

Der muskarinerge M₂-Rezeptor - Theoretische Betrachtungen des Bindungsmodus orthosterischer und allosterischer Liganden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kirstin Jöhren

aus Köln

Düsseldorf 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Gutachter Univ. Prof. Dr. H.-D. Höltje

2. Gutachter Univ. Prof. Dr. P. Proksch

Tag der mündlichen Prüfung 30. Januar.2004

Diese Arbeit wurde als elektronische Dissertation veröffentlicht.

URL: <http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2004/joehren.html>

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2000 bis November 2003 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje für die Überlassung des interessanten Themas, die hilfreichen Diskussionen und Anregungen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. K. Mohr danke ich für die gute Zusammenarbeit, die Überlassung der experimentellen Daten und für viele hilfreiche Gespräche. Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Uta Voigtländer, Alexandra Raasch, Marion Mohr und Stefanie Prilla für den unkomplizierten Austausch der experimentellen Ergebnisse und die Beantwortung meiner Fragen.

Herrn Prof. Dr. P. Proksch danke ich herzlich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	VORBEMERKUNG.....	9
1.2	G-PROTEIN GEKOPPELTE REZEPTOREN	9
1.2.1	<i>Aufbau und Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....</i>	<i>10</i>
1.2.2	<i>Signaltransduktion.....</i>	<i>16</i>
1.2.3	<i>Basalaktivität und konstitutiv aktive GPCRs</i>	<i>18</i>
1.2.4	<i>Interaktionen zwischen Rezeptoren.....</i>	<i>19</i>
1.3	MUSKARINERGE REZEPTOREN	20
1.3.1	<i>Einordnung der muskarinergen Rezeptoren.....</i>	<i>20</i>
1.3.2	<i>Eigenschaften und Expression der Subtypen.....</i>	<i>21</i>
1.3.3	<i>Liganden der muskarinergen Rezeptoren</i>	<i>25</i>
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	35
3	METHODEN.....	39
3.1	QUANTENCHEMIE	41
3.2	SEMI-EMPIRISCHE PROZEDUREN	43
3.3	KRAFTFELD-VERFAHREN	43
3.4	KONFORMATIONSANALYSE.....	48
3.5	GEOMETRIEOPTIMIERUNG	50
3.6	MOLEKÜLDYNAMIKSIMULATION	51
3.7	HOMOLOGIE MODELLING	52
3.7.1	<i>Sekundärstruktur-Vorhersageprogramme</i>	<i>53</i>
3.7.2	<i>Loop-Search-Routinen</i>	<i>55</i>
3.7.3	<i>Seitenketten-Rotamerbibliotheken.....</i>	<i>56</i>
3.8	ANALYSE-PROGRAMME	58
3.8.1	<i>NMRCLUST</i>	<i>58</i>
3.8.2	<i>SURFNET</i>	<i>58</i>
3.8.3	<i>Sekundärstruktur Analyse</i>	<i>59</i>
3.8.4	<i>Wechselwirkungspotential.....</i>	<i>59</i>

4	DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE	63
4.1	AUFBAU EINES M ₂ -REZEPTORMODELLS.....	65
4.1.1	<i>Sequenzalignment.....</i>	65
4.1.2	<i>Modellieren der extrazellulären Bereiche.....</i>	76
4.1.3	<i>Modellieren der intrazellulären Bereiche.....</i>	78
4.2	VALIDIERUNG DES REZEPTORMODELLS	80
4.2.1	<i>Moleküldynamiksimulationen im Vakuum.....</i>	80
4.2.2	<i>Moleküldynamiksimulationen in einer membranähnlichen Umgebung.....</i>	87
4.2.3	<i>Moleküldynamiksimulationen in einer Phospholipidmembran.....</i>	95
4.2.4	<i>Konformationsvergleich</i>	102
4.3	REZEPTOR-LIGAND-KOMPLEXE	109
4.3.1	<i>Bindungstasche orthosterischer Liganden.....</i>	109
4.3.2	<i>Ternäre Komplexe</i>	135
4.3.3	<i>AF-DX 384 – W84-Hybride</i>	155
4.4	MUTATIONSSTUDIEN AN DER ALLOSTERISCHEN BINDUNGSSTELLE.....	160
4.4.1	<i>Punktmutation von Threonin 423 zu Histidin</i>	161
4.4.2	<i>Punktmutation von Tyrosin 177 zu Glutamin</i>	167
5	DISKUSSION	177
5.1	REZEPTORMODELL	179
5.2	REZEPTOR-LIGAND-KOMPLEXE	184
5.3	MUTATIONSSTUDIEN	193
5.4	AUSBLICK	195
6	ZUSAMMENFASSUNG	197
7	LITERATUR	201
8	ANHANG.....	218

1 EINLEITUNG

1.1 Vorbemerkung

Untersuchungen zum Verständnis der Arzneistoffwirkungen stehen seit langem im wissenschaftlichen Interesse der pharmazeutischen und medizinischen Forschung. Neben der Suche nach dem molekularen Wirkungsmechanismus einer Substanz stellt die rationale Optimierung d.h. die Verringerung von unerwünschten Wirkungen oder eine bessere Wirksamkeit ein wichtiges Ziel der Forschung dar. Die Aufklärung der Zielstrukturen eines Wirkstoffes bietet dafür eine wichtige Voraussetzung. Gerade in der letzten Dekade sind durch den exponentiellen Anstieg der aufgeklärten Proteinstrukturen viele neue Erkenntnisse hinzugekommen, die eine zunehmend solidere Basis für die Entwicklung von Modellen bieten. Das Verständnis der molekularen Vorgänge auf Rezeptorebene kann mit Hilfe von Molecular Modelling Techniken kann zu immer besseren Vorstellungen über die Wirkung von Arzneistoffen und die Regelmechanismen im menschlichen und tierischen Organismus beitragen. Stets muss jedoch berücksichtigt werden, dass Modelle immer nur ein mögliches – mehr oder minder genaues - Abbild der Wirklichkeit geben. Jedes Modell muss durch experimentelle Befunde abgesichert und überprüft werden. Berücksichtigt man jedoch diese Einschränkung der Bedeutung eines Proteinmodells, können über die Visualisierung des Proteins und der Arzneistoff-Wechselwirkungen mit dem Protein Erklärungen und neue Einsichten abgeleitet werden.

1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind der Angriffspunkt von hunderten von Arzneistoffen z.B. Antihistaminika, Neuroleptika, Antidepressiva und Antihypertensiva [1].

Große Bedeutung besitzen diese membranständigen Proteine auch für die Kommunikation mit der Umwelt. GPCRs sind an allen Prozessen der Sinneswahrnehmung beteiligt. Die GPCR-Superfamilie, mit über eintausend Proteinen, ist nicht nur pharmakologisch bedeutend, sondern stellt auch die größte bisher bekannte Proteinfamilie dar [2,3]. Bisher wurden im humanen Genom schon etwa 450 für GPCRs kodierende Gensequenzen identifiziert.

Allgemeine Aufgabe der GPCRs ist es, Signale, die die Zelle von außen erreichen, in das Innere weiterzuleiten.

Der Typ dieser Stimuli reicht von einem Lichtquant, über Ionen, biogene Amine, Nukleotide, Lipide, Peptide und Glykoproteine bis zu Proteasen [4].

Auch wenn die genaue Funktion der einzelnen Proteine häufig noch unbekannt ist, gemeinsam ist allen GPCRs die Möglichkeit der Bindung und Aktivierung eines intrazellulär vorhandenen, heterotrimeren G-Proteins [5].

1.2.1 Aufbau und Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Trotz geringer Sequenzhomologie untereinander, besitzen G-Protein gekoppelte Rezeptoren eine sehr ähnliche Makrostruktur. Sie bestehen aus sieben transmembranären Bereichen (TM), die hauptsächlich eine α -helikale Struktur besitzen und gebündelt die Membran durchdringen.

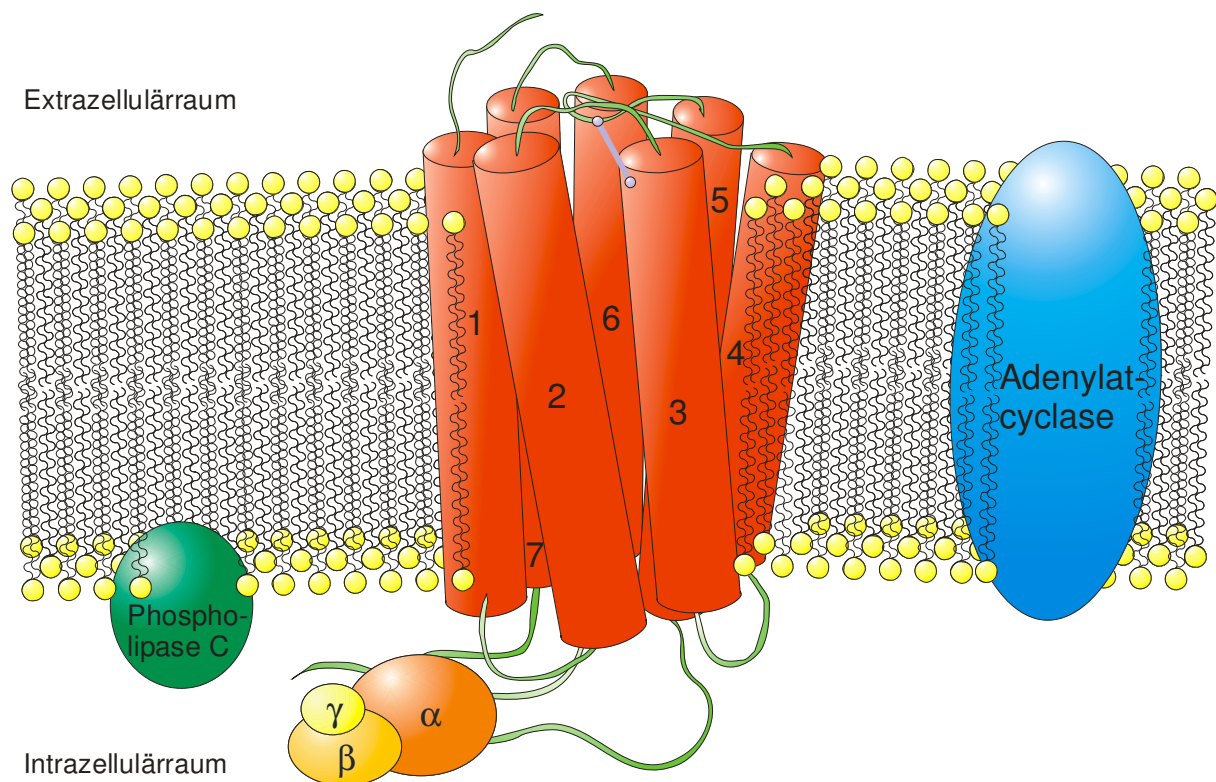


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors

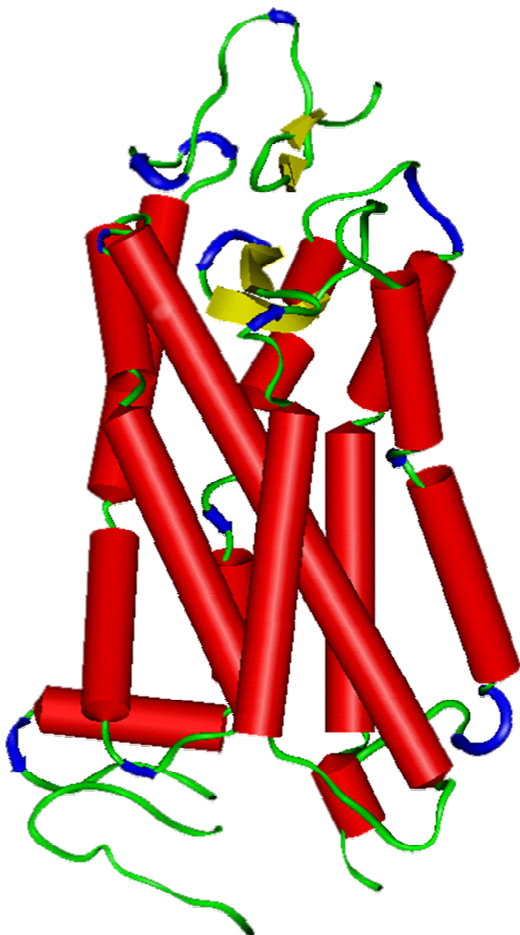
Die transmembranären Helices, dargestellt als rote Zylinder, werden entgegen dem Uhrzeigersinn nummeriert. Sie durchdringen die Membran vom extrazellulären N-Terminus aus siebenmal und enden im intrazellulären C-Terminus. Verbindende Loopbereiche sowie N-Terminus und C-Terminus sind als grüne Schleifen dargestellt. Zusätzlich wird der Rezeptor über eine intramolekulare Disulfidbrücke (violett) zwischen dem zweiten extrazellulären Loop und Helix 3 stabilisiert. Die Kopplung mit dem G-Protein findet im Intrazellulärraum im Bereich zwischen drittem intrazellulären Loop und C-Terminus statt. Dadurch können Effektorsysteme wie die Adenylatcyclase oder die Phospholipase C moduliert werden.

Als Verankerung des Rezeptors in der Membran fungieren positiv geladene, basische Aminosäuren, die mit den negativen Kopfgruppen der Phospholipide der Membran über Salzbrücken wechselwirken. Die helikalen Bereiche werden jeweils durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Loops miteinander verbunden.

Der N-Terminus befindet sich im Extrazellulärraum, der C-Terminus im Cytosol. Eine Stabilisierung der Anordnung wird sowohl durch interhelikale Kontakte als auch durch eine Disulfidbrücke zwischen der dritten Helix und dem zweiten extrazellulären Loop erreicht. Die Bindung des G-Proteins erfolgt am dritten intrazellulären Loop und am C-Terminus.

Die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur des bovinen Rhodopsins, die erstmals im Jahr 2000 gelang, brachte Einsicht in die Mikrostruktur eines GPCRs [6,7].

Es wurde deutlich, dass die transmembranären Bereiche keineswegs ideale Helices sind, sondern dass die vorhandenen Abweichungen sogar eine Bedeutung für die Funktion des Proteins besitzen (Abbildung 1-2). Eine Störung der α -helikalen Strukturen ist auch in anderen GPCRs, die nur eine geringe Homologie zum Rhodopsin aufweisen, aus funktionellen Gründen sehr wahrscheinlich. Diese Vermutung wird mittlerweile durch Mutationsstudien an unterschiedlichsten GPCRs zunehmend bestätigt [8- 10].



Ein weiteres auffälliges Strukturelement in der Kristallstruktur des Rhodopsins ist das Beta-Faltblattbündel, das durch den N-Terminus und den zweiten extrazellulären Loop gebildet wird. Diese Anordnung hat eine recht hohe Stabilität dieser Bereiche zur Folge.

Aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede werden GPCRs in die Familien A – E eingeteilt [11].

Abbildung 1-2: Kristallstruktur des Rinderrhodopsins (PDB 1HZX)

Dargestellt ist die Sekundärstruktur eines Monomeres. Die transmembranären Helices sind als rote Zylinder, Beta-Faltblätter als gelbe Pfeile, Beta-Turns als blaue Pfeile und der Coiled-Coil-Bereich als grünes Band dargestellt.

1.2.1.1 Familie A

Die Familie A stellt die größte und am besten untersuchte Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren dar. Aufgrund phylogenetischer Untersuchungen kann die Familie in sechs Unterfamilien eingeteilt werden (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Unterfamilien der Familie A

1	Rezeptoren für biogene Amine (Adrenalin, Histamin, Acetylcholin, Dopamin)
2	Rezeptoren für Neuropeptid-Hormone und Wirbeltier-Opsine
3	Rezeptoren für Bradykinin und Nicht-Wirbeltier-Opsine
4	Rezeptoren für Adenosin, Cannabinoide, Melanocortine, Geruchsrezeptoren
5	Rezeptoren für Chemokine, Opiode, Eicosanoside, Peptid-Hormone, Glykoprotein-Hormone
6	Nicht klassifizierte Rezeptoren: Melatonin-Rezeptor und andere

Die genauesten Kenntnisse innerhalb dieser Familie besitzt man über Rhodopsin aus der Unterfamilie 2 und den β_2 -Rezeptor aus Unterfamilie 1. Als beschreibender Name dieser Familie hat sich daher die Bezeichnung rhodopsinartige GPCRs eingebürgert.

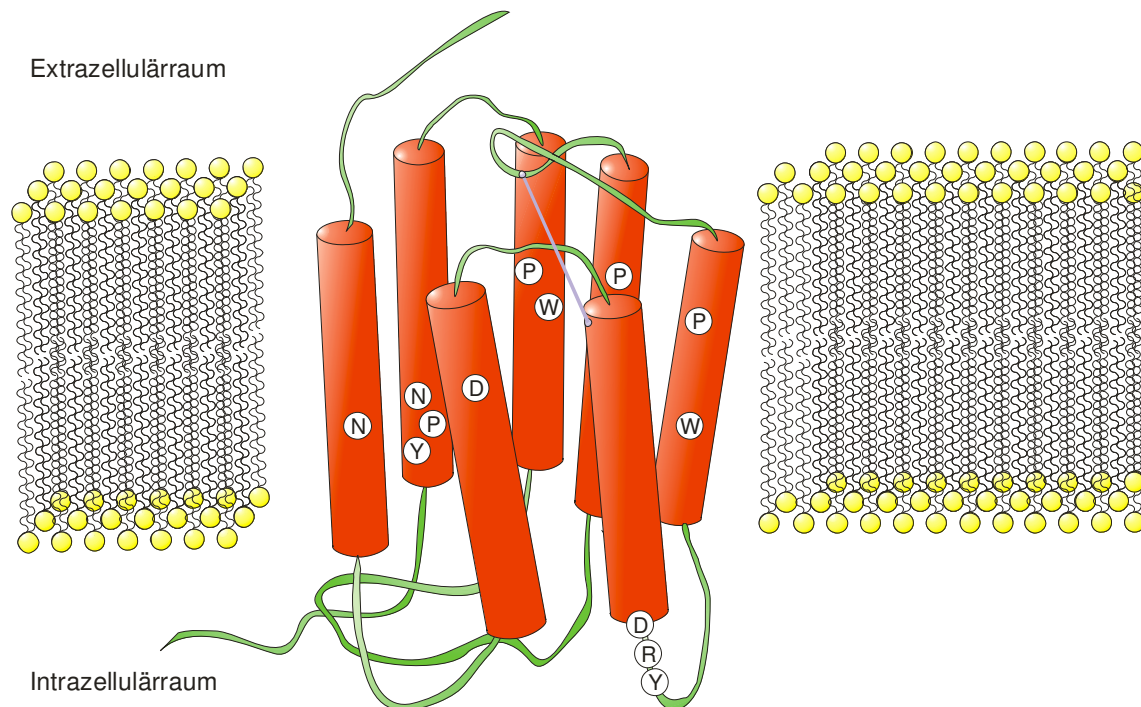


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung eines GPCRs der Familie A

Die hochkonservierten Aminosäuren sind nach ihrer Lage in den Helices hervorgehoben.

Die Sequenzhomologie dieser Familie ist relativ gering und beschränkt sich, bis auf ein Cystein im zweiten extrazellulären Loop, auf einige dem Cytosol nahe Aminosäuren. Die hohe Konservierung dieser wenigen Aminosäuren lässt aber auf eine große funktionelle oder strukturelle Bedeutung schließen. Auffälligste Konservierung innerhalb der Familie A ist ein Arginin am cytosolischen Ende von TM III innerhalb des so genannten DRY-Motifs, das entweder aus Asp-Arg-Tyr oder Glu-Arg-Tyr besteht [12-16].

1.2.1.2 Familie B

Familie B enthält fünfzehn Unterfamilien mit annähernd zwanzig bekannten Rezeptoren für eine Reihe von Peptiden und Neuropeptiden. Dazu gehören unter anderem Calcitonin, der Corticoliberin, das Somatoliberin und Sekretin. Daher wird diese Familie auch als Familie der Sekretin-ähnlichen GPCRs bezeichnet.

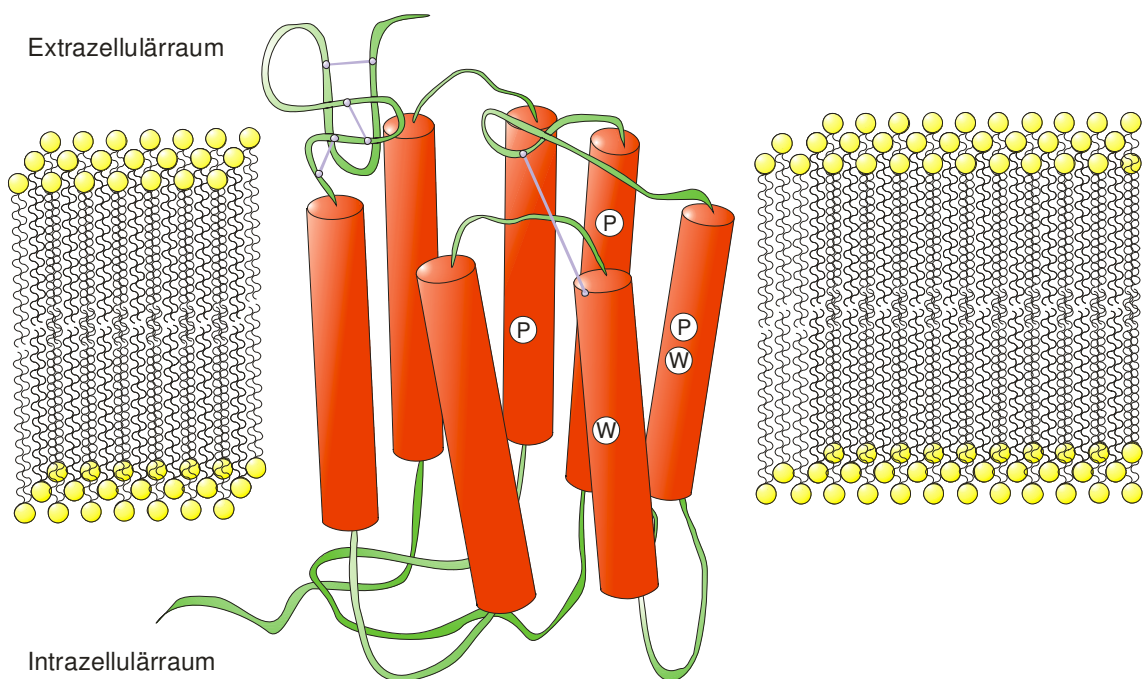


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung eines GPCRs der Familie B

Diese Familie besitzt einen langen Cystein-reichen N-Terminus, der über Disulfidbrücken stabilisiert wird. Konservierte Aminosäuren sind in ihrer Lage im Rezeptor gekennzeichnet.

Die Konservierungen der Helices, wie sie in Familie A vorhanden sind, fehlen in Familie B. Auffällig dagegen ist der sehr lange N-Terminus, der mehrere Cysteine enthält, die in der Lage sind, ein Netz von Disulfidbrücken auszubilden.

1.2.1.3 Familie C

Zur Familie C gehören die metabotropen Glutamat-Rezeptoren und die Pheromonrezeptoren, die der Familie auch den Namen geben. Daneben werden auch GABA_B-Rezeptoren, Calciumrezeptoren und Geschmacksrezeptoren zur Familie C gezählt.

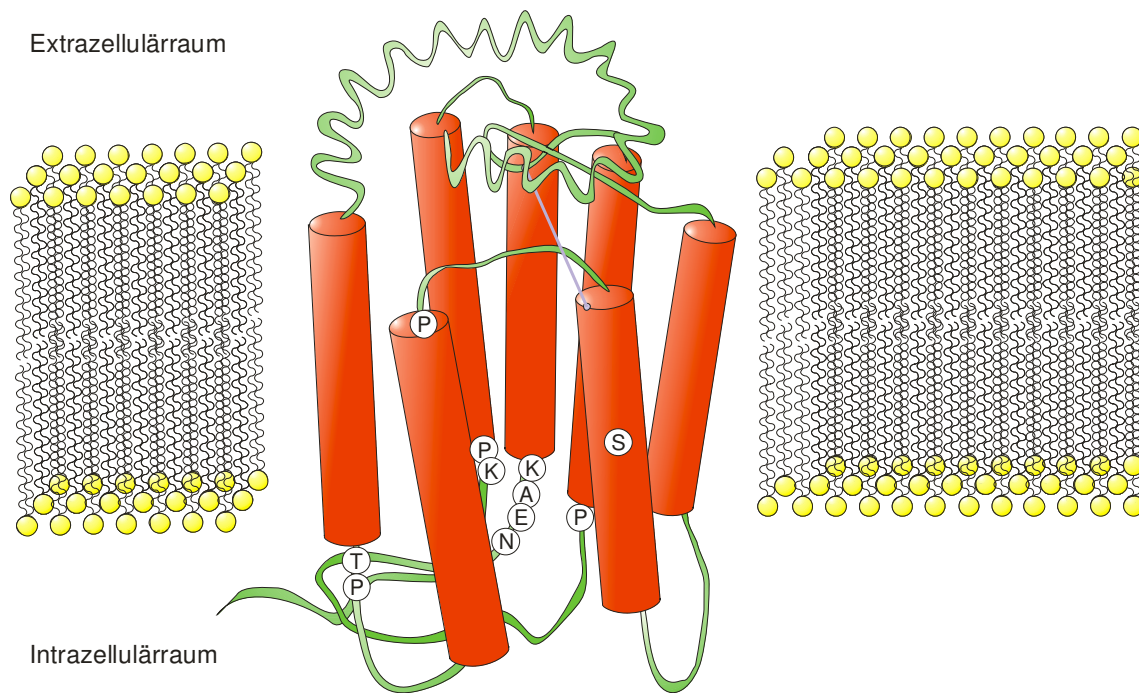


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung eines GPCRs der Familie C

Diese Familie besitzt einen langen N-Terminus, der wahrscheinlich die Ligandbindungsdomäne enthält. Die hochkonservierten Aminosäuren sind in ihrer Lage im Rezeptor gekennzeichnet.

Als gemeinsames strukturelles Merkmal besitzen alle Rezeptoren dieser Familie einen außergewöhnlich langen N-Terminus. Im Falle der metabotropen Glutamatrezeptoren ähnelt die vermutliche Sekundärstruktur des N-Terminus der Glutamatbindungsstelle von bakteriellen periplasmatischen Proteinen, so dass die Bindungsstelle wahrscheinlich in diesem Bereich liegt. Zusätzlich wurde kürzlich am metabotropen Glutamat 1 Rezeptor eine interhelikale allosterische Bindungsstelle entdeckt, die über ein rhodopsin-basiertes 7-Helix-Modell visualisierbar ist [17].

1.2.1.4 Familien D, E und F

Neben den oben beschriebenen großen Familien der GPCRs existieren noch weitere kleinere. Rezeptoren der Familie D existieren in Pilzen und Hefen und binden Pheromone. Familie E wird aus vier Rezeptoren der Amöbe *Dictyostelium discoideum* gebildet. Die Opsine der Archebakterien bilden die Familie F.

1.2.2 Signaltransduktion

Die Reizübertragung erfolgt bei GPCRs in mehreren Schritten. Zunächst stabilisiert ein Agonist die aktive Rezeptor-Konformation so, dass ein G-Protein (Guanin-Nucleotid-bindendes Protein) andocken kann. Dieses heterotrimere Protein besteht aus der $G\alpha$ -, $G\beta$ - und der $G\gamma$ -Untereinheit. Aus der $G\alpha$ -Untereinheit wird nun GDP freigesetzt. Der ternäre Komplex aus Agonist, GPCR und G-Protein ist hochaffin für GTP, das die Guanin-Nukleotid-Bindungsstelle in der $G\alpha$ -Untereinheit besetzt. Diese Aktivierung von $G\alpha$ führt zur Abspaltung der $G\beta\gamma$ -Untereinheiten, die assoziiert bleiben. Beide G-Protein-Untereinheiten ($G\alpha$ und $G\beta\gamma$) können verschiedene Effektorsysteme regulieren. Nach Bindung am Zielenzym werden so lange *second messenger*¹ gebildet, bis die $G\alpha$ -Untereinheit spontan GTPase-Aktivität erlangt, so dass das gebundene GTP zu GDP dephosphoryliert wird und die α -Untereinheit zum inaktiven Zustand zurückkehrt. Sie dissoziiert vom Enzym ab und assoziiert wieder mit den β - und γ -Untereinheiten zum Heterotrimer (Abbildung 1-6).

Für die Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit spielt die Phosphorylierung bestimmter Serine und Threonine im intrazellulären Bereich des Rezeptors eine große Rolle. Sie wird durch verschiedene *second messenger*¹ abhängige Kinasen katalysiert und hat einen sofortigen Abbruch der Signalübertragung zur Folge.

In Abhängigkeit vom G-Protein werden unterschiedliche Effektorsysteme, wie die Adenylatcyclase, Phospholipasen, Phosphodiesterasen oder auch Ionenkanäle aktiviert. Eine Übersicht über die $G\alpha$ -Protein-Klassen und ihre Signaltransduktionswege gibt Tabelle 2.

Tabelle 1-2: Klassen der $G\alpha$ -Untereinheiten

G_s	Stimuliert die Adenylatcyclase, moduliert Ca^{2+} - und Na^+ -Kanäle
G_i	Hemmt die Adenylatcyclase, aktiviert cGMP-Phosphodiesterase, öffnet K^+ -Kanäle, schließt Ca^{2+} -Kanäle
G_q	Aktiviert die Phospholipase C
G_{12}	Stimuliert das Zellwachstum

Über indirekte Wege der Signalweiterleitung ist es möglich, ein äußeres Signal nicht nur nach innen weiterzuleiten, sondern es auch zu verstärken, da ein aktivierter Rezeptor mehrere G-Proteine binden und aktivieren kann. Auch die aktivierten Effektorsysteme können zu einer Effektverstärkung beitragen, da sie hunderte bis tausende *second messenger*¹ Moleküle freisetzen können [18]. Eine weitere Möglichkeit zur Regelung der Signalstärke bietet die Veränderung der Rezeptordichte z.B. durch Internalisierung oder verstärkte Expression (*Up / Down Regulation*).

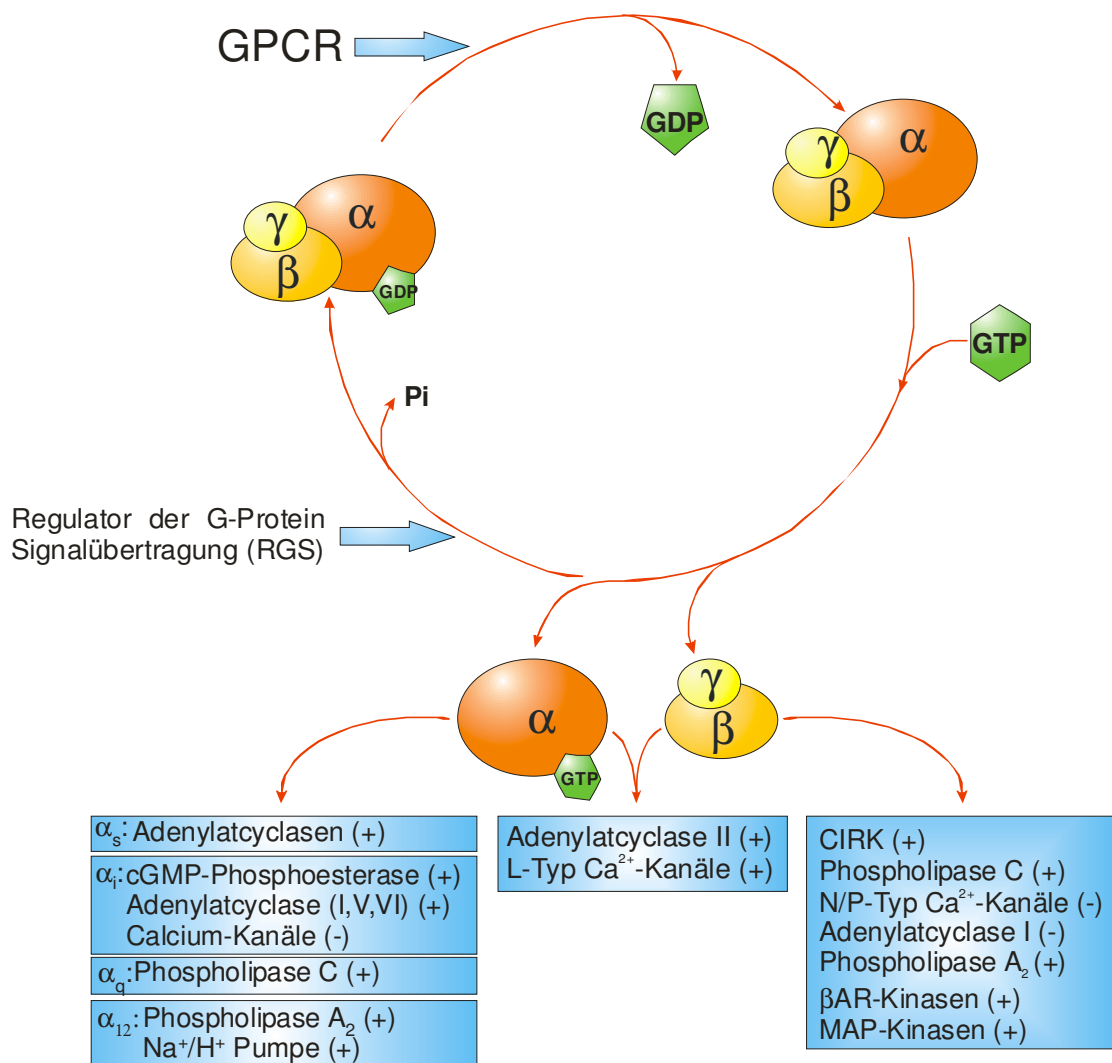


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Signaltransduktion:

Die verschiedenen G-Protein-Untereinheiten lösen unterschiedliche Effekte aus. Ein (+) bedeutet eine Aktivitätszunahme des jeweiligen Zielproteins, ein (-) eine Aktivitätsabnahme.

¹ *second messenger* sind Botenstoffe, die Signale eines Rezeptors oder Kanals weiterleiten. Beispiele für solche Substanzen sind Inositoltriphosphat (IP3), Stickstoffmonoxid (NO) und cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP).

In Abbildung 1-6 ist der allgemeine, vereinfachte Weg der Signaltransduktion dargestellt [19,20]. Es gibt aber zahlreiche Besonderheiten in den unterschiedlichen Familien der GPCRs, so z.B. die Aktivierung des Rhodopsins durch ein Lichtquant.

Die molekularen Grundlagen der Signalübertragung sind noch weitgehend ungeklärt. Eine Bedeutung für die Signaltransduktion der Familie A scheint den Aminosäuren des DRY-Motivs am cytoplasmatischen Ende von Helix 3 zuzukommen [21]. Das konservierte Aminosäuremotiv N/DPXXXY in Helix 7 ist ebenfalls wichtig für die Funktion eines rhodopsinartigen GPCRs, besitzt aber wohl eher Bedeutung für die Struktur, da es für einen direkten Einfluss zu weit vom Interzellularraum entfernt ist. Mutationsstudien im dritten intrazellulären Loop deuten darauf hin, dass in diesem Bereich über die Art des bindenden G-Proteins entschieden wird [22-26].

1.2.3 Basalaktivität und konstitutiv aktive GPCRs

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene Signaltransduktion behandelt den G-Protein gekoppelte Rezeptor als in einer inaktiven Form vorliegend. Eine Zellantwort lässt sich jedoch auch ohne Stimulation durch einen Agonisten messen. Daraus lässt sich ableiten, dass sich der inaktive (R) und der aktive (R*) Zustand der GPCRs in einem Gleichgewicht befinden, mit einer leichten Verschiebung zur aktiven Seite hin. Bei den beiden Zuständen handelt es sich also nicht um statische vorhandene Konformationen, sondern um ein dynamisches Verhältnis d.h. der einzelne Rezeptor wechselt laufend seinen Zustand von R zu R* und umgekehrt. Wird durch Mutation der Wechsel von der inaktiven in die aktive Form erleichtert oder der Wechsel von R* nach R erschwert, so erhält man die ebenfalls bekannten konstitutiv aktiven Rezeptoren. Diese besitzen eine deutlich erhöhte Basalaktivität, die durch Agonisten aber noch steigerbar ist [28-30]. In diesem Fall ist das ursprüngliche Gleichgewicht zwischen R und R* zur aktiven Seite hin verschoben. Ebenso sind Mutationen bekannt, die die konstitutive Aktivität verringern [31-38]. Einen weiteren Hinweis auf ein solches Gleichgewicht geben inverse Agonisten, die die Basalaktivität bis auf Null absenken, und damit das Gleichgewicht in Richtung R verschieben. Ein Antagonist bewirkt in diesem erweiterten ternären Modell eine Stabilisierung des Gleichgewichtes auf dem Niveau der Basalaktivität.

Analog zu der oben beschriebenen Gleichgewichtsverschiebung verhalten sich auch die partiellen Agonisten bzw. partielle inverse Agonisten.

1.2.4 Interaktionen zwischen Rezeptoren

In den letzten Jahren wurden immer wieder Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen GPCRs gefunden [39-41]. So konnten für die Familien A-C in den Jahren 1998-2000 über Immunoprecipitation bzw. Kristallographie Homodimere nachgewiesen werden. Die Stabilität dieser Dimere kann durch Agonisten entweder stabilisiert werden, z.B. bei β_2 -Rezeptoren, oder auch destabilisiert werden wie im Falle des δ -Opioid-Rezeptors. Neben den Homodimeren wurden durch Immunoprecipitation auch Heterodimere identifiziert. Sie bestehen aus mehr oder weniger nah verwandten Rezeptortypen. So bildet der δ -Opioid-Rezeptor sowohl mit dem nah verwandten μ -Opioid-Rezeptor als auch mit β_2 -Rezeptoren Heterodimere. Hinweise auf eine Dimerisierung existieren auch für die muskarinergen Rezeptoren [42]. Der genaue Mechanismus einer Dimerbildung sowie die Dimerisationsstellen sind noch ungeklärt. Ebenso unklar ist die Funktion der Rezeptordimere: Spielen sie eine Rolle für die Internalisierung und/ oder beeinflussen sie die Rezeptorfunktion? Die Klärung dieser Fragen wird in den nächsten Jahren mit Sicherheit weitere Einsicht in die physiologischen Aktivierungsmechanismen G-Protein gekoppelter Rezeptoren geben.

1.3 Muskarinerge Rezeptoren

Acetylcholin-Rezeptoren wurden im Jahre 1914 erstmals vom Nobelpreisträger Sir Henry Dale in zwei Klassen unterteilt. Der Effekt des Acetylcholins konnte bei der einen Klasse durch Nikotin, bei der anderen Klasse durch Muskarin imitiert werden. In den folgenden Jahrzehnten wurden die nikotinergeren und muskarinergen Rezeptoren als Mitglieder von zwei Superfamilien (Ionenkanäle und GPCRs) identifiziert. Die Reizweiterleitung über die Synapsen erfolgt nach unterschiedlichen Mechanismen. Die nikotinergeren Acetylcholin-Rezeptoren stellen Ionenkanäle für Ca^{2+} -, K^+ - oder Na^+ -Ionen dar und beeinflussen so direkt das Membranpotential. Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren koppeln zunächst an ein G-Protein und leiten den Reiz dann über einen *second messenger* weiter. Kürzlich wurde die Struktur eines nikotinergeren Acetylcholin-Rezeptors mit einer Auflösung von 4Å von Miyazawa, Fujiyoshi und Unwin aufgeklärt [43, PDB 1OED]. Für die muskarinergen Rezeptoren existiert keine solche Kristallstruktur, so dass hier Modelle für die Erklärung molekularer Vorgänge benutzt werden.

1.3.1 Einordnung der muskarinergen Rezeptoren

Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) gehören zur Unterfamilie der rhodopsinartigen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und bilden mit anderen Rezeptoren, die biogene Amine binden, die Unterfamilie 1. Sie besitzen je nach Subtyp ein Molekulargewicht zwischen 50–67 kDa. Zunächst konnte man zwei unterschiedliche Typen komplementärer DNA (cDNA) aus Herz und Gehirn klonen. Heute unterscheidet man fünf Subtypen, die ubiquitär in fast allen Geweben und Muskeln im menschlichen und tierischen Organismus vorhanden sind [44-46]. Durch Expression der einzelnen Subtypen konnten die identifizierten Gensequenzen den pharmakologischen Typen zugeordnet werden, so dass Sequenz m_1 dem M_1 -Rezeptor entspricht. Die Nomenklatur erfolgt nun einheitlich als M_1 - M_5 . Die Gensequenzierung bietet auch die Möglichkeit, die Verwandtschaft der muskarinergen Rezeptoren untereinander zu untersuchen [47,48].

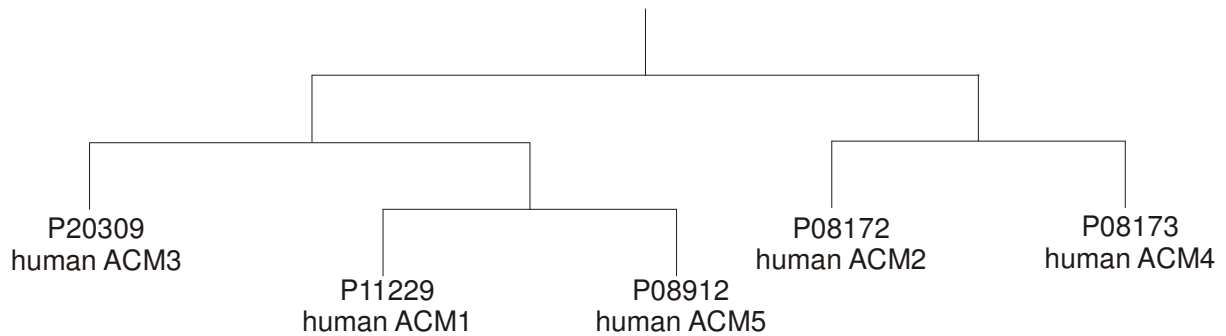


Abbildung 1-7: Phylogenetischer Baum der humanen muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren

Im Verlauf dieser molekularbiologischen Untersuchungen konnten auch neue Erkenntnisse über die Funktion der einzelnen muskarinergen Rezeptoren erlangt werden.

1.3.2 Eigenschaften und Expression der Subtypen

Muskarin-Rezeptoren können in Abhängigkeit von dem gebundenen G-Protein bei unterschiedlichen Zelltypen eine Vielzahl von Funktionen modulieren. Auf zellulärer Ebene beeinflussen sie unter anderem die Aktivität verschiedener Ionenkanäle (M_1 - M_5) [49], aktivieren die Phospholipase A_2 und Phospholipase D und stimulieren die NO-Synthetase (M_1 , M_3 , M_5) [50]. Außerdem können M_1 - bzw. M_2 -Rezeptoren das Wachstum und die Differenzierung der Zellen durch Modulation der Raf-Kinase (M_1 , M_2) steuern [51]. Die physiologische Bedeutung dieser zumeist mit rekombinanten Rezeptoren gewonnenen Ergebnisse ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren findet man sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem sowie in vielen Organen des vegetativen Nervensystems. Als Beispiele seien hier nur Herz, Atemwege, Gastrointestinal-Trakt, Blase, Niere und das Auge genannt. Trotz der weiten Verbreitung der muskarinergen Rezeptoren lassen sich durch pharmakologische und molekularbiologische Untersuchungen Subtyp-Präferenzen für einzelne Organe bzw. beobachtete Effekte bestimmen. Die Charakterisierung der einzelnen Subtypen in Geweben und Organen ist jedoch recht komplex, da überwiegend mehrere Subtypen nebeneinander exprimiert werden und diese sich auch im beobachteten Effekt gegenseitig beeinflussen [52-56]. Eine Übersicht über Lokalisation und Effekte gibt Tabelle 1-3.

Tabelle 1-3: Vorkommen und Effekt der muskarinergen Rezeptoren

	Subtypen				
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Lokalisation	ZNS (Kortex, Hippocampus), Drüsen, Ganglien	ZNS (Hirnstamm), Herz, glatte Muskulatur	ZNS, Drüsen, Glatte Muskulatur (Darm, Bronchien)	ZNS (Vorderhirn, Striatum), Uterus, Lunge	ZNS (Substantia nigra)
Effekt	Inhibierung von Ionenkanälen (KM-Typ)	Aktivierung von K ⁺ -Kanälen (βγ-Untereinheit), Inhibierung von Ca ²⁺ -Kanälen, negativ inotrop, negativ chronotrop	Kontraktion der glatten Muskulatur, Tonuserhöhung, Drüsensekretion, NO-Freisetzung	Inhibierung von Ca ²⁺ -Kanälen	

Die Subtypen lassen sich durch ihr Kopplungsverhalten an G-Protein-Typen in zwei Klassen einteilen: Während die Gruppe aus M₁, M₃ und M₅ Rezeptor G-Proteine der Gruppe G_q und G₁₁ bindet, bildet die Gruppe aus M₂ und M₄ Rezeptor ternäre Komplexe mit den inhibitorischen G-Proteinen der Klassen G_i und G₀.

1.3.2.1 M₁, M₃ und M₅ Rezeptor

Die Subtypen M₁, M₃ und M₅ induzieren die Aktivierung der Phospholipase C und damit die Bildung von Inositol-Triphosphat (IP₃). Diese Aktivierung wirkt im Allgemeinen stimulierend und ist mit einer Neurotransmitter-Ausschüttung verbunden. Dementsprechend ist diese Subtyp-Gruppe vor allem postsynaptisch lokalisiert, wo sie eine Rolle für die Modulation der synaptischen Signalübertragung und metabotroper Funktionen spielt [57].

1.3.2.1.1 M₁ mAChRs

Die Untergruppe der M₁ Rezeptoren wird in Geweben nur in geringem Umfang gefunden. Eine deutliche Expression findet in den Speicheldrüsen und den sympathisch innervierten Ganglien statt. Im Vorderhirn, d.h. im cerebralen Kortex, im Hippocampus und im Striatum, beträgt der Anteil an muskarinergen M₁-Rezeptoren zwischen 40 und 50 % der gesamten muskarinergen Rezeptoren.

Der Rezeptordichte im jeweiligen Zielorgan entsprechend bewirken Agonisten in der Peripherie eine Erhöhung von Blutdruck und Herzschlag, sowie eine Verminderung der Speichelsekretion. Im zentralen Nervensystem wird vor allem die Lernfähigkeit durch eine verringerte Rezeptordichte ungünstig beeinflusst [58,59]. Bei vollständig fehlender M_1 -Expression lassen sich im Tierexperiment keine agonist-induzierten Krämpfe mehr hervorrufen. Auf molekularer Ebene führte ein Test an *Knockout*² Mäusen zu einem vollständigen Fehlen der IP_3 -Hydrolyse sowie auch der Stimulation der MAP-Kinase.

1.3.2.1.2 M_3 mAChRs

M_3 -Rezeptoren sind, im Gegensatz zu den M_1 -Rezeptoren, nur in mäßiger Anzahl im zentralen Nervensystem zu finden. Eine hohe Rezeptoranzahl findet sich dagegen in den glatten Muskelzellen des Gastrointestinal- und Urogenital-Traktes, der exokrinen Drüsen und auch im Auge.

Die Kontraktion der glatten Muskulatur wird überwiegend durch den M_3 -Subtyp vermittelt [60]. Vermutlich wird dieser Effekt durch eine Erhöhung der Freisetzung von Stickstoffmonoxid ausgelöst [50]. Eine weitere diskutierte Funktion dieses Subtyps ist die Modulation des Speichelflusses, wobei hier aber auch die anderen muskarinergen Rezeptortypen eine, wenn auch weniger bedeutsame, Rolle spielen. Die durch Antagonisten über den M_3 -Rezeptor vermittelte Pupillenerweiterung ordnet eine, seit langem bekannte, lokale, parasymphatische Wirkung des Atropins einem Rezeptortyp zu. Agonisten regeln die Pupillengröße über den Sphinctertonus.

M_3 -*Knockout* Mäuse zeigen außerdem eine deutlich geringere Nahrungsaufnahme, sowie ein um 25% reduziertes Gewicht mit weniger Fettreserven, bei normaler Größe.

² Bei den *Knockout* Mäusen handelt es sich um genetisch veränderte, gesunde Tiere, die nur einen speziellen Subtyp der muskarinergen Rezeptoren nicht exprimieren können. Alle Tiere unterscheiden sich genetisch nur geringfügig, so dass die beobachteten Effekte auf das fehlende Gen bzw. Protein zurückgeführt werden können.

1.3.2.1.3 M_5 mAChR

Die Lokalisation der M_5 -Rezeptoren im menschlichen und tierischen Organismus gestaltet sich besonders schwierig, da ihr Gesamtanteil an den muskarinergen Rezeptoren nur 2% beträgt. Erst kürzlich gelang es Tuček *et al.* die mRNA und darüber die Expression des M_5 -Subtyps sowohl im Herzen als auch im Gehirn zu quantifizieren. [53]

Die häufige Beobachtung der Co-Expression des M_5 -Rezeptors mit dem Dopamin D_2 -Rezeptor, führte zur Vermutung, dass der muskarinerge Rezeptor zur Dopaminfreisetzung aus den Nervenendigungen beiträgt. Ein Effekt auf die Ausschüttung von Dopamin wurde zwar im Tierexperiment über Hirnstrommessungen beobachtet, eine Auswirkung auf die Motorik der Tiere war aber nicht erkennbar [61].

1.3.2.2 M_2 und M_4 Rezeptor

Die vor allem inhibitorisch wirkenden Subtypen M_2 und M_4 koppeln mit G-Proteinen der Klassen G_i und G_o . Diese Proteine bewirken eine Verminderung der Adenylatcyclase-Aktivität und damit eine Reduktion der cAMP-Spiegel. Zusammen mit der präsynaptischen Lokalisation dieser muskarinergen Rezeptoren deutet diese Eigenschaft auf eine regulatorische Funktion für die Neurotransmitter-Ausschüttung hin, wobei sowohl funktionelle Eigenschaften eines Autorezeptors³ als auch eines Heterorezeptors⁴ festgestellt wurden.

1.3.2.2.1 M_2 mAChR

In den glatten Muskelzellen und im Herz stellen M_2 -Rezeptoren einen großen Anteil der muskarinergen Rezeptoren. Der Anteil im Hirn ist deutlich geringer, beträgt im Kortex aber immerhin etwa 21% der mRNA [53]. Im Herz findet eine Expression vor allem im Vorhofmyokard und in den Schrittmacherzellen statt, so dass nach Aktivierung ein negativ chronotroper bzw. negativ inotroper Effekt ausgelöst wird.

³ Autorezeptoren reagieren auf den entsprechenden in der Synapse freigesetzten Botenstoff im Sinne einer negativen Rückkopplung.

⁴ Heterorezeptoren reagieren mit den Neurotransmittern anderer ebenfalls an der Synapse lokalisierten Rezeptoren.

Der negativ chronotrope Effekt wird möglicherweise durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins vermittelt und bewirkt eine Leitfähigkeitserhöhung an K^+ -Kanälen, wodurch die diastolische Depolarisation verlangsamt wird. Die negativ inotrope Wirkung kann auf die Inhibierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, infolge der erniedrigten cAMP-Konzentration, zurückgeführt werden. Im Hirn erfolgt nach Aktivierung des muskarinergen Systems eine Acetylcholin-Freisetzung aus den Nervenendigungen. Im Tierversuch zeigte sich, dass die Freisetzung über K^+ -Kanäle erfolgt, wobei der M_2 -Rezeptor im Kortex und Hippocampus dominiert, während im Striatum der M_4 -Rezeptor vorherrscht. Der M_2 -Rezeptor ist sowohl für die Regelung der Körperwärme als auch für die Analgesie mitverantwortlich. Agonist-induziertes Ganzkörperzittern wurde in M_2 -*Knockout* Mäusen komplett verhindert. Auch die Erhöhung des Serum Corticosteronspiegels durch bestimmte muskarinerge Agonisten wurde im $M_2^{(-/-)}$ -Genotyp nicht beobachtet [62-65].

1.3.2.2 M_4 mAChR

Muskarinerge M_4 -Rezeptoren befinden sich vor allem in der Lunge, in den Speicheldrüsen und im Ileum. Im Hirn findet sich dieser Subtyp im Hippocampus, im Kortex und vor allem im Striatum. Eine sehr kleine Rezeptoranzahl konnte aber auch im Kleinhirn und im Hirnstamm festgestellt werden. Die peripheren Effekte des M_4 -Rezeptors sind gering und noch nicht genau identifiziert. Für die zentralen Effekte wurde eine Kopplung mit den dopaminergen D_1 - und D_2 -Rezeptoren festgestellt, die zu einer antagonist-induzierten Förderung der Beweglichkeit führt [66].

1.3.3 Liganden der muskarinergen Rezeptoren

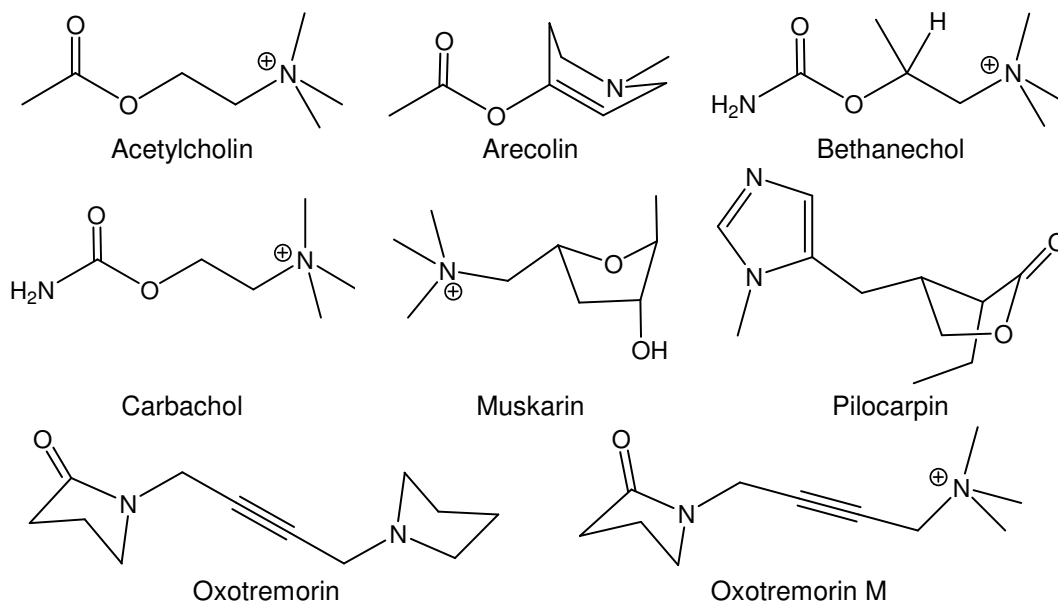
Die Wirkung von Acetylcholin auf muskarinerge Rezeptoren war 1921 verantwortlich für die Entdeckung des ersten Neurotransmitters durch Otto Loewi. Er stellte fest, dass eine Substanz aus dem Nervus Vagus auf ein isoliertes Herz eine Verlangsamung der Herzfrequenz bewirkt. Die Entdeckung einer weiteren, allosterischen Bindungsstelle dauerte noch bis ins Jahr 1976. Hier gelang der funktionelle Nachweis der allosterischen Modulation durch Gallamin an arteriellen muskarinergen Rezeptoren [67]. Alle muskarinergen Rezeptoren besitzen diese beiden Bindungsstellen, unterscheiden sich aber deutlich in der Affinität der jeweiligen Agonisten und Antagonisten sowie auch im jeweiligen Effekt [68].

1.3.3.1 Klassische Liganden

Die klassischen Muscarin-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten werden, gemäß ihres primären Angriffsortes am Parasympathikus, auch als direkte Parasympathomimetika bzw. direkte Parasympatholytika bezeichnet. Der Wirkungsmechanismus dieser Liganden entspricht dem schon zuvor dargestellten erweiterten ternären Modell der GPCR-Aktivierung. Neben dem endogenen Agonisten Acetylcholin (ACh), wirken auch verschiedene pflanzliche Alkaloide auf den Parasympathikus erregend.

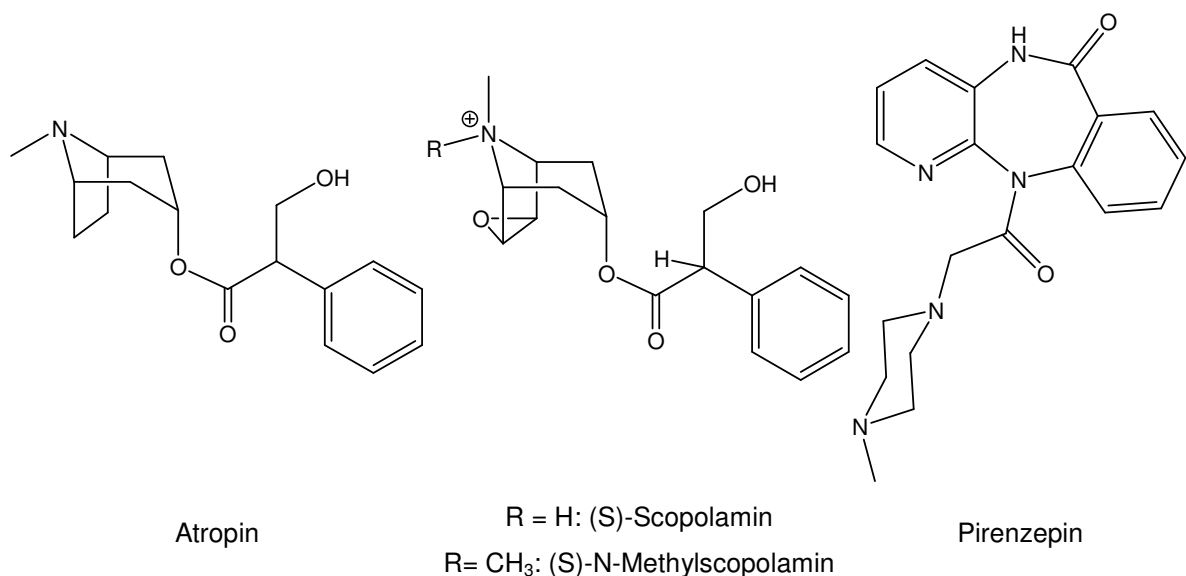
Beispiele für solche Substanzen sind: Arecolin, das Hauptalkaloid der Betelnuss (*Areca catechu*), Muscarin aus *Amanita muscaria*, sowie auch Pilocarpin aus *Pilocarpium jaborandi*. Aus der lokalen Anwendung dieser Substanzen als Miotika oder der systemischen Anwendung bei Blasenatonie ergab sich die Notwendigkeit synthetischer bzw. partialsynthetischer Derivate mit verbesserter Wirkung bzw. weniger unerwünschten Wirkungen. Carbachol und Bethanechol sind strukturell nah verwandt mit dem Acetylcholin. Für experimentelle Untersuchungen wird als Ligand auch Oxotremorin bzw. Oxotremorin M (Oxo M) verwendet (Tabelle 1-4).

Tabelle 1-4: Klassische Agonisten der muskarinergen Rezeptoren



Die direkten Parasympatholytika lassen sich nochmals in zwei Klassen unterteilen: die Belladonna-Alkaloidartigen und eine heterogene Gruppe synthetischer Substanzen (Tabelle 1-5). Atropin, Alkaloid aus *Atropa belladonna*, *Datura stramonium* oder *Hyoscyamus niger*, entsteht erst durch Racemisierung des S-Hyoscyamins bei der Isolierung aus der Droge. Es wird aufgrund seiner starken zentralen Wirkungen und der geringen therapeutischen Breite nur noch als Mydriatikum eingesetzt, wobei es auch hier zunehmend durch weniger lang anhaltend wirksame Substanzen wie z.B. Homatropin oder Tropicamid ersetzt wird. Es ist jedoch ein unverzichtbares Antidot bei der Therapie der Organophosphat-Vergiftung. Ein weiteres antagonistisch wirkendes Alkaloid aus *Atropa belladonna* ist das Scopolamin, das seine Anwendung sowohl lokal am Auge als auch als Pflaster gegen Reiseübelkeit findet. Überwiegend lokal wirksame Antagonisten werden durch eine Quaternärisierung des Tropan-Stickstoffs durch Einführung verschiedener Substituenten erhalten. Ein solches Derivat des Scopolamins ist das N-Methylscopolamin (NMS). In der experimentellen Pharmakologie wird Tritium-markiertes N-Methylscopolamin ($[^3\text{H}]\text{NMS}$) als Radioligand eingesetzt. Pirenzepin ist ein Vertreter der synthetischen Antagonisten der muskarinergen Rezeptoren. Sein Anwendungsgebiet ist die Ulkus-Therapie. Hierbei ist auffällig, dass Pirenzepin eine Präferenz für M_1 -Rezeptoren gegenüber den M_2 / M_3 -Rezeptoren zeigt.

Tabelle 1-5: Klassische Antagonisten der muskarinergen Rezeptoren



Gemeinsames Merkmal aller Substanzen ist jeweils mindestens ein protonierbarer bzw. quartärer Stickstoff sowie eine Wasserstoffbrücken-akzeptierende Funktion. Deutliche Unterschiede zwischen den Agonisten und den Antagonisten findet man dagegen im Volumen der jeweiligen Moleküle.

Die als klassische oder auch orthosterische Liganden bezeichneten Substanzen binden an der, zwischen den muskarinergen Subtypen hochkonservierten Bindungsstelle des Acetylcholins. Diese Bindungsstelle befindet sich im oberen Drittel zwischen den transmembranären Helices. Als wichtige Epitope für die Agonist- bzw. Antagonistbindung wurden Aspartat 3.32⁵, die Tyrosine 3.33, 6.51, die Threonine 5.39 und 5.42, Serin 3.36, Alanin 5.46 sowie die Asparagin 6.52 identifiziert [69-74].

1.3.3.2 Allosterische Modulatoren

Die allosterischen Modulatoren besitzen eine eigene Bindungsstelle, die räumlich benachbart, aber klar abgegrenzt zur orthosterischen liegt. Eine genaue Identifizierung der wichtigen Aminosäuren für die jeweiligen Modulatoren ist schwierig, da sich die Bindungsstelle in den flexiblen Loop-Regionen bzw. am Beginn der transmembranären Helices befindet. Zusätzlich unterscheiden sich die wichtigen Aminosäuren auch je nach Modulator bzw. es wird auch eine zweite allosterische Bindungsstelle diskutiert [76-80].

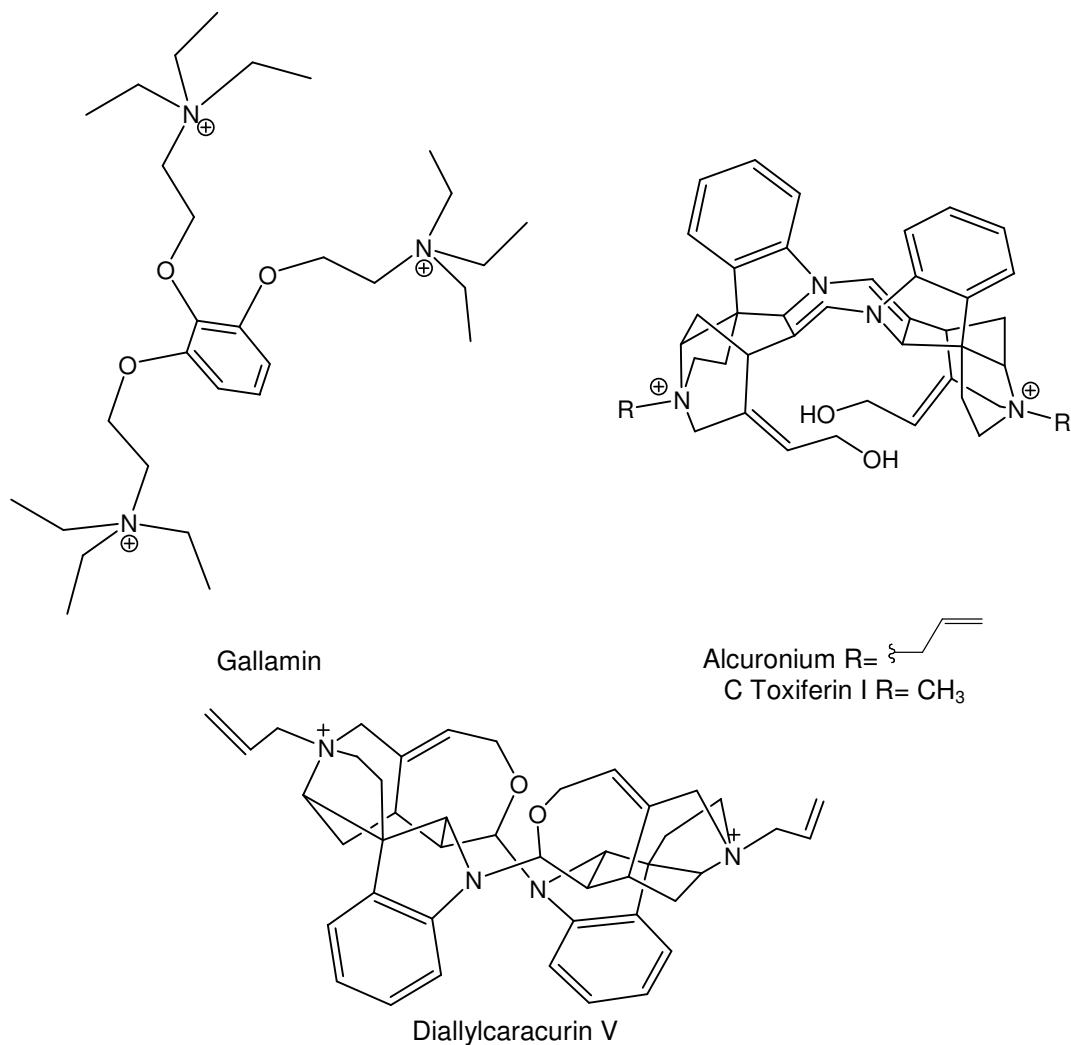
Der älteste bekannte allosterische Modulator ist das Gallamin. Seine allosterische Potenz an muskarinergen Rezeptoren wurde an Meerschweinchenherzen gezeigt. Angewendet wird es als stabilisierendes Muskelrelaxans, wobei diese Wirkung auf die ebenfalls vorhandene antagonistische Wirkung auf nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren zurückzuführen ist [82-85].

Weitere Substanzen sind Inhaltsstoffe der Pfeilgifte südamerikanischer Indianer z.B. Tubocurarin aus *Chondodendrum tomentosum* und C-Toxiferin I aus *Strychnos toxifera*. Alcuronium, einer der potentesten allosterischen Modulatoren, gehört wie C Toxiferin I zu den quartären Bisindolalkaloiden [86].

⁵ Da die beschriebenen Aminosäuren in allen Subtypen des M-Rezeptors, vorliegen wurde die allgemeingültige Nomenklatur nach van Rhee und Jacobson verwendet [75]. Die Zahl vor dem Punkt kennzeichnet die transmembranäre Helix, die Zahl dahinter die Position der Aminosäure. Die Position 50 kennzeichnet dabei jeweils die in allen GPCRs in diesem Abschnitt am stärksten konservierte Aminosäure.

Diese beiden Substanzen unterscheiden sich nur in der Substitution der beiden quartären Stickstoffe. Die Entwicklung weiterer allosterischer Modulatoren geht von dem verwandten Indolalkaloid Caracurin V aus. Das N,N-Diallyl-substituierte Derivat Diallylcaracurin V zeigt eine ähnliche Affinität zum M_2 -Rezeptor wie Alcuronium, aber eine schwächere muskelrelaxierende Wirkung. Die Affinität der Caracurin V-Derivate ist stark abhängig von ihrer Substitution [87]. Auch andere strukturell verwandte Alkaloide zeigen allosterische Effekte an muskarinergen Rezeptoren. Strychnin, Brucin und Vincamin sind ebenfalls Indolalkaloide, die dem Strychnan-Typ bzw. dem Eburnan-Typ zugeordnet sind. Die Affinität dieser Substanzen ist allerdings deutlich geringer als bei den „Dimeren“ Alcuronium und Diallylcaracurin V [88]. Erzeugt man partialsynthetisch Strychnin- und Brucin-Dimere, so erreicht man, je nach Substitution, eine ähnliche Affinität zum M_2 -Rezeptor wie Alcuronium [89]. Eine Übersicht der strukturellen Eigenschaften dieser Substanzen gibt Tabelle 1-6.

Tabelle 1-6: Allosterische Modulatoren des Indol-Typs

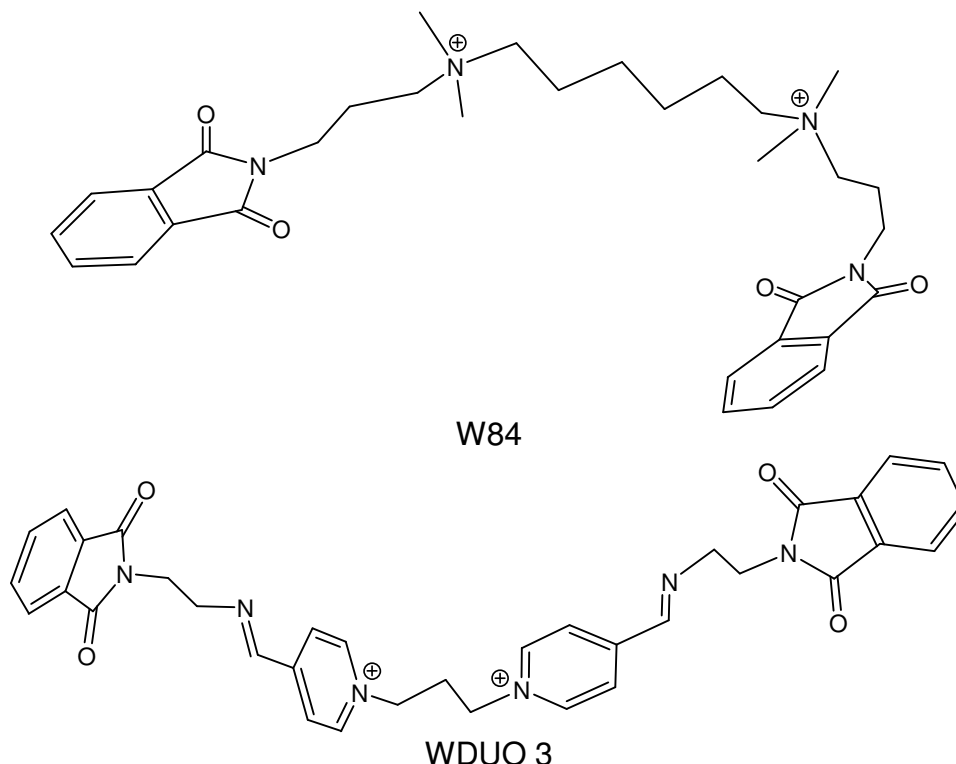


Eine strukturell vollkommen andere Gruppe allosterischer Modulatoren wurde in den Arbeitskreisen Lüllmann und Holzgrabe synthetisiert. Die Ausgangsstruktur bildet jeweils der Ganglienblocker Hexamethonium [90,91]. Es zeigte sich, dass durch die Ersetzung einer Methylgruppe am quartären Stickstoff durch einen lipophilen Rest die Affinität zu den Nicotin-Rezeptoren gesenkt und umgekehrt die Affinität zur allosterischen Bindungsstelle der Muskarin-Rezeptoren erhöht wird.

W84 zeigt eine ähnliche Affinität zur allosterischen Bindungsstelle wie Alcuronium und Diallylcaracurin V.

Der Einsatz dieser Substanz als Radioalloster ist günstiger als bei den vorgeannten, da die Synthese vollsynthetisch erfolgt und daher der Austausch von Wasserstoff gegen Tritium leichter möglich ist. Eine genauere Diskussion der Struktur-Wirkungs-Beziehungen erfolgt später. Beispiele für diese Substanzklasse zeigt Tabelle 1-7.

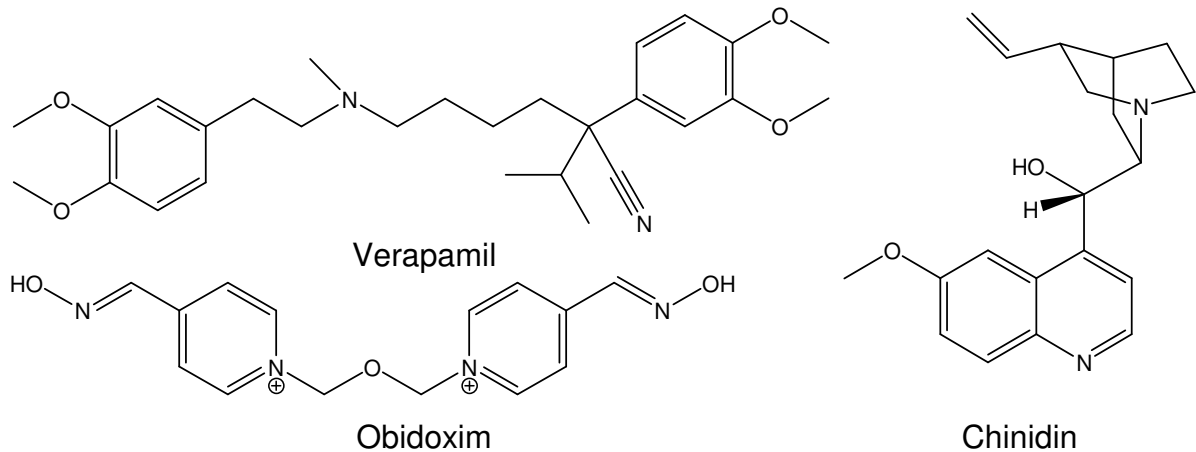
Tabelle 1-7: Vollsynthetische allosterische Modulatoren



Neben diesen beiden Gruppen von allosterischen Modulatoren gibt es noch weitere. Die erste Gruppe bilden Substanzen, die eine andere therapeutische Bedeutung haben, aber auch als Allosterer wirken. So zeigen der Calcium-Kanalblocker Verapamil, der Acetylcholinesterase-Reaktivator Obidoxim und die Klasse IA

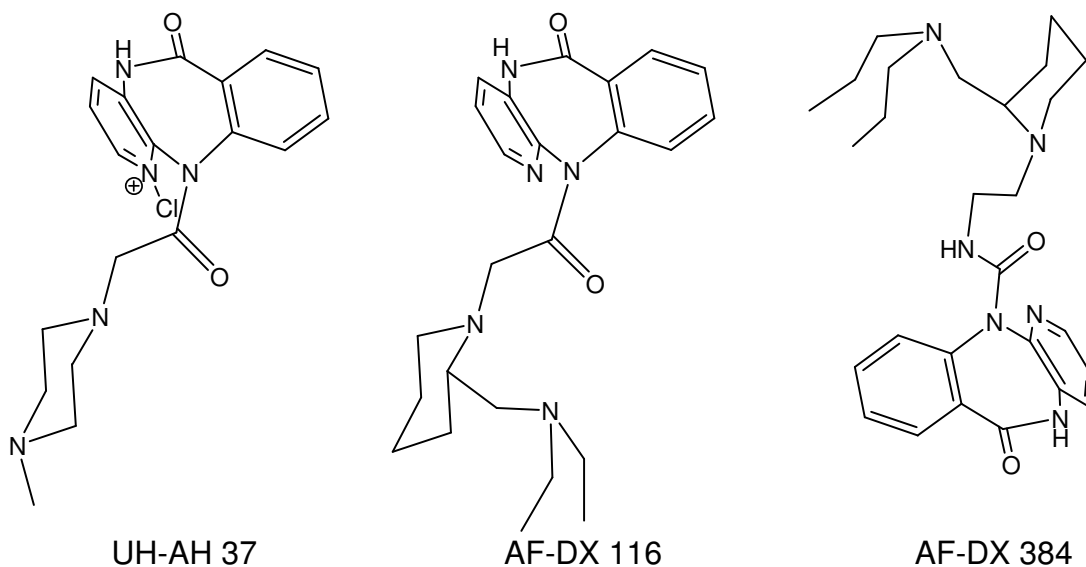
Antiarrhythmikum Chinidin eine schwache allosterische Wirkung am muskarinergen M_2 -Rezeptor (Tabelle 1-8).

Tabelle 1-8: Allosterische Modulatoren mit anderer therapeutischer Bedeutung



Die Gruppe der Pirenzepin-ähnlichen Substanzen zeigt nicht nur Bindungsvermögen an der allosterischen Bindungsstelle sondern zeigt auch eine Verdrängung orthosterischer Liganden aus der Bindungsstasche. Zu diesen Substanzen zählen, neben Pirenzepin, UH-AH 37, AF-DX 116 und AF-DX 384 (Tabelle 1-9). Sie zeigen eine unterschiedliche Affinität zum freien bzw. besetzten Rezeptor, wobei die Affinität zum freien Rezeptor überwiegt [92,93].

Tabelle 1-9: Pirenzepin-ähnliche allosterische Modulatoren



Substanzen, die an einer möglichen zweiten allosterischen Bindungsstasche ihre Wirkung zeigen, sind Staurosporin, Tacrin, DUO3 [79]. Möglicherweise unterscheiden sich die „gemeinsame“ und die „zweite“ allosterische Bindungsstelle aber nur in den für die jeweilige Ligandbindung wichtigen Aminosäuren.

1.3.3.3 Vorstellungen zur allosterischen Modulation

Clark und Mitchelson postulierten 1976 einen allosterischen Mechanismus der antagonistischen Wirkung für Gallamin [67]. Sie stützten ihr Postulat auf den experimentellen Befund, dass Gallamin die agonistische Wirkung von Acetylcholin weniger vermindert als für einen kompetitiven Antagonisten erwartet. Außerdem stellten sie fest, dass Gallamin die antagonistische Wirkung von Atropin vermindert. Ein Befund, der ebenfalls gegen eine kompetitive Hemmung spricht. Weitere Untersuchungen bestätigten diese Hypothese [94-96]

Von einem allosteren System spricht man, wenn sich zwei an räumlich getrennten Bindungsstellen andockende Liganden gegenseitig in ihrem Effekt beeinflussen. Im Falle einer räumlich benachbarten Position der beiden Bindungstaschen ist auch eine gegenseitige direkte Beeinflussung der Liganden vorstellbar. Eine gute Modellvorstellung für die Vorgänge bei der allosterischen Modulation stellt das erweiterte ternäre Komplexmodell dar. Das Modell beinhaltet vier Rezeptorzustände: den freien Rezeptor, den Rezeptor mit gebundenem Orthoster, den Rezeptor mit gebundenem Alloster und den Rezeptor mit gebundenen Orthoster und Alloster. Abbildung 1-8 stellt die Verbindung dieser Formen miteinander durch die Gleichgewichtskonstanten K_1 - K_4 dar, wobei die Konstanten unabhängig von der Richtung des Prozesses sind [97,98].

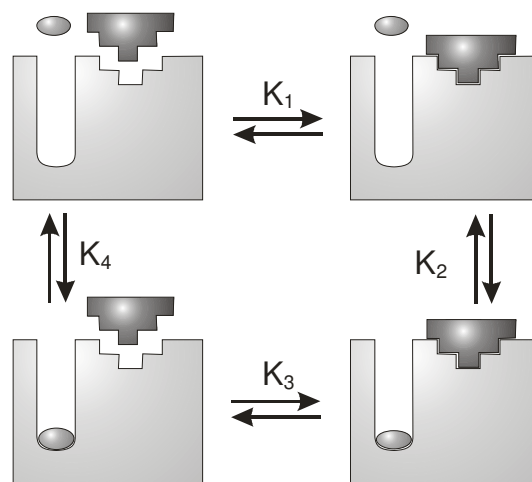


Abbildung 1-8 Erweitertes ternäres Komplexmodell

Die Geschwindigkeitskonstanten $K_1 - K_4$ bestimmen den beobachteten allosterischen Effekt.

Durch die gegenseitige Beeinflussung der Bindungsstellen unterscheiden sich die Bindungskonstanten K_1 und K_3 bzw. K_2 und K_4 . Der Kooperationsgrad α , berechnet als Verhältnis K_3/K_1 und K_4/K_2 , ist wegen der wechselseitigen Beeinflussung gleich. Wenn die Affinität des allosterischen Liganden zum besetzten Rezeptor höher ist als zum freien Rezeptor, so ist $\alpha < 1$ und man spricht von positiver Kooperativität. Im umgekehrten Fall d.h. $\alpha > 1$, ist die Affinität zum freien Rezeptor geringer als zum Orthoster besetzten (Abbildung 1-9). Im Falle einer positiven Kooperativität wird der orthosterisch vermittelte Effekt verstärkt, bei negativer Kooperativität dagegen abgeschwächt. Einen Sonderfall stellt die neutrale Kooperativität dar, bei der der orthosterisch ausgelöste Effekt unbeeinflusst bleibt. Für die Bindungskonstanten bedeutet dies $K_1=K_3$ und $K_2=K_4$.

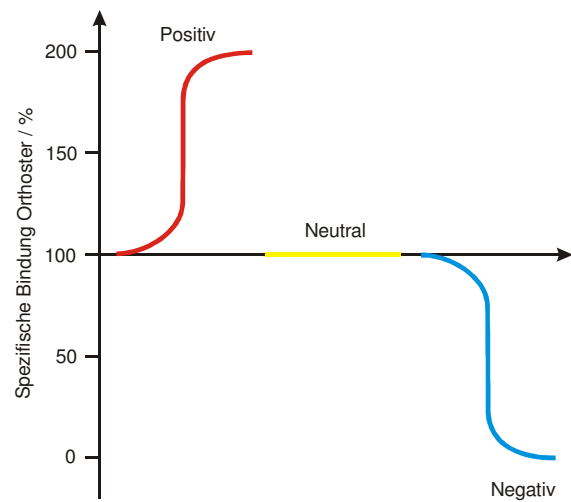


Abbildung 1-9: Einfluss der Kooperativität auf die Gleichgewichtsbindung

Diese Darstellung der allosterischen Modulation zeichnet ein für die Erklärung der Bindungsstudien unterschiedlicher Liganden brauchbares Bild. Die Beeinflussung der Rezeptorgeometrie und die Eigenschaften in Bezug auf die G-Protein-Bindung bleiben dabei jedoch unberücksichtigt.

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Der muskarinerge M_2 -Rezeptor ist für physiologische Funktionen am Herzen, in der glatten Muskulatur und im Gehirn verantwortlich. Eine subtypselektive Aktivierung oder Hemmung der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren ist über die orthosterische Bindungsstelle aufgrund der hohen Konservierung in diesem Rezeptorbereich jedoch nur bedingt möglich. Der Einsatz allosterischer Modulatoren bietet einen Ansatzpunkt für die Entwicklung subtypselektiver Liganden. Ebenfalls denkbar ist der additive Einsatz solcher Modulatoren mit unselektiven Liganden, um so die unerwünschten Wirkungen zu vermindern.

Im ersten Teil der Arbeit sollte ein vollständiges Homologie-Modell des muskarinergen M_2 -Rezeptors erstellt werden. Als Grundlage dafür diene die erste Röntgen-Kristallstruktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors aus einem Säugetier: das bovine Rhodopsin. Die Rezeptorgeometrie sollte danach unter unterschiedlichen Simulationsbedingungen überprüft werden. Dabei sollte untersucht werden, ob sich die Ergebnisse einer Moleküldynamiksimulation unter geeigneten Vakuumbedingungen mit den etwas natürlicheren Bedingungen eines Wasser-Tetrachlorkohlenstoff-Systems bzw. einer Phospholipidmembran vergleichen lassen.

Der zweite Teil der Arbeit sollte zunächst die Position der orthosterischen Liganden in der Bindungsstelle untersuchen. Hierzu lagen bei Beginn der Arbeit einige Mutationsdaten vor, die die Bindungstasche gut identifizieren. Als nächster Schritt sollte der Bindungsmodus von strukturell diversen allosterischen Modulatoren untersucht werden. Hierbei sollten die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten am *N*-Methylscopolamin-besetzten Rezeptor über ein Rezeptor-basiertes Pharmakophormodell erklärt werden können.

Im dritten Teil der Arbeit sollten, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor K. Mohr, wichtige Aminosäuren für die M_2 -Subtypselektivität der allosterischen Modulatoren identifiziert werden. Hierzu wurden virtuelle Punktmutationen herangezogen, die parallel zu den realen Mutationen untersucht werden sollten.

3 METHODEN

3.1 Quantenchemie

Die Quantenchemie, ein Teilgebiet der theoretischen Chemie, beschäftigt sich mit der Anwendung der Quantenmechanik auf chemische Probleme. So ist es möglich, sowohl Molekülgeometrien und –eigenschaften als auch chemische Reaktionen zu beschreiben.

Die Grundlage der Quantenchemie ist die Schrödinger-Gleichung:

$$\bar{H}\Psi = E\Psi$$

\bar{H} : Hamilton Operator

Gleichung 3-1

ψ : Wellenfunktion

E: Energie des Zustandes

Bei den so genannten *ab initio* Methoden werden außer den Fundamentalkonstanten nur die Kernladungen der beteiligten Atome berücksichtigt. Ein Molekül ist demnach über seine Atomkerne und Elektronen, die Kernkonfiguration und die Multiplizität definiert. Bei den semiempirischen Verfahren werden dagegen viele der zu berechnenden Integrale aus empirischen Parametern abgeleitet (s. Kapitel 3.2).

Als Lösung der Schrödinger-Gleichung erhält man die Wellenfunktion eines Systems, aus der die Eigenschaften eines Moleküls abgeleitet werden können. Eine genaue Lösung ist aber nur für das Wasserstoffatom möglich. Um auch für größere Moleküle *ab initio* Berechnungen durchführen zu können, wurden verschiedene Näherungen z.B. die Self Consistent Field (SCF)-Methode eingeführt. Bei der von Hartree und Fock entwickelten Methode sind drei Näherungen berücksichtigt [99,100]:

1. Born-Oppenheimer-Näherung:

Die Kernbewegung ist im Verhältnis zur Bewegung der Elektronen gering, weil Protonen und Neutronen wesentlich höhere Masse besitzen. Eine Vernachlässigung der kinetischen Energie der Kernpartikel bedeutet daher nur einen geringen Fehler in der Lösung der Schrödinger-Gleichung. Durch dieses Verfahren erhält man die so genannte elektronische Schrödinger-Gleichung, wobei der Kern noch mit einem konstanten Term für die potentielle Energie berücksichtigt wird.

2. Hartree-Fock-Näherung:

Die Wellenfunktion aller Elektronen wird als Summe der Produkte der einzelnen Wellenfunktionen betrachtet. Hierbei werden die Elektron-Elektron-Wechselwirkungen durch ein Feld ersetzt, das sich im Zuge der Berechnung verfeinert. Für jedes Elektron wird die Wechselwirkung mit der Summe aller anderen Elektronenorbitale berechnet und daraus ein neues Orbital für das jeweils betrachtete Elektron generiert. Verändert sich das Potential der Elektronen nur noch in einem vorher definierten Bereich, so sind sie selbstkonsistent und die Berechnung endet [101]. Nachteil dieser Methode ist, dass die Elektronenkorrelation vernachlässigt wird. Eine Berücksichtigung, wie z.B. bei der Møller-Plesset-Störungstheorie (MP2), geht jedoch mit einem deutlichen Anstieg der Rechenzeit einher.

3. Linearkombination von Atomorbitalen (LCAO):

Die Molekülorbitale werden bei Verwendung des SCF-Verfahrens als Linearkombination der entsprechenden Atomorbitale betrachtet. Dies hat den Vorteil, dass nur noch die Koeffizienten der Atomorbitale variiert werden müssen, um zur Selbstkonsistenz zu gelangen. Andererseits hat es aber auch den Nachteil, dass die Genauigkeit der Methode stark vom Basissatz, d.h. von der Anzahl der berücksichtigten Atomorbitale abhängt.

Der Basissatz gibt die Anzahl der Gaußfunktionen an, die für die Berechnung genutzt werden. Ein 3-21G-Basissatz stellt die inneren Schalen als kontrahierte Gaußfunktion dar, die durch die Linearkombination von drei primitiven Gaußfunktionen gebildet wird. Die Valenzschalen werden dem entsprechend durch eine kontrahierte Gaußfunktion, erhalten durch Linearkombination von zwei primitiven Gaußfunktionen, und eine primitive Gaußfunktion dargestellt. Um eine genauere Berechnung zu erhalten ist es sinnvoll, die energetisch niedrig liegenden, unbesetzten d-Orbitale mitzuberechnen. Hieraus lassen sich dann Deformationen der p-Orbitale ableiten. Die Einbeziehung einer solchen Deformations-Funktion wird durch einen Stern symbolisiert z.B. 6-31G*. Im Laufe einer quantenchemischen Geometrieoptimierung wird die Kernkonfiguration leicht verändert, um ein Energieminimum in der Wellenfunktion zu erreichen. Die Optimierung ist abgeschlossen, sobald die Energie konstant bleibt. Zur Bestimmung von Hybridisierungszuständen wurde in der vorliegenden Arbeit ein 6-31G**-Basissatz benutzt.

3.2 Semi-empirische Prozeduren

Die Semi-empirischen Verfahren nutzen grundsätzlich die gleichen Methoden wie *ab initio* Strategien. Zur Vereinfachung der Berechnungen werden hier jedoch nur die Orbitale der Valenzelektronen exakt berechnet, weil sie für viele chemische Eigenschaften des Moleküls verantwortlich sind. Viele andere Werte, die sonst die Lösung von sehr zeitaufwändigen Integralen erfordern, werden aus empirischen Daten abgeschätzt. Eine solche Näherung erlaubt die Berechnung wesentlich größerer Moleküle in deutlich geringerer Zeit als dies mit *ab initio* Methoden möglich ist.

Die Methoden unterscheiden sich in der Art der Näherungen und der verwendeten empirischen Datensätze, aus denen die entsprechenden Parameter abgeleitet werden. Verbreitete Methoden sind PM3, *Parametric Method Number 3*, und AM1, *Austin Model 1*. Zur genaueren Beschreibung der Verfahren s. [102]

Die Ladungsberechnung für die Liganden wurde mit Hilfe der AM1-Methode durchgeführt. Diese erwies sich als am besten geeignet, da die Ladungen den quantenchemischen Berechnungen für die entsprechenden Fragmente am ähnlichsten sind.

3.3 Kraftfeld-Verfahren

Die exponentielle Zunahme der Rechenleistung in den letzten Jahren ermöglicht es immer mehr Moleküle mit *ab initio* oder semi-empirischen Methoden zu berechnen. Dennoch liegen die Grenzen, betreffend der Atomanzahl bzw. auch der Genauigkeit der Berechnung, immer noch weit unterhalb der Größe von Biopolymeren. Methode der Wahl zur Simulation von Proteinen sind hier die verschiedenen Kraftfeld-basierenden Verfahren.

Alle Kraftfelder berechnen den Energieinhalt eines Moleküls nach den Gesetzen der klassischen Mechanik. Die Atome werden als Massepunkte betrachtet, die Bindungen besitzen, im einfachsten Fall, die Eigenschaften von Federn. Die Festigkeit der Bindungen wird durch verschiedene Kraftkonstanten wiedergegeben. Man erhält daher ein System, das nach dem Hook'schen Gesetz, aus harmonischen Schwingungen besteht⁶.

⁶ Im Fall, dass alle Taylor-Reihen nach dem 1. Glied abgebrochen werden.

Eine solche Betrachtung der Energie eines Moleküls als Funktion seiner Atomkoordinaten wird auch als Molekülmechanik bezeichnet.

Jedes Kraftfeld beinhaltet Gleichgewichtswerte, die zur Berechnung der idealen Geometrie der Ruhelage verwendet werden. Während einer Minimierungsprozedur werden die Bindungslängen, -winkel, Torsionswinkel etc. über mechanische Kräfte an den entsprechenden Gleichgewichtswert angenähert. Ist es nicht möglich, den idealen Wert zu erreichen, so wird der Geometrie eine Strafenergie auferlegt.

Dies führt zwar zu einem energetisch ungünstigeren Zustand, die berechneten Energiewerte haben aber keinen direkten Bezug zum realen Energieinhalt eines Moleküls oder zu seinen physikalischen oder chemischen Eigenschaften. Der Vergleich der Energieinhalte ist daher auch nur innerhalb des gleichen Kraftfeldes zulässig und möglich.

Die Energie eines Moleküls setzt sich aus sechs Standardenergietermen zusammen: der Bindungslängenenergie E_B , der Bindungswinkelenergie E_A , der Torsionswinkelenergie E_{Tor} , der Out-of-plane-Energie E_{OOP} , der Coulomb-Energie $E_{Coulomb}$ und der Lennard-Jones-Energie E_{LJ} (Gleichung 3-2). Die beiden letztgenannten Energien beinhalten die räumlichen Wechselwirkungen zwischen nicht kovalent verbundenen Atomen.

$$E = \sum E_B + \sum E_A + \sum E_{Tor} + \sum E_{OOP} + \sum E_{Coulomb} + \sum E_{LJ} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

In dieser Arbeit wurde das TRIPOS-, das CVFF- (consistent valence forcefield) und das GROMACS-Kraftfeld [103-109] zur Berechnung der Proteingeometrie bzw. der Rezeptor-Ligand-Komplexe verwendet. Das TRIPOS-Kraftfeld, implementiert in SYBYL, wurde als generalisiertes Kraftfeld entwickelt, so dass für Moleküle aller Substanzklassen Parameter vorhanden sind. Die beiden anderen Kraftfelder wurden ursprünglich für die Berechnung von Peptiden bzw. Proteinen konzipiert. Für das CVFF-Kraftfeld wurden Erweiterungen eingeführt, die die Berechnung weiterer Verbindungen ermöglichen. Das GROMACS-Kraftfeld wurde insoweit ergänzt, dass sowohl Nicht-Peptide als auch die Bestandteile einer Biomembran simuliert werden können. Die Berechnung der einzelnen Energierterme wird im Folgenden näher erläutert.

Bindungslängenenergie:

Die Bindungslängenenergie resultiert aus den Streckenschwingungen zwischen zwei kovalent gebundenen Atomen. Sie kann in allen oben genannten Kraftfeldern durch ein harmonisches Potential beschrieben werden.

$$E_B(d_{IJ}) = k_{d_{IJ}} \cdot (d_{IJ} - d_{0,IJ})^2 \quad \text{Gleichung 3-3}$$

$k_{d_{IJ}}$: Kraftkonstante für die Bindung zwischen den Atomen I und J

d_{IJ} : aktueller Abstand der Atome I und J

$d_{0,IJ}$: optimaler Abstand der Atome I und J

Eine Abweichung von der idealen Bindungslänge führt in der quadratischen Funktion immer zu einer Zunahme der Energie. Die Kraftfelder unterscheiden sich aber in den jeweiligen Werten ihrer Kraftkonstanten.

Das CVFF- und das GROMACS-Kraftfeld erlauben neben der Berechnung der Bindungslängenenergie durch ein harmonisches Potential, auch die Berechnung dieses Energieterms über ein Morsepotential⁷. Die Verwendung dieser Möglichkeit lässt zwar eine erhöhte Genauigkeit der Berechnung zu, führt aber auch zu einem deutlich erhöhten Rechenaufwand. Da diese Genauigkeit für die vorliegende Fragestellung nicht nötig war, wurden die harmonischen Potentiale verwendet.

Bindungswinkelenergie:

Dieser Energieterm lässt sich ebenfalls durch ein harmonisches Potential darstellen.

$$E_A = k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad \text{Gleichung 3-4}$$

k_θ : Kraftkonstante für den Bindungswinkel

θ : Aktueller Bindungswinkel

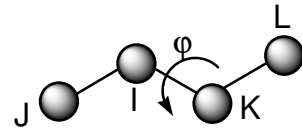
θ_0 : Optimaler Bindungswinkel

Auf molekularer Ebene lässt sich diese Energie als Winkelschwingung darstellen.

⁷ $E_{Morse} = k_{IJ} [1 - e^{-\alpha(d_{IJ} - d_{0,IJ})}]$

Torsionswinkelenergie:

Die Drehung um eine Einfachbindung wird durch eine Cosinusfunktion beschrieben, wodurch jeweils zwei energetisch bevorzugte Winkel berücksichtigt werden können.



$$E_{Tor} = k_{\varphi} [1 + \cos(n\varphi - \varphi_0)]$$

k_{φ} : halbe Torsionsbarriere (kcal / mol)

n: Periodizität

φ : aktueller Torsionswinkel

φ_0 : Referenztorsionswinkel / Phasenverschiebung (0° oder 180°)

Gleichung 3-5

Out-of-Plane-Energie:

Das Tripos-Kraftfeld berechnet die Out-of-Plane-Energie über eine quadratische Funktion.

$$E_{OOP} = k_{OOP} \cdot d^2$$

k_{OOP} : Out-of-Plane-Kraftkonstante (kcal / mol)

Gleichung 3-6

d^2 : Abstand zwischen dem Zentralatom und der Ebene seiner drei Substituenten (Å)

Im CVFF-Kraftfeld wird dieser Energieterm über *improper torsions* berechnet, d.h. es wird wie ein Torsionswinkel als trigonometrische Funktion behandelt.

$$E_{OOP} = k_{OOP} [1 + \cos(n\chi - \chi_0)]$$

k_{OOP} : out - of - plane - Kraftkonstante

n: Periodizität

χ : aktueller fiktiver Torsionswinkel

χ_0 : fiktiver Referenztorsionswinkel

Gleichung 3-7

Das GROMACS-Kraftfeld berechnet die Out-of-Plane-Energie wie das TRIPOS-Kraftfeld über eine quadratische Funktion. Der Out-of-plane-Winkel wird über den Winkel von zwei Ebenen zueinander bestimmt, wobei die zugehörigen Winkel als *Improper Dihedrals* bezeichnet werden.

$$E_{OOP} = k_{\xi} (\xi_{IJKL} - \xi_0)^2$$

k_{ξ} : Kraftkonstante für den *Out-of-Plane-Winkel*

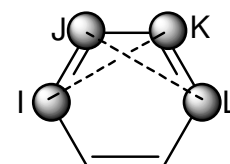
Gleichung 3-8

ξ_{IJKL} : aktueller *Improper Dihedralwinkel*

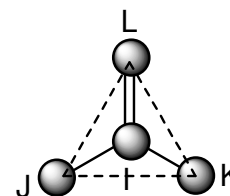
ξ_0 : optimaler *Improper Dihedralwinkel*

Die Ebenen werden jeweils durch vier miteinander verbundene Atome erhalten.

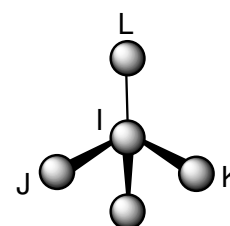
Für ein aromatisches Ringsystem sind die vier benötigten Positionen I, J, K und L aufeinander folgende Atome innerhalb des Rings. Die beiden Flächen erhält man durch ergänzen einer fiktiven Bindung zwischen den Atomen I und K sowie J und L, so dass der Winkel zwischen den Ebenen IJK und JKL als Out-of-Plane-Winkel bestimmt wird. Der Out-of-Plane-Winkel einer planaren Gruppe, wie z. B. der Amidgruppe, lässt sich ausgehend vom Zentralatom I durch die Ebenen IJK, IJL und IKL, die Pyramidenflächen, und die Grundfläche der Pyramide, JKL analog zum Out-of-plane-Winkel eines aromatischen Systems bestimmen. Einen Sonderfall der *Improper Dihedrals* stellen Chiralitätszentren dar. Sie werden im GROMACS-Kraftfeld wie planare Gruppen behandelt, wobei der Substituent mit der niedrigsten Priorität nach Cahn-Ingold-Prelog nicht berücksichtigt wird. Zur Stabilisierung einer bestimmten Konfiguration ist es dann möglich ein *Improper Dihedral* zu definieren, ohne eine Festlegung von Abständen oder Winkeln über *Distance Restraints*⁸ zu benutzen.



Out-of-Plane-Winkel eines aromatischen Systems



Out-of-Plane-Winkel einer planaren Gruppe



Out-of-Plane-Winkel eines Chiralitätszentrums

⁸ *Distance Restraints* erhalten mit Hilfe einer Strafenergie einen vorgegebenen Abstand oder Winkel innerhalb eines Moleküls.

Coulomb-Energie:

Durch die Coulomb-Energie werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen nicht kovalent gebundenen Atomen beschrieben. Der Abstand beträgt daher mindestens zwei Bindungen.

$$E_{\text{Coulomb}} = \frac{q_I \cdot q_J}{r_{IJ} \cdot \epsilon}$$

Gleichung 3-9

q_I, q_J : Ladung der Atome I und J

r_{IJ} : Abstand zwischen I und J (Å bzw. nm)

ϵ : Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums

Dispersionsenergie:

Bei der Annäherung zweier Atome treten sowohl Repulsions- als auch Dispersionskräfte auf, die durch das Lennard-Jones-Potential beschrieben werden können.

$$E_{LJ} = \frac{k_{IJ(12)}}{r_{IJ}^{12}} - \frac{k_{IJ(6)}}{r_{IJ}^6}$$

Gleichung 3-10

$k_{IJ(12)}$: Kraftkonstante repulsiver Term

$k_{IJ(6)}$: Kraftkonstante attraktiver Term

r_{IJ} : Abstand zwischen den Atomen I und J

3.4 Konformationsanalyse

Moleküle sind sowohl bei Raumtemperatur als auch bei Körpertemperatur keine starren Körper. Ihre Beweglichkeit ist vielmehr Voraussetzung zur Einnahme einer energetisch günstigen Konformation. Die unterschiedlichen räumlichen Anordnungen beruhen hauptsächlich auf der Drehung um Einzelbindungen, d.h. es handelt sich um Rotamere. Diese besitzen je nach Energieinhalt eine unterschiedliche Wahrscheinlichkeit und damit Häufigkeit ihres Auftretens. Prinzipiell sind aber alle Konformationen möglich. Durch diese Verteilung wird eine Energiehyperfläche mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten aufgespannt [110].

Die bioaktive Konformation einer Substanz stellt ein lokales Minimum auf der Energiehyperfläche dar, sie muss jedoch nicht unbedingt das globale Energieminimum für das jeweilige Molekül sein.

Zur Identifizierung einer solchen bioaktiven bzw. energetisch günstigen Konformation stehen prinzipiell drei Methoden zur Verfügung:

Die systematische Konformationsanalyse

Bei dieser Methode werden systematisch alle frei drehbaren Torsionswinkel um ein bestimmtes Inkrement verändert. Die jeweiligen Konformationen werden auf ungünstige Kontakte untersucht (*bump check*) und somit hochenergetische Varianten sofort ausgeschlossen. Je nach Inkrement und Anzahl der drehbaren Bindungen erhält man schnell eine sehr große Datenbank mit unterschiedlichen Konformeren, z.B. bei 5 drehbaren Bindungen und einem Inkrement von 30° 5^{12} Konformere, d.h. 244 Millionen Strukturen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine systematische Konformationsanalyse verzichtet.

Die Monte-Carlo-Methode

Diese Methode, die auch als *Random Search* bezeichnet wird, verwendet zufällig variierte Torsionswinkel, kombiniert mit einer nachfolgenden molekülmechanischen Minimierung zur Abdeckung des Konformationsraumes. Als Endkriterium dient hierbei die wiederholte Auffindung einer Konformation. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass deutlich weniger ungünstige Konformationen resultieren als bei der systematischen Konformationsanalyse. Es ist daher möglich, auch flexiblere Moleküle zu handhaben. Nachteilig ist jedoch, dass zur vollständigen Abdeckung des Konformationsraumes mehrere Startgeometrien benutzt werden sollten bzw. das Endkriterium der Konformationswiederfindung deutlich erhöht werden muss.

Dynamische Konformationsanalyse

Die dynamische Form der Konformationsbestimmung lässt sich in zwei prinzipielle Ansätze unterteilen: die Moleküldynamik- und die *simulated annealing* Methode.

Bei den moleküldynamischen Methoden wird eine Startgeometrie auf eine erhöhte Temperatur aufgeheizt, so dass Energiebarrieren überwunden werden können. Die während der Simulation erhaltenen Strukturen werden in bestimmten Zeitabständen extrahiert und minimiert.

Abschließend ist eine Einteilung in Familien ähnlicher Struktur sinnvoll, so dass eine handhabbare Anzahl von energetisch günstigen Konformationen vorliegt. Diese Methode besitzt den Vorteil, dass auch eine natürliche Umgebung z.B. die extrazelluläre Flüssigkeit mit in die Optimierung eingehen kann. Die Geometrieoptimierungen in dieser Arbeit wurden im Programm GROMACS in einer wässrigen Umgebung durchgeführt, um eventuelle Artefakte einer Optimierung im Vakuum zu vermeiden.

Ein *simulated annealing* Protokoll heizt die Ausgangsgeometrie in wiederholten Zyklen auf hohe Temperaturen auf, worauf eine schnelle Abkühlung auf 0 K erfolgt, so dass das Molekül in einer Konformation nahe eines lokalen Minimums gehalten wird. Bei dieser Methode ist es nicht notwendig nachträglich die erhaltenen Strukturen zu minimieren, weil sie schon nahe eines Minimums liegen. Ein solches Protokoll wurde im Programm GROMACS zur Bestimmung der Ringkonformationen in Alcuronium und den Caracurin V-Derivaten in wässrigem Medium verwendet.

3.5 Geometrieoptimierung

Die erhaltenen Strukturen, sowohl der Proteine als auch der Liganden, weisen häufig ungünstige intramolekulare Wechselwirkungen auf, die über eine Minimierungsroutine beseitigt werden können. Als robusteste Methode bietet sich für eine grobe Minimierung die *steepest descent* Methode an. In der Nähe eines Energieminimums ist dieses Verfahren dagegen wenig effektiv, da hier die Steigung der Energiehyperfläche, auf der die Minimierung basiert, nur noch minimal ist. Gut geeignet für diesen Bereich ist dagegen die *conjugate gradient* Methode. Sie bietet den Vorteil, dass zur Berechnung des neuen Richtungsvektors die Steigung am aktuellen Punkt zur bisherigen Suchrichtung addiert wird. Es kann dadurch vermieden werden, dass Fortschritte vorheriger Minimierungsschritte wieder rückgängig gemacht werden. Als Konvergenzkriterium wird bei beiden Verfahren ein Gradient benutzt, wobei auch die Festlegung einer Anzahl von Iterationen möglich ist. In dieser Arbeit wurde das übliche Minimierungsverfahren genutzt, das zunächst eine grobe *steepest descent* Minimierung und nachfolgend eine ausführlichere *conjugate gradient* Minimierung beinhaltet [111].

3.6 Moleküldynamiksimulation

In natürlicher Umgebung, d.h. bei Temperaturen um 300 K, spielt die Beweglichkeit chemischer Moleküle eine große Rolle. Ohne diese Bewegungen wäre ein Ligand weder in der Lage „seinen“ Rezeptor zu finden noch an diesem einen Effekt, d.h. wiederum eine Bewegung auszulösen. Daher wird in moleküldynamischen Methoden (MD) im Gegensatz zu den schon besprochenen molekülmechanischen Methoden (MM) auch die Beweglichkeit der Moleküle berücksichtigt.

Zur energetischen Beschreibung dient hierbei die Newtonsche Bewegungsgleichung:

$$F_i(t) = m_i \cdot a_i(t)$$

F_i : Kraft auf das Atom i zur Zeit t

Gleichung 3-11

m_i : Masse des Atoms i

a_i : Beschleunigung des Atoms i zur Zeit t

Die Kraft auf das Atom i ist die Ableitung der potentiellen Energie des Atoms i nach der Zeit. Durch Kenntnis der Ausgangskordinaten des Moleküls und der Anfangsbeschleunigung lassen sich die Koordinaten und die Beschleunigung zu einem späteren Zeitpunkt berechnen. Ein wesentliches Kriterium ist hierbei die Wahl des richtigen Zeitschrittes Δt . Die Wahl des Zeitschrittes ist dabei auch vom verwendeten Algorithmus abhängig. Sowohl FDISCOVER als auch GROMACS benutzen einen Leap-Frog-Algorithmus. Die hochfrequenteste Vibrationsbewegung, mit einer Periode von 10^{-14} s, die z.B. einer C-H-Bindung entspricht, muss dafür 8-10 mal pro Periode abgetastet (gesampelt) werden. Daraus ergibt sich dann ein Zeitschritt Δt von 10^{-15} s (1 fs). Dieser Standardzeitschritt wurde in dieser Arbeit zur Simulation der Rezeptor-Ligand-Komplexe im Vakuum angewandt. Benutzt man zusätzliche Rückhaltekräfte z.B. über den LINCS-Algorithmus, so kann dieser Zeitschritt erhöht werden. Eine solche Vergrößerung des Zeitschrittes auf 2 fs erlaubte im Programm GROMACS eine längere Simulationsdauer der komplexen membranähnlichen Systeme.

Neben dem Zeitschritt spielt bei Moleküldynamik-Simulationen (MDS) im Vakuum auch die Dielektrizitätskonstante eine wichtige Rolle. Für wässrige Lösungen beträgt sie um 80, im Inneren von Proteinen wird sie auf 2 bis 4 geschätzt [112]. Zusätzlich kann durch eine Abstandsabhängigkeit dieses Kraftfeldterms die Artefaktbildung durch eine Unterbewertung der elektrostatischen Wechselwirkungen durch den *Cut-Off* verhindert werden.

Jede MDS besteht aus zwei Phasen: einer Equilibrierungsphase und einer Datensammelphase. Die Equilibrierung ist als beendet anzusehen, wenn die physikalischen Parameter Energie, Temperatur und / oder Druck nahezu einen konstanten Durchschnittswert zeigen. In der folgenden Datensammelphase befindet sich das System in einem wahrscheinlichen Zustand, wobei auch hier verschiedene günstige Konformationen in *Clustern*⁹ gefunden werden können.

Eine andere Möglichkeit die wahrscheinlichste Konformation zu erreichen ist, ähnlich der Konformationsanalyse, die Verwendung unterschiedlicher Startstrukturen, die alle nach der Equilibrierung zu einer ähnlichen Struktur konvergieren sollten.

3.7 Homologie Modelling

Die Methoden des Homologie Modelling erlauben es, die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins, dessen Primärsequenz bekannt ist, dreidimensional darzustellen. Dazu wird ein verwandtes Protein bekannter Struktur als Vorlage benutzt und die Koordinaten für ähnliche, aber unbekannte Strukturen übernommen. Die Grundlage dazu bildet das Alignment, bei dem die Aminosäuresequenz der Vorlage und des Zielproteins anhand identischer oder ähnlicher Aminosäuren ausgerichtet werden. Voraussetzung dafür sind geeignete Programme zur Sekundärstruktur-Vorhersage sowie zur Bestimmung einer geeigneten Seitenketten-Konformation im Proteinmodell.

⁹ Strukturen, die aufgrund eines Ähnlichkeitskriteriums z.B. eines Winkels zwischen zwei Atomen, als gleich betrachtet werden können.

3.7.1 Sekundärstruktur-Vorhersageprogramme

Die Verfahren zur Sekundärstruktur-Vorhersage basieren auf der Analyse eines Datensatzes hochaufgelöster Röntgenkristallstrukturen. Hierbei werden Aminosäuremotive gesucht, die Hinweise auf eine bestimmte Sekundärstruktur geben. Daneben werden von einigen Programmen auch die physiko-chemischen Eigenschaften der benachbarten Aminosäuren berücksichtigt.

3.7.1.1 Hydrophathie-Untersuchungen nach Kyte und Doolittle

Diese von Kyte und Doolittle aufgestellte Skala weist jeder Aminosäure einen bestimmten Wert zu, der ihre Hydrophilie oder Hydrophobie (Hydrophathie) angibt [113]. Die einzelnen Werte werden in einem bestimmten Fenster addiert und jeweils der mittleren Aminosäure des Fensters zugeordnet, so dass man ein Hydrophathie-Profil erhält. Je nach Fenstergröße verändert sich dieses Profil. Wählt man ein kleines Fenster (ca. sieben Aminosäuren), so ist das Profil zwar genauer, es besteht aber die Gefahr der falschen Vorhersage z.B. transmembranärer Bereiche. Durch Vergrößerung des Fensters wird dieses Problem zwar gelöst, aber es ist eventuell nicht mehr möglich zwischen zwei benachbarten transmembranären Bereichen zu unterscheiden [114].

3.7.1.2 PredictProtein

Der PredictProtein Server ist ein Meta-Server zur Sekundärstruktur-Vorhersage der über das WorldWideWeb zugänglich ist [115]. Er bietet die Möglichkeit unterschiedliche Programme parallel zu nutzen. Im Folgenden werden nur die Programme vorgestellt, die anhand von Testsequenzen bekannter Strukturen für diese Problemstellung als gut geeignet identifiziert wurden.

PHD

Das Programm PHD ist über die Module PHDsec, PHDhtm und PHDacc in der Lage, auf der Basis eines *multiple sequence Alignments*¹⁰ die Sekundärstruktur, die transmembranären Bereiche, sowie die Lösungsmittel-Zugänglichkeit vorherzusagen. Dies erfolgt auf Basis eines neuronalen Netzes, das über bekannte Strukturen trainiert wurde und zu sehr genauen Ergebnissen führt [116].

TMHMM

Dieses Programm basiert auf einem Hidden Markov Model und ermöglicht es, transmembranäre Bereiche mit hoher Genauigkeit zu identifizieren [117]. In der vorliegenden Arbeit wurde es daher zusätzlich zur Vorhersage aus PHD berücksichtigt, um die Lage des Proteins in der Membran zu spezifizieren.

PsiPred

PSIPRED arbeitet wie auch PHD auf Basis eines neuronalen Netzes, wobei hierbei die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Netze miteinander verglichen und die Ergebnisse als kombinierte neue Eingabematrix benutzt werden. Das Ergebnis enthält sowohl ein *multiple sequence Alignment* als auch Aussagen zur Sekundärstruktur und den transmembranären Bereichen [118].

LOOPP

Das Programm *Learning, Observing and Outputting Protein Patterns* führt sowohl Sequenz-Sequenz-, Sequenz-Struktur- als auch Struktur-Struktur-Alignments durch [119]. Dadurch ist es möglich, für eine vorgegebene Sequenz Strukturen in der *Protein Data Bank* [120] zu finden, die ein bestimmtes Strukturelement enthalten z.B. einen β -Turn. Dies wurde für die Identifizierung von Strukturelementen in den flexiblen Loop-Regionen genutzt.

¹⁰ Mehrere Aminosäuresequenzen werden in einem *multiple sequence Alignment* miteinander verglichen und anhand von Ähnlichkeiten ausgerichtet.

3.7.2 Loop-Search-Routinen

Die Loop-Search-Routinen werden zur Identifikation geeigneter Koordinaten für variable Regionen einer Peptidkette genutzt. Dazu eignen sich prinzipiell zwei Ansätze: Entweder die Suche nach einem Peptidsegment, dessen räumliche Eigenschaften gut zur noch vorhandenen Lücke passen, oder die *de novo*-Erzeugung eines Segmentes. Der Suche nach ähnlichen Proteinstrukturen sollte dabei der Vorzug gewährt werden, weil sie auf vorhandenen Strukturen der *Protein Data Bank* beruht. Die Generierung vollkommen neuer Proteinstrukturen bietet zwar die Möglichkeit einer genaueren Anpassung, darin liegt aber auch die Gefahr dieser Methode, so dass „unnatürliche“ Verbindungen geschaffen werden. Im HOMOLOGY-Modul des Programmpaketes INSIGHT II sind diese Varianten in den Kommandos *Search Loops* und *Generate Loops* zu finden.

Search Loops

Das *Search Loops* Kommando durchsucht die *Protein Data Bank* nach Proteinregionen, die den Eigenschaften des gesuchten Loops nahe kommen. Das Ergebnis berücksichtigt die Anzahl der Aminosäuren im betrachteten Proteinabschnitt. Daneben werden über eine distanzabhängige Matrix die Anschlussregionen ebenfalls einkalkuliert. Die Anschlussbereiche (*Preflex* / *Postflex*) werden dabei nicht vollkommen starr gehalten, sondern auch ihnen wird eine gewisse Abweichung ermöglicht. Gleichung 3-12 gibt die Distanzmatrix für den *Preflex*-Bereich (pe) und den *Postflex*-Bereich (po) wieder.

$$d_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} \quad i, j \in \text{pe, po} \quad \text{Gleichung 3-12}$$

Für die Loopkandidaten werden ebenfalls solche Matrizen aufgestellt. Das Ranking erfolgt dann durch Vergleich der Loopmatrizen mit der vorgegebenen Matrix nach Gleichung 3-13.

$$D_c^2 = \frac{2}{N(N+1)} \sum_{i \in \text{pe, po}} \sum_{j \in \text{pe, po}} (d_{ij} - d_{r_c(i)r_c(j)})^2 \quad i, j \in \text{pe, po} \quad \text{Gleichung 3-13}$$

3.7.3 Seitenketten-Rotamerbibliotheken

Die Seitenketten-Konformation der Aminosäuren ist wichtig für die Tertiärstruktur eines Proteins. Obwohl es sich bei den Seitenketten theoretisch um frei drehbare Molekülteile handelt, findet man in Kristallstrukturen für die unterschiedlichen Aminosäuren eine deutliche Bevorzugung einzelner Rotamere.

3.7.3.1 Die Bibliothek nach Ponder und Richards

Eine Untersuchung von 19 Proteinen hoher Auflösung ($\leq 2,0 \text{ \AA}$), die insgesamt 2273 Aminosäuren enthalten, zeigte nach statistischer Auswertung der χ -Winkel, dass nur eine geringe Anzahl der theoretisch möglichen Rotamere tatsächlich eingenommen wurde [121]. Die Ergebnisse bilden die Bibliothek nach Ponder und Richards, die die Grundlage für die Rotamerbibliothek des Programms INSIGHT II [104] bildet. Einige χ -Winkel bilden keine eindeutigen Cluster, so dass z.B. die Winkel χ_3 und χ_4 in Lysin und Arginin manuell in Cluster unterteilt wurden.

3.7.3.2 SCWRL

Das Programm SCWRL [122] basiert auf der Analyse von 180 Protein-Ketten der *Protein Data Base* [120]. Die χ_1 und χ_2 Winkel werden dabei im Testsatz mit über 90%iger Genauigkeit wieder gefunden, χ_3 und χ_4 Winkel können dagegen nicht analysiert werden und werden als gestreckte Konformation vorliegend angenommen. SCWRL baut, an ein vorgegebenes Rückgrat, alle wahrscheinlichen Seitenketten-Konformationen an und untersucht das Protein dann auf Kollisionen zwischen Seitekette und Rückgrat bzw. der Seitenketten untereinander. Die endgültige Konformation berücksichtigt neben den ungünstigen Kontakten auch die Häufigkeit eines Rotamers.

3.7.3.3 PROCHECK

Das Programmpaket PROCHECK [123,124] bietet die Möglichkeit, Proteine auf ihre Qualität zu untersuchen. Die Verteilung der ϕ -, ψ - und χ_1 -Winkel, im Vergleich zu Kristallstrukturen gleicher Auflösung, wird als guter Indikator für die stereochemische Qualität eines Proteinmodells angesehen. Die Parameter für Bindungslängen und -winkel sind aus der *Cambridge Structural Database* [125,126] abgeleitet. Eine Übersicht über die Standardparameter gibt Tabelle 3-1.

Tabelle 3-1: Überprüfte stereochemische Parameter des Programms PROCHECK

Stereochemische Parameter	Mittelwert	Standard- abweichung
ϕ -/ ψ -Winkel im am meisten bevorzugten Bereich des Ramachandran Plots	> 90 %	
χ_1 -Winkel		
gauche minus	64,1°	15,7°
trans	183,6°	16,8°
gauche plus	-66,7°	15,0°
χ_2 -Winkel	177,4°	18,5°
Prolin:		
ϕ -Winkel	-65,4°	11,2°
Helix:		
ϕ -Winkel	-65,3°	11,9°
ψ -Winkel	-39,4°	11,3°
Disulfidbrücke:		
χ_3 :		
rechtshändig	96,8°	14,8°
linkshändig	85,8°	10,7°
Abstand	2,0 Å	1,0 Å
Protein-Rückgrat:		
ω -Winkel	180,0°	5,8°
Wasserstoffbrückenenergie	-2,03 kcal/mol	0,75 kcal/mol
$C\alpha$ -Chiralität:		
Virtueller Torsionswinkel ($C\alpha$ -N-C- $C\beta$)	33,9 °	3,5°

Zur besseren Übersicht werden viele Beziehungen zwischen den Parametern graphisch dargestellt, so stellt zum Beispiel der Ramachandran-Plot die Beziehungen zwischen ϕ -/ ψ -Winkeln dar. Zusätzlich werden für jede Aminosäure G-Faktoren berechnet, die angeben ob die gemessenen Eigenschaften üblich sind. Ist dies der Fall nimmt, der G-Faktor einen Wert $\geq -0,5$ an.

3.8 Analyse-Programme

3.8.1 NMRCLUST

Das Programm NMRCLUST [127] teilt die Konformationen eines Ensembles in konformatorisch ähnliche Gruppen (*Cluster*) ein und wählt eine repräsentative Struktur aus dieser Gruppe aus.

Zunächst werden die enthaltenen Konformationen überlagert und die *root mean square deviation* (*rmsd*-Wert, RMS-Wert) berechnet. Zur Bestimmung des *rmsd*-Wertes können verschiedene Kriterien angegeben werden. Es kann sich nur auf das Proteinrückgrat oder Teile desselben beziehen, kann aber auch alle schweren Atome berücksichtigen. Standard ist letzteres, so dass die Cluster auch Unterschiede in der Seitenkettenkonformation widerspiegeln. Jede Struktur wird danach zunächst in einen eigenen Cluster eingeteilt. Die Zusammenlegung der Cluster erfolgt dann nach Gesichtspunkten der Streuung und der RMS-Werte.

3.8.2 SURFNET

Das Programm SURFNET [128] dient zur Visualisierung der Hohlräume innerhalb eines Proteins. Hierzu werden kugelförmige Volumina einer bestimmten Größe innerhalb des Proteins eingelagert und miteinander verbunden bis zu einem maximalen Volumen. Als sinnvoller Minimal-Wert ist hier das Volumen eines Wasserstoffatoms anzusehen, weil dies das kleinste von Liganden ausfüllbare Volumen darstellt. Die Obergrenze kann deutlich flexibler gehandhabt werden, weil der Wert so gewählt werden sollte, dass das Volumen nicht nur hauptsächlich außerhalb des Proteins detektiert wird. Als Grenzwerte für die Berechnungen in der vorliegenden Arbeit erwiesen sich 1,2 Å und 4 Å als gut geeignet, um aussagekräftige Volumina zu erhalten.

3.8.3 Sekundärstruktur Analyse

3.8.3.1 Kabsch-Sander

Die Methode der Bestimmung der Sekundärstruktur nach Kabsch und Sander ist die am weitesten verbreitete [129,130]. Sie ist im Viewer-Modul von INSIGHT II, in der Sekundärstrukturbestimmung von PROCHECK und als DSSP-Routine in GROMACS implementiert. Ausgehend von den dreidimensionalen Koordinaten eines Proteins werden zunächst über ein Abstandskriterium die Wasserstoffbrückenbindungen definiert. Die Sekundärstrukturelemente werden dann analog dem Wasserstoffbrückenmuster zugeordnet, z.B. eine α -Helix bildet zwischen den Backboneatomen k und $k+4$ Wasserstoffbrückenbindungen aus.

3.8.3.2 STRIDE

Das Programm STRIDE beruht auf einem automatischen Algorithmus zur Sekundärstrukturvorhersage einer dreidimensionalen Struktur [131]. Hierbei werden sowohl die Wasserstoffbrücken-Bindungsenergie als auch Informationen über die Backbone-Torsionswinkel berücksichtigt. Die Parameter wurden hierzu über eine statistische Auswertung verschiedener bekannter Proteine optimiert. Die Vorhersagen zeigen eine gute Übereinstimmung mit den in Kristallstrukturen identifizierten Sekundärstrukturelementen. Einen Vorteil gegenüber der in INSIGHT II implementierten Kabsch-Sander-Methode bietet die zusätzliche Zuordnung der Turntypen sowie die Berücksichtigung der Torsionswinkel.

3.8.4 Wechselwirkungspotential

Für die Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Komplexen sind die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen von großem Interesse. Hierbei spielen die Kräfte zwischen nicht kovalent gebundenen Atomen die größte Rolle. Weiterhin ist es von Interesse für eine Optimierung der Liganden, die Eigenschaften der Bindungsstelle mit Sonden bestimmter Eigenschaften zu untersuchen.

3.8.4.1 DeCipher

Im CVFF-Kraftfeld werden die Wechselwirkungen zwischen nicht kovalent gebundenen Atomen über das Coulomb-Potential und die Lennard-Jones-Wechselwirkungen beschrieben. Der Energieterm für Wasserstoffbrückenbindungen ergibt sich als Funktion aus Abstand und Elektrostatik. Das INSIGHT II-Modul DeCipher [104] ist in der Lage, die einzelnen Energieterme für Moleküle, Aminosäuren und / oder Atome im Verlauf einer Moleküldynamik-Simulation zu verfolgen. Somit ist es möglich, die Bedeutung einzelner Bestandteile eines Rezeptor-Ligand-Komplexes energetisch zu beschreiben.

3.8.4.2 GRID

Das Programm GRID [132-134] beschreibt die günstigen und ungünstigen Wechselwirkungen zwischen einem Protein oder Liganden und einer Sonde mit Eigenschaften einer bestimmten funktionellen Gruppe. Die Sonde wird charakterisiert durch ihren van-der-Waals Radius, die Elektronenanzahl, die Partialladung, die Polarisierbarkeit und die Wasserstoffbrückenbindungs-Eigenschaften. Die zu untersuchende Struktur wird in einen dreidimensionalen Gitterkäfig gelegt und an jedem Gitterpunkt die Wechselwirkungsenergie berechnet. Aus benachbarten Punkten ähnlicher Wechselwirkungsenergie lassen sich mögliche Wechselwirkungsfelder im Raum darstellen. Durch die Auswahl einer oder mehrerer geeigneter Sonden, ist es daher möglich, ein Protein nach einer günstigen Bindungstasche für einen Liganden abzutasten oder umgekehrt die Eigenschaften bestimmter Aminosäuren auf die funktionellen Gruppen eines Liganden zu projizieren. Die Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Sonden sind in Tabelle 3-2 dargestellt.

Tabelle 3-2: Eigenschaften der verwendeten molekularen Sonden des Programms GRID

Spezifische Eigenschaften der molekularen Sonde	DRY	Sp ³ Amin mit Ladung N1+	Ester OES	Ether OC2
Van-der-Waals-Radius / Å	1,70	1,65	1,60	1,60
Effektive Anzahl der Elektronen	7	7	6	6
Polarisierbarkeit / Å ³	1,20	1,40	0,64	0,64
Partialladung	0	0,66	-0,20	-0,20
Optimale H-Brückenbindungsenergie	-4,5	-3,0	-0,5	-2,0
Optimaler Radius der H-Brücke / Å	1,40	1,60	1,55	1,50
Anzahl der donierten H-Brücken	2	1	0	0
Anzahl der akzeptierten H-Brücken	2	0	2	2

Spezifische Eigenschaften der molekularen Sonde	Vinyl / Aromat C1=	Trimethylammonium NM3	Carbonyl CO	Methyl C3
Van-der-Waals-Radius / Å	1,90	2,55	1,6	1,95
Effektive Anzahl der Elektronen	6	33	6	8
Polarisierbarkeit / Å ³	2,07	7,60	0,84	2,17
Partialladung	0	0,84	-0,25	0
Optimale H-Brückenbindungsenergie	0	0	-5,0	0
Optimaler Radius der H-Brücke / Å	0	0	1,40	0
Anzahl der donierten H-Brücken	0	0	0	0
Anzahl der akzeptierten H-Brücken	0	0	2	0

4 DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

4.1 Aufbau eines M₂-Rezeptormodells

Der muskarinerge M₂-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Funktionsfähigkeit dieser Klasse membranständiger Rezeptoren ist nur durch die Stabilisierung in der Membran gewährleistet. Wegen Schwierigkeiten mit einer ausreichenden Expression für die Kristallgewinnung [135] ist eine Kristallisation sehr schwierig. Im Jahr 2000 ist es erstmals gelungen die Struktur eines funktionsfähigen Säugetier-GPCRs röntgenkristallographisch aufzuklären [6]. Rhodopsin wurde dazu aus Rinderretina in großer Menge extrahiert und dann unter Zusatz von Detergentien und Schwermetallen in funktionsfähigen Proteinkristallen stabilisiert [7]. Für den M₂-Rezeptor ist bis jetzt keine Kristallisation gelungen, so dass die genaue dreidimensionale Struktur des muskarinergen M₂-Rezeptors unbekannt ist. Aufgrund von großen Ähnlichkeiten der Makrostruktur der rhodopsinähnlichen GPCRs kann das Rhodopsin als Vorlage für ein Modell des M₂-Rezeptors dienen. Die dreidimensionalen Koordinaten des Rinderrhodopsins sind in verschiedenen Auflösungen in der *Protein Data Bank* [120] hinterlegt.

4.1.1 Sequenzalignment

Für den Aufbau eines Homologie Modells werden, um gesicherte Aussagen machen zu können, ca. 40 % homologe Aminosäuren benötigt. Im Falle des humanen muskarinergen M₂-Rezeptors liegt die Homologie zum bovinen Rhodopsin aber nur bei knapp 23 %. Eine sinnvolle Modellierung ist aber, trotz der geringen Gesamthomologie, zum einen wegen der ähnlichen Makrostruktur aller GPCRs und zum anderen wegen der Konservierung bestimmter Aminosäuren innerhalb sieben transmembranären Helices der Familie A, möglich. Diese transmembranären Helices stellen ein essentielles, konserviertes Strukturelement der GPCRs dar. Die Homologie innerhalb dieser Bereiche ist mit 80 % auch deutlich höher.

Die Nummerierung der verschiedenen transmembranären Bereiche erfolgt in diesem Abschnitt der Arbeit nach einem allgemeinen Schema für GPCRs, das den Vergleich von Sequenzen untereinander vereinfacht [75]. Die am stärksten konservierte Aminosäure innerhalb einer Helix erhält dabei die Nummer 50.

Konservierte Aminosäuren

Durch die statistische Auflistung der Konservierungen innerhalb der Familie A ist es möglich, in jeder Sequenz der Familie A die transmembranären Bereiche grob einzugrenzen. Die hochkonservierten Aminosäuren legen die Topologie des Rezeptors reißbrettartig fest, daher werden sie auch häufig als *Pin Points* bezeichnet.

Zur Identifizierung dieser Punkte wurden die Sequenzen des Rinderrhodopsins und der M₂-Rezeptoren aus Ratte, Maus, Schwein und Mensch aus der SwissProt [137] entnommen.

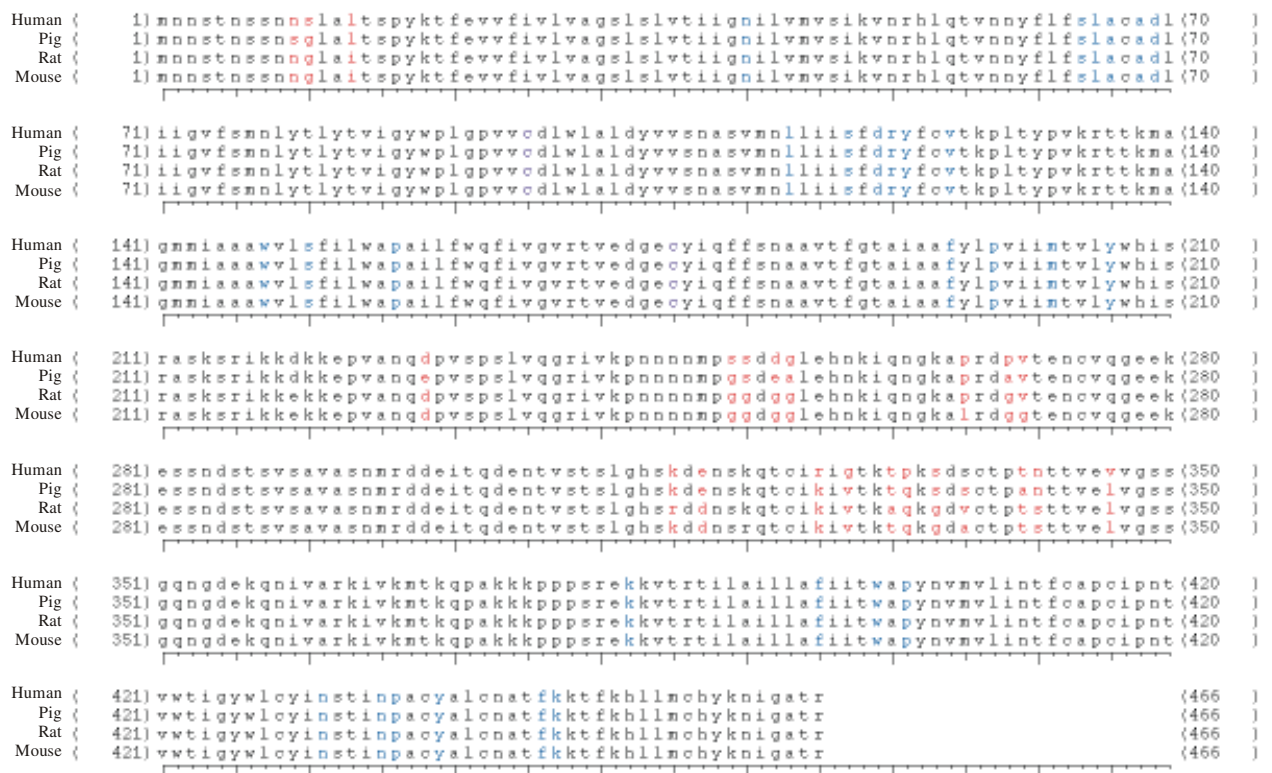


Abbildung 4-1 Sequenzvergleich muskarinerges M₂-Rezeptoren

Die Aminosäuresequenzen der M₂-Rezeptoren von Mensch, Schwein, Ratte und Maus unterscheiden sich nur in 19 Positionen, wobei sich drei davon im N-Terminus befinden, die übrigen im dritten intrazellulären Loop. Die Differenzen in der Primärsequenz sind rot markiert, die *Pin Points* blau.

Die Primär-Struktur der M₂-Rezeptoren unterscheidet sich nur in wenigen Aminosäuren des N-Terminus und in einigen Aminosäuren des dritten intrazellulären Loops (Abbildung 4-1). Dieser Vergleich ist notwendig, um experimentelle Daten später zwischen den Spezies eventuell übertragen zu können.

Aufgrund der großen Identität der M₂-Rezeptorsequenzen untereinander ist die Übertragung experimenteller Daten möglich, wobei ein eventuell anderer Effekt in der Signaltransduktion, die über den dritten intrazellulären Loop vermittelt wird, berücksichtigt werden sollte.

Vergleicht man die Sequenz des bovinen Rhodopsins mit der des menschlichen M₂-Rezeptors und der anderen menschlichen muskarinergen Rezeptoren, so sieht man deutliche Unterschiede. Ein Alignment der Sequenzen ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Identische hochkonservierte Aminosäuren und alternative hochkonservierte Aminosäuren sind schwarz eingefärbt.

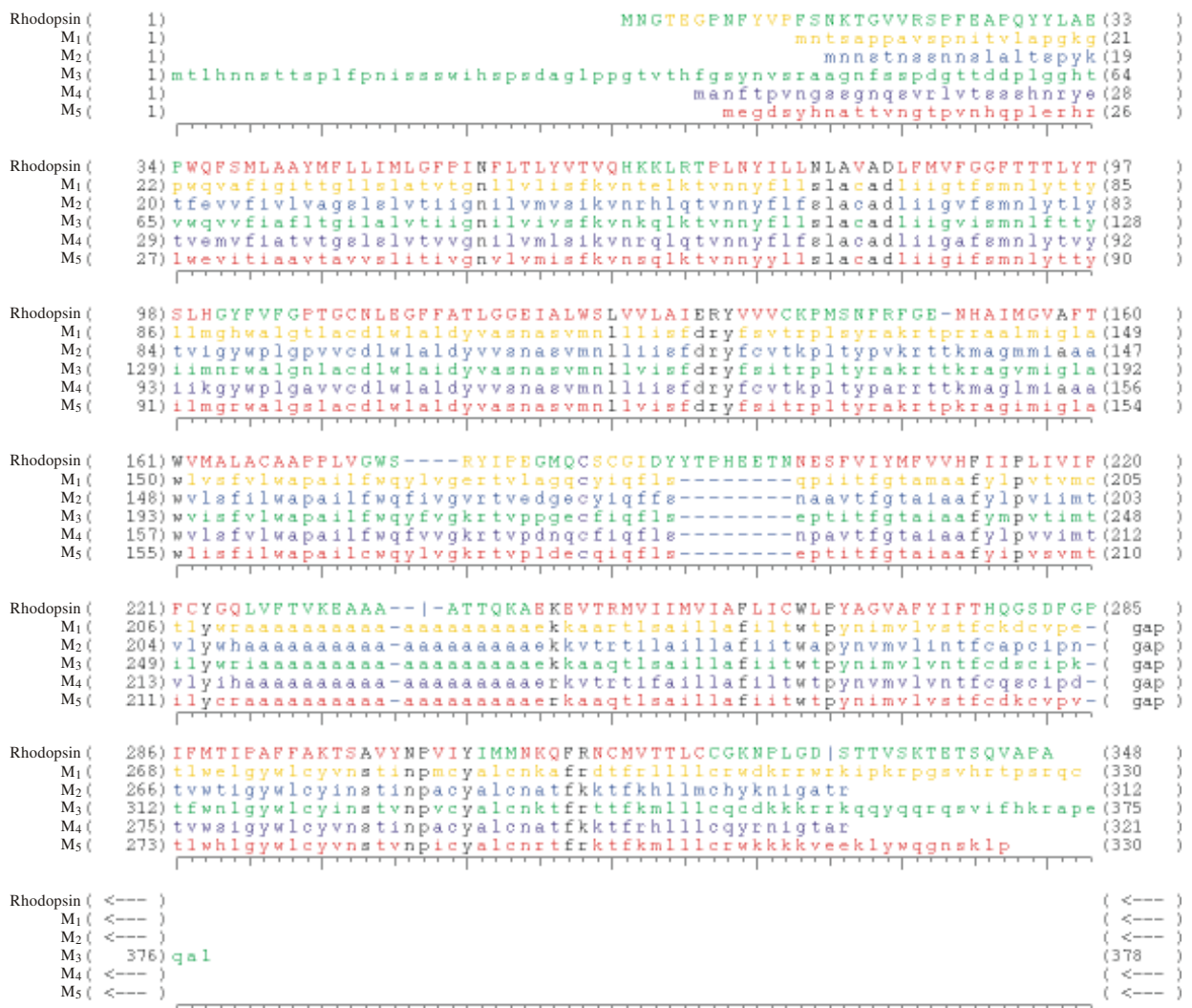


Abbildung 4-2: Sequenzalignment der humanen muskarinergen Rezeptoren mit bovinem Rhodopsin

Helikale Strukturen im Rhodopsin sind rot markiert, Beta-Faltblätter gelb, Coiled-Coil grün. Die *Pin Points* sind in allen Sequenzen schwarz eingefärbt.

Als Ankerpunkt für Helix I ist im Rhodopsin nur das Asparagin in Position 1.50 vorhanden. Die beiden weiteren stark konservierten Aminosäuren in diesem transmembranären Abschnitt (Glycin 1.49, Valin 1.53) lassen sich nur in den muskarinergen Rezeptoren finden. Innerhalb des zweiten helikalen Bereichs finden sich vier der fünf konservierten Aminosäuren in allen Sequenzen wieder. Dies sind Leucin 2.46, die Alanine 2.47 und 2.49 sowie Aspartat 2.50.

Für Helix III lässt sich als Ankerpunkt zunächst das DRY/ ERY-Motiv identifizieren. Es wird gebildet aus Aspartat beziehungsweise Glutamat 3.49, Arginin 3.50 und Tyrosin 3.51. Weitere *Pin Points* dieses Bereiches sind Serin / Alanin 3.47 und Leucin 3.43. In der kürzesten Helix, Nummer IV, finden sich Tryptophan 4.50 und Alanin 4.53 sowohl in Sequenz des Rhodopsins als auch im menschlichen M₂-Rezeptor und M₄-Rezeptor. Die Position der fünften Helix wird markiert durch Phenylalanin 5.47, Prolin 5.50 und Tyrosin 5.58. Zur Bestimmung der Position der sechsten Helix dient als wichtigster Ankerpunkt das zu 100% vorhandene Prolin 6.50. Als weitere *Pin Points* sind in diesem Bereich Lysin 6.32, Phenylalanin 6.44 und Tryptophan 6.48 zu finden. Innerhalb Helix VII sind fünf der sieben identifizierten Konservierungen vorhanden. Es handelt sich dabei um Asparagin 7.49, Prolin 7.50, Tyrosin 7.53, Phenylalanin 7.60 und Arginin / Lysin 7.61.

Bestimmung der transmembranären Bereiche

Neben der Lokalisation der transmembranären Bereiche innerhalb der Proteinsequenz ist auch die Ausdehnung der helikalen Strukturen von Interesse. Das Programm TMHMM wurde zunächst auf seine Vorhersagequalität für das bovine Rhodopsin überprüft. Die Vorhersage der transmembranären Bereiche wurde dazu mit den aus der Röntgenkristallstruktur bekannten helikalen Bereichen verglichen. Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren durchspannen siebenmal die Membran. Hierbei kann die Dicke der Membran mit 28-35 Å als etwa konstant angenommen werden. Für die transmembranären Bereiche sollte also eine Länge von ≈ 30 Å gefunden werden. Im Falle eines idealen helikalen Aufbaus entspricht das 20 Aminosäuren. Diese Länge ist auch abhängig vom Neigungswinkel der jeweiligen Helix innerhalb der Membran, so dass aus den Vorhersagen auch eine Ableitung der Position der Helices beziehungsweise auch des Rezeptorproteins innerhalb der Membran möglich ist.

Erwartungsgemäß enthielten die sieben Helices der Kristallstruktur die vorhergesagten transmembranären Bereiche (Abbildung 4-4).

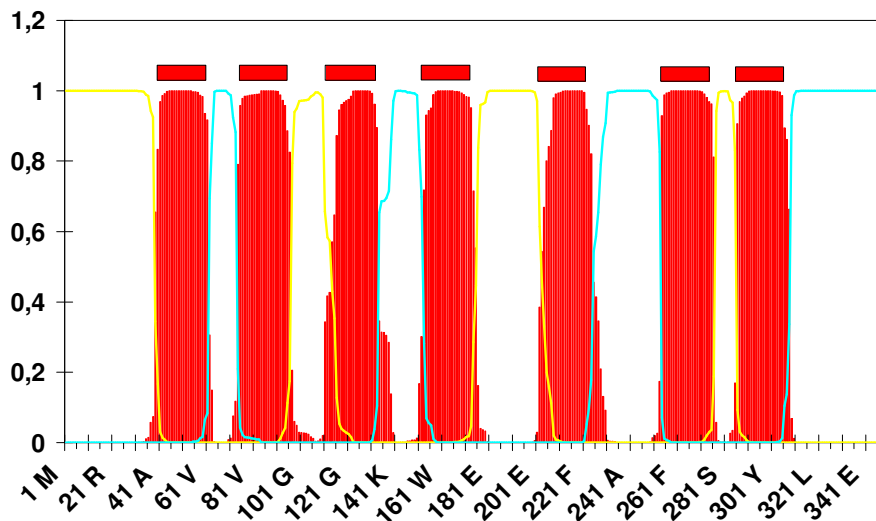


Abbildung 4-4: Vorhersage der transmembranären Bereiche für Rinderrhodopsin

TMHMM stellt die Wahrscheinlichkeit transmembranärer Helices über die gesamte Primärstruktur dar. Die transmembranären Bereiche sind als rote Flächen dargestellt, intrazelluläre Bereiche als cyanfarbige Linie, extrazelluläre Bereiche als gelbe Linie. Oberhalb der Vorhersage sind die transmembranären Helices der Kristallstruktur des Rhodopsins als rote Rechtecke dargestellt.

Das gleiche Verfahren wurde auch für die transmembranären Bereiche des muskarinergen M_2 -Rezeptors angewandt (Abbildung 4-3). Hierbei wurde für die sieben Helices jeweils ein transmembranärer Bereich von 22 Aminosäuren vorgeschagt. Einzige Ausnahme bildet Helix III, für die nur 19 Aminosäuren als transmembranär vorhergesagt werden. Dies unterscheidet sich von den Vorhersagen für Rhodopsin, so dass vermutlich der M_2 -Rezeptor eine leicht veränderte Lage in der Membran einnimmt.

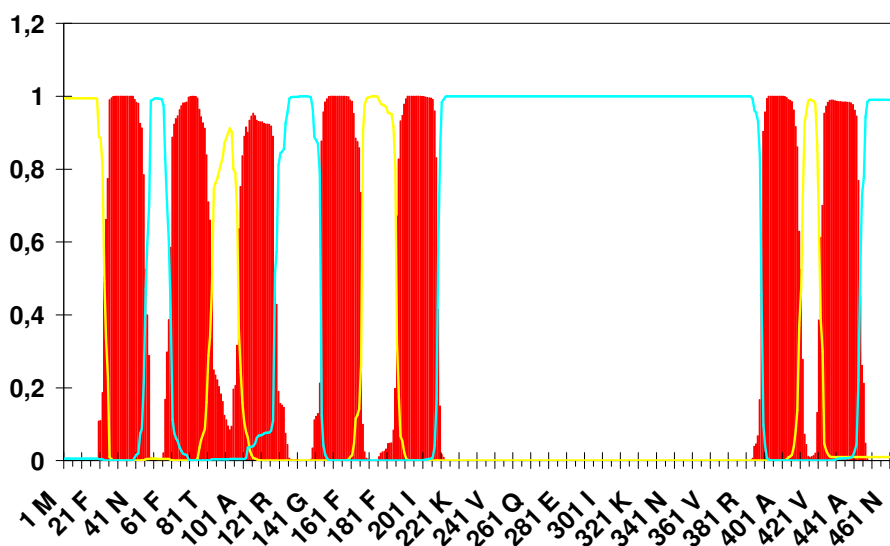


Abbildung 4-3: Vorhersage der transmembranären Bereiche für den menschlichen M_2 -Rezeptor

Sekundärstrukturvorhersagen

Die transmembranären Bereiche sind Bestandteil der sieben Helices, die GPCRs der Familie A enthalten. Als Vorhersageprogramm erwies sich hierbei das Programm PHD mit seinen Funktionen zur Vorhersage der Helices als gut geeignet. Als Teststruktur wurde dabei wieder das Rinderrhodopsin benutzt, um den Vergleich zwischen Vorhersage und Realität im späteren Templat zu erhalten. Die Prognose der helikalen Bereiche unterscheidet sich hierbei nur um ein bis vier Aminosäuren gegenüber der Kristallstruktur (Abbildung 4-5). Dieses Ergebnis ist insofern zufriedenstellend, als sich die helikalen Strukturen, die in der *Protein Data Bank* hinterlegt sind und die Angaben in der zugehörigen Veröffentlichung auch in dieser Größenordnung unterscheiden. Die Abweichungen in der Vorhersage liegen folglich im Bereich der Ungenauigkeit der Strukturauflösung. Betrachtet man die Position der unterschiedlichen Helixvorhersagen, so ist es auffällig, dass vor allem im kristallographisch schwieriger aufzulösenden intrazellulären Bereich Unterschiede festzustellen sind. Aufgrund der hohen Flexibilität dieser Teilstruktur, ist es nicht möglich gewesen, den dritten intrazellulären Loop inklusive Seitenketten aufzulösen.

Für den M₂-Rezeptor wurden die Helixlängen ebenfalls durch PHDhtm bestimmt (Abbildung 4-6). Im Vergleich zum Rhodopsin finden sich ähnliche Vorhersagen der Helixlängen. Einzige Ausnahme bildet der dritte transmembranäre Bereich, der deutlich länger prognostiziert wird. In diesem Abschnitt findet sich in der Kristallstruktur des Rinderrhodopsins ebenfalls eine deutlich längere Helix als vorhergesagt.

Die Sekundärstrukturvorhersage für den muskarinergen M₂-Rezeptor enthält im Vergleich zum Rhodospin, ähnliche Helixlängen. Außerdem lässt sich auch eine achte intrazelluläre Helix wieder finden. Die im Rinderrhodopsin vorhandenen β -Faltblattstrukturen werden in der Vorhersage für den muskarinergen M₂-Rezeptor allerdings, bis auf ein Faltblatt in N-Terminus, nicht wieder gefunden (Abbildung 4-8).

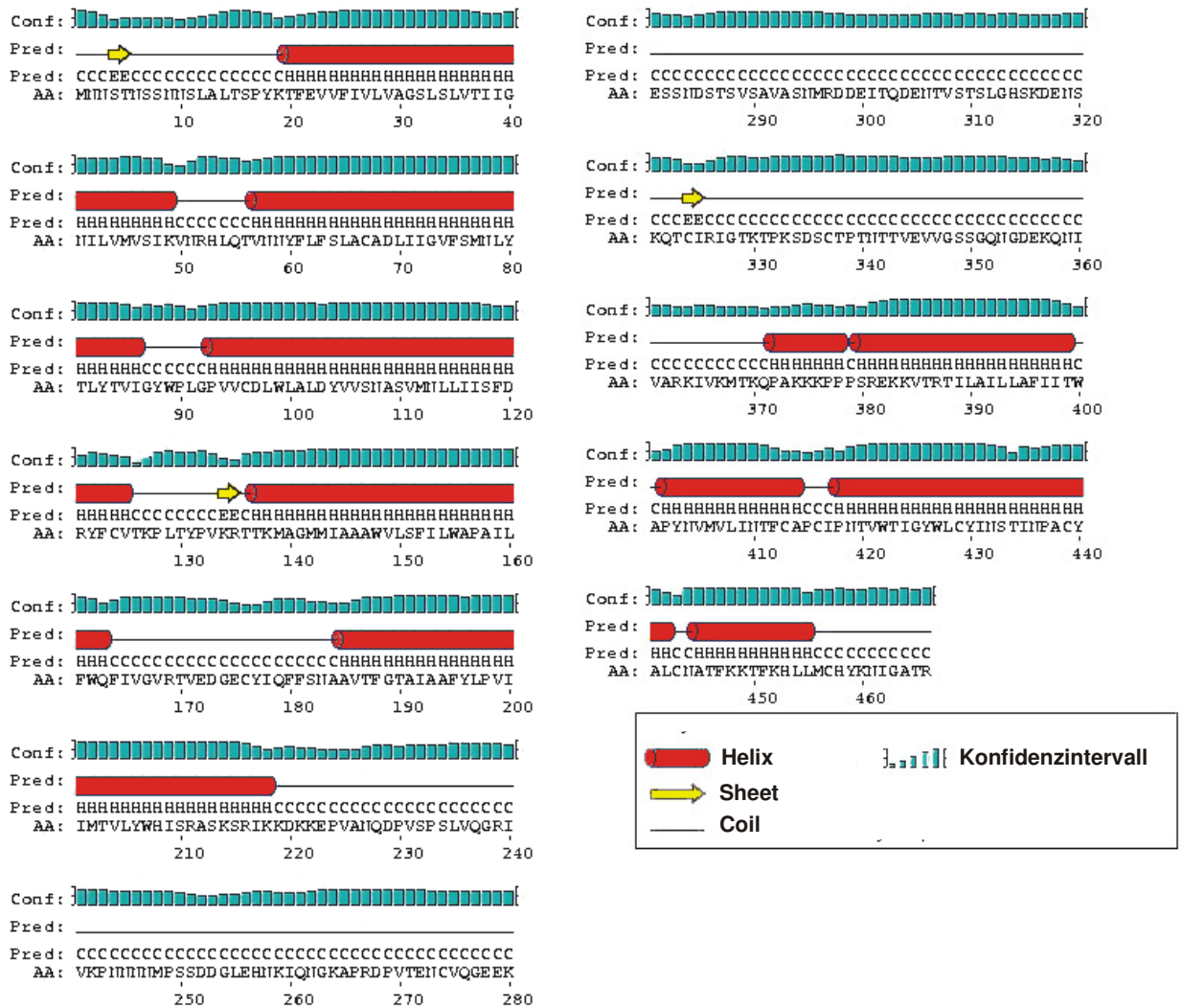


Abbildung 4-8: Vorhersage der Sekundärstrukturelemente mit PsiPred für den M₂-Rezeptor

Innerhalb des sehr langen N-Terminus des dritten intrazellulären Loops wird nur ein β -Faltblatt vorhergesagt. Dies ist auf das fehlende Training des zugrunde liegenden neuronalen Netzes mangels Vorlagen für einen solchen Bereich begründet.

4.1.2 Modellieren der extrazellulären Bereiche

Die drei extrazellulären Loops und der N-Terminus bilden die extrazellulären Bereiche. Diese spielen, neben den sieben Helices, für die vorliegende Fragestellung eine besondere Rolle, da die zu untersuchende allosterische Bindungsstelle innerhalb dieses Bereiches lokalisiert ist.

Loop E1

Der erste extrazelluläre Loop (E1) ist mit einer Länge von nur drei Aminosäuren sehr kurz. Vermutlich dient er daher auch nur zur Verbindung der zweiten transmembranären Helix zur dritten. Das bovine Rhodopsin besitzt an dieser Position einen Loop gleicher Länge, Sekundärstruktur und Funktion. Es ist daher sinnvoll, diese Struktur in das M₂-Rezeptormodell zu übertragen [138].

Loop E2

Der zweite extrazelluläre Loop stellt einen wichtigen Bereich für die Untersuchung der allosterischen Modulation dar. Innerhalb dieses Strukturelementes liegt eine, zunächst nicht durch Punktmutationen identifizierte Bindungsstelle für allosterische Modulatoren. Als weiteres wichtiges Strukturelement enthält diese Schleife Cystein 176, das zusammen mit Cystein 96, die innerhalb der Familie A konservierte Disulfid-Brücke ausbildet und im Bereich der allosterischen Bindungsstelle liegt [139]. Dieses Cystein teilt den Loop im M₂-Rezeptor in zwei Abschnitte von 14 und sechs Aminosäuren. Eine vollständige Übertragung der Koordinaten des Loops der Vorlage ist in diesem Fall aus mehreren Gründen nicht sinnvoll. Zunächst unterscheidet sich die Aminosäureanzahl zwischen dem Loop in Rhodopsin und im muskarinergen M₂-Rezeptor um vier Aminosäuren. Des Weiteren unterscheiden sich auch die Sekundärstrukturvorhersagen und damit auch die vermutliche Sekundärstruktur im M₂-Rezeptor. Der Einbau einer Loopstruktur, wie sie im Rinderrhodopsin gefunden wurde, führte im M₂-Rezeptor zu einem vollständigen Verschluss der orthosterischen Bindungsstelle, die zwischen den transmembranären Bereichen zu finden ist. Diese Anordnung würde es schwierig machen die Kooperativität zwischen den allosterischen Modulatoren und den Orthosteren zu erklären. Daher erscheint diese Loopgeometrie als eher unwahrscheinlich.

Aus dem bovinen Rhodopsin wurden daher nur die Koordinaten des konservierten Cysteins der Disulfid-Brücke und der unmittelbar anschließenden Aminosäuren übertragen.

Zur Identifizierung von Turnstrukturen wurden die Aminosäuren nach dem Schema der *Thornton Frequencies* für β -Turns abgesucht [140,141]. Demnach bildet der Sequenzabschnitt EDGE, unmittelbar vor der Disulfid-Brücke, wahrscheinlich einen β -I'-Turn. Zur Überprüfung dieses Postulates wurde der komplette zweite extrazelluläre Loop sowie die angrenzenden sechs Aminosäuren der helikalen Bereiche durch das Programm LOOPP untersucht. Hierbei wurden sowohl die Helixenden als auch der vorhergesagte β -I'-Turn in *Protein Data Bank*-Strukturen wieder gefunden. Die gefundenen Strukturmerkmale wurden dann beim nachfolgenden *Loopsearch* im HOMOLOGY berücksichtigt [104].

Loop E3

Der dritte extrazelluläre Loop wurde analog dem Vorgehen für den zweiten extrazellulären Loop untersucht. In diesem Fall ist keine Übertragung von Koordinaten aus dem bovinen Rhodopsin möglich. Innerhalb des nur fünf Aminosäuren umfassenden Bereiches liegt wahrscheinlich ein β -Turn des Typs IV vor, d.h. ein β -Turn, der in keine der sonstigen Kategorien passt. Eine solche Struktur wurde auch mehrfach innerhalb der besten Vorschläge des *Loopsearches* gefunden und für das M_2 -Rezeptormodell übernommen.

N-Terminus

Der hochflexible N-Terminus wurde ebenfalls auf Sekundärstrukturen untersucht. Die Konsensus-Vorhersage aus PsiPred, LOOPP und SPLIT35 [142,143] beinhaltete ein kurzes β -Faltblatt sowie einen β -Turn Typ IV. Die Koordinaten wurden daher zunächst über ein *End-Repair* zugeordnet und dann die Sekundärstruktur der entsprechenden Aminosäuren angepasst.

4.1.3 Modellieren der intrazellulären Bereiche

Zur Vervollständigung des Proteinmodells wurden als letztes die intrazellulären Bereiche hinzugefügt.

Loop I1

Der erste intrazelluläre Loop I1 verbindet die Helices I und II. Dieser Abschnitt besitzt im Rhodopsin und im M₂-Rezeptor keine genauer klassifizierte Sekundärstruktur. Dies ist aufgrund seiner Länge, nur vier Aminosäuren, auch kaum möglich. Gegen ein Sekundärstrukturelement spricht auch seine Funktion, nämlich die einfache Verbindung der beiden Helices. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten erscheint es sinnvoll die Struktur des Loops aus dem Rhodopsin zu übernehmen.

Loop I2

Die Länge des zweiten intrazellulären Loops (I2) unterscheidet sich von der des bovinen Rhodopsins um eine Aminosäure. Eine Sekundärstruktur findet sich in diesem Bereich von neun Aminosäuren laut Vorhersage vermutlich auch nicht. Der Abschnitt kann also sehr gut durch einen *Loopsearch* ergänzt werden, wobei die Enden jeweils über die Helices III und IV definiert werden.

Loop I3

Die intrazellulären Bereiche der G-Protein gekoppelten Rezeptoren umfassen auch den Bereich der Signalübertragung. Im Falle der muskarinergen Rezeptoren beträgt die Länge dieses Abschnittes circa 150 Aminosäuren. Wegen fehlender Kenntnisse über eine sehr wahrscheinlich vorhandene strukturelle Gliederung und einer zu großen Länge wurde auf die Modellierung dieses Abschnittes verzichtet. Um die Verbindung zwischen den Helices V und VI dennoch herzustellen, wurde I3 durch einen Loop, der von 20 Alaninen gebildet wird, ersetzt. Eine solche Länge erschien sinnvoll, um eine möglichst natürliche Bewegungsfreiheit der Helices zueinander zu erlauben. Weitere begrenzende Größe ist die *Loopsearch*-Routine, die nur für 20 Aminosäuren ausgelegt ist.

C-Terminus

Im C-terminalen Ende des Rinderrhodopsins wurde eine weitere Helix, im Folgenden als Helix VIII bezeichnet, entdeckt. Für den muskarinergen M_2 -Rezeptor lässt sich aufgrund von Sekundärstrukturvorhersagen eine ähnlich positionierte Struktur erwarten. Es lassen sich in diesem Bereich auch einige homologe Aminosäuren im Sequenzvergleich identifizieren, so dass auch die achte Helix aus dem Rhodopsin in das M_2 -Modell übernommen wurde. Der letzte Abschnitt des C-terminalen Endes wurde abschließend über die *Endrepair*-Prozedur im HOMOLOGY-Modul angefügt.

4.1.4 Bestimmung einer günstigen Seitenkettenkonformation

Das bisher beschriebene M_2 -Rezeptor-Modell beinhaltet bis jetzt nur das Proteinerückgrat ohne Seitenketten. Diese wurden zunächst im HOMOLOGY-Modul des Programmpakets INSIGHT II hinzugefügt, wobei eine virtuelle Mutation der Aminosäuren stattfand. Dies bedeutet, dass für identische Aminosäuren zunächst die Seitenkettenkonformation der Vorlage übernommen wird. Unterscheidet sich die Seitenkette der Vorlage von der des Zielproteins, so wird eine geeignete Konformation aus einer Bibliothek analog der nach Ponder und Richards ausgewählt. Zusätzlich wurde eine weitere Überprüfung der Seitenkettenkonformation im Programm SCWRL durchgeführt. Hierbei wurden sehr ähnliche Konformationen gefunden, die keine Verbesserung des Modells beinhalteten.

4.2 Validierung des Rezeptormodells

Homologiemodelle müssen nach ihrer Erstellung zunächst auf ihre Stabilität hin überprüft werden. Die Stabilität ist dabei auch von den jeweiligen Simulationsbedingungen abhängig, die die Grundlage für die späteren Untersuchungen bilden. Anschließend erfolgt ein Vergleich mit experimentellen Daten, die sich auf die allgemeine Protein-Geometrie beziehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Ansätze zur Überprüfung beziehungsweise zur Erzeugung einer guten Proteingeometrie angewandt und miteinander verglichen, um die Eignung für die Problemstellung und die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen.

4.2.1 Moleküldynamiksimulationen im Vakuum

Die Simulationen unter Vakuumbedingungen stellen die unnatürlichste Umgebung für einen membranständigen Rezeptor dar, dessen transmembranäre Helices sich sonst in einem System aus Phospholipiden mit weiteren eingelagerten Proteinen befindet und dessen Loops sich in einer wässrigen Umgebung mit verschiedenen Ionen sowie auch Botenstoffen befinden. Andererseits sind Simulationen in einem Vakuumsystem für verschiedene GPCRs als geeignet beschrieben worden und auch diejenigen mit dem geringsten rechentechnischen Aufwand [144,145].

4.2.1.1 Energieminimierung

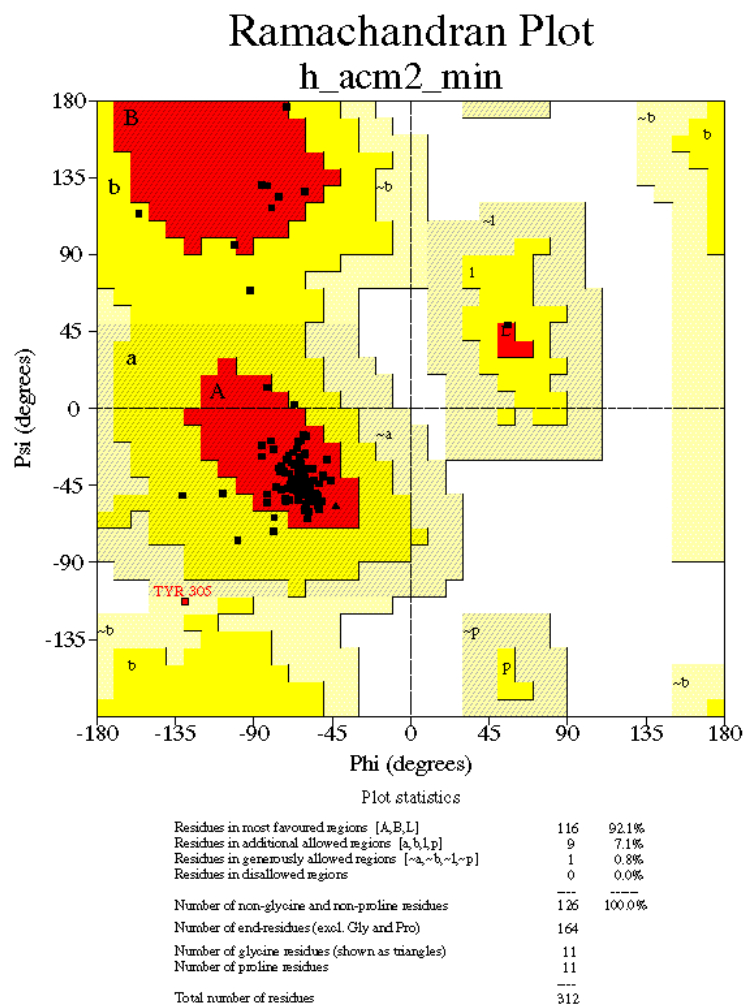
Das Rohmodell des muskarinergen M_2 -Rezeptors sollte in dieser ersten Minimierung von groben Störungen wie zum Beispiel einer zu dichten Anordnung der Seitenketten befreit werden. Hierzu wurde eine relativ grobe Minimierung vorgenommen, die nach 100 Zyklen *steepest descent* und folgenden 500 Zyklen *conjugate gradient* ein Konvergenzkriterium von $0,5 \text{ kcal}/\text{Å}$ erreichte¹¹. Dies ist insofern ausreichend, als der Ramachandran-Plot (Abbildung 4-9), der für die Güte des Modells zunächst betrachtet wurde, schon über 92% der Aminosäuren in den *most favoured regions* anzeigte. Außerdem erschien eine sehr ausführliche energetische Minimierungsprozedur nicht als sinnvoll, weil in der anschließenden

¹¹ Die genauen Simulationsprotokolle aller Energieminimierungen und Moleküldynamiksimulationen befinden sich im Anhang.

Dynamiksimulation dem System wieder kinetische Energie zugeführt wird, mit dem Ziel, eventuelle ungünstige oder untypische Strukturen zu verändern.

Erreicht man auf der Energiehyperfläche aber durch eine Minimierung ein tief gelegenes lokales oder sogar das absolute Energieminimum, so werden deutlich höhere Energien beziehungsweise längere Simulationszeiten benötigt.

Zur weiteren Überprüfung der Proteinstruktur nach der Energieminimierung wurden auch die wichtigen Sekundärstrukturen herangezogen. Der Vergleich mit dem Rohmodell zeigte erwartungsgemäß keine Abweichungen. Das Monomer A der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins wurde in analoger Weise berechnet, um eine Unterscheidung zwischen methodenbedingten und rezeptorbedingten Veränderungen zu ermöglichen.



Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Abbildung 4-9: Ramachandran-Plot des energieminierten M₂-Rezeptormodells

Es befindet sich nur eine einzige Aminosäure in den zusätzlich erlaubten Bereichen und über 92 % innerhalb der am meisten favorisierten Bereiche, so dass es sich um ein sehr gutes Modell handelt.

4.2.1.2 Moleküldynamiksimulation

Im Laufe einer Moleküldynamiksimulation verändert sich die Proteinstruktur hin zu einem energetisch günstigeren Zustand. Um geeignete Simulationsbedingungen zu finden, wurden zunächst Simulationen des Rinderrhodopsins durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass eine Rückhaltekraft von 200 kcal/Å auf das Proteinrückgrat ausreicht, um die transmembranären Bereiche zu stabilisieren. Ein solches *tethering* des Backbones ist für einen membranständigen Rezeptor als sinnvoll anzusehen, da diese Funktion in der natürlichen Umgebung von der Membran übernommen wird. Als Temperatur wurden 310 K, d.h. Körpertemperatur, gewählt. Außerdem wurde ein physiologischer pH-Wert von 7,4 eingestellt. Dies bedeutet, dass Asparaginsäure und Glutaminsäure deprotoniert und Arginin und Lysin in protoniertem Zustand vorliegen. Die oben beschriebenen Parameter wurden dann auf das M₂-Rezeptor-Modell übertragen und zeigten sich auch hier als geeignet. Als Beurteilungskriterien wurden der Verlauf der potentiellen Energie während der Simulation, die *root mean square deviation*, der Ramachandran-Plot, inklusive der Verteilung der Ψ -, Φ -, χ -, und ω -Winkel, und die Sekundärstruktur-Veränderung beziehungsweise deren Erhaltung herangezogen. Die Beschränkung auf die potentielle Energie des Proteins bietet den Vorteil, dass die Schwankungen der kinetischen Energie, die durch kleinere Temperaturschwankungen während der Simulation entstehen nicht mitbetrachtet werden. Abbildung 4-10 zeigt den typischen Verlauf einer 500 ps dauernden Moleküldynamik-Simulation. Nach einer Initialisierungsphase von 1 ps erreicht die potentielle Energie ein Maximum. Während der anschließenden Equilibrierungsphase fällt die potentielle Energie beständig ab, bis sie schließlich ein Plateau erreicht, das eine energetisch stabile Position aufweist.

Zur übersichtlicheren Darstellung der Daten wurden die einzelnen Energiepunkte über die Ermittlung eines gleitenden Mittelwertes vom Rauschen der Simulationsbedingungen befreit. Anschließend wurde zur Bestimmung der mittleren potentiellen Energie der Mittelwert der Messpunkte nach der Equilibrierung bestimmt.

Zur Objektivierung der Equilibrierung wurde jeweils auch die Geradengleichung innerhalb des Bereichs berechnet und die Equilibrierung erst akzeptiert, wenn die Steigung weniger als 0,001% beträgt und die Abweichung des Ordinatenabschnittes vom gleitenden Mittelwert 0,1%¹².

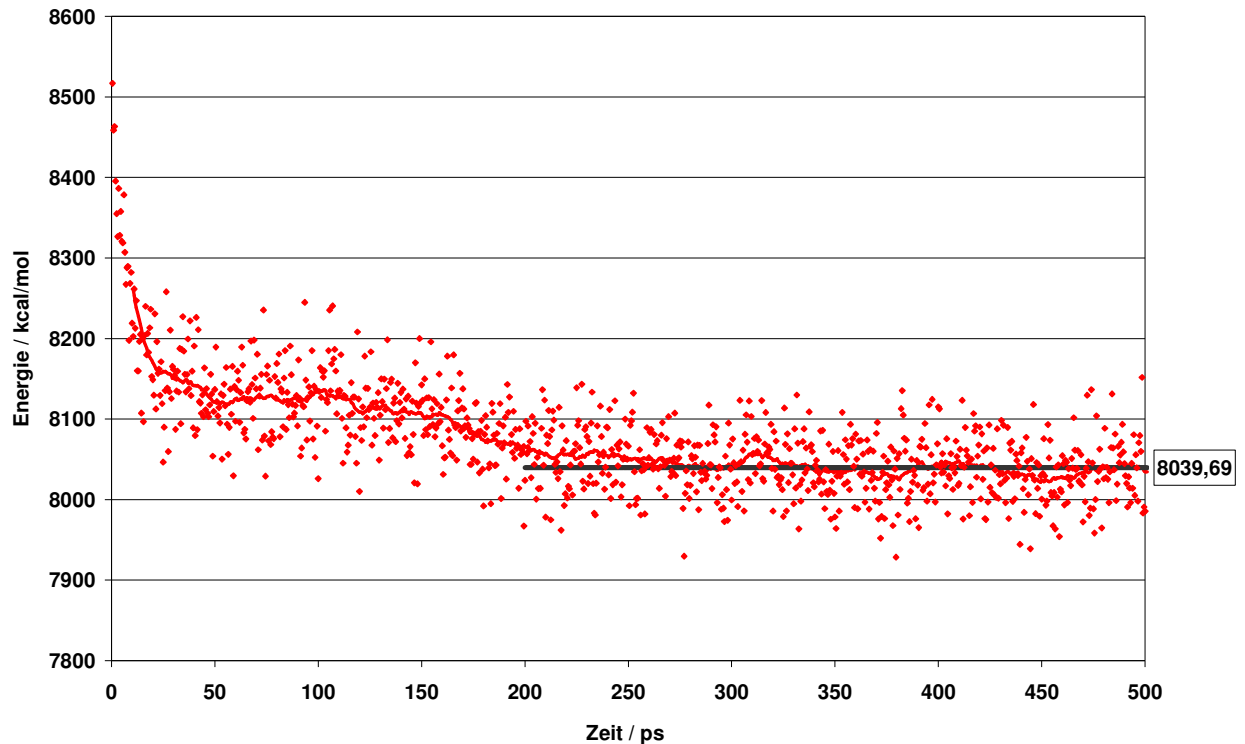


Abbildung 4-10: Verlauf der potentiellen Energie

Die einzelnen Werte der potentiellen Energie sind als rote Punkte dargestellt. Der gleitende Durchschnitt, wird für jeden auf der Abszisse aufgetragenen Wert als Mittelwert von 40 Punkten auf der Ordinate um den jeweiligen abszissenwert gebildet. Dieses Vorgehen entfernt das „Rauschen“ aus der potentiellen Energie, so dass die Identifizierung der Equilibrierung, die sich hier nach 200 ps einstellt, erleichtert wird.

Betrachtet man die Abweichungen im Bereich des Proteinrückgrates, so zeigen diese einen analogen Verlauf. Nach einem zunächst steilen Anstieg flacht die Kurve zunehmend ab, bis sie ebenfalls ein Plateau erreicht, auf dem sich das Backbone nur noch geringfügig in seiner Position zwischen aufeinander folgenden *frames* unterscheidet (Abbildung 4-11).

¹² Dieses Vorgehen wird auch auf die energetischen Betrachtungen des M₂-Rezeptormodells und der Rezeptor-Ligand-Komplexe übertragen.

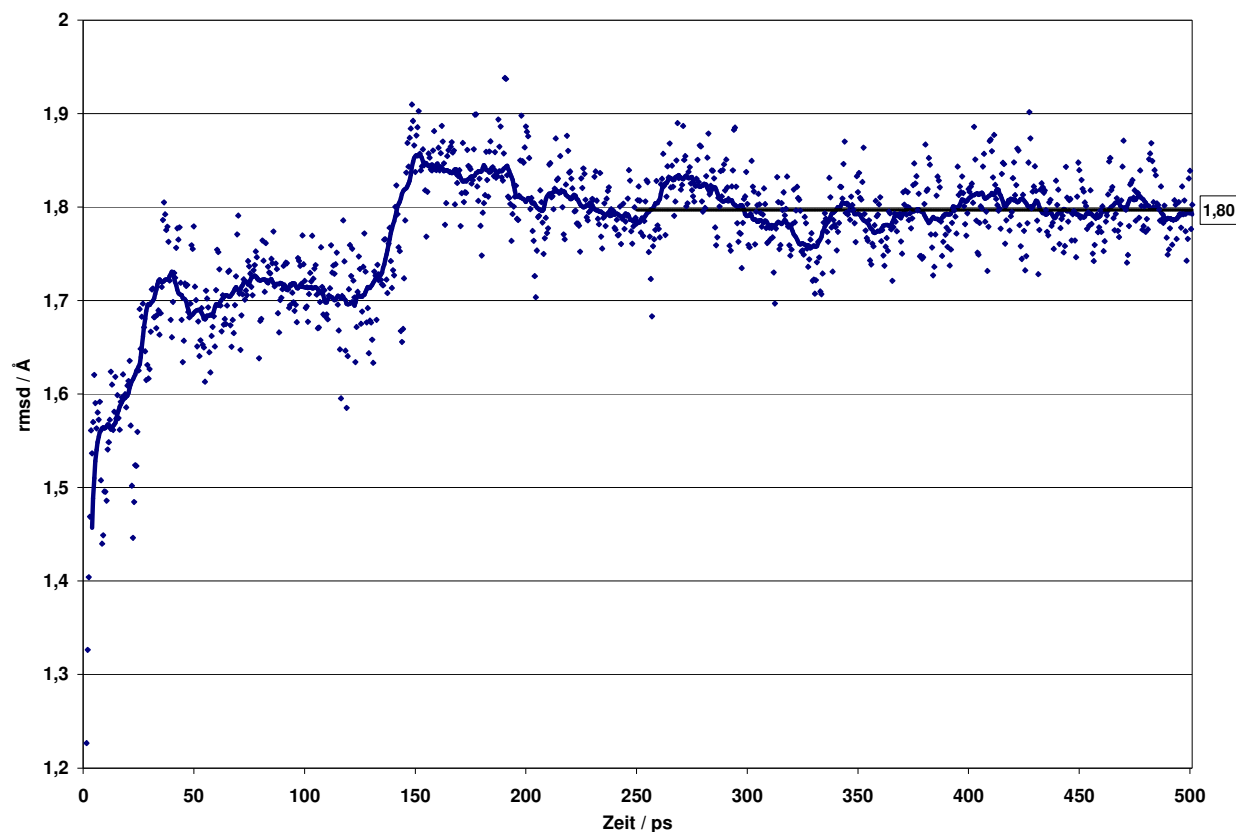


Abbildung 4-11: root mean square deviation des Proteinrückgrates

Die einzelnen Abweichungen des Proteinrückgrates sind als blaue Punkte dargestellt. Der gleitende Durchschnitt wird jeweils als Mittelwert von 28 Punkten um den jeweiligen Punkt gebildet. Dieses Vorgehen entfernt das „Rauschen“ der rmsd-Werte durch Schwingung, so dass die Identifizierung der Equilibrierung erleichtert wird.

Zur weiteren Auswertung der Simulation wurde die Datensammelphase, also der Bereich nach der energetischen und strukturellen Equilibrierung herangezogen. In dieser MDS wurden die Strukturen nach 250 ps alle 500 fs entnommen. Die erhaltenen 500 Konformationen wurden dann mittels des Programms NMRCLUST [127] in Gruppen eingeteilt werden. Dies bietet den Vorteil einer deutlichen Datenreduktion, da ähnliche Strukturen aussortiert werden. Anschließend erfolgte eine ausführliche energetische Minimierung der repräsentativen Strukturen jedes *Clusters*. Die energieminierten Strukturen wurden dann strukturell überprüft, sowohl auf Qualität, im Programm PROCHECK [123] als auch auf ihre Sekundärstruktur im Programm STRIDE [131]. Das Ergebnis der Untersuchung mittels PROCHECK zeigt Tabelle 4-2.

Tabelle 4-2: Statistik des Ramachandran-Plots einer repräsentativen Struktur

Ramachandran-Plot (Φ/Ψ -Winkel-Verteilung)	Idealwert	Modell
Aminosäuren in am meisten bevorzugten Regionen	> 90 %	92,1 %
Aminosäuren in der erlaubten Regionen		7,1 %
Aminosäuren in zusätzlich erlaubten Regionen		0,8 %
Aminosäuren in verbotenen Regionen		0 %
G-Faktoren		
Torsionswinkel		Bindungslängen und –winkel des Proteinrückgrates
Φ -Winkelverteilung	-0,24	Bindungslängen
χ_1 -/ χ_2 -Winkelverteilung	-0,27	Bindungswinkel
χ_1 -Winkel	-0,2	
χ_3 / χ_4 -Winkel	0,52	
ω -Winkel	0,48	
Torsionswinkel gesamt	-0,11	Bindungsparameter gesamt
G-Faktor gesamt	-0,08	

Ein struktureller Vergleich der Proteingeometrien zeigte, dass die helikalen Bereiche sich untereinander kaum unterscheiden. Im Vergleich zur Ausgangsstruktur sind Veränderungen vor allem im Bereich von Helix IV, V und VI zu beobachten (Abbildung 4-12).

Die vierte transmembranäre Helix wurde in der Sekundärstrukturvorhersage überwiegend als etwas kürzer als im Rhodopsin beschrieben. Daher ist die Verkürzung dieser Helix nach der Moleküldynamiksimulation als durchaus sinnvoll anzusehen. Eine Veränderung der Helices V und VI findet am Übergang zum dritten intrazellulären Loop statt. An dieser Stelle befinden sich diejenigen Aminosäuren, die für den Übergang in den aktiven Zustand verantwortlich zu sein scheinen [30]. In diesem Bereich liegt auch das hochkonservierte DRY-Motiv, das sich im M_2 -Rezeptor an den Positionen 120-122 befindet. Zwischen Aspartat 120, Arginin 121 und Glutamat 382 in Helix VI besteht die Möglichkeit der Ausbildung von Salzbrücken, deren fehlende Ausbildung zu einer konstitutiven Aktivität führt. Während der MDS des leeren Rezeptormodells unter Vakuumbedingungen wurde diese doppelte Salzbrücke, je nach Ausgangskonformation der Seitenketten in unterschiedlicher Häufigkeit beobachtet.

Fehlte diese Salzbrücke zeigte das Rezeptorprotein allerdings in den Simulationen auch keine deutlichen Veränderungen der Konformation in Richtung einer aktiven Form.

Die interhelikalen Wasserstoffbrückenbindungen, die in der Kristallstruktur des Rinderrhodopsins möglich sind, werden auch im Modell des M₂-Rezeptors erhalten. Sie verbinden Helix I mit den Helices II und VII sowie mit dem C-Terminus. Helix II tritt in Verbindung mit Helix III, IV und VII. Die dritte transmembranäre Helix ist mit den Helices VI und VII verbunden, im Unterschied zum Rhodopsin, bei dem Helix III mit den Helices IV, V und VII verbunden ist. Wasserstoffbrückenbindungen verbinden auch die Helices VI und VII sowie die siebte Helix und den C-Terminus.

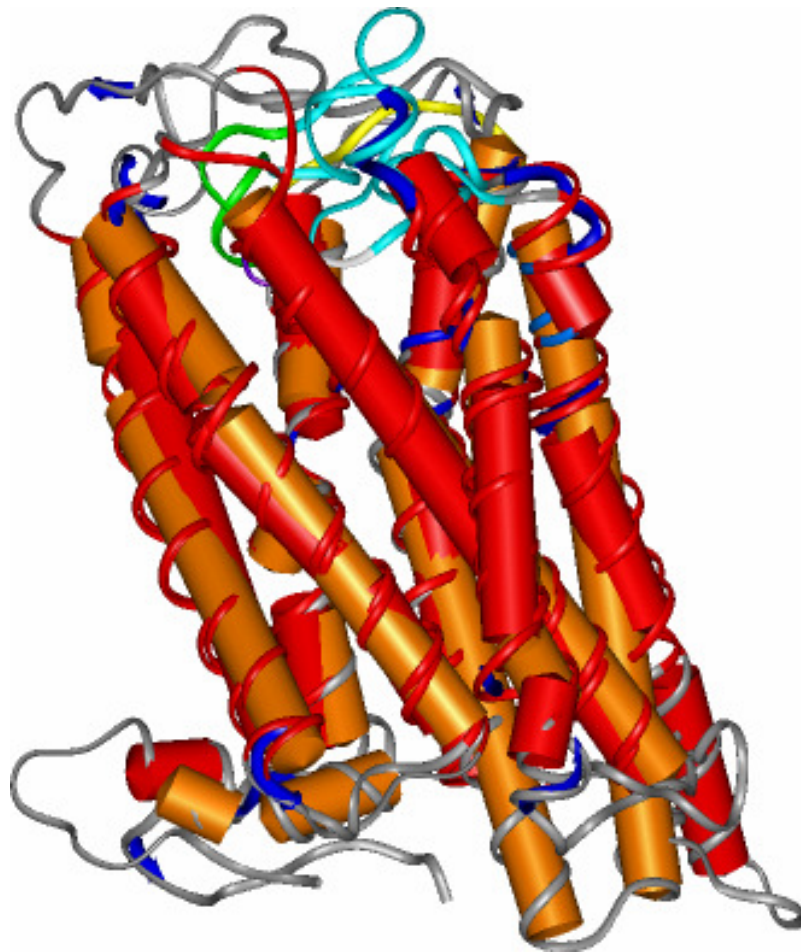


Abbildung 4-12: Überlagerung der Startstruktur mit der minimierten Endstruktur

Die transmembranären Helices sind als Röhren dargestellt, wobei die Ausgangsstruktur orange gefärbt ist, die Endstruktur rot. Turnstrukturen sind als blaue Pfeile markiert, β -Faltblattstrukturen nicht vorhanden. Die Bänder zeigen den Verlauf des Proteinerückgrates. Ursprünglich helikale Bereiche sind rot, die intrazellulären Loops sowie der N-Terminus und der erste extrazelluläre Loop grau, der zweite extrazelluläre Loop grün / cyan und der dritte extrazelluläre Loop gelb eingefärbt.

4.2.2 Moleküldynamiksimulationen in einer membranähnlichen Umgebung

Die Simulation eines membranständigen Rezeptors in einer membranähnlichen Umgebung bietet den Vorteil einer genaueren Wiedergabe der natürlichen Umgebung. So entfallen die im Vakuum notwendigen Rückhaltekräfte auf das Proteinerückgrat. Als einfaches Membranmodell dient eine Umgebung aus 3-Phasen, einer zentralen Tetrachlorkohlenstoffschicht und zwei wässrigen Schichten. Die extrazelluläre und intrazelluläre Wasserschicht wird durch die Zugabe von Natrium- und Chlorid-Ionen auf physiologische Bedingungen eingestellt. Die Simulation eines definierten pH-Wertes ist jedoch zu aufwändig, so dass hier wie bei den Vakuumrechnungen die sauren Aminosäuren als deprotoniert und die basischen Aminosäuren als protoniert betrachtet werden. Zum Aufbau der lipophilen Schicht ist Tetrachlorkohlenstoff geeignet, da er neben Lennard-Jones-Wechselwirkungen keine weiteren Kontakte mit dem Protein ausbildet und sich somit ähnlich verhält wie die Phospholipidketten einer Biomembran. Zur Berechnung der Schichtdicke der Tetrachlorkohlenstoff-Phase müssen die fehlenden hydrophilen Kopfgruppenbereiche der Phospholipide berücksichtigt werden. Die Tetrachlorkohlenstoffschicht besitzt daher eine Dicke zwischen 22–29 Å. Im GROMACS-Kraftfeld sind für Tetrachlorkohlenstoff keine Parameter definiert. Das Kraftfeld wurde daher durch Atomtypen für den Kohlenstoff (CCL) und das Chlor (CLC) ergänzt. Die Parameter hierfür wurden teils aus dem TRIPOS-Kraftfeld teils aus dem GROMOS96-Kraftfeld übertragen. Zusätzlich wurden die Partialladungen sowie auch die Bindungslängen quantenchemisch berechnet. Nach dieser Ergänzung wurde zunächst eine reine Tetrachlorkohlenstoff-Box auf ihre physikalischen Eigenschaften hin untersucht, danach dann eine Box mit einem Wasser/Tetrachlorkohlenstoff-Gemisch. Diese Vorarbeiten zeigten, dass die physikalischen Parameter gut wiedergegeben werden können und keine Mischung sondern eine Phasenbildung stattfindet. Die Eigenschaften der ergänzten Parameter entsprechen den physikalischen und chemischen Gegebenheiten. Im Folgenden wird diese Simulationsumgebung als 3-Phasen-Box bezeichnet. Abbildung 4-13 zeigt das M₂-Rezeptormodell in der Simulationsumgebung.

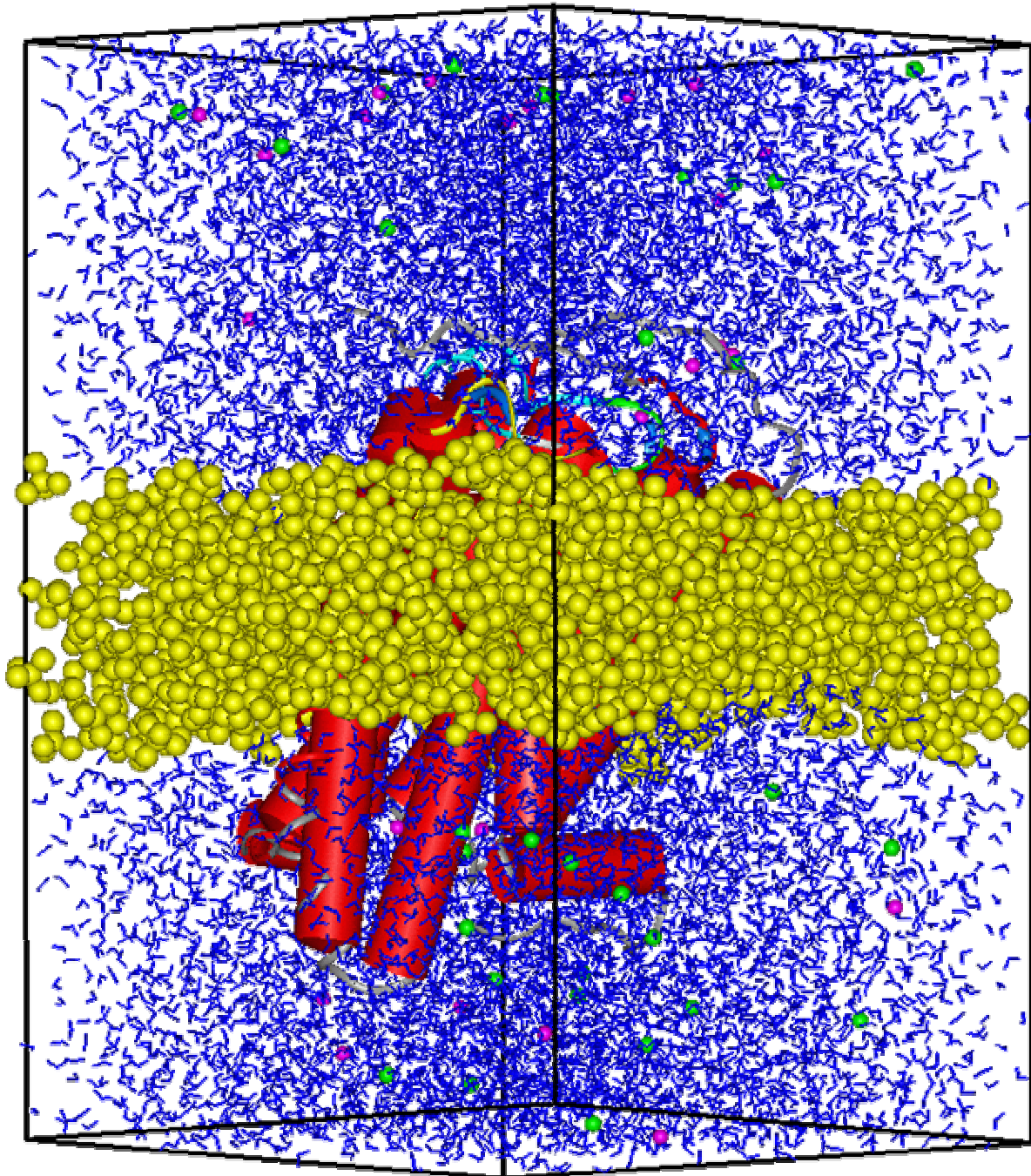


Abbildung 4-13: M₂-Rezeptormodell in einer 3-Phasenbox aus Wasser und Tetrachlorkohlenstoff

Das Proteinrückgrat des M₂-Rezeptormodells ist als Band dargestellt. Zusätzlich sind die helikalen Strukturen als rote Röhren dargestellt. Der Tetrachlorkohlenstoff ist als gelbe CPK-Struktur eingezeichnet, Wasser in blau. Die enthaltenen Natrium- und Chlorid-Ionen sind magenta bzw. grün eingefärbt.

Zur Verminderung des Rechenaufwandes und zur Vermeidung von Wandeffekten wurden die im Folgenden beschriebenen Simulationen unter periodischen Randbedingungen durchgeführt. Diese bieten den Vorteil, dass eine deutlich größere Lösungsmittelumgebung durch Spiegelung der real simulierten Box vorhanden ist. Es muss allerdings bei der Boxgröße berücksichtigt werden, dass sich in diesen Boxen ebenfalls ein Protein befindet, mit dem keine Wechselwirkungen eingegangen werden sollen. Um weitreichende Lennard-Jones-Wechselwirkungen zu verhindern muss daher die Box mindestens einen Abstand von 5 Å zur Proteinoberfläche aufweisen. Die Längen der X-Achse und die Y-Achse wurden daher auf 64 Å, die Länge der Z-Achse auf 99 Å festgelegt. Die Simulationsparameter der 3-Phasen-Box sind in Tabelle 4-3 aufgelistet.

Tabelle 4-3: Simulationsbedingungen der 3-Phasenbox

Zeitschritt / ps	0,002
Anzahl Schritte	2.500.000
Cut-off / nm	0,9
Methode zur Berechnung der Coulombwechselwirkungen	PME
Coulomb Cut-off / nm	0,9
Methode zur Berechnung der Lennard-Jones-Wechselwirkungen	Cut-off
LJ-Cut-off / nm	0,9
Temperatur / K	310
Druck / bar	1,0
Constraints	Bindungen zwischen Wasserstoffen und schweren Atomen

4.2.2.1 Energieminimierung und Strukturoptimierung

Als Ausgangsstruktur diente das Rohmodell des muskarinergen M₂-Rezeptors. Es wurde anhand der in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Vorhersagen der transmembranären Bereiche innerhalb der 3-Phasen-Box positioniert. Anschließend wurde eine *steepest descent* Minimierung von 1000 Schritten durchgeführt, so dass sehr ungünstige Kontakte aufgehoben wurden. Trotzdem enthielt die Proteinstruktur deutlich mehr untypische Positionen als die im Vakuum minimierte Struktur.

Eine weitere Minimierung mit der *conjugate gradient* Methode führte zu keiner strukturellen Verbesserung. Daher wurde ein Protokoll aus mehreren kurzen Moleküldynamiksimulationen zur Strukturoptimierung benutzt. Bei dieser Vorgehensweise wurde auf die Backbone-Atome der sieben Helices langsam abnehmende Rückhaltekräfte gelegt. Die Ergebnisse der Analyse durch das Programm PROCHECK waren trotzdem im Vergleich zu der im Vakuum erhaltenen Struktur deutlich schlechter. Eine weitere Verbesserung der Struktur war unter Verwendung von Rückhaltekräften nicht möglich. Innerhalb der freien MDS ist es allerdings möglich, dass sich ungünstige Kontakte bzw. untypische Winkel innerhalb des Proteinrückgrates zu typischen verändern. Eine solche Optimierung wurde im Rahmen anschließenden der moleküldynamischen Untersuchungen auch beobachtet, ist aber im abgebildeten Ramachandran-Plot noch nicht berücksichtigt, sondern wird erst innerhalb der Equilibrierungsphase der MDS durchgeführt und dort beschrieben.

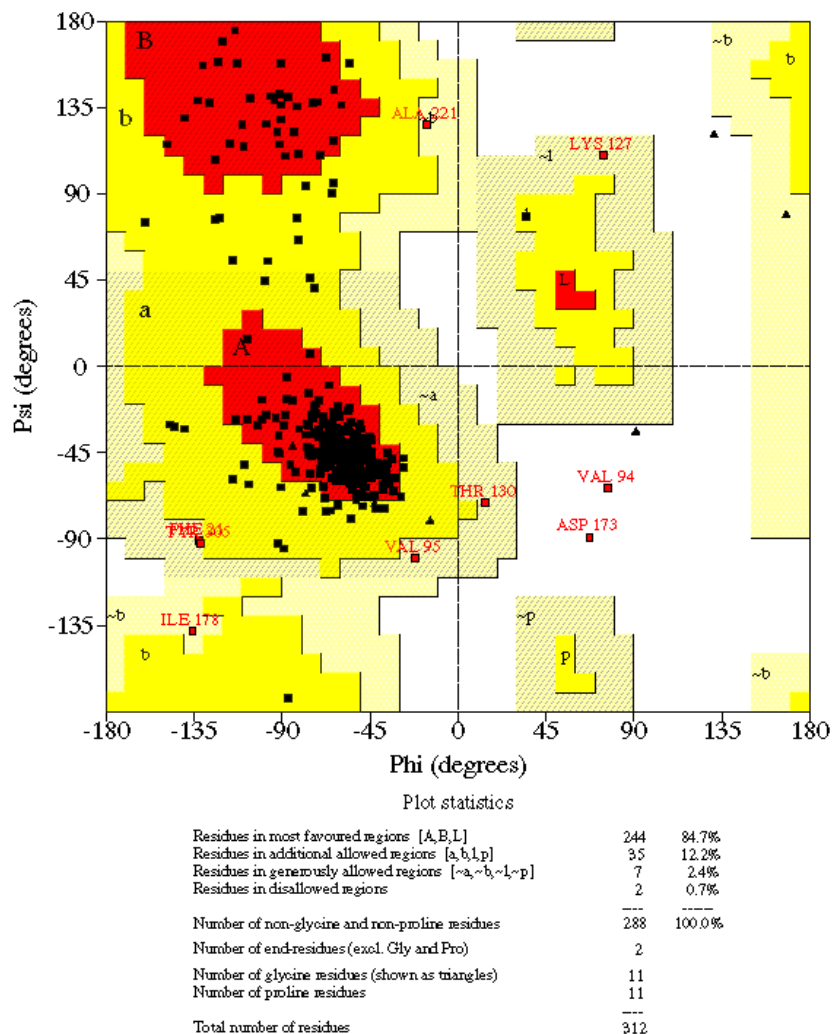


Abbildung 4-14: Ramachandran-Plot des M₂-Rezeptormodells in der 3-Phasenbox

Die Proteinstruktur wurde zunächst in der 3-Phasenbox minimiert und anschließend in der Simulationsumgebung vorequiliert.

4.2.2.2 Moleküldynamiksimulation

Die Moleküldynamiksimulation erfolgte, analog zu derjenigen im Vakuum, bei 310 K, wobei aufgrund der Größe des Systems mit 5 ns eine deutlich längere Simulationsdauer nötig ist. Eine Rückhalterkraft auf das Proteinrückgrat ist unter diesen Bedingungen nicht notwendig.

Die Analyse erfolgte zunächst wieder über eine energetische Auswertung, bei der die potentielle Energie des Systems und die potentielle Energie des Proteins betrachtet wurden. Nach einer Simulationsdauer von 1 ns stellte sich die energetische Equilibrierung ein. Die Beurteilung der Equilibrierung erfolgte ebenfalls nach der *root mean square deviation* des Proteinrückgrates, die ebenfalls nach 1 ns ein erstes Plateau erreicht, dieses nach einer weiteren Nanosekunde aber wieder verlässt, um ein weiteres Plateau nach 3 ns Simulationsdauer zu erreichen. Danach blieb der rmsd-Wert bis zum Ende der Simulation bei 5 ns stabil. Die Fluktuation der Schichtdicke des Tetrachlorkohlenstoffs wurde ebenfalls beobachtet, um eine zu große Ausdehnung oder eine zu starke Kontraktion der lipophilen Schicht zu vermeiden. In Bezug auf diese Schicht wurde der Wert der Endstruktur mit 26,6 Å bestimmt, der im Sollbereich zwischen 25 und 28 Å liegt. Die Ausdehnung der Tetrachlorkohlenstoffschicht entspricht damit der Schichtdicke der Seitenketten einer Phospholipidmembran ohne die geladenen Kopfgruppen.

Zur Vermeidung von Spitzen bezüglich des Boxinnendrucks wurde mit einer Druckanpassung nach Berendsen gearbeitet. Die Anpassung führte im Laufe der Dynamiksimulation nur zu einer geringen Abweichung von der Ausgangsgröße der 3-Phasen-Box. Eine Auswertung des Innendrucks zeigte einen konstanten Druck von 1 bar allerdings mit simulationsbedingten Abweichungen vom Mittelwert. Das simulierte 3-Phasen-System ist demnach stabil und geeignet, die Membranumgebung eines Proteins zu ersetzen. Zur strukturellen Auswertung der Proteinkonformation wurden nach der Equilibrierungsphase in Abständen von 10 ps Strukturen aus der Dynamiksimulation extrahiert und durch das Programm NMRCLUST analysiert. Die repräsentativen Strukturen der einzelnen Cluster wurden energetisch minimiert und noch einmal auf ihre Ähnlichkeit hin überprüft. Im Anschluss wurden die erhaltenen zwei Strukturen sowohl auf ihre Qualität als auch auf ihre Sekundärstrukturmerkmale überprüft.

Die Ergebnisse des PROCHECKS waren besser als vor der Moleküldynamiksimulation, so waren nur noch fünf Aminosäuren in nicht erlaubten beziehungsweise im Allgemeinen erlaubten Bereichen vorhanden (Tabelle 4-4). Insgesamt ist die Qualität des Modells als gut anzusehen, da über 90 % der Aminosäuren sich in den am meisten favorisierten und zusätzlich erlaubten Regionen befinden.

Tabelle 4-4: Statistik des Ramachandran-Plots der repräsentativen Strukturen aus der Dynamiksimulation

Ramachandran-Plot (Φ/Ψ -Winkel-Verteilung)		Idealwert	Modell
Aminosäuren in am meisten bevorzugten Regionen		> 90 %	88,2 %
Aminosäuren in der erlaubten Regionen			10,1 %
Aminosäuren in zusätzlich erlaubten Regionen			0,3 %
Aminosäuren in verbotenen Regionen			1,4 %
G-Faktoren			
Torsionswinkel		Bindungslängen und -winkel des Proteinerückgrates	
Φ -Winkelverteilung	-0,25	Bindungslängen	0,22
χ_1/χ_2 -Winkelverteilung	-0,51	Bindungswinkel	-0,06
χ_1 -Winkel	-0,04		
χ_3/χ_4 -Winkel	0,60		
ω -Winkel	-0,8		
Torsionswinkel gesamt	-0,45	Bindungsparameter gesamt	-0,06
G-Faktor gesamt	-0,24		

Der G-Faktor, der neben den Phi- und Psi-Winkeln auch die Omega- und Zeta-Winkel, ungünstige Kontakte der Seitenketten und Wasserstoffbrückenbindungen berücksichtigt, wurde von -1,1 auf -0,24 deutlich verbessert und liegt jetzt oberhalb des Standardwertes von -0,5. Eine genauere Untersuchung der Aminosäuren in den unerlaubten Regionen zeigte, dass es sich dabei mit Valin 94 (E1), Isoleucin 158 (TM IV / E2), Aspartat 173 (E2) und Cystein 303 (C-Terminus) ausschließlich um Aminosäuren angrenzend an die Loop-Regionen, in den Loop-Regionen beziehungsweise des C-Terminus handelt. Diese Abschnitte sind in Proteinen als sehr flexibel anzusehen und lassen sich daher schlechter mit den, aus starren Kristallstrukturen abgeleiteten, Parametern beschreiben.

Die Koordinaten der Vorlage, der A-Kette des Rinderrhodopsins, weisen, an den in unerlaubten Bereichen liegenden Aminosäuren der Modellstruktur, schon Φ - und Ψ -Winkel in den zusätzlich erlaubten Regionen auf. Eine Ausnahme bildet hierbei Aspartat 173, dessen Ursprungskoordinaten nicht aus der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins resultieren, sondern aus einem Loopsearch. Betrachtet man zusätzlich die Position, in der Nähe der konservierten Disulfid-Brücke und die umgebende Sequenz mit Glutamat 172 und Glutamat 175 so finden sich in der *Protein Data Bank* zwar ähnliche Strukturen, aber auch diese weisen keine typische Φ - und Ψ -Winkel-Verteilung auf, sondern erzeugen im PROCHECK unerlaubte Bereiche.

Die sieben transmembranären Helices sind in ihrer Länge erhalten geblieben, wobei sich in einigen Bereichen andere Kinks¹³ ausgebildet haben (Abbildung 4-15).

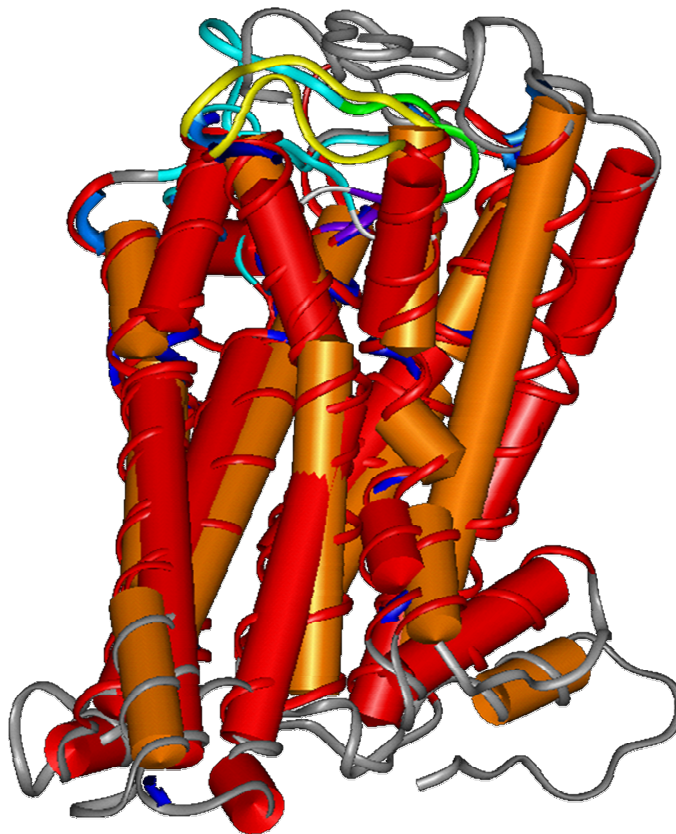


Abbildung 4-15: Überlagerung der Ausgangsstruktur und einer Clusterstruktur

Die Helices der Ausgangsstruktur (orange) zeigen eine ähnliche Orientierung wie nach der MDS (rot), wobei sich die Kinks (blau) voneinander unterscheiden.

¹³ Kinks sind Knicke innerhalb einer helikalen Struktur, zum Beispiel verursacht durch strukturbrechende Aminosäuren wie Prolin oder Alanin.

Diese Veränderungen sind zum Beispiel im Fall der siebten Helix auf die Anhäufung von aromatischen Aminosäuren zurückzuführen, die deutlich mehr Raum beanspruchen als die im Rhodopsin vorhandenen Aminosäuren. Innerhalb des verkürzten dritten intrazellulären Loops bildet sich teilweise eine zusätzliche Helix aus. Hinweise auf eine solche Struktur gibt auch eine Sekundärstrukturvorhersage für diesen Loop-Bereich. Im Bereich der anderen intrazellulären Loops und des C-Terminus finden sich nur minimale Abweichungen von der Sekundärstruktur des Rohmodells. Das gleiche gilt für den N-Terminus sowie den ersten und dritten extrazellulären Loop. Die Sekundärstruktur des zweiten extrazellulären Loops zeigt zwei unterschiedliche Erscheinungsbilder, die über den Simulationszeitraum alternierend auftreten. So kann sowohl ausgehend von Thr 170 bis Tyr 177 ein β -Hairpinturn mit zwei β -Faltblattstrukturen gefunden werden, als auch verschiedene β -Turntypen ohne eine β -Faltblattstruktur. Die beiden möglichen Strukturen sind in Abbildung 4-16 dargestellt.

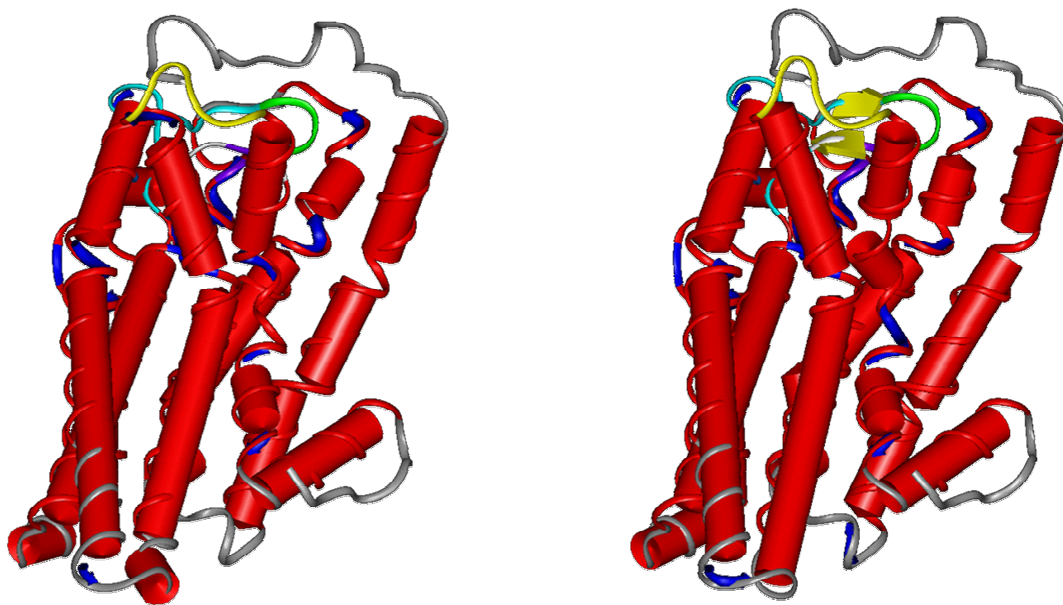


Abbildung 4-16: Typische Strukturen während der MDS in der 3-Phasenbox

Das Proteinrückgrat ist als Band dargestellt. Die intrazellulären Loops, der erste extrazelluläre Loop und der N-Terminus sind grau gefärbt, die transmembranären Bereiche rot, der zweite extrazelluläre Loop cyan / grün, der dritte extrazelluläre Loops gelb. Sekundärstrukturen sind nach der Methode von Kabsch und Sander dargestellt. Rote Röhren symbolisieren Helices, blaue Pfeile Turn-Strukturen und gelbe Pfeile β -Faltblätter.

4.2.3 Moleküldynamiksimulationen in einer Phospholipidmembran

Die Simulation des muskarinergen M_2 -Rezeptormodells in einer Phospholipidmembran stellt den Ansatz dar, der den realen Bedingungen am ähnlichsten ist. Das Modell und die Parameter der Membran wurden in unserer Arbeitsgruppe von C. Anézo erstellt und validiert [146]. In diesem Modell sind 128 Moleküle Diphosphatidylcholin (DPPC) vorhanden, die senkrecht zur Membranebene auf einer Fläche von $64 \times 64 \text{ \AA}$ verteilt sind. Diese Größe der Box erlaubte es das M_2 -Rezeptormodell ohne eine wesentliche Veränderung der Phospholipidschicht in der Box zu positionieren. Um Platz für das Protein zu schaffen wurden 33 DPPC-Moleküle aus der Box entfernt und die wässrigen Schichten oberhalb und unterhalb der DPPC-Doppelschicht aufgrund der größeren Ausdehnung des Proteins ergänzt werden. Die Boxlänge entlang der Lipidketten wurde wie bei der 3-Phasen-Box auf 99 \AA festgesetzt. Der physiologische pH-Wert wurde, wie bei den vorherigen Simulationsbedingungen beschrieben, erzeugt. Es wurden ebenfalls Natrium- und Chlorid-Ionen sowohl zum Ladungsausgleich als auch zur Erzeugung physiologischer Ionenkonzentrationen hinzugefügt. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Simulationsbox gibt Tabelle 4-5.

Tabelle 4-5: DPPC-Membran mit dem M_2 -Rezeptormodell

Protein	312 Aminosäuren
Diphosphatidylcholin (DPPC)	95 Moleküle
Wasser	8132 Moleküle
Chlorid-Ionen	31 Cl^-
Natrium-Ionen	23 Na^+
Boxgröße	$62,9 \times 62,9 \times 102,9 \text{ \AA}^3$

4.2.3.1 Energieminimierung und Strukturoptimierung

Die energetische Minimierung des Systems erfolgte wie oben schon beschrieben zunächst nach einem *steepest descent* Algorithmus. Auch in diesem Fall führte eine anschließende *conjugate gradient* Minimierung zu keiner Verbesserung der Proteinstruktur, sondern im Gegenteil zu einer Auflösung der helikalen Struktur innerhalb der transmembranären Bereiche.

Daher wurde die Optimierung der Startstruktur mit Hilfe mehrerer kurzer Moleküldynamiksimulationen bei abnehmenden Rückhaltekräften auf das Protein und anschließend auf das Proteinrückgrat der Helices durchgeführt. Dieses Vorgehen bietet den umgebenden Lösungsmittelmolekülen beziehungsweise den Phospholipidketten die Möglichkeit sich besser an das Protein im Inneren der Box anzupassen, ohne die vorhandenen Sekundärstrukturen zu zerstören. Es war allerdings nicht möglich, die Aminosäuren in unerlaubten Bereichen vollständig zu entfernen. Die Größe der Box passte sich ebenfalls an, denn durch die Entfernung der DPPC-Moleküle entstand zunächst ein kleiner Leerraum zwischen Membran und Protein, der während der Equilibrierungsphase geschlossen wurde (Abbildung 4-17).

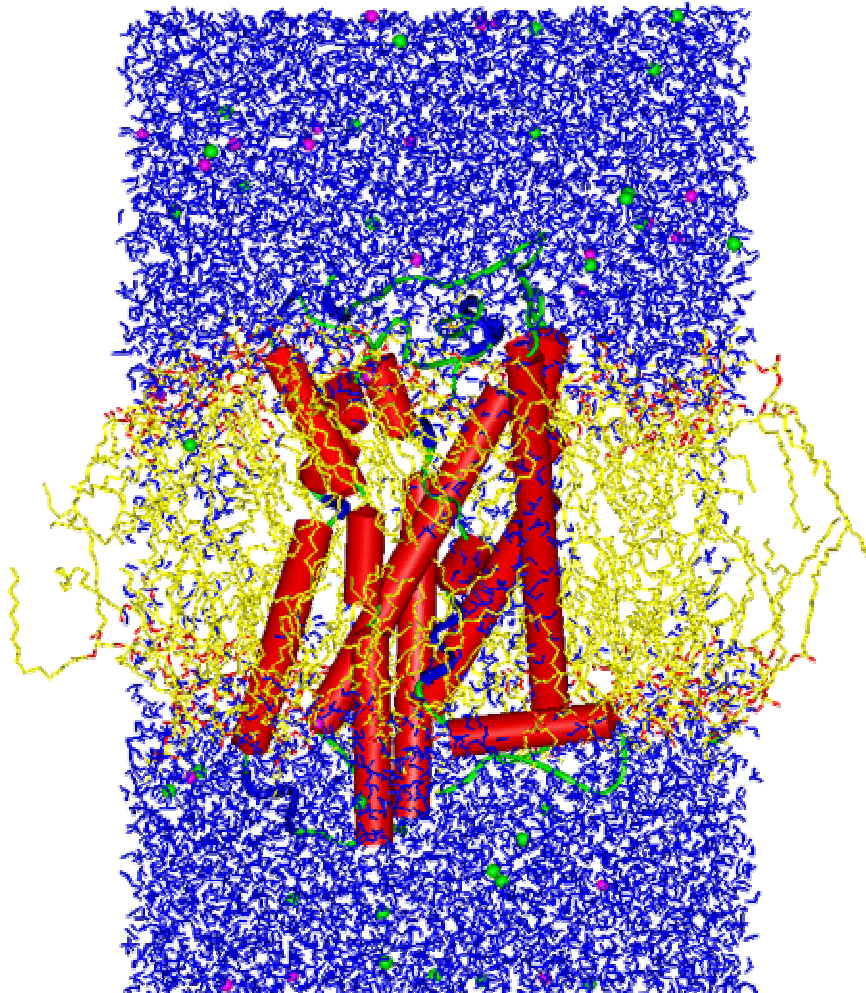


Abbildung 4-17: M₂-Rezeptormodell in einer Phospholipidmembran

Das Proteinmodell ist mit seinen Sekundärstrukturelementen dargestellt: Helices: rote Röhren, Turn-Strukturen: blaue Pfeile, Coiled-Coil: grüne Bänder. Die Seitenketten des Diphosphatidylcholins sind gelb gefärbt, die Stickstoffe der Cholinkopfgruppe blau, die Sauerstoffe rot. Der wässrige Extrazellulärraum (oben) und Intrazellulärraum (unten) sind blau gefärbt, die zum Ladungsausgleich bzw. zur Einstellung einer physiologischen Lösung benötigten Chlorid-Ionen grün, die Natrium-Ionen magenta.

4.2.3.2 Moleküldynamiksimulation

Zur Prüfung der Stabilität der Rezeptorgeometrie wurde eine Moleküldynamiksimulation bei 310 K durchgeführt. Analog zur Simulation in der 3-Phasen-Box sind auch in diesem System keinerlei Rückhaltekräfte auf die helikalen Bereiche des Proteins notwendig. Bis zur energetischen Equilibrierung benötigte das System eine Simulationsdauer von ungefähr 2 ns (Abbildung 4-18). Die potentielle Energie der Membrenumgebung beträgt nach der Equilibrierung durchschnittlich $-419.770,52 \text{ kJ/mol}^{14}$.

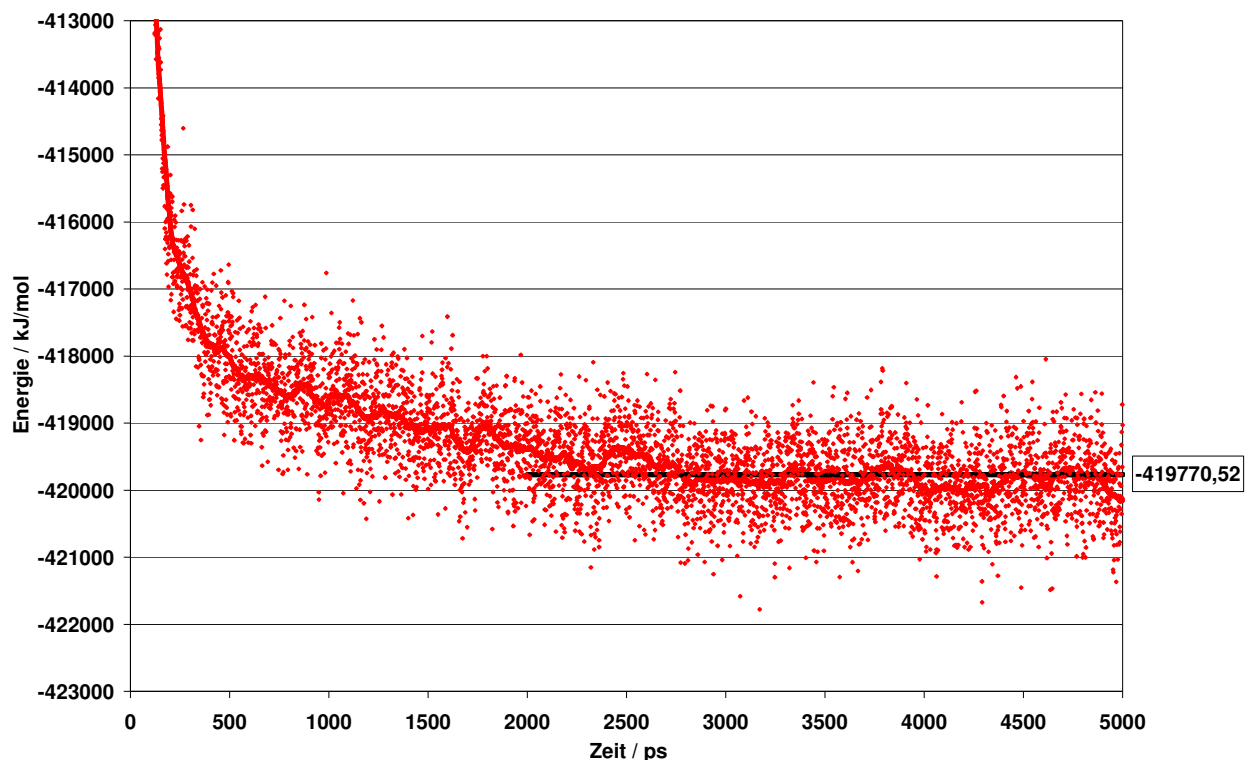


Abbildung 4-18: Verlauf der potentiellen Energie des Membransystems

Das Membransystem ist nach 2 ns energetisch equilibriert, entsprechend den in Abschnitt 4.2.1.2 beschriebenen Definitionen.

¹⁴ Im Programmpaket GROMACS werden die Energiewerte in kJ/ mol angegeben, im Unterschied zu FDISCOVER, das diese Werte in kcal/mol angibt. Da die Energiewerte aus unterschiedlichen Kraftfeldern nicht miteinander verglichen werden können, wurde auf eine Umwandlung verzichtet.

Zu diesem Zeitpunkt erreicht die *root mean square deviation* ebenfalls einen Plateauwert, der eine Equilibrierung des Systems anzeigt. Die Abweichung des Backbones wird im Programm GROMACS in nm angegeben, da die Werte aber leicht zu vergleichen sind wurden sie nicht in Å, der Einheit die FDISCOVER verwendet, umgewandelt um auch die Unterschiede zwischen den verwendeten Software-Paketen leichter kenntlich zu machen.

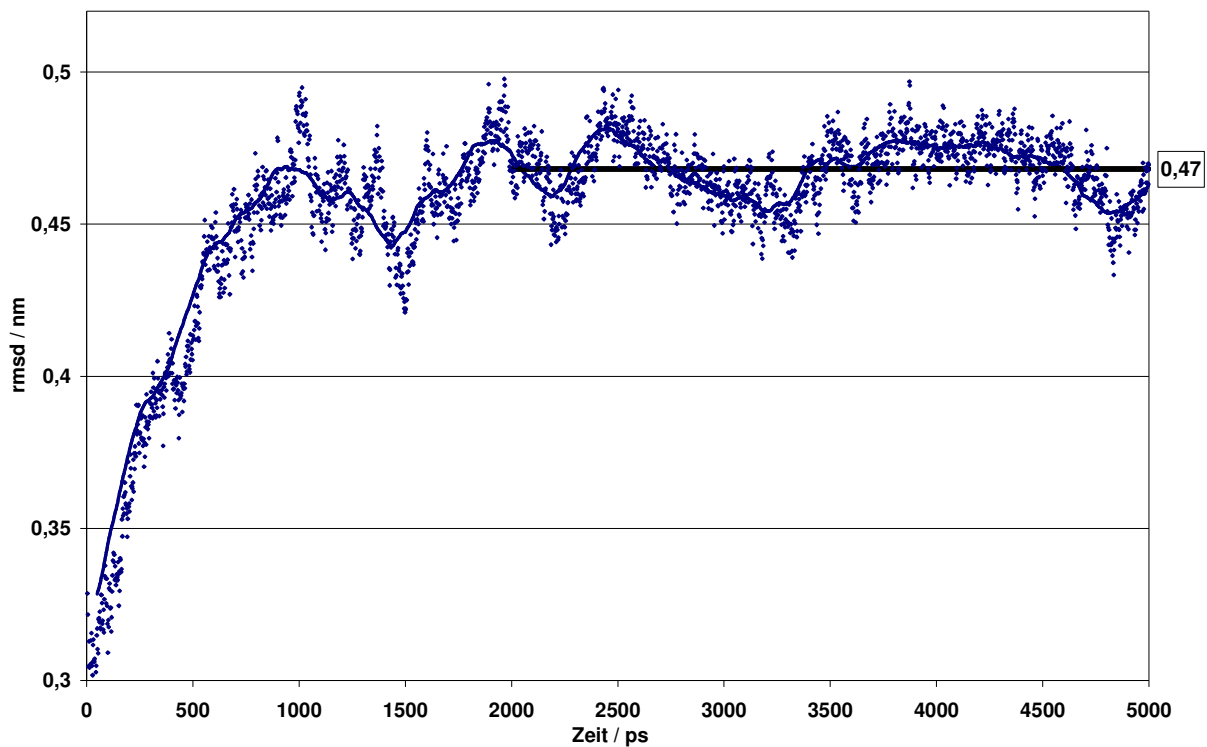


Abbildung 4-19: rmsd-Wert im Verlauf der MDS in der Membran

Die Membranumgebung zeigte sich auch im weiteren Simulationsverlauf stabil und entsprechend den untersuchten physikalischen Parametern.

Zur Untersuchung der Proteinkonformation nach der Equilibrierung wurden 200 Strukturen aus den letzten 2 ns der Simulation in regelmäßigen Abständen extrahiert und über das Programm NMRCLUST in Familien eingeteilt. Die Strukturanalyse der schweren Atome zeigte insgesamt 29 Familien unterschiedlicher Größe, wobei eine Reduktion der Daten auf insgesamt 15 Familien für die weitere Analyse möglich war, da eine statistisch ausgewogene Verteilung über den gesamten Zeitraum vorliegt.

Nach einer ausführlichen Minimierung wurden die Proteinstrukturen nochmals miteinander verglichen, wobei nur noch 3 unterschiedliche Konformationen erhalten wurden, die sich innerhalb der helikalen Bereiche zwischen 0,67 und 0,88 Å unterscheiden. Diese Abweichung innerhalb der transmembranären Helices ist vernachlässigbar klein sowohl gegenüber den Abweichungen von der Ausgangsstruktur mit 3,6 Å als auch gegenüber der Auflösung der Rhodopsinkristallstruktur mit 2,8 Å.

Die stereochemischen Parameter sind gegenüber der Ausgangsstruktur verbessert. Es befinden sich zwar immer noch 4 Aminosäuren in den verbotenen Bereichen, aber auch 81,2 % in der am meisten bevorzugten Regionen und weitere 15,6 % in den zusätzlich erlaubten Regionen. Der G-Faktor weist mit -0,26 ebenfalls auf eine gute Proteinstruktur hin.

Tabelle 4-6: Statistik des Ramachandran-Plots der repräsentativen Struktur aus der MDS

Ramachandran-Plot (Φ/Ψ -Winkel-Verteilung)		Idealwert	Modell
Aminosäuren in am meisten bevorzugten Regionen		> 90 %	81,2 %
Aminosäuren in der erlaubten Regionen			15,6 %
Aminosäuren in zusätzlich erlaubten Regionen			1,7 %
Aminosäuren in verbotenen Regionen			1,4 %
G-Faktoren			
Torsionswinkel		Bindungslängen und Proteinrückgrates	-winkel des
Φ -Winkelverteilung	-0,46	Bindungslängen	0,23
χ_1 -/ χ_2 -Winkelverteilung	-0,44	Bindungswinkel	-0,15
χ_1 -Winkel	-0,05		
χ_3 / χ_4 -Winkel	0,56		
ω -Winkel	-0,76		
Torsionswinkel gesamt	-0,46	Bindungsparameter gesamt	0,00
G-Faktor gesamt	-0,26		

Bei den Aminosäuren in den nicht erlaubten Bereichen handelt es sich um Leucin 12 (N-Terminus), Leucin 91 (E1), Phenylalanin 161 (E2) und Phenylalanin 195 (TM V). Die unerlaubten Aminosäuren innerhalb der Loopstrukturen und des N-Terminus sind als wenig problematisch anzusehen. Phenylalanin 195 befindet sich allerdings in der Nähe eines Teils der orthosterischen Bindungsstelle und bedurfte daher einer näheren Betrachtung.

Hierfür wurde zusätzlich eine repräsentative Struktur des M_2 -Rezeptormodells mit Scopolamin innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle herangezogen.

Diese Struktur bietet den Vorteil, dass die Bindungstasche von einem großen Liganden besetzt ist und es daher den umgebenden Aminosäuren nicht mehr möglich ist, sich in den entsprechenden Hohlraum einzulagern und damit einen Teil der fünften transmembranären Helix aufzulösen und sich in einen ungünstigen Konformationsraum zu begeben. Nach dem Einfügen des M_2 -Rezeptormodells befindet sich, im Gegensatz zum ligandbesetzten Rezeptor, im Inneren des Proteins zunächst eine artifizielle Lücke, die erst während der MDS von Wassermolekülen ausgefüllt wird. Die Scopolamin-besetzte Struktur zeigte keine Aminosäuren der TMs in unerlaubten Regionen, so dass die untypische Position von Phenylalanin 195 als Artefakt aus der Einfügung des Proteins in die Membran angesehen werden kann.

Nach Analyse der Sekundärstrukturmerkmale bestätigte sich die Aussage, dass die drei verbliebenen Familien in eine einzige zusammengefasst werden können. Die Längen der Helices unterscheiden sich maximal um ein oder zwei Aminosäuren und auch die Ausprägung von β -Turns und γ -Turns sowie die Turntypen unterscheiden sich kaum. Abbildung 4-20 zeigt die Überlagerung der Start- und Endstruktur.

Bezüglich der Helices sind nur geringe Unterschiede zu erkennen, allerdings ist deutlich die Auflösung der fünften Helix im Bereich von Phenylalanin 195 zu sehen.

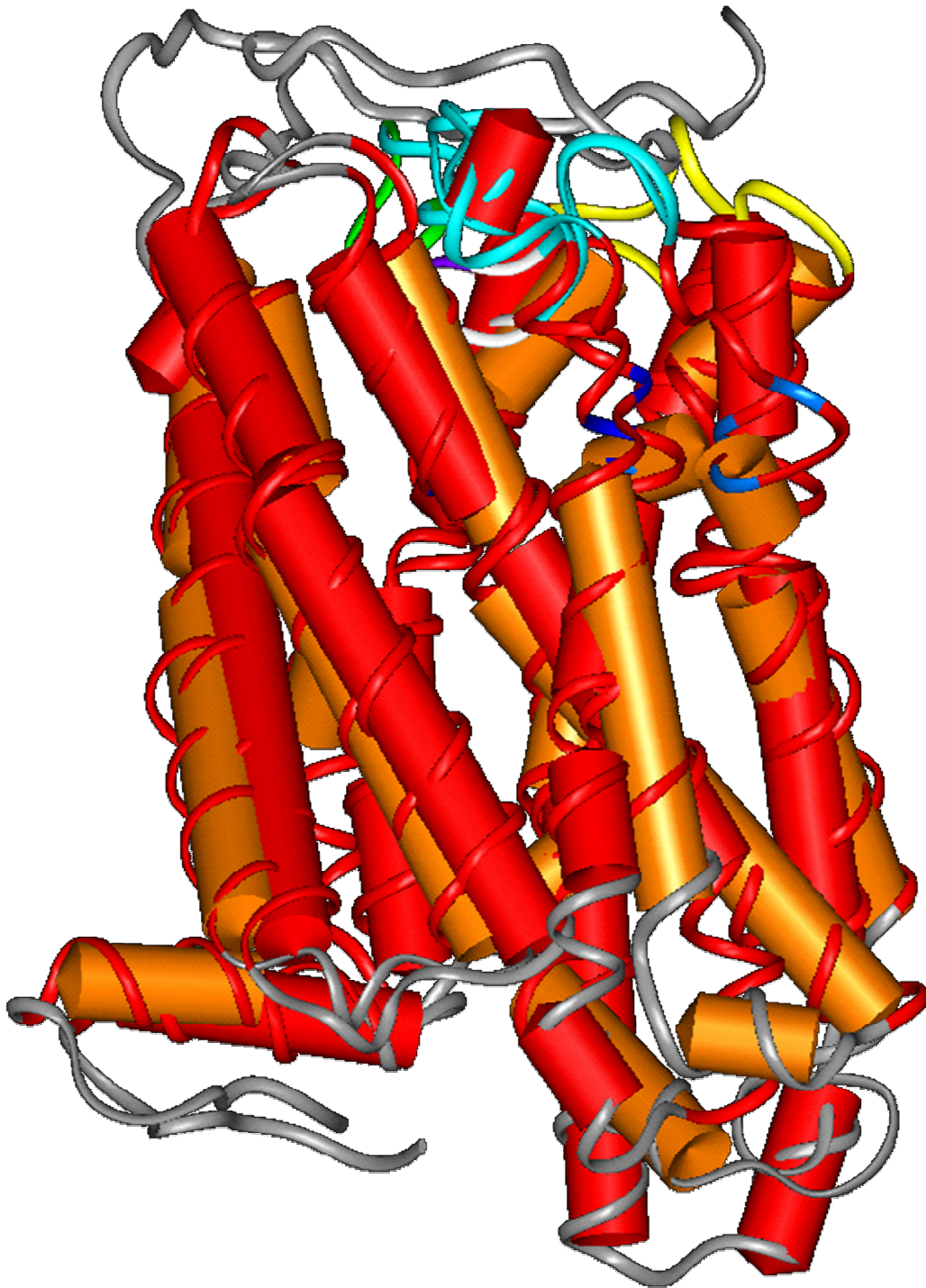


Abbildung 4-20: Überlagerung der Startstruktur mit der minimierten Endstruktur

Die transmembranären Helices sind als Röhren dargestellt, wobei die Ausgangsstruktur orange gefärbt ist, die Endstruktur rot. Turnstrukturen sind als blaue Pfeile markiert, β -Faltblattstrukturen nicht vorhanden. Die Bänder zeigen den Verlauf des Proteinrückgrates. Ursprünglich helikalen Bereiche sind rot, die intrazellulären Loops sowie der N-Terminus und der erste extrazelluläre Loop grau, der zweite extrazelluläre Loop grün / cyan und dritte extrazelluläre Loop gelb eingefärbt.

4.2.4 Konformationsvergleich

Die Konformationen des M₂-Rezeptormodells, die unter den drei sehr unterschiedlichen Simulationsbedingungen erhalten wurden, wurden nun auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten hin untersucht. Hierfür wurden jeweils die energieminierten repräsentativen Strukturen der Clusteranalyse miteinander verglichen. Ein solches Vorgehen besitzt den Vorteil, dass nur wenige typische Konformationen miteinander verglichen werden und der Datensatz somit sehr übersichtlich bleibt.

Das erste Kriterium, das für den Vergleich herangezogen wurde, war die Abweichung der dreidimensionalen Struktur über die *root mean square deviation*. Dabei wurde zunächst die Abweichung des Proteinrückgrates innerhalb der transmembranären Helices betrachtet. Zur Beurteilung der Unterschiede wurde außerdem auch die Auflösung der Kristallstruktur des Rhodopsins von 2,8 Å herangezogen. Die Auflösung der Kristallstruktur gibt die Unschärfe beziehungsweise die Ungenauigkeit der Vorlage wieder, die das darauf basierende Modell natürlich ebenfalls beinhaltet. Tabelle 4-7 listet die rmsd-Werte aller energetisch minimierten repräsentativen Strukturen der unter den oben beschriebenen Bedingungen erhaltenen Modelle auf.

Tabelle 4-7: Vergleich der Abweichungen in den TM-Bereichen in Å

	3-Phasen-Box 1	3-Phasen-Box 2	Membran 1	Membran 2	Membran 3	Rhodopsin
Vakuum	3,35	3,23	3,25	3,38	3,36	2,79
3-Phasen-Box 1		1,13	4,27	4,48	4,34	3,71
3-Phasen-Box 2			4,11	4,29	4,17	3,59
Membran 1				0,88	0,68	3,59
Membran 2					0,80	3,62
Membran 3						3,68

Die größten Abweichungen innerhalb der helikalen Bereiche finden sich mit 4,11 bis 4,48 Å zwischen den Modellen aus der Phospholipid-Membran und denjenigen aus der 3-Phasen-Box. Das repräsentative Modell bei Vakuumbedingungen stellt mit einer Abweichung von 3,23 bis 3,38 Å im Vergleich zu den übrigen M₂-Rezeptorstrukturen eine Kompromissstruktur dar.

Die Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins zeigt den geringsten Unterschied zu der unter Vakuum-Bedingungen erhaltenen Struktur. Somit sind die übertragenen Koordinaten der Vorlage, in Bezug auf das Proteinrückgrat am besten erhalten geblieben. Unter Berücksichtigung der Unschärfe der Kristallstruktur weisen die in der 3-Phasen-Box und der Phospholipidmembran erhaltenen Strukturen allerdings ebenfalls nur eine geringe Veränderung des Proteinrückgrates von unter 1 Å auf. Neben der Ausrichtung der Helices zueinander, die sich in der Erhaltung des Proteinbackbones spiegelt, leisten auch die interhelikalen Kontakte der Seitenketten sowie auch des Backbones einen Beitrag zur Stabilisierung der Rezeptorkonformation. Als Hilfsgröße für diese Wechselwirkungen bietet sich zum einen die Gesamtanzahl der innerhalb des Proteins ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen an, zusätzlich wurden auch die einzelnen Kontakte zwischen den Helices der M₂-Rezeptormodelle mit denen der Kristallstruktur des Rinderrhodopsins verglichen. Die durchschnittliche Gesamtanzahl der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des M₂-Rezeptormodells unterscheidet sich zwischen den einzelnen Simulationsumgebungen kaum. Unter Vakuumbedingungen beträgt sie 256, ebenso wie bei der Simulation in der 3-Phasen-Box. In der Membrenumgebung finden sich mit 252 Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Proteins durchschnittlich vier Kontakte weniger. Dieser Unterschied von 1,5 % ist allerdings dann zu vernachlässigen, wenn alle für die Struktur wichtigen Kontakte zwischen und innerhalb der Helices erhalten bleiben. Um diese Überprüfung durchzuführen wurden zunächst die interhelikalen Wasserstoffbrückenbindungen im bovinen Rhodopsin bestimmt. Im Rinderrhodopsin ist die erste transmembranäre Helix mit den Helices II, VII und VIII verbunden. Der dritte transmembranäre Bereich bildet die zentrale Helix und geht Interaktionen mit den Helices II, IV, V und VII ein. Der flexibelste Bereich in Bezug auf die Anordnung der Helices ist im Rhodopsin zwischen den Helices III, V und VI, in dem sich auch die Retinal-Bindestelle befindet. Die innerhalb der Kristallstruktur identifizierten Wasserstoffbrückenbindungen sind in Abbildung 4-21 schematisch dargestellt.

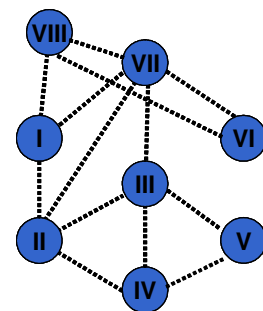


Abbildung 4-21: Interhelikale Kontakte im Rinderrhodopsin

Die innerhalb der Kristallstruktur identifizierten Wasserstoffbrückenbindungen sind in Abbildung 4-21 schematisch dargestellt.

Die drei M_2 -Rezeptormodelle wurden ebenfalls auf die Interaktionen der Helices, die einen wichtigen Stabilitätsfaktor für die Tertiärstruktur des Proteins darstellen untersucht. In Abbildung 4-22 sind die Ergebnisse schematisch dargestellt.

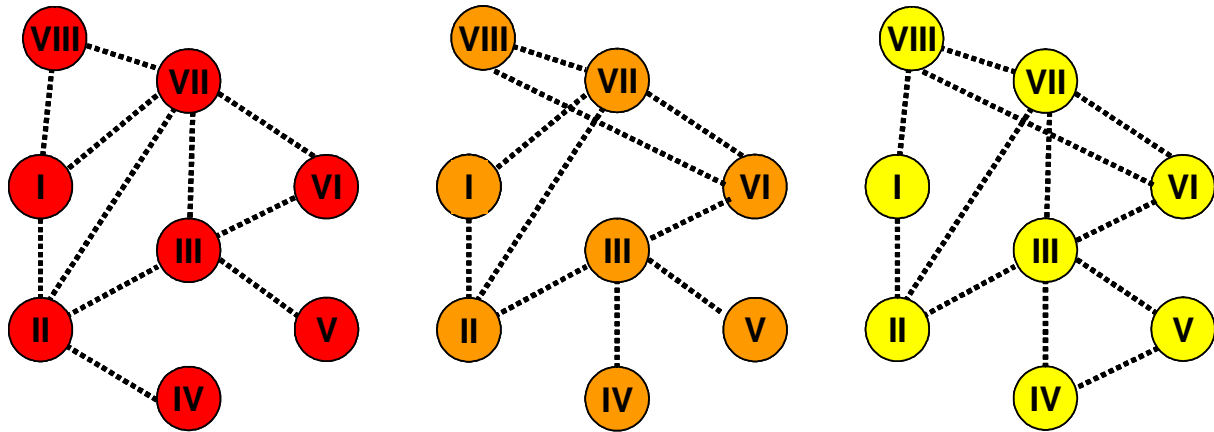


Abbildung 4-22: Interhelikale Kontakte repräsentativer Strukturen der M_2 -Rezeptormodelle

Die Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen bzw. Salzbrücken sind als gepunktete Linie dargestellt. Links (rot) sind die Helices aus der MDS in Vakuum, in der Mitte (orange) aus der MDS in der 3-Phasen-Box, rechts (gelb) die Helices aus der MDS in der Phospholipidmembran dargestellt.

Die Struktur aus der Moleküldynamiksimulation unter Vakuumbedingungen zeigt sehr ähnliche interhelikale Kontakte wie das Rhodopsin. Auffälligste Veränderungen sind das Fehlen der Kontakte zwischen TM III– TM IV, TM IV– TM V sowie TM VI– Helix VIII. Durch die Ausbildung eines *Ionic Lock*¹⁵ zwischen TM III und TM VI findet sich ein neuer Kontakt zwischen den Helices III und VI, der im Rhodopsin so nicht möglich war. Nach der Simulation in der 3-Phasen-Box findet sich ebenfalls ein Kontakt über Aspartat 120 und Arginin 121 zu Arginin 382. Der Kontakt zwischen TM IV und V fehlt aber ebenfalls. Die Veränderungen gegenüber Rhodopsin fallen allerdings sonst andersartig aus. In diesem Modell fehlt die Wechselwirkung zwischen TM II– TM IV, TM III– TM VII, TM I– Helix VIII. Die geringsten Veränderungen der interhelikalen Wechselwirkungen zeigt das Modell aus der Simulation in der DPPC-Membran. Die einzigen Veränderungen bestehen im Fehlen der Kontakte zwischen TM II– TM IV und der Ausbildung des *Ionic Lock* zwischen TM III– TM VI.

¹⁵ Das *Ionic Lock* wird durch Salzbrücken zwischen Aspartat 120, Arginin 121 und Arginin 382 ausgebildet und stabilisiert den inaktiven Zustand in verschiedenen GPCRs.

Innerhalb dieses Vergleiches zeigt die Proteinstruktur aus der Membran erwartungsgemäß die geringsten Abweichungen von den Gegebenheiten der Kristallstrukturvorlage. Die Simulation des Proteins in einer 3-Phasen-Box scheint allerdings gegenüber derjenigen unter Vakuumbedingungen keinen Vorteil zu bieten.

Als weiteres wichtiges Kriterium wurden die Sekundärstrukturelemente in ihrer Ausdehnung und Ausprägung verglichen. Diese Analyse wurde über das Programm STRIDE durchgeführt, das neben helikalen Bereichen und den β -Faltblättern auch eine Analyse der Turn-Typen durchführt. Die Unterschiede in den Helixlängen sind in Tabelle 4-8 dargestellt.

Tabelle 4-8: Vergleich der Helixlängen nach der Bestimmung mit STRIDE

	Ausgangsstruktur	Vakuum-Bedingungen	3-Phasen-Box	DPPC-Membran
Helix I	21 – 50	20 – 50	23 – 50	20 – 51
Helix II	57 – 86	58 – 85	57 – 84	58 – 86
Helix III	91 – 125	94 – 126	96 – 125	95 – 125
Helix IV	138 – 160	142 – 155	136 – 153	136 – 152
Helix V	184 – 208	186 – 208	183 – 208	186 – 208
Helix VI	382 – 412	383 – 411	382 – 412	382 – 412
Helix VII	421 – 440	419 – 443	419 – 443	419 – 440
Helix VIII	446 – 455	449 – 454	445 – 456	448 – 455

Die detektierten Unterschiede bewegen sich bei allen Modellen im Bereich von ein bis zwei Aminosäuren, so dass die Sekundärstrukturen grundsätzlich erhalten geblieben sind. Eine Ausnahme bildet Helix IV, die sich um fünf bis sieben Aminosäuren, d.h. ein bis zwei Windungen verkürzt. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Sekundärstruktur-Vorhersagen überein, die diese Helix durchweg etwas kürzer als im Rhodopsin vorhergesagt haben. Im Bereich der Loops lassen sich keine einheitlichen Strukturmerkmale zwischen den Modellen feststellen. Es werden zwar verschiedene β -Turns gefunden, aufgrund der hohen Flexibilität der Schleifenregion sind sie allerdings weder innerhalb einer Simulationsumgebung noch zwischen den Modellen konstant sondern ständigen Veränderungen unterworfen.

Eine repräsentative Struktur aus der MDS in der 3-Phasen-Box zeigt ein antiparalleles β -Faltblatt im zweiten extrazellulären Loop, ähnlich dem des Rhodopsins an der analogen Position. Dieses β -Strand ließ sich allerdings weder unter Vakuumbedingungen erhalten, noch wurde es in Simulationen mit der Phospholipidmembran gefunden, eine Struktur ohne β -Faltblatt existiert allerdings auch in der Simulation in der 3-Phasen-Box. Da es in den Sekundärstruktur-Vorhersagen auch nur wenige Hinweise auf eine solche Struktur gibt, wurde es in den weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt, sondern von einer anderen Loop-Geometrie ausgegangen.

Als Letztes wurden die drei Modelle mit der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins in Bezug auf die Ausrichtung der Helixbündel visuell verglichen (Abbildung 4-23).

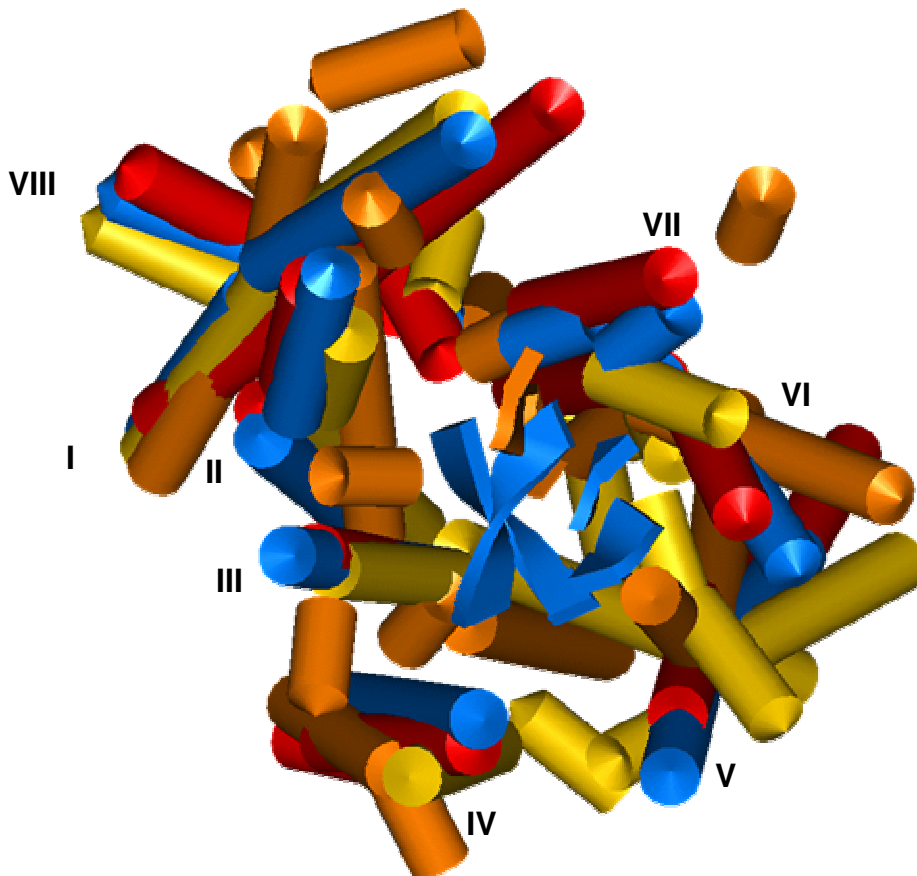


Abbildung 4-23: Überlagerung der Helixbündel des Rhodopsins und der M_2 -Rezeptormodelle

Die Abbildung zeigt eine Ansicht aus dem Extrazellularraum auf das Sieben-Helix-Bündel. Helices sind als Röhren, β -Faltblätter als Pfeile dargestellt. Die Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins ist blau gefärbt und weist neben den sieben Helices einen β -Strand im N-Terminus und einen weiteren in E2 auf. Die ähnlichste Anordnung zeigt die Vakuum-Simulation (rot), wobei auch hier deutlich Unterschiede erkennbar sind. Die Konformationen aus der DPPC-Membran (gelb) und der 3-Phasen-Box (orange) weisen größere Unterschiede auf.

Als dem Templat am ähnlichsten zeigte sich die Struktur aus der Vakuum-simulation. Allerdings war dies zu erwarten, da auf dem Proteinrückgrat bei dieser Simulation eine Rückhaltekraft liegt, die die Ausgangskonformation stabilisiert. Ein Vergleich der beiden „realistischeren“ Simulationsbedingungen fällt zu Ungunsten der 3-Phasenbox aus. Die Bündelung der Helices bleibt in der Membrenumgebung besser erhalten als in der 3-Phasenbox. Alle drei Simulationsumgebungen zeigen aber Abweichungen vom Templat, wobei hier drei mögliche Ursachen vorliegen: Zum einen stellt eine Kristallstruktur keine „natürliche“ Struktur dar, sondern es wird ein Proteinzustand fixiert. Dieser immobile Zustand wird durch eine Packung mit Detergentien, Ionen sowie weiteren Proteinen noch zusätzlich stabilisiert. Außerdem muss zur Kristallgewinnung eine ausreichende Anzahl an Proteinen pro Kristallisationseinheit vorliegen, so dass die Rezeptordichte deutlich höher ist als bei natürlicher Expression des Proteins. Hierdurch können sich Proteinkonformationen ausbilden bzw. stabilisieren, die bei niedrigerer Rezeptordichte nicht üblich sind und sich in einem Modell mit nur einem GPCR wieder auflösen. Die Expression des Rhodopsins im Augenhintergrund ist sehr hoch, die Rezeptordichte der muskarinergen Rezeptoren in den Synapsen dagegen wesentlich geringer, so dass hier eine so dichte „Packung“ wie im Auge nicht vorhanden sein kann. Der wichtigste Grund für die Beobachtung struktureller Unterschiede zwischen der Röntgenkristallstruktur des bovinen Rhodopsins und dem Homologiemodell des humanen M₂-Rezeptors liegt aber in der Aminosäuresequenz und der Funktion des Rezeptors begründet. Die Sequenzidentität zwischen Rhodopsin und dem M₂-Rezeptor beträgt nur etwa 23%. Dementsprechend ist es auch wahrscheinlich, dass sich die Mikrostruktur der muskarinergen Rezeptoren von demjenigen des Rhodopsins in einigen Bereichen unterscheidet. Dies kann sich auch wie in den verschiedenen Simulationen beobachtet auf die Anordnung der Helixbündel zueinander auswirken. Umgekehrt ist eine allzu große Abweichung von der Rhodopsinstruktur unwahrscheinlich, weil die Familie A, der beide Proteine angehören, auch einige gemeinsame, hochkonservierte Aminosäuren besitzt, die für die Aktivierung wichtig zu sein scheinen. Rhodopsin wird durch ein Lichtquant d.h. durch Energiezufuhr aktiviert und verursacht dadurch die Umwandlung des als Schiff'sche Base gebundenen 9-cis-Retinal in all-trans-Retinal, dann erst erfolgen die Bindung eines G-Proteins und die Signalweiterleitung.

Die muskarinergen Rezeptoren besitzen keinen kovalent gebundenen Liganden, sondern werden durch die Ausschüttung von Acetylcholin aktiviert. Diese unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen bilden sich vermutlich auch in der Mikrostruktur des GPCRs ab, die jeweils an die Erfordernisse angepasst wird.

Trotzdem entsprechen die Ergebnisse der Simulationen in der 3-Phasenbox nicht den Erwartungen an eine so zeit- und rechenintensive Methode, so dass Simulationen, die eine Berücksichtigung des umgebenden Medium erfordern in einer DPPC-Membran durchgeführt werden. Die Vakuumsimulationen stellen anhand des Vergleichs eine zeitsparende Alternative zu aufwändigen MDS in einer Membran dar, immer unter Berücksichtigung der Einschränkung, dass die Proteinumgebung nicht berücksichtigt wird. Für die Simulation von Liganden besitzt außerdem das für Vakuumsimulationen benutzte CVFF-Kraftfeld integrierte Parameter, die im GROMACS-Kraftfeld nicht vorhanden sind. Daher ist eine Simulation im Vakuum insofern zunächst vorzuziehen, da die zeitintensive Parametrisierung der Liganden für das GROMACS-Kraftfeld entfällt, so dass sie einen Ansatz darstellt, der schneller zu Ergebnissen führt. Simulationen unter Vakuumbedingungen sind im GROMACS-Kraftfeld zwar ebenfalls möglich, sind aber von der benötigten Simulationszeit her nicht schneller als vergleichbare FDISCOVER-Rechnungen, so dass zwei verschiedene Kraftfelder benutzt werden.

4.3 Rezeptor-Ligand-Komplexe

Rezeptor-Ligand-Komplexe sind ein wichtiges Hilfsmittel zur Erklärung von Ligand-Effekten auf molekularer Ebene. So lässt sich mit ihrer Hilfe ein rezeptor-basiertes Modell der Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen. Es ist ebenfalls möglich Aussagen über den Bindungsmodus in einem Rezeptor zu machen. Die muskarinergen Rezeptoren besitzen, wie in Kapitel 1.3.3 erläutert, zwei Bindungsstellen für strukturell sehr unterschiedliche Liganden, die sich aufgrund räumlicher Nähe in ihrem Effekt gegenseitig beeinflussen. Die direkten Parasympathomimetika und Parasympatholytika wurden hierbei zunächst untersucht, da Bindungsstudien mit allosterischen Modulatoren hauptsächlich am Agonist- oder Antagonist-besetzten Rezeptor durchgeführt werden und diese Untersuchungen daher Grundlage für die spätere Analyse der Bindungsmodi der Allosterie bilden. Die Moleküldynamiksimulationen der Rezeptor-Ligand-Komplexe finden überwiegend unter Vakuumbedingungen statt. Diese haben sich, wie in Kapitel 4.2.4 diskutiert als geeignet für die Simulation eines GPCRs erwiesen

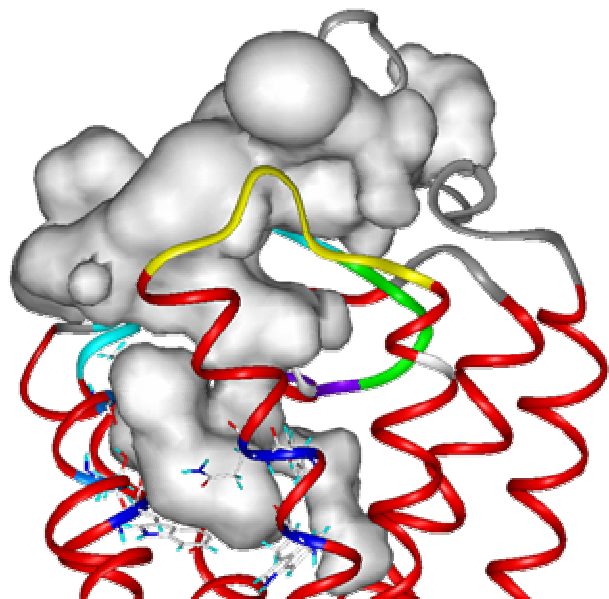
4.3.1 Bindungstasche orthosterischer Liganden

Die Bindungstasche der orthosterischen Liganden befindet sich zwischen den Helices III, IV, V und VI. Im Modell des muskarinergen M_2 -Rezeptors befindet sich die Bindungstasche, analog zu derjenigen des Retinals im bovinen Rhodopsin, im oberen Drittel des Rezeptors.

Innerhalb des Rezeptormodells lässt sich diese, vom Extrazellularraum aus zugängliche, Höhle gut identifizieren. Abbildung 4-24 zeigt den Zugang für die Liganden.

Abbildung 4-24: Zugang für die orthosterischen Liganden

Farbcode: Helices rot, E2 cyan/grün, E3 gelb, N-Terminus und E1 grau, Aminosäuren der Bindungstasche „atomtype-coded“



Acetylcholin ist der endogene Agonist an allen muskarinergen Rezeptoren. Es ist aber auch Ligand oder Substrat an weiteren Rezeptoren und Enzymen. So existieren für die Acetylcholin-Esterase (AChE) diverse Röntgenkristallstrukturen sowohl mit Agonisten als auch mit gebundenen Antagonisten. Der Bindungsmodus beziehungsweise die Umgebung der Bindungstasche ist in der Acetylcholin-Esterase ähnlich der in den muskarinergen Rezeptoren. In der Esterase wird die positive Ladung der Liganden über ein aromatisches System fixiert. Dieser Käfig ist an einem Ende durch ein Glutamat noch zusätzlich mit einem negativen Potential beladen. Diese Partialladung ist aber nicht im Sinne einer Salzbrücke an der Ligandbindung beteiligt. Eine ähnliche Annahme gilt auch für die muskarinergen Rezeptoren. In dieser Rezeptorfamilie wird die negative Ladung von Aspartat 3.50 geliefert. In der Umgebung befinden sich Tryptophane, Phenylalanine und Tyrosine. Die geladene Kopfgruppe der orthosterischen Liganden sollte also in diesem Bereich liegen.

Es werden drei Gruppen von Liganden der orthosterischen Bindungsstelle untersucht: unselektive direkte Parasympathomimetika, unselektive direkte Parasympatholytika und ein M_2 -prävalentes direktes Parasympatholytikum.

Als Beispiel für agonistische Verbindungen wurde zum einen Acetylcholin als endogener Ligand ausgewählt, zum anderen das Oxotremorin M. An seiner Stelle wären für die Simulationen an der orthosterischen Bindungsstelle auch andere Verbindungen möglich. Für Oxotremorin M existieren allerdings auch Affinitäten und Kooperativitäten im Komplex mit allosterischen Modulatoren, so dass diese Auswahl für die eventuelle weitere Untersuchungen an der allosterischen Bindungsstelle günstig erschien. Als antagonistisch wirksame Verbindungen wurden mit Atropin bzw. Hyoscyamin, Scopolamin und *N*-Methylscopolamin drei Tropa-säure-Derivate ausgewählt (s. Tabelle 1-5, S. 27). Diese zeigen kaum Selektivität zwischen den muskarinergen Rezeptoren, zeigen aber trotz großer struktureller Ähnlichkeit unterschiedliche Affinitäten, die ein gutes Modell wiedergeben können sollte. Außerdem eignen sich diese drei Substanzen zur Differenzierung zwischen dem Bindungsmodus tertiärer protonierter Verbindungen und einer quartären Verbindung. Ein weiterer Grund für die Auswahl von *N*-Methylscopolamin ist, dass Bindungsstudien allosterischer Modulatoren überwiegend am $[3H]$ -*N*-Methylscopolamin besetzten Rezeptor durchgeführt werden und so eine Nachahmung der experimentellen Bedingungen möglich ist.

4.3.1.1 Oxotremorin M

Oxotremorin M (OXO M) besitzt nur eine mäßige konformatorische Flexibilität, da die zentrale Dreifachbindung ein sehr starres Strukturelement darstellt. Die Trimethylammoniumgruppe und der Pyrrolidin-2-on-Ring können sich daher nur in einer Z-Konformation oder einer E-Konformation anordnen. Eine systematische Konformationsanalyse zeigte, dass die E-Konformation energetisch bevorzugt ist.

Bindungsstudien an Punktmutanten des muskarinergen M₂-Rezeptors geben Hinweise darauf, dass einige Aminosäuren essentiell für die Bindung der Agonisten und Antagonisten sind. Die Relevanz der Aminosäuren unterscheidet sich jedoch von Ligand zu Ligand. Außerdem muss das jeweilige Testsystem berücksichtigt werden. Für Oxotremorin M ist 1999 ein Datensatz mit Punktmutationen am humanen M₂-Rezeptor von Heitz *et al.* veröffentlicht worden [73]. Darin wurden Aspartat 103, die Tryptophane 155 und 400, Tyrosin 403, Asparagin 404 sowie die Threonine 187 und 190 als wichtig für die Bindung von Oxotremorin M beschrieben. Diese Aminosäuren dienen nun als Orientierungspunkte für das manuelle Eindocken von OXO M. Die positiv geladene Kopfgruppe wurde im aromatischen Käfig, gebildet aus den Tryptophanen und dem Tyrosin positioniert. Aspartat 103 bildet einen negativ geladenen Pol in der aromatischen Höhle. Der Pyrrolidin-2-on-Ring zeigte eine Orientierung in Richtung der Threonine 187 und 190.

Diese Startgeometrie wurde zunächst energetisch minimiert und dann molekulardynamisch untersucht. Hierbei wurde zunächst die energetische Equilibrierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes beobachtet (Abbildung 4-25). Sie stellte sich, wie auch beim freien Rezeptor, nach circa 220 ps Simulationsdauer ein. Nach weiteren 50 ps wurde auch eine Stabilisierung der Rezeptorkonformation anhand der *root mean square deviation* beobachtet.

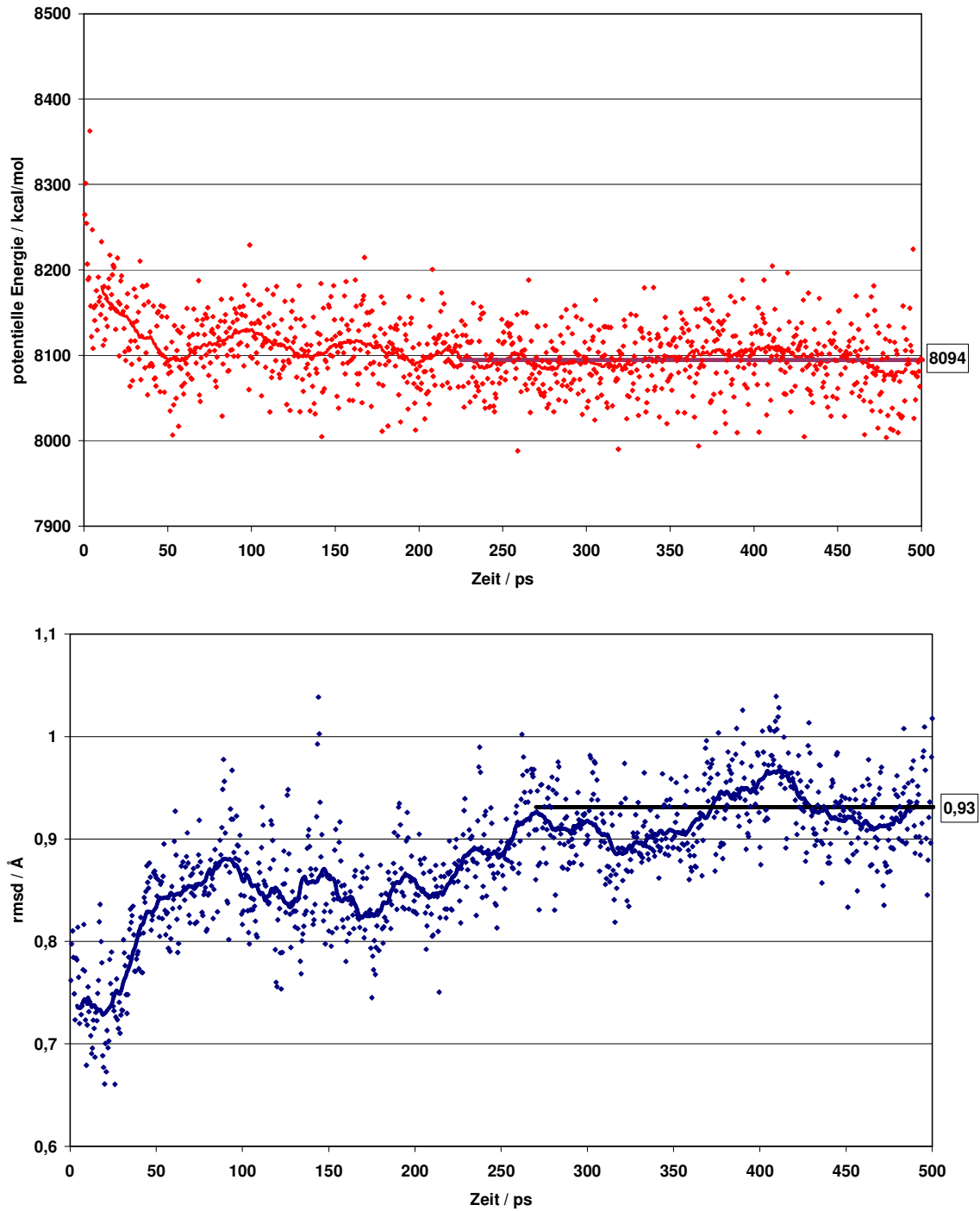


Abbildung 4-25: Verlauf der potentiellen Energie / der root mean square deviation

Der gemittelte Energieverlauf ist als rote Linie dargestellt, nach der Equilibrierung liegt der Mittelwert bei 8095 kcal/mol. Das gleiche Verfahren wurde auch auf die rmsd-Werte angewendet, deren mittlere Gesamtabweichung von der Ausgangsstruktur 0,93 Å beträgt.

Betrachtet man die Wechselwirkungsenergie zwischen Oxotremorin M und dem Rezeptorprotein, so finden sich fast doppelt so große prozentuale Abweichungen vom Mittelwert der equilibrierten Einheit wie zum Beispiel bei der Auswertung der potentiellen Energie. Eine mögliche Ursache ist die größere Bewegungsfreiheit, die der Ligand innerhalb der Bindungstasche besitzt gegenüber der relativen Starre des Proteins selber. Im F-Test (5%) zeigt sich die Wechselwirkungsenergie aber ebenfalls als equilibrierte Größe. Als weiteres Auswertungskriterium der Protein-Ligand-Wechselwirkungen wurden die im Verlauf der Simulation ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen herangezogen. Für Oxotremorin M wurden diese Wechselwirkungen zwischen der phenolischen Funktion von Tyrosin 104, den Hydroxylgruppen von Threonin 187 und Threonin 190 und der amidischen Funktion von Asparagin 404 gefunden. Für agonistische Verbindungen scheint die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylfunktion des Oxotremorins M und der phenolischen Funktion von Tyrosin 104 besonders wichtig zu sein. Zur Überprüfung der Position der positiv geladenen Kopfgruppe wurden die Abstände zwischen dem Stickstoff, den beiden Methylgruppen und der Carboxylatgruppe von Aspartat 103 untersucht. Dieser Abstand liegt nach der Equilibrierung für den Stickstoff bei 4,9 Å. Die beiden Methylgruppen befinden sich mit ihrem zentralen Kohlenstoff 4,4 Å beziehungsweise 5,7 Å von der Carboxylatgruppe entfernt. Daher sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der positiven Ladung und der Carboxylatgruppe zu erwarten. Um die Ladung ordnen sich ebenfalls Tryptophan 155, Tryptophan 400, Tyrosin 403 und Tyrosin 104 an. Sie bilden für das Oxotremorin M den aromatischen Käfig, der ebenfalls an der Bindung der Liganden beteiligt ist. Die Komplexe wurden nach der Equilibrierung in regelmäßigen Abständen von 500 fs extrahiert und mit dem Programm NMRCLUST in Familien eingeteilt. Hierbei diente die Veränderung aller schweren Atome, das heißt aller Atome außer den Wasserstoffen als Ähnlichkeitskriterium, unabhängig von der Position des Liganden. Die ersten zehn repräsentativen Strukturen der Cluster wurden anschließend inklusive der Liganden ausführlich energieminiert und nochmals einer Clusteranalyse unterworfen. Hierbei ließen sich die Strukturen in zwei repräsentative Cluster einteilen (Abbildung 4-26).

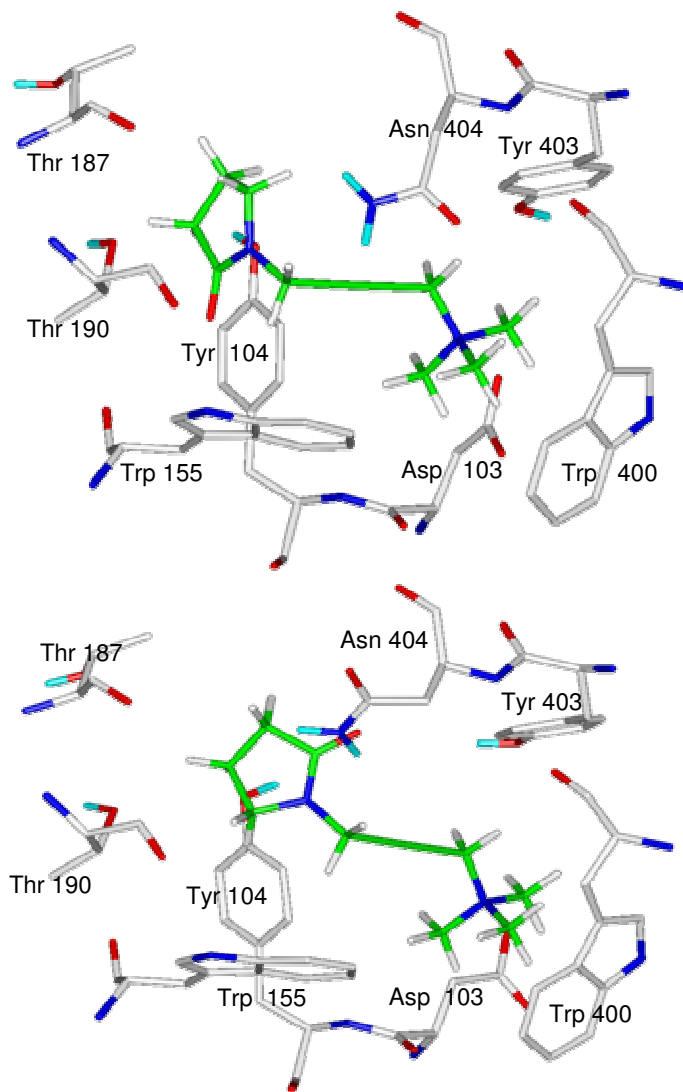


Abbildung 4-26:
Clusterstrukturen mit
unterschiedlicher OXO M
Orientierung

Oben:
Orientierung der Carbonylfunktion des
Pyrrolidin-2-on-Ringes zu Thr 187 /
Thr 190

Unten:
Orientierung der Carbonylfunktion des
Pyrrolidin-2-on-Ringes zu Asn 404

Farbcode der Atomtypen:
Kohlenstoff weiß (Protein) / grün
(Ligand), Sauerstoff rot, Stickstoff blau,
Wasserstoff cyan

In Bezug auf das Proteinrückgrat unterscheiden sich die Strukturen nur mäßig, so beträgt die *root mean square deviation* im gesamten Backbone 0,77 Å, bezogen auf die Helices 0,39 Å. Ein deutlicher Unterschied besteht jedoch in der Ausrichtung des Pyrrolidin-2-on-Ringes: Die Carbonylfunktion orientiert sich entweder zur Hydroxylfunktion von Threonin 187, Threonin 190 oder zur amidischen Funktion von Asparagin 404.

Diese Orientierung im M₂-Rezeptormodell bietet einen guten Ansatzpunkt für die Erklärung der Bedeutung der genannten hydrophilen Aminosäuren, die in Mutationsstudien alle einen ähnlichen Affinitätsverlust hervorrufen. Ihre Wechselwirkungen mit Oxotremorin M lassen sich durch die jeweils verbleibenden Aminosäuren in gewissem Maße ersetzen, da unter den experimentellen Bedingungen ebenfalls eine wechselnde Ausprägung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carbonylfunktion des Oxotremorin M und den Threoninen beziehungsweise dem Asparagin möglich ist.

4.3.1.2 Acetylcholin

Für Acetylcholin existieren in der *Cambridge Crystallographic Database* [147] fünf Kristallstrukturen im Komplex mit unterschiedlichen Gegenionen und aromatischen Systemen. Die verschiedenen Strukturen wurden zunächst überlagert und anschließend auf ihre geometrischen Eigenschaften hin verglichen.

Zur Superpositionierung wurden der quartäre Stickstoff und die beiden Ester-Sauerstoffe mit der Multifit-Routine überlagert. Die Strukturen bildeten nach diesem Vorgehen zwei Cluster mit nur geringen Differenzen. Der Unterschied besteht hauptsächlich in der Formation der Trimethylamino-Kopfgruppe des Acetylcholins im Verhältnis zu der Estergruppe. In den Kristallstrukturen mit aromatischen Co-Kristallisaten wird überwiegend die *gauche*-Form gefunden, während die *trans*-Form bei kleineren mitkristallisierten Gegenionen gefunden wird.

Die Bindungsstelle im muskarinergen M₂-Rezeptor entspricht physikalisch-chemisch den Bedingungen eines aromatischen Co-Kristallisates, so dass die *gauche*-Form die wahrscheinlichere in der Bindungstasche ist. Trotzdem wurden beide Rotamere manuell in das Homologiemodell des muskarinergen M₂-Rezeptors eingedockt. Als Orientierungspunkte dienten hierfür die an der Bindung beteiligten Aminosäuren. Punktmutationen an den Positionen 103, 104, 155, 187, 190, 400 und 403, jeweils bezogen auf die Nummerierung des M₂-Rezeptors, führten jeweils zu einem deutlichen Affinitätsverlust bei Agonisten der muskarinergen Rezeptoren.

Die Acetylcholin-M₂-Rezeptor-Komplexe wurden danach in einer ausführlichen Moleküldynamiksimulation untersucht. Zunächst wurden die energetische Equilibrierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes sowie auch die *root mean square deviation* des Proteins überprüft. Nach der üblichen Equilibrierungsphase von ungefähr 200 ps, stellte sich für beide Konformere eine stabile fast identische Komplex-Geometrie ein. Im Gegensatz zu Oxotremorin M wurden keine Wasserstoffbrückenbindungen zu Threonin 187, Threonin 190 oder Asparagin 404 gefunden.

Es bildete sich aber eine stabile Wasserstoffbrückenbindung zwischen den phenolischen Funktionen von Tyrosin 104 beziehungsweise Tyrosin 403 und dem Estercarbonylsauerstoff des Acetylcholins aus.

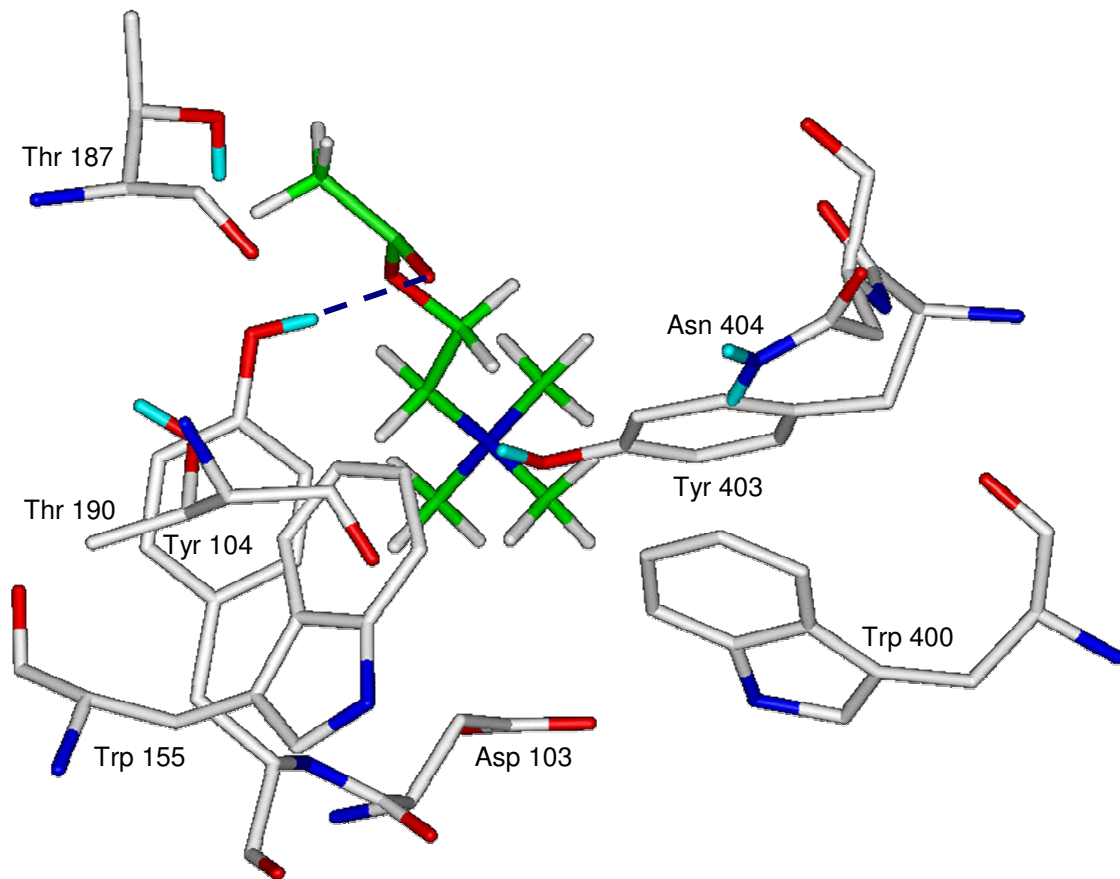


Abbildung 4-27: Position des Acetylcholins in der orthosterischen Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors

Der aromatische Käfig wird von Tyr 104, Trp 155, Trp 400 und Tyr 403 gebildet mit einer negativen Polarisierung durch Asp 103. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Tyrosin 104 und der Esterfunktion des Acetylcholins ist als blaue unterbrochene Linie dargestellt.

Diese beiden Aminosäuren sind, neben Tryptophan 155 und Tryptophan 400, zusätzlich auch an dem aromatischen Käfig beteiligt, der die positiv geladene Trimethylammonium-Kopfgruppe umschließt (Abbildung 4-27).

Der Abstand zwischen dem quartären Stickstoff und der Carboxylatgruppe von Aspartat 103 beträgt 4,7 Å, wobei der zentrale Kohlenstoff der Methylgruppen sich in einem Abstand von 4,1 Å beziehungsweise 5,6 Å befindet. Im Falle des Acetylcholins sind also ebenfalls elektrostatische Wechselwirkungen mit der Carboxylatfunktion vorhanden, deren Fehlen in Mutageneseuntersuchungen zu einer verminderten Affinität führt. Die verschiedenen Komplexe beider Ausgangskonformere wurden in regelmäßigen Abständen aus der Trajektorie extrahiert und über das Programm NMRCLUST in Familien ähnlicher Proteinstruktur eingeteilt, die aber alle eine Struktur analog Abbildung 4-27 zeigen.

4.3.1.3 Atropin

Atropin ist das Racemat aus (R/S)-Hyoscyamin und wirkt als unselektiver Antagonist an den muskarinergen Rezeptoren. Die besser bindende Wirkform am M_2 -Rezeptor ist das S-Enantiomer, daher wurde nur diese Form näher untersucht. In Bindungsstudien wird sowohl das, bei der Aufarbeitung entstehende Racemat, als auch das reine (S)-(-)-Hyoscyamin verwendet. Eine Übertragung der Ergebnisse aus Mutageneseuntersuchungen ist zwischen Hyoscyamin und Atropin ohne weiteres möglich, so dass diese beiden Substanzen als gleichwertig betrachtet werden. In der *Cambridge Crystallographic Database* ist eine Kristallstruktur mit Bromid als Gegenion hinterlegt [147].

Eine wichtige Rolle spielt der Protonierungszustand des tertiären Stickstoffs. Der pK_S -Wert wird mit 9,65-9,85 beschrieben [148], so dass bei physiologischem pH-Wert über 99 Prozent protoniert vorliegen. Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Protonierung liefert die Tatsache, dass quartäre Verbindungen eine hohe Affinität zu den muskarinergen Rezeptoren aufweisen. Im Folgenden wird daher die protonierte Form verwendet.

Das (S)-Hyoscyamin wurde manuell in die oben beschriebene orthosterische Bindungstasche eingedockt. Hierbei wurde zusätzlich noch Asparagin 404 berücksichtigt. Der so erhaltene Komplex wurde anschließend bis zu einem Energiekriterium von 0,5 kcal/Å minimiert. Anschließend wurde eine Moleküldynamiksimulation von 500 ps unter den oben beschriebenen Vakuumbedingungen durchgeführt. Die Equilibrierungsphase war nach circa 200 ps abgeschlossen. Anhand der zwischen dem Protein und dem Atropin ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen wurde die Stabilität der Bindung überprüft. Es zeigte sich, dass eine konstante Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asparagin 404 und dem Carbonylsauerstoff des Esters existiert. Die alkoholische Funktion bildet Wasserstoffbrückenbindungen entweder mit Threonin 190 und/ oder Threonin 187 aus (Abbildung 4-28).

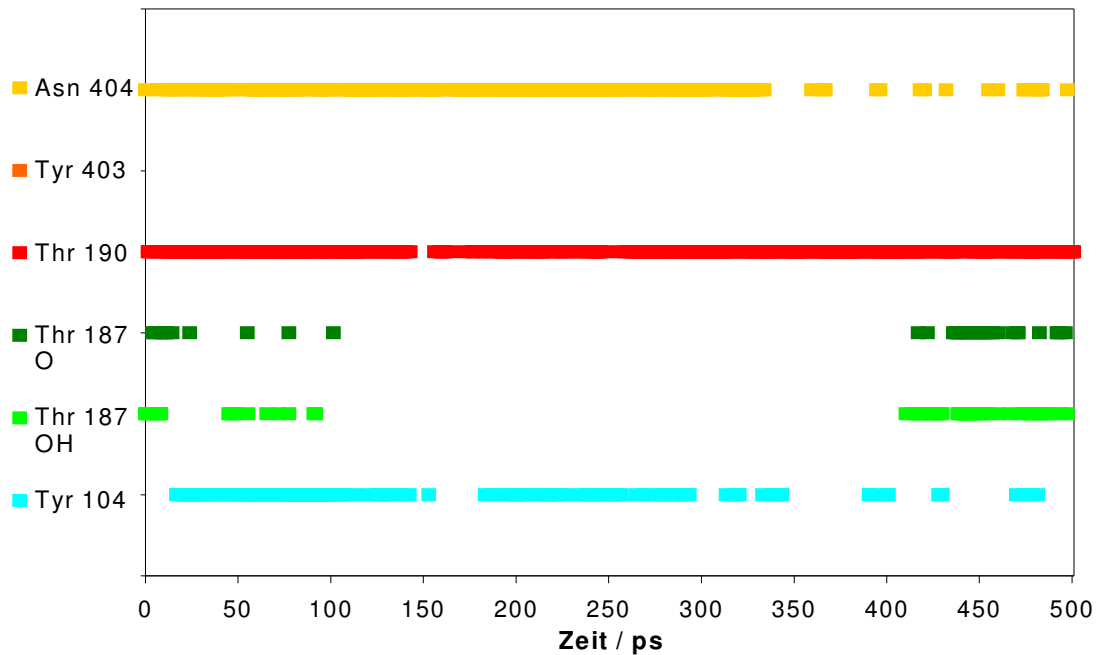


Abbildung 4-28: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen (S)-Hyoscyamin und dem M₂-Rezeptormodell

Tyrosin 104, Threonin 187, Threonin 190 und Asparagin 404 bilden stabile Wasserstoffbrückenbindungen mit Atropin aus. Tyrosin 403 geht eine solche Bindung nicht ein, während bei Threonin 187 zusätzlich noch Wechselwirkungen mit dem Backbone beobachtet werden.

Zusätzlich wurde auch der Abstand zwischen dem protonierten Stickstoff und der Carboxylatgruppe des Aspartats 103 betrachtet. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Stickstoff und dem Carboxylat war aufgrund der Position der Methylgruppe nicht möglich. Der Abstand pendelte sich aber auf ein konstantes Niveau zwischen 4 und 5 Å ein. Dieser Abstand liegt im Bereich einer Coulomb-Wechselwirkung.

Im Vergleich zum schwächer affinen Oxotremorin M war die Wechselwirkungsenergie zwischen Atropin und dem Protein deutlich höher, so dass diese Größe als Kriterium zum Vergleich der Bindungsaffinität geeignet scheint.

Zur weiteren konformatorischen Auswertung wurden die letzten 150 ps der Simulation mit Hilfe von NMRCLUST näher untersucht. Hierbei wurden die, alle 500 fs entnommenen Frames, anhand ihrer schweren Atome, d.h. alle Atome außer den Wasserstoffen, überlagert und in Familien eingeteilt. Hieraus ergaben sich 35 Cluster unterschiedlicher Größe. Die Streuung der repräsentativen Strukturen der Cluster lässt eine Datenreduktion auf die 10 ersten und größten Cluster zu.

Diese 10 Strukturen wurden nun ausführlich energieminimiert und anschließend wiederum einer Cluster-Analyse unterzogen. Hierbei zeigte es sich, dass nach der Minimierung nur noch zwei verschiedene Strukturen erhalten wurden.

Diese Strukturen zeigen einen Unterschied von 0,72 Å, bezogen auf das gesamte Proteinrückgrat, und in Bezug auf das Backbone der Helices, einen Unterschied von 0,4 Å. Die Untersuchung der Sekundärstruktur mit STRIDE zeigte nur minimale Unterschiede zwischen den beiden Strukturen. Die Position des Atropins in der orthosterischen Bindungsstelle ist in Abbildung 4-29 dargestellt.

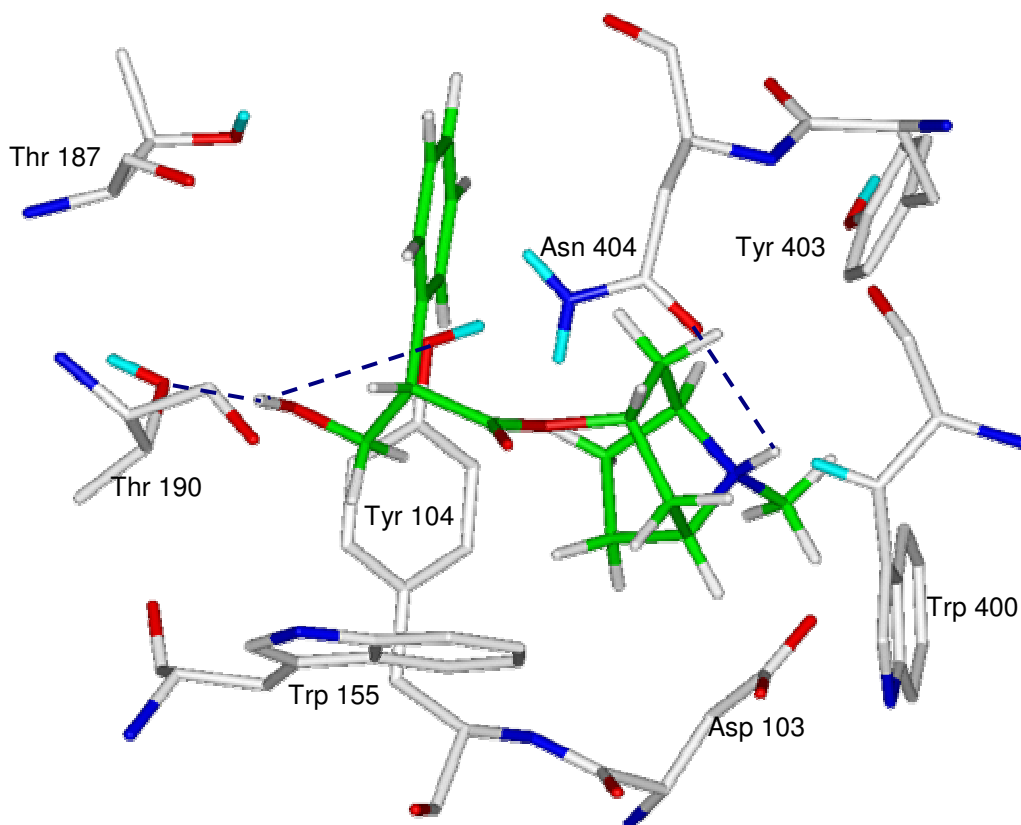


Abbildung 4-29: Position des Hyoscyamins in der orthosterischen Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors

Der aromatische Käfig wird von Tyr 104, Trp 155, Trp 400 und Tyr 403 gebildet mit einer negativen Polarisierung durch Asp 103. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Tyrosin 104 und der Esterfunktion des Acetylcholins ist als blaue unterbrochene Linie dargestellt.

4.3.1.4 Scopolamin

Scopolamin unterscheidet sich strukturell kaum vom (S)-(-)-Hyoscyamin. Der einzige bedeutsame Unterschied besteht darin, dass der Oxiranring den Methylsubstituenten des Stickstoffs aus sterischen Gründen von der äquatorialen in die axiale Position zwingt. Scopolamin ist ebenfalls als Kristallstruktur in der *Cambridge Crystallographic Database* enthalten. Für diesen Liganden finden sich auch Strukturen, die im Komplex mit Wasser kristallisiert wurden. Dieses befindet sich, über eine Wasserstoffbrückenbindung gebunden, entweder im Bereich der Hydroxylgruppe oder gebunden über den protonierten Stickstoff.

Der pK_S -Wert des Scopolamins wird zwischen 7,55 und 8,15 angegeben und ist damit um ein bis zwei Zehnerpotenzen gegenüber Atropin verändert [148]. Für den Protonierungszustand bedeutet dies, dass Scopolamin zu einem weit geringeren Anteil als Atropin in protoniertem Zustand vorliegt. Trotzdem bindet wahrscheinlich in Analogie zu den quartären orthosterischen Liganden die protonierte Form. Eine pH-Wert abhängige Untersuchung von Ehlert und Delen zeigte, dass Scopolamin in protoniertem Zustand eine ähnliche Dissoziationskonstante aufweist wie das quartäre N-Methylscopolamin, wohingegen unprotoniertes Scopolamin eine etwa um den Faktor 70 verringerte Dissoziationskonstante zeigt [149].

Der Ligand wurde anschließend in die orthosterische Bindungstasche eingedockt, wobei ein zusätzliches Wassermolekül zwischen den protonierten Stickstoff und Aspartat 103 platziert wurde. Über dieses Wassermolekül ist das Scopolamin in der Lage eine indirekte Wasserstoffbrückenbindung zu diesem Aspartat auszubilden. Dieser Rezeptor-Ligand-Komplex wurde unter den für das (S)-Hyoscyamin beschriebenen Bedingungen moleküldynamisch untersucht. Nach der Equilibrierungsphase wurden neben der indirekten Wasserstoffbrücke zu Aspartat 103 auch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Estersauerstoff und Asparagin 404 sowie zwischen der Hydroxylgruppe und den Threoninen 187 und 190 wieder gefunden.

Der Verlauf der potentiellen Energie sowie auch der *root mean square deviation* war analog denen des Atropins, so dass sie hier nicht näher ausgeführt werden.

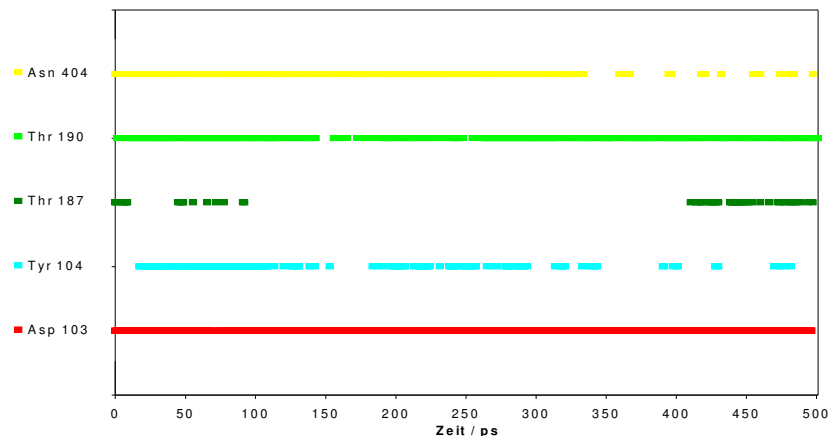


Abbildung 4-31: Wasserstoffbrückenbindungen während der Moleküldynamiksimulation unter Vakuumbedingungen mit einem Wassermolekül

Zwischen Scopolamin und den Aminosäuren der orthosterischen Bindungstasche können über den gesamten Simulationszeitraum verschiedene Wasserstoffbrückenbindungen gefunden werden.

Abbildung 4-30 zeigt eine typische Struktur des Komplexes mit Scopolamin unter Vakuumbedingungen.

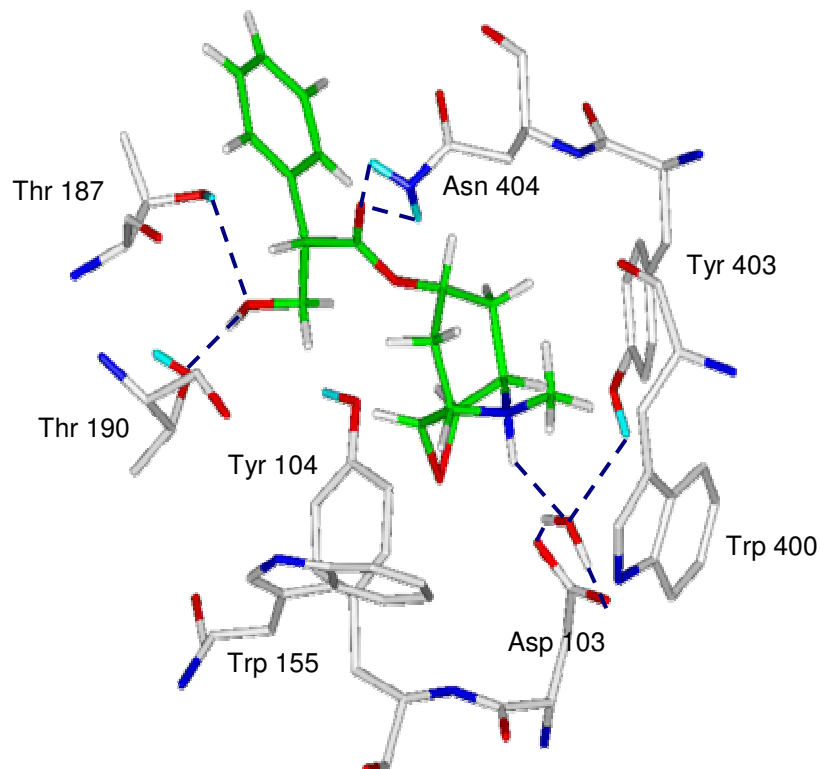


Abbildung 4-30: Scopolamin in der orthosterischen Bindungsstelle

Die Kohlenstoffatome der Aminosäuren der orthosterischen Bindungsstelle sind weiß dargestellt, wichtige Wasserstoffe cyan. Sauerstoffatome sind rot gefärbt, Stickstoffatome dunkelblau. Das Kohlenstoffgerüst des Scopolamin ist grün markiert, die Wasserstoffe sind weiß.

Zur Überprüfung der Position des postulierten Wassermoleküls wurde hier zusätzlich eine Simulation in der Phospholipidmembran durchgeführt. Die Simulationsbedingungen wurden analog denen für das ligandfreie Rezeptormodell in Kapitel 4.2.3 gewählt. Im GROMACS-Kraftfeld wurden die Parameter für den Oxiranring analog den Gegebenheiten in den Kristallstrukturen ergänzt. Aufgrund der Systemgröße war hier eine deutlich längere Equilibrierungsphase von circa 1 ns zu beobachten. Anschließend war der Rezeptor-Ligand-Komplex sowohl in Bezug auf die potentielle Energie als auch auf die Backbone-Abweichung des Proteins genauso stabil wie unter Vakuumbedingungen. Die orthosterische Bindungstasche zeigte bei visueller Inspektion keine auffälligen Unterschiede zu den im Vakuum erhaltenen Strukturen. Zur genaueren Untersuchung des Bindungsmodus des Scopolamins wurden auch für diese Simulation die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen ausgewertet (Abbildung 4-32).

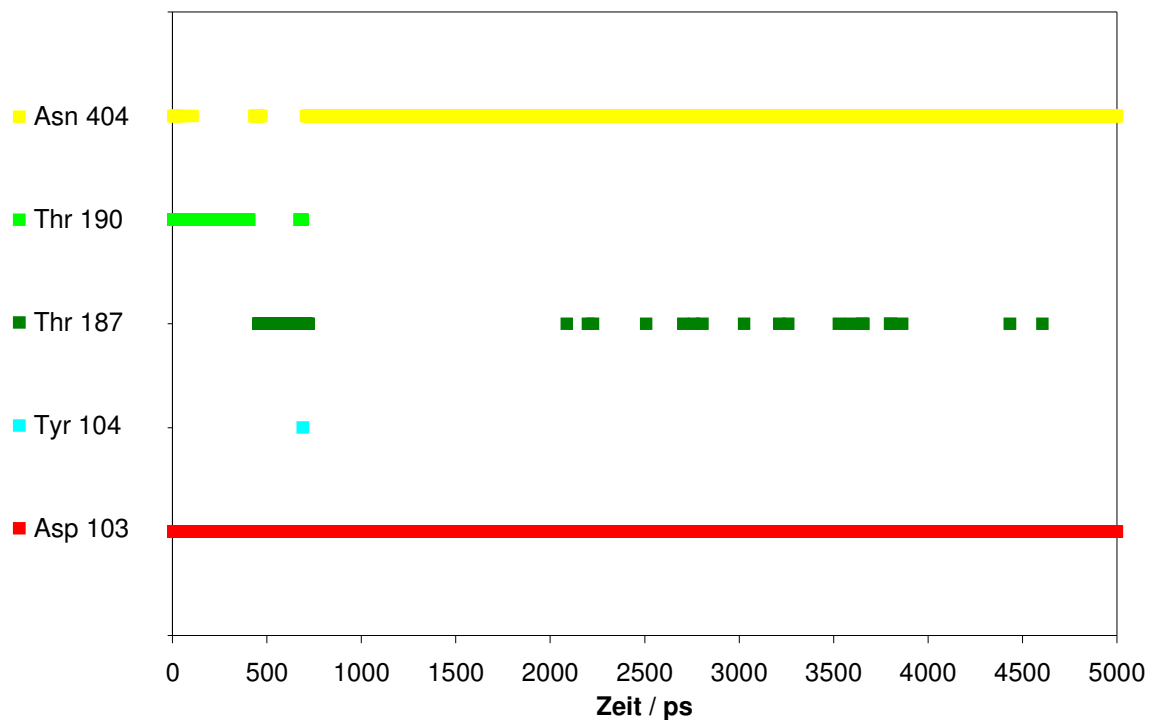


Abbildung 4-32: Wasserstoffbrückenbindungen während der Moleküldynamiksimulation zwischen Scopolamin und den Aminosäuren der orthosterischen Bindungstasche in der DPPC-Membran

Für die Häufigkeit der Kontakte zu Aspartat 103 über ein eingefügtes Wasser und Asparagin 404 waren die Unterschiede nur minimal. Bei den anderen im Vakuum

gefundenen Wasserstoffbrückenbindungen zu Threonin 187 und Threonin 190 unterscheidet sich die Häufigkeit zwischen Vakuum und Membranumgebung. Zu Beginn der Simulation finden sich auch in der Membranumgebung beide direkten Kontakte. Anschließend dreht sich die Hydroxylgruppe des Scopolamins allerdings ein wenig, so dass eine Verbindung zu Threonin 187 nur noch über ein Netz von Wassermolekülen erhalten bleibt Abbildung 4-33.

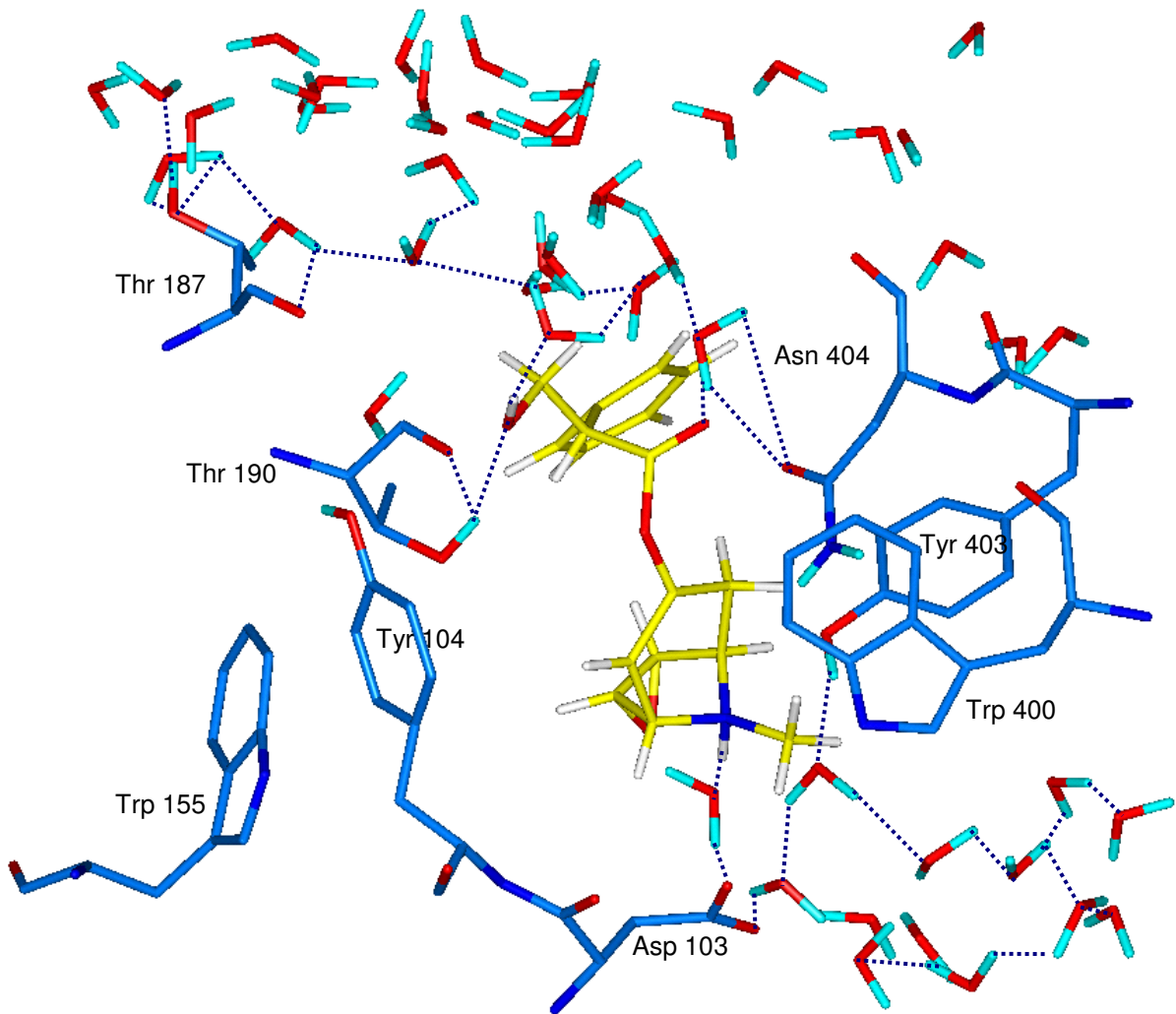


Abbildung 4-33: Bindungsmodus von Scopolamin in der orthosterischen Bindungstasche in einer Membranumgebung

Neben den Aminosäuren der orthosterischen Bindungstasche sind auch die in einem Abstand von 5 Å gefundenen Wassermoleküle abgebildet. Scopolamin (gelb) bildet sowohl direkte als auch wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindungen.

Unter Einbeziehung der wasservermittelten Wasserstoffbrückenbindungen liegen keine Unterschiede in Bezug auf diesen Parameter mehr vor. Die Geometrie der Vakuumsimulation unterscheidet sich also zwar in Bezug auf die Art der Wasserstoffbrückenbindungen (direkt/ indirekt), eine grundsätzliche Aussage lässt sich aber nach einer Auswertung beider Simulationsbedingungen erkennen.

Diese weitreichende Verbindung ist in Abbildung 4-32 aber nicht mitberücksichtigt worden. Ähnliches gilt für den Kontakt zu Tyrosin 104. Er wird fast ausschließlich unter Vakuumbedingungen gefunden. In der Membranumgebung ist die Hydroxylgruppe an der Stabilisierung des Wasserclusters zwischen Aspartat 103 und dem protonierten Stickstoff des Scopolamins beteiligt.

Zum Vergleich wurden die Proteinstrukturen aus der Simulation in der Diphosphatidylcholin-Membran ebenfalls durch das Programm NMRCLUST in Familien eingeteilt und die erhaltenen repräsentativen Komplexe ausführlich minimiert. Nach erneutem *Clustering* der energieminierten Strukturen bleibt nur noch eine Konformation übrig.

Im Bereich des Tropanol-Grundkörpers zeigen die Konformationen der, unter unterschiedlichen Simulationsbedingungen gewonnenen, Komplexe nur geringe Unterschiede. Die Orientierung der Tropasäure ist dagegen verschieden. Hydroxylgruppe und die Esterfunktion zeigen jeweils Interaktionen mit Threonin 187, Threonin 190 und Asparagin 404 (Abbildung 4-34). Der Benzylrest zeigt unter Vakuumbedingungen in den Zugangskanal, der unter physiologischen Bedingungen mit Wasser gefüllt ist. In der Membranumgebung vermeidet der Aromat verständlicher Weise diese Position und lagert sich in eine Position zwischen Helix VI und VII ein, die in diesem Bereich neben einem Phenylalanin auch mit einigen Alaninen, Leucinen und Isoeucinen eine lipophilere Umgebung für den Aromaten bildet. Diese Umgebung ist im Fall eines mit Wasser gefüllten Zugangskanals natürlich deutlich bevorzugt gegenüber einer Position im wässrigen Medium. Unter Vakuumbedingungen kann dieser Effekt nicht beobachtet werden, da die wässrige, hydrophile Umgebung nicht simuliert wird.

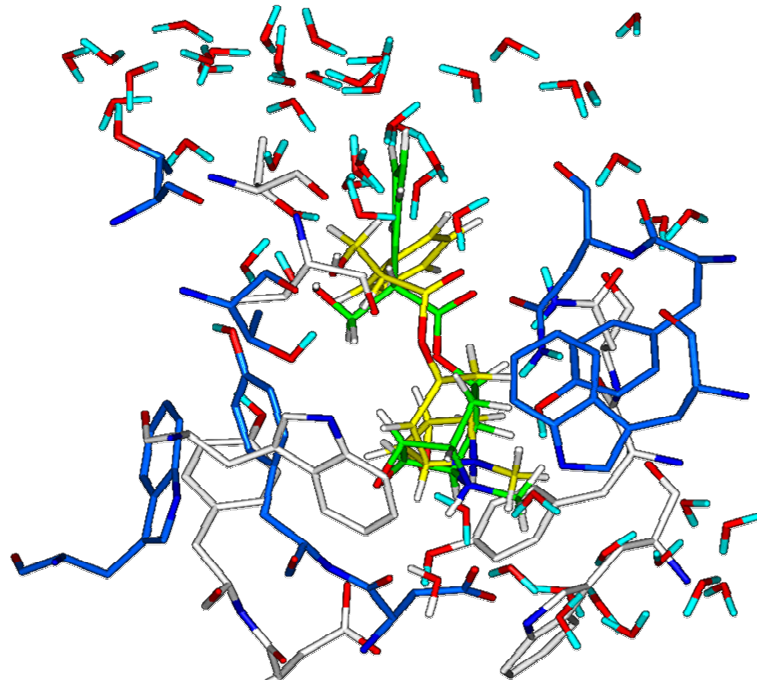


Abbildung 4-34: Überlagerung der orthosterischen Bindungsstelle mit Scopolamin

Die Konformationen aus den MDS unterscheiden sich nach der Überlagerung des Backbones um 3, 27 Å². Diese Abweichung entspricht damit etwa den Backbone-Differenzen zwischen den unbesetzten Modellen.

4.3.1.5 N-Methylscopolamin

N-Methylscopolamin gehört, wie Atropin und Scopolamin, zu den unselektiven Antagonisten am muskarinergen M₂-Rezeptor. Der Bindungsmodus dieser drei Antagonisten unterscheidet sich nur geringfügig, wobei das *N*-Methylscopolamin (NMS) aufgrund seiner höheren Affinität empfindlicher auf Mutationen reagiert. *N*-Methylscopolamin wurde als Antagonist ausgewählt, weil die Untersuchungen der allosterischen Bindungsstelle überwiegend am [³H]*N*-Methylscopolamin-besetzten Rezeptor stattfinden. Bei den Affinitätsunterschieden muss auch berücksichtigt werden, dass es sich bei Atropin um das Racemat von (R/S)-Hyoscyamin handelt, wohingegen das *N*-Methylscopolamin als reines (S)-Enantiomer eingesetzt wird. Für *N*-Methylscopolamin sind in der *Cambridge Crystallographic Database* vier Kristallstrukturen hinterlegt. Der Stickstoff und die beiden Ester-Sauerstoffe der Strukturen wurden mit der Multifit-Routine überlagert. Die Unterschiede waren jedoch so gering, dass eine Einteilung in verschiedene Familien nicht sinnvoll war. Der konformatorische Vergleich des (S)-*N*-Methylscopolamin mit (S)-(-)-Hyoscyamin und (S)-Scopolamin zeigte nur unbedeutende Unterschiede, verursacht durch den Oxiranring beziehungsweise den quartären Stickstoff.

Das N-Methylscopolamin wurde anschließend ebenfalls manuell in die orthosterische Bindungstasche gedockt und moleküldynamisch untersucht. Die Equilibrierungsphase war auch in diesem Fall ähnlich wie oben beschrieben, so dass die Datensammelphase nach 300 ps Simulationsdauer begonnen werden konnte. Die Betrachtung der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen NMS und dem Protein ergab ein ähnliches Bild wie für die strukturell sehr ähnlichen Liganden (S)-Hyoscyamin und Scopolamin. So bildeten sich sowohl zwischen den Hydroxylgruppen von Threonin 187 und 190 und der Hydroxylgruppe des N-Methylscopolamins als auch zwischen der amidischen Funktion von Asparagin 404 und der Esterfunktion des N-Methylscopolamins Wasserstoffbrücken aus. Das quartäre Amin der Kopfgruppe wurde wiederum auf seinen Abstand zur Carboxylatfunktion von Aspartat 103 untersucht. Dieser liegt für den Stickstoff-Carboxylat-Abstand bei 6,4 Å beziehungsweise 7,0 Å, für den Methylgruppen-Kohlenstoff-Carboxylat-Abstand zwischen 5,5 Å und 8,1 Å.

Bei den quartären Verbindungen ist der Abstand im Vergleich zu den tertiären Aminen in Atropin und Scopolamin deutlich größer. Das vorhandene Volumen scheint für die Bindung notwendig zu sein, denn die Mutation des Aspartats 103 zu einem Glutamat, das nur eine um eine Methylgruppe längere Seitenkette besitzt, führt bei den quartären Liganden zu einem deutlichen Affinitätsverlust. Gleichzeitig ist aber auch die negative Ladung des Aspartats wichtig, die Mutation zu Asparagin führt ebenfalls zu einem Affinitätsverlust. Der aromatische Käfig, der um den quartären Stickstoff gebildet wird, besteht ebenfalls wie bei Atropin aus Tryptophan 155, Tryptophan 400 und Tyrosin 403 (Abbildung 4-35).

Ein konformatorischer Vergleich wurde ebenfalls, wie oben beschrieben, mit dem Programm NMRCLUST durchgeführt. Nach der Datenreduktion blieben nur noch 2 unterschiedliche Strukturen übrig. Sie unterscheiden sich in der *root mean square deviation* des gesamten Proteinrückgrates um 0,54 Å, in Bezug auf die helikalen Bereiche um 0,43 Å. Die Position des NMS und die Kontakte innerhalb der Bindungstasche sind in beiden Strukturen identisch

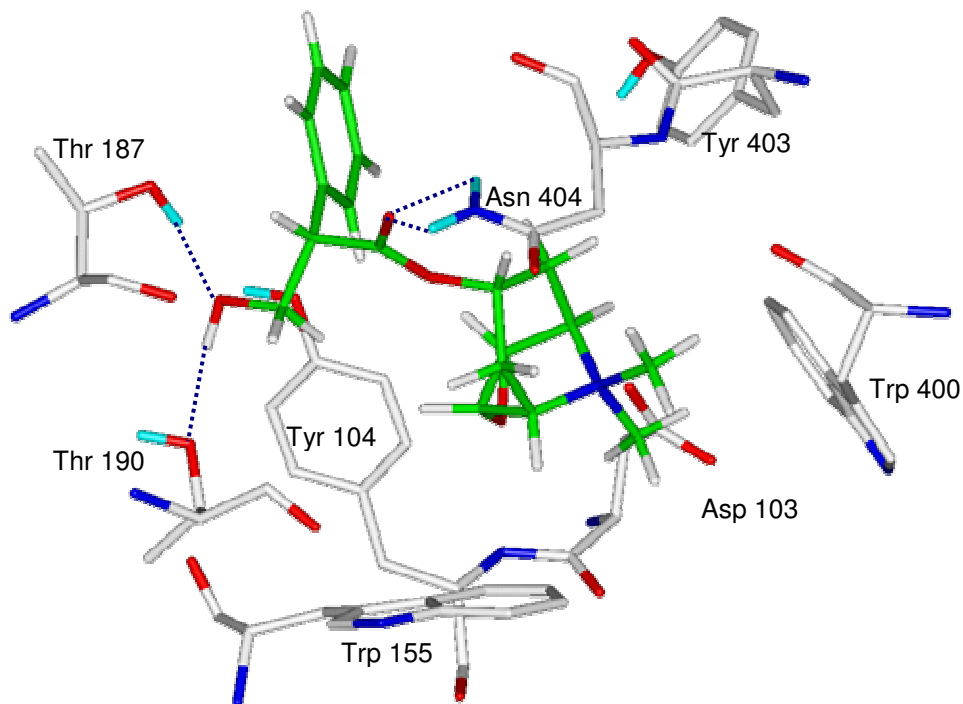


Abbildung 4-35: N-Methylscopolamin in der orthosterischen Bindungstasche

N-Methylscopolamin (grünes Kohlenstoffgerüst) bildet zu Asn 404 und Thr 187 / Thr 190 Wasserstoffbrückenbindungen aus (blaue Linien). Die quartäre Kopfgruppe wird von Tyr 104, Trp 155, Trp 400 und Tyr 403 eingeschlossen, wobei zusätzlich Wechselwirkungen zwischen der positiven Ladung des Liganden und Asp 103 beobachtet werden.

4.3.1.6 AF-DX 384

AF-DX 384 stellt im Gegensatz zu den vorher besprochenen Liganden einen Sonderfall dar. Anders als andere orthosterische Liganden besitzt es eine M_2 -Prävalenz. Einen weiteren Unterschied stellt die Tatsache dar, dass ein AF-DX 384 besetzter M_2 -Rezeptor durch das Alkanbisammonium-Derivat W84 nur noch in einem weit geringeren Maß allosterisch modulierbar ist [150]. Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass nur noch Raum für ein „halbes“ W84 in der allosterischen Bindungstasche vorhanden ist. Aus diesen beiden Tatsachen lässt sich ableiten, dass AF-DX 384 nicht nur die orthosterische Bindungsstelle besetzt sondern auch, zumindest einen Teil, der allosterischen Bindungsstelle.

AF-DX 384 besitzt zwei mögliche Bindungsmodi im muskarinergen M_2 -Rezeptor. Es ist möglich, dass ein protonierter Stickstoff der Seitenkette, in Analogie zu den klassischen orthosterische Liganden, Wechselwirkungen mit Aspartat 103 und dem aromatischen Käfig aus Tryptophan 155, Tryptophan 400 und Tyrosin 403 eingeht. Ein solcher Bindungsmodus wird im muskarinergen M_1 -Rezeptor für das strukturell verwandte Pirenzepin vorgeschlagen [151]. Gegen einen solchen Bindungsmodus spricht allerdings die relative M_1 -Prävalenz des Pirenzepins, die am besten über einen unterschiedlichen Bindungsmodus innerhalb der muskarinergen Rezeptoren erklärt werden kann. Alternativ ist es aber auch möglich, dass der aromatische Trizyklus Wechselwirkungen mit dem aromatischen Käfig eingeht und die protonierten Stickstoffe der Seitenkette Wechselwirkungen innerhalb der allosterischen Bindungstasche eingehen.

Ausgehend von beiden Hypothesen wurden ausführliche Moleküldynamiksimulationen durchgeführt, um einen bevorzugten Bindungsmodus identifizieren zu können.

In beiden Fällen wurden energetisch und strukturell stabile Komplexe erhalten, so dass zur weiteren Analyse zunächst die potentielle Energie herangezogen wurde. Die beiden Rezeptor-Ligand-Komplexe unterschieden sich hierbei nach der Equilibrierungsphase um 31,09 kcal/mol (Abbildung 4-36).

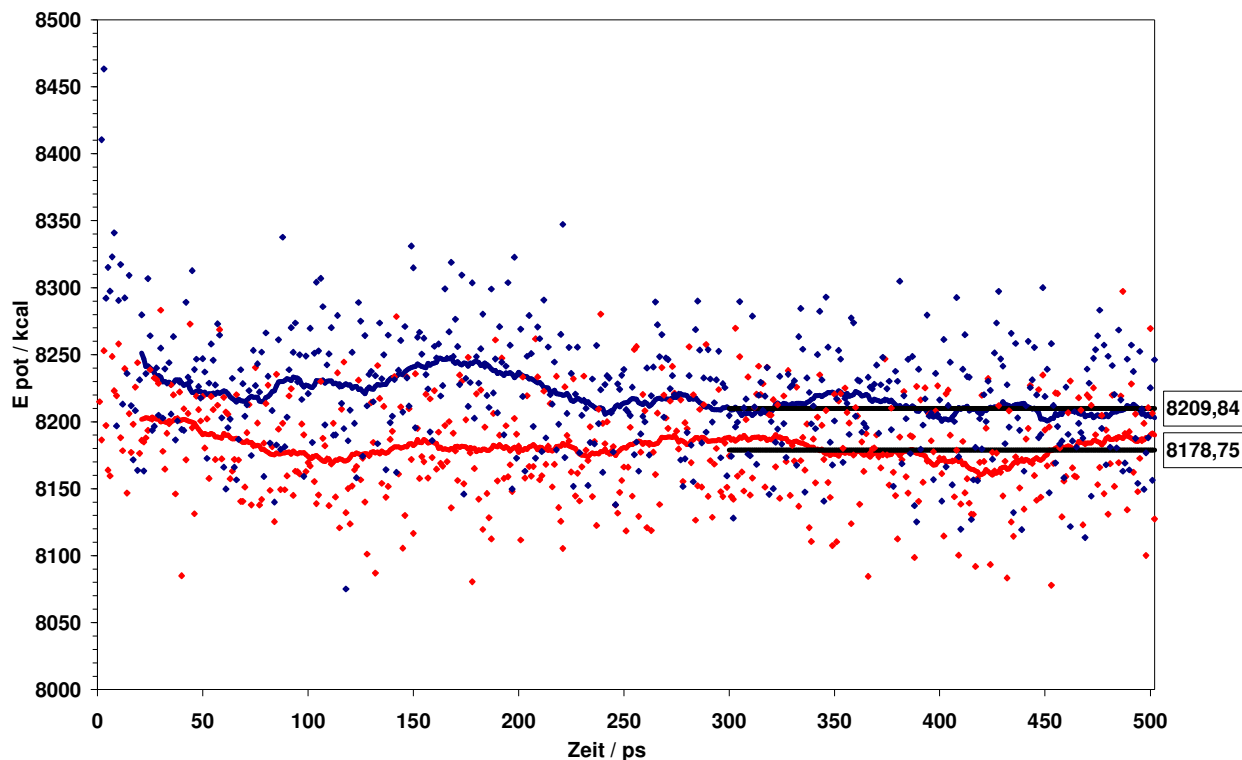


Abbildung 4-36: Vergleich der potentiellen Energien der AF-DX384-M₂-Rezeptor-Komplexe während der MDS

Der Verlauf der Energiekurven bewegt sich auf einem ähnlichen Niveau mit einem Unterschied von circa 30 kcal. Hierbei ist der Komplex mit dem Pyridobenzodiazepin-System innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle (rot) leicht bevorzugt gegenüber dem Komplex mit diesem Ringsystem im Loopbereich des M₂-Rezeptors (blau).

Als weiteres Entscheidungskriterium für eine der beiden Geometrien diene die Wechselwirkungsenergie zwischen dem M₂-Rezeptormodell und AF-DX 384. Dieses Kriterium hat sich bei den anderen orthosterischen Liganden zur Bestimmung der Affinität bewährt. In diesem Fall unterscheidet sich die Wechselwirkungsenergie zwischen den Komplexen um 16 kcal/mol (Abbildung 4-37). Dies bedeutet bei einer Gesamt Wechselwirkungsenergie von -139,5 kcal/mol für den günstigeren Komplex eine prozentuale Differenz von mehr als 10% der Gesamtwechselwirkungsenergie und stellt damit einen signifikanten Unterschied dar. Trotzdem muss bei solchen Aussagen immer berücksichtigt werden, dass vermutlich die allosterische Bindungsstelle an der Bindung beteiligt ist und sich dadurch etwas andere Bedingungen ergeben können.

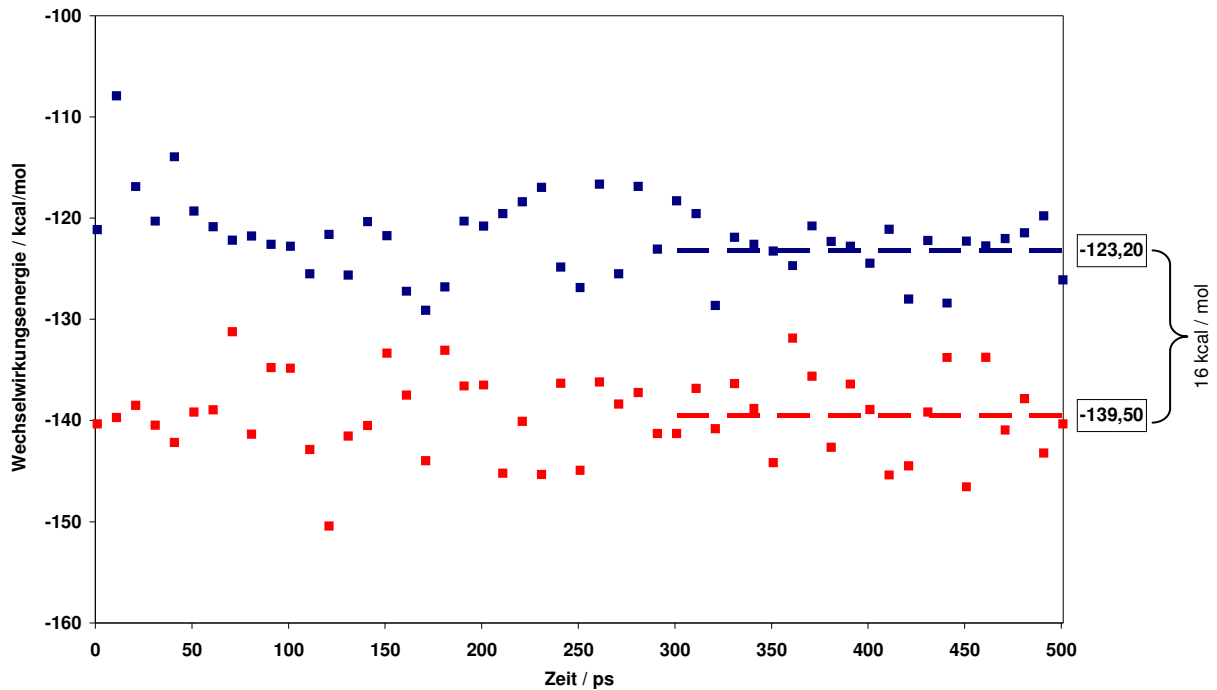


Abbildung 4-37: Vergleich der Wechselwirkungsenergien der AF-DX384-M₂-Rezeptor-Komplexe

Der Komplex mit dem Trizyklus in der orthosterischen Bindungstasche (rot) ist im Durchschnitt um 20 kcal/mol günstiger als der Komplex mit dem Benzopyrido-diazepin im Loopbereich (blau).

Beide Kriterien deuten auf den gleichen Bindungsmodus hin: Eine Position, bei der der aromatische Trizyklus innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle liegt und die Seitenkette außerhalb. Beide Bindungsmodi sind in den Abbildung 4-38 dargestellt. Neben den Aminosäuren der orthosterischen Bindungsstelle ist es für den Trizyklus auch möglich mit Tyrosin 177 aus dem zweiten extrazellulären Loop aromatische Wechselwirkungen einzugehen. Die protonierten Stickstoffe können mit Glutamat 22 ionische Wechselwirkungen ausbilden. Für die Beteiligung dieser Aminosäuren an der Bindung von AF-DX 384 gibt es allerdings noch keine experimentellen Beweise. Untersuchungen anhand von chimären Rezeptoren und Punktmutation sind im Arbeitskreis Mohr aber schon in Planung.

Die nun durchgeführte rezeptorbasierte Analyse des Bindungsmodus von AF-DX 384 im M₂-Rezeptor bestätigt damit das Postulat von Kerckhoff und Höltje auf Basis eines ligandbasierten Vergleichs verschiedener muskarinergere Liganden.

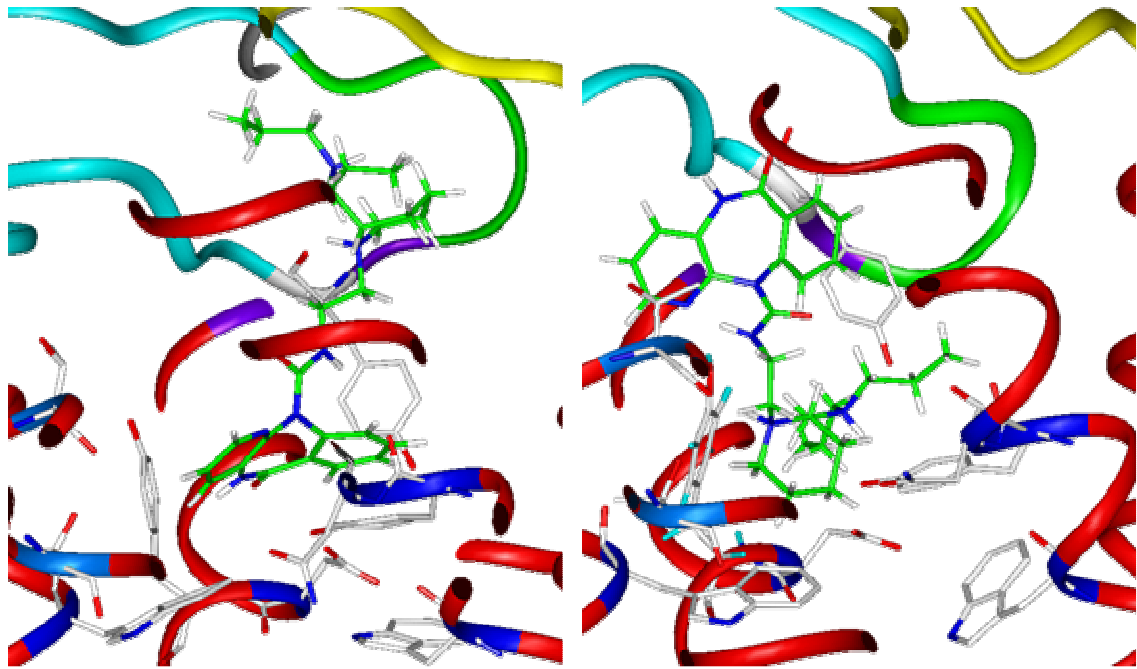


Abbildung 4-38: Mögliche Orientierungen von AF-DX 384 im M₂-Rezeptor

Links: energetisch günstigere Position mit dem Benzo-pyrido-diazepin in der orthosterischen Bindungstasche.

Rechts: energetisch ungünstigere Position mit dem Benzo-pyrido-diazepin in der Loopregion.

Das Backbone der helikalen Bereiche ist als rotes Band mit blauen Markierungen für die Position der Aminosäuren der orthosterischen Bindungsstelle dargestellt. Die Kohlenstoffe der, für die Bindung von AF-DX 384 wichtigen Aminosäuren sind weiß gefärbt, Sauerstoffe rot, Stickstoffe blau, die Wasserstoffe sind nicht dargestellt. Heteroatome in AF-DX 384 sind analog gefärbt, das Kohlenstoffgerüst grün, Wasserstoffe weiß. Das Backbone des zweiten extrazellulären Loop ist cyan / grün (EDGE) / violett (Disulfid-Brücke) dargestellt, der dritte extrazelluläre Loop gelb.

Die Affinität von AF-DX 384 zum freien Rezeptor wird mit einem pK_a -Wert von 8,16 beschrieben. Vergleicht man diesen Wert mit den bekannten Affinitäten der klassischen Orthostere und deren Wechselwirkungsenergien, dann ergibt sich eine Diskrepanz hinsichtlich der im Modell bestimmten Bindungsenergie für AF-DX 384. Mögliche Ursache hierfür ist die zusätzliche Beteiligung der allosterischen Bindungsstelle an der Ligandbindung. Insofern spiegeln sich im Modell auch die im Vorfeld schon bekannten experimentellen Daten wieder und es erscheint geeignet auch den Bindungsmodus „untypischer“ orthosterischer Liganden richtig wiederzugeben.

4.3.1.7 Korrelation der Bindungsaffinität der orthosterischen Liganden

Zum Vergleich der Affinitätsunterschiede wurde zunächst die Wechselwirkungsenergie zwischen den Orthosteren und dem Protein ausgewertet. Hierbei lassen sich die Energien zwar nicht im Sinne einer 3D-QSAR-Analyse mit den Affinitäten korrelieren, es lassen sich aber die Unterschiede zwischen den Affinitäten deutlich an den Veränderungen der Wechselwirkungsenergie erkennen (Abbildung 4-39).

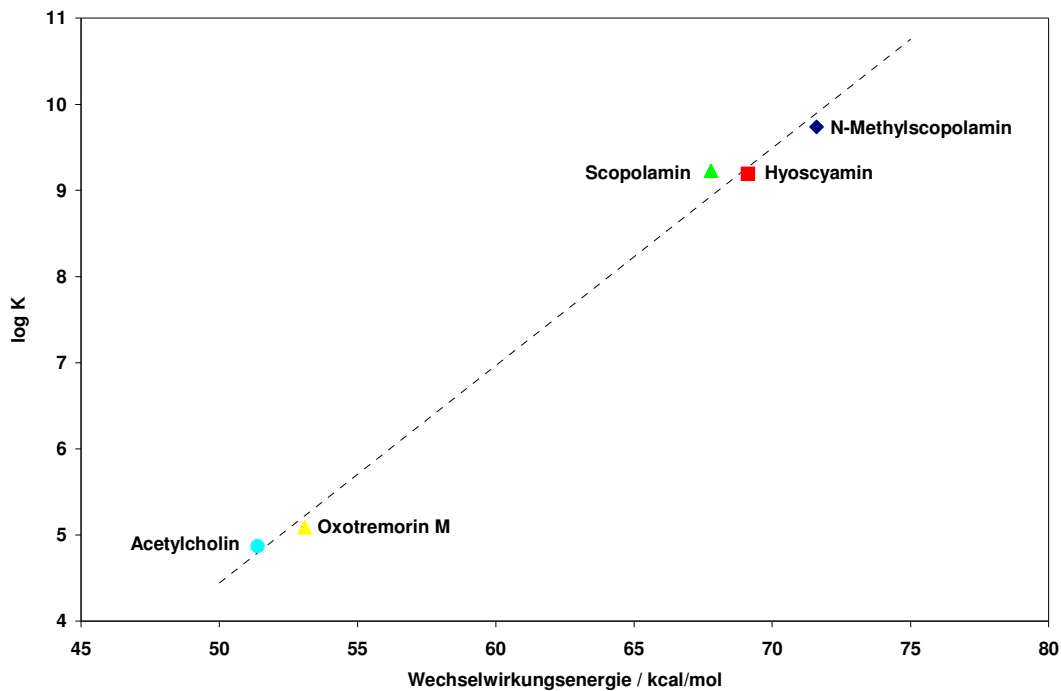


Abbildung 4-39: Korrelation der Wechselwirkungsenergien der fünf „typischen“ orthosterischen Liganden

Die Affinitätskonstanten sind logarithmisch gegen die mittleren Wechselwirkungsenergien aus den MDS aufgetragen. Die gestrichelte Linie stellt die resultierende Korrelationsgerade dar.

Die proteinbasierte Überlagerung der Liganden zeigt, dass sich die protonierten beziehungsweise quartären Stickstoffe zwar alle innerhalb eines aromatischen Käfigs aus Tyrosin 104, Tryptophan 155, Tryptophan 400 und Tyrosin 403 befinden, die genaue Position variiert allerdings sowohl innerhalb der Agonisten und Antagonisten als auch zwischen protonierten tertiären und quartären Stickstoffen. Abbildung 4-40 zeigt die proteinbasierte Überlagerung der klassischen muskarinergen Liganden in einer Stereoansicht, allerdings aus Gründen der Übersichtlichkeit ohne die Seitenketten der orthosterischen Bindungsstelle.

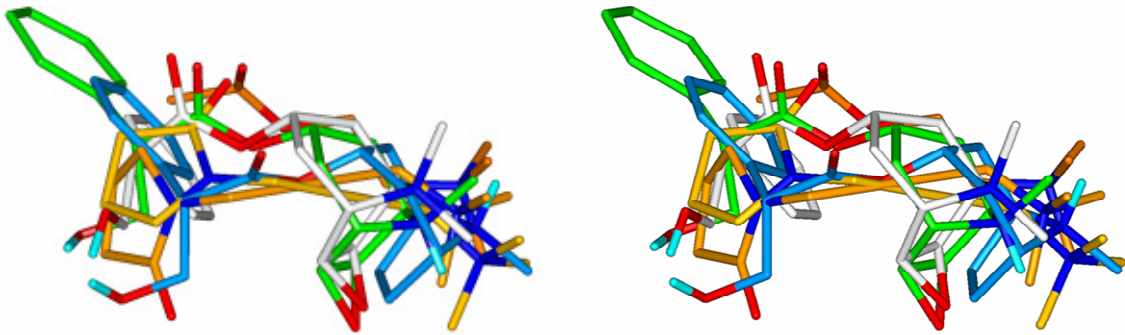


Abbildung 4-40: Stereoabbildung der proteinbasierten Überlagerung der orthosterischen Liganden

N-Methylscopolamin (weiß) und Scopolamin (grün) weisen eine sehr ähnliche Position auf, während sich Hyoscyamin (blau) etwas tiefer in der Bindungstasche befindet. Acetylcholin (orange) und OXO M (gelb/ goldgelb) nehmen eine leicht versetzte Position zu den Antagonisten ein.

Der Unterschied zwischen Agonist und Antagonistbindung scheint mit einer Wechselwirkung zu Asparagin 404 einherzugehen. Die Agonisten Oxotremorin M und Acetylcholin bilden über die Esterfunktion bevorzugt eine Wasserstoffbrückenbindung zu Tyrosin 104 aus, während die Scopolamin und *N*-Methylscopolamin bevorzugt Wasserstoffbrückenbindungen mit Asparagin 404 aufweisen. Atropin bzw. Hyoscyamin bilden über den protonierten Stickstoff eine Wasserstoffbrückenbindung zu Asparagin 404 aus. Die Positionen der Hydroxylgruppen, die Wasserstoffbrückenbindungen zu Threonin 190 bzw. Threonin 187 eingehen können, liegen aber trotzdem in einem ähnlichen Bereich. Hyoscyamin nimmt im M_2 -Rezeptormodell, trotz des fast identischen Grundgerüsts der Tropa-Alkaloide eine andere Position ein, Unterschiede im Bindungsmodus hervorrufen.

Diese Aussagen werden prinzipiell durch Mutationen am M_2 - und anderen Subtypen der muskarinergen Rezeptoren bestätigt, die für Asparagin 404 eine größere Bedeutung bei antagonistisch wirksamen Verbindungen finden, während Tyrosin 104 für die Agonisten eine größere Rolle spielt. Threonin 187 und Threonin 190 bilden mit den atropinartigen Antagonisten eine direkte oder indirekte Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxylgruppe dieser Antagonisten aus. Auch dieser Befund entspricht experimentellen Daten, die bei Mutationen eine Abnahme der Bindungsstärke um den Faktor 30 feststellten [152,153].

Genauere Aussagen bezüglich des Bindungsmodus sind allerdings nur mit einem deutlich größeren Datensatz zu bewerkstelligen, der unter gleichen experimentellen Bedingungen und im gleichen Zellsystem gewonnen sein muss.

Die Überlagerung der Liganden in der gefundenen bioaktiven Konformation entspricht in etwa den gängigen Vorstellungen, dass ein geladener Stickstoff Wechselwirkungen mit einer negativen Ladung beziehungsweise einer elektronenreichen Struktur eingeht. Außerdem scheint der unterschiedlichen Größe und unterschiedliche Lipophilie zwischen Agonisten und Antagonisten, für die Wirkungen entscheidend zu sein (Abbildung 4-41). Antagonisten sind durchweg deutlich voluminöser als die Agonisten. Ebenso zeigen sie eine höhere Lipophilie in dem der positiven Ladung entgegengesetzten Bereich.

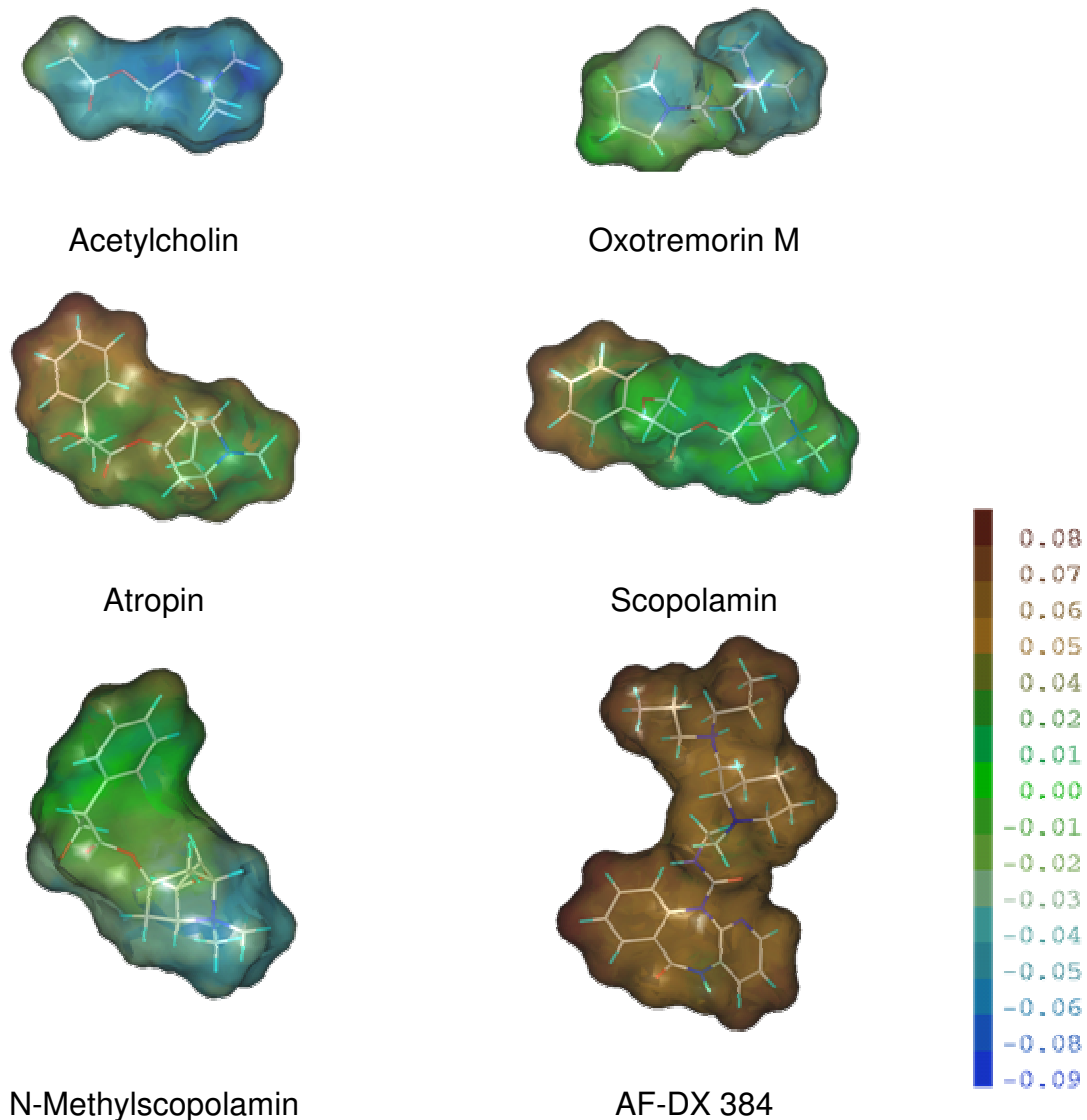


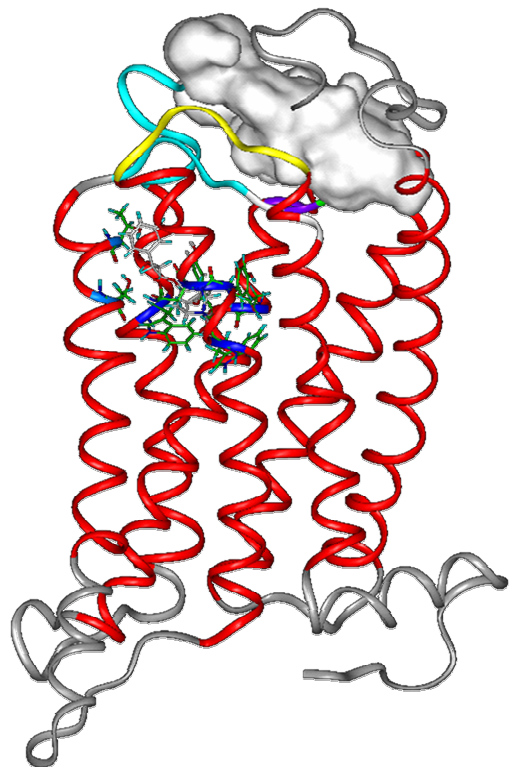
Abbildung 4-41: Lipophile Potentiale (LP) der orthosterischen Liganden

4.3.2 Ternäre Komplexe

Die ternären Komplexe werden aus dem Protein, einem Orthoster und einem Alloster gebildet. Als orthosterischer Ligand wird in den meisten experimentellen Untersuchungen tritiummarkiertes *N*-Methylscopolamin ($[^3\text{H}]\text{NMS}$) eingesetzt. Es erschien daher sinnvoll es auch für die theoretischen Untersuchungen an der allosterischen Bindungsstelle zu benutzen. Die einzelnen Aminosäuren, die die allosterische Bindungstasche bilden sind nicht genau bekannt. Aus Mutationsstudien mit chimären Rezeptoren ist bekannt, dass sie sich im extrazellulären Bereich beziehungsweise am Beginn der transmembranären Helices befindet. Mehrfach-Mutationen weisen darauf hin, dass die saure EDGE-Sequenz (^{172}Asp - ^{173}Glu - ^{174}Gly - ^{175}Asp) im zweiten extrazellulären Loop sowie Asparagin 419 im dritten extrazellulären Loop an der *common allosteric binding-site* beteiligt sind. Als erster Hinweis auf die Bindungsstelle diente daher eine Untersuchung des M_2 -Rezeptormodells mittels des Programms SURFNET. Hierbei zeigte sich, dass zwischen dem zweiten und dem dritten extrazellulären Loop und dem N-Terminus ein genügend großes Volumen für die sperrigen allosterischen Modulatoren vorhanden ist (Abbildung 4-42). Die Untersuchungen der Bindungsmodi der einzelnen Liganden wurden ausgehend von diesem als Bindungsstelle identifizierten Raum durchgeführt.¹⁶

Abbildung 4-42: Volumen der allosterischen Bindungsstelle

N-Methylscopolamin ist in der orthosterischen Bindungsstelle mit, für die Bindung wichtigen, Aminosäuren dargestellt. Zwischen E2 (cyan) im Bereich der EDGE-Sequenz (grün) und E3 (gelb) befindet sich eine ausreichend große Kavität für die allosterischen Modulatoren.



¹⁶ Die Farbgebung der Bänder, die das Proteinrückgrat darstellen ist, sofern nicht anders beschrieben, wie folgt: Die transmembranären Helices sind rot markiert. Der N-Terminus, I1, E1, I2, I3 und der C-Terminus sind grau gefärbt. E2 ist in cyan dargestellt, wobei die EDGE-Sequenz grün und die zentrale Disulfidbrücke violett hervorgehoben sind. Loop E3 ist gelb eingefärbt.

Die Auswahl der allosterischen Modulatoren wurde so vorgenommen, dass möglichst viele Gruppen und somit unterschiedliche Strukturen berücksichtigt werden. Alcuronium auch die Caracurin V-Derivate gehören zur Gruppe der Indolalkaloidartigen Substanzen. Ein Vorteil dieser Substanzklasse ist ihre relative Rigidität, so dass bei einer hohen Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor davon ausgegangen werden kann, dass die allosterische Bindungsstelle gut ausgefüllt wird. Es sind aus Bindungsstudien an chimären Rezeptoren aber auch Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen Diallylcaracurin V und Alcuronium bekannt, die in Kapitel 4.4 detailliert beschrieben werden.

Das Hexamethonium-Derivat W84 wurde als Beispiel für die Gruppe der Bisammonium-Derivate ausgewählt, weil es als Tritium-markierter Radioligand mit relativ hoher Affinität, in Verdrängungsexperimenten am muskarinergen M_2 -Rezeptor eingesetzt wird. Eine Schwierigkeit stellt allerdings die große konformatorische Flexibilität dar, die die Identifizierung der bioaktiven Konformation problematisch gestaltet. W84 ist gleichzeitig auch Subjekt verschiedener Bindungsstudien an chimären Rezeptoren. Die für die Subtypselektivität verantwortlichen Aminosäuren wurden in den Arbeitskreisen Mohr und Ellis identifiziert. Im dritten Teil der Arbeit wurden die Punktmutationen virtuell ebenfalls durchgeführt.

Gallamin wurde in den theoretischen Untersuchungen trotz seiner nur mittelmäßigen Affinität berücksichtigt, weil es der am längsten bekannte allosterische Modulator am M_2 -Rezeptor ist. Es stellt daher eine unter verschiedenen Bedingungen recht gut untersuchte Substanz dar.

AF-DX 384 kann, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, sowohl die orthosterische als auch die allosterische Bindungstasche besetzen. In diesem Teil der Arbeit werden neben der Untersuchung des allosterischen Bindungsmodus dieser Substanz auch Hybride aus AF-DX 384 und W84 untersucht, die eventuell in der Lage sind beide Bindungsstellen gleichzeitig zu besetzen.

4.3.2.1 Caracurin V-Derivate

Caracurin V und seine Derivate sind gut als Modellsubstanzen für die Untersuchung der allosterischen Bindungsstelle geeignet, da sie sich im Grundgerüst nur geringfügig unterscheiden, aufgrund ihrer unterschiedlichen Substitution in der Seitenkette allerdings sehr deutliche Affinitätsunterschiede aufweisen.

Der vorliegende Datensatz stammt von Zlotos et al. [87] und besteht aus 11 Caracurin V Derivaten und Caracurin V selbst. Ebenfalls einer Publikation von Zlotos entnommen wurde eine aus NMR-Daten abgeleitete Konfiguration des Caracurin V [155]. Diese wurde auf alle untersuchten Derivate ebenfalls übertragen. Die Anordnung der aromatischen Ringe lässt sich aus diesen Daten allerdings nicht genau bestimmen, so dass hier eine dynamische Konformationsanalyse zur Bestimmung der günstigeren Konformation notwendig war. Prinzipiell möglich ist sowohl die gewinkelte als auch die planare Konformation (s. Abbildung 4-43).

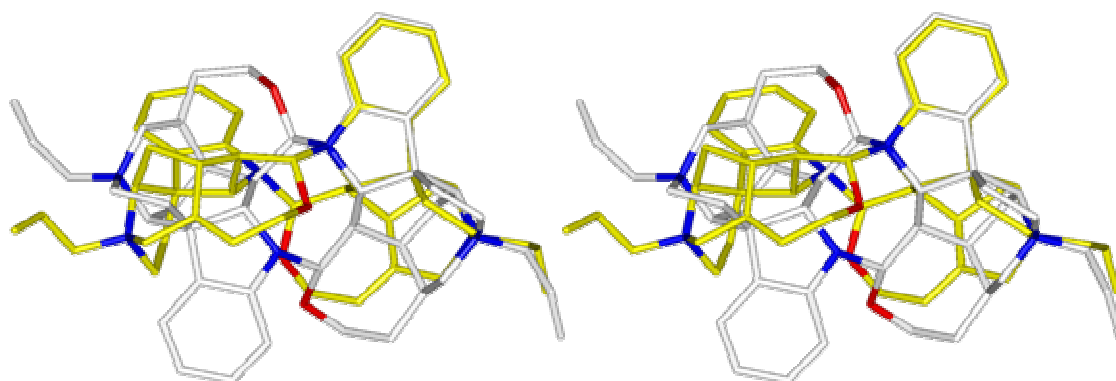


Abbildung 4-43: Stereoabbildung der Konformationen des Diallylcaracurin V

Der zentrale Diazacyclooctanring des Diallylcaracurin V kann eine „geknickte“ oder eine „gestreckte“ Konformation einnehmen. In Abhängigkeit davon befinden sich die Indolin-Substituenten auf gegenüberliegenden Seiten oder benachbart zueinander.

Entscheidend für die Anordnung ist hierbei auch der Hybridisierungszustand des Stickstoffs in Indol-Partialstruktur. Quantenchemische Rechnungen im Programm SPARTAN [100] ließen eine Entscheidung zwischen einem sp^2 - und einem sp^3 -hybridisierten Zustand nicht eindeutig zu, sondern ließen einen Zwischenzustand vermuten. Sowohl im CVFF-Kraftfeld als auch im GROMACS-Kraftfeld wurde diese Eigenschaft am besten durch einen sp^2 -hybridisierten Stickstoff innerhalb des Indolin-Rings wiedergegeben.

Die Ringkonformation des gesättigten Achtringssystems wurde von beiden möglichen Konformationen ausgehend in Moleküldynamiksimulationen mit einem *simulated annealing* Protokoll untersucht. Da es sich bei der möglichen bioaktiven Konformation um eine solche in wässrigem Milieu handelt, wurde zur Konformationsanalyse das Programm GROMACS benutzt. Die zur Simulation notwendigen Parameter, zum Beispiel ein protonierter tertiärer Stickstoff, wurden dafür zunächst im GROMACS-Kraftfeld ergänzt. Caracurin V wurde dann ausgehend von beiden Konformationen (Aromaten in einer Ebene und Aromaten gewinkelt zueinander) in einer Wasserbox in physiologischem Milieu untersucht. Zur Auswertung dienten nach der Equilibrierung sowohl die potentielle Energie des Caracurin V als auch die Häufigkeit der gefundenen Winkel innerhalb des Diazacyclooctan-Grundgerüsts. Eine Einteilung in Familien erfolgte zunächst nach der Ähnlichkeit in diesem Grundkörper, dann nach dem Energiekriterium. Die Konformation, bei der die Aromaten gewinkelt zueinander stehen, erwies sich dabei als die stabilere und energetisch günstigere. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch eine Analyse von A. Kuhn unter Vakuum-Bedingungen [156].

Die so bestimmte Konformation des Grundgerüsts wurde nun für das manuelle Docking in die Bindungsstelle des M₂-Rezeptormodells benutzt. Als erstes Derivat wurde das Diallylcaracurin V (Substanz 4) eingedockt, da es die höchste Affinität besitzt und daher die Bindungstasche gut ausfüllen sollte. Zur objektiven Bestimmung einer günstigen Position des Liganden im Protein wurden innerhalb der allosterischen Bindungstasche GRID-Felder berechnet. Hierfür wurden eine quartäre Stickstoffsonde, sowie die hydrophobe DRY-Sonde benutzt. Anhand der berechneten Felder wurde das Diallylcaracurin V positioniert. Die Startstruktur wurde anschließend in einer Moleküldynamiksimulation unter Vakuumbedingungen in FDISCOVER untersucht. Die Equilibrierungsphase war bei diesen Simulationen mit circa 100 ps gegenüber denen der orthosterischen Liganden deutlich verkürzt, da schon vorher ein energetisch und strukturell equilibriertes System vorlag. Zur Auswertung der Datensammelphase wurden zunächst die strukturellen Veränderungen im Proteinmodell durch den zusätzlichen Liganden herangezogen. Die Beurteilung erfolgte, nachdem die während der Dynamiksimulation in Abständen von 500 fs entnommenen Strukturen, mit NMRCLUST wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben, in Cluster eingeteilt worden sind.

Der Vergleich der Sekundärstrukturen zeigte eine Veränderung innerhalb der Loopstrukturen. Eine solche Veränderung ist aufgrund der Bindungstasche der allosterischen Modulatoren in diesem Bereich als sinnvoll anzusehen. Neben dem Einfluss auf den extrazellulären Loopbereich zeigte sich auch ein geringer Einfluss auf die Position der transmembranären Helices, wobei hier die inaktive Ausgangskonformation nur unterstützt beziehungsweise stabilisiert wird (Abbildung 4-44).

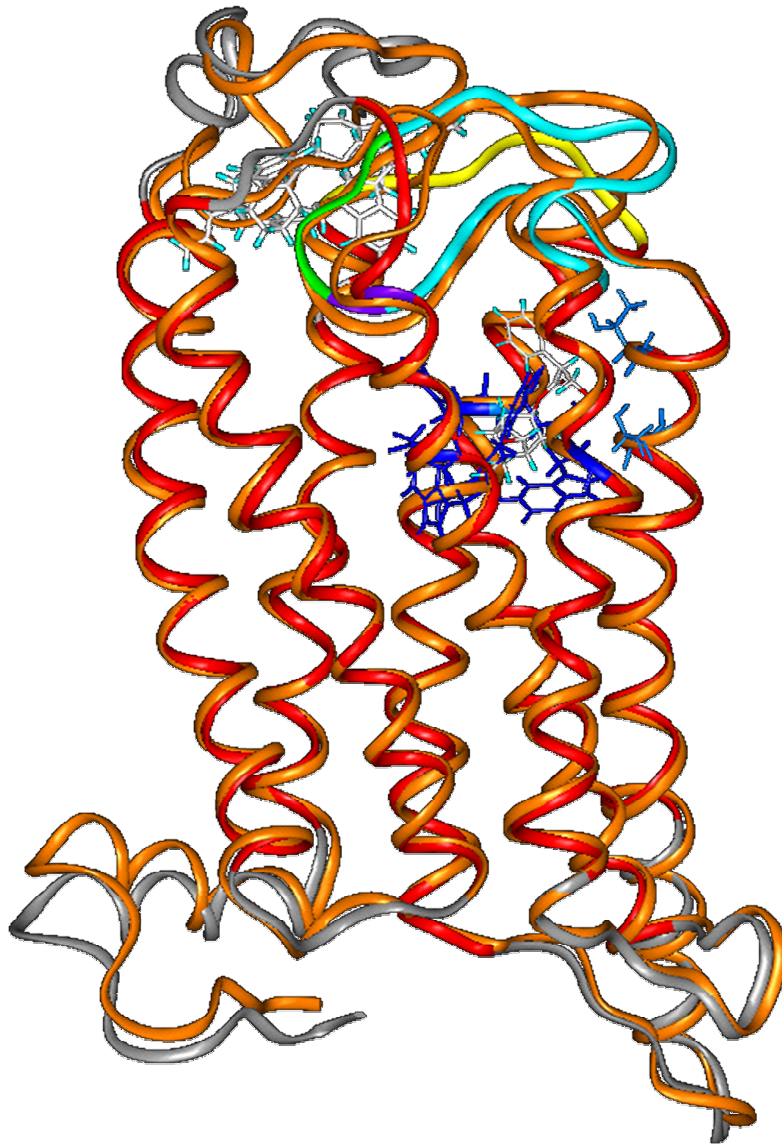


Abbildung 4-44: Überlagerung einer Struktur mit NMS und einer Struktur mit NMS und Diallylcaracurin V

Die Konformationen des M_2 -Rezeptormodells sind jeweils minimierte repräsentative Strukturen innerhalb einer MDS. Zur besseren Unterscheidung ist bei der Form ohne CAR 4 das Proteinrückgrat in orange markiert. Innerhalb der transmembranären Bereiche sind kaum Unterschiede festzustellen, im Bereich von N-Terminus und den extrazellulären Loops hat dagegen eine Anpassung an den Alloster stattgefunden.

Die Bindung des Allosters erfolgt sowohl in räumlicher Nähe zur EDGE-Sequenz im zweiten extrazellulären Loop, als auch im Bereich des dritten extrazellulären Loops beziehungsweise TM 7, der Asparagin 419 enthält.

Die Position wurde mit Hilfe von GRID-Feldern nochmals überprüft. Hierzu wurden neben der positiv geladenen Stickstoffprobe (N1+) auch die Etherprobe (OC2) sowie die Allylprobe (C=) benutzt. Die Projektion der erhaltenen Felder auf das Diallylcaracurin V zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der günstigen Wechselwirkungspositionen im Protein mit den im Liganden vorhandenen funktionellen Gruppen (Abbildung 4-45).

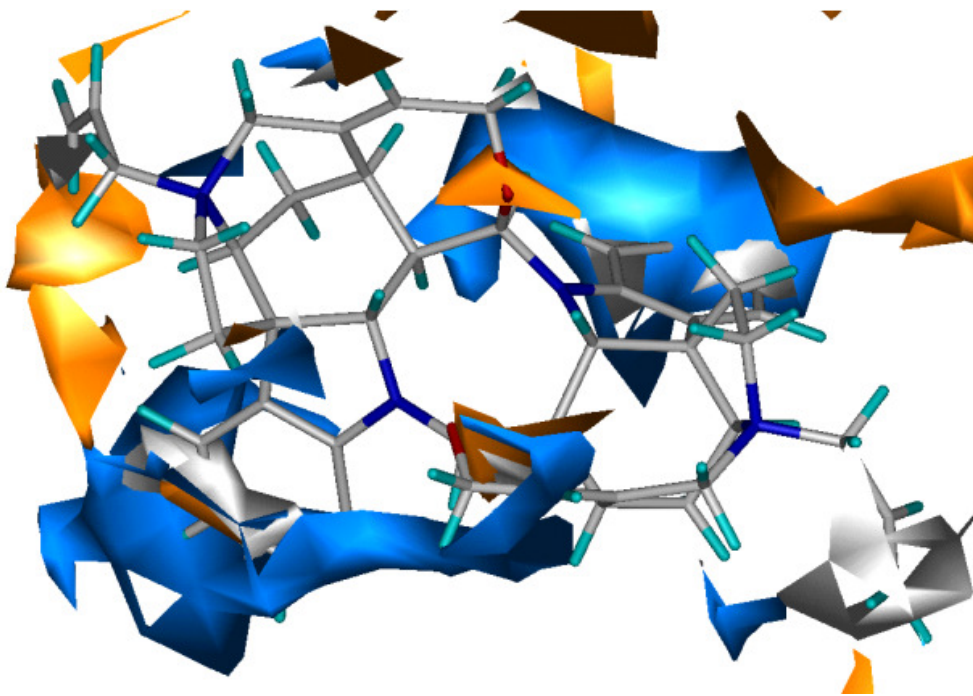
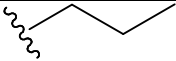
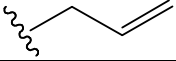
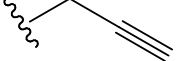
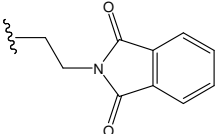


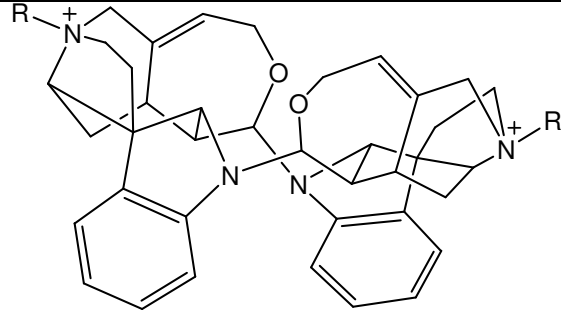
Abbildung 4-45: Wechselwirkungs-Felder des M₂-Rezeptormodells projiziert auf Diallylcaracurin V

Farbgebung: Stickstoff-Probe bei -13,3 kcal: blau, Ether-Probe bei -3,0 kcal: orange, Vinyl-Aromatische-Probe bei -2,5 kcal: weiß

Als weiteres Kriterium diente die Wechselwirkungsenergie zwischen dem Alloster und dem Protein. Nach der Equilibrierung lag sie für das hochaffine Diallylcaracurin V bei -151,5 kcal/mol. Dieser Wert sollte im Folgenden zum Vergleich der unterschiedlichen Affinitäten der Caracurin V Derivate herangezogen werden. Caracurin V und weitere vier Derivate (s. Tabelle 4-9) wurden in analoger Weise untersucht.

Tabelle 4-9: Caracurin V-Derivate

Derivat	EC ₅₀ / nM	Substituent
1	1187	H
2	8	CH ₃
3	30	
4	3	
5	4	
6	376	



Die Position des Grundkörpers sowie der aromatischen Ringsysteme der Liganden 2 bis 5 im M₂-Rezeptormodell unterscheidet sich nach der Moleküldynamiksimulation kaum von der des Diallylcaracurin V. Unterschiede sind allerdings, wie

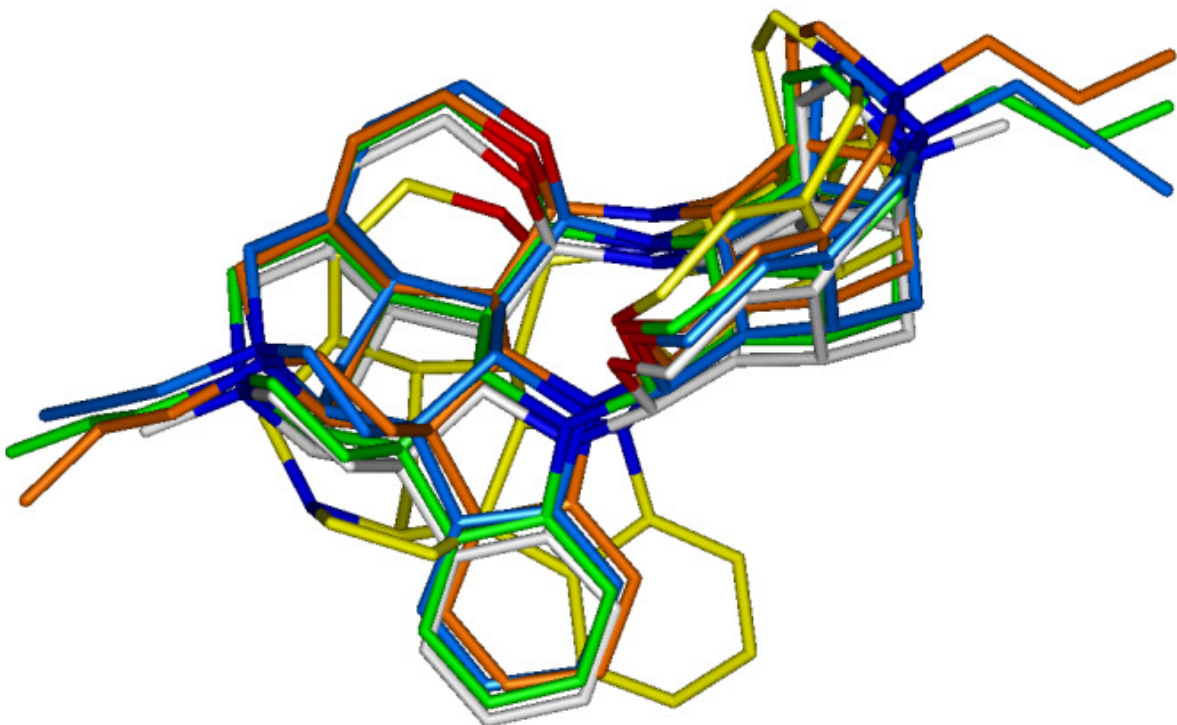


Abbildung 4-46: Proteinbasierte Überlagerung der Caracurin V-Derivate

Farbgebung:

Caracurin V: gelb, Dimethylcaracurin V: weiß, Dipropylcaracurin V: orange, Diallylcaracurin V: grün, Dipropinylcaracurin V: blau; Stickstoffe: dunkelblau, Sauerstoffe: rot

zu erwarten, in der Position der Seitenketten zu erkennen (Abbildung 4-46). Die für das Diallylcaracurin V beschriebenen GRID-Felder zeigten, mit Ausnahme der Allyl-Felder, bei den anderen Caracurin V-Derivaten eine ähnlich gute Übereinstimmung. In Abbildung 4-46 ist auch die Position von Caracurin V dargestellt, die sich nach der proteinbasierten Überlagerung von der der anderen Modulatoren unterscheidet. Eine solche veränderte Position im Rezeptor lässt sich auf die veränderte Elektrostatik an den, bei den anderen Modulatoren quartären Stickstoffen, zurückführen. Dieser Unterschied schlägt sich auch in den Wechselwirkungsenergien für die Modulatoren nieder (Tabelle 4-10).

Tabelle 4-10: Wechselwirkungsenergien und Affinitäten der Caracurin V-Derivate

Derivat Nr.	Name	Wechselwirkungsenergie / kcal/mol	EC ₅₀ / nM
1	Caracurin V	-124,31	1187
2	Dimethylcaracurin V	-144,32	8
3	Dipropylcaracurin V	-144,54	30
4	Diallylcaracurin V	-151,55	3
5	Dipropinylcaracurin V	-148,70	4
6	Diphthalimidoethylcaracurin V	-130,79	376

Ausgenommen aus den bisherigen Betrachtungen ist das Caracurin V Derivat 6. Es besitzt nicht nur deutlich voluminösere Seitenketten als die anderen Derivate, sondern mit den Phthalimidgruppen auch Substituenten anderer chemischer Eigenschaften. Solche Seitenketten sind aus der Gruppe der Alkanbisammonium-Derivate allerdings als günstig bekannt. Im Falle der Caracurin V Derivate führen sie aber zu einem deutlichen Affinitätsverlust, der etwa der Affinität einer Seitenkette entspricht. Derivat 6 lässt sich im Modell nicht analog der Position der anderen Caracurin V-Derivate in die allosterische Bindungstasche docken, sondern der Platz ist nur für einen Substituenten und einen Teil des Grundgerüsts ausreichend. Eine solche Position des Liganden erwies sich als stabil und zeigte eine deutlich verringerte Wechselwirkungsenergie gegenüber den anderen allosterischen Modulatoren. Die überlagerte Position der sechs näher untersuchten allosterischen Modulatoren des Caracurin V Typs im Modell des muskarinergen M₂-Rezeptors ist in Abbildung 4-47 dargestellt.

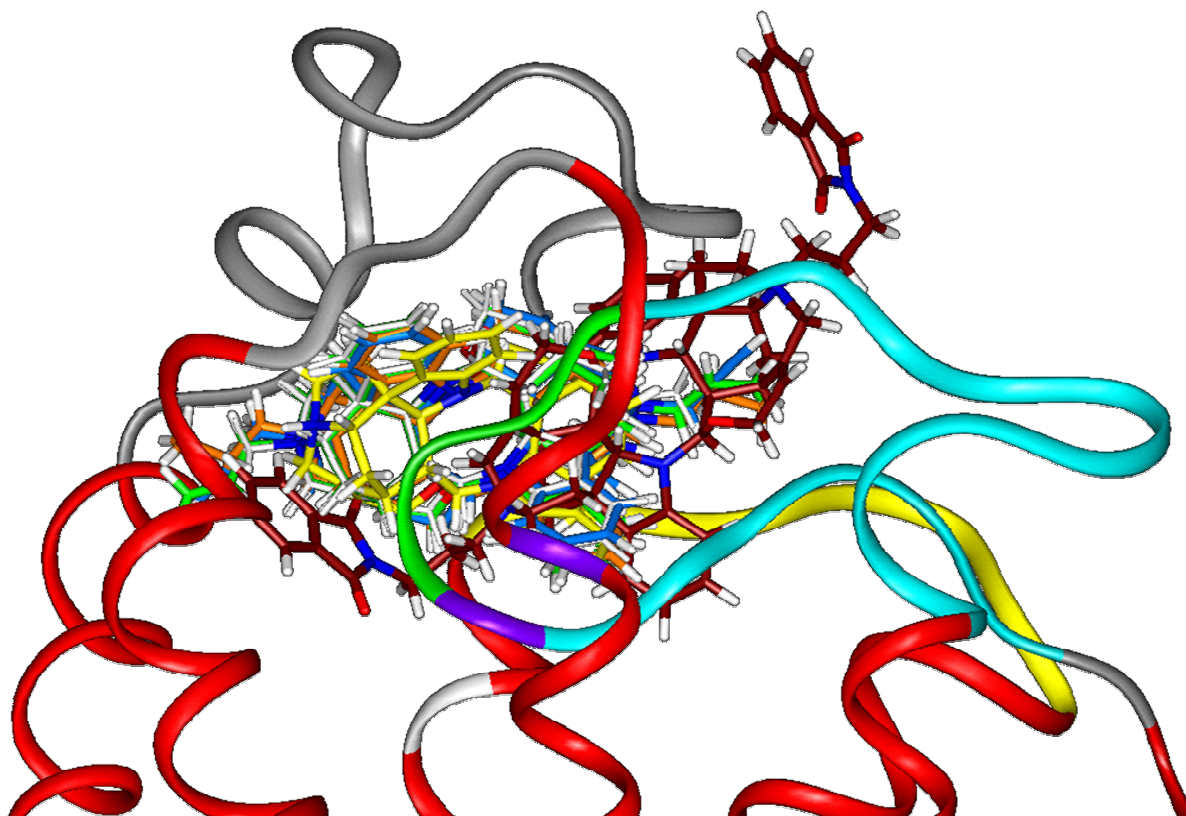


Abbildung 4-47: Position der sechs Caracurin V-Derivate im M_2 -Rezeptor-Modell

Caracurin V: gelb, Dimethylcaracurin V: weiß, Dipropylcaracurin V: orange, Diallylcaracurin V: grün, Dipropinylcaracurin V: blau, Diphtalimidoethylcaracurin V: rotbraun;
Stickstoffe: dunkelblau, Sauerstoffe: rot

4.3.2.2 Alcuronium

Alcuronium ist rein formell gesehen nur das nicht veretherte Ausgangsprodukt für Diallylcaracurin V. In Bezug auf die Konformation des zentralen Achtringes sind jedoch deutliche Unterschiede zu erwarten, da es sich um ein Diazacyclooctadien handelt. Die dynamische Konformationsanalyse dieser Verbindung im Programm GROMACS analog der Vorgehensweise beim Caracurin V zeigte, dass die Ausrichtung der aromatischen Systeme in einer Ebene hier die bevorzugte Konformation darstellt.

Anschließend wurde das Alcuronium in das freie Volumen der allosterischen Bindungsstelle im M_2 -Rezeptormodell eingepasst und unter gleichen Bedingungen wie die Caracurin V Derivate moleküldynamisch untersucht.

Die Verläufe der Kurven der potentiellen Energie sowie der *root mean square deviation* sind analog denen der Caracurin V Derivate, so dass sie hier nicht ausführlicher besprochen werden. Im Vergleich zur Position von Diallylcaracurin V findet sich Alcuronium etwas weiter in Richtung des Extrazellulärraumes zwischen zweitem und drittem extrazellulären Loop, im Bereich der EDGE-Sequenz und Asparagin 419.

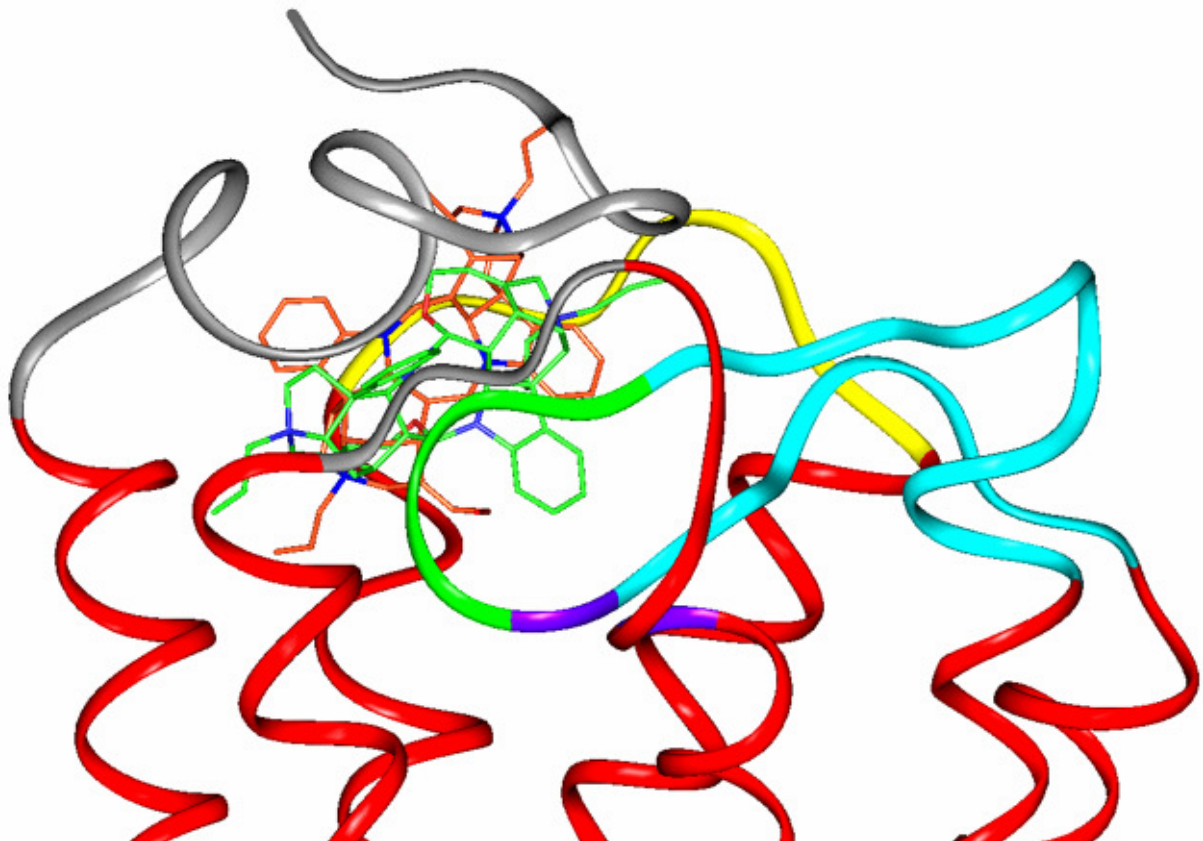


Abbildung 4-48: Bindungsmodus von Alcuronium und Diallylcaracurin V

Alcuronium (orange) bindet bezogen auf die quartären Stickstoffe um 15° gedreht gegenüber Diallylcaracurin V (grün). Dadurch befindet sich Alcuronium weiter in Richtung Extrazellulärraum.

Die Untersuchung der günstigen Wechselwirkungen durch GRID-Felder zeigt ein ähnlich gut übereinstimmendes Bild wie bei Diallylcaracurin V. So finden sich mit der Hydroxyl-Probe (OH) bei einer Konturierung von $-6,5$ kcal günstige Wechselwirkungen an den Positionen der Hydroxylgruppen des Alcuroniums im Rezeptor-Ligand-Komplex. Als Wechselwirkungspartner für die Hydroxylgruppen lassen sich aufgrund der GRID-Felder die Asparagine 2, 3 und 419 identifizieren.

Günstige Wechselwirkungen mit Wasserstoffbrückenakzeptoren, durch die positive Stickstoff-Probe lokalisiert, verursachen Glutamat 22, Glutamat 175, aber auch die schon erwähnten Asparagine 2, 3 und 419. Ebenso lassen sich auch die Wechselwirkungsfelder der Vinyl-Aromatischen-Probe auf das Alcuronium projizieren (Abbildung 4-49).

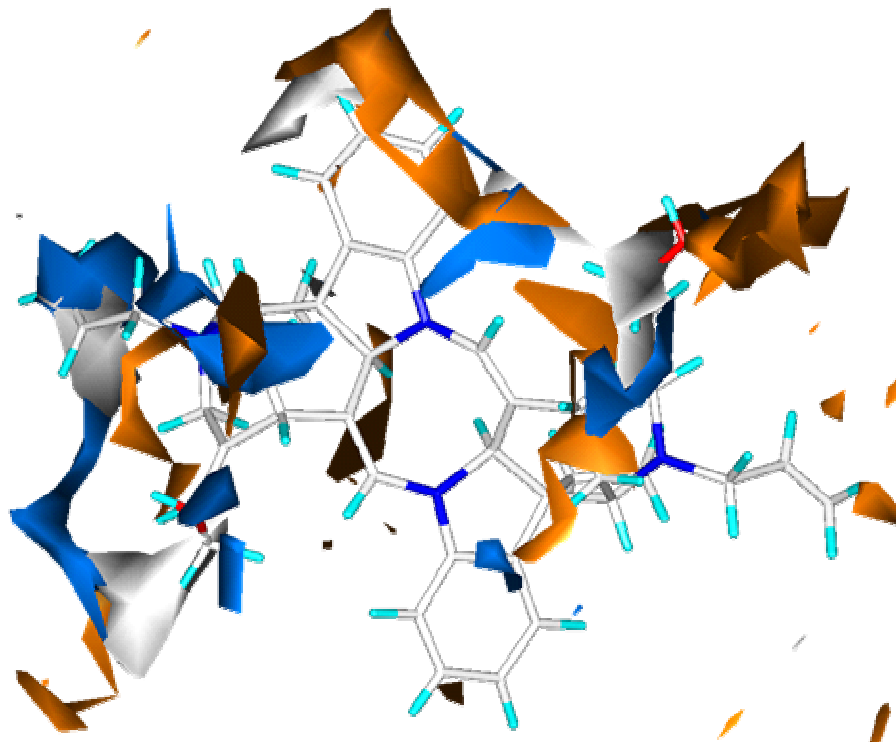


Abbildung 4-49: GRID-Felder des M₂-Rezeptormodells abgebildet auf Alcuronium

Fargebung: Stickstoff-Probe bei -12,0 kcal: blau, Hydroxyl-Probe bei -6,5 kcal: orange, Vinyl-Aromatische-Probe bei -3,0 kcal: weiß

Die Wechselwirkungsenergie zwischen dem M₂-Rezeptormodell und Alcuronium beträgt nach der Equilibrierung -149,9 kcal/mol. Dieser Wert unterscheidet sich nur geringfügig von denen des Diallylcaracurin V (-151,5 kcal/mol, EC₅₀ 3 nM) und des Dipropinylcaracurin V (-148,7 kcal/mol, EC₅₀ 4 nM) und entspricht damit den Erwartungen bei einer Substanz mit einem EC₅₀-Wert von 4 nM.

4.3.2.3 W84

W84 stellt als Vertreter der Gruppe der Hexamethonium-Derivate die flexibelste Verbindung der hier besprochenen allosterischen Modulatoren dar. Gleichzeitig gehört es, unter bestimmten experimentellen Bedingungen, zu den hochaffinen Verbindungen. Von Holzgrabe *et al.* [157] wurde 1996 eine S-förmige Konformation postuliert, die eine Überlagerung mit den Aromaten und den quartären Stickstoffen des Alcuroniums zulässt. Dieser Konformationsvorschlag wurde zunächst strukturell überprüft. Als Ausgangsstruktur wurden hierfür sowohl eine lang gestreckte Konformation als auch der „S-Shape“ benutzt. Schon unter Vakuumbedingungen war der „S-Shape“ während der Energieminimierung allerdings energetisch ungünstig und daher nicht stabil.

Um die Simulationsbedingungen an die experimentellen Bedingungen anzunähern wurde die weitere dynamische Konformationsanalyse in einer physiologischen Kochsalz-Lösung durchgeführt. Die notwendigen Moleküldynamiksimulation wurden im Programm GROMACS durchgeführt, das gegenüber dem FDISCOVER, wässrige Systeme gleicher Größe in deutlich geringerer Zeit simuliert. Hierzu wurden im GROMACS-Kraftfeld zusätzliche Parameter für die quartären Stickstoffe eingeführt. In diesen Simulationen bestätigte sich ebenfalls die Instabilität der postulierten S-Konformation des W84. Als energetisch günstig bildet sich im Wässrigen eine gebogene, schalenähnliche Form des W84 aus (Abbildung 4-50).

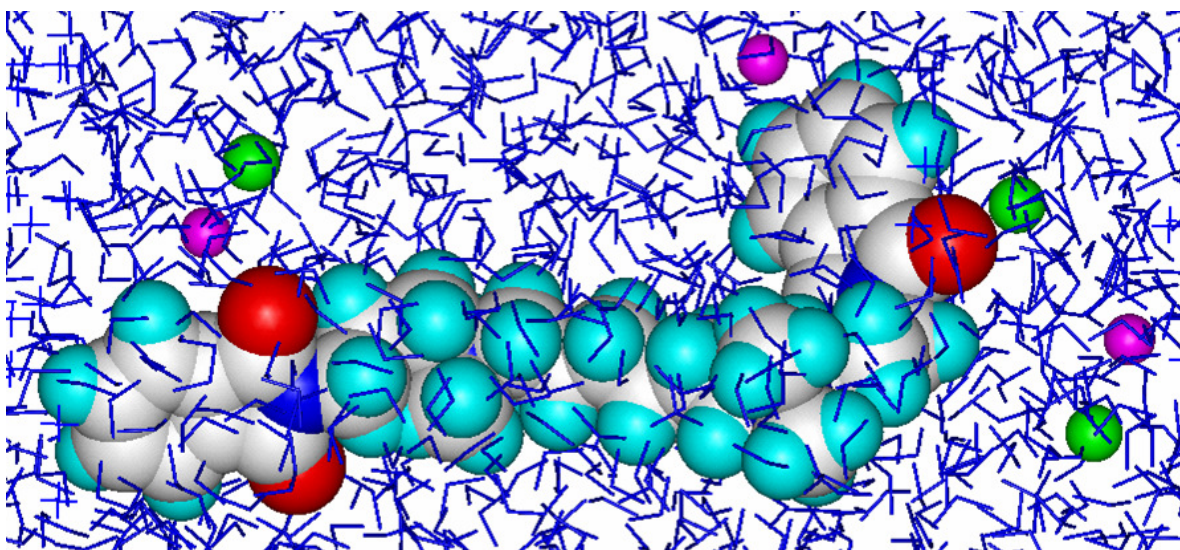


Abbildung 4-50: Konformation von W84 in der Wasserbox

W84 nimmt in einer wässrigen Umgebung unter Natrium- und Chlorid-Ionen-Zusatz (magenta / grün) eine schalenförmige Konformation ein. W84 ist in den entsprechenden Atomtyp-farben dargestellt.

Für die Untersuchungen von W84 im Modell des muskarinergen M_2 -Rezeptors wurde daher nur diese Form berücksichtigt, die sich auch gut in die allosterische Bindungstasche zwischen den extrazellulären Loops eindocken ließ. Die gefundene Position für W84 wurde dann unter gleichen Bedingungen wie bei den Caracurin V-Derivaten beschrieben moleküldynamisch im Programm FDISCOVER untersucht. Nach der energetischen und konformatorischen Equilibrierung des Komplexes wurden die Konformationen während der Datensammelphase alle 500 fs extrahiert und anschließend wieder mit dem Programm NMRCLUST in Familien eingeteilt.

Der equilibrierte Protein-Ligand-Komplex zeigte danach eine ähnliche Position für das W84 wie vor der freien Moleküldynamiksimulation (Abbildung 4-51).

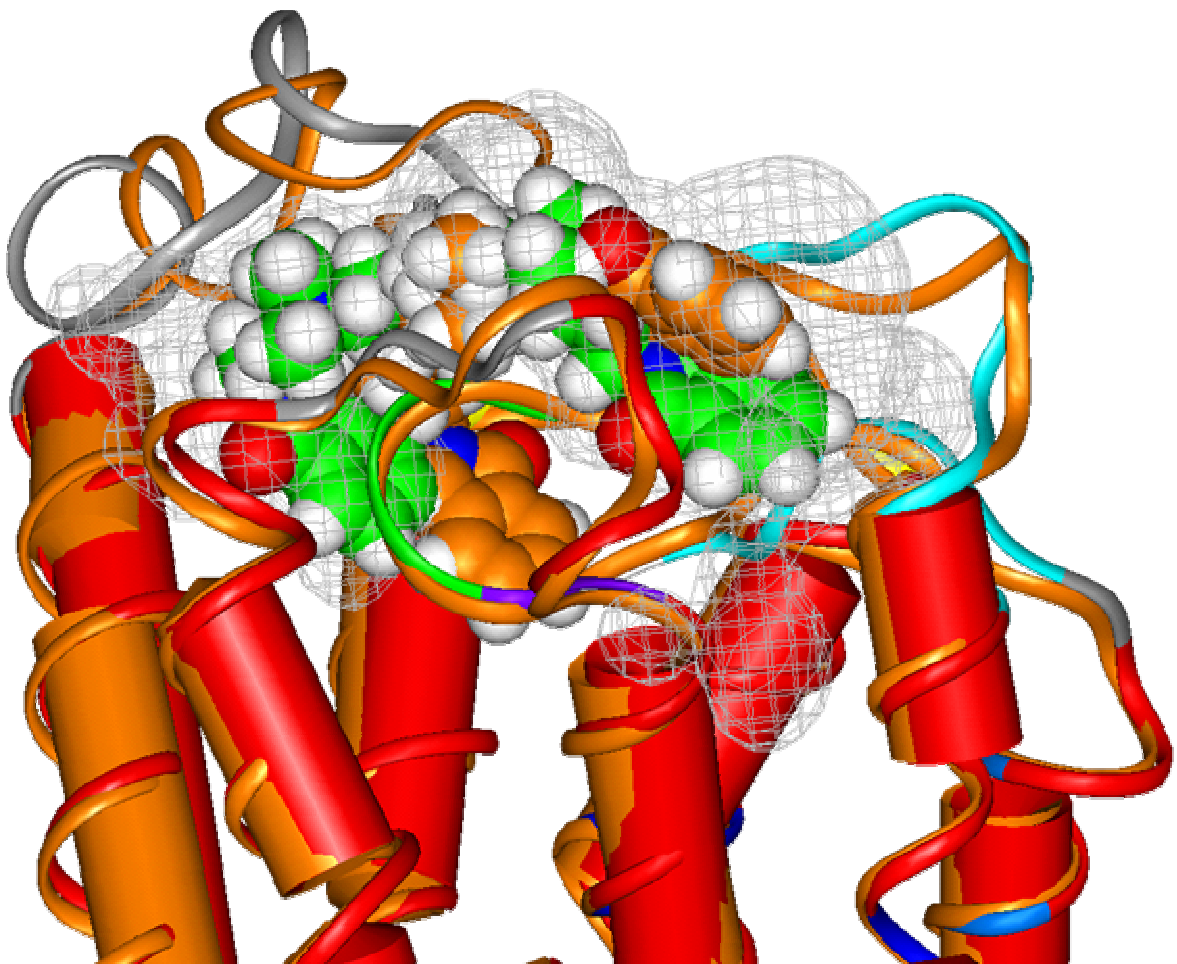


Abbildung 4-51: Überlagerung der Ausgangs- und Endstruktur der MDS mit W84

Das Backbone, die transmembranären Helices sowie die Kohlenstoffe von W84 sind in der Startkonformation orange eingefärbt. Die Helices in der Endstruktur sind rot markiert, das Volumen der Bindungsstelle (graues Gitter) befindet sich in guter Übereinstimmung mit dem Volumen von W84. Die Bindung findet sowohl im Bereich der extrazellulären Loops als auch im oberen Teil von TM I und TM VII statt.

Die Bindungsdomäne für W84 befindet sich sowohl im Loopbereich zwischen dem zweiten und dem dritten Extrazellulären Loop, als auch am Beginn der ersten und siebten transmembranären Helix. Eine Begrenzung zum Extrazellulärraum hin, die allerdings recht flexibel ist, stellt der N-Terminus dar. Die Analyse der Wechselwirkungsenergien zwischen W84 und dem M_2 -Rezeptorprotein bestätigt die gefundene Konformation in ihren Wechselwirkungen, denn sie entspricht mit $-141,08$ kcal/mol größenordnungsmäßig derjenigen des Dipropylcaracurin V, das eine ähnliche Affinität zum mit *N*-Methylscopolamin besetzten M_2 -Rezeptor besitzt.

Zur genaueren Untersuchung der Wechselwirkungen wurden anschließend an einer repräsentativen Struktur GRID-Felder mit der positiv geladenen Trimethylammoniumprobe (NM3), der Methylprobe (C3) und der Carbonylprobe (O=) herangezogen. Die Felder wurden auf W84 in der Bindungstasche projiziert, um die Übereinstimmungen mit funktionellen Gruppen erkennen zu können (Abbildung 4-52). Bei einer Konturierung von $-2,0$ kcal/Å umschließt die Methyl-Probe die hydrophoben Bereiche von W84 fast vollständig. Ebenfalls in guter Übereinstimmung finden sich ein Feld der Carbonylprobe bei $-3,5$ kcal / Å mit einer der Phthalimid-Carbonylgruppen. Die Wechselwirkungsfelder der Trimethylammoniumprobe, bei $-6,7$ kcal/Å konturiert, zeigen günstige Interaktionen sowohl im Bereich der Phthalimidreste als auch im Bereich eines quartären Stickstoffs.

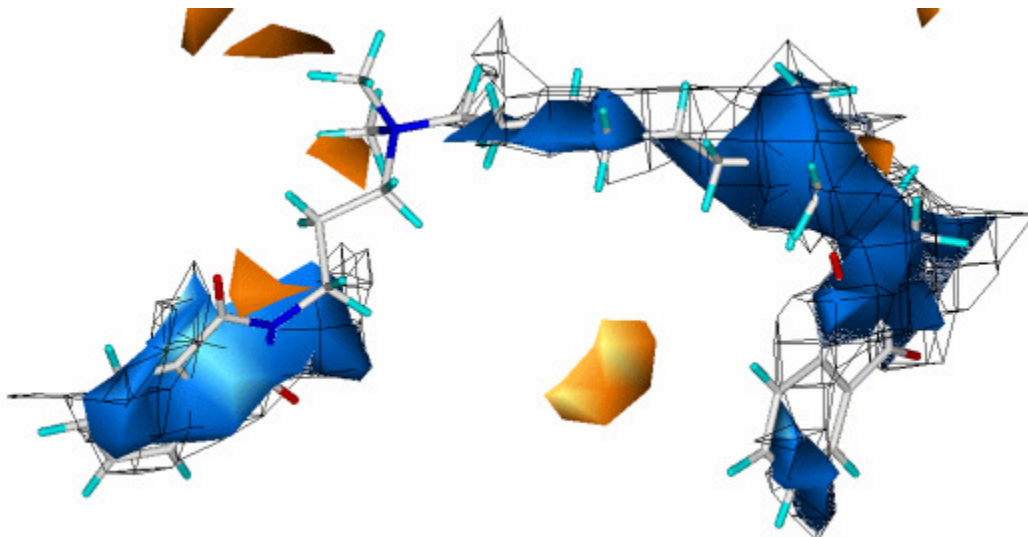


Abbildung 4-52: GRID-Felder übertragen auf die funktionellen Gruppen von W84

W84 ist nach Atomtypen gefärbt: Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Kohlenstoff weiß, Wasserstoff: cyan. Die hellblauen Felder der Trimethylammoniumprobe, konturiert bei $-6,7$ kcal / mol umschließen sowohl die Phthalimidgruppen als auch einen quartären Stickstoff. Ein Feld der Carbonylprobe, berechnet bei $-3,5$ kcal / mol zeigt Übereinstimmung mit der entsprechenden Funktion eines Phthalimidrestes. Die Methylprobe erzeugt bei einem Energiewert von $-2,0$ kcal / mol ein Feld, das nahezu das Volumen von W84 wiedergibt.

4.3.2.4 Gallamin

Gallamin ist im Vergleich zu den Caracurin V Derivaten ein relativ kleiner Ligand der allosterischen Bindungsstelle. Durch seine sehr flexiblen Seitenketten ist es allerdings in der Lage einen sehr großen Konformationsraum abzudecken. Für eine systematische Konformationsanalyse dieser Seitenketten ist die Anzahl der drehbaren Einfachbindungen zu groß (s. Kapitel 3.4), so dass eine dynamische Konformationsanalyse in wässrigem Milieu unter Natrium- und Chlorid-Ionen-Zusatz durchgeführt wurde. Die gefundenen, energetisch günstigen Konformationen decken nur einen kleinen Teil des Raumes ab und lassen sich nochmals in Familien großer Ähnlichkeit einteilen. Nach dieser Analyse blieb nur eine Konformation übrig, die in das Volumen der allosterischen Bindungsstelle eingedockt werden konnte. Ausgehend von diesem Rezeptor-Ligand-Komplex wurde eine Moleküldynamiksimulation im Vakuum unter identischen Bedingungen wie für die Caracurin V-Derivate, Alcuronium und W84 durchgeführt. Die Equilibrierung erforderte wie bei den anderen Simulationen circa 100 ps, danach stellte sich ein energetischer und konformatorischer Gleichgewichtszustand ein. Der Benzolgrundkörper des Gallamins liegt tief in der Bindungstasche und geht dadurch Wechselwirkungen mit aromatischen Aminosäuren ein. Die Seitenketten mit den quartären Stickstoffen bleiben dagegen an der Oberfläche des M₂-Rezeptormodells. Hier befinden sich sowohl in den extrazellulären Loops als auch im N-Terminus hydrophile beziehungsweise negativ geladene Aminosäuren, die mit den positiven Ladungen Wechselwirkungen eingehen können (Abbildung 4-53).

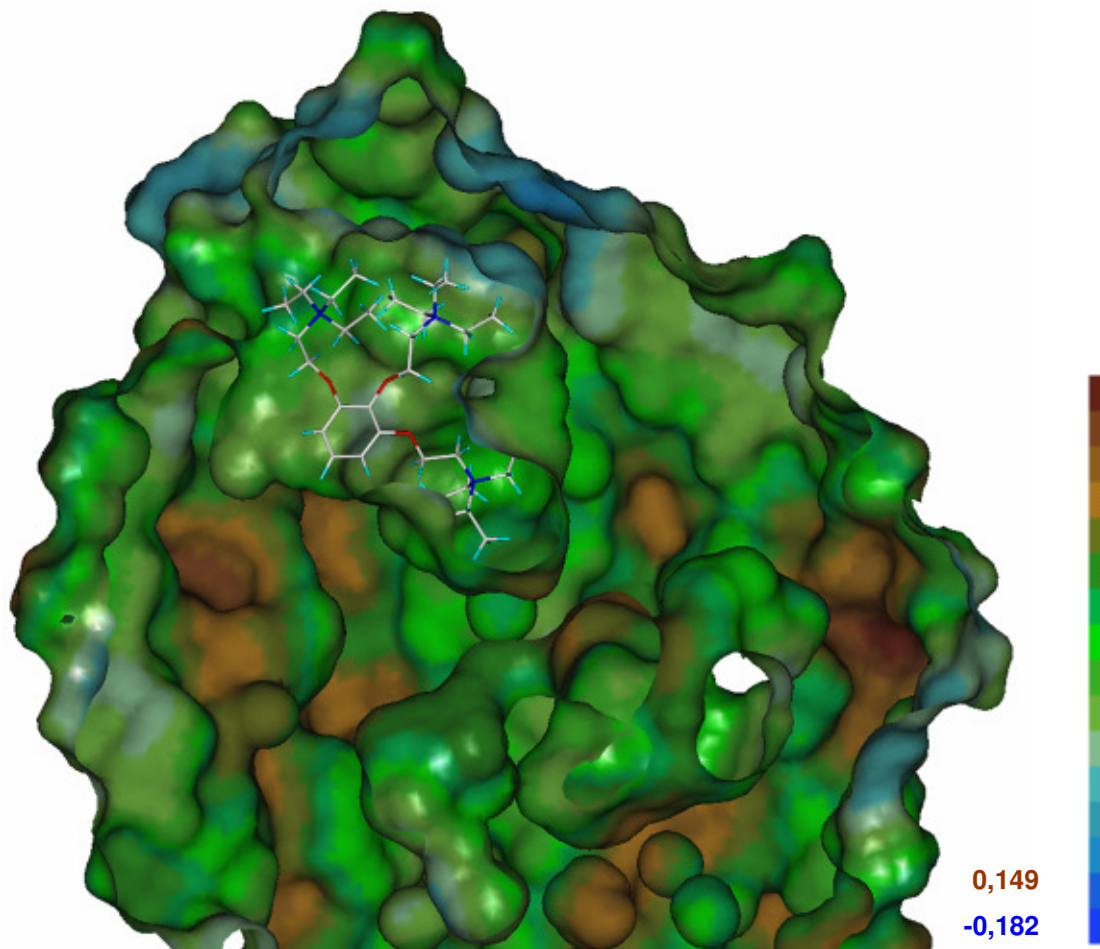


Abbildung 4-53: Lipophiles Potential der allosterischen Bindungstasche mit Gallamin

Die Bindungstasche ist überwiegend hydrophob und damit gut geeignet das hydrophobe Grundgerüst des Gallamins aufzunehmen. Im Bereich der geladenen Kopfgruppen sind hydrophilere Bereiche zu erkennen, die an dieser Stelle ebenfalls günstige Wechselwirkungen erlauben.

Die Projektion von GRID-Feldern des Proteins auf die funktionellen Gruppen des Gallamins war in der gefundenen Position ebenfalls möglich (Abbildung 4-55). Hierbei zeigten sich vor allem im Bereich der Ethersauerstoffe, bei einer Konturierung von $-2,4 \text{ kcal/mol}$, gute Übereinstimmungen. Für den Aromaten, die lipophilen Kettenanteile und die quartären Stickstoffe wurden bei einer Konturierung von $-2,0 \text{ kcal/mol}$ (C3) und $-5,5 \text{ kcal/mol}$ (NM3) ebenfalls günstige Wechselwirkungen identifiziert. Vor allem die Interaktionsmöglichkeiten mit der Trimethylammoniumprobe stimmen mit der berechneten Ladungsverteilung der jeweiligen Seitenketten im Gallamin sehr gut überein.

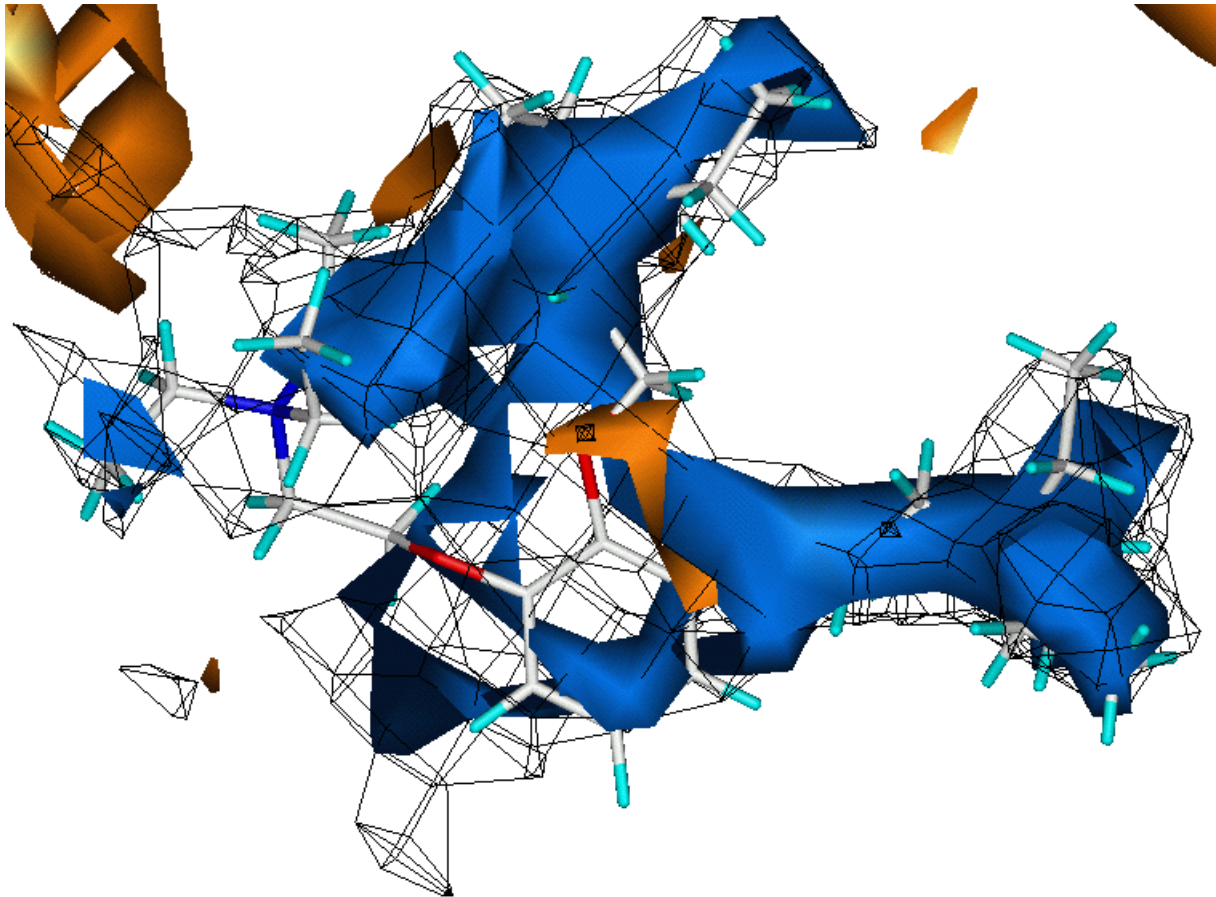


Abbildung 4-55: GRID-Felder abgebildet auf Gallamin

Projektion der Wechselwirkungsfelder der Methyl-, Ether- und Trimethylammoniumprobe des M_2 -Modells auf Gallamin.

Methyl-Probe: schwarzes Gitternetz, Konturierung -2,0 kcal / mol

Ether-Probe: orange Flächen, Konturierung -2,4 kcal / mol

Trimethylammoniumprobe: blaue Flächen, Konturierung -5,5 kcal / mol

4.3.2.5 AF-DX 384

AF-DX 384 besitzt, wie in Kapitel 4.3.1.6 dargestellt, sowohl Affinität zur orthosterischen als auch zur allosterischen Bindungsstelle des muskarinergen M_2 -Rezeptors. Die Affinität zur allosterischen Bindungsstelle ist vergleichbar mit derjenigen von Gallamin. Seine chemischen Eigenschaften entsprechen aber, vor allem aufgrund seiner Größe, eher W84. Die konformatorische Flexibilität ist allerdings wesentlich geringer. Eine energetisch günstige Struktur ließ sich mühelos in die Kavität der allosterischen Bindungstasche eindocken und wurde als Ausgangspunkt für die folgende Moleküldynamiksimulation benutzt. Während der Equilibrierungsphase von circa 100 ps, veränderte sich die Position von AF-DX 384 in der Bindungstasche nur wenig. Der aromatische Trizyklus befindet sich dabei zentral im oberen Bereich des Rezeptors, am Eingang der orthosterischen Bindungstasche. Nach der Bindung des Allosters ist der Zugang zur allosterischen Bindungstasche somit blockiert (Abbildung 4-56).

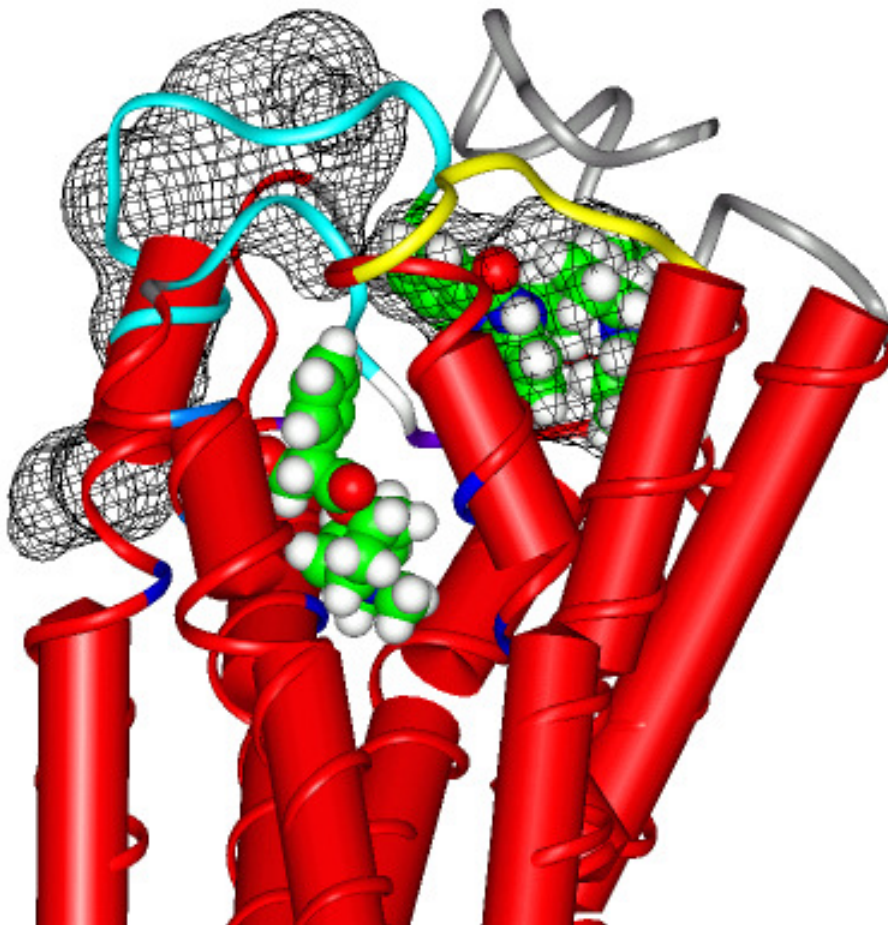


Abbildung 4-56: M_2 -Rezeptormodell mit AF-DX 384 in der allosterischen und NMS in der orthosterischen Bindungsstelle

4.3.2.6 Korrelation der Bindungsaffinitäten der allosterischen Liganden

Die Affinität zum M_2 -Rezeptormodell kann bei den orthosterischen Liganden mit der jeweiligen Wechselwirkungsenergie zwischen Protein und Ligand korreliert werden. Bei den allosterischen Modulatoren der *common allosteric binding-site* scheint eine ähnliche Beziehung vorzuliegen.

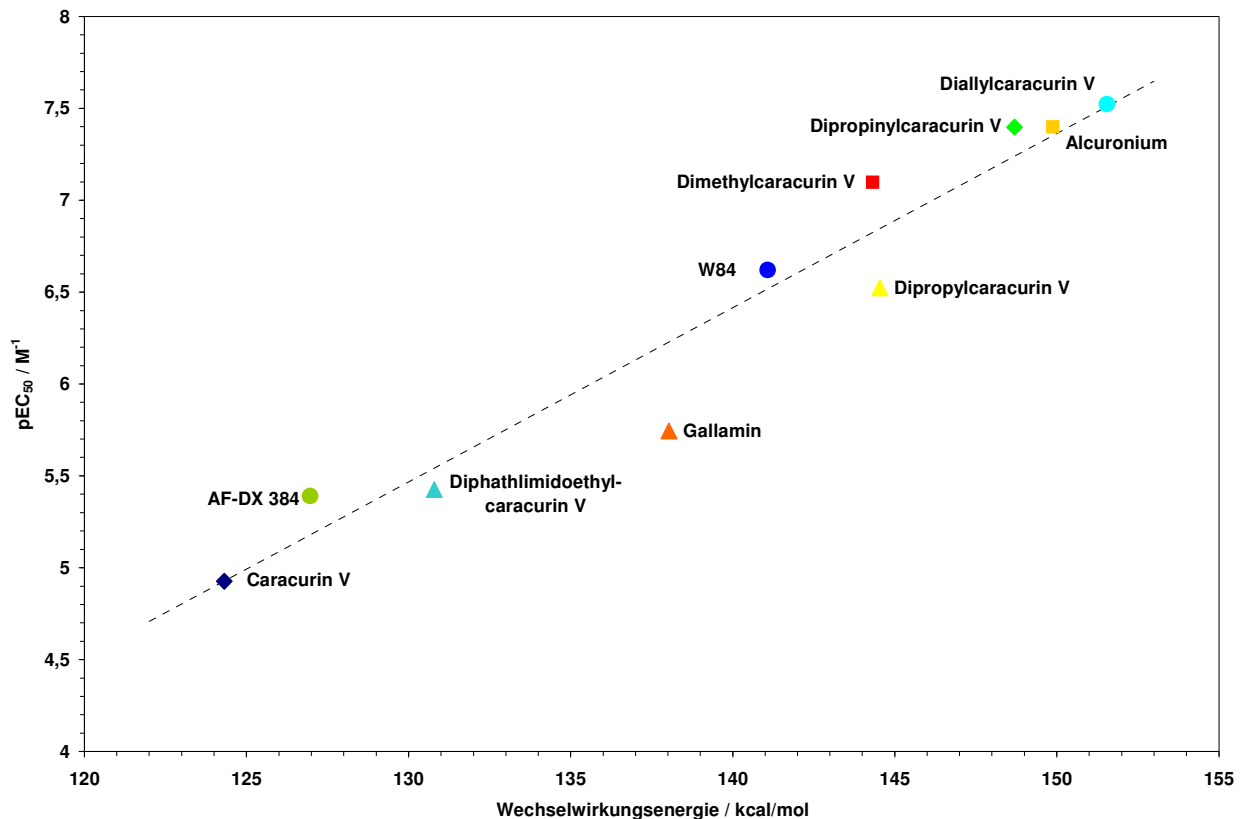


Abbildung 4-57: Korrelation der pEC₅₀-Werte mit der Wechselwirkungsenergie im M₂-Modell

Die pEC₅₀-Werte geben die Affinität der allosterischen Modulatoren zum NMS-besetzten M_2 -Rezeptor wider. Auf der Ordinate sind die durchschnittlichen Beträge der Interaktionsenergie nach der Equilibrierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes aufgetragen. Die gestrichelte Linie ist die Korrelationsgerade zwischen pEC₅₀-Werten und Wechselwirkungsenergie.

Aus den Interaktionsenergien der neun untersuchten Liganden lässt sich zwar die Tendenz erkennen, dass eine Beziehung zwischen der Wechselwirkungsenergie im Modell und der Affinität besteht, um eine definitive Aussage machen zu können ist es aber nötig deutlich mehr Liganden einzubeziehen. Deswegen wurde in Abbildung 4-57 auch auf die Angabe von Korrelationskoeffizienten verzichtet. Der proteinbasierte Ansatz zeigt zwar einen guten Anhaltspunkt zur Beurteilung der Affinität einer Struktur, allerdings wird bei der vorhandenen großen Diversität keine

genaue Überlagerung der Liganden wie bei einer 3D-QSAR-Studie erhalten. Die Position in der allosterischen Bindungstasche ist dafür zu stark vom Molekülgrundgerüst abhängig. Zusätzlich kommt auch noch die Beweglichkeit der Loop-Regionen und des N-Terminus hinzu, die sich an jeden Liganden durch einen *induced fit* individuell anpassen und so die Position des Allosters beeinflussen.

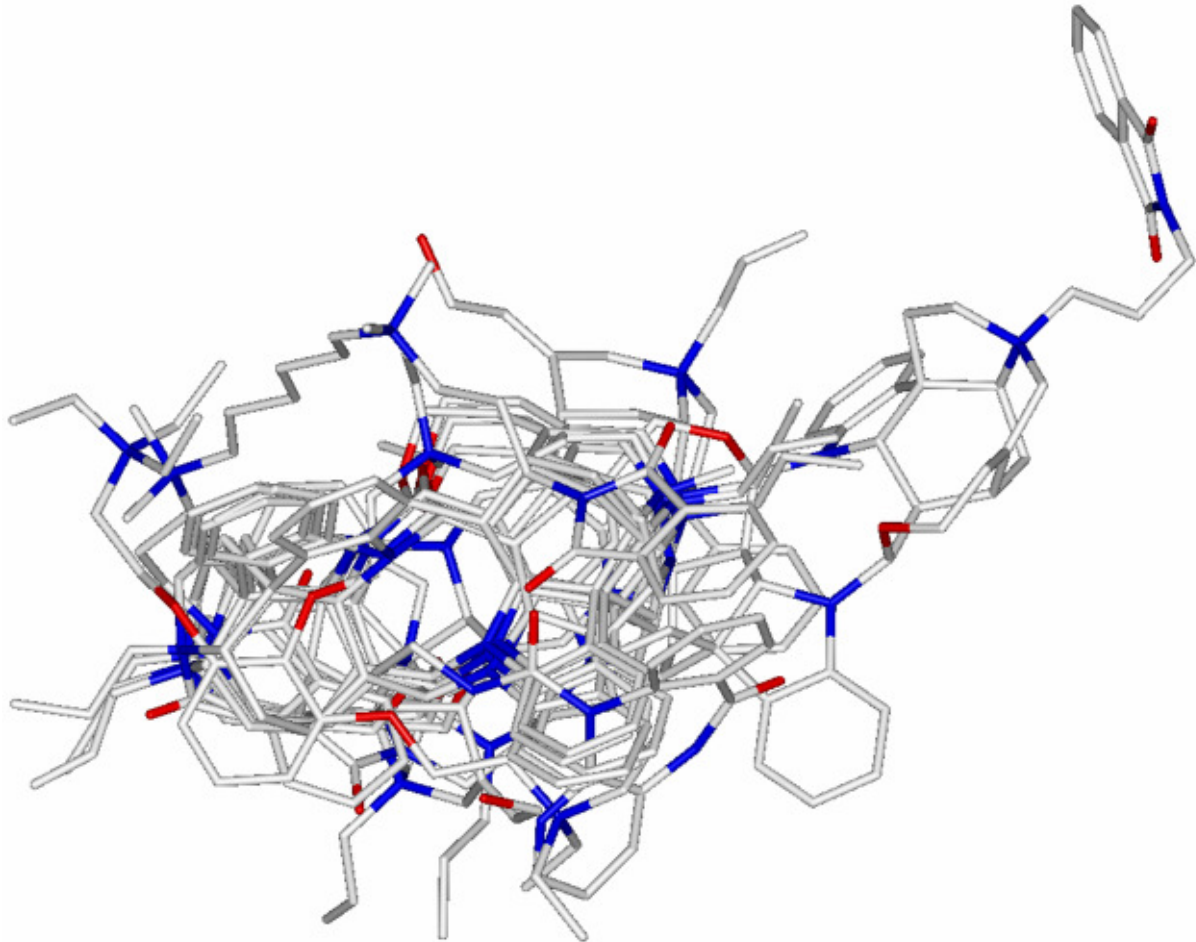


Abbildung 4-58: Proteinbasierte Überlagerung aller 10 untersuchten allosterischen Modulatoren

Die Verteilung der Wasserstoffbrücken-fähigen Funktionen (Sauerstoffe und Stickstoffe) unterliegt einer weiten Streuung. Gemeinsames Merkmal aller Substanzen ist eher der mehr oder weniger ausgeprägte lipophile Bereich, der an zentraler Position in der allosterischen Bindungstasche zu liegen kommt.

4.3.3 AF-DX 384 – W84-Hybride

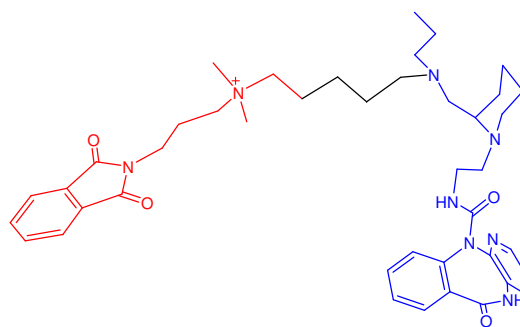
Hybride aus AF-DX 384 und einem „halben“ W84 sollten bei einer entsprechenden Verbindung der Komponenten in der Lage sein, sowohl die orthosterische als auch die allosterische Bindungsstelle zu besetzen. Hierzu wurden zunächst zwei Substanzen im Arbeitskreis Holzgrabe synthetisiert, die Hybride 1 und 2. Die Hybride 3 und 4 stellen Vorschläge aufgrund der theoretischen Erkenntnisse über die Hybride 1 und 2 dar. Die vorgeschlagenen Strukturen wurden zunächst ebenfalls theoretisch untersucht und sollten dann, wenn sich für eine Verbindung eine Vorhersage für die gleichzeitige Besetzung beider Bindungsstellen ergab, anschließend synthetisiert werden.

4.3.3.1 Hybrid 1

Hybrid 1 setzt sich strukturell aus AF-DX 384 und einem W84 zusammen, das um einen quartären Stickstoff und die anhängende Phthalimid-Komponente gekürzt ist (Hybrid 1). Im Experiment zeigt dieses Hybrid aber nicht die gewünschte Verdrängung des *N*-Methylscopolamins aus der orthosterischen Bindungstasche, sondern es verhält sich wie W84.

Im Modell verhält sich Hybrid 1 ebenfalls analog zu W84 und nimmt auch eine ähnliche Position innerhalb der Loopregionen

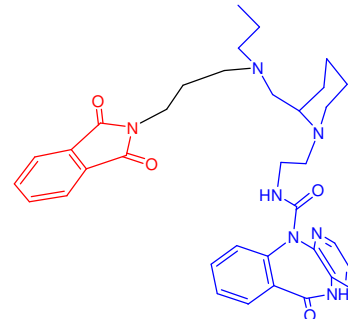
ein. Zum Vergleich wurde Hybrid 1 auch innerhalb der orthosterischen Bindungstasche positioniert. Diese Ausrichtung war aber energetisch deutlich ungünstiger, so dass diese Position, analog zum Experiment, nicht eingenommen wird.



Hybrid 1

4.3.3.2 Hybrid 2

Bei Hybrid 2 handelt es sich um ein AF-DX 384, dessen Seitenkette nur noch um den Phthalimid-Ring aus W84 erweitert worden ist (Hybrid 2). Auch dieses Molekül zeigt keine Verdrängung von *N*-Methylscopolamin aus der orthosterischen Bindungsstelle sondern verhält sich ähnlich wie W84 und lässt sich auch durch dieses aus der allosterischen Bindungstasche verdrängen. In diesem Fall besitzt das Hybrid aber eine positive Kooperativität zu NMS, so dass dessen Bindungsaffinität erhöht wird. Auch in diesem Fall ist die Position zwischen zweitem und drittem extrazellulären Loop im Modell energetisch günstiger als innerhalb der orthosterischen Bindungstasche. Die divergierende Kooperativität konnte im Modell aber nur undeutlich nachvollzogen werden, wobei wahrscheinlich die etwas unterschiedliche Position in der allosterischen Bindungstasche eine Rolle spielt.



Hybrid 2

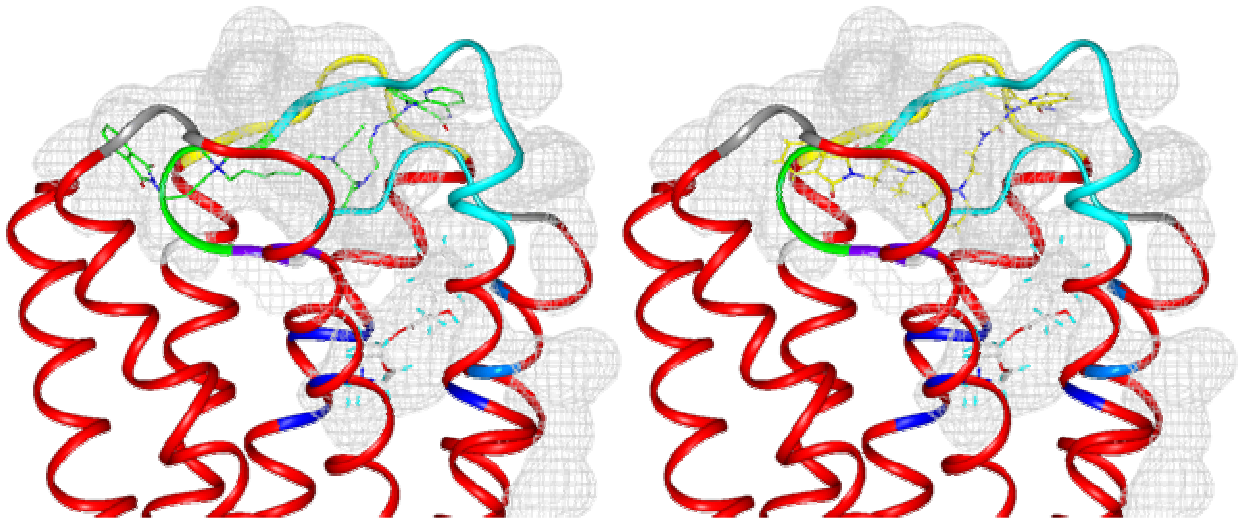


Abbildung 4-59: Hybrid 1 und Hybrid 2 in der allosterischen Bindungstasche

Links: **Hybrid 1**

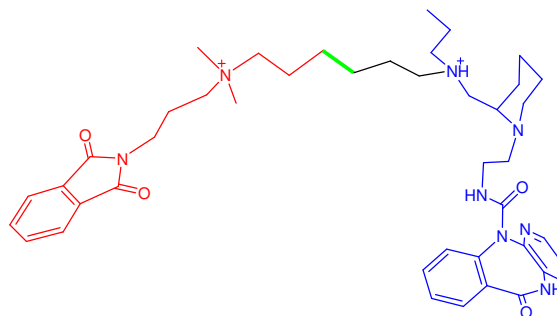
Die Konformation und Orientierung entspricht derjenigen von W84. Der Zugang zur orthosterischen Bindungstasche ist vollständig verschlossen.

Rechts: **Hybrid 2**

Die Konformation von Hybrid 2 ist ähnlich zu der von W84, aufgrund seiner kürzeren Seitenkette ist der Zugang zur orthosterischen Bindungsstelle nicht vollständig verschlossen, so dass eine Förderung der Affinität von NMS zum Rezeptor möglich erscheint.

4.3.3.3 Hybrid 3

Auf Basis von Hybrid 1 sollten weitere Hybride synthetisiert werden, die dann die gewünschte gleichzeitige Besetzung der orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle ermöglichen. Hierzu wurde als erster Vorschlag Hybrid 3 untersucht, das die Möglichkeit dieses Ziel über die Verlängerung des Abstandes zwischen Phthalimidgruppe und AF-DX 384 zu erreichen beinhaltet. Hierzu wurde zwischen dem, unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegenden Stickstoff von AF-DX 384 und dem quartären Stickstoff des W84-Anteils, eine Methylgruppe hinzugefügt (s. Strukturformel).



Hybrid 3

Um eine Unterscheidung zu ermöglichen wurde Hybrid 3 wie die beiden anderen Hybride sowohl in der orthosterischen und allosterischen Bindungstasche als auch im Komplex mit NMS in der orthosterischen Bindungstasche moleküldynamisch untersucht. Der Unterschied der Wechselwirkungsenergie zwischen den Positionen beträgt in diesem Fall über 10 kcal, allerdings zu ungunsten der Besetzung beider Bindungsstellen (Abbildung 4-60).

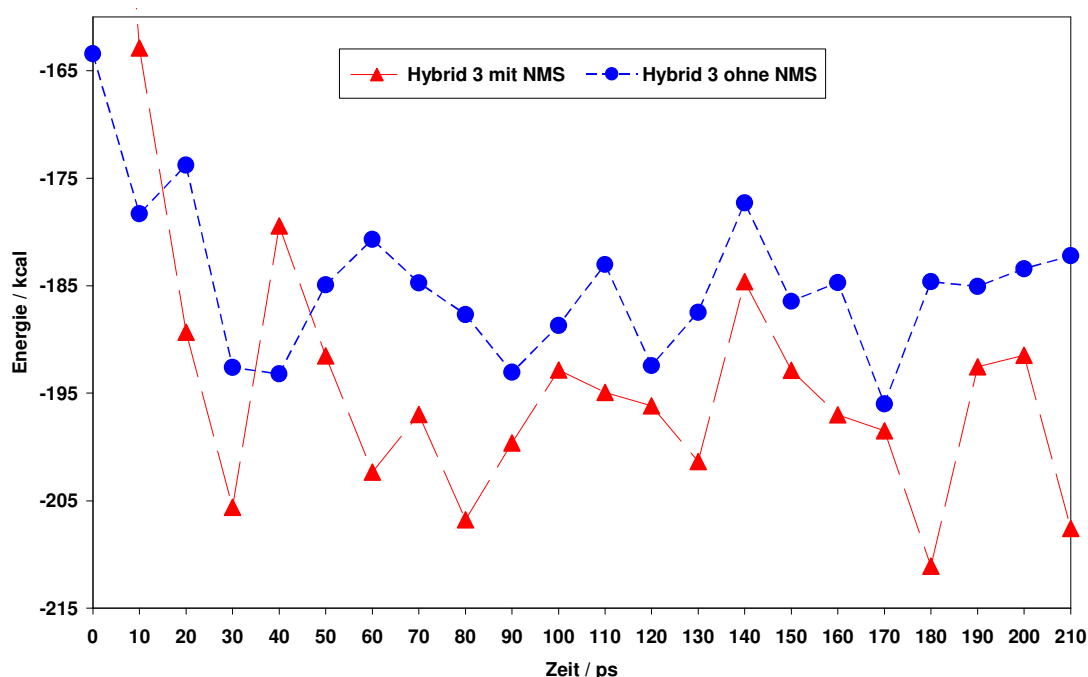
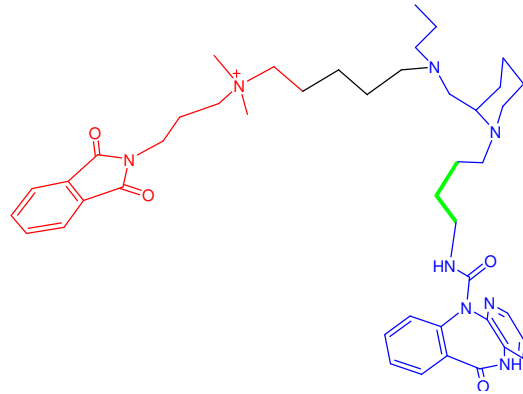


Abbildung 4-60: Wechselwirkungsenergie zwischen Hybrid 3 und dem M₂-Rezeptormodell

Die Wechselwirkungsenergie zwischen Hybrid 3 und dem Protein beträgt bei rein allosterischer Bindung durchschnittlich -196,7 kcal (rot). Findet die Bindung in der orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle statt, so nimmt die Wechselwirkungsenergie um fast 10 kcal auf -185,9 kcal ab (blau).

4.3.3.4 Hybrid 4

Da die Verlängerung des Abstandes zwischen Phtalimid-Gruppe und AF-DX 384 in der theoretischen Untersuchung nicht erfolgreich erschien, wurde eine Veränderung des Abstandes zwischen Trizyklus und Piperidin-Ring überprüft. Die Veränderung erschien Erfolg versprechender, da der W84-Anteil in den vorher berechneten Hybriden die allosterische Bindungstasche nur unvollständig erreicht. Hybrid 4 stellt im engeren Sinne daher kein AF-DX 384-Derivat dar, sondern gehört einer neuen Substanzgruppe an. Die zweidimensionale Struktur von Hybrid 4 mit der veränderten Mittelkette ist rechts dargestellt. Auch in diesem Fall wurden sowohl ein rein allosterischer Bindungsmodus und ein allosterisch-orthosterisch gemischter Bindungsmodus in einer MDS überprüft. Das Ergebnis entspricht der Erwartung, dass in diesem Fall die kombinierte Wechselwirkung mit beiden Bindungstaschen energetisch günstiger ist als die Bindung nur als allosterischer Modulator.



Hybrid 4

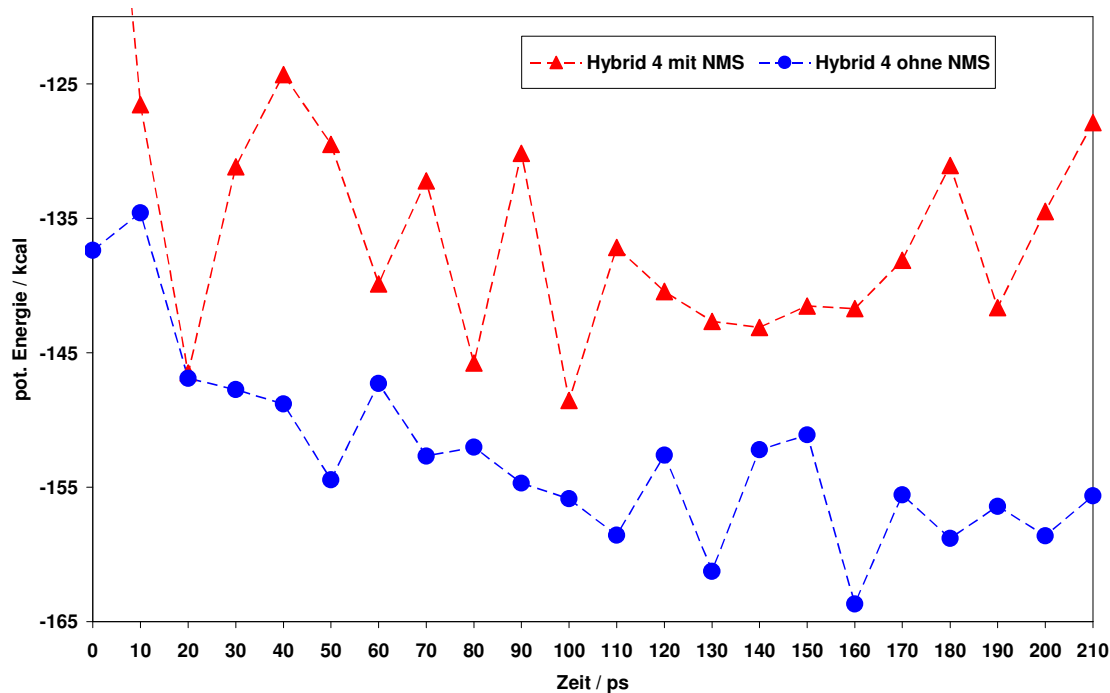


Abbildung 4-61: Wechselwirkungsenergie zwischen Hybrid 4 und dem M₂-Rezeptormodell

Die Wechselwirkungsenergie zwischen Hybrid 4 und dem Protein beträgt bei rein allosterischer Bindung -138,1 kcal (rot). Bei kombinierter allosterischer und orthosterischer Bindung nimmt die Wechselwirkungsenergie um über 18 kcal auf -156,8 kcal zu (blau).

Der Unterschied zwischen kombinierter und allosterischer Bindung ist mit 18,7 kcal zugunsten der kombinierten Bindung sehr deutlich. Hybrid 4 sollte also nach den durchgeführten Berechnungen in der Lage sein sowohl die allosterische als auch die orthosterische Bindungstasche zu besetzen. Die aus der MDS resultierende Konformation ist in Abbildung 4-62 dargestellt.

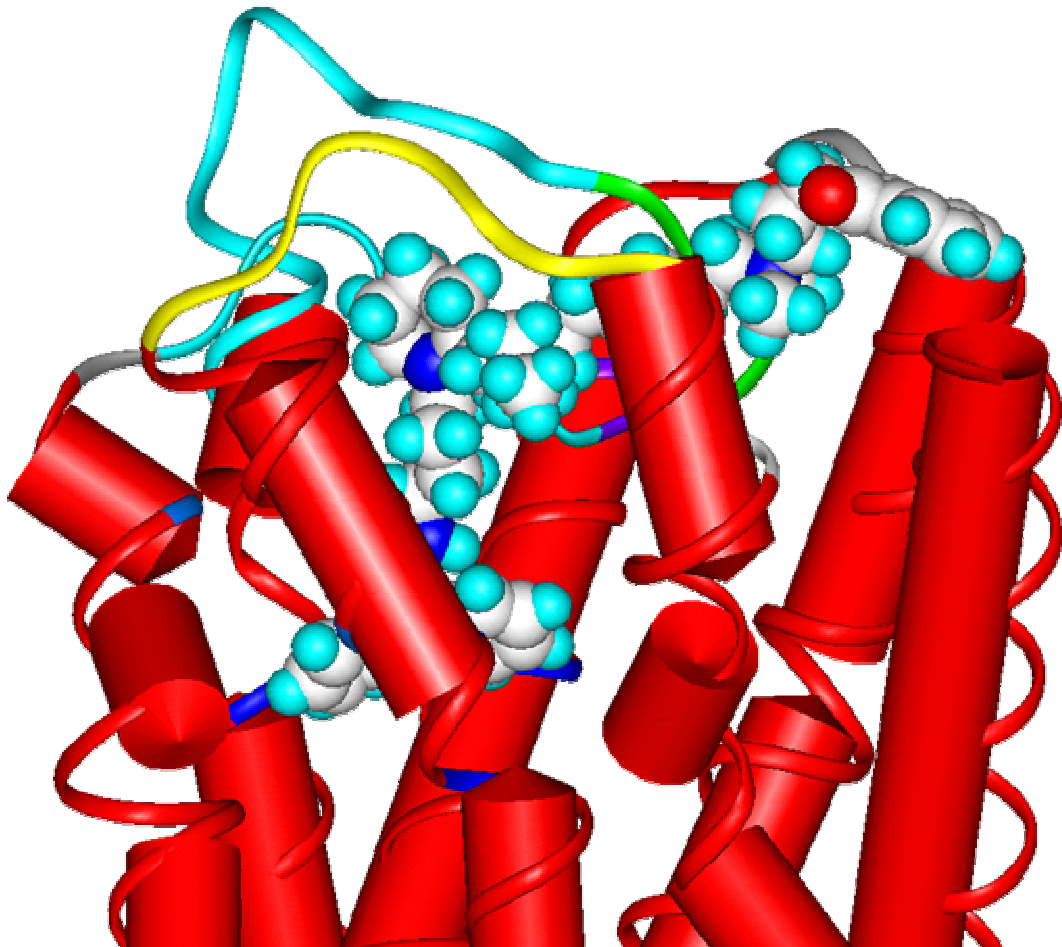


Abbildung 4-62: Bevorzugter Bindungsmodus von Hybrid 4

Der Trizyklus des AF-DX 384-Analogons befindet sich, wie bei der Muttersubstanz, in der orthosterischen Bindungstasche. Die Methylenketten und der Piperidin-Ring stellen dann die Verbindung zur allosterischen Bindungsstelle her, in der sich ein W84-analoges Teilstück befindet.

In dieser Konformation wird der Zugang zur orthosterischen Bindungstasche als zusätzliche ligandbindende Domäne neben den beiden anderen benutzt. Es scheint mit diesem Hybrid möglich zu sein, sowohl die orthosterische Bindungstasche durch den Trizyklus zu besetzen, analog des Bindungsmodus von AF-DX 384, als auch die allosterische Bindungstasche in einer, dem W84-ähnlichen Konformation, zu füllen.

4.4 Mutationsstudien an der allosterischen Bindungsstelle

Eine Identifizierung wichtiger Aminosäuren für die Ligandbindung ist durch Punktmutationen möglich. Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen beziehen sich nicht auf die absolute Affinität der jeweils untersuchten Liganden zum M_2 -Rezeptor, sondern auf die Subtypselektivität beziehungsweise die Subtypprävalenz zwischen dem M_2 -Rezeptor und dem M_5 -Rezeptor. Diese beiden Subtypen der muskarinergen Rezeptoren stellen die am besten (M_2 -Rezeptor) bzw. die am schlechtesten (M_5 -Rezeptor) über einen allosterischen Mechanismus regulierbaren Formen dar. Aus diesem Grund sollten die Selektivitäts-Unterschiede der Punktmutationen hier am deutlichsten ausgeprägt sein. Eine Untersuchung der Bedeutung bestimmter Bereiche im muskarinergen M_2 -Rezeptor wurde anhand von Chimären-Rezeptoren zwischen dem M_2 - und dem M_5 -Subtyp von M. Seidenberg und J. Ellis durchgeführt [159]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden im Arbeitskreis Mohr Punktmutationen durchgeführt und die Veränderung der Bindungskonstanten der allosterischen Modulatoren am *N*-Methylscopolamin besetzten Rezeptor unter jeweils identischen Bedingungen bestimmt. Parallel dazu wurden die Mutationen mit Hilfe des erstellten M_2 -Rezeptormodells nachvollzogen beziehungsweise vorhergesagt. Als Ausgangsstruktur diente jeweils der equilibrierte Rezeptor-Ligand-Komplex, der sowohl *N*-Methylscopolamin als auch den zu untersuchenden allosterischen Modulator enthielt. Die interessierende Aminosäure wurde im Modell zu der korrespondierenden Aminosäure im M_5 -Rezeptor mutiert. Anschließend wurden sowohl das Wildtyp-Rezeptormodell (WT) als auch die Mutante moleküldynamisch untersucht.

Als Liganden wurden Alcuronium, Diallylcaracurin V, Gallamin und W84 zum einen aufgrund der vorhandenen beziehungsweise geplanten Mutageneseuntersuchungen im Arbeitskreis Mohr zum anderen ihrer aufgrund strukturellen Diversität und des Postulates ihrer Bindung in der *common allosteric binding-site* ausgewählt. Die Affinitäten lassen sich mit den berechneten Wechselwirkungsenergien in Einklang bringen, so dass das M_2 -Modell den Bindungsmodus wahrscheinlich gut wiedergibt. Im folgenden Abschnitt wurde nun untersucht, inwieweit es auch in der Lage ist die Subtypselektivität der ausgewählten allosterischen Modulatoren zu erklären.

Die Simulationszeiträume können bei den Vergleichen der virtuellen Mutationen mit dem Wildtyp M_2 -Modell auf 300 ps verkürzt werden, da die in Kapitel 4.3.2 identifizierten ternären Komplexe jeweils den Ausgangspunkt bildeten und sich daher die Equilibrierungsphase stark verkürzt.

4.4.1 Punktmutation von Threonin 423¹⁷ zu Histidin

Die Bedeutung dieser Mutante wurde experimentell im Jahr 2002 von Buller *et al.* [161] in Bezug auf Diallylcaracurin V und das Alkanbisammonium-Derivat W84 beschrieben, nachdem ein chimärer Rezeptor, der hauptsächlich aus einem M_5 -Anteil besteht und nur den dritten extrazellulären Loop und die siebte transmembranäre Helix aus dem M_2 -Rezeptor enthält.

Es handelt sich bei der Punktmutation um eine Position am Beginn der siebten transmembranären Helix. Das Proteinrückgrat ist an dieser Stelle in ein recht starres Sekundärstrukturelement eingebunden, so dass ein Einfluss auf die allosterische Bindungstasche wohl nur durch die Veränderung der Seitenkette verursacht wird und nicht zusätzlich noch Einflüsse des Backbones berücksichtigt werden müssen.

4.4.1.1 Diallylcaracurin V

Diallylcaracurin V zeigt im Verlauf der potentiellen Energie und der *root mean square deviation* eine Equilibrierungsphase, die im Wildtyp und der Histidin-Mutante analog verläuft und sich entsprechend den in Kapitel 4.3.2.1 beschriebenen allosterischen Modulatoren verhält.

Zur Beurteilung des Effektes wurde die Wechselwirkungsenergie zwischen Diallylcaracurin und Threonin 423 beziehungsweise dem entsprechenden Histidin im DeCipher-Modul von INSIGHT II berechnet. Im Wildtyp liegt die durchschnittliche Wechselwirkungsenergie bei -0,67 kcal. Die Histidin-Mutante zeigt dagegen eine positive Wechselwirkungsenergie von 1,2 kcal. Daraus lässt sich ableiten, dass ein Histidin an Position 423 energetisch deutlich ungünstiger ist als ein Threonin.

¹⁷ Die Nummerierungen beziehen sich jeweils auf die Position der Aminosäuren in der M_2 -Rezeptor-Sequenz.

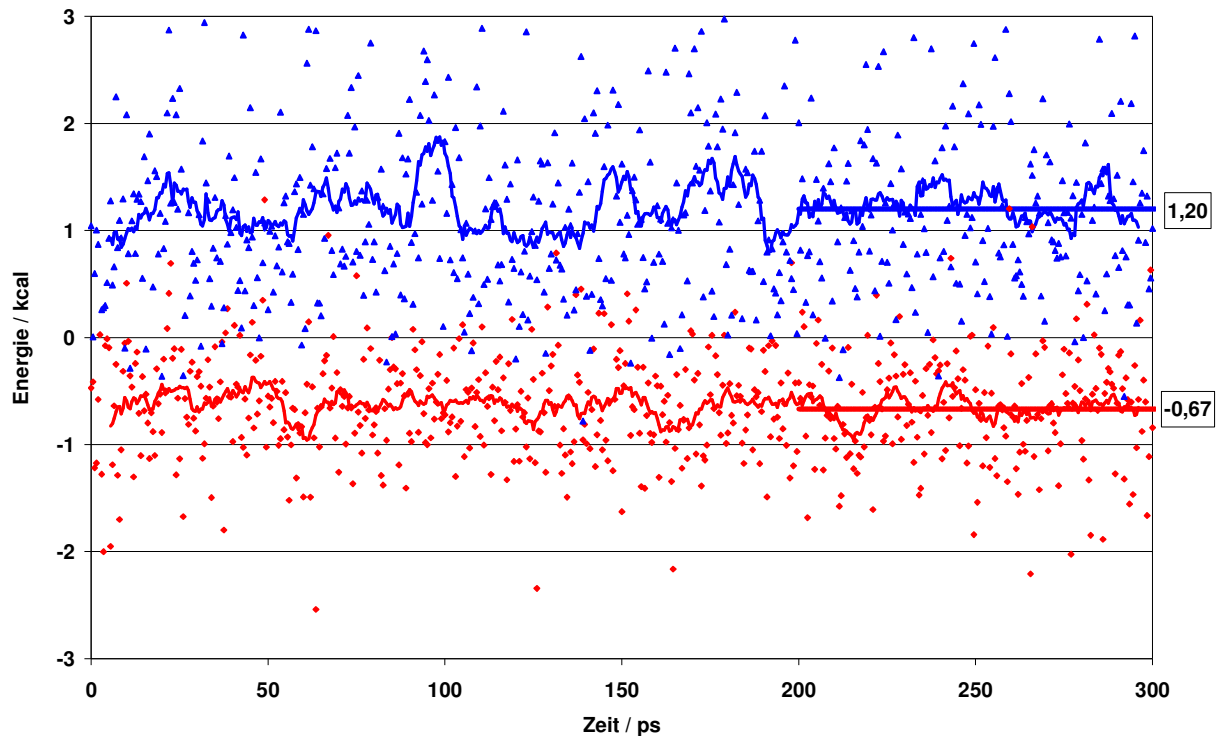


Abbildung 4-63: Wechselwirkungsenergie zwischen Position 423 und Diallylcaracurin

Die mittlere Wechselwirkungsenergie zwischen Threonin 423 (WT) und Diallylcaracurin ist in rot dargestellt. Die Histidin-Mutante zeigt neben einer ungünstigen Wechselwirkungsenergie auch deutlich größere Ausschläge d.h. die Position der Seitenkette ist deutlich beweglicher.

Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit dem experimentellen Befund, dass Diallylcaracurin V zu der M₂⁴²³His-Mutante eine deutlich verminderte Affinität aufweist.

4.4.1.2 W84

Die energetische und strukturelle Equilibrierung verläuft für W84 ähnlich wie bei Diallylcaracurin V und auch den im Weiteren beschriebenen allosterischen Modulatoren. Der Vergleich der Wechselwirkungsenergie über das DeCipher-Modul zeigt für die Histidin-Mutante keinen Verlust der Bindungsenergie wie erwartet, sondern zeigt eher, dass sie günstiger ist als das Threonin an der gleichen Position. In unmittelbarer Nachbarschaft befinden sich allerdings auch zwei, innerhalb der muskarinergen Rezeptoren konservierte, Tryptophane (422, 427). Ein Phthalimid-Ring von W84 befindet sich im Wildtyp-Komplex in einer günstigen Position für π - π -Wechselwirkungen (Abbildung 4-64).

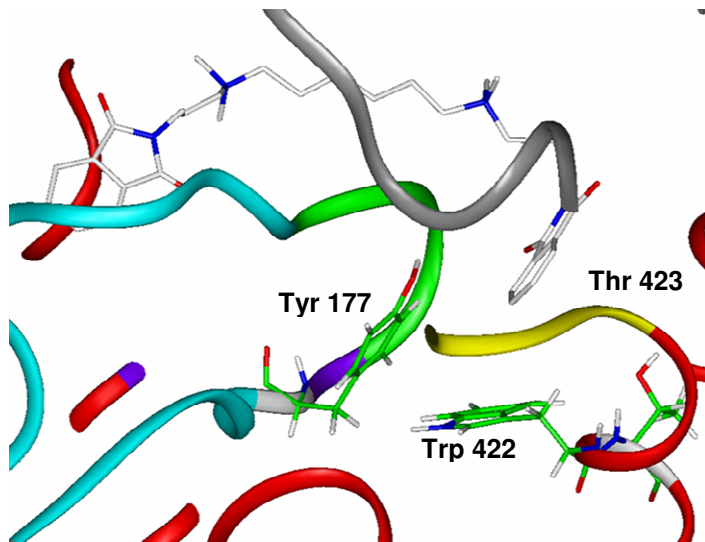


Abbildung 4-64:
**Position von W84 im M₂-
Wildtyp-Rezeptor**

Zwischen einer Phthalimidgruppe und Tryptophan 422 sowie Tyrosin 177 sind aromatische Wechselwirkungen möglich. Bei Mutation des Threonins zu Histidin, wird Tryptophan 422 aus seiner Position verdrängt.

In der Histidin-Mutante ist eine solche Wechselwirkung nicht mehr möglich, da Tryptophan 422 nun senkrecht zum Phthalimid-Ring steht.

Diese fehlende Interaktion zeigt sich auch in der Wechselwirkungsenergie zwischen Tryptophan 422 und W84 (Abbildung 4-65).

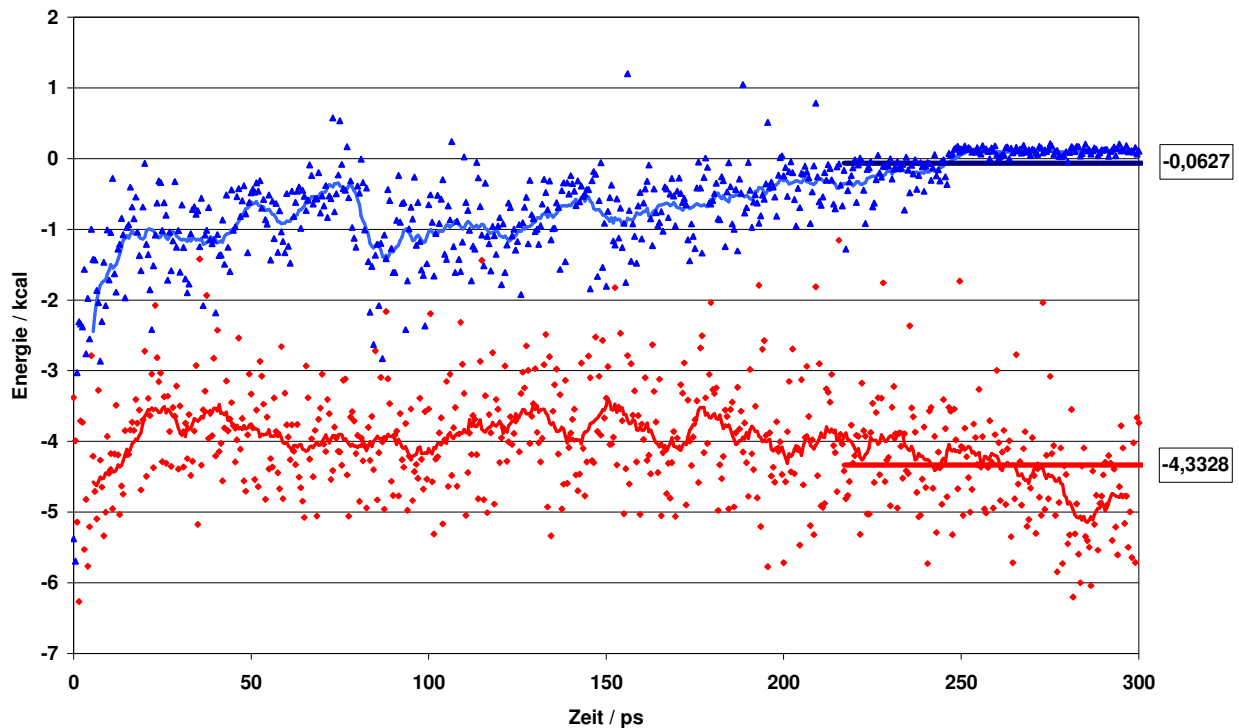


Abbildung 4-65: Wechselwirkungsenergie zwischen Tryptophan 422 und W84

Die Mutation von Threonin 423 in ein Histidin wirkt sich auf Tryptophan mit einem Energieunterschied von 4,5 kcal aus. Der Wildtyp ist rot dargestellt, der Energieverlauf der Histidin-Mutante in blau.

4.4.1.3 Alcuronium

Die Untersuchung der Bedeutung der Histidin-Mutante für die Prävalenz von Alcuronium zum M₂-Rezeptor stellt eine Vorhersage dar. Sie erfolgte aus dem Vergleich der Wechselwirkungsenergien an Position 423 im Wildtyp-M₂-Rezeptormodell und dem mutierten Proteinmodell. Hier ist der Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante nur minimal (Abbildung 4-66).

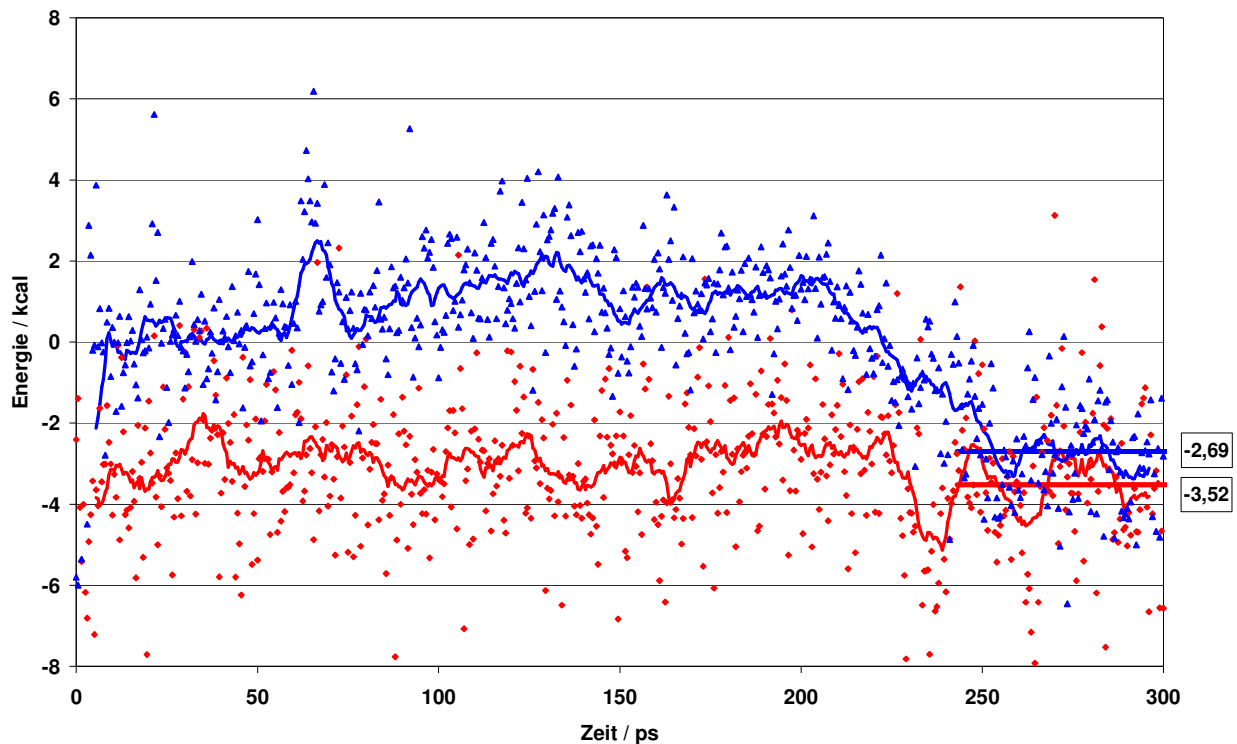


Abbildung 4-66: Wechselwirkungsenergie zwischen Alcuronium und Position 423

Die Wechselwirkungsenergie des Wildtyps (rot) unterscheidet sich nur um 0,7 kcal von derjenigen der ⁴²³His-Mutante, so dass hier kein signifikanter Unterschied vorliegt.

Als Vergleich wurde auch das strukturell verwandte Diallylcaracurin V herangezogen, bei dem Threonin 423 eine recht große Bedeutung besitzt. Für Alcuronium ist die Bedeutung dieser Mutation als wesentlich geringer anzusehen, wobei ein Affinitätsverlust dennoch möglich ist, da sich die Position von Tryptophan 422, ähnlich wie auch für W84 beobachtet, zwischen Wildtyp und Mutante unterscheidet. Werden die einzelnen Wechselwirkungen verglichen, so fallen diejenigen zwischen Alcuronium und Tryptophan 422 deutlich geringer aus als die zwischen W84 und dieser Aminosäure, so dass auch dieser Effekt nicht zu einem so ausgeprägten Affinitätsverlust führen sollte wie er bei W84 beobachtet wurde.

Das Ergebnis dieser Vorhersage stimmt mit den Ergebnissen der Bindungsstudien aus dem Arbeitskreis Mohr überein¹⁸.

4.4.1.4 Gallamin

Für Gallamin existieren Befunde von A.L. Gnagney, M. Seidenberg und J. Ellis [82], die Asparagin 419 für die Affinitätsunterschiede zwischen M₂- und M₅-Subtyp als wichtiges Epitop identifizieren. Da Gallamin, wie alle in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Allosteren, die *common allosteric binding-site* benutzt, wurde auch hier die Bedeutung der Seitenketten-Veränderung von Threonin zu Histidin untersucht. Der Betrag der Veränderung der Wechselwirkungsenergie zwischen Gallamin und Threonin / Histidin an Position 423 beträgt circa 1,8 kcal. Das Threonin scheint also eine Bedeutung für die Affinität zu besitzen, auch in diesem Fall verändert sich die Interaktionsenergie von einem Wert nahe 0 kcal hin zu einem ungünstigen Wert von fast 2 kcal.

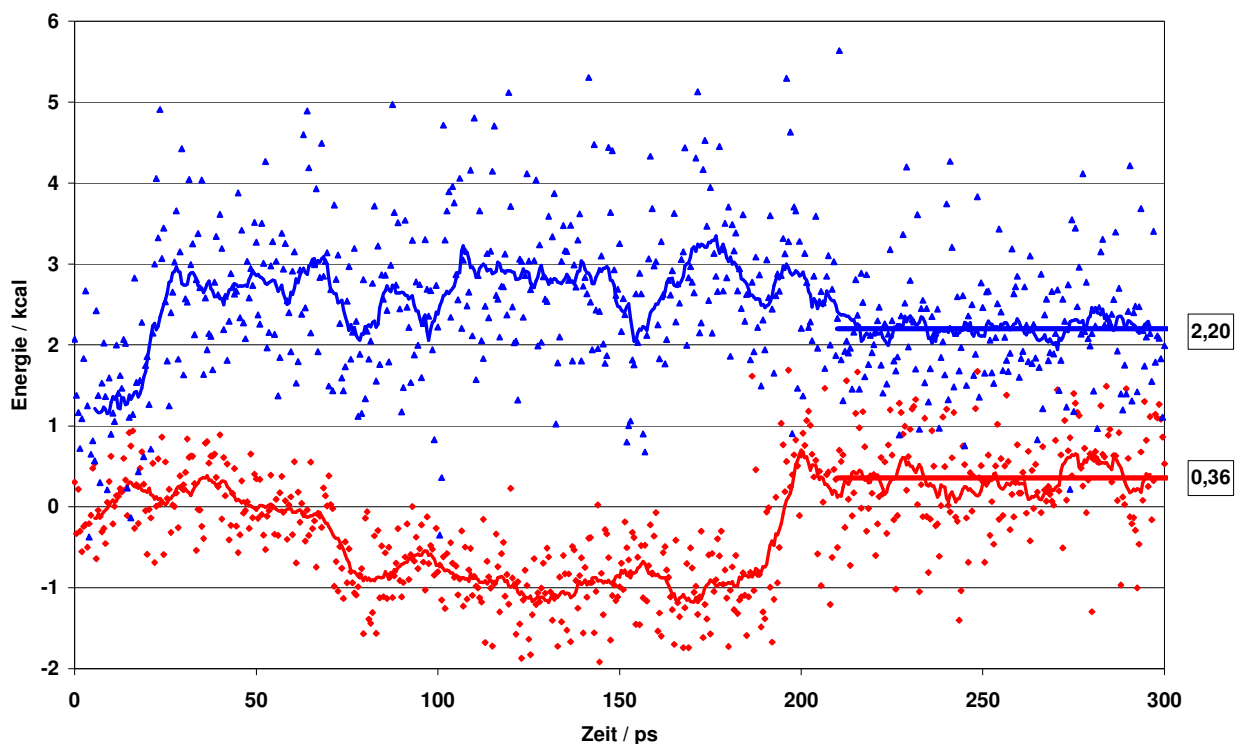


Abbildung 4-67: Wechselwirkungsenergie zwischen Position 423 und Gallamin

¹⁸ Stefanie Prilla, persönliche Mitteilung.

Die Bedeutung dieser Mutation kann auch einfach darin begründet liegen, dass eine Seitenkette ohne oder mit nur geringem Einfluss auf die Selektivität zu einer Seitenkette mit ungünstigem Einfluss auf die M_2 -Prävalenz mutiert wird. Auf ein solches Ergebnis deuten auch die experimentellen Daten aus dem Arbeitskreis Ellis hin.

Es wurde hier zwar eine Affinitätsabnahme an der M_2 -Rezeptormutante gezeigt, die Rückmutation d.h. der Austausch des Histidins im M_5 -Rezeptor durch Threonin zeigte aber nicht vollständig den erwarteten Affinitätsgewinn. Die Komplexgeometrie spiegelt diese Aussage insofern wieder, als sich die Position des Gallamins in der allosterischen Bindungsstelle durch die Mutation verändert. Hiervon sind die Kontakte zu Asparagin 419 aber nicht betroffen, die elektrostatischen Wechselwirkungen bleiben zwischen einer „Seitenkette“ und der Amidfunktion bleiben erhalten (Abbildung 4-68).



Abbildung 4-68: Position von Gallamin im Wildtyp und in der ⁴²³Histidin-Mutante

Das Proteinrückgrat und die ⁴²³His-Mutante besitzen ein fast identisches Proteinrückgrat. Um einen besseren Eindruck von den Unterschieden in der Position des Gallamins zu erhalten wurde das Gallamin, das eine ähnliche Konformation einnimmt, überlagert. Die Proteine zeigen in diesem Fall eine um fast 30° veränderte Ausrichtung.

4.4.2 Punktmutation von Tyrosin 177 zu Glutamin

Tyrosin 177 befindet sich fast mittig im zweiten extrazellulären Loop, unmittelbar benachbart zur Disulfid-Brücke zwischen Cystein 176 (E2) und Cystein 96 (TM III). Diese Position lässt für die Variation der Backbone-Koordinaten des Tyrosins einen deutlich geringeren Spielraum als für andere Positionen in den extrazellulären Schleifen. Die Untersuchung des Effektes einer Mutation in diesem Bereich sollte also auch vor allem von der Seitenkettenkonformation der jeweiligen Aminosäure abhängen, so dass eine Vorgehensweise analog der bei der Histidin-Mutation in der siebten transmembranären Helix möglich ist.

4.4.2.1 Diallylcaracurin V

Durch die Mutation von Threonin 423 zu Histidin wurde die Affinität von Diallylcaracurin V zu der M₂-Rezeptormutante im Experiment auf ein Niveau zwischen M₂ und M₅ abgesenkt. Aus Studien mit M₂/M₅-Chimären war bekannt, dass eine oder mehrere Aminosäuren im zweiten extrazellulären Loop eine Rolle für die Affinität beziehungsweise Selektivität spielen [159]. Die Bedeutung von Tyrosin 177 für die Bindung ist anhand der berechneten Wechselwirkungsenergien sehr deutlich zu erkennen (Abbildung 4-69).

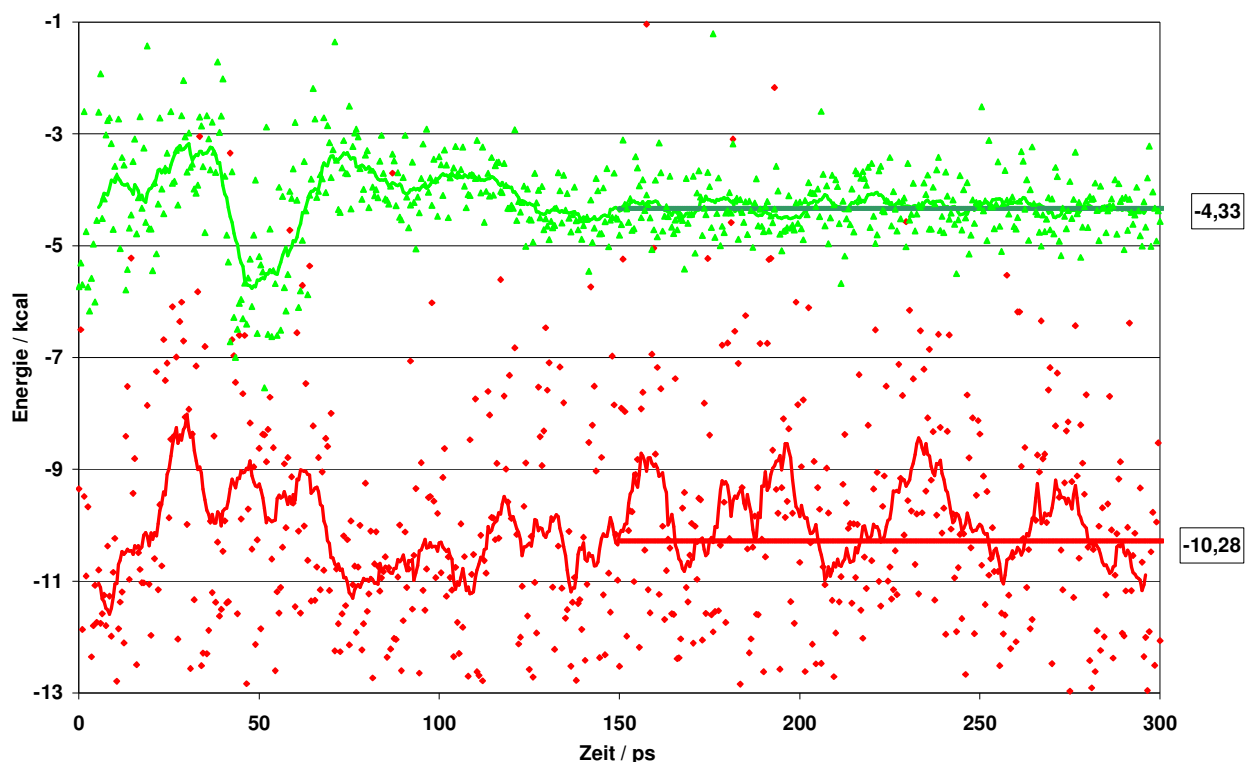


Abbildung 4-69: Wechselwirkungsenergie zwischen Position 177 und Diallylcaracurin V

Die ¹⁷⁷Gln-Mutante (blau) weist mit -2 kcal eine wesentlich geringere Wechselwirkungsenergie auf als der WT (rot) mit -10 kcal.

Die drastische Verminderung der Wechselwirkungsenergie spiegelt sich auch in der Komplex-Geometrie wieder. Im Fall eines Tyrosins in Position 177 richtet sich dieses im Lauf der Moleküldynamiksimulation so aus, dass π - π -Wechselwirkungen zwischen einem Aromaten des Diallylcaracurin V und Tyrosin 177 möglich sind. Zusätzlich werden auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der phenolischen Funktion des Tyrosins und einem Indolin-Stickstoff beobachtet (Abbildung 4-70).

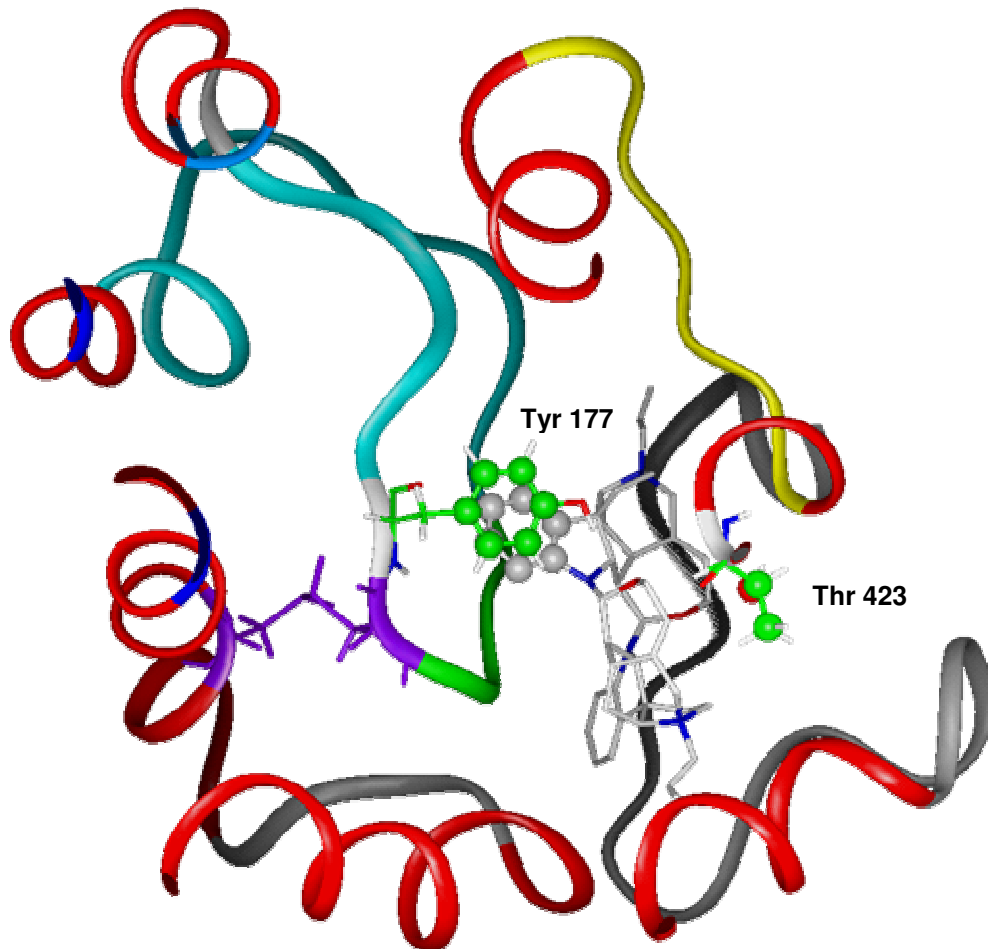


Abbildung 4-70: Blick aus der orthosterischen in die allosterische Bindungstasche im Wildtyp M₂-Rezeptormodell

Tyrosin 177 bildet mit einer Indolstruktur des Diallylcaracurin V π - π -Wechselwirkungen aus.

Bei Mutation des Tyrosins zu Glutamin kann die π - π -Wechselwirkung nicht mehr stattfinden und die Seitenkette nimmt als Folge davon eine Ausrichtung in die entgegengesetzte Position ein (Abbildung 4-71).

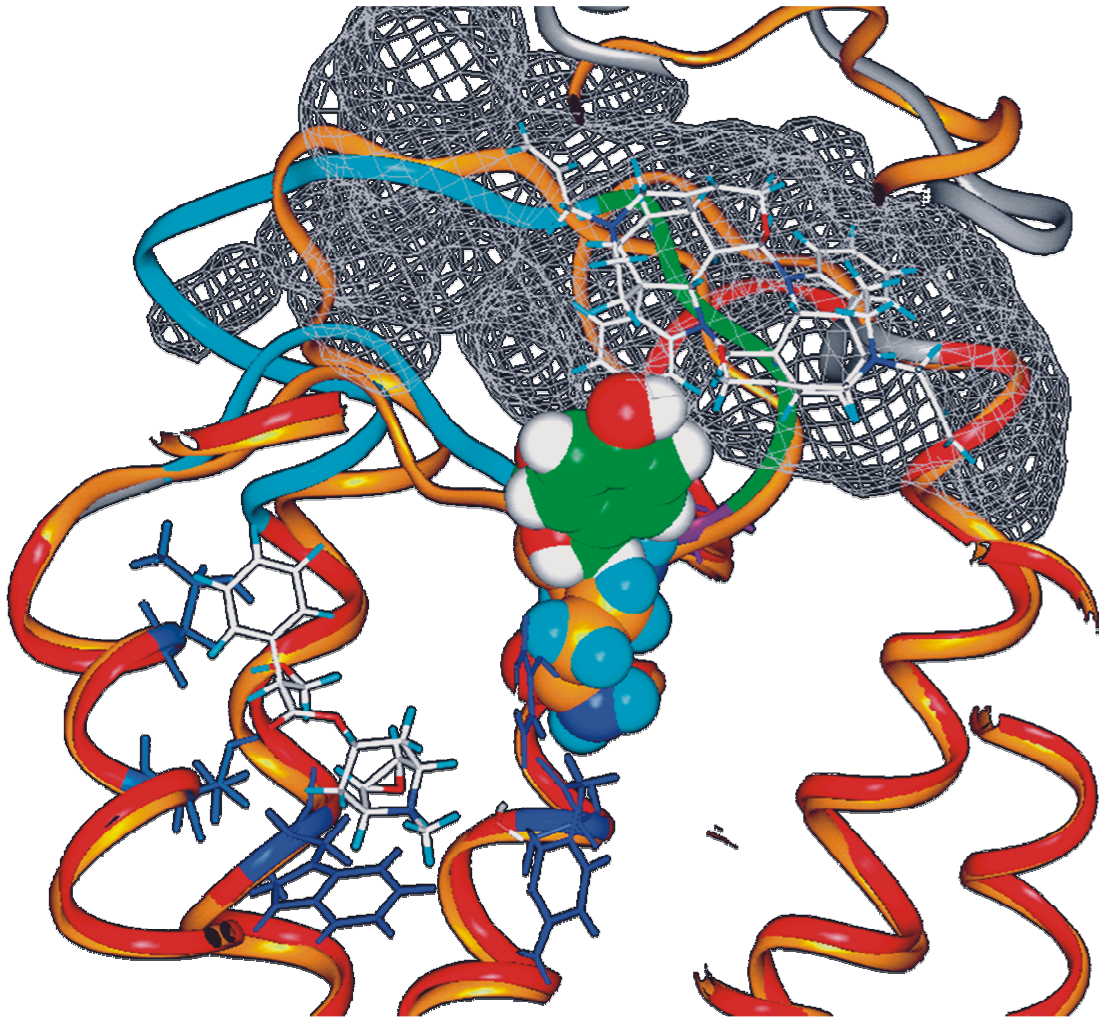


Abbildung 4-71: Unterschiedliche Ausrichtung der Seitenketten von Tyrosin 177 und Glutamin 177.

Der Phenylrest von Tyrosin 177 (grüne C-Atome) geht π - π -Wechselwirkungen mit Diallylcaracurin V ein, wozu Glutamin 177 (C-Atome orange) nicht in der Lage ist. Die Proteinkonformation der Rezeptoren ist in beiden Fällen vergleichbar, ebenso wie Position von NMS und CARALL.

Das Proteinrückgrat unterscheidet sich im Bereich der Helices kaum. Die Struktur der Loop-Regionen weist dagegen Unterschiede auf, die sich während der Moleküldynamiksimulation im Sinne eines *induced fit*¹⁹ ergeben.

¹⁹ Das Protein und Ligand passen sich im Lauf der MDS strukturell an, so dass eine bessere Passform (*fit*) zwischen den Molekülen, durch den Liganden induziert, erhalten wird.

Zur weiteren Überprüfung der postulierten π - π -Wechselwirkungen wurde auch eine Mutation des Tyrosins zu Phenylalanin durchgeführt. Dies entspricht von seinen aromatischen Eigenschaften her annähernd dem Tyrosin. Das Ergebnis zeigt zwar eine Verminderung der Wechselwirkungsenergie um etwa 2 kcal gegenüber dem M₂-Wildtyp, sie liegt aber dennoch fast auf M₂-Niveau. Der M₄-Rezeptor stellt nach dem M₂-Rezeptor den Subtyp dar, der am besten durch die oben beschriebenen Allosterie moduliert werden kann. Nur im M₄-Subtyp befindet sich an der, dem Tyrosin 177 in M₂ analogen Position, ein Phenylalanin, so dass diese Mutation vielleicht einen Erklärungsansatz bietet für die günstigeren Eigenschaften bezüglich der allosterischen Modulation.

4.4.2.2 W84

Im Fall von W84 findet sich im Experiment ein analoges Verhalten der Affinität zu Wildtyp und Mutante wie bei Diallylcaracurin V. In der Moleküldynamiksimulation sind die Unterschiede zwar vorhanden aber aufgrund der geringeren Wechselwirkungsenergie energetisch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei Diallylcaracurin V.

Ein möglicher Grund für das weniger deutliche Ergebnis ist neben der größeren Flexibilität von W84 auch die um eine Zehnerpotenz geringere Affinität zum M₂-Rezeptor gegenüber Diallylcaracurin V, bei gleicher Affinität zum M₅-Subtyp. Die Unterschiede bei visueller Inspektion der Komplexe sind aber ähnlich ausgeprägt wie für Diallylcaracurin V, so dass die energetischen Unterschiede auf den Einfluss der Punktmutation zurückzuführen sind. In Abbildung 4-72 ist die Überlagerung der Komplexe zwischen Wildtyp und Glutamin-Mutante dargestellt. Hierbei ergeben sich im Bereich des Proteinrückgrats der transmembranären Helices nur geringe Unterschiede, die Ausrichtung der Tyrosin- beziehungsweise Glutaminseitenkette an Position 177 ist dagegen verschieden.

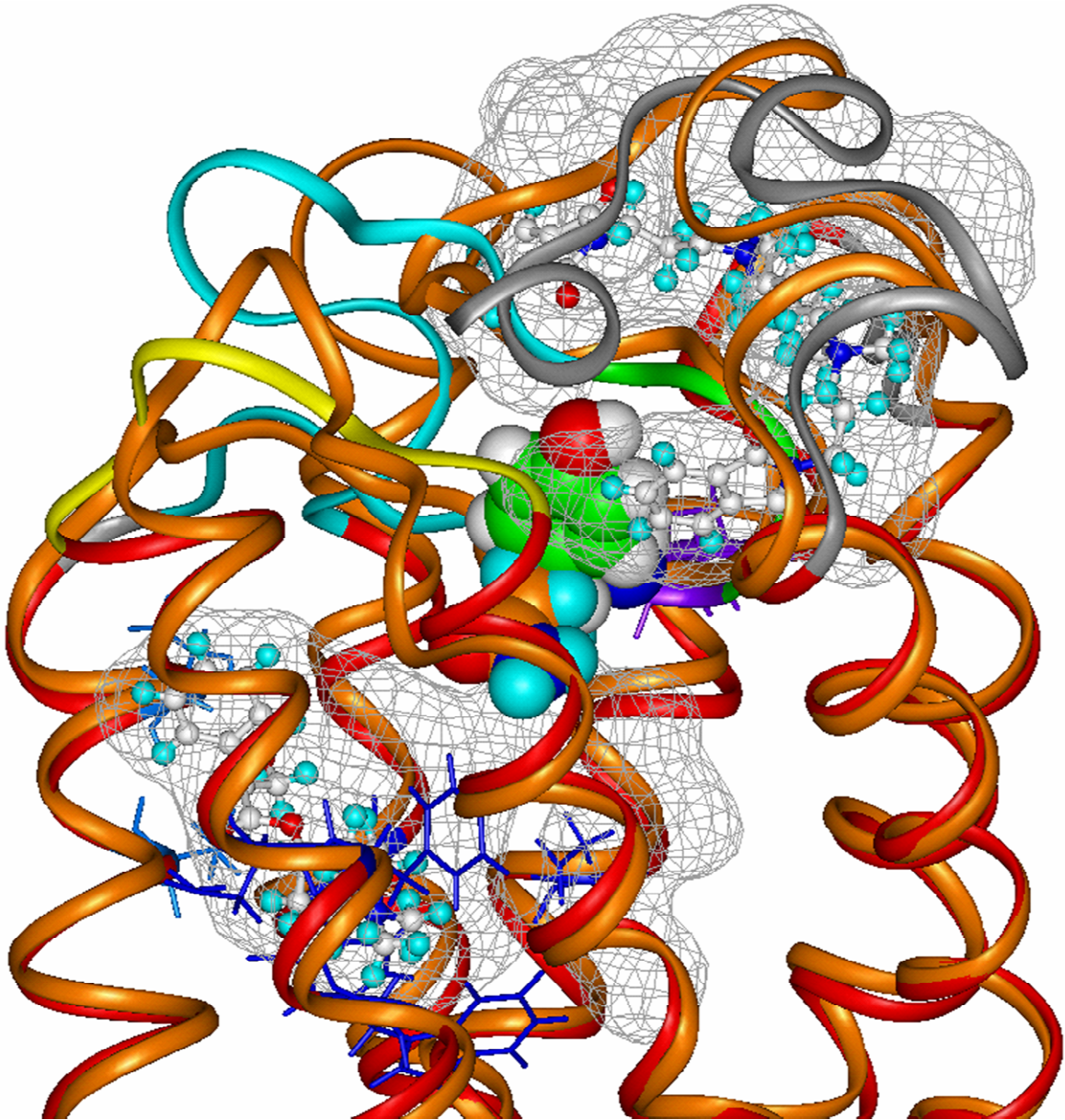


Abbildung 4-72: Unterschiedliche Ausrichtung der Seitenketten von Tyrosin und Glutamin an Position 177

Das Proteinrückgrat unterscheidet sich innerhalb der helikalen Bereiche nur wenig, genauso die Position von NMS innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle. Das Glutamin an Position 177 nimmt eine ähnliche Konformation ein wie im Fall des Diallylcaracurin V (Abbildung 4-71), weil die aromatischen Wechselwirkungen zu W84 fehlen.

4.4.2.3 Alcuronium

Die Punktmutation im Bereich von Helix VII zeigte im Modell kaum eine Auswirkung auf die Affinität von Alcuronium zu dieser M_2 -Rezeptormutante. Im Unterschied dazu ist der Einfluss der 177 Glutamin sehr deutlich ausgeprägt (Abbildung 4-73).

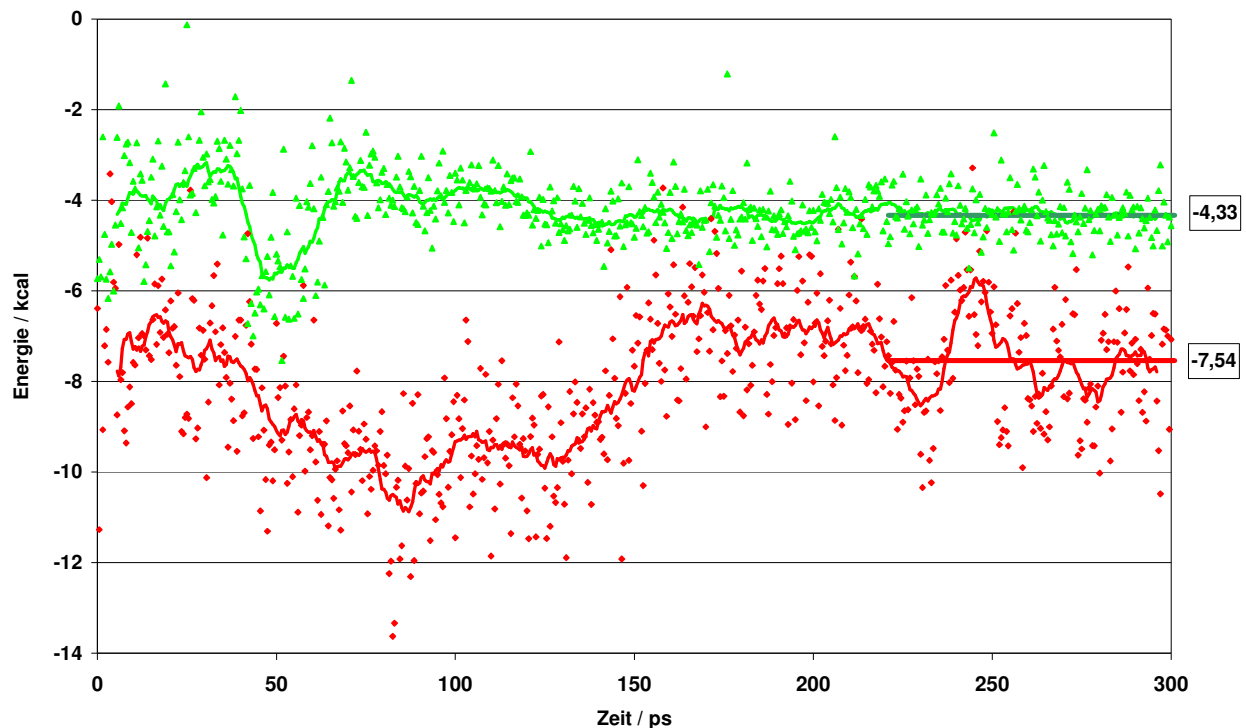
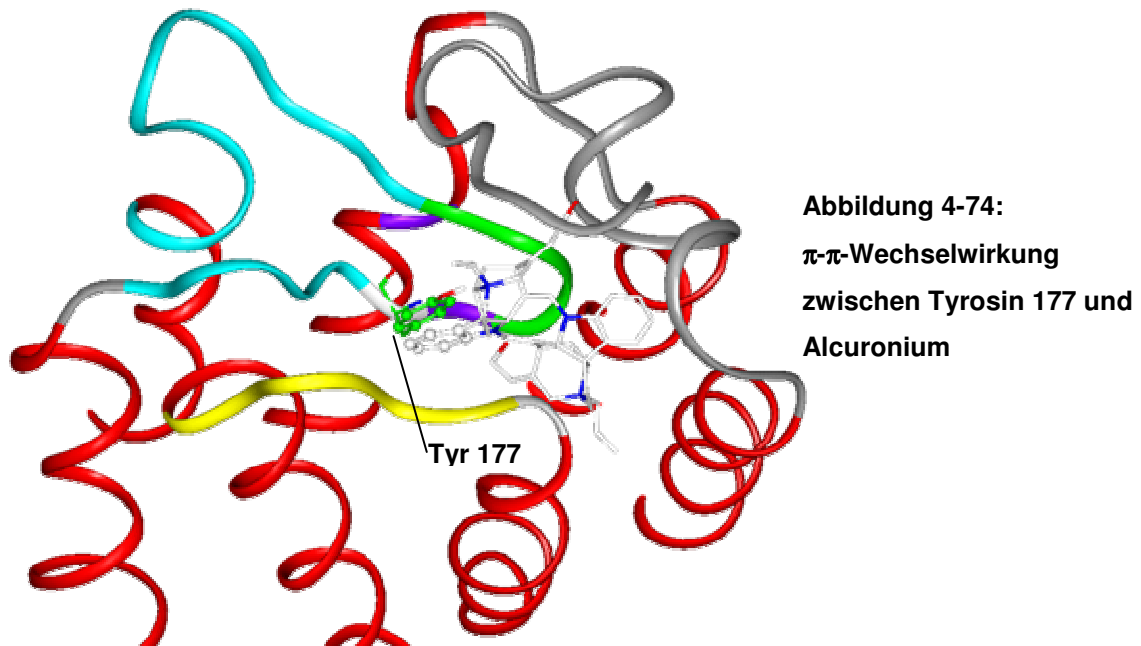


Abbildung 4-73: Wechselwirkungsenergie zwischen Position 177 und Alcuronium

Wildtyp: rot, Glutamin-Mutante: grün

Zurückzuführen ist dieses Ergebnis auf aromatische Wechselwirkungen zwischen einem Aromaten des Alcuroniums und Tyrosin 177. Alcuronium zeigt an chimären M_2/M_5 -Rezeptoren ebenfalls nur eine Veränderung der Affinität im Bereich des zweiten extrazellulären Loops, während die Überführung der M_2 -Sequenz in die analoge M_5 -Sequenz in anderen Bereichen kaum eine Veränderung der Affinität bewirkt [159]. Die Wechselwirkung zwischen Alcuronium und Tyrosin 177 beruht, laut Modell, wie bei Dialylcaracurin V auf einer π - π -Wechselwirkung zwischen den aromatischen Systemen (Abbildung 4-74).



4.4.2.4 Gallamin

Für Gallamin wurde im M_2 -Rezeptormodell eine Position identifiziert, bei der der zentrale Phenylring tief in die allosterische Bindungstasche eintaucht. In diesem Bereich befindet sich auch Tyrosin 177, so dass hier günstige Wechselwirkungen vorhanden sind. Die Mutation des Tyrosins zu Glutamin führt in diesem Fall zu einem deutlich sichtbaren Affinitätsverlust (5,5 kcal) zu der ¹⁷⁷Gln-Mutante.

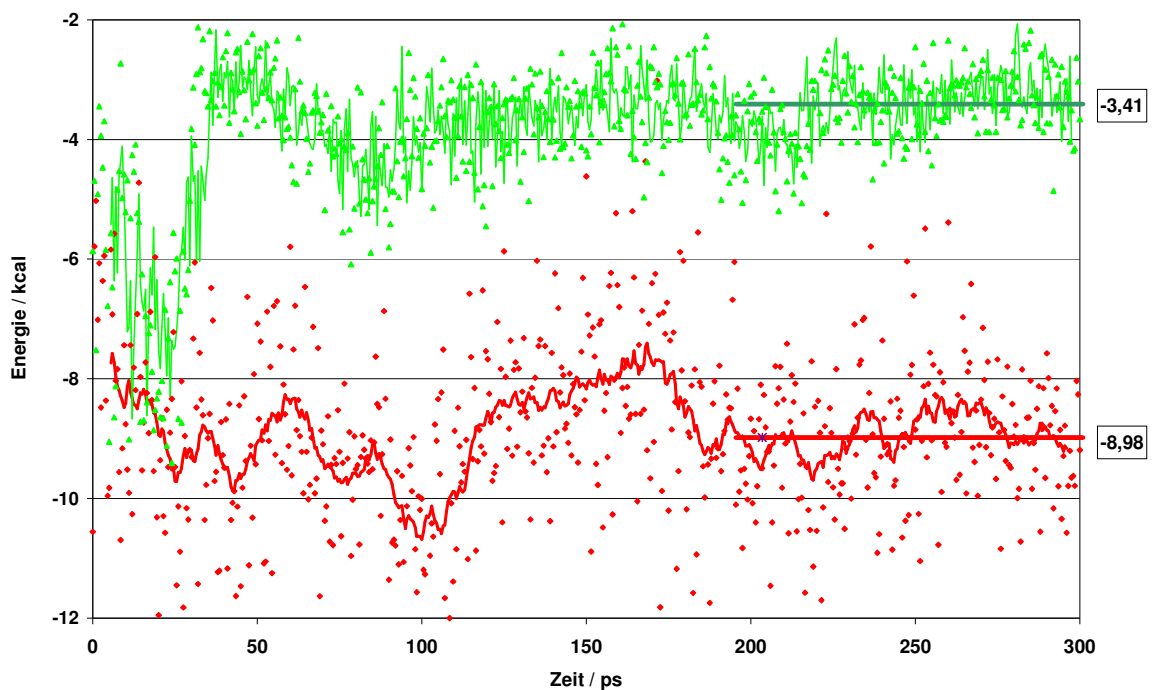


Abbildung 4-75: Wechselwirkungsenergie zwischen Position 177 und Gallamin

Der Unterschied der Interaktionsenergie zwischen dem Wildtyp (rot) und der Glutaminmutante (grün) beträgt für Gallamin 5,5 kcal.

Auch im Falle des Gallamins handelt es sich bei den Wechselwirkungen zwischen Tyrosin 177 um π - π -Wechselwirkungen. Die beiden aromatischen Systeme ordnen sich fast vollständig parallel in einem Abstand zwischen 4 und 5 Å an.

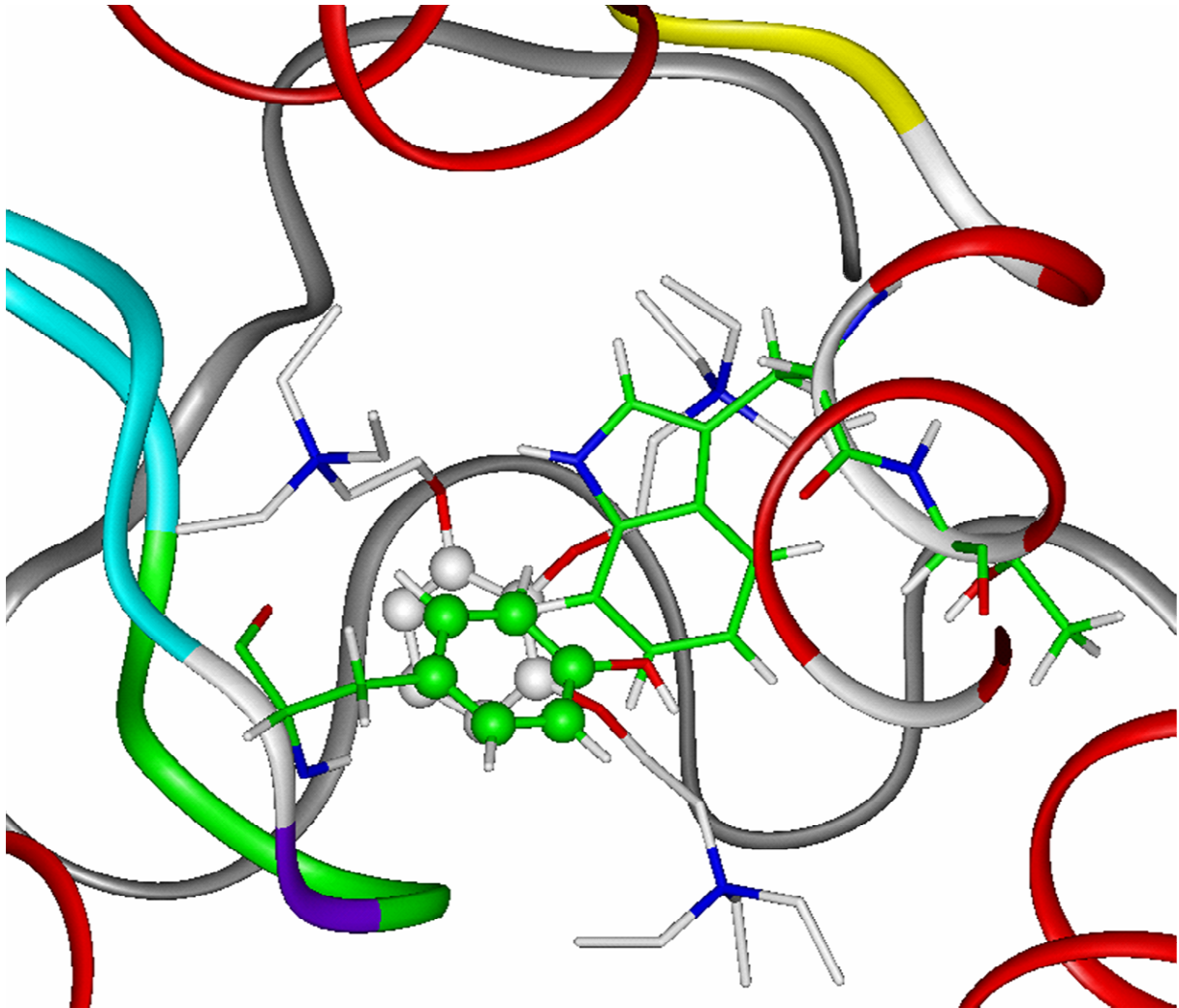


Abbildung 4-76: Wechselwirkung von Gallamin mit Tyrosin 177

Der zentrale Aromat des Gallamins befindet sich 4-5 Å von dem Phenyl-Rest des Tyrosins entfernt und kann daher π - π -Wechselwirkungen eingehen.

Durch die vergleichenden Moleküldynamiksimulationen ist es möglich nicht nur die Experimente zu erklären, sondern nach Identifizierung des jeweiligen Bindungsmodus des Allosters auch die Ergebnisse der Mutationen qualitativ vorherzusagen. Eine sichere quantitative Aussage über das Ausmaß der Abnahme der Bindungsaffinität ist über eine Korrelation mit den Wechselwirkungsenergien aber wegen der notwendigen Unvollständigkeit des Modells nicht möglich.

5 DISKUSSION

5.1 Rezeptormodell

Die Röntgenkristallstruktur des bovinen Rhodopsins ist bis heute die einzige bekannte Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. Rhodopsin und der muskarinerge M₂-Rezeptor gehören zwar der gleichen Familie der GPCRs an, trotzdem weisen sie nur eine Sequenzidentität von knapp 24% innerhalb der transmembranären Bereiche auf. Die Makrostruktur der Proteine ist innerhalb der Familie gleich, in der Mikrostruktur sind allerdings aufgrund der Variation in der Aminosäuresequenz strukturelle Unterschiede zu erwarten. Diese lassen sich jedoch nur schwer ohne experimentelle Befunde vorhersagen und damit in einem Modell berücksichtigen. Ein Beispiel für strukturelle Diversität stellt der vermutlich unterschiedliche inaktive Zustand des μ -Opioid-Rezeptors gegenüber dem inaktiven Zustand der aminergen GPCRs dar. Obwohl beide Rezeptoren der Familie A angehören, kann der μ -Opioid-Rezeptor das *ionic lock* wegen der Ersetzung des Aspartats innerhalb des hochkonservierten DRY-Motivs durch ein Leucin nicht über eine Salzbrücke stabilisiert werden. An diesem Beispiel lässt sich ablesen, dass es wichtig ist möglichst viele experimentelle Befunde in einem Homologie-modell zu verwenden, um ein so genaues Abbild wie möglich zu erstellen. Trotzdem wird ein Modell die Wirklichkeit immer nur unvollständig wiedergeben, als Beispiel sei auch auf die strukturellen Unterschiede zwischen der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins und einem von Pogozeva erstellten Modell desselben hingewiesen [162-164].

Das entwickelte M₂-Modell enthält die sieben transmembranären Helices sowie die vollständigen extrazellulären Loops, den N-Terminus und den C-Terminus. Die intrazellulären Loops sind ebenfalls vorhanden, wobei der dritte intrazelluläre Loop durch eine Konstruktion aus 20 Alaninen ersetzt wurde. Diese vollständige Ersetzung war notwendig, da der dritte intrazelluläre Loop mit ungefähr 150 Aminosäuren ohne eine adäquate Vorlage, die bis jetzt nicht existiert, dem Homologie Modelling nicht zugänglich ist. Besondere Sorgfalt wurde auf den Aufbau der extrazellulären Loop-Regionen verwandt, weil sie die allosterische Bindungsstelle enthalten. Die Aminosäuresequenz dieser drei sehr flexiblen Bereiche unterscheidet sich teilweise von denjenigen des Rhodopsins, so dass hier Strukturelemente anderer Proteine, die nicht zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören, als Vorlage dienen mussten.

Hieraus ergibt sich das Problem der korrekten Verknüpfung dieser Elemente mit den Helices d.h. der Einfluss der hinzugefügten Loopstruktur auf die Struktur und Anordnung der transmembranären Helices muss genau beobachtet werden. Die sechs Loops befinden sich zudem in einem Bereich des Proteins, dass je nach Rezeptorzustand (aktiv / inaktiv) eine unterschiedliche Konformation einnehmen kann. Im Falle der intrazellulären Loops ist dies wegen der Bindung des G-Proteins sowieso anzunehmen. Die Loop-Regionen stellen daher immer Bereiche dar, in denen potentiell ungünstige Konformationen des Proteinrückgrates gefunden werden. Dieses Phänomen kann auch im M_2 -Modell in den verschiedenen untersuchten Simulationsumgebungen beobachtet werden. Aufgrund der hohen Flexibilität der Loop-Regionen, speziell des zweiten extrazellulären Loops, ist es schwierig ein Modell zu erstellen, das diese Strukturen stabil und in einer für die Bindung der allosterischen Modulatoren geeigneten Konformation wiedergibt. Die Aussagekraft der Sekundärstruktur-Vorhersageprogramme stellt für diesen Bereich auch einen kritischen Punkt dar. Die Vorschläge leiten sich jeweils nur von einem Sequenz- und Strukturvergleich mit anderen Proteinen, die aber keine GPCRs sind, ab. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass der modellierte Sequenzabschnitt bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine andere Sekundärstruktur besitzt als die Programme anhand des Trainingsatzes errechnet haben und in das erstellte M_2 -Rezeptormodell übertragen worden ist.

Ein früher von Kuhn erstelltes Modell der extrazellulären Bereiche des M_2 -Rezeptors verwendet die Aminosäuresequenz des Schweins, weil diese sich im modellierten Bereich nicht von der des humanen Rezeptors unterscheidet (s. Kapitel 3.7).

Im Gegensatz zu dem Modell von Kuhn basiert das, im Rahmen dieser Arbeit erstellte, M_2 -Rezeptormodell auf der Kristallstruktur des Rinderrhodopsins und nicht auf dem Rhodopsinmodell von Pogozheva *et al* [163]. Innerhalb der transmembranären Bereiche finden sich daher einige Unterschiede, bedingt durch die veränderte Vorlage.

So ist zum Beispiel Helix IV in Richtung des Extrazellularraumes gegenüber dem Modell von Kuhn verkürzt, so dass die Verbindung zwischen allosterischer und orthosterischer Bindungstasche im aktuellen Modell vorhanden ist. In Bezug auf die rmsd-Werte der $C\alpha$ -Atome des Backbones zeigt das Rhodopsinmodell zur Kristallstruktur eine Abweichung von 3,2 Å, so dass es notwendig war ein

vollständig neues M₂-Modell zu erstellen, bevor die orthosterische und allosterische Bindungsstelle untersucht werden konnte. Gleichzeitig erfolgte die Ergänzung der bei Kuhn fehlenden Helixenden sowie der intrazellulären Loops und des C-Terminus. Ein vollständiges Modell bietet den Vorteil, dass den transmembranären Helices mehr „Bewegungsfreiheit“ gewährt werden kann d.h. es kann mit deutlich geringeren oder auch ganz ohne Rückhaltekräfte moleküldynamisch untersucht werden. Gleichzeitig birgt es aber aufgrund größerer Unsicherheiten bezüglich der strukturellen Gegebenheiten die Gefahr artifizielle Zustände auszubilden z.B. durch Kontakte zwischen Loop-Regionen und den transmembranären Bereichen. Ebenfalls muss verstärkt auf die Anordnung der Helices geachtet werden, so dass sich durch den Einfluss der Loops das Bündel nicht vollständig anders anordnet, weil dies eine Veränderung der GPCR-Makrostruktur bedeuten würde.

Das vollständige Modell wurde anschließend unter drei Simulationsbedingungen untersucht: im Vakuum, in einer membranähnlichen Umgebung und in einer Dipalmitoylphosphatidylcholin-Membran.

Bei Moleküldynamiksimulationen im Vakuum ist bei membranständigen Rezeptoren immer eine Rückhaltekraft notwendig, die die Membran ersetzt, um die Tertiärstruktur des Proteins zu erhalten. Unter den in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen, werden mit diesem Simulationsansatz gute Ergebnisse erzielt. Die helikalen Bereiche bleiben erhalten und es werden ausreichend große Volumina innerhalb der orthosterischen und der allosterischen Bindungsstelle gefunden um die Liganden aufzunehmen. Neben den Sekundärstrukturen bleiben auch die im Rhodopsin beschriebenen interhelikalen Kontakte über Wasserstoffbrückenbindungen überwiegend erhalten. Zusätzlich wird bei allen Simulationen noch ein Kontakt zwischen Helix III und Helix VI gefunden, der für den inaktiven Zustand der aminergen GPCRs wichtig ist. Innerhalb der Vakuum-Simulationen bleibt also der inaktive Zustand des Templates Rhodopsin im M₂-Modell weiterhin erhalten. Solvations-Effekte oder der Einfluss einer wässrigen Umgebung können innerhalb dieser Simulation natürlich nicht beschrieben werden. Ebenso wenig können detaillierte Erkenntnisse über die Anordnung des Helixbündels gewonnen werden, weil es durch das *Tethering* des Backbones in einer rhodopsin-ähnlichen Position erhalten wird. Mit diesem Ansatz lassen sich aber die interhelikalen Kontakte überprüfen.

Die Rückhalterkräfte lassen sich auch so wählen, dass eine Anpassung der helikalen Bereiche an Liganden ermöglicht wird und so Rezeptor-Ligand-Komplexe simuliert werden können. Eine andere Möglichkeit der Erhaltung der Bündelung besteht darin interhelikale Kontakte über eine abstandsabhängige „Strafenergie“ so genannte *distance restraints* zu erhalten. Dieses Verfahren ist im vorliegenden Fall aber nicht geeignet, weil zu wenige Kontakte zwischen den Helices bestehen. Zusätzlich wären auch *restraints* innerhalb der Helices notwendig, die dann nur noch eine wesentlich geringere Möglichkeit hätten sich anzupassen. Eine Veränderung der Helixlängen kann aber durchaus sinnvoll sein z.B. im Fall von Helix IV.

Für MDS in einer Box mit einer zentralen Tetrachlorkohlenstoffschicht, die die Lipidketten wiedergeben soll, werden keine Rückhalterkräfte auf das Proteinrückgrat benötigt. Das Ergebnis des Verfahrens ist aber enttäuschend.

Die benötigte Rechenzeit ist nicht wesentlich gegenüber denen der expliziten Phospholipidmembran verkürzt, im Vergleich zur Rechnung unter Vakuumbedingungen aber aufgrund der notwendigen längeren Simulationszeiträume deutlich erhöht²⁰. Die Strukturhaltung ist teilweise sogar schlechter als bei Simulationen unter Vakuumbedingungen, vor allem in Bezug auf die *root mean square deviation* und die Erhaltung der interhelikalen Wasserstoffbrückenbindungen erscheint die 3-Phasen-Box weniger geeignet. Ein Grund für dieses Ergebnis könnte die geringere Stabilität der Tetrachlorkohlenstoffschicht gegenüber Scherkräften sein, die das Protein aufgrund von abstoßenden Wechselwirkungen im Inneren auf seine Umgebung ausübt. Vorteil dieser Methode gegenüber einer Simulation unter Vakuumbedingungen ist aber die Berücksichtigung einer expliziten extramembranären wässrigen Umgebung, so dass Kontakte innerhalb der Loop-Regionen oder auch der orthosterischen Bindungsstelle über ein oder mehrere Wassermoleküle vermittelt werden können, ein Umstand der zu einer Stabilisierung dieser Bereiche beiträgt. Ein System aus einer lipophilen und zwei wässrigen Schichten scheint grundsätzlich zwar die Strukturintegrität eines GPCRs erhalten zu können, gleichzeitig aber Veränderungen zu induzieren, die wahrscheinlich nicht der Realität entsprechen z.B. das β -Faltblatt in E2.

²⁰ Diese Angaben beziehen sich auf einen IRIS O2 R12000 Prozessor, 500 ps Vakuumsimulation im Programm FDISCOVER und jeweils 5 ns MDS im Programm GROMACS. Die Simulation im Vakuum dauert ungefähr eine Woche, die beiden anderen circa zwei Monate.

In der DPPC-Membran sind Moleküldynamiksimulationen in einer realitätsnahen Umgebung möglich. Dementsprechend werden auch keine zusätzlichen Rückhaltekräfte auf das Protein benötigt, diese werden von der umgebenden Membran in ausreichendem Maße ausgeübt. Die sieben transmembranären und auch die achte C-terminale Helix entsprechen in ihrer Ausdehnung den Sekundärstrukturvorhersagen. Die Loopstrukturen sowie die beiden Termini, erweisen sich in der Membranumgebung als ebenso flexibel wie unter Vakuumbedingungen. Es findet aber keine Veränderung der interhelikalen Kontakte wie in der 3-Phasen-Box statt, sondern sie bleiben, mit Ausnahme des zusätzlichen Kontaktes zwischen Helix III und VI, so erhalten, wie sie im Rhodopsin beobachtet worden sind. Unberücksichtigt bleibt nach wie vor die Zusammensetzung einer natürlichen Membran, die neben unterschiedlichen Phospholipiden auch Cholesterol sowie Proteine enthält. Auch eine eventuelle Glykosylierung im N-Terminus und eine Phosphorylierung im C-Terminus werden nicht in das Modell einbezogen und stellen einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen und Verbesserungen des Modells dar.

Als Fazit der Untersuchungen ergibt sich, dass eine Simulation in einer 3-Phasen-Box kaum Vorteile gegenüber der Simulation in Vakuum ergibt, zumal wenn eventuelle wichtige Wassermoleküle im Vakuum explizit berücksichtigt werden. Vorteil der MDS in einer Membran ist, dass gegenüber dem Vakuum das umgebende Medium berücksichtigt wird. Es können einerseits elektrostatische und ionische Wechselwirkungen wie z.B. wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen beobachtet werden, andererseits werden attraktive Wechselwirkungen zwischen lipophilen Aminosäuren und der Membran berücksichtigt. Die weniger zeitaufwändige Simulation unter Vakuumbedingungen, zeigt dem Membransystem strukturell vergleichbare Ergebnisse, so dass die Vorgehensweise je nach Problemstellung abgewogen werden muss.

5.2 Rezeptor-Ligand-Komplexe

Der erste Teil der Untersuchungen der Rezeptor-Ligand-Komplexe beschäftigt sich mit klassischen Agonisten und Antagonisten der muskarinergen Rezeptoren, die, wenn überhaupt, nur eine geringe Subtypspezifität aufweisen. Die Bindungsstelle dieser Substanzen befindet sich im oberen Drittel zwischen den transmembranären Helices und die unterschiedliche Bedeutung einzelner Aminosäuren für Agonisten und Antagonisten ist in Bindungsstudien mit punktmutierten muskarinergen Rezeptoren untersucht worden. Hierbei wurden Aspartat 103, Tyrosin 104, Tryptophan 155, Threonin 187, Threonin 190, Tryptophan 400, Tyrosin 403 und Asparagin 404 als wichtig für die Ligandbindung identifiziert. Je nachdem, welcher Agonist oder Antagonist sich in der orthosterischen Bindungsstelle befindet, besitzen die verschiedenen Epitope aber auch einen unterschiedlichen Einfluss auf die Affinität [152]. Auf Grundlage dieser Studien wurden als agonistisch wirksame Beispielsubstanzen Acetylcholin, der endogene Agonist, und Oxotremorin M, eine experimentell bedeutsame Verbindung, in das M_2 -Rezeptormodell eingedockt. Als Antagonisten wurden die Tropasäure-Derivate (S)-Hyoscyamin, Scopolamin und *N*-Methylscopolamin sowie AD-DX 384, eine M_2 -prävalente Substanz verwendet.

Die Agonisten binden mit ihrer quartären Kopfgruppe innerhalb eines aromatischen Käfigs zwischen Aspartat 103, Tyrosin 104, Tryptophan 155, Tryptophan 400 und Tyrosin 403. Das negative Potential der Carboxylatgruppe von Aspartat 103 übt bei diesem Bindungsmodus elektrostatische Wechselwirkungen mit der verteilten positiven Ladung des kationischen Kopfes aus. Zusätzlich tragen auch die aromatischen Seitenketten der Tryptophane und Tyrosine in Form einer Kation- π -Wechselwirkung zur Bindung bei. Der Pyrrolidin-2-on-Ring des Oxotremorin M nimmt eine Position zwischen Asparagin 404 und Threonin 187/Threonin 190 ein, so dass er in der Lage ist mit diesen Aminosäuren Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden.

Acetylcholin geht mit diesen Aminosäuren keine direkten Interaktionen ein, sondern die Carbonylfunktion der Estergruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit der phenolischen Hydroxylfunktion von Tyrosin 104 aus. Dieses Verhalten ist im Einklang mit den Experimenten, die bei einer Mutation beider Threonine und des Asparagins 404 eine geringere Bedeutung für die Affinität feststellen als bei Aspartat 103 und den aromatischen Aminosäuren. Diese Aussagen über agonistische Verbindungen innerhalb des Modells sind allerdings nur als Anhaltspunkt zu werten. Der aktive Rezeptorzustand unterscheidet sich konformatorisch vom inaktiven z.B. eine wird andere Geometrie von Helix VI diskutiert. Eine andere Ausrichtung der Position der Helices hat natürlich auch Einfluss auf die Position der an der Bindung beteiligten Aminosäuren, so dass andere Kontakte zwischen den Agonisten und dem Rezeptor möglich sind. Die modellierten Komplexe stellen demnach einen möglichen Initialkomplex vor der Aktivierung des M_2 -Rezeptors durch einen Agonisten dar. Auf eine „Aktivierung“ des Modells durch Veränderungen in den Helices wurde bewusst verzichtet, da hierfür nicht ausreichend Anhaltspunkt über den aktiven Zustand vorliegen und ein solches Vorgehen sehr viele Unsicherheiten in sich trägt. Bestrebungen das Rhodopsin in einer aktiven Form zu kristallisieren, führten bis jetzt noch zu keinem Erfolg, falls eine solche Struktur jedoch veröffentlicht werden sollte, ist es sinnvoll die Agonisten in einem auf dieser Struktur basierenden Homologiemodell nochmals zu untersuchen, um eventuelle Unterschiede beobachten zu können.

Die Antagonisten vom Tropasäuretyp weisen im Verhältnis zu den Agonisten die höheren Affinitäten zum M_2 Rezeptor auf. In Analogie zu den Agonisten befindet sich der protonierte tertiäre oder der quartäre Stickstoff innerhalb des aromatischen Käfigs aus Tyrosin 107, Tyrosin 403, Tryptophan 155 und Tryptophan 400. Die Bedeutung der Protonierung für die Bindungsaffinität wurde für Scopolamin in einer pH-Wert abhängigen Bindungsstudie von Ehlert und Dehlen gezeigt, so dass auch Atropin und Scopolamin unter physiologischen Bedingungen in geladener Form in der Bindungstasche vorliegen und sich damit nicht vom quartären *N*-Methylscopolamin unterscheiden. Der Tropasäureanteil der Antagonisten weist in den Raum zwischen Threonin 187, Threonin 190, Asparagin 404 und Tyrosin 104. In den Simulationen unter Vakuumbedingungen variiert die Ausrichtung des Phenylrestes zwischen den Liganden etwas. Es werden aber die gleichen Wasserstoffbrückenbindungen identifiziert nämlich zwischen der Hydroxylfunktion

und Threonin 187 beziehungsweise Threonin 190 und dem Estercarbonylsauerstoff und Asparagin 404. Trotz ihrer großen Strukturähnlichkeit zeigen sich im Bindungsmodus aber auch einige Unterschiede. Atropin ist aufgrund der äquatorialen Ausrichtung seines Protons nicht in der Lage eine direkte oder indirekte Wasserstoffbrückenbindung zu Aspartat 103 auszubilden. Für Scopolamin besteht dagegen diese Möglichkeit. Sie konnte sowohl unter Vakuumbedingungen stabil erhalten werden, als sich auch in der freien Simulation in der DPPC-Membran ausbilden. Die Ausrichtung des Phenylrestes in der Membranumgebung ist dabei noch etwas weiter von Threonin 187 und Threonin 190 abgewandt, die Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein werden aber ebenfalls gefunden.

(S)-Hyoscyamin, Scopolamin und *N*-Methylscopolamin zeigen in den Untersuchungen schon eine Variation in der Position innerhalb des Proteins, obwohl sie chemisch recht ähnlich sind. Daneben existieren noch viele andere strukturell deutlich diversere Liganden z.B. Chinuclidinbenzilat, die in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt werden. Die Untersuchung ihrer Bindungsmodi innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle könnte noch weitere Erkenntnisse z.B. über die Konformation der Seitenkette von Asparagin 404 und die Art der Wechselwirkung mit den Antagonisten ergeben. Eine Schwierigkeit stellt allerdings der Aufbau eines homogenen vergleichbare Datensatzes für eine solche Analyse dar. Die Affinitäten werden sowohl im Verdrängungsexperiment als auch zum freien Rezeptor gemessen bzw. als Dissoziationskonstante angegeben. Schon diese Werte können nicht direkt miteinander verglichen werden. Zusätzlich beeinflussen auch die experimentellen Bedingungen das Ergebnis, so dass es mit Hilfe einer jeweils getesteten Verbindung zwar prinzipiell möglich ist Ergebnisse aus Bindungsstudien zu vergleichen, hierin aber eine große Fehlerquelle liegt. Die Bindungsstudien lassen sich auch nur innerhalb eines Rezeptorsubtyps vergleichen, denn trotz der starken Konservierung innerhalb der orthosterischen Bindungstasche werden für jeden Subtyp unterschiedliche Bindungskonstanten bestimmt [69].

Auffälliges Unterscheidungsmerkmal der Agonisten gegenüber den Antagonisten ist ihre deutlich geringere Größe, aber auch ihre weniger ausgeprägte Lipophilie. Die Affinitäten der klassischen orthosterischen Liganden lassen sich in Beziehung setzen zu den im Modell berechneten Wechselwirkungsenergien zwischen Protein und Ligand. Wegen der geringen Anzahl von nur fünf untersuchten Liganden ist es allerdings nicht möglich eine statistisch sichere Aussage treffen zu können, so dass hier keine Korrelation im Sinne einer 3D-QSAR-Untersuchung erhalten wird. Die Beziehungen zeigen lediglich einen Trend, der aus den Moleküldynamiksimulationen entnommen werden kann. Eine proteinbasierte 3D-QSAR-Studie wäre möglich, wenn weitere orthosterische Liganden betrachtet würden, wäre jedoch immer mit den in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Problemen behaftet. Ein ligandbasierter Ansatz zur Strukturoptimierung ist im Jahr 2001 von Gratteri beschrieben worden [154]. Wünschenswert wären allerdings subtypselektive Liganden, wobei dies nicht über die Untersuchung der bekannten orthosterischen Bindungsstelle verwirklicht werden kann. Vielmehr ist hierzu ein Vergleich der Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen den Subtypen notwendig. Verschiedene Arbeitsgruppen in USA und Japan verfolgen das Ziel subtypselektive Liganden zu synthetisieren.

AF-DX 384 stellt einen möglichen Prototyp für M_2 -subtyp-selektive Liganden dar, da es neben der orthosterischen Bindungstasche auch einen Teil der allosterischen Bindungsstelle besetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Bindungsmodi für AF-DX 384 beschrieben, wobei die Position mit dem Benzo-pyridodiazepin-Ring innerhalb der orthosterischen Bindungstasche als energetisch günstiger identifiziert wurde als der Bindungsmodus mit einem der protonierten Stickstoffe innerhalb des aromatischen Käfigs. Diese Orientierung des Trizyklus wurde auch von Kerckhoff und Höltje nach einer ligandbasierten Analyse von M_1 und M_2 -prävalenten Liganden vorgeschlagen [151] und bestätigt sich in dem hier vorgestellten Modell.

Das M_2 -Rezeptormodell ist zwar in der Lage die Position der orthosterischen Agonisten und Antagonisten in einem inaktiven Proteinzustand analog dem des bovinen Rhodopsins wiederzugeben. Zum Aktivierungsmechanismus oder dem aktiven Zustand, den Agonisten stabilisieren können, sind aber keine Erkenntnisse ableitbar.

Bei den Bindungsstudien der allosterischen Modulatoren stellt die inaktive Form der Rezeptorproteins einen Vorteil dar, denn die Untersuchungen finden überwiegend am *N*-Methylscopolamin-besetzten und damit inaktiven Rezeptor statt. Für die Beobachtungen am Modell wurde ebenfalls NMS in die orthosterische Bindungstasche eingefügt und somit die experimentellen Bedingungen nachgeahmt. Die allosterischen Liganden bilden eine heterogene Gruppe aus mehr oder weniger flexiblen Substanzen. Daher ist es nicht genau bekannt welche Aminosäuren an der Bindung der verschiedenen Alloster beteiligt sind. Aus Untersuchungen mit chimären muskarinergen Rezeptoren konnten nur der zweite extrazelluläre Loop im Bereich der EDGE-Sequenz sowie der Bereich des dritten extrazellulären Loops und der angrenzende Bereich der siebten transmembranären Helix als Bindungsort identifiziert werden.

Die innerhalb des Modells identifizierte Bindungstasche befindet sich im Bereich zwischen E2 und E3 sowie TM I und TM VII, zum Extrazellulärraum begrenzt durch den N-Terminus. Eine Einschätzung der Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für die absolute Affinität ist aber nicht möglich. Aussagen über Wechselwirkungen der Aminosäuren mit den Liganden lassen sich indirekt über die Projektion von Wechselwirkungs-Feldern (GRID-Felder) auf den Liganden treffen, indem die einzelne Aminosäure oder die Gruppe von Aminosäuren, die das jeweilige Feld „verursacht“ identifiziert wird. Diese Aminosäure besitzen allerdings nicht automatisch eine Bedeutung für die absolute Affinität, sondern ihre Eigenschaften können möglicherweise auch durch benachbarte Aminosäuren simuliert werden. Es ist daher nicht möglich an der Wechselwirkungsenergie zwischen einem Epitop und einem Alloster die Auswirkung einer Punktmutation vorherzusagen. Die gesamte Wechselwirkungsenergie zwischen Alloster und Protein stellt allerdings im Modell einen Parameter dar, der mit der Affinität der strukturell diversen allosterischen Modulatoren in Einklang steht. Die Auswahl der Substanzen orientiert sich zum einen an der Diversität, um ein möglichst genaues Bild des Bindungsmodus in der allosterischen Bindungstasche zu erhalten, zum anderen auch an der Datenlage für die Liganden. Als zusätzliches Auswahlkriterium spielten die geplanten Mutageneseuntersuchungen im Arbeitskreis Mohr eine Rolle.

Diallylcaracurin V stellt, mit einer Bindungskonstante von 3 nM, die Substanz mit der höchsten Affinität und gleichzeitig der geringsten Flexibilität dar. Weitere Caracurin V-Derivate decken ein Affinitäts-Spektrum von drei Zehnerpotenzen ab, so dass diese Gruppe zur Untersuchung von Affinitätsunterschieden aufgrund unterschiedlicher Substitution gut geeignet ist. Diese experimentell gefundenen Differenzen lassen sich anhand der durch Modellierung bestimmten Wechselwirkungskomplexe der sechs betrachteten Caracurin V-Derivate und über den Vergleich der Wechselwirkungsenergien zwischen dem Alloster und dem Proteinmodell gut nachvollziehen.

Dimethylcaracurin V, Dipropylcaracurin V, Dipropinylcaracurin V und Diallylcaracurin V nehmen innerhalb des M_2 -Rezeptormodells eine identische Position des Grundkörpers ein. Allein die Position des zentralen Diazacycloctan-Ringes des Caracurin V unterscheidet sich von den anderen vier Derivaten. Ursache hierfür ist vermutlich die veränderte Elektrostatik durch die tertiären Stickstoffe des Caracurin V. Die Überlagerung der Caracurin V-Derivate ist in Abbildung 4-46 dargestellt.

Alcuronium stellt rein formell die unveretherte Form des Diallylcaracurin V dar. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass die Ringkonformation sich von derjenigen des Diallylcaracurin V unterscheidet. Dies kann zum einen durch eine dynamische Konformationsanalyse verdeutlicht werden, zum anderen lässt sich ausschließlich diese Konformation auch über die Wechselwirkungsenergie mit den Affinitäten der Caracurin V-Derivate in Einklang bringen.

Das Hexamethonium-Derivat W84 ist die flexibelste Substanz der untersuchten allosterischen Modulatoren. Seine bioaktive Konformation stellt damit auch die größte Schwierigkeit dar. Holzgrabe formulierte 1996 eine pharmakophore Überlagerung von W84 auf Alcuronium [91], bei der W84 eine S-förmige Konformation einnimmt. Diese Konformation von W84 war in der vorliegenden Arbeit aber weder unter Vakuumbedingungen noch in einer physiologischen Kochsalzlösung stabil. Stattdessen wurde eine andere, eher schalenförmige Konformation gefunden, die sowohl im Vakuum als auch in der wässrigen Umgebung als energetisch besonders günstige und damit stabile Konformation auftrat.

Diese Konformation ließ sich ohne Änderungen in die allosterische Bindungsstelle des M_2 -Rezeptormodells eindocken und bildete dort einen stabilen Komplex.

Als weiterer Hinweis darauf, dass die vorgeschlagene Konformation und Position innerhalb des Proteinmodells sinnvoll ist, kann die Interaktionsenergie zwischen dem M₂-Modell und W84 angeführt werden, die sich mit denjenigen der Caracurin V-Derivate korrelieren lässt. In einem kürzlich erschienenen Artikel [165] werden die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Bisammonium- und Bispyridinium-Derivate analog zu den in diesem Modell vorgestellten Aussagen getrennt von denen der Alcuronium-ähnlichen allosterischen Modulatoren betrachtet, die einen anderen Bindungsmodus in der *common allosteric binding-site* besitzen. Die beschriebenen Variationsmöglichkeiten von W84 können ebenfalls mit dem Modell vereinbart werden. So ist die deutliche Vergrößerung eines Phthalimid-Substituenten ohne Affinitätsverlust insofern möglich, als sich einer dieser Reste in Richtung des Extrazellulärraums erstreckt. Auch die Ersetzung eines protonierten Stickstoffs durch ein Silicium erscheint möglich, da die verteilte positive Ladung innerhalb des für W84 modellierten Komplexes keine unmittelbare ionische Wechselwirkung eingeht. Um zu überprüfen, ob die Experimente und das Modell auch in Bezug auf Variationen innerhalb der Bispyridinium-Komponenten übereinstimmen wären aber ausführliche Berechnungen jeder Komponente notwendig.

Gallamin ist der älteste bekannte allosterische Modulator am M₂-Rezeptor. Das recht kleine Molekül besitzt zwar theoretisch eine relativ hohe Flexibilität, es wird aufgrund der symmetrischen Substitution und sterischer Hinderung aber im Wesentlichen nur eine Konformation in der dynamischen Konformationsanalyse gefunden. Diese kann ohne Konformationsänderungen des Liganden mit dem Aromaten zwischen den transmembranären Helices, innerhalb der allosterischen Bindungstasche positioniert werden.

Der nach einer MDS resultierende Protein-Ligand-Komplex ist stabil und weist ebenso wie die Caracurin V-Derivate, Alcuronium und W84 einen Zusammenhang zwischen der berechneten Wechselwirkungsenergie und der Affinität des Liganden zum NMS-besetzten Rezeptor auf. Obwohl Gallamin seit langem als allosterischer Modulator bekannt ist, sind noch nicht alle wichtigen Epitope für die Subtyp-Selektivität bzw. auch für die Affinität bekannt. Es gibt zwar Untersuchungen, die eine Bedeutung von Asparagin 419 und der EDGE-Sequenz erkennen lassen [159]. Ein Vergleich mit der Bindungsstelle weiterer allosterischer Modulatoren erschien sinnvoll, um daraus eventuell Rückschlüsse auf wichtige Epitope für Caracurin V-ähnliche und Bisammonium-artige allosterische Modulatoren

ziehen zu können. Diese Erwartung konnte allerdings nicht erfüllt werden, weil die Bindungsaffinität gerade im flexiblen Loopbereich ein sehr komplexes Zusammenwirken der Proteinumgebung zu erfordern scheint.

Das vorliegende M_2 -Rezeptormodell ist somit zwar in der Lage sowohl die Gegebenheiten der orthosterischen als auch der allosterischen Bindungsstelle verschiedener Rezeptor-Ligand-Komplexe wiederzugeben und die Affinitäten der jeweiligen Substanzen über die Berechnung von Interaktionsenergien zwischen Protein und Ligand zu differenzieren, eine Identifizierung der Aminosäuren der *common allosteric binding-site* ist auf Modellbasis allerdings nicht möglich. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre der Vergleich der Loop-Regionen der anderen muskarinergen Subtypen sowie eventuell auch verwandter Rezeptoren. Ein ähnlicher Ansatz wurde experimentell von Franken verfolgt, der die Spezifität allosterischer Modulatoren am phylogenetisch engverwandten H_1 -Histamin-Rezeptor untersuchte [166]. In einer solchen Untersuchung wäre es über ein Ausschlussverfahren vielleicht möglich wichtigere und unwichtigere Aminosäuregruppen oder günstige und ungünstige Proteinkonformationen zu identifizieren.

Der Zusammenhang zwischen Bindungsaffinität und Wechselwirkungsenergie zwischen Proteinmodell und Ligand am NMS-besetzten Rezeptor lässt sich auch für AF-DX 384 herstellen. Diese Verbindung unterscheidet sich von den übrigen allosterischen Modulatoren insofern, als sie in der Lage ist, sowohl an der orthosterischen Bindungsstelle, als auch an der allosterischen Bindungsstelle einen Effekt auszulösen. Im Fall des allosterischen Bindungsmodus unterscheidet sich das Verhalten von AF-DX 384 aber kaum von demjenigen des W84. So nimmt das Molekül im Modell auch eine ähnliche Konformation und Bindungsposition ein.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden zunächst zwei Hybride zwischen AF-DX 384 und W84, die die gleichzeitig orthosterische und allosterische Bindungsstelle besetzen sollten untersucht. Die Experimente der Arbeitsgruppe Mohr hatten gezeigt, dass dies jedoch nicht der Fall ist, sondern nur ein allosterischer Effekt vorlag. Im Modell wurden die beiden Hypothesen überprüft, wobei das Ergebnis ebenfalls eine deutlich Bevorzugung der allosterischen Bindung dieser beiden Substanzen vorhersagt. Daraufhin wurden zwei weitere Hybride virtuell untersucht, um einen Vorschlag für die Synthese einer weiteren Substanz unterbreiten zu können. Die Ergebnisse zeigten, dass der erste Ansatz (Hybrid 3) sich laut Vorhersage ebenso wie die Hybride 1 und 2 verhalten sollte, d.h. eine rein allo-

sterische Modulation hervorrufen. Erfolgversprechender erweist sich Hybrid 4, für das eine Benutzung beider Bindungsstellen prognostiziert wird. Leider lassen sich die Vorhersagen bis jetzt aufgrund Schwierigkeiten mit der Synthese des Hybrids 4 nicht experimentell verifizieren, so dass eine abschließende Bewertung der Vorhersage nicht möglich ist.

5.3 Mutationsstudien

Die meisten allosterischen Modulatoren des M₂-Rezeptors weisen eine gewisse Subtypselektivität auf. Der Unterschied ist zumeist am deutlichsten zwischen dem M₂- und dem M₅-Subtyp ausgeprägt, so dass eine Identifizierung der für diese Selektivität verantwortlichen Aminosäuren am ehesten zwischen diesen beiden Typen möglich ist.

Untersuchungen mit Diallylcaracurin V und W84 zeigten, dass die Selektivität nur von zwei Aminosäuren abhängig zu sein scheint [168]. Die Bedeutung von Threonin 423 in der siebten transmembranären Helix und Tyrosin 177 im zweiten extrazellulären Loop konnte anhand virtueller Mutationen in Kombination mit einer anschließenden Moleküldynamiksimulation gut nachvollzogen werden. Zur Beurteilung der Unterschiede wurden die Wechselwirkungsenergien zwischen dem Ligand und der jeweils betrachteten Aminosäure herangezogen. Dieses Verfahren erscheint zwar ziemlich aufwändig, bietet aber den Vorteil, dass der Einfluss der Aminosäure in der untersuchten Position genau beschrieben werden kann. Außerdem ist es mit diesem Verfahren möglich die Auswirkung einer Punktmutation auf die Aminosäuren der Umgebung zu quantifizieren. Das Modell konnte dabei auch zur visuellen Erklärung der Unterschiede im Bindungsverhalten, besonders in Bezug auf Tyrosin 177, herangezogen werden (s. auch Abbildung 4-71). In den experimentellen Untersuchungen wurden jeweils zusätzlich die Affinitätszunahme zwischen dem M₅-Wildtyp und einem M₅-Rezeptor mit der analogen M₂-Aminosäure untersucht. Eine solche zusätzliche Überprüfung der virtuellen Mutationen ist zwar nicht unbedingt notwendig. Es wäre über einen direkten Vergleich zwischen M₂-Wildtyp, M₂-M₅-Mutation, M₅-M₂-Mutation und M₅-Wildtyp aber eventuell möglich auch annähernd quantitative Aussagen zum beobachteten Effekt zu erlangen. Die direkte absolute Auswertung der Wechselwirkungsenergien z.B. als Anteil an der Gesamtwechselwirkungsenergie ist nicht geeignet die Selektivität bzw. die Bedeutung einer Aminosäure für Allosterie wiederzugeben. Dies liegt in den Kraftfeldmethoden begründet, die viele experimentelle Effekte nicht berücksichtigen. So wird die z.B. Solvatationsenergie überhaupt nicht berücksichtigt ebenso wie der entropische Anteil der Bindungsenergie. Auch π - π -Wechselwirkungen bzw. Kation- π -Wechselwirkungen werden im Kraftfeld durch die Lennard-Jones-Potentiale nur unvollständig

wiedergegeben. Eine genauere Berechnung der Wechselwirkungsenergien wäre zwar über eine Kombination aus quantenchemischen und molekülmechanischen Berechnungen (QM/MM-Methoden) möglich, die Ergebnisse sind allerdings insofern als fragwürdig anzusehen, als die Grundlage für den Protein-Ligand-Komplex ein, mit vielen Unsicherheiten behaftetes, Homologiemodell bildet. Über den in Kapitel 4.4 beschriebenen vergleichenden Ansatz erhält man zwar nicht so genaue Aussagen über den absoluten Effekt, eliminiert allerdings den Fehler innerhalb des Modells aus der Berechnung, da er immer in ähnlichem Ausmaß vorhanden ist.

Auch für Alcuronium und Gallamin wurden die entsprechenden virtuellen Punktmutationen durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese Aminosäuren möglicherweise bei allen allosterischen Modulatoren die gleiche Rolle spielen.

Die Mutation von Threonin 423 in Helix VII in das analoge M₅ Histidin zeigt im Fall des Alcuroniums kaum eine Wirkung, in beiden Fällen werden günstige Interaktionsenergien beobachtet.

Für Gallamin wird zwar eine Bedeutung festgestellt, allerdings verändert sich die Wechselwirkung von einem unbeteiligten Verhalten im M₂ Wildtyp zu einer Störung der Bindung in der Histidin-Mutante. Beide Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen der Arbeitsgruppen Mohr und Ellis überein. Die Untersuchungen der Mutation ¹⁷⁷Tyrosin zu Glutamin zeigen sowohl auf Alcuronium als auch auf Gallamin einen ausgeprägten Verlust der Wechselwirkungsenergie an dieser Position. Im Modell lassen sie sich mit dem Verlust der π - π -Wechselwirkungen zwischen den Aromaten der Liganden und der Phenolseitenkette des Tyrosins erklären. Dieser Wechselwirkungstyp bietet auch einen Erklärungsansatz für die höhere Affinität der allosterischen Modulatoren zum M₄-Rezeptor, der an der homologen Position zu M₂ 177 ein Phenylalanin besitzt und daher ebenfalls zu aromatischen Wechselwirkungen in der Lage wäre.

Untersuchungen mit chimären Rezeptoren verschiedener muskarinergere Subtypen zeigen, dass chimäre Rezeptoren aus verschiedenen muskarinergen Subtypen einen erste Eingrenzung der für die Bindung und Selektivität wichtigen Aminosäuren ermöglichen [161]. In diesem Fall wäre eine virtuelle Nachbildung oder auch der Vorschlag für ein neues Chimär aufgrund theoretischer Untersuchungen, ein möglicher Ansatz zur weiteren Aufklärung der Grundlagen der allosterischen Modulation an muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren.

5.4 Ausblick

Bis jetzt ist das in dieser Arbeit erstellte M_2 -Rezeptormodell in der Lage, den Bindungsmodus einiger Liganden der orthosterischen und allosterischen Bindungstasche gut wiederzugeben. Es sind noch viele weitere Substanzen bekannt, die ihren Wirkort innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle haben, so dass hier weiterführende Simulationen von Interesse wären.

Einen weiteren interessanten Ansatzpunkt stellt die Entwicklung subtypselektiver Liganden für die klassische Bindungsdomäne dar. Die Aminosäuren innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle unterscheiden sich zwischen den muskarinergen Rezeptoren allerdings nicht, so dass hier eine Optimierung in Bezug auf die Selektivität nicht möglich ist. Vielmehr bieten die Epitope in der Umgebung der orthosterischen Bindungstasche hierfür einen Ansatzpunkt, weil sich hier die Aminosäuresequenz zwischen den muskarinergen Rezeptoren unterscheidet. Wenn ein nur mäßig affiner Ligand der muskarinergen Rezeptoren über die Wechselwirkung mit einem oder mehreren Aminosäuren außerhalb der klassischen Bindungsstelle einen Affinitätsgewinn erfährt, so erhält er eine Prävalenz für einen Subtyp, wobei grundsätzlich immer eine „Grundaffinität“ zu den muskarinergen Rezeptoren und eventuell auch zu anderen aminergen Rezeptoren erhalten bleibt.

Die *common allosteric binding-site* gibt die Bindungsmodi der untersuchten Substanzklassen gut wieder. Eine weitere Optimierung innerhalb dieses Bereichs des Rezeptormodells ist durch Platzierung weiterer Liganden möglich. Innerhalb eines größeren Datensatzes sind vermutlich auch deutlicher die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Bindungsmodi der Substanzklassen der verschiedenen allosterischen Modulatoren zu erkennen.

Theoretische Untersuchungen an der *second allosteric binding-site* sind bis jetzt noch nicht durchgeführt worden. Auch hier könnten mit Hilfe des M_2 -Rezeptormodells Ideen entwickelt werden, inwieweit sich diese Bindungsstelle von der *common allosteric binding-site* unterscheidet und daraus Vorschläge für eine experimentelle Überprüfung resultieren.

Insgesamt stellt das aktuelle Modell eine gute Grundlage für weiterführende Untersuchungen sowohl zur orthosterischen als auch zur allosterischen Ligandbindung dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war es, ein vollständiges Modell des muskarinergen M₂-Rezeptors zu generieren, das in der Lage ist sowohl die Gegebenheiten der orthosterischen als auch der allosterischen Bindungstasche wiederzugeben.

Als Vorlage für die transmembranären Bereiche diente die einzige Kristallstruktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, das bovine Rhodopsin, die im Jahr 2000 von Palczweski *et al.* aufgeklärt wurde. Die Strukturen der verbindenden Loopelemente konnten, unter Berücksichtigung der Sekundärstrukturvorhersagen für diese Bereiche, über Fragmente aus der *Protein Data Bank* ergänzt werden.

Das Proteinmodell zeigte sich unter Vakuumbedingungen, in einer membranähnlichen Umgebung aus Tetrachlorkohlenstoff/ Wasserschichten und auch in einer Phospholipidmembran stabil. Die Ergebnisse wurden miteinander verglichen und weisen darauf hin, dass Moleküldynamiksimulationen im Vakuum unter geeigneten Bedingungen mit solchen in einer Phospholipidmembran zu vergleichen sind. Die Vakuumbedingungen sind allerdings nicht in der Lage Wechselwirkungen mit der Umgebung z.B. die Bedeutung von Wassermolekülen wiederzugeben. Sowohl die Membranumgebung als auch die 3-Phasenbox können diese Informationen im Gegensatz zu den Vakuumbedingungen geben.

Anschließend wurden zunächst Agonisten und Antagonisten der orthosterischen Bindungsstelle untersucht. Diese befindet sich zwischen den transmembranären Helices und ist zwischen den muskarinergen Rezeptoren hochkonserviert. Hierbei zeigte sich das Modell als geeignet sowohl die bekannten Mutationsstudien als auch die Affinität der Liganden zum Rezeptor wiederzugeben.

Die allosterischen Modulatoren besitzen eine Bindungsstelle im Bereich der extrazellulären Loops, so dass bei dem Aufbau des Modells besonderes Augenmerk auf diese Strukturen gelegt wurde. In der anschließenden Untersuchung mit strukturell verschiedenen allosterischen Modulatoren wurde ein Bindungsmodus identifiziert, der die unterschiedlichen Affinitäten der Liganden wiedergibt. Es wurden aber weder für die orthosterischen noch für die allosterischen Liganden 3D-QSAR-Untersuchungen durchgeführt.

Aufgrund der identifizierten Bindungstasche im Wildtyp-M₂-Rezeptormodell wurden virtuelle Punktmutanten untersucht, die Aussagen über die Subtypselektivität der Substanzen beinhalten. Das Proteinmodell zeigt sich auch in diesem Fall als geeignet die experimentellen Ergebnisse zu erklären und zu visualisieren, lässt aber auch eine Vorhersage des Effektes der Mutation bei anderen Substanzen zu.

7 LITERATUR

- [1] GPCRDB: Information system for G protein-coupled receptors (GPCRs). GPCR-Datenbank unter World Wide Web:
URL: <http://swift.embl-heidelberg.de/7tm/> (Zugriff im November 2003)
- [2] Fraser, C.M., Lee, N.H.; Pellegrino, S.M., Kerlavage A.R.: Molecular properties and regulation of G-protein-coupled receptors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **1994**, 49, 113-156
- [3] Kolakowski, L. F. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **1994**, 2, 1-7
- [4] Gether, U.: Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **2000**, 21, 90-113
- [5] Gunnarson, I.; Andersson, P.; Wikberg, J.; Lundstedt, T.: Multivariate analysis of G-protein-coupled receptors. *J. Chemometrics* **2003**, 17, 82-92
- [6] Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B.A.; LeTrong, I.; Teller, D.C.; Okada, T.; Stenkamp, R.E.; Yamamoto, M.; Miyano, M.: Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor. *SCIENCE* **2000**, 289, 739-745
- [7] Teller, D.C.; Okada, T.; Behnke, C.A.; Palczewski, K.; Stenkamp, R.E.: Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* **2001**, 40 (26), 7761- 7772
- [8] Bourne, H.R.; Meng, E.C.: Rhodopsin sees the light. *SCIENCE* **2000**, 289, 733-7734
- [9] Baldwin, J.M.: Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **1994**, 6, 180-190
- [10] Ballesteros, J.A.; Shi, L.; Javitch, J.A.: Structural Mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of Rhodopsin for structure-function analysis of Rhodopsin-like receptors. *Mol. Pharmacol.* **2001**, 60 (1), 1-19
- [11] Qian, B.; Soyer, O.S.; Neubig, R.R.; Goldstein, R.A.: Depicting a protein's two faces: GPCR classification by phylogenetic tree-based HMMs. *FEBS Lett.* **2003**, 554(1-2), 95-99
- [12] Unger V.M., Schertler G.F.X., Baldwin J.M.: An alpha carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J. Mol Biol* **1997**, 272, 144-164
- [13] Huang, E.S.: Construction of a sequence motif characteristic of aminergic G protein-coupled receptors. *Protein Sci.* **2003**, 12(7),1360-1367
- [14] Boyd, N.D.; Kage, R.; Dumas, J.J.; Krause, J.E.; Leeman, S.E.: The peptide binding site of the substance P (NK-1) receptor localized by a photoreactive analogue of substance P: presence of a disulfide bond. *Proc. Natl. Acad. Sci. Pharmacology* **1996**, 93, 433-437
- [15] Mirzadegan, T.; Benkő, G.; Filipek, S.; Palczewski, K.: Sequence analyses of G-protein-coupled receptors. similarities to rhodopsin. *Biochemistry* **2003**, 42 (10), 2759-2767

- [16] Kim, J.E.; Pan, D.; Mathies, R.: Picosecond dynamics of G-protein coupled receptor activation in Rhodopsin from time-resolved UV resonance raman spectroscopy. *Biochemistry* **2003**, 42(18), 5169-5175
- [17] Malherbe, P.; Kratochwil, N.; Knoflach, F.; Zenner, M.-T.; Kew, J.N.C.; Kratzeisen, C.; Maerki, H.P.; Adam, G.; Mutel V.: Mutational Analysis and molecular modelling of the allosteric binding site of a novel, selective, noncompetitive antagonist of the metabotropic glutamate 1 receptor, *J. Biol. Chem.* **2002**, 278 (10), 8340-8347
- [18] Hakak, Y.; Shrestha, D.; Goegel, M.C.; Behan, D.P.; Chalmers, D.T.: Global analysis of G-protein-coupled receptor signaling in human tissues. *FEBS Lett.* **2003**, 550(1-3):11-17
- [19] Karnik, S.S.; Gogonea, C.; Patil, S.; Saad, Y.; Takezako, T.: Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends Endocrinol Metab.* **2003**, 14(9), 431-437
- [20] Hertlitz, S., Garcia, D.E.; Mackie, K.; Hille, B.; Scheuer, T.; Catterall, W.A.: Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein β subunits. *Nature* **1996**, 380, 258–262
- [21] Mullaney, I.; Mitchell, F.M.; McCallum, J.F.; Buckley, N.J., Milligan, G.: The human muscarinic M₁ acetylcholine receptor, when expressed in CHO cells, activates and downregulates Gq and G11 equally and non-selectively. *FEBS Lett* **1993**, 324, 241–245
- [22] van de Westerlo, E.; Yang, J.; Logsdon, C.; Williams, J.A.: Down-regulation of the G-proteins Gq alpha and G11 alpha by transfected human M₃ muscarinic acetylcholine receptors in Chinese hamster ovary cells is independent of receptor down-regulation. *Biochem. J.* **1995**, 310, 559–563
- [23] Struckmann, N., Schwering, S.; Wiegand, S.; Gschnell, A.; Yamada, M.; Kummer, W.; Wess, J., von Haberberger, R.: Role of Muscarinic Receptor Subtypes in the Constriction of Peripheral Airways: Studies on Receptor-Deficient Mice *Mol Pharmacol* 64:1444–1451, 2003
- [24] Huang, P.; Visiers, I.; Weinstein, H.; Liu-Chen, L.-Y.: The local environment at the cytoplasmic end of TM6 of the μ opioid receptor differs from those of rhodopsin and monoamine receptors: introduction of an ionic lock between the cytoplasmic ends of helices 3 and 6 by a L.6.30(275)E mutation inactivates the μ opioid receptor and reduces the constitutive activity of its T6.34(279)K mutant. *Biochemistry* **2002**, 41, 11972-11980
- [25] Ballesteros, J.A.; Jensen, A.D.; Liapakis, G.; Rasmussen, S.G.; Shi, L.; Gether, U.; Javitch, J.A.: Activation of the β_2 adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 29171-29177
- [26] Kostenis, E.; Gomeza, J.; Lerche, C.; Wess J.: Genetic Analysis of Receptor-G α_q Coupling Selectivity. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (389), 23675–23681

- [27] Kostenis, E.; Conklin B.R.; Wess, J.: Molecular basis of receptor/G protein coupling selectivity studied by coexpression of wild type and mutant m2 muscarinic receptors with mutant $G\alpha_q$ subunits. *Biochemistry* **1997**, 36(6), 1487-1495
- [28] Samama, P.; Cotecchia, S.; Costa, T.; Lefkowitz, R. J. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* **1993**, 268, 4625-4636
- [29] Lefkowitz, R.J.; Cotecchia, S.; Samama, P.; Costa, T.: Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* **1993**, 14, 303-307
- [30] Burstein, E.S.; Spalding, T.A.; Brann, M.R.: Constitutive activation of chimeric m2/m5 muscarinic receptors and delineation of G-protein coupling selectivity domains. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 51, 539-544
- [31] Schmidt, C.; Li, B.; Bloodworth, L.; Erlenbach, I.; Zeng, F.Y.; Wess, J.: Random mutagenesis of the M_3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in yeast. Identification of point mutations that "silence" a constitutively active mutant M_3 receptor and greatly impair receptor/G protein coupling. *J Biol Chem.* **2003**, 278(32), 30248-30260
- [32] Spalding; T.A.; Burstein, E.S.; Wells, J.W.; Brann M.R.: Constitutive activation of the m5 muscarinic receptor by a series of mutations at the extracellular end of transmembrane 6. *Biochemistry* **1997**, 36(33), 10109-10116
- [33] Costa, T.; Herz, A.: Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, 86, 7321-7325.
- [34] Gether, U.; Kobilka, B. K.: G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **1998**, 273, 17979-17982
- [35] Seifert, R.; Wenzel Seifert, K.; Gether, U.; Kobilka, B.K.: Functional differences between full and partial agonists: evidence for ligand-specific receptor conformations. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, 297, 1218-1226.
- [36] Schwartz, T.W.; Rosenkilde, M.M.: Is there a 'lock' for all agonist 'keys' in 7TM receptors? *Trends Pharmacol Sci* **1997**, 17, 213-216
- [37] Hulme, E.C.; Lu, Z.-L.; Bee, M.; Curtis, C.A.M.; Saldanha, J.: The conformational switch in muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci.* **2001**, 68, 2495-2500
- [38] Prioleau, C.; Visiers, I.; Ebersole, B.J.; Weinstein, H.; Sealfon, S.C.: Conserved helix 7 tyrosine acts as a multistate conformational switch in the 5HT_{2C} receptor. *J. Bio. Chem.* **2002**, 277(39), 36577-36584
- [39] Gomes, I.; Jordan, B.A.; Gupta, A.; Rios, C.; Trapaidze, N.; Devi L.A.: G Protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med* **2001**, 79, 226-242

- [40] Chabre, M.; Cone, R.; Saibil, H.: Biophysics: is rhodopsin dimeric in native retinal rods? *Nature*. **2003**, 426(6962), 30-31; discussion 31
- [41] Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K.: Biophysics (communication arising): Is rhodopsin dimeric in native retinal rods? *Nature*. **2003**, 426(6962), 31
- [42] Park, P.S.; Wells, J.W.: Monomers and oligomers of the m(2) muscarinic cholinergic receptor purified from sf9 cells. *Biochemistry*. **2003**, 42(44),12960-71
- [43] Miyazawa, A.; Fujiyoshi, Y.; Unwin, N.: Structure and Gating Mechanism of the Acetylcholine Receptor Pore. *Nature* **2003** 423, 949-955 (PDB 1OED)
- [44] Kubo, T.; Fukuda, K.; Mikami, A.; Maeda, A.; Takahashi, H.; Mishina, M.; Haga, T.; Haga K.; Ichiyama, A.; Kangawa, K.; Kojima, M.; Hisayuki, M.; Hirose, T.; Numa S: Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **1986**, 323, 411-416
- [45] Bonner, T.I.; Buckley, N.J.; Young A.C.; Brann M.R.: Identification of a family of muscarinic Acetylcholine receptor genes. *Science* **1987**, 237, 527-532
- [46] Peralta, E.G.; Ashkenazi, A.; Winslow, J.W.; Smith, D.H.; Ramachandran, J.; Capon D.J.: Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J*. **1987**, 6, 3923-3929
- [47] Wess, J.: Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. *Trends Pharmacol Sci*. **2003** , 24(8), 414-420
- [48] Bymaster, F.P.; McKinzie, D.L.; Felder, C.C.; Wess, J.: Use of M₁-M₅ knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochem. Res*. **2003**, 28, 437-442
- [49] Jones, S.V.P.: Muscarinic receptor subtypes: Modulation of ion channels. *Life Sci*. **1993**, 52, 457-467
- [50] Wotta, D.R.; El Fakahany, E. E.: Muscarinic receptor-mediated activation of nitric oxide synthase. *Drug. Dev. Res*. **1997**, 40, 205-214
- [51] Qian, N.-X.; Russell, M.; Johnson, G.L.: Acetylcholine muscarinic receptor regulation of the RAS/RAF/MAP kinase pathway. *Life Sci*. **1995**, 56 (11/12), 945-949
- [52] Eglen, R.M.; Whiting, R.L.: Heterogeneity of vascular muscarinic receptors. *J. Auton. Pharmacol*. **1990**, 10, 233-255
- [53] Krejčí, A.; Tuček, S.: Quantitation of mRNAs for M₁ to M₅ subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol. Pharmacol*. **2002**, 61 (6), 1267-1272
- [54] Willmy-Matthes, P.; Leineweber, K.; Wangemann, T.; Silber, R.E.; Brodde, O.E.: Existence of functional M(3)-muscarinic receptors in the human heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. **2003** [Epub]

- [55] Griffin, M.T.; Matsui, M.; Shehnaz, D.; Ansari, K.Z.; Taketo, M.M.; Manabe, T.; Ehlert, F.J.: Muscarinic agonist-mediated heterologous desensitization in isolated ileum requires activation of both muscarinic M₂ and M₃ receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **2003** [Epub]
- [56] Murthy, K.S.; Zhou, H.; Grider, J.R.; Brautigan, D.L.; Eto, M.; Makhoulf, G.M.: Differential signalling by muscarinic receptors in smooth muscle: m₂-mediated inactivation of myosin light chain kinase via Gi₃, Cdc42/Rac1 and p21-activated kinase 1 pathway, and m₃-mediated MLC20 (20 kDa regulatory light chain of myosin II) phosphorylation via Rho-associated kinase/myosin phosphatase targeting subunit 1 and protein kinase C/CPI-17 pathway. *Biochem J.* **2003**, 374(1), 145-55
- [57] Kim, J.; Isokawa, M.; Ledent, C.; Alger, B.E.: Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J. Neurosci.* **2002**, 22(23), 10182-10191
- [58] Cao, Y.; Zhang, M.; Wu, C.; Lee, S.; Wroblewski, M.E.; Whipple, T.; Nagy, P.I.; Takacs-Novak, K.; Balazs, A.; Toros, S.; Messer, W.S. Jr.: Synthesis and biological characterization of 1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridyl-1,2,5-thiadiazole derivatives as muscarinic agonists for the treatment of neurological disorders. *J Med Chem.* **2003** 46(20), 4273-4286
- [59] Sterin-Borda, L.; Ganzinelli, S.; Berra, A.; Borda, E.: Novel insight into the mechanisms involved in the regulation of the m₁ muscarinic receptor, iNOS and nNOS mRNA levels. *Neuropharmacology.* **2003**, 45(2), 260-269
- [60] Unno, T.; Kwon, S.-C.; Okamoto, H.; Irie, Y.; Kato, Y.; Matsyama, H.; Komori, S.: Receptor signaling mechanisms underlying muscarinic agonist-evoked contraction in guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, 139, 337-350
- [61] Fink-Jensen, A.; Fedorova, I.; Wortwein, G.; Woldbye, D.P.; Rasmussen, T.; Thomsen, M.; Bolwig, T.G.; Knitowski, K.M.; McKinzie, D.L.; Yamada, M.; Wess, J.; Basile, A.: Role for M₅ muscarinic acetylcholine receptors in cocaine addiction. *J Neurosci Res.* **2003**, 74(1), 91-96
- [62] Gomeza, J.; Shannon, H.; Kostenis, E.; Felder, C.; Zhang, L.; Brodtkin, J.; Grinberg, A.; Sheng, H.; Wess, J.: Pronounced pharmacologic deficits in M₂ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Neurobiology* **1999**, 96, 1692-1697
- [63] Ben-Chaim, Y.; Tour, O.; Dascal, N.; Parnast, I.; Parnas, H.: The M₂ muscarinic G-protein-coupled receptor is voltage-sensitive. *J. Bio. Chem.* **2003**, 278(25), 22482-22491
- [64] Salín-Pascual, R.J.; Díaz-Muñoz, M.; Rivera-Valerdi, L.; Ortiz-López, L.; Blanco-Centurión C.: Decrease in muscarinic M₂ receptors from synaptosomes in the pons and hippocampus after REM sleep deprivation in rats. *Sleep Res.* **1998**, 1(1), 19-23
- [65] Coulson, F.R.; Jacoby, D.B.; Fryer, A.D.: Insulin regulates neuronal M₂ muscarinic receptor function in the ileum of diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **2003**, 10 [Epub]

- [66] Mulugeta, E.; El-Bakri, N.; Karlsson, E.; Elhassan, A.; Adem, A.: Loss of muscarinic M(4) receptors in spinal cord of arthritic rats: implications for a role of M(4) receptors in pain response. *Brain Res.* **2003**, 982(2), 284-7
- [67] Clark, A.L.; Mitchelson, F.: The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br. J. Pharmac.* **1976**, 58, 323-331
- [68] Hulme, E.C.; Saldanha, J.W.; Bee, M.S.: Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31 (1), 29-34
- [69] Jones, P.G.; Page, K.M.; Curtis, C.A.M.; Hulme, E.C.: The functional role of the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors, probed by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 289, 429-437
- [70] Jones, P.G.; Page, K.M.; Curtis, C.A.M.; Hulme, E.C.: The role of charge interactions in muscarinic agonist binding, and receptor-response coupling. *Life Sci.* **1995** 56 (11/12): 891-898
- [71] Schimerlik, M.I.; Sheehan, D.M.; Vogel, W.K.: Site-directed mutagenesis on the M₂ muscarinic acetylcholine receptor: the significance of Tyr403 in the binding of agonists and functional coupling. *Mol. Pharmacol.* **1997**, 52, 1087-1094
- [72] Hulme, E. C.; Lu, Z.-L.; Ward, S. D. C.; Allmann, K.; Curtis, C. A. M.: The conformational switch in 7-transmembrane receptors: the muscarinic receptor paradigm. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, 375, 247-260
- [73] Heitz F., Trumpp-Kallmeyer S., Hibert M.F.: Site-directed mutagenesis of the putative human muscarinic M₂ receptor binding site. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, 380, 183-195
- [74] Vogel, W.K.; Peterson, G.L.; Broderick, D.J.; Mosser, V.A.; Schimerlik, M.I.: Double mutant cycle analysis of aspartate 69, 97, and 103 to asparagine mutants in the m₂ muscarinic acetylcholine receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 361(2), 283-294
- [75] van Rhee, A. M.; Jacobson, K. A.: Molecular Architecture of G Protein-Coupled Receptors. *Drug Development Res.* **1996**, 37, 1-38
- [76] Jakubík, J.; El-Fakahany, E.E; Tuček, S.: Evidence for a tandem two-site model of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (25), 18836-18844
- [77] Lanzafame, A.; Christopoulos, A.; Mitchelson, F.: Three allosteric modulators act at a common site, distinct from that of competitive antagonist, at muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1997**, 283, 278-285
- [78] Birdsall, N.J.M.; Lazareno, S., Popham, A.; Saladanha, J.: Multiple allosteric sites on muscarinic receptors. *Life Sci.* **2001**, 68, 2517-2524

- [79] Lazareno, S.; Popham, A.; Birdsall, N.J.M.: Allosteric interactions of staurosporine and other indocarbazoles with N-[methyl-³H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: Identification of a second allosteric site. *Mol. Pharmacol.* **2000**, 58, 194-207
- [80] Lazareno, S.; Popham, A.; Birdsall, N.J.: Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **2002**, 62, 1492-1505
- [81] Tränkle, C.; Weyand, O.; Schröter, A.; Mohr K.: Using a radioalloster to test predictions of the cooperativity model for gallamine binding to the allosteric site of muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *Mol. Pharmacol.* **1999**, 56, 962-965
- [82] Gnagney, A.; Ellis, J.: Allosteric regulation of the binding of [³H]acetylcholine to m2 muscarinic receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 52, 1767-1775
- [83] Tränkle, C.; Mohr, K.: Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors. *Mol. Pharmacol.* **1997**, 51, 674-682
- [84] Lee, N. H.; El- Fakahany, E. E.: Allosteric antagonists of the muscarinic acetylcholine receptor. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 42(2), 199-205
- [85] Waelbroeck, M.: Allosteric drugs acting at muscarinic acetylcholine receptors. *Neurochem. Res.* **2003**, 28(3/4), 419-422
- [86] Rimpler, H.: *Biogene Arzneistoffe*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1990**, S. 417 ff
- [87] Zlotos, D. P.; Buller, S.; Tränkle, C.; Mohr, K.: Bisquaternary Caracurine V derivatives as Allosteric Modulators of Ligand Binding to M₂ Acetylcholine Receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 10, 2529-2532
- [88] Proška, J.; Tuček, S.: Positive allosteric action of eburnamonine on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, 305, 201-205
- [89] Zlotos D.P., Buller S., Holzgrabe U., Mohr K.: bisquaternary dimers of strychnine and brucine. A new class of potent enhancers of antagonist binding to muscarinic M₂ receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 2627-2634
- [90] Lüllmann, H.; Ohnesorge, F. K.; Schauwecker, G. C.; Wassermann, O.: Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur. J. Pharmacol.* **1969**, 6, 241-247
- [91] Holzgrabe, U.; Bender, W.; Botero Cid, H. M.; Staudt, M.; Pick, R.; Pfletschinger, C.; Balatkova, E., Tränkle, C.; Mohr, K.: Ligands for the common allosteric site of acetylcholine M₂-receptors. Development and application. *Pharm. Acta Helvetiae* **2000**, 74, 149-155
- [92] Tränkle, C.; Andresen, I.; Lambrecht, G.; Mohr K.: M₂ receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: possible involvement of the common allosteric site. *Mol Pharmacol* **1996**, 53, 304-312

- [93] Ellis, J.; Seidenberg M.: Competitive and allosteric interactions of 6-Chloro-5,10-dihydro-5-[(1-methyl-4-piperidiny)acetyl]-11H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine-11-one hydrochloride (UHAH 37) at muscarinic receptors, via distinct epitopes. *Biochem Pharmacol* **1999**, 57, 181-186
- [94] S. Tuček, J. Proška: Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors (REVIEW). *Trends Pharmacol Sci* **1995**, 16, 205-212
- [95] Schröter, A.; Tränkle, C.; Mohr K.: modes of allosteric interactions with free and [³H]N-methylscopolamine-occupied muscarinic M₂ receptors as deduced from buffer-dependent potency shifts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2000**, 362, 512-519
- [96] Proška, J.; Tuček, S.: Mechanisms of steric and cooperative actions of alcuronium on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **1994**, 45, 709
- [97] Tuček S.: Is R R* dichotomy real? *Trends Pharmacol Sci.* **1997**, 18(11):414-416
- [98] Birdsall, N.J.M.; Cohen, F.; Lazareno, S.; Matsui, H.: Allosteric regulation of G-protein-linked receptors. *Biochem Soc Trans* **1995**, 23: 108-111
- [99] Hehre, W.J.; Huang, W.W.: *Chemistry in computation, an introduction to Spartan.* Wavefunction Inc. **1995**, S. 49
- [100] SPARTAN 5.1.1, Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA
- [101] Atkins, P. W.: *Quanten.* VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim **1993**, S. 297 f.
- [102] Stewart, J.J.: MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. *J Comput Aided Mol Des* **1990**, 4, 1-105
- [103] SYBYL 6.8.1: Tripos Inc., St. Louis, MO, USA
- [104] INSIGHT II 2000, FDISCOVER, Accelrys, San Diego, CA, USA
- [105] Hagler, A.T.; Huler, E.; Lifson, S.: Energy functions for peptides and proteins. I. Derivation of a consistent force field including the hydrogen from amide crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 5319-5327
- [106] Berendsen, H.J.C., van der Spoel, D. and van Drunen, R., GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation, *Comp. Phys. Comm.* **1995**, 91, 43-56.
- [107] Essman, U.; Perela, L.; Berkowitz, M.L.; Darden, T.; Lee H.; Pedersen L.G.: A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **1995**, 103, 8577-8592
- [108] Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; DiNola, A.; Haak, J.R.: Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, 81, 3684-3690
- [109] Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D.: GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.* **2001**, 7, 306-317

- [110] Höltje, H.-D.; Sippel, W.; Rognan, D.; Folkers, G.: Molecular Modeling. Basic principles and applications. Wiley-VCH, Weinheim, 2003, 27ff
- [111] Höltje, H.-D.; Sippel, W.; Rognan, D.; Folkers, G.: Molecular Modeling. Basic principles and applications. Wiley-VCH, Weinheim, 2003, 15 ff
- [112] Harvey, S.C.: Treatment of electrostatic effects in macromolecular modelling. *Proteins: Struct. Funct. Gen.* **1989**, 5, 78-92
- [113] Kyte, J.; Doolittle, R. F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **1982**, 157, 105-132
- [114] Ballesteros, J. A.; Weinstein, H.: Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci* **1995**, 25, 366-428
- [115] PredictProtein Meta Server
URL: <http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein>
- [116] Rost, B.: PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. *Meth. in Enzymolgy* **1996**, 266, 525-539
- [117] Krogh, A.; Larsson, B.; Heijne, G.; Songgammer, E.L.L.: Predicting transmembrane topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **2001**, 305, 567-580
- [118] McGuffin, L.J.; Bryson, K.; Jones, D.T.: The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics.* **2000**, 16, 404-405
PsiPred URL: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>
- [119] Meller, J.; Elber, R.; The design of an efficient and accurate threading algorithm: Choice of energies and statistical verifications, submitted
LOOPP URL: <http://cbsu.tc.cornell.edu/software/loopp/>
- [120] Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, 28, 235-242.
- [121] Ponder, J.W.; Richards, F.M.: Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *J Mol Biol* **1987**, 193, 775-791
- [122] Canutescu, A.A.; Shelenkov, A.A.; Dunbrack R.L. Jr.: A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Science* **2003**, 12, 2001–2014.
- [123] Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton J.M.: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **1993**, 26, 283-291
- [124] Morris, A. L.; MacArthur, M.W.; Hutchinson, E.G.; Thornton J.M.: Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* **1992**, 12, 345-364

- [125] Allen, F.H.: The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Cryst.* **2002**, B58, 380-388
- [126] Allen, F.H., Motherwell, W.D.S.: Applications of the Cambridge Structural Database in organic chemistry and crystal chemistry. *Acta Cryst.* **2002**, B58, 407-422
- [127] Kelley, L.A.; Gardner, S.P.; Sutcliffe, M.J.: An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally-related subfamilies. *Protein Engineering* **1996**, 9, 1063-1065
- [128] Laskowski, R.A.: SURFNET: A program for visualizing molecular surfaces, cavities and intermolecular interactions. *J. Mol. Graph.* **1995**, 13, 323-330
- [129] Kabsch, W.; Sander, C.: Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**, 22, 2577-2637
- [130] Kabsch, W.; Sander, C.: How good are predictions of protein secondary structure? *FEBS Letter* **1983**, 155(2), 179-182
- [131] Frishman, D.; Argos, P.: Knowledge-based protein secondary structure assignment. *PROTEINS* **1995**, 23, 566-579
- [132] GRID 21: Goodford, P. J.: A computational procedure for determining energetically favourable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 849-857
- [133] Boobbyer, D.N.; Goodford, P.J.; McWhinnie, P.M.; Wade, R.C.: New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1083-1094
- [134] Wade, R.C.; Clark, K.J.; Goodford, P.J.: Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 140-147
- [135] Copprey, M.: Membrane protein crystallisation. *J. Struct. Biol.* **2003**, 192, 108-132
- [136] Baldwin J.M., Unger V.M., Schertler G.F.X.: An alpha carbon template for the transmembrane helices of the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J. Mol Biol* **1997**, 272, 144-164
- [137] Bairoch, A.; Apweiler, R.: The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 45-48
- [138] Jöhren, K.; Höltje, H.-D.: A model of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor. *JCAMD* **2002**, 16, 795-801
- [139] Jakubík, J.; Tuček, S.: Positive allosteric interactions on cardiac muscarinic receptors: effects of chemical modifications of disulfide and carboxyl groups. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 289, 311-319
- [140] Hutchinson, E. G.; Thornton, J.M.: A revised set of potentials for beta turn formation in proteins. *Protein Science* **1994**, 3, 2207-2216

- [141] Milner-White, E.J.; Poet, R.: Loops, bulges, turns, and hairpins in proteins. *Trends Pharmacol Sci* **1987**, 12, 189-192
- [142] Juretic, D.; Jeroncic, A.; Zucic, D.: Sequence analysis of membrane proteins with the web server SPLIT." *Croatica Chemica Acta* **1999**, 72 (49), 975-997
- [143] Juretic, D., Jeroncic, A.; Zucic, D.: Prediction of initiation sites for protein folding. *Periodicum Biologorum* **1999**, 101 (4), 339-347
- [144] Stoll, F.: Theoretische Untersuchungen zur Entwicklung eines Prostacyclin-Rezeptor-modells. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2001**, S. 114 ff.
- [145] Ghosh, R.: Molecular Modelling Untersuchungen am Dopamin D₃ Rezeptor und seinen Liganden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2002**, S. 107 ff.
- [146] Anezo, C.; de Vries, A.H.; Höltje, H.-D.; Tieleman, D.P.; Marrink S.-J.: Methodological issues in lipid bilayer simulations, *J. Phys. Chem.* **2003**, B 107, 9424-9433
- [147] Bruno, I.J.; Cole, J.C.; Edgington, P.R.; Kessler, M.; Macrae, C.F.; McCabe, P.; Pearson, J.; Taylor, R.: New Software for searching the Cambridge Structural Database and visualizing crystal structures *Acta Cryst.* **2002**, B58, 389-397
- [148] Eger, K.; Troschütz, R.; Roth, H.J.: *Arzneistoffanalyse: Reaktivität – Stabilität – Analytik.* Dt. Apotheker Verlag 1999, S. 138 f. (Atropin), S. 142 f. (Scopolamin)
- [149] Ehlert, F.J.; Dehlen, F.M.: Influence of pH on the binding of scopolamine and *N*-methylscopolamine to muscarinic receptors in the corpus striatum and heart of rats. *Mol.Pharmacol.* **1990**, 38, 143-147
- [150] Staudt, M.; Tränkle, C.; Mohr, K.; Holzgrabe, U.: Contribution of lateral substituents in heptane-bisammonium derivatives to the allosteric stabilization of antagonist binding to muscarinic receptors. *Life Sci.* **1998**, 62 (5), 423-429
- [151] Kerckhoff, H.; Höltje, H.-D.: Conformational analysis and receptor modelling of m1 and m2 selective antagonists. *Pharmazie* **1994**, 49, 566-573
- [152] Wess, J.; Gdula, D.; Brann, M.R.: Site-directed mutagenesis of the m3 muscarinic receptor: identification of a series of Threonine and tyrosine residues involved in agonist but not antagonist binding *EMBO J.* **1991**, 10, 3729-3734
- [153] Allman, K.; Page, K.M.; Curtis, C.A.M.; Hulme, E.C.: Scanning Mutagenesis Identifies Amino Acid Side Chains in Transmembrane Domain 5 of the M₁ Muscarinic Receptor that Participate in Binding the Acetyl Methyl Group of Acetylcholine *Mol. Pharmacol.*, **2000**; 58(1), 175-184
- [154] Gratteri, P., Cruciani, G.; Scapecchi, S., Romanelli, M.N.: Grid independent descriptors (GRIND) in the rational design of muscarinic antagonists. Rational approaches to drug design, Proceedings of the 13th European symposium on quantitative structure-activity relationships, Hrsg. Höltje, H.-D., Sippl, W., S. 241-243

- [155] Zlotos, D.P.: Stereochemistry of Caracurine V. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 864-865
- [156] Kuhn, A.: Molecular Modelling Untersuchungen an der Bindungsstelle allosterischer Modulatoren des Muscarin M₂ Rezeptors. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2002**, S. 99 f.
- [157] Wagener, M.; Holzgrabe, U.; Gasteiger, J.: Comparison of structurally different allosteric modulators of muscarinic receptors by self-organizing neural networks. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 185-193
- [158] Barbier, P.; Bolognesi, M.L.; Melchiorre, C.; Maggio, R.: Antagonist binding profile of the split chimeric muscarinic m2-trunc / m3-tail receptor. *Eur J Pharm* **1998**, *355*, 267-274
- [159] Seidenberg, M.; Ellis, J.: Interactions of alcuronium, TMB-8, and other allosteric ligands with muscarinic acetylcholine receptors: studies with chimeric receptors. *Mol Pharmacol.* **2000**, *58* (6), 1451-1460
- [160] Gnagey, A.; Seidenberg, M.; Ellis, J.: Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol* **1999**, *56* (6), 1245-1253
- [161] Buller, S.; Zlotos, D.P.; Mohr, K.; Ellis, J.: Allosteric site on muscarinic receptors: a single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivity of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands. *Mol Pharmacol* **2002**, *61* (1): 160-168
- [162] Archer, E.; Maignret, B.; Escrieut, C.; Pradayrol, L.; Fourmy, D.: Rhodopsin crystal: new template yielding realistic models of G-protein-coupled receptors? *Trends Pharmacol Sci* **2003**, *24*, 36-40
- [163] Pogozheva I.D., Lomize A.L., Mosberg H.I.: The transmembrane 7-alpha-bundle of rhodopsin: distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. *Biophys. J.* 1997 *72*: 1963-1985
- [164] Unger, V.M.; Schertler, G.F.X.: Low resolution structure of bovine Rhodopsin determined by electron cryo-microscopy. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 1776-17786
- [165] Mohr K., Tränkle C., Holzgrabe U.: Structure/Activity relationships of M₂ muscarinic allosteric modulators. *Receptors & Channels* **2003**, *9*, 229-240
- [166] Franken, C.; Tränkle, C.; Mohr, K.: Testing the specificity of allosteric modulators of muscarinic receptors in phylogenetically closely related H1-receptors. *Naunyn-Schmiedeneberg Arch. Pharmacol.* 2000, *361* (2), 107-112
- [167] Zahn, K.; Echstein, N.; Tränkle, C.; Sadée, W.; Mohr, K.: Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpine from an agonist into an antagonist. *JPET* **2002**, *301*, 720-728

- [168] Voigtländer, U., Jöhren, K.; Mohr, M.; Raasch, A.; Tränkle, C.; Buller, S.; Ellis, J.; Höltje, H.-D.; Mohr, K.: Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M₂ receptor that account entirely for the M₂/M₅ subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in *N*-Methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol* **2003**, 64, 21–31

8 ANHANG

A Abkürzungsverzeichnis, Einheiten

Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	Cambridge Crystallographic Database
CVFF	Consistent Valence Force Field
d.h.	das heißt
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
HF	Hartree-Fock
IP3	Inositoltriphosphat
M ₂ - Rezeptor	Muskarinernerger M ₂ -Rezeptor
NMS	<i>N</i> -Methylscopolamin
PDB	Protein Data Bank
PDB	Protein Data Bank
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionen- Konzentration
rmsd	Root mean square deviation
s.	Siehe
TM	Transmembranäre helikale Bereiche
vgl.	Vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Einheiten

Å	Ångstrom, 10 ⁻¹⁰ m
K	Kelvin (0 K = -273,15° C)
kcal	Kilocalorie (1 kcal = 4,186 kJ)
kDa	Kilo Dalton,
ps	Picosekunde (1 ps = 10 ⁻¹² s)

B Hardware

Die Berechnungen dieser Arbeit wurden mit den folgenden Rechnersystemen durchgeführt:

Silicon Graphics Workstations:

- IRIS INDIGO² R10000
- IRIS O2 R12000
- IRIS INDY R4000
- Origin 2000 mit 38 R10000 Prozessoren (am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Personal Computer

- Intel Pentium 4, 2,53 GHz, 512 MB RAM
- Intel Pentium 4 HT, 2,8 GHz, 512 MB RAM

C Software

DISCOVER	Rechenmodul des Programmpakets INSIGHT II der Firma Accelrys, mit dem molekülmechanische und moleküldynamische Berechnungen in verschiedenen Kraftfeldern durchgeführt werden können
EXCEL	Tabellenkalkulationsprogramm der Firma Microsoft
INSIGHT II	Grafikmodul des Programmpakets INSIGHTII der Firma Accelrys zum Strukturaufbau und zur Visualisierung
HOMOLOGY	INSIGHTII-Modul zur Generierung von Proteinmodellen
MOLCAD	Programm zur Untersuchung hydrophober Eigenschaften
NMRCLUST	Programm zur Einteilung eines Proteinensembles in Gruppen entsprechend der strukturellen Ähnlichkeiten
PROCHECK	Programme zur Überprüfung der stereochemischen Eigenschaften von Proteinstrukturen
SYBYL	Molecular-Modelling-Paket der Firma TRIPOS mit Schnittstellen zu dem Programm MOLCAD
GRID	Programm zur Berechnung von molekularen Interaktionsfeldern
CONQUEST	Software zur Struktursuche in der <i>Cambridge Structural Database</i>
SPARTAN	Software-Paket zur Durchführung von ab-initio- und semiempirischen Berechnungen, das auch umfangreiche Visualisierungsmöglichkeiten bietet
SURFNET	Programm zur Visualisierung von Hohlräumen und Oberflächen in Proteinen
STRIDE	Zusätzliches Programm zur Bestimmung von Sekundärstrukturelementen
GROMACS	Molecular Modelling-Software zur Berechnung von Moleküldynamik-Simulationen in einer Lösungsmittelbox
SCWRL	Programm zur Optimierung der Position von Protein-Seitenketten Computermodellen nach Mutation
DeCipher	INSIGHTII-Modul zur Berechnung von Energien

D Aminosäuren: Ein- und Dreibuchstabencode

Aminosäure	Dreibuch- stabencode	Einbuch- stabencode
Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

E β -Turn-Typen

Type	Phi(i+1)	Psi(i+1)	Phi(i+2)	Psi(i+2)	
I	-60	-30	-90	0	
II	-60	120	80	0	
VIII	-60	-30	-120	120	
I'	60	30	90	0	
II'	60	-120	-80	0	
VIa1	-60	120	-90	0	cis-proline(i+2)
VIa2	-120	120	-60	0	cis-proline(i+2)
VIb	-135	135	-75	160	cis-proline(i+2)
IV	turns excluded from all the above categories				

F Thornton's Frequencies

RESIDUE PREFERENCES IN BETA TURNS

OVERALL TURN POTENTIALS AND POSITIONAL POTENTIALS

The columns represent the positional potentials for each residue at each position in beta turns.

residue	l	l+1	l+2	l+3	overall
I	0,66	0,61	0,42	0,68	0,59
F	0,98	0,66	0,96	0,95	0,89
V	0,72	0,7	0,54	0,84	0,7
L	0,73	0,67	0,47	0,78	0,66
W	0,62	0,65	0,76	0,79	0,7
M	0,7	0,48	0,41	0,68	0,57
A	0,81	0,96	0,66	0,89	0,83
G	1,09	1,04	2,14	1,64	1,48
C	1,42	0,73	0,98	1,2	1,08
Y	1,04	0,75	0,83	1,07	0,92
P	1,48	2,45	0,63	0,96	1,38
T	1,08	0,79	0,94	1,2	1
S	1,29	1,23	1,06	1,03	1,15
H	1,25	0,95	1,16	0,93	1,07
E	0,87	1,35	0,92	0,89	1,01
N	1,54	1,02	2,14	1,06	1,44
Q	0,89	0,94	0,93	1,01	0,94
D	1,56	1,24	1,86	0,99	1,41
K	0,8	1,22	0,94	1,1	1,01
R	0,69	0,93	0,75	0,93	0,82

G Eingabedateien

FDISCOVER

Beispielprotokoll einer MDS mit orthosterischem Ligand und vorgeschalteter Energieminimierung in FDISCOVER. Simulationen ohne Ligand bzw. mit zusätzlichem allosterischen Ligand verwenden das gleiche Protokoll.

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
  overlap = 0.01
  cutoff = 15
  cutdis = 14
  swtdis = 1.5

  begin simulation
  * add-automatic bond torsion valence out-of-plane
    force omega to trans in molecule 1 except PRO *
  * using 5.0 kcal/mole
    force omega to cis/trans in residues PRO *
  * using 5.0 kcal/mole
  reduce
!
  set dielectric = 2.000000*r
!

  restrain main
  * molecule 1 residue ASP- 103
  * with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
  * molecule 1 residue TRP 155
  * with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
  * molecule 1 residue THR 187
  * with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
  * molecule 1 residue THR 190
  * with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
  * molecule 1 residue TRP 400
  * with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
  * molecule 1 residue TYR 403
  * with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
  * molecule 1 residue ASN 404
  * with a maximum force of 150.0 kcal/A2
!

  tethered list
  * add main
  * molecule 1 residue PHE 21 to ILE 86
  * add main
  * molecule 1 residue PRO 93 to LEU 102
  * add main
  * molecule 1 residue TYR 104 to LEU 154
  * add main
  * molecule 1 residue ALA 156 to LEU 160
```

```
*      add main
*      molecule 1 residue  ASN  183 to  VAL  186
*      add main
*      molecule 1 residue  PHE  188 to  GLY  189
*      add main
*      molecule 1 residue  ALA  191 to  THR  399
*      add main
*      molecule 1 residue  ALA  401 to  PRO  402
*      add main
*      molecule 1 residue  VAL  405 to  PHE  412
*      add main
*      molecule 1 residue  VAL  421 to  ALA  445
!
  template force with a force constant of 200.0 kcal/A2
*      no cross terms
*      no morse
*      for 500 iterations
*      using conjugate gradient
*      until the maximum derivative is less than 0.50000000 kcal/A
print energy/molecule
print molecule-molecule interactions
print hbonds
!
  initialize dynamics
*      template force constant of 200.0 kcal/A2
*      for 1000 iterations
*      at 310.000 K
*      steps of 1.000
*      no cross terms
*      no morse
*      write history file every 500 steps
print energy/molecule
print hbonds

  iloop = 1
100 resume dynamics
*      template force constant of 200.0 kcal/A2
*      for 5000 iterations
*      no cross terms
*      no morse
print energy/molecule
print molecule-molecule interactions
print hbonds
archive as file number iloop "m_scopolamin.arc"
iloop = iloop + 1
if iloop .le. 100 then 100

end
```

Protokoll der abschließenden Minimierung der mit NMRCLUST untersuchten Strukturen.

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
  overlap = 0.01
  cutoff = 15
  cutdis = 14
  swtdis = 1.5

  begin simulation
*   add-automatic bond torsion valence out-of-plane
  force omega to trans in molecule 1 except PRO *
*   using 5.0 kcal/mole
  force omega to cis/trans in residues PRO *
*   using 5.0 kcal/mole
  reduce
!
  set dielectric = 2.000000*r
!
  restrain main
*   molecule 1 residue ASP- 103
*   with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
*   molecule 1 residue TRP 155
*   with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
*   molecule 1 residue THR 187
*   with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
*   molecule 1 residue THR 190
*   with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
*   molecule 1 residue TRP 400
*   with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
*   molecule 1 residue TYR 403
*   with a maximum force of 150.0 kcal/A2
  restrain main
*   molecule 1 residue ASN 404
*   with a maximum force of 150.0 kcal/A2
!
  tethered list
*   add main
*   molecule 1 residue PHE 21 to ILE 86
*   add main
*   molecule 1 residue PRO 93 to LEU 102
*   add main
*   molecule 1 residue TYR 104 to LEU 154
*   add main
*   molecule 1 residue ALA 156 to LEU 160
*   add main
*   molecule 1 residue ASN 183 to VAL 186
*   add main
*   molecule 1 residue PHE 188 to GLY 189
*   add main
*   molecule 1 residue ALA 191 to THR 399
*   add main
*   molecule 1 residue ALA 401 to PRO 402
*   add main
*   molecule 1 residue VAL 405 to PHE 412
```

```
*      add main
*      molecule 1 residue  VAL  421 to  ALA  445
!
  template force with a force constant of 1000.0 kcal/A2
*      no cross terms
*      no morse
*      for 5000 iterations
*      using steepest descent
*      until the maximum derivative is less than 10.0000000 kcal/A
print energy/molecule
print hbonds
!
  template force with a force constant of 500.0 kcal/A2
*      no cross terms
*      no morse
*      for 5000 iterations
*      using conjugate gradient
*      until the maximum derivative is less than 1.0000000 kcal/A
print energy/molecule
print hbonds
!
  template force with a force constant of 500.0 kcal/A2
*      no cross terms
*      no morse
*      for 5000 iterations
*      using conjugate gradient
*      until the maximum derivative is less than 0.5000000 kcal/A
print energy/molecule
print hbonds
!
  template force with a force constant of 200.0 kcal/A2
*      no cross terms
*      no morse
*      for 5000 iterations
*      using conjugate gradient
*      until the maximum derivative is less than 0.0010000 kcal/A
print energy/molecule
print hbonds
!
end
```

GROMACS

Protokoll einer freien MD in der Membranumgebung

```
title                = Yo
cpp                  = /lib/cpp
include              = -I/home/joehren/GROMACS/KRAFTFELD
define               =
integrator           = md
dt                   = 0.002
nsteps               = 2500000
nstxout              = 1000
nstvout              = 1000
nstlog               = 5000
nstenergy            = 500
nstxtcout            = 500
xtc_grps             = Protein
energygrps           = Protein DPPC SOL Na Cl
nstlist              = 10
ns_type              = grid
pbc                  = xyz
rlist                = 0.9
coulombtype          = PME
rcoulomb             = 0.9
vdwtype              = Cut-off
rvdw                 = 0.9
tcoupl               = Berendsen
tc-grps              = Protein DPPC SOL Na Cl
tau_t                = 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t                = 310 310 310 310 310
Pcoupl               = Berendsen
tau_p                = 1.0 1.0
compressibility       = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p                = 1.0 1.0
gen_vel              = no
gen_temp             = 310
gen_seed             = 1975
constraints           = hbonds
```

Ein analoges Protokoll wurde auch in der 3-Phasenbox verwendet.

H Swissprot Einträge

Swissprot-Code	Muskarin-Rezeptor-Subtyp und Spezies
P11229	ACM1 human
Q9ERZ4	ACM2 human
P08172	ACM2 mouse
P06199	ACM2 pig
P10980	ACM2 rat
P20309	ACM3 human
P08173	ACM4 human
P08912	ACM5 human

I *Protein Data Bank*

Röntgenkristallstrukturen des bovinen Rhodopsins

PDB-Eintrag	Auflösung / Å
1GZM	2,65
1HZX	2,8
1L9H	2,6
1F88	2,8

J Cambridge Structural Database

Strukturen mit 3D-Koordinaten in der CCD

Ligand	CCD-Eintrag	
Acetylcholin	Mit Gegenion	Mit aromat. Käfig
	ACCHOB11	ACHRES
	ACCHOB12	ACHTPB
	ACHOBU	GEBMET
	ACHOLC	REDKIN
	ACHOLC01	
	ACHOLP	
	ACHTAR10	
	ACTART10	
	ACTART11	
	(S)-Hyoscyamin	HYOHBR
N-Methylscopolamin	DUTNIP	
	DUTNIP10	
	KEYWEQ	
	XACNAQ	
	CALQOW	
Scopolamin	HYOSBR	
	JAYZEO	
	KEYSOV	
	KEYTOX	
	TIDPOL	

K Skripte

Arc2pdb.bcl

Dieses Skript wandelt das Archiv-File einer Trajektorie in ein *multiple pdb* für die Auswertung mit NMRCLUST um.

```
#Info

#Liest ein .arc-File ein und wandelt das Protein in ein .pdb um.
#Trajectory speichern mit "put trajectory range n n+x 1 off none off
name.pdb

Define_Macro arc2pdb \

Lstring Molekuelname \
Int Konform_anzahl
Lstring fn
Int index

Set_Param_Pick Molekuelname MOLECULE_ASSEMBLIES
Foreach $index from 1 to $Konform_anzahl

  Get Molecule Archive Frame ($index) ($Molekuelname//".arc")
  ($Molekuelname//$index) -Reference_Object
  Put Molecule PDB ($Molekuelname//$index//"_1") (datenframe//$index) -
Transformed -Displayed -Insight_Style -Write_PSF
  fn = frame // $index

  Write $fn "%s" "MODEL      "
  Write $fn "%d" $index "\t"
  Write $fn "%s"
  Close $fn

  Delete Object (*)
End
  Unix ("pdbconcat.sh "// $Konform_anzahl)

End_Macro

Add_To_Pulldown arc2pdb Molecule
```

Stride2Monomer.pl

Funktion dieses Perl-Makros ist, die Ausgabedatei des Programms STRIDE in eine für INSIGHT II interpretierbare Monomertabelle umzuwandeln.

```
if ($ARGV[0]){
    $infile = $ARGV[0];
}else{
    print "Bitte geben Sie den Namen des Stride-Files ein: ";
    $eingabe = <STDIN>;
    chomp $eingabe;
    $infile = $eingabe;
}

($file) = split (/\/\./, $infile);
$outfile = $file."monomer.txt";
$infile = $file.".txt";
print ("$outfile \n");

open (INFILE , "$infile") or die "$infile could not be read";
open (OUTFILE , ">$outfile") or die "$outfile could not be opened";

$hnum = 1;
$tnum = 1;
$snum = 1;

while (<INFILE>){
    $inline = $_;
    @line = split /\t/, $inline;
    if ($inline[1] == /H/) {
        printf (OUTFILE "%s\t%s\n", $inline[0], $inline[1]);
    }
}
print (" \n");
close (INFILE);
```

Backbone.pl

Das Perl-Skript wird als Tool im Programmpakte GROMACS genutzt. Es dient dazu ein .itp für Backbone-Constraints aufzustellen.

```

#!/usr/bin/perl -w

# Dieses Skript erzeugt ein .itp-File zum tethern des Backbones.
#
#
if ($ARGV[0]){
    $infile = $ARGV[0];
}else{
    print "Bitte geben Sie den Namen des gro-Files ein: ";
    $eingabe = <STDIN>;
    chomp $eingabe;
    $infile = $eingabe;
}

($file) = split (/\/./, $infile);
$outfile = $file."posres.itp";
$infile = $file.".gro";
print ("$outfile \n");

open (INFILE , "$infile") or die "$infile could not be read";
open (OUTFILE , ">$outfile") or die "$outfile could not be opened";

$atomnum = 1;

print (OUTFILE"[ position_restraints ] \n");
print (OUTFILE"; atom type      fx      fy      fz \n");
    $inline = <INFILE>;
    $inline = <INFILE>;
while (<INFILE>){
    $inline = $_;
    if ($inline =~ / N /){
        printf (OUTFILE "%s%4s%s\n", ' ', $atomnum, '      1  1000.0
1000.0  1000.0');}
    if ($inline =~ / C /){
        printf (OUTFILE "%s%4s%s\n", ' ', $atomnum, '      1  1000.0
1000.0  1000.0');}
    if ($inline =~ / CA /){
        printf (OUTFILE "%s%4s%s\n", ' ', $atomnum, '      1  1000.0
1000.0  1000.0');}
    if ($inline =~ / O /){
        printf (OUTFILE "%s%4s%s\n", ' ', $atomnum, '      1  1000.0
1000.0  1000.0');}
    $atomnum ++;
}
print (" \n");
close (INFILE);

```


Es ist nicht möglich, allen Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis namentlich für die vielen interessanten und hilfreichen Diskussionen und Gespräche zu danken, daher beschränke ich mich auf einen Dank an alle für die sehr gute Zusammenarbeit und harmonische Atmosphäre im Arbeitskreis!

Einige Kolleginnen und Kollegen möchte ich allerdings doch namentlich erwähnen:

Innerhalb der „Teerunde“ wurden mit Andrea Vollbrecht, Dirk Claaßen-Houben, Andrea Hombrecher, Sonja Schlimme und Edith Tot viele Gespräche und Diskussionen geführt – auch durchaus arbeitsbezogen. Auch die spontanen „Kochorgien“ waren immer wieder lecker.

Andrea Hombrecher und Birgit Schlegel verdanke ich auch die sorgfältige und schnelle Korrektur meiner Arbeit.

Peter Sippel und Gisela Jessen halfen mir bei der Eingewöhnung in den Arbeitskreis und gewährten mir auch nach dem Verlassen des gemeinsamen Büros „Kaffeasy!“. Dank des direkten Kontakts zu Peter konnte ich die Systemadministration immer „hatunah“ miterleben und so viel Neues lernen.

Die Zusammenarbeit mit den Kolleginnen und Kollegen im achten Semester, zunächst Friederike Stoll, Gunther Stahl und Johannes Hermann, danach mit Britta Bröer, war stets unkompliziert.

Philipp Türk musste, vor allem in der letzten Phase meiner Arbeit, häufiger unter meinen Launen leiden. Ihm verdanke ich auch die Betrachtung der Arbeit von einer ganz anderen Seite her.

Ein ganz besonderer Dank geht zum Schluss an meine Eltern sowie an meine Schwester Andrea, die sich, obwohl vollkommen fachfremd, immer sehr für meine Arbeit interessiert und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Öhmchen, die leider den Abschluss der Arbeit nicht mehr miterleben durfte, die mich aber immer sehr unterstützt hat.

Name Kirstin Jöhren
Geburtsdatum 09. Oktober 1975
Geburtsort Köln

Schulbildung

1982-1986 GGS Im Kirchfeld, Leverkusen-Lützenkirchen
1986-1995 Marienschule Opladen, Gymnasium
1995 Abitur

Studium

Pharmaziestudium an der Heinrich-Heine-Universität
Oktober 1995 – Düsseldorf
Oktober 1999 Erstes Staatsexamen 1997
Zweites Staatsexamen 1999
Oktober 1999 – Pharmaziepraktikantin in der Löwen-Apotheke, Leverkusen-
April 2000 Lützenkirchen
April 2000 – Pharmaziepraktikantin am Institut für Pharmazeutische
November 2000 Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Dezember 2000 Approbation als Apothekerin

Wissenschaftliche Tätigkeit

November 2000 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für
Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf unter Anleitung von Prof. Dr. H.-D. Höltje
Thema: Der Muskarinerge M₂-Rezeptor – Theoretische
Betrachtungen des Bindungsmodus orthosterischer und
allosterischer Liganden
Seit November
2000 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für
Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

