

**Molecular Modelling Untersuchungen
an der Bindungsstelle allosterischer Modulatoren
des Muscarin M₂ Rezeptors**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Arne Kuhn

aus Berlin

Düsseldorf 2002

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

Gutachter: Prof. Dr. H.-D. Höltje

Gutachter: Prof. Dr. U. Kuckländer

Tag der mündlichen Prüfung: 13. April 2002

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1996 bis März 2002 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, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Lehrstuhl.

Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe und Herrn Prof. Dr. K. Mohr danke ich für die freundliche Zusammenarbeit, die Überlassung der experimentellen Daten und für viele hilfreiche Gespräche.

Herrn Prof. Dr. U. Kuckländer danke ich herzlich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

1	Einleitung	9
1.1	Muscarin-Rezeptoren	10
1.1.1	Einleitung	10
1.1.2	Kopplung mit unterschiedlichen G-Proteinen	12
1.1.3	Pharmakologische Untersuchungen	13
1.1.4	Physiologische Funktionen	14
1.1.5	Struktur der Muscarin-Rezeptoren	16
1.2	Allosterische Modulation an Muscarin-Rezeptoren	19
1.2.1	Allosterische Modulation	19
1.2.2	Messung der allosterischen Potenz	21
1.2.3	Allosterische Modulatoren	22
1.2.4	Struktur-Wirkungsbeziehungen	25
1.2.5	Pharmakophormodell	29
1.2.6	Einsatz allosterischer Modulatoren	31
2	Problemstellung	35
3	Methoden, Durchführung, Ergebnisse	37
3.1	Aufbau des Rezeptormodells	38
3.2	Sekundärstrukturvorhersage	38
3.2.1	Programme zur Sekundärstrukturvorhersage	39
3.2.2	Durchführung der Strukturvorhersagen	41
3.2.3	Vorhersage der Helixenden	43
3.2.3.1	Interpretation der Ergebnisse	43
3.2.3.2	Bacteriorhodopsin	45
3.2.3.3	Cytochrom-C-Oxidase	47
3.2.3.4	M ₂ -Rezeptor	49
3.2.3.5	'Helical capping'-Motive	51
3.2.4	Charakterisierung der Loopregionen	51

3.2.4.1	β-Turns	51
3.2.4.2	Vorhersage von β-Turns	52
3.3	Aufbau des M₂-Rezeptormodells	55
3.3.1	Auswahl der Modellvorlage	55
3.3.1.1	Strukturaufklärung bei GPCRs	55
3.3.1.2	Modellierung von GPCRs	56
3.3.1.3	Rhodopsinmodell von Pogozeva	58
3.3.2	Sequenzalignment	60
3.3.3	7-Helix-Modell des M ₂ -Rezeptors	61
3.3.3.1	Modellabsicherung	64
3.3.4	Datenbanksuche nach Loopfragmenten	66
3.3.4.1	„ <i>search-loop</i> “-Routine	66
3.3.4.2	Durchführung	67
3.3.4.3	Kriterien für die Auswahl geeigneter Strukturfragmente	69
3.3.4.4	Ergebnisse der Datenbanksuche	72
3.4	Aufbau des zweiten und dritten extrazellulären Loops	75
3.4.1	Einführung in das <i>Simulated-Annealing</i> -Verfahren	75
3.4.2	Ausgangsstruktur für die MD-Simulation	75
3.4.2.1	Untersuchung der Turnstruktur im Loop 2	76
3.4.2.2	Vervollständigung des Rezeptormodells	77
3.4.3	Simulation mit Lösungsmittel	78
3.4.3.1	Nutzung von GROMACS	79
3.4.3.2	Verwendung periodischer Randbedingungen	80
3.4.3.3	Verwendung eines Rezeptorfragments	80
3.4.4	Simulated-Annealing-Protokoll	82
3.4.4.1	Stabilisierung strukturierter Bereiche	82
3.4.4.2	Initialisierung	83
3.4.4.3	Temperaturverlauf der MD-Simulation	83

3.4.5	Kontrolle der Proteingeometrie mit PROCHECK.....	83
3.4.5.1	ϕ - ϕ -Winkelverteilung	84
3.4.5.2	Bindungslängen und -winkel	85
3.4.5.3	ω -Winkel.....	86
3.4.5.4	Seitenkettengeometrie	87
3.5	Liganden	88
3.5.1	Einleitung.....	88
3.5.2	Auswahl der Liganden	88
3.5.3	Durchführung der Konformationsanalyse	91
3.5.3.1	Ausgangsstrukturen	91
3.5.3.2	Simulated annealing.....	92
3.5.3.3	Xcluster	93
3.5.3.4	Geometrieoptimierung mit AM1	94
3.5.4	Alcuronium	94
3.5.5	Diallylcaracurin V.....	99
3.5.6	Tubocurarin	100
3.5.7	Vergleich mit anderen Modellen	105
3.6	Rezeptor-Ligand-Komplexe.....	105
3.6.1	Einleitung.....	105
3.6.2	Mutationsstudien	106
3.6.3	Chemische Modifikation der Bindungsstelle.....	107
3.6.4	Informationen aus dem Pharmakophormodell.....	108
3.6.4.1	Volumen der Bindungstaschen	108
3.6.4.2	Wechselwirkung der Liganden mit dem Rezeptor	109
3.6.5	Darstellung möglicher Bindungstaschen mit SURFNET.....	109
3.6.6	Darstellung des elektrostatischen Potentials mit MOLCAD.....	110
3.6.7	Darstellung molekularer Wechselwirkungsfelder mit GRID	111
3.6.8	Charakterisierung der Bindungstaschen	111

3.6.9	Volumen der Bindungstaschen	114
3.6.10	Initialmodelle der Ligand-Rezeptor-Komplexe	117
3.6.11	Disulfidbrücke im dritten extrazellulären Loop	121
3.6.12	Optimierung der Initialkomplexe	123
3.6.12.1	Kontrolle der CV-Kraftfeldparameter	123
3.6.12.2	Protokoll der MD-Simulation	124
3.6.12.3	Ergebnisse der Optimierung	124
3.6.13	Einbau des N-terminalen Fragments	126
3.6.13.1	Diallylcaracurin V	127
3.6.13.2	Alcuronium.....	128
3.6.13.3	Tubocurarin.....	129
3.6.14	Zweite Optimierung.....	130
3.6.14.1	Alcuronium.....	130
3.6.14.2	Diallylcaracurin V	132
3.6.14.3	Tubocurarin.....	133
3.6.15	PROCHECK-Analyse.....	133
3.6.16	Berechnung der Bindungsenergien	135
3.6.16.1	Elektrostatistischer Anteil der Bindungsenergie	136
3.6.16.2	Apolarer Anteil der Bindungsenergie	139
3.6.16.3	Vergleich mit experimentellen Daten	140
4	Diskussion _____	145
4.1	Vergleich mit der Rhodopsin-Struktur	146
4.2	Bindungsstelle des W84	150
4.3	Blockade der orthosterischen Bindungsstelle	152
5	Zusammenfassung _____	155
6	Literaturverzeichnis _____	157
7	Anhang _____	167

1 Einleitung

1.1 Muscarin-Rezeptoren

1.1.1 Einleitung

Der Begriff des Muscarin-Rezeptors geht auf die Definition von Sir Henry Dale zurück, nach der bereits 1914 zwei Arten von Acetylcholin-bindenden Rezeptoren unterschieden wurden. Muscarin-Rezeptoren werden demnach selektiv durch Muscarin aktiviert und durch Atropin gehemmt. Nikotin-Rezeptoren hingegen werden durch Nikotin aktiviert und durch Curare gehemmt. Aus heutiger Sicht erscheint die Aktivierung beider Rezeptoren durch denselben Neurotransmitter Acetylcholin eine der wenigen Gemeinsamkeiten zwischen Muscarin- und Nikotin-Rezeptoren zu sein. Die Weiterleitung des durch Acetylcholin übertragenen Reizes an den Synapsen erfolgt bei den beiden Rezeptortypen nach unterschiedlichen Mechanismen: Nikotin-Rezeptoren verändern als transmembranäre Ionenkanäle ihre Durchlässigkeit für Ca^{2+} -, K^+ - oder Na^+ -Ionen. Muscarin-Rezeptoren gehören dagegen zur großen Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die Bindung eines GPCR an die α -Untereinheit eines Guanin-Nucleotid-bindenden-Proteins (G-Protein), führt zur Abspaltung von Guanindiphosphat (GDP). Anschließend kann Guanintriphosphat (GTP) angelagert werden, und es erfolgt die Abspaltung der $\beta\gamma$ -Untereinheit. In diesem aktivierten Zustand kann das G-Protein nun weitere Effekte vermitteln, bis die α -Untereinheit GTP zu GDP und Phosphat hydrolysiert. Bei der Rückkehr zum inaktivierten Zustand bildet sich erneut das Trimer aus den drei Untereinheiten (siehe Abbildung 1.1).

Man unterscheidet heute fünf Subtypen des Muscarin-Rezeptors (M_1 – M_5), die durch molekularbiologische Untersuchungen eindeutig identifiziert werden konnten [1]-[4]. Durch das Exprimieren der Gene eines spezifischen Rezeptor-Subtyps in Zellkulturen, wurden neue Erkenntnisse über die Funktionen der einzelnen Muscarin-Rezeptoren gewonnen.

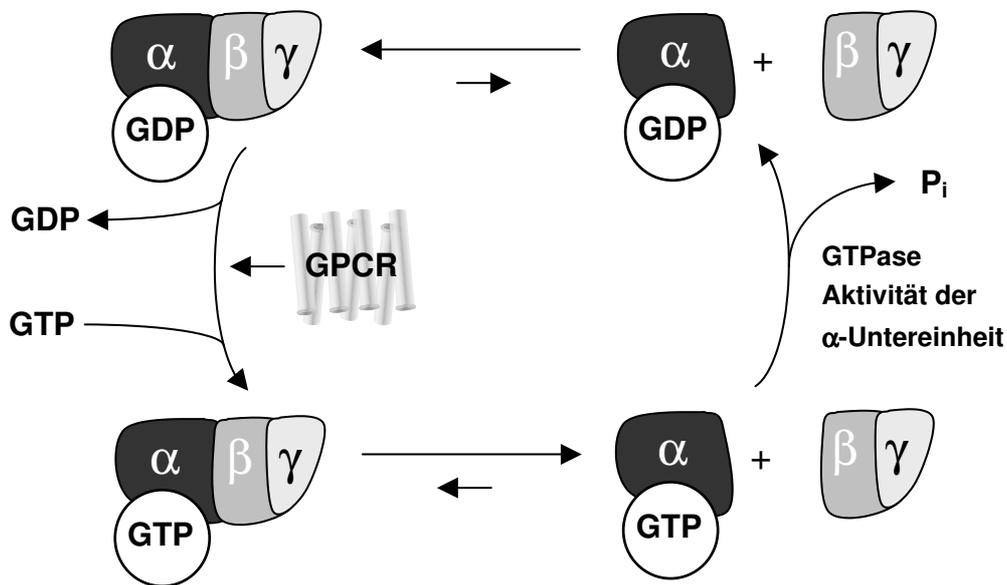


Abbildung 1.1: Regulation der G-Protein vermittelten Signalübertragung

Darüber hinaus konnten mit Hilfe dieser Zellkulturen Verfahren zur Lokalisation und pharmakologischen Unterscheidung einzelner Subtypen erprobt und verbessert werden. Entsprechend wurde die früher gebräuchliche Nomenklatur zur Unterscheidung von pharmakologisch definierten Subtypen als M_1 -, M_2 -, M_3 -, M_4 - und M_5 -Rezeptoren und Subtypen mit eindeutig genetischer Herkunft als m_1 -, m_2 -, m_3 -, m_4 - und m_5 -Rezeptoren vereinheitlicht. Da aufgrund des heutigen Kenntnisstands eine eindeutige Zuordnung zwischen den beiden Klassen möglich ist (m_1 entspricht dabei M_1 , m_2 entspricht M_2 usw.) werden nun in beiden Fällen die Subtypen als M_1 , M_2 , M_3 , M_4 und M_5 -Rezeptor bezeichnet [5]. Tabelle 1.1 faßt einige Eigenschaften der einzelnen Subtypen zusammen. Sie sollen in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

Tabelle 1.1: Eigenschaften von Muscarin-Rezeptoren. Abkürzungen siehe Text

	Rezeptor – Subtypen				
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Bevorzugtes G-Protein	G _q /G ₁₁	G _i /G _o	G _q /G ₁₁	G _i /G _o	G _q /G ₁₁
<i>Second messenger</i>	PLC, IP ₃ /DAG, Ca ²⁺ /PKC	AC (-)	PLC, IP ₃ /DAG, Ca ²⁺ /PKC	AC (-)	PLC, IP ₃ /DAG, Ca ²⁺ /PKC
Lokalisation	ZNS (Cortex, Hippocampus), Drüsen, Ganglien	ZNS (Hirnstamm), Herz, Glatte Muskulatur	glatte Muskulatur, Drüsen, ZNS	ZNS (Vorderhirn, Striatum)	ZNS (Substantia nigra)
Vermittelter Effekt	Inhibierung von Ionenkanälen (K _M -Typ)	Aktivierung von K ⁺ -Kanälen (βγ-Untereinheit), Inhibierung von Ca ²⁺ -Kanälen, negativ inotrop, negativ chronotrop	Kontraktion der glatten Muskulatur, Drüsensekretion	Inhibierung von Ca ²⁺ -Kanälen	

1.1.2 Kopplung mit unterschiedlichen G-Proteinen

Aufgrund der bevorzugten Kopplung mit unterschiedlichen G-Proteinen lassen sich die Muscarin-Rezeptor-Subtypen in zwei Gruppen einteilen. Die Subtypen M₂ und M₄ koppeln mit den α-Untereinheiten von G-Proteinen der G_i- und G_o-Familie. Durch die Aktivierung des Rezeptors wird Adenylatcyclase (AC) inhibiert, und somit die Bildung des *second messenger* cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP) verringert. Die Hemmung der AC kann in Abhängigkeit von ihrer vorliegenden Isoform über die α- oder βγ-Untereinheit des G-Proteins vermittelt werden.

M₁-, M₃- und M₅-Subtypen koppeln vor allem mit G-Proteinen der G_q/G₁₁-Familie. Hierbei führt die Abspaltung der α-Untereinheit nach der Bindung

eines Agonisten an den Rezeptor zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol in die *second messenger* Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP₃ induziert die Freisetzung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum und DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Neben der α -Einheit kann auch die abgespaltene $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins die Phospholipase C stimulieren. Diesen Weg können auch die M₂- und M₄-Subtypen zur Spaltung von Phosphatidylinositol nutzen. Neben diesen Hauptwegen der Reizweiterleitung wurden weitere Möglichkeiten beschrieben. Für den M₄-Rezeptor konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß die Kopplung mit G-Proteinen der G_s-Klasse möglich ist, durch die die Bildung von cAMP stimuliert wird [6].

Muscarin-Rezeptoren können so in Abhängigkeit von dem gebundenen G-Protein bei unterschiedlichen Zelltypen eine Vielzahl weiterer Funktionen modulieren. Auf zellulärer Ebene beeinflussen sie unter anderem die Aktivität verschiedener Ionenkanäle (M₁-M₅) [7], aktivieren die Phospholipase A₂ und Phospholipase D und stimulieren die NO-Synthetase (M₁, M₃, M₅) [8]. Außerdem können M₁- bzw. M₂-Rezeptoren das Wachstum und die Differenzierung der Zellen durch Modulation der Raf-Kinase (M₁, M₂) steuern [9]. Die physiologische Bedeutung dieser zumeist mit rekombinanten Rezeptoren gewonnenen Ergebnisse ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

1.1.3 Pharmakologische Untersuchungen

Pharmakologische Untersuchungen zeigen, daß Muscarin-Rezeptoren eine Vielzahl von Funktionen im menschlichen und tierischen Organismus übernehmen. So sind sie an der Weiterleitung von Aktionspotentialen in Neuronen beteiligt und beeinflussen Prozesse, die durch das zentrale Nervensystem (ZNS) gesteuert werden. Am Ende einer solchen Reiz-Reaktionskette findet man Muscarin-Rezeptoren an den parasymphatisch inner-vierten Erfolgsorganen.

Die eindeutige pharmakologische Zuordnung einer Funktion zu einem spezifischen Rezeptor-Subtyp ist aufgrund der geringen Selektivität der bisher verfügbaren Antagonisten nur möglich, wenn mehrere Verbindungen in der

Untersuchung berücksichtigt werden. Es stehen inzwischen eine Reihe von Affinitätskonstanten unterschiedlicher Antagonisten an ausreichend charakterisierten Subtypen zur Verfügung. Die Ableitung von Affinitäten aus Bindungsstudien oder Konzentrations-Wirkungsbeziehungen mehrerer Antagonisten führt somit zu einem spezifischen Datenprofil, das sich mit den bekannten Affinitäten der Antagonisten an den einzelnen Rezeptor-Subtypen vergleichen läßt. Auch mit dieser Methode konnte für einige muscarinerge Effekte kein Subtyp spezifiziert werden. Dies muß nicht unbedingt auf einen neuen Rezeptor-Subtyp hinweisen, denn es ist möglich, daß bei den Messungen im untersuchten Gewebe mehrere Subtypen gleichzeitig erfaßt wurden. Eine solche Subtypenmischung kann zu einem nicht erklärbaren Affinitätsprofil führen [5]. Die Lokalisation einzelner Subtypen durch selektive Antikörper oder durch die Bestimmung von spezifischer Rezeptor Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) zeigen tatsächlich die Coexprimierung verschiedener muscarinerge Subtypen. So läßt sich die mRNA von allen fünf Subtypen im Hippocampus nachweisen [10].

1.1.4 Physiologische Funktionen

Bisher konnten für einige Rezeptor-Subtypen Vorkommen und Funktion geklärt werden. M_2 -Rezeptoren findet man am Herzen im Vorhofmyokard und in den Schrittmacherzellen, durch die nach Aktivierung ein negativ inotroper bzw. negativ chronotroper Effekt ausgelöst wird. Der negativ chronotrope Effekt wird wahrscheinlich durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins vermittelt, die die Leitfähigkeit von K^+ -Kanälen erhöht und so die diastolische Depolarisation verlangsamt. Der negativ inotrope Effekt ist auf die Inhibierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle infolge der niedrigen cAMP-Konzentration zurückzuführen. Möglicherweise besitzt auch der M_1 -Rezeptor eine Funktion am Herzen, denn Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern und Messungen der mRNA lassen auf seine Anwesenheit schließen [11].

Die M_3 -Rezeptor-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der glatten Muskulatur führt zur Kontraktion. Auch der M_2 -Rezeptor konnte in Geweben der glatten Muskulatur nachgewiesen werden. Er wird hier im Vergleich zum M_3 -Rezeptor in bis zu viermal größerer Zahl exprimiert. Durch

die Hemmung der Adenylatcyclase kann der M_2 -Rezeptor hier Effekte des sympathischen Systems antagonisieren [12]. Auf die glatte Muskulatur der Gefäßwände wirkt die Aktivierung des M_3 -Rezeptors relaxierend. Dabei ist wahrscheinlich die Freisetzung von Stickstoffmonoxid von Bedeutung [13].

Drüsengewebe kann durch eine M_3 -Rezeptor-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration angeregt werden. An den Belegzellen der Magenschleimhaut, die für die Säuresekretion verantwortlich sind, findet man neben M_3 - auch M_1 -Rezeptoren. Da bekannt ist, daß die Säuresekretion über den M_1 -selektiven Antagonisten Pirenzepin gesenkt werden kann, könnte hier die Angriffsstelle von Pirenzepin liegen. Es wird aber auch ein indirekter Weg diskutiert, der die Hemmung der Säuresekretion durch eine verminderte Histaminfreisetzung aus den enterochromaffinartigen Zellen des Magens erklärt. Die Blockierung des M_1 -Rezeptors an diesen Zellen, könnte die Übertragung der vom Nervus vagus ausgehenden Reize behindern und somit die Histaminfreisetzung unterdrücken [14].

Neben ihrer Bedeutung für die ganglionäre Übertragung sind M_1 -Rezeptoren auch im Zentralnervensystem (ZNS) wichtig. Sie spielen hier wahrscheinlich bei Gedächtnis- und Lernprozessen eine Rolle. M_4 -Rezeptoren wurden im Bereich des ZNS u. a. im Vorderhirn, Hippocampus und Striatum gefunden. Allerdings ist ihre physiologische Funktion noch nicht eindeutig geklärt. Sie sind wahrscheinlich an willkürmotorischen Funktionen beteiligt. Ebenfalls unklar ist die Bedeutung des M_2 - und des M_5 -Rezeptors im ZNS.

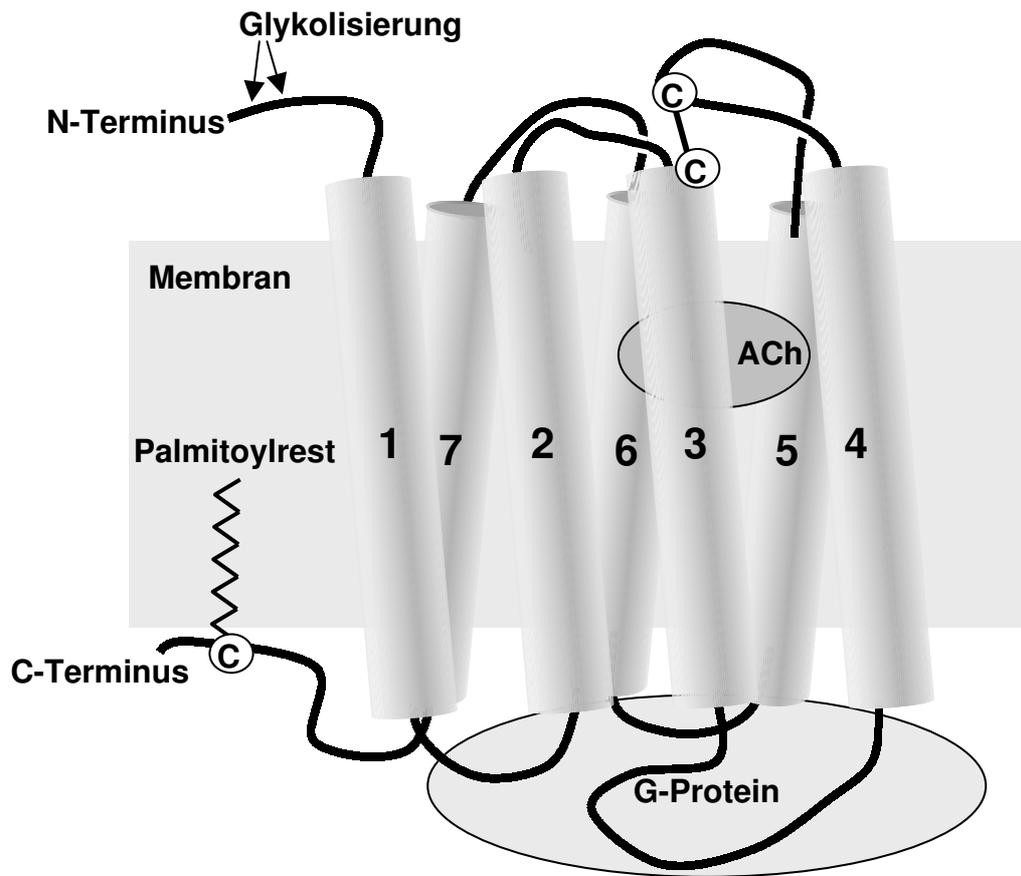


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Muscarin-Rezeptors. Zylinder kennzeichnen die transmembranären Helices. Die mögliche Bindungsstelle von Acetylcholin (ACh) ist abgebildet. Mit C gekennzeichnete Kreise verweisen auf die Lage der im Text behandelten Cysteine.

1.1.5 Struktur der Muscarin-Rezeptoren

Genauere Kenntnisse über die Tertiärstruktur der Muscarin-Rezeptoren sind im wesentlichen auf ihren transmembranären Bereich begrenzt. In allen GPCRs lassen sich diese Regionen als lipophile Sequenzabschnitte wiederfinden, die auch bei phylogenetisch entfernter verwandten Rezeptoren noch eine Sequenzidentität von 20-25% aufweisen. Auch in Hinblick auf den gemeinsamen Mechanismus der Reizvermittlung erscheint so die Annahme eines einheitlichen Aufbaus dieses Bereichs bei den GPCRs wahrscheinlich. Dies bestätigen auch eine Reihe von Mutationsstudien, bei denen die Mutation stark konservierter Aminosäuren in unterschiedlichen Rezeptortypen einen ähnlichen Effekt zeigte [15]. Vorstellungen über die Anordnung der sieben

Helices basieren im wesentlichen auf den kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Rhodopsins und auf Sequenzvergleichen umfangreicher Multialignments (vgl. Kapitel 3.3.1.2). Im September letzten Jahres wurde außerdem eine Röntgenkristallstruktur des Rhodopsins veröffentlicht, die in wesentlichen Teilen die bis dahin vertretenen Modellvorstellungen bestätigte [16].

In Abbildung 1.2 ist schematisch die Struktur eines Muscarin-Rezeptors dargestellt. Der transmembranäre Bereich dieses GPCR besteht aus sieben, fast ausschließlich α -helikalen Bereichen, die ringförmig in einem Bündel angeordnet sind. Verbunden werden sie durch jeweils drei extra- und intrazelluläre Loopbereiche. Bei allen Muscarin-Rezeptor-Subtypen findet man eine Disulfidbrücke zwischen zwei konservierten Cysteinen im zweiten extrazellulären Loop und in der dritten Helix [17][18]. Das N-terminale Ende des Rezeptors liegt im extrazellulären Bereich und besitzt eine oder mehrere Glykosylierungsstellen. Für den M_2 -Rezeptor konnte gezeigt werden, daß die Glykosylierung weder für die Exprimierung noch für die Funktion eine besondere Bedeutung besitzen [19]. Das C-terminale Ende ist intrazellulär lokalisiert. In diesem Bereich wurde ein palmitoyliertes Cystein gefunden, dessen Palmitoylrest in der Membran verankert ist. Untersuchungen am M_2 -Rezeptor zeigen keine absolute Notwendigkeit für dieses Strukturmerkmal bei der Wechselwirkung mit dem G-Protein. Allerdings konnte eine verstärkte Rezeptorfunktion beobachtet werden [20].

Aminosäuren im zweiten intrazellulären Loop und an den intrazellulären Enden der fünften und der sechsten transmembranären Helix sind für die selektive Erkennung von G-Proteinen einer bestimmten Familie wichtig. Die Aminosäuren der sechsten Helix zeigen allerdings beim inaktivierten Rezeptor ins Innere des Helixbündels. Es wird daher vermutet, daß sie erst nach der Aktivierung des Rezeptors aufgrund der hierbei durchlaufene Konformationsänderungen in Kontakt mit dem G-Protein treten können [21]. Gestützt wird diese Vermutung durch Ergebnisse von *Spin-Label*-Untersuchungen am Rhodopsin, die sich im Sinne einer Drehbewegung zumindest eines Teils der Helices 3 und 6 interpretieren lassen [22]. Auch die Auswirkungen bestimmter Punktmutationen

an Helix 3 muscarinergerezeptoren auf ihre Funktion legen diese Ansicht nahe [23].

Die Bindungsstelle des Acetylcholins liegt im Inneren des Helixbündels, etwa 10 Å von der extrazellulären Begrenzung der Membran entfernt. Mittels Mutationsstudien konnten in den Helices 3, 5, 6 und 7 Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bindung des Neurotransmitters Acetylcholin beteiligt sind. Wie in allen aminergen GPCRs findet sich ein Aspartat in der extrazellulären Hälfte der dritten Helix. Wechselwirkungen zwischen dem quartären Kopf des Acetylcholins und der Carboxylgruppe des Aspartats 3.32¹ sind bei der Bindung des Liganden wahrscheinlich. Prinzipiell zeigen Muscarinmodelle auch die Möglichkeit die quartäre Ammoniumgruppe über Wechselwirkungen mit den aromatischen Ringsystemen der Tyrosine 3.33, 6.51, 7.39 zu binden. Auch polare Kontakte der OH-Gruppen dieser Tyrosine sind an der Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes beteiligt. Weitere Aminosäuren deren Mutation die Bindung von Acetylcholin beeinflussen sind: Ser 3.36, Asn 3.37, Thr 5.39, Thr 5.42, Ala 5.46 und Asn 6.52 [23].

Zusätzlich zur Bindungsstelle des Acetylcholins und seiner Agonisten und Antagonisten existiert im extrazellulären Bereich eine allosterische Bindungsstelle, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurde. Auf die Möglichkeit der allosterischen Modulation der Rezeptorfunktion soll daher in zweiten Teil dieser Einleitung näher eingegangen werden

¹ Da die beschriebenen Aminosäuren in allen Subtypen des M-Rezeptors, vorliegen wurde die allgemeingültige Nomenklatur nach van Rhee und Jacobson verwendet [15]. 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.

1.2 Allosterische Modulation an Muscarin-Rezeptoren

1.2.1 Allosterische Modulation

Man spricht von einem allosteren System, wenn die Besetzung räumlich getrennter Bindungsstellen durch Liganden zu einer wechselseitigen Beeinflussung der Bindungszentren führt. Diese Definition soll anhand der Abbildung 1.3 für den Fall der Muscarin-Rezeptoren genauer beschrieben werden. Hilfreich ist hierbei die Unterscheidung zwischen orthosterischen und allosterischen Liganden. Zu den orthosterischen Liganden gehören alle Verbindungen, deren Bindung zur Aktivierung des Rezeptors führt (z.B. Acetylcholin, Carbachol) bzw. diesen Effekt durch kompetitive Bindung aufheben können (z.B. Atropin, N-Methylscopolamin (NMS)). Der ideale allosterische Ligand besitzt dagegen keine dieser Eigenschaften, sondern moduliert den Effekt gemäß der oben gegebenen Definition.

Abbildung 1.3 a) beschreibt den Prozeß der allosterischen Modulation, in einer allgemeingültigen Form. Der ternäre Komplex aus Rezeptor und den beiden Liganden kann hierbei auf zwei unterschiedlichen Wegen gebildet werden. Die Wechselwirkung zwischen dem orthosterischen und dem allosterischen Liganden ist im Schema nicht dargestellt. Unter der Annahme die beiden Bindungsstellen lägen nahe beieinander, ist eine direkte Wechselwirkung zwischen den beiden Liganden vorstellbar. Ebenfalls denkbar wäre eine durch die Liganden hervorgerufene Konformationsänderung des Rezeptors. In beiden Fällen werden sich durch die gegenseitige Beeinflussung der Bindungsstelle die Bindungskonstanten K_1 und K_3 bzw. K_2 und K_4 voneinander unterscheiden. Da es sich um eine wechselseitige Beeinflussung handelt, besitzen die Koeffizienten K_3/K_1 bzw. K_2/K_4 den gleichen Wert. Dieser Koeffizient wird als Kooperationsgrad α bezeichnet. Bei $\alpha < 1$ spricht man von positiver Kooperation. In diesem Fall ist die Affinität des allosterischen Liganden zum besetzten Rezeptor höher als zum freien Rezeptor und der vom orthosterischen Liganden vermittelte Effekt wird verstärkt. Bei negativer Kooperation ($\alpha > 1$) wird dieser Effekt entsprechend abgeschwächt. Ist $\alpha=1$ gilt $K_3 = K_1$ und $K_4 = K_2$. Obwohl allosterischer und orthosterischer Ligand an den Rezeptor binden, kommt es zu

keiner Veränderung des vom orthosterischen Liganden vermittelten Effekts. Man spricht in diesem Fall von neutraler Kooperation.

Ein Spezialfall wird für die allosterische Modulation der Muscarin-Rezeptoren diskutiert. Wie in Abbildung 1.3 b) gezeigt, wird hierbei durch die Bindung des allosterischen Modulators die Assoziation und Dissoziation des orthosterischen Liganden vollständig verhindert. Neben der in der Abbildung dargestellten direkten sterischen Blockade wäre auch eine durch den allosterischen Modulator induzierte Änderung der Rezeptorkonformation möglich [25]. Aber auch in diesem Spezialfall beruht die allosterische Modulation auf der unterschiedlichen Affinität des allosterischen Liganden zum freien und besetzten Rezeptor.

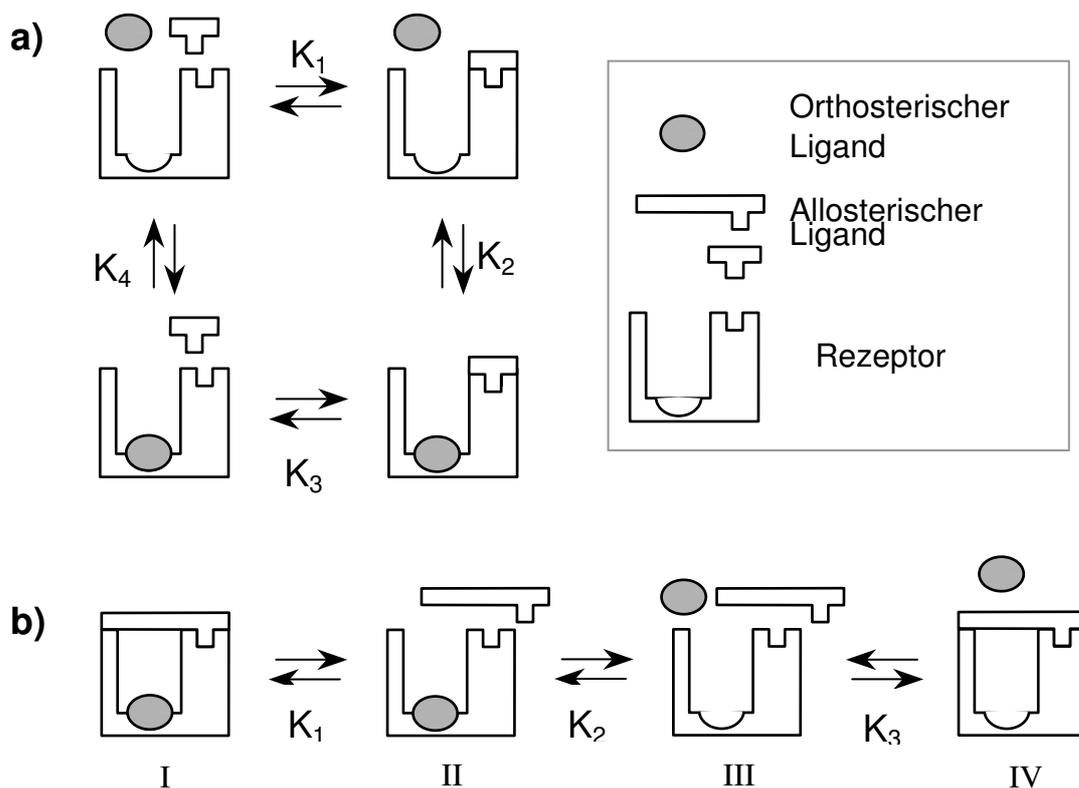


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der allosterischen Modulation der Muscarin-Rezeptoren nach Tuček und Proška [24].

Ergebnisse von Bindungsstudien mit dem allosterischem Modulator Alcuronium lassen sich im Sinne einer Blockade der orthosterischen Bindungsstelle interpretieren [24]. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Alcuronium die

Inaktivierung des M_2 -Rezeptors verhindert, wenn der Rezeptor Substanzen ausgesetzt wird, die kovalent an wichtige Aminosäuren der orthosterischen Bindungsstelle binden [25].

1.2.2 Messung der allosterischen Potenz

Durch kompetitive Bindungsstudien mit dem allosterischen Radioliganden [^3H]-Dimethyl-W84 können Affinitätskonstanten allosterischer Modulatoren ermittelt werden [26]. Man erhält die Affinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor (K_1 in Abbildung 1.3 a). Allerdings ist keine direkte Aussage über den Kooperationsgrad α möglich, denn dieser kann nur im Zusammenhang mit einem bestimmten orthosterischen Liganden ermittelt werden. Liegt der orthosterische Ligand in entsprechend hoher Konzentration während der Bindungsstudie vor, ist es prinzipiell möglich die Affinität des allosterischen Liganden zum besetzten Rezeptor (K_3 in Abbildung 1.3 a) zu messen [26]. Aus den beiden Bindungskonstanten (K_1, K_3) läßt sich anschließend der Kooperationsgrad berechnen.

Die Bindungsaffinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor und der Kooperationsgrad α können auch aus der Betrachtung des Wechselspiels zwischen ortho- und allosterischem Ligand abgeleitet werden. Gemessen wird hierbei der Anteil an gebundenem orthosterischen (Radio)liganden bei steigender Konzentration des allosterischen Modulators. Allerdings kann hierbei nicht zwischen allosterischen und kompetitiven Effekten der untersuchten Verbindung unterschieden werden. Außerdem kann im Falle der neutralen Kooperativität, die Bindung des allosterischen Modulators an den Rezeptor nicht nachgewiesen werden [27].

Bei allen allosterischen Liganden der Muscarin-Rezeptoren konnte gezeigt werden, daß sie die Dissoziation von orthosterischen Liganden verzögern können. Als Maß für die Dissoziationsverzögerung wird der $EC_{50, \text{dis}}$ -Wert bestimmt. Er gibt die Konzentration des allosterischen Modulators an, bei der die Dissoziationsgeschwindigkeit des orthosterischen Radioliganden halbiert wird. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber dem vorangegangenen Verfahren besteht darin, daß hier ein rein allosterischer Effekt berücksichtigt wird. Wenn

die Ergebnisse Bindungsstudien bestimmten Bedingungen entsprechen, kann der $EC_{50,diss}$ -Wert mit der Bindungsaffinität des allosterischen Modulators zum besetzten Rezeptor gleichgesetzt werden [28]. Tatsächlich korrelieren in den untersuchten Fällen die Affinitätskonstanten aus den beiden vorangegangenen Verfahren sehr gut mit den $EC_{50,diss}$ -Werten [26]. Entsprechend der $EC_{50,diss}$ -Konzentration kann die $EC_{50,ass}$ -Konzentration aus der Verzögerung der Assoziationsgeschwindigkeit eines Radioliganden abgeleitet werden. Sie entspricht der Affinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor. Der Koeffizient $EC_{50,diss}/EC_{50,ass}$ entspricht dann dem Kooperationsgrad α [29].

1.2.3 Allosterische Modulatoren

Die kardioselektive Wirkung der Substanz Gallamin (siehe Abbildung 1.4) lieferte einen der ersten Hinweise auf das Vorkommen verschiedener Subtypen beim Muscarin-Rezeptor. Der beobachtete antagonistische Effekt der Substanz beruht nicht auf einer kompetitiven Verdrängung von Acetylcholin, sondern auf der allosterischen Modulation im Sinne einer negativen Kooperation [30]. Daneben besitzt Gallamin als Ganglienblocker zusätzlich Affinität zu Nikotin-Rezeptoren, eine Eigenschaft die auch bei einigen anderen muscarinergen allosterischen Modulatoren auftritt.

So handelt es sich bei einem der bisher potentesten allosterischen Modulatoren um das Muskelrelaxans Alcuronium (siehe Abbildung 1.4) [31]. Im Vergleich zum natürlich vorkommenden Indolalkaloid C-Toxiferin I unterscheidet sich Alcuronium lediglich in der Substitution der beiden quartären Stickstoffe. Ein neuer Entwicklungsansatz für allosterische Modulatoren geht von dem biogenetisch verwandten Indolalkaloid Caracurin V aus. Untersuchungen seines Derivats N,N-Diallylcaracurin V (Diallylcaracurin V) zeigten im Vergleich zu C-Toxiferin I und Alcuronium eine schwächer muskelrelaxierende Wirkung trotz vergleichbarer Affinität zum M_2 -Rezeptor (siehe Abbildung 1.4) [32]. Auch lassen sich bei weiteren biogenetisch verwandten Alkaloiden allosterische Effekte an Muscarin-Rezeptoren nachweisen. Bei Strychnin, Brucin und Vincamin handelt es sich ebenfalls um Indolalkaloide, die wie C-Toxiferin I und Caracurin V dem Strychnan-Typ bzw. dem nahe verwandten Eburnan-Typ

zuzuordnen sind (siehe Abbildung 1.4). Die Affinität dieser Substanzen zum M_2 -Rezeptor ist allerdings geringer ausgeprägt als bei den „dimeren“ Verbindungen Alcuronium und Diallylcaracurin V [33][34].

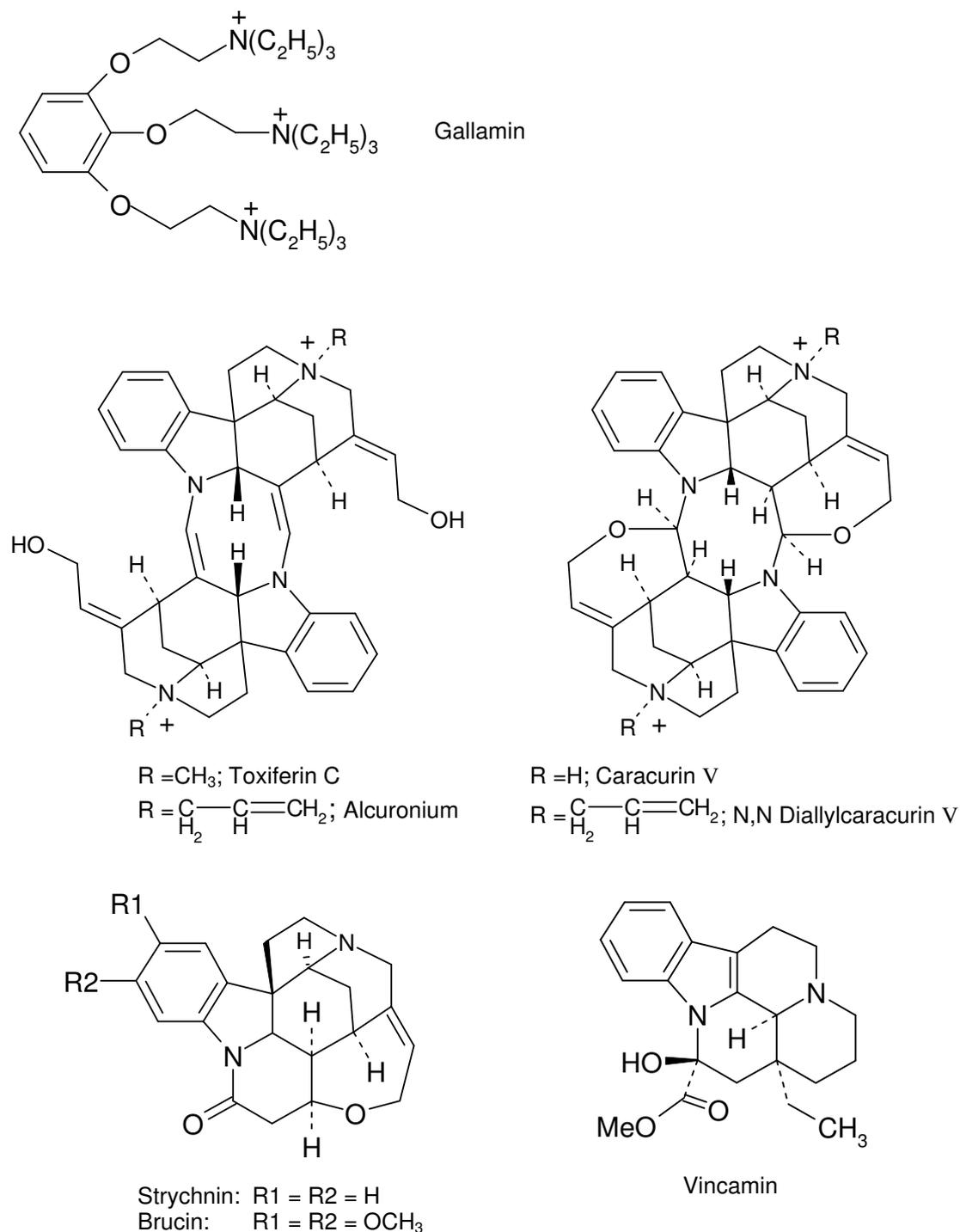


Abbildung 1.4: Allosterische Modulatoren I

Ausgehend vom Ganglienblocker Hexamethonium, wurden im Arbeitskreis Lüllmann und im Arbeitskreis Holzgrabe eine Reihe von Derivaten synthetisiert, deren Eigenschaft als allosterische Modulatoren untersucht wurden [35][36]. Durch die Substitution einer Methylgruppe am quartären Stickstoff mit größeren lipophilen Resten konnte zum einen die Affinität der Verbindungen zu Nikotin-Rezeptoren gesenkt, zum anderen die Affinität zur allosterischen Bindungsstelle der Muscarin-Rezeptoren gesteigert werden. Die Struktur-Wirkungsbeziehungen innerhalb dieser Gruppe werden in Kapitel 1.2.4 gesondert behandelt.

Eine weitere Gruppe bilden Substanzen, die als kompetitive Antagonisten an der orthosterischen Bindungsstelle angreifen und gleichzeitig über einen allosterischen Mechanismus wirken können. Es handelt sich hierbei um die strukturell verwandten Verbindungen Pirenzepin, AF-DX 116, AF-DX 384 und UH-AH 37 (siehe Abbildung 1.5). Grundsätzlich zeigen diese Substanzen eine höhere Affinität zur orthosterischen Bindungsstelle im Vergleich zur allosterischen Bindungsstelle [37]-[39]

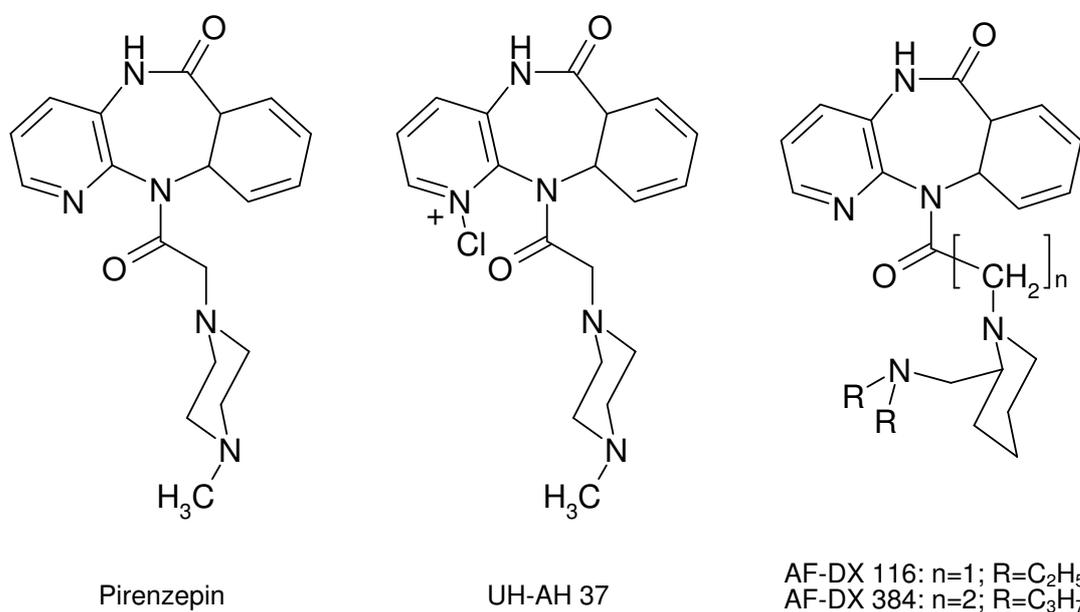


Abbildung 1.5: Verbindungen, die sowohl an der orthosterischen als auch an der allosterischen Bindungsstelle angreifen können

Neben Alcuronium konnten auch für einige andere Verbindungen, die bereits in anderen therapeutischen Gebieten eingesetzt werden, eine allosterische Modulation muscarinerger Effekte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 1.6). Der Calcium-Kanalblocker Verapamil, das Antiarrhythmikum Chinidin und der Acetylcholinesterase-Reaktivator Obidoxim zeigen alle eine, wenn auch schwach ausgeprägte Affinität zur allosterischen Bindungsstelle der Muscarin-Rezeptoren [40].

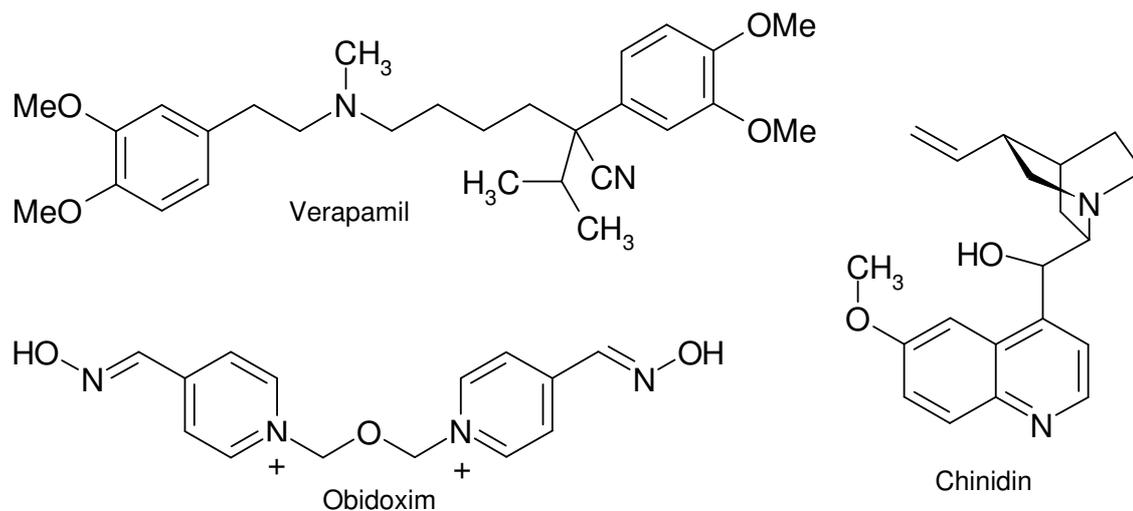


Abbildung 1.6: Allosterische Modulatoren mit anderem therapeutischen Einsatz

1.2.4 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Im Arbeitskreis Holzgrabe wurden ausgehend von der Struktur des W84 und den Bispyridiniumverbindungen WDUO und IWDUO eine große Zahl von Derivaten synthetisiert und ihr allosterisches Potential untersucht [41]. Abbildung 1.7 gibt einen Überblick über die in diesem Kapitel behandelten Verbindungen mit ihren $EC_{50,diss}$ -Werten. Die getesteten Verbindungen zeigen alle einen ähnlichen Aufbau. Sie besitzen einen Mittelteil, der durch zwei quartäre Ammoniumgruppen bzw. durch zwei Pyridinium-Ringe begrenzt wird. An diese schließen sich zwei laterale Bereiche an. Die lateralen Bereiche bestehen aus einem starren, lipophilen und meist aromatischen Rest der über eine kurze Brückenregion mit dem Mittelteil verbunden ist. Den Mittelteil bei

W84 bildet eine Hexylkette mit den zwei daran angrenzenden, quartären Stickstoffgruppen.

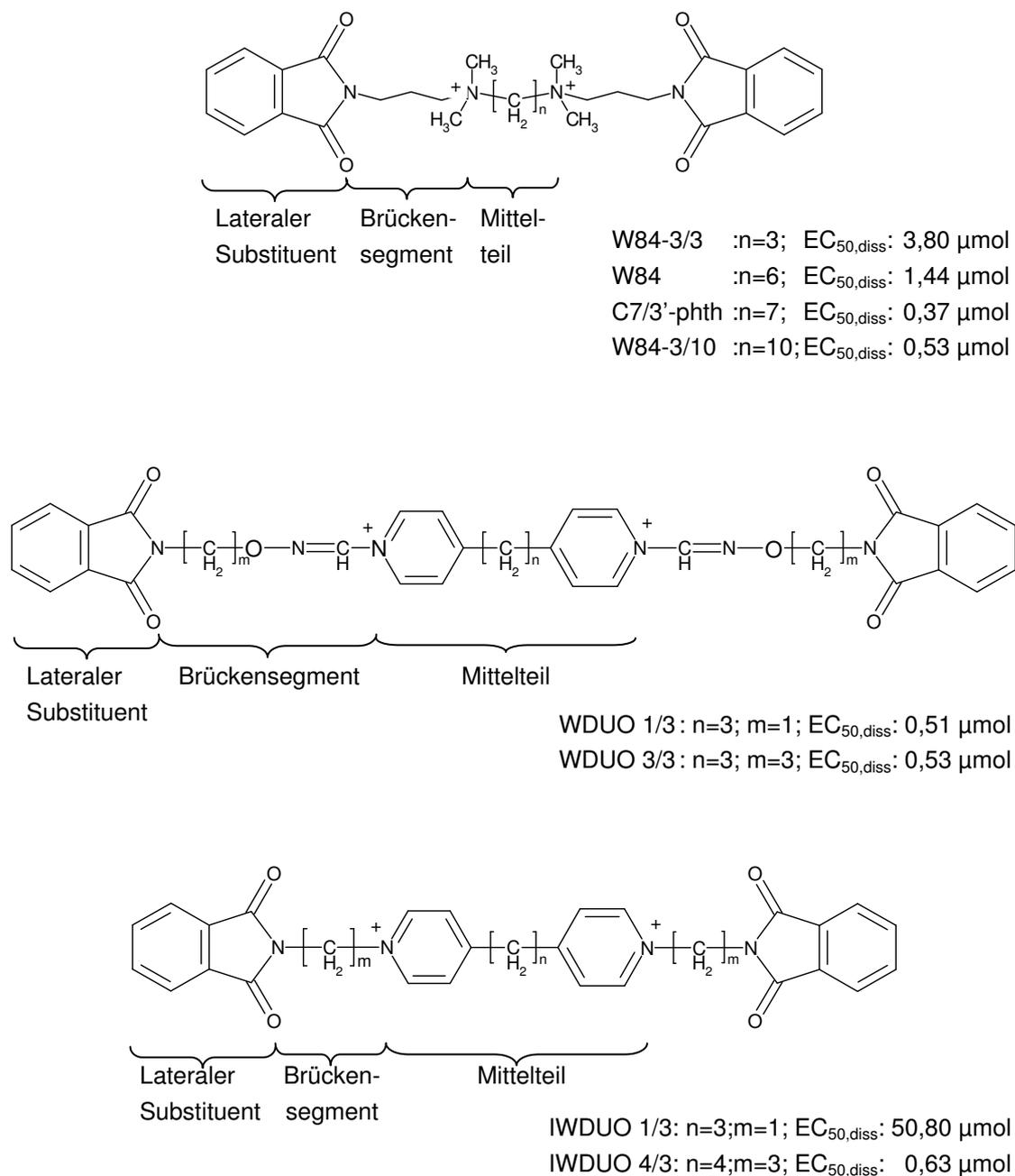


Abbildung 1.7: Allosterische Modulatoren der W84-,WDUO- und IWDUO-Verbindungen.

Veränderungen in der Kettenlänge beeinflussen das allosterische Potential der Verbindungen. So sinkt die $EC_{50,diss}$ -Konzentration vom Propyl- zum Heptylrest der Verbindung C7/3'-phth um fast eine Zehnerpotenz von 3,8 auf 0,37 μmol . Eine weitere Verlängerung zum Decanyl-Derivat zeigt dagegen keinen nennenswerten Einfluß auf den $EC_{50,diss}$ -Wert ($EC_{50,diss} = 0,53 \mu\text{mol}$). Ein ähnliches Verhalten findet man bei der Variation der Alkylkettenlänge im Mittelteil der Bispyridiniumderivate. Bei einer Kettenlänge von drei Methylgruppen zeigen auch WDUO- und IWDUO-Derivate keine nennenswerte Änderung der $EC_{50,diss}$ -Werte mehr.

Geht man von einer gestreckten Konformation der Alkylkette aus, so entspricht die Länge der Mittelstücke bei W84-, WDUO- und IWDUO-Derivaten mit dem Erreichen der optimalen Kettenlänge etwa 10 Å. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Abstand der beiden quartären Stickstoffatome im Alcuronium (Abstand N, N' = 9,2 Å). Es wurde deshalb vermutet, daß der Mittelteil als Abstandshalter fungiert, der die lateralen Substituenten und/oder die positiven Ladungen in eine für die Bindung am Rezeptor günstige Position dirigiert [42].

Variationen in den Alkylketten der IWDUO-Derivate, die den Mittelteil auf beiden Seiten mit den Phthalimidringen verbinden, können ebenfalls die Affinität des Liganden beeinflussen (IWDUO 1/3 \rightarrow IWDUO 4/3). Bei einer Kettenlänge von eins beträgt die $EC_{50,diss}$ -Konzentration hier 50,8 μmol , während bei einer Kettenlänge von vier der $EC_{50,diss}$ -Wert 0,63 μmol beträgt. (Alkylkettenlänge des Mittelstücks = 3 in beiden Fällen). Bei den WDUO-Derivaten, in denen neben dem Alkylrest noch eine Oximgruppe vorliegt, waren hingegen keine Änderung nach Verlängerung der Alkylkette meßbar.

Den größten Einfluß auf die Affinität der Verbindungen besitzen die lateralen Substituenten. Der Abbau des Benzolrings der Phthalimidgruppen der Verbindung C 7/3'-phth führt zur Abnahme der Affinität. Die $EC_{50,diss}$ erhöht sich auf das 190fache, wenn die Substanz nur noch zwei Succimidringe als laterale Substituenten besitzt (siehe Abbildung 1.8 Verbindung (1)). Umgekehrt nimmt die Affinität zu, wenn der Phthalimidring weiter substituiert wird. So besitzt Verbindung (2) in Abbildung 1.8 eine etwa 10fach höhere Affinität als W84. Interessanterweise hat die Stereochemie der an die Phthalimidgruppen

gebundenen Benzylidenreste keinen Einfluß auf die Affinität, d.h. E/E-, Z/Z- und E/Z-Isomere zeigen ähnliche $EC_{50,diss}$ -Werte. Der Austausch der Phthalimidgruppen gegen Naphthalimidreste (siehe Abbildung 1.8 Verbindung (3)) erhöhte die Affinität um das 100fache [36]. Diese Ergebnisse zusammengenommen zeigen, daß das Volumen der Bindungsstelle im Bereich der lateralen Substituenten relativ groß sein muß. Weiterhin müssen in diesem Bereich lipophile Aminosäuren als Wechselwirkungspartner zur Verfügung stehen.

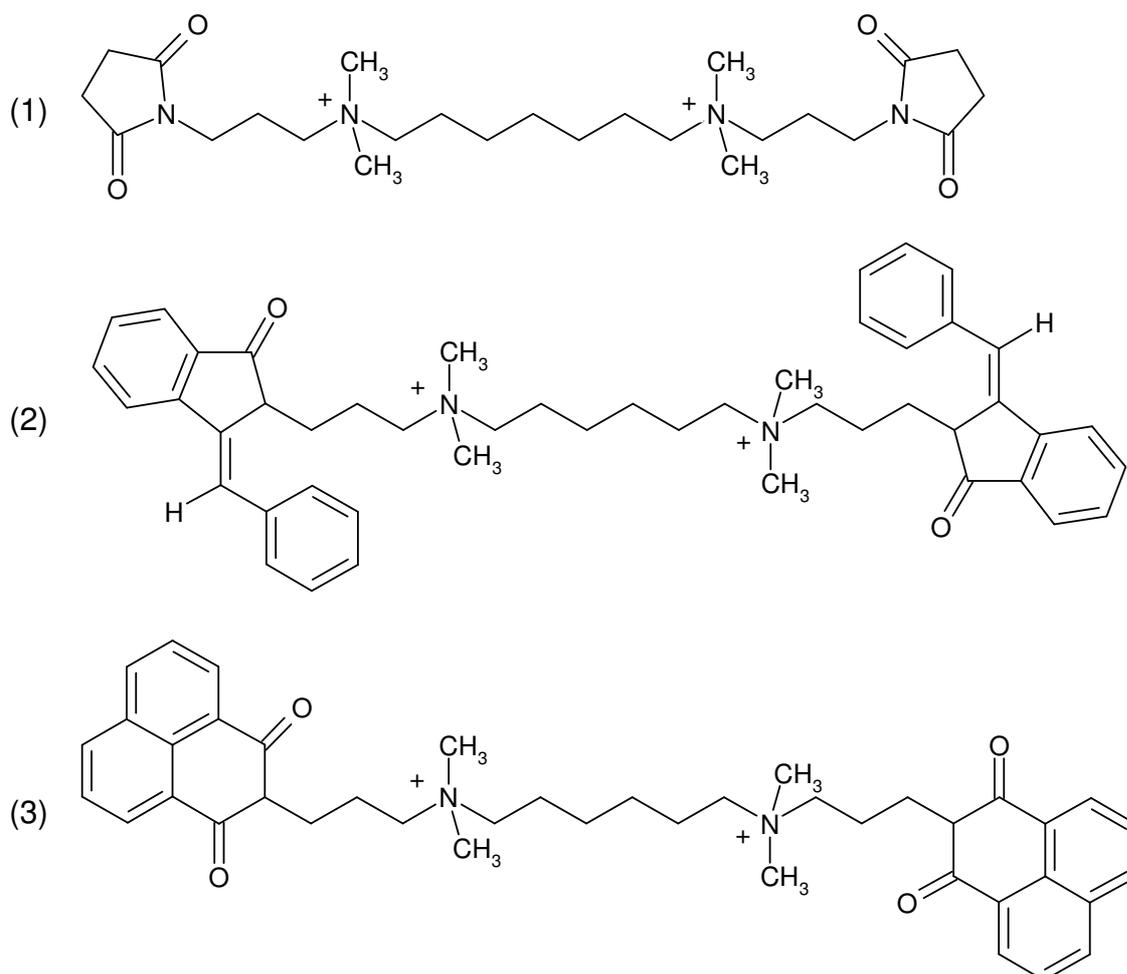


Abbildung 1.8: Derivate der Verbindungen W84 und C7/3'-phtH mit unterschiedlichen lateralen Substituenten.

Die bisher besprochenen Substanzen besitzen alle einen symmetrischen Aufbau. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß auch die Rezeptorbin-

dungsstelle einen symmetrischen Aufbau besitzt. Der einseitige Austausch des Phthalimids gegen ein Succimid führt beim W84 zu einer Senkung der $EC_{50,diss}$ -Konzentration um das 8fache. Vergleicht man dies mit dem Austausch beider Phthalimidreste in der ähnlichen Verbindung C7/3'-phth, erkennt man, daß beide Seiten mit dem Rezeptor interagieren, wenn auch nicht unbedingt im gleichen Maße. Ähnliche Ergebnisse finden sich beim Vergleich symmetrischer und unsymmetrischer Substitution mit Benzylidenresten und Naphthalimidgruppen.

1.2.5 Pharmakophormodell

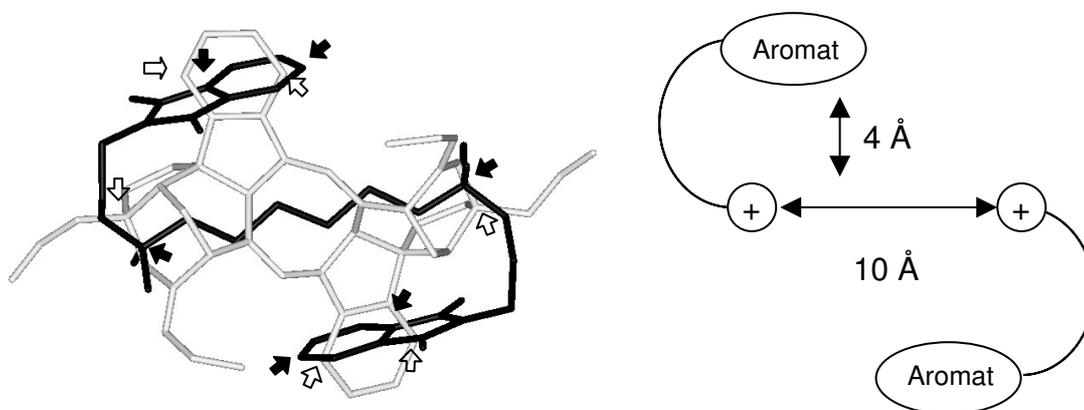


Abbildung 1.9: Eine mögliche bioaktive Konformation des W84. Das Bild links zeigt die Überlagerung von W84 (schwarz) in der S-förmigen Konformation mit Alcuronium (grau). Die Pfeile in der Farbe der dazugehörigen Verbindung kennzeichnen die benutzten Überlagerungspunkte. Das Bild rechts gibt die S-förmige Konformation des W84 schematisch wieder.

Anhand der Struktur-Wirkungsbeziehungen und der rigiden Verbindung Alcuronium als Templat wurde für die flexiblen Hexamethonium- und Bispyridiniumderivate eine mögliche bioaktive Konformation gefunden. Hierbei dienten die beiden quartären Stickstoffe und die Aromaten der Phthalimidringe des W84 bzw. der Indolinringe bei Alcuronium als Überlagerungspunkte (siehe Abbildung 1.9). In gestreckter Konformation besitzen die quartären Stickstoffe in den flexiblen Hexamethonium- und Bispyridiniumderivaten in etwa den gleichen Abstand zueinander wie im Alcuronium und lassen sich somit gut überlagern. In dieser Position können die für die Bindung wichtigen lateralen aromatischen

Substituenten mit den Aromaten des Indolinrings des Alcuroniums überlagert werden. W84 nimmt hierbei eine S-förmige Konformation ein [42].

Mit dem Pharmakophormodell lassen sich einige der beobachteten Struktur-Wirkungsbeziehungen semiquantitativ nachvollziehen. Um die S-förmige Konformation einzunehmen, muß die Verbindung über ein ausreichend flexibles Verbindungsstück zwischen dem Mittelteil und den lateralen Substituenten verfügen. Bei dem IWDUO-Derivat IWDUO 1/3 mit einer kurzen Methylen-Brücke ließ sich keine S-Konformation modellieren. Diese Beobachtung läßt sich mit der deutlich abgeschwächten Affinität dieser Substanz in Einklang bringen ($EC_{50,diss} = 50,3 \mu\text{mol}$; vgl. vorheriges Kapitel). Einige Substanzen mit sehr kurzen Mittelstücken, zeigten bei den Untersuchungen trotzdem eine relativ hohe Affinität (siehe Abbildung 1.10). Mit dem Modell läßt sich zeigen, daß trotz der Unterschiede eine Überlagerung mit Alcuronium möglich ist (Bei der Verbindung W84-3/0 allerdings nur für die zwei lateralen Substituenten und einem quartären Stickstoff) [41].

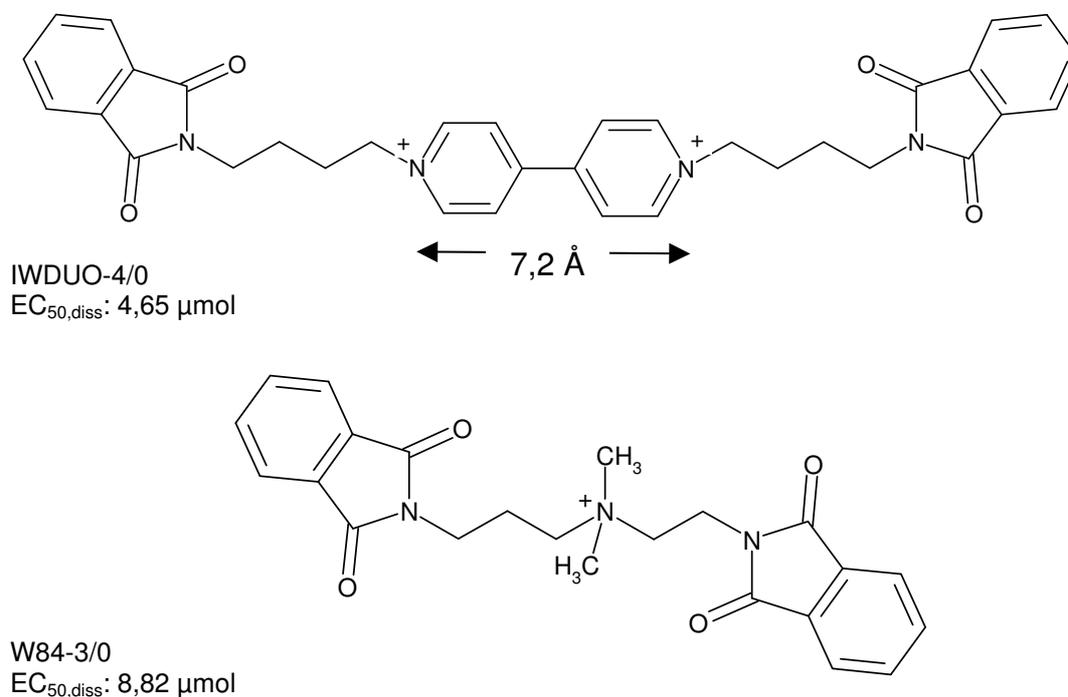


Abbildung 1.10: IWDUO- und W84-Derivate mit kurzem Mittelstück, die trotzdem einen relativ geringen $EC_{50,diss}$ -Wert besitzen.

1.2.6 Einsatz allosterischer Modulatoren

Der therapeutische Einsatz nichtselektiver muscarinerges Agonisten und Antagonisten ist problematisch, da sie das breite Spektrum der durch Muscarin-Rezeptoren gesteuerten Effekte beeinflussen. Hierdurch treten neben der erwünschten Wirkung weitere, zum Teil schwere Nebenwirkungen auf. Hierzu gehören unter anderem zerebrale Störungen, Änderungen der Herzfrequenz und Beeinflussung der Speichelsekretion.

Pirenzepin stellt im Moment die einzige relativ subtypselektive Verbindung dar, die sich im therapeutischen Einsatz befindet. Sie wird zur Behandlung der Ulkuskrankheit eingesetzt, da sie die Magensäuresekretion vermindern kann. Diese Wirkung resultiert aus einer Blockade des M_1 -Rezeptors, zu dem Pirenzepin eine etwa 50mal höhere Affinität besitzt als zu anderen Subtypen des Muscarin-Rezeptors. Dementsprechend sind auch die Nebenwirkungen im Vergleich zu nichtselektiven Parasympatholytika schwächer ausgeprägt. Insgesamt ist die Verträglichkeit jedoch schlechter als bei den für die Therapie bevorzugten H_2 -Antagonisten. Mittel der Wahl sind muscarinerge, nichtselektive Antagonisten wie Oxybutinin und Tolterodin dagegen bei der Therapie der Drang-Inkontinenz. Aber auch hier wäre der Einsatz einer M_3 -selektiven Verbindung wünschenswert.

Keine der bekannten muscarinergen Agonisten zeigte bisher eine hohe Selektivität zu einem speziellen Muscarin-Rezeptor-Subtyp. Im Bereich des ZNS könnte ein solcher selektiver Muscarin-Agonist zur Schmerztherapie und zur Behandlung der Alzheimer-Demenz erfolgreich eingesetzt werden. Derzeit ist noch unklar, welcher Muscarin-Rezeptor-Subtyp für die Weiterleitung der Schmerzimpulse im Rückenmark eine entscheidende Rolle spielt (diskutiert wird ein Einfluß von M_1 -, M_2 - und M_4 -Rezeptoren) [43]. Bei der Alzheimer-Demenz gibt es dagegen bereits genauere Vorstellungen, welcher Subtyp einen Angriffspunkt bei der Therapie darstellen könnte. So zeigt sich in Folge der Degeneration des Nervengewebes im Verlauf der Krankheit keine Änderung und zum Teil sogar eine *up*-Regulation der Zahl der M_1 -Rezeptoren [44].

Weiterhin beeinflussen M_1 -Rezeptoren die Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP), welches eine Rolle bei der Bildung von Amyloidplaques bei der Alzheimer Demenz spielt [45].

Die fehlende Subtypselektivität der bekannten Agonisten und Antagonisten erklärt sich wahrscheinlich aus der großen Ähnlichkeit, die die Muscarin-Rezeptor-Subtypen im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle aufweisen. Allosterische Modulatoren, deren Bindungsstelle in der stärker variierenden Loopregionen vermutet wird, sollten entsprechend eine höhere Selektivität besitzen. Tatsächlich wurde bei Bindungsstudien an verschiedenen Subtypen, für Gallamin, Alcuronium und C7/3-phth eine erhöhte Affinität zum M_2 -Subtyp gefunden [46][47][48].

Für allosterische Modulatoren existiert darüber hinaus aber noch eine weitere Möglichkeit Subtypselektivität zu zeigen. Eine Verbindung die an einem bestimmten Subtyp im Sinne einer positiven Kooperation mit Acetylcholin interagiert, könnte den durch Acetylcholin ausgelösten Effekt verstärken. Obwohl diese Substanz auch an die anderen Subtypen bindet, kann sie hier im Idealfall in Bezug auf Acetylcholin eine neutrale Kooperation zeigen, d.h. der Effekt wird nicht moduliert und zwar unabhängig von der Konzentration des allosterischen Modulators. Eine solche Verbindung entspräche in ihren Eigenschaften einem subtypselektiven Agonisten. Entsprechend kann man sich einen antagonistischen Effekt vorstellen, wenn der allosterische Modulator und Acetylcholin eine negative Kooperation zeigen. Insofern könnten allosterische Modulatoren als Alternative für Agonisten und kompetitive Antagonisten bei den oben genannten Therapieansätze eingesetzt werden, wenn sie eine entsprechende Subtypselektivität zeigen. Bei einigen Derivaten des allosterischen Modulators Brucin, konnten bereits für die einzelnen Verbindungen unterschiedliche Arten der Kooperation mit Acetylcholin bei den verschiedenen Subtypen nachgewiesen werden [49].

Auch die Behandlung von Vergiftungen durch Organophosphate stellt ein mögliches Einsatzgebiet für allosterische Modulatoren dar. So begann die Entdeckung der allosterischen Modulation an Muscarin-Rezeptoren unter anderem mit den Beobachtungen Lüllmanns et al., daß durch die kombinierte

Gabe des Antagonisten Atropin mit dem Hexamethoniumderivat W84 die letale Dosis des Organophosphats Diisopropylfluorophosphat bei Mäusen auf das 15fache erhöht werden kann. Es konnte gezeigt werden, daß dieser überadditive Effekt nicht auf einer Ganglienblockade resultiert. Vielmehr beobachtete man bei Rezeptorbindungsstudien, daß W84 die Dissoziation von [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) verzögert. Die Wirkung des Atropins wird durch eine Verlängerung der Bindungsdauer am Rezeptor aufgrund einer positiven Kooperation mit dem allosterischen Modulator verstärkt [35].

2 Problemstellung

Muscarin-Rezeptoren sind im menschlichen Organismus in zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse involviert. Der therapeutische Einsatz von Agonisten und kompetitiven Antagonisten der Muscarin-Rezeptoren wird allerdings durch die geringe Subtypselektivität der bisher bekannten Verbindungen eingeschränkt. Die allosterische Bindungsstelle der Muscarin-Rezeptoren bietet hier einen alternativen Ansatzpunkt für die Entwicklung subtypselektiver Verbindungen, die unter physiologischen Bedingungen ebenfalls in der Lage sind die Rezeptorfunktion zu beeinflussen.

Mutationsstudien zeigen unter anderem, daß die allosterische Bindungsstelle im extrazellulären Bereich der Muscarin-Rezeptoren liegt. Insgesamt liefern die Untersuchungen an der allosterischen Bindungsstelle somit Informationen über einen Bereich der Muscarin-Rezeptoren, über den im Gegensatz zur transmembranären Region nur wenig bekannt ist. In Verbindung mit Molecular Modelling Techniken können die experimentellen Daten zur näheren Charakterisierung der Struktur der extrazellulären Region genutzt werden. Auf der anderen Seite führt dieser Ansatz zum Aufbau eines Ligand-Rezeptor-Komplexes, der Informationen über das Bindungsverhalten der allosterischen Modulatoren liefern kann.

Da die 3D-Struktur der Muscarin-Rezeptoren nicht bekannt ist, sollte die Grundlage des Modells die Struktur der sieben transmembranären Helices des Rezeptors bilden. Für die Modellierung der Loopregionen, die den extrazellulären Bereich charakterisieren standen zwei gängige Verfahren zur Verfügung: Die Modellierung von Loopfragmenten anhand von Röntgenkristallstrukturen und die Generierung von Loops mit Hilfe von Moleküldynamiksimulationen. Im letzten Schritt sollten Liganden in das Rezeptormodell eingepaßt werden. Durch die Analyse der Rezeptor-Ligand-Komplexe sollten sich Aminosäuren identifizieren lassen, die entscheidenden Anteil an der Bindung der Liganden haben. Außerdem sollte sich hieraus ein Erklärungsansatz für das Bindungsverhalten der einzelnen Liganden ergeben.

3 Methoden, Durchführung, Ergebnisse

3.1 Aufbau des Rezeptormodells

Die Struktur der transmembranären Helices G-Protein gekoppelter Rezeptoren ist durch eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen recht gut bekannt. Man geht davon aus, daß alle Rhodopsin-ähnlichen GPCRs in diesem Bereich einen vergleichbaren Aufbau besitzen. Für Aufbau und Neigung der transmembranären Helices standen während der Anfertigung dieser Arbeit eine Vielzahl von Strukturschablonen zur Verfügung, die die experimentellen Ergebnisse berücksichtigen. Die Loopregionen von GPCRs dagegen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Länge und der Sequenz. In diesen Bereichen kann daher nicht von einer generellen Übereinstimmung zwischen GPCRs ausgegangen werden. Nur die Disulfidbrücke, die den zweiten extrazellulären Loop mit der dritten transmembranären Helix verknüpft, stellt ein gemeinsames Merkmal für die Rhodopsin-ähnlichen GPCRs dar.

Der hier interessierende extrazelluläre Bereich umfaßt flexible Loopregionen und die Enden der sich bis in diesen Bereich erstreckenden transmembranären Helices [50]. Zur näheren Charakterisierung der extrazellulären Region wurde von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, Informationen über ihre Struktur aus der Analyse der Aminosäuresequenz zu gewinnen. Die hierfür verwendeten Methoden zur Sekundärstrukturvorhersage sollten Auskunft geben über:

- das Ende der transmembranären helikalen Segmente
- mögliche strukturierte Bereiche in den extrazellulären Loopregionen

3.2 Sekundärstrukturvorhersage

Die Anwendung von Sekundärstrukturvorhersagen auf die Sequenz membranärer Proteine ist nicht unproblematisch, da sich die Programme bei ihrer Prognose auf die Analyse globulärer Proteine stützen. So zeigen Rost und Sander, daß bei ihren Untersuchungen die Vorhersagen des Programms PHDsec für transmembranäre Proteine unzuverlässiger waren als für globuläre Proteine [51]. Da membranäre Bereiche eines Proteins einen höheren Anteil lipophiler Aminosäuren aufweisen, können hier Abweichungen zu globulären

Proteinen auftreten, die von den Verfahren fehlerhaft interpretiert werden. Im Falle der GPCRs zeigen Untersuchungen von van Rhee et al., daß anstelle der transmembranären Helices häufig β -Faltblattstrukturen vorhergesagt werden, denn Faltblattstrukturen enthalten in globulären Proteinen ebenfalls einen erhöhten Anteil lipophiler Aminosäuren [15].

Die hohe Hydrophobizität membranärer Bereiche kann andererseits genutzt werden, um sie anhand der Sequenz eines Proteins zu lokalisieren. Die Methoden sind zwar wenig geeignet um die gewünschten Informationen über den extrazellulären Bereich der GPCRs zu liefern, sie können aber als sinnvolle Ergänzung bei der Interpretation der Sekundärstrukturvorhersagen genutzt werden, da man innerhalb der Membran von einer überwiegend α -helikalen Konformation des M_2 -Rezeptors ausgehen kann.

3.2.1 Programme zur Sekundärstrukturvorhersage

In diesem Kapitel soll nur eine kurze Zusammenfassung der Funktionsweise der Methoden gegeben werden, soweit sie für das Verständnis der Durchführung und der Ergebnisse notwendig ist. Statt einer ausführlichen Beschreibung einzelner Methoden sei auf die Referenzen in Tabelle 2.2 sowie die Arbeiten von Paulin [52] und Schappach [53] verwiesen. Die Verfahren verwenden ein Regelwerk, mit dem Aminosäuren eine Sekundärstruktur zugewiesen werden kann. Die Regeln werden hauptsächlich aus der Analyse eines nichtredundanten Datensatzes hochaufgelöster Röntgenkristallstrukturen abgeleitet. Bei der Analyse des Datensatzes werden Aminosäuremotive gesucht, die ein möglichst deutliches Signal für eine bestimmte Sekundärstruktur der Aminosäuren in diesem Abschnitt darstellen. Den Aminosäuremotiven in der Sequenz entsprechen spezifische Wechselwirkungsmuster in der Struktur, die bestimmte Konformationen des Proteinrückgrats stabilisieren. Die einem Aminosäuremotiv entsprechenden Strukturmerkmale sind dabei allerdings nicht von den vorherzusagenden Sekundärstrukturklassen (z.B. Helix oder β -Faltblattstrang) allein abhängig. Einige Verfahren berücksichtigen daher bei der Vorhersage eine größere Zahl

von Strukturklassen, bei denen Helices oder Faltblattstränge weiter unterteilt oder zu größeren Strukturmotiven zusammengefaßt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren lassen sich anhand ihrer unterschiedlichen Vorgehensweise gliedern:

- **Statistische Verfahren**

Statistische Verfahren ermitteln anhand des Datensatzes bekannter Strukturen die Häufigkeit, mit der ein bestimmtes Aminosäuremotiv mit einem bestimmten Strukturmerkmal verbunden ist. Hiermit läßt sich die Sekundärstruktur für eine Aminosäure der untersuchten Sequenz auswählen, die aufgrund der benachbarten Aminosäuren am wahrscheinlichsten ist.

- **Alignment-Verfahren (*nearest neighbour search*)**

Über ein Alignment werden für Abschnitte der Testsequenz die ähnlichsten Segmente entsprechender Länge aus einem Datensatz bekannter Proteinstrukturen ausgewählt. Bei der Aufstellung des Alignments werden die Aminosäuren im Datensatz nicht durch ihren Typus, sondern durch ihre Strukturklasse repräsentiert. Als Maß für die Ähnlichkeit an einer Position des Alignments gilt die Häufigkeit, mit der der Aminosäuretyp der Testsequenz in der Strukturklasse auftritt, die ihm anhand der Analyse bekannter Proteinstrukturen zugewiesen wird. Anhand der Sekundärstruktur der ausgewählten Abschnitte wird dann die Sekundärstruktur für die Aminosäuren der Testsequenz im untersuchten Teilstück festgelegt.

- **Neuronale Netze**

Neuronale Netze sind lernfähige Computerprogramme, die in vereinfachter Form die Funktionsweise des Gehirns simulieren. Sie benötigen kein externes Regelwissen, sondern optimieren ein System selbstständig. Miteinander vernetzte Speichervariablen, die in einzelne Schichten gegliedert werden, entsprechen dabei den einzelnen Neuronen. Die ‚Neuronen‘ der Eingabeschicht bewerten die eingehenden Informationen, diejenigen der Verarbeitungsschicht bündeln sie und leiten sie an die Ausgabeschicht weiter. Die erfolgreichen Ausgaben werden an die Eingabeschicht zurückgemeldet und die ursprünglichen Eingaben neu gewichtet. Der Wert einer Variablen einer übergeordneten Schicht kann dabei den Wert jeder Variablen einer nachfolgenden Schicht

beeinflussen. Bei der Strukturvorhersage wird in der Eingabeschicht die Information aus der untersuchten Sequenz gespeichert. Die Ausgabe enthält am Ende die Informationen, die die Zuordnung zu den Sekundärstrukturklassen ermöglicht. In der Trainingsphase wird die Vorhersagegenauigkeit für einen Datensatz bekannter Strukturen optimiert. Die erlernten Zusammenhänge können dann für die Vorhersage anderer Sequenzen genutzt werden.

- **Multialignments**

Einige Methoden zur Strukturvorhersage sind in der Lage Multialignments als Eingabe zu verwenden. Hierbei erfolgt die Vorhersage der Testsequenz unter Berücksichtigung strukturell verwandter Sequenzen. Anders als beim Alignmentverfahren, ist die Struktur dieser Sequenzen unbekannt. Die zusätzliche Information besteht vielmehr in den Unterschieden und Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Sequenzen, die sozusagen den Rahmen für die Variabilität in der Sequenz, bei vergleichbarer Struktur darstellt. Grundsätzlich führt die Verwendung eines Multialignments im Vergleich zur Einzelsequenz zu einer verbesserten Vorhersagegenauigkeit.

3.2.2 Durchführung der Strukturvorhersagen

Für die Strukturvorhersagen wurden zehn Verfahren verwendet, die alle mittels Datenfernübertragung über das World-Wide-Web zugänglich waren. Obwohl die in Tabelle 3.1 aufgeführten Programme teilweise auf die gleiche allgemeine Methodik zurückgreifen, unterscheiden sich die Einzelergebnisse voneinander. Dies liegt sowohl an der unterschiedlichen Wahl von Strukturklassen bei der Analyse der Röntgenstrukturen, als auch an verschiedenen zusätzlichen Prozeduren, die zur Vorhersage verwendet werden. So basieren zum Beispiel Ssp und das Verfahren von Garnier, Osguthorpe und Robson (GOR) auf der statistischen Analyse von Proteinstrukturen. Ssp berücksichtigt aber zusätzlich auch die Abfolge von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren für die Vorhersage von Helices und Faltblattstrukturen. Fast alle Methoden nutzen außerdem verschiedene Filterfunktionen, um eine sinnvolle Länge der vorhergesagten Helices und Faltblätter zu gewährleisten.

Die meisten der hier verwendeten Vorhersageprogramme ordnen einer Aminosäure eine von drei Sekundärstrukturklassen zu: Helix, β -Faltblatt oder *Coil*. Die Bezeichnung *Coil* kennzeichnet dabei keine definierte Sekundärstruktur, sondern faßt alle weiteren Konformationen zusammen, die nicht als Helix oder Faltblatt vorhergesagt werden. Zwei der verwendeten Verfahren bilden hierbei eine Ausnahme. Das Programm GOR erlaubt die zusätzliche Vorhersage von β -Turns. In GPCRs ist dieses Strukturelement allerdings nur für die Charakterisierung der Loopbereiche von Bedeutung. (siehe Kapitel 3.2.4).

Tabelle 3.1: Verwendete Verfahren zur Sekundärstrukturvorhersage

Verfahren	allgemeine Methode	Multi-Alignment
GOR [54]	Statistik	Nein
PHDsec [51]	Neuronales Netz	Ja
Psipred [55]	Neuronales Netz	Ja
Predator [56]	Statistik und Alignment-Verfahren	Ja
PSA [57]	Statistik	Nein
Nnpredict [58]	Neuronales Netz	Nein
Ssp [59]	Statistik	Nein
Nnssp [60]	Alignment-Verfahren	Ja
Sspal [61]	Alignment-Verfahren	Ja
Sopma [62]	Alignment-Verfahren	Ja

Für die Vorhersage der Helixenden wurden β -Turn-Vorhersagen als Coil-Vorhersage interpretiert. Das Programm Nnpredict unterscheidet dagegen nur zwischen helikalen und nicht helikalen Bereichen. Dies schränkt zwar die Aussagefähigkeit der Methode allgemein ein, verbesserte aber ihre Vorhersagegenauigkeit für helikale Bereiche, was für die Vorhersage der Helixenden besonders günstig erschien [58].

Bei der Verwendung des PHDsec-Verfahrens wird vor der eigentlichen Vorhersage ein Multialignment mit Hilfe des Programms MAXHOM erstellt

[63][64]. Dieses Multialignment diente auch als Eingabe für die anderen Methoden, die Multialignments für die Vorhersage verwenden.

Um zu überprüfen ob die verwendeten Strukturvorhersageverfahren es ermöglichen, die Enden transmembranärer Helices für die Struktur des M_2 -Rezeptors mit einer ausreichenden Genauigkeit festzulegen, wurden die Verfahren zuerst an zwei Proteinen mit bekannter Sekundärstruktur getestet, deren membranäre Regionen ausschließlich aus Helices bestehen. Mögliche Proteinstrukturen konnten hierbei der Protein Data Bank (PDB) [65] entnommen werden. Ausgewählt wurden das den GPCRs strukturell verwandte Bacteriorhodopsin, dessen Struktur zum Zeitpunkt der Untersuchung anhand kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen aufgeklärt worden war (PDB-Eintrag: 2BRD) [66]. Weiterhin wurde die Röntgenkristallstruktur der bovinen Cytochrom-C-Oxidase ausgewählt (PDB-Eintrag: 1OCC) [67]. Die Untersuchung der Cytochrom-C-Oxidase beschränkte sich dabei auf die Kette A, die mit zwölf transmembranären Helices die größte zusammenhängende membranäre Struktur in der PDB darstellt.

Für die beiden Testsequenzen wurden außerdem die membranären Bereiche der Helices mit Hilfe des Programms PHDtop ermittelt [68]. Die Vorhersage erfolgt hier ähnlich wie beim PHDsec-Verfahren über ein neuronales Netz, das anhand von Sequenzen transmembranärer Proteine trainiert wurde. Die Sequenzen und die Lage der membranären Bereiche wurden der SWISS-PROT Sequenzdatenbank [69] entnommen. Als Eingabe diente auch hier das bereits erwähnte MAXHOM-Multialignment.

Lage und Ausmaß der membranären Helixbereiche in der Sequenz des M_2 -Rezeptors entsprechen den Ergebnissen, die aus einer Analyse von etwa 500 GPCR-Sequenzen gewonnen wurden [70]. Für die GPCRs erlaubt diese Untersuchung die genaueste Vorhersage der membranären Helixbereiche.

3.2.3 Vorhersage der Helixenden

3.2.3.1 Interpretation der Ergebnisse

Interpretierte man die Sekundärstrukturvorhersagen für das Bacteriorhodopsin und die Cytochrom-C-Oxidase wie bei einem globulären Protein, so erlaubten

die Ergebnisse nur in wenigen Fällen die korrekte Vorhersage der transmembranären Helices. Deshalb war eine Änderung des Interpretationsansatzes nötig. Um diese Änderung deutlich zu machen, soll kurz die Auswertung der Ergebnisse für ein globuläres Protein beschrieben werden: Hier sollten Helices in der Vorhersage als zusammenhängende helikale Bereiche erkennbar sein, die an ihren Enden durch *Coil*-Segmente begrenzt werden. Um die Fehler einzelner Programme zu minimieren, ist es vorteilhaft, sogenannte Consensus-Vorhersagen einzusetzen, in denen die Ergebnisse mehrerer Vorhersageverfahren zusammengefaßt werden [71]. Hierbei wird meist eine Mehrheitsentscheidung herangezogen, d.h. einer Aminosäure wird diejenige Sekundärstruktur zugeordnet, die am häufigsten vorausgesagt wurde. In den Fällen, wo keine Sekundärstruktur mehrheitlich vorausgesagt wird, kann die Consensus-Vorhersage keine eindeutige Aussage machen.

Entsprechend den Ergebnissen van Rhees fanden sich auch bei den hier verwendeten Methoden häufig falsch vorhergesagte β -Faltblattstrukturen innerhalb der transmembranären Helices der Teststrukturen (vgl. Kapitel 3.2). Hieraus ergab sich eine wichtige Änderung im Interpretationsansatz, mit dem die Vorhersagegenauigkeit verbessert werden konnte: Eine transmembranäre Helix wurde als zusammenhängender Bereich von Helix- und β -Faltblattstrukturvorhersagen definiert. Diese Änderung muß sich auch auf die Bildung der Consensus-Vorhersage auswirken. Als transmembranäre helikale Bereiche kamen nun alle Aminosäuren der Sequenz in Betracht, für die mindestens die Hälfte der Verfahren eine Helix oder ein β -Faltblatt vorhersagt. Aminosäuren mit uneindeutiger Consensus-Vorhersage, d. h. bei denen genau die Hälfte der Verfahren eine Helix- oder Faltblattvorhersage machte, wurden ebenfalls als potentielle transmembranäre Helix interpretiert. Diese Entscheidung wurde getroffen, weil durch sie ebenfalls die Vorhersagegenauigkeit verbessert werden konnte. Zur Unterscheidung einer transmembranären Helix von einer Helix bzw. einem β -Faltblatt der Loopregion wurde zudem die PHDtop-Vorhersage genutzt, d.h. im Bereich einer transmembranären Helix mußte auch die PHDtop-Methode eine transmembranäre Region vorhersagen.

3.2.3.2 Bacteriorhodopsin

Die hier vorgestellten Ergebnisse umfassen nur die Consensus-Vorhersagen für die Sequenzen von Bacteriorhodopsin und der Cytochrom-C-Oxidase, da durch sie die Helixenden der Strukturen am genauesten wiedergegeben werden konnten. Die Ergebnisse der Einzelvorhersagen finden sich in Anhang A. Die Ergebnisse von Bacteriorhodopsin werden in Abbildung 3.1 vorgestellt.

Helix 1, 2, 3 und 7 wurden fast durchgängig als helikale Bereiche vorhergesagt. In den anderen drei Helices fanden sich dagegen auch Vorhersagen für eine β -Faltblattstruktur, so daß nur durch ihre Einbeziehung alle sieben Helices in der Sequenz identifiziert und die Helixenden vorhergesagt werden konnten. Nur in Helix 3 (N-terminales Ende) und Helix 4 (C-terminales Ende) kam es zu geringfügigen Verschlechterungen. Abweichungen der vorhergesagten Helixenden von der PDB-Struktur betragen nicht mehr als drei Aminosäuren.

In Helix 6 teilte eine *Coil*-Vorhersage die Helix in zwei Teile. Tatsächlich ließ sich bereits aus der Sequenz aufgrund des vorhandenen Prolins Pro199 auf eine Abweichung von der helikalen Struktur schließen. Proline lassen sich nicht in die ideale Struktur einer α -Helix einpassen, da das Wasserstoffbrückenmuster der Helix gestört wird und durch den wenig flexiblen Ring ein Knick in der Helix induziert wird [72]. Im membranären Bereich ist das Aufbrechen von α -helikalen Wasserstoffbrücken ungünstig, da der Energieverlust nicht durch Wechselwirkungen mit (den polaren) Wassermolekülen ausgeglichen werden kann. Die Störung, die durch das Prolin in der PDB-Struktur des Bacteriorhodopsins induziert wird, bleibt daher lokal begrenzt, die Integrität der transmembranären Helix geht nicht verloren. Für die Festlegung der Enden der transmembranären Helices spielte die Störung daher keine Rolle. Beim späteren Aufbau der Struktur muß der Knick (*Kink*) allerdings berücksichtigt werden (vgl. Kapitel 3.3.3). Die Lage des membranären Bereichs der Helix wird in diesem Fall von der PHDtop-Vorhersage besser beschrieben, da diese speziell für diesen Bereich ausgelegt ist.

3.2.3.3 Cytochrom-C-Oxidase

Abbildung 3.2 zeigt die Consensus-Vorhersage für die Cytochrom-C-Oxidase. Die meisten der 24 Helixenden können mit Abweichungen von maximal drei Aminosäuren vorausgesagt werden. In vier Fällen erwies sich die Vorhersage allerdings als problematisch. Nach dem oben entwickelten Interpretationsansatz würde das Ende der Helix 2 deutlich von dem Helixende in der PDB-Struktur abweichen, da hier eine *Coil*-Region außerhalb des von PHDtop ermittelten transmembranären Bereichs vorhergesagt wurde. In diesem Fall würden daher die beiden Segmente als zwei unterschiedliche Sekundärstrukturelemente interpretiert und damit die transmembranäre Helix viel zu kurz vorhergesagt werden. In solchen Fällen kann die Vorhersage keine eindeutige Aussage machen, sondern stellt zwei mögliche Helixenden zur Auswahl.

Für die Helix 11 kann nur das N-terminale Ende mit guter Genauigkeit vorhergesagt werden, während die Vorhersage des C-Terminus nicht möglich ist. Das Problem ist allerdings bereits anhand der Ergebnisse erkennbar, da die Segmente der Consensus- und der PHDtop-Vorhersage hinsichtlich der Lage der Helix nur eine geringe Übereinstimmung zeigen. Am besten läßt sich die gesamte Helix beschreiben, wenn man beide Vorhersagen kombiniert.

In den beiden beschriebenen Fällen war die Problematik der Voraussage ohne Kenntnis der PDB-Struktur erkennbar. In zwei weiteren Fällen war dies nicht möglich. Das N-terminale Ende der Helix 3 und das C-terminale Ende von Helix 7 weichen um fünf bzw. sechs Aminosäuren von den realen Helixenden ab. Diese beiden großen Abweichungen treten aber in Hinblick auf die insgesamt 38 untersuchten Helixenden allerdings sehr selten auf.

		10	H1	20	30	40	50
Sequenz						
Sequenz	MFINRWLFSTNHKDIGTLYLLFGAWAGMVGTLALSLLIRAELGQPGTLLGD						
Consensus	++EEEE+		+++HH				
		H2	60	70	80	90	H3 100
Sequenz						
Sequenz	DQIYNVVVTAHAFVMIFFVMVPIIMIGGFGNWLVP LMI GAPDMAFFPRMNNM						
Consensus	+EEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHEE+				+EE+++		
		H3	110	120	130	140	H4 150
Sequenz						
Sequenz	SFWLLPPSFLLLLASSMVEAGAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTIFSL						
Consensus	+EEE	+++HHHHHHHHHHHH		EEE+			HHHHEEHHH
		H4	160	170	180	H5 190	200
Sequenz						
Sequenz	HLAGVSSILGAINFITTIINMKPPAMSQYQTP LFVWSVMITAVLLLLSLP						
Consensus	HHHHHHHHHHHHHHHEEE+					EEEEHHHHHHHHHHHH+	
		H5	210	220	230	H6 240	250
Sequenz						
Sequenz	VLAAGITMLLTDRNLNTTFDPAGGGDP ILYQH LFWFFGHPEVYILILPG						
Consensus	HHHHHHEEE+		+E+		++++HHEEE		EEEEEE
		H6	260	270	H7 280	290	300
Sequenz						
Sequenz	FGMISHIVTYYS GKKEPFGYMGMVWAMMSIGFLGFIVWAHMF TVGMDVD						
Consensus	+EEEEEEEE			++++HHHHHHHHHH+HHH+++HHHEEEEEEE			
		H8	310	320	330	H9 340	350
Sequenz						
Sequenz	TRAYFTSATMIIAIP TGVKVF SWLATLHGNIKWSPAMMWALGFIFLFTV						
Consensus	+HHHHHEEEEEEE		HHHHHHHHHH			HHHHHHH HHEE+E+	
		H9	360	370	H10 380	390	400
Sequenz						
Sequenz	GGLTGIVLANSSLDIVLHDTYYVVAHFHYVLSMGAVFAIMGGFVHWFP LF						
Consensus	+EEEE+		EEE		++++HHHHHHHH+HHHHHHHHHH+EE+		
			410	H11 420	430	440	H12 450
Sequenz						
Sequenz	SGYTLNDTWAKIHFAIMFVGVNMTFFPQHFLGLSGMPRRYSDYDPDAYTMW						
Consensus	HHHHHHHHEEEEE			++			HHHH
		H12	460	470	480	490	500
Sequenz						
Sequenz	NTISSMGSFISLTAVMLMVFIWEAFASKREVLTVDLTTTNLEWLNGGPP						
Consensus	HH+		HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH		EEEE		+++

Abbildung 3.2: Consensus-vorhersage für die Sequenz der Cytochrom-C-Oxidase (A-Kette; Swiss-Prot-Eintrag: cocc_bov). Für weitere Erklärungen siehe Abbildung 3.1

3.2.3.4 M₂-Rezeptor

Abbildung 3.3 zeigt das Ergebnis der Consensus-Vorhersage für den M₂-Rezeptor. Mit Hilfe des entwickelten Interpretationsansatzes wurden hieraus die Enden der transmembranären Helices abgeleitet. Die Lage des zweiten und dritten extrazellulären Loops konnte dabei eindeutig vorhergesagt werden. Dies gilt auch für das N-terminale Ende der Helix 5, wo die Consensus-Vorhersage selbst uneindeutig ist. Das N-terminale Ende der Helix 5 könnte sowohl bei Cys176, als auch bei Ala184 liegen. Grundlegende Vorstellungen über die Struktur eines GPCR der Rhodopsinfamilie schließen jedoch eine Beteiligung von Cys176 an einer transmembranären Helix aus (vgl. Kapitel 1.1.5). Vielmehr muß diese Aminosäure in einer flexiblen Loopregion liegen, da anders die Bildung der Disulfidbrücke mit Cys124 aufgrund der Lage von Helix 3 und 5 nicht vorstellbar wäre.

Auch für Helix 2 kamen zwei mögliche C-terminale Enden in Frage. Aufgrund der *Coil*-Vorhersage für Aminosäure Asn78 läßt sich das eine mögliche Helixende bei Met77 festlegen, das alternative Helixende liegt bei Ile96. Eine Entscheidung konnte zu diesem Zeitpunkt nicht getroffen werden, da über diesen Bereich keine weiteren Informationen verfügbar waren. Daß letztendlich das Ende der Helix im 7-Helix-Modell bei Ile96 festgelegt wurde, sollte nur sicherstellen, daß für den Aufbau der Loopbereiche Koordinaten für beide möglichen Helixenden verfügbar waren.

Eine genaue Kenntnis der Helixenden des intrazellulären Bereichs war im Rahmen dieser Arbeit nicht erforderlich, insofern wurden die Ergebnisse der Consensus-Vorhersage fast ohne Änderung für den Aufbau des 7-Helix-Modells übernommen. In zwei Fällen wurden zusätzliche experimentelle Ergebnisse berücksichtigt. So wurde das Ende der Helix 3 bei Val125 festgelegt, da *spin-label*-Untersuchungen zeigen konnten, daß das hochkonservierte DRY-Motiv (Asp120 - Tyr122) in helikaler Konformation vorliegt [73]. Weiterhin wurde das C-terminale Ende der Helix 7 dem Ende des später als Vorlage verwendeten Rhodopsinmodells angepaßt (vgl. Kapitel 3.3.2), da die extreme Länge der Sekundärstrukturvorhersage nicht mit experimentellen Ergebnissen in Einklang stand. In der Vorhersage in Abbildung 3.3 endet die Helix bei Cys457.

Untersuchungen zeigen, daß dieses Cystein palmitoyliert vorliegt, wobei der Palmitoylrest in der Membran verankert ist [20]. Daher muß auch das Cystein in Membrannähe lokalisiert sein. Berücksichtigt man die Lage des transmembranären Bereichs der Helix 7 und seinen Abstand zu Cys457, so kann sich die Helix unmöglich bis zu dieser Aminosäure erstrecken.

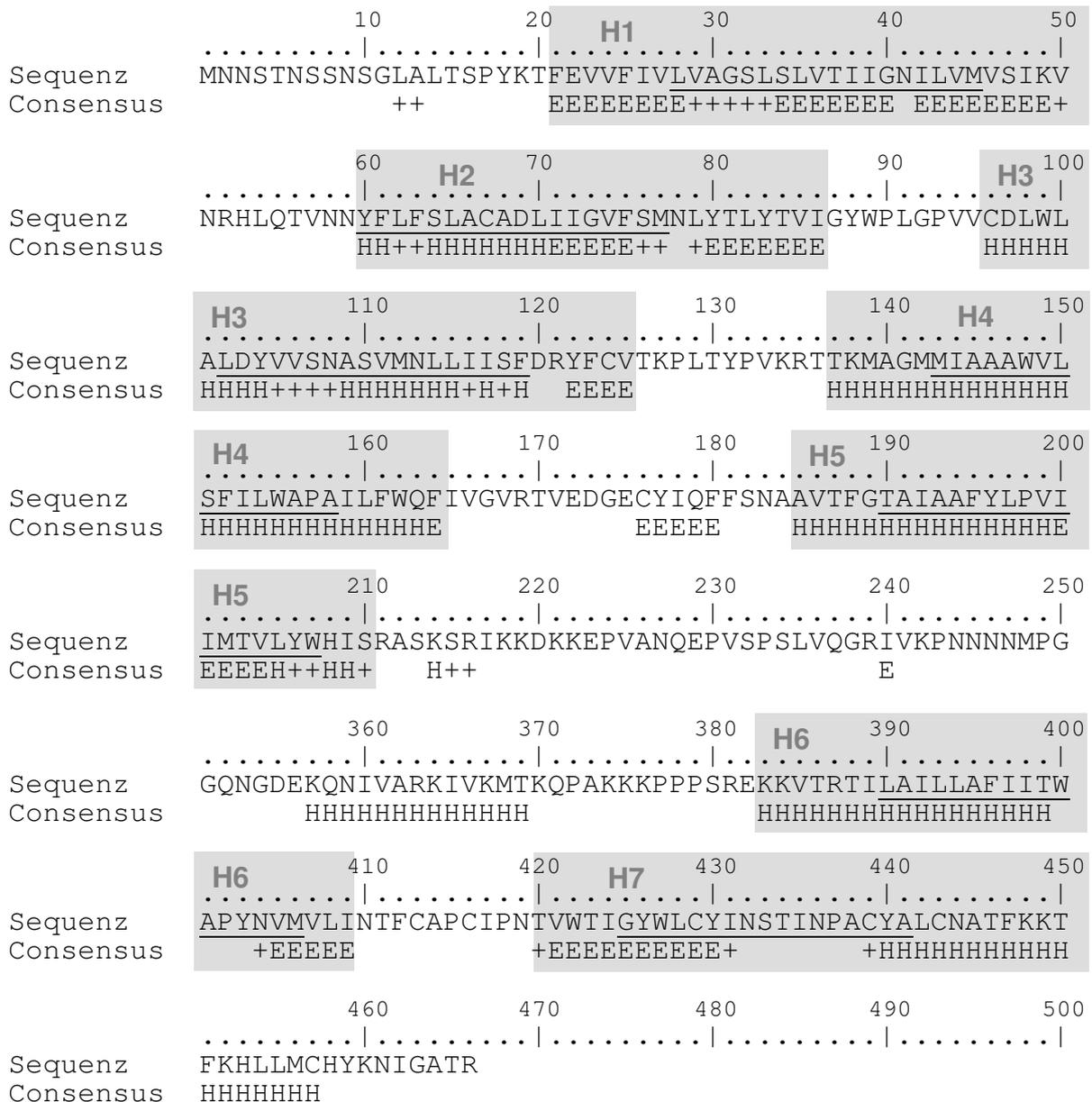


Abbildung 3.3: Consensus-Vorhersagen für die Sequenz des M₂-Rezeptors. Die grau unterlegten Bereiche markieren die Lage der transmembranären Helices die aufgrund der Vorhersage wahrscheinlich erschien. Zur weiteren Erklärung der Abbildung siehe Abbildung 3.1

3.2.3.5 'Helical capping'-Motive

Unter dem Begriff ‚Helical cap‘ versteht man Struktur motive im Bereich C- oder N-terminaler Enden einer Helix. Typisch für ein solches Motiv ist sein Muster polarer und hydrophober Wechselwirkungen, das über bestimmte Aminosäuren ermöglicht wird. Hierbei liegt jeweils der eine Wechselwirkungspartner innerhalb, der anderer außerhalb der Helix. Es wurden eine Reihe wiederkehrender Wechselwirkungsmuster gefunden, die in der Sequenz als charakteristisches Aminosäuremotiv erscheinen. Sieben solcher Muster konnten bislang eindeutig identifiziert werden. Nach der Nomenklatur von Aurora und Rose handelt es sich hierbei um die Motive: Box, Big Box, β -Box, Schellmann, Non-Gly-Schellmann, α_L und das Prolin-Motiv [74].

Mit dem Auffinden solcher Bereiche in der Sequenz könnten im Gegensatz zu den oben beschriebenen Sekundärstrukturvorhersagen nicht nur die Enden der Helices exakt festgelegt werden, sondern auch zusätzliche Informationen über den Verlauf des sich anschließenden Loopbereichs gewonnen werden. Die aus den Sekundärstrukturvorhersagen ermittelten extrazellulären Helixenden und ihre Umgebung wurden daher auf die Aminosäuremotive untersucht, die die sieben Arten der ‚Helical caps‘ charakterisieren. Es konnte aber keines der Motive in der Sequenz wiedergefunden werden.

3.2.4 Charakterisierung der Loopregionen

3.2.4.1 β -Turns

Das Ergebnis der Sekundärstrukturvorhersagen bei der Charakterisierung der extrazellulären Loopbereiche beschränkte sich auf die Identifizierung eines β -Faltblattbereichs im zweiten extrazellulären Loop. Um weitere Informationen über die Loopstruktur zu erhalten, wurde zusätzlich nach β -Turns gesucht. β -Turns bestehen aus vier hintereinanderfolgenden Aminosäuren, deren Proteinrückgrat eine Wendung von ungefähr 180 Grad vollzieht, woraus ein relativ kleiner Abstand zwischen den C_α -Atomen der ersten und vierten Aminosäure resultiert. Entsprechend liegt nach Definition von Lewis et al. dann ein β -Turn vor, wenn der Abstand zwischen diesen beiden C_α -Atomen weniger als 7Å beträgt, außerdem darf das Fragment nicht Teil einer α -Helix sein. Die

Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen den Hauptkettenatomen $C=O_i$ und $N-H_{i+3}$, die in den idealen Turnkonformationen auftritt, ist dagegen nicht zwingend vorgeschrieben [75]. Anhand der Φ - und Ψ -Winkel der zweiten und dritten Aminosäure eines β -Turns unterscheidet man acht Typen (I,II,I',II',VIa,VIb,VIII). β -Turns, die sich keiner dieser Klassen zuordnen lassen, werden unter der Kategorie IV zusammengefaßt. Die Strukturen für die wichtigsten 4 Turntypen, sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

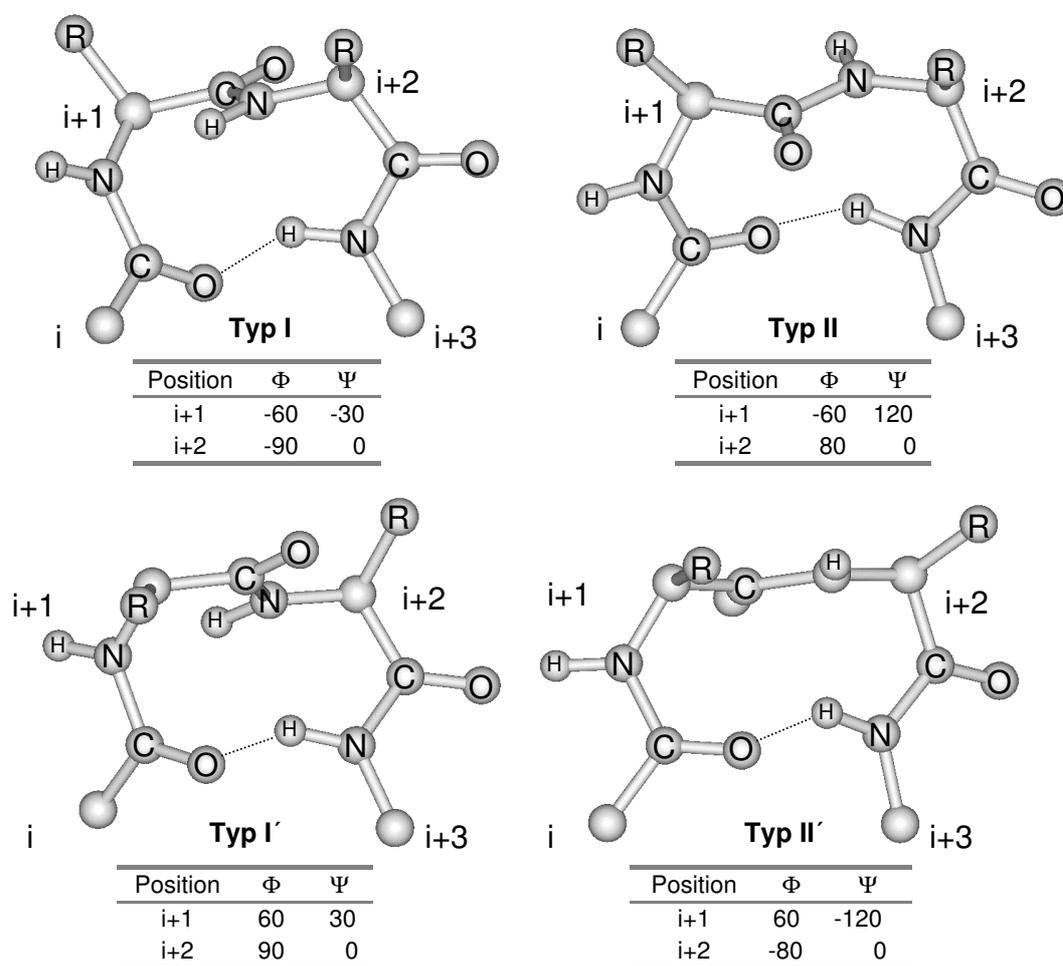


Abbildung 3.4: Ideale Struktur der β -Turn-Typen I, II, I' und II'

3.2.4.2 Vorhersage von β -Turns

Bereits bei der Strukturvorhersage mit der GOR-Methode fanden sich in allen drei extrazellulären Loops für einzelne Aminosäuren Voraussagen für einen β -Turn. Aussagen über den Turntyp oder die Position der betreffenden Amino-

säuren im Turn sind mit GOR allerdings nicht möglich. Daher wurden die drei extrazellulären Loopregionen auf Aminosäuretypen untersucht, deren Auftreten nach Untersuchungen von Hutchinson et al. an bestimmten Turnpositionen signifikant höher ist, als aufgrund ihrer durchschnittlichen Verteilung in Proteinen zu erwarten wäre [76]. Wahrscheinlich sind solche Aminosäuren in der Lage, die Turnstruktur an der entsprechenden Position zu stabilisieren. Im ersten und zweiten extrazellulären Loop konnten so Stellen identifiziert werden, die potentielle Turnstrukturen für β -Turns des Typs I und II darstellen. Als drittes Vorhersageverfahren wurde BTPRED [77] verwendet. Mit Hilfe eines neuronalen Netzes werden hier Vorhersagen über die Lage und die Art des Turns (Unterscheidung in Klasse I und II) gemacht. Da sich die Vorhersage auf β -Turns beschränkt, mußte dem Programm die Lage helikaler Segmente und β -Faltblattstrukturen im M_2 -Rezeptor zusammen mit der Rezeptorsequenz mitgeteilt werden. Hierbei wurde auf die Ergebnisse der vorangegangenen Consensus-Vorhersage für den M_2 -Rezeptor zurückgegriffen, mit Hilfe derer die Längen der transmembranären Helices festgelegt worden waren. Außerdem wurde der für den zweiten extrazellulären Loop vorhergesagte β -Faltblattstrang berücksichtigt. Die Ergebnisse der BTPRED-Vorhersage bestätigten die vorher gefundene Lage der möglichen Turnstrukturen im ersten und zweiten extrazellulären Loop. Abbildung 3.5 a und b fassen die Ergebnisse der drei Vorhersagen zusammen.

Die Vorhersage eines β -Turns erlaubte einen neuen Interpretationsansatz für den zweiten extrazellulären Loop. Im Zusammenhang mit der β -Faltblattstruktur besteht die Möglichkeit, daß hier ein β -Hairpin vorliegt. Bei dieser von Sibanda et al. [78] beschriebenen Struktur werden zwei antiparallel angeordnete Faltblattstränge über einen β -Turn verbunden. Ein zweiter nicht vorhergesagter Strang läge danach etwa im Bereich vor Val170. Tatsächlich wurden die Aminosäure Phe163 in der Consensus-Vorhersage als β -Faltblattstrukturen vorhergesagt und längere Faltblattstrukturen in diesem Bereich finden sich auch in einigen Einzelvorhersagen. Für den ersten extrazellulären Loop des Bacteriorhodopsins findet sich eine ähnliche Vorhersage (siehe Abbildung 3.5 c), allerdings schlug der Versuch von Henderson et al. fehl, diesen

β -Hairpin in ein Bacteriorhodopsinmodell einzubauen [66]. Die dabei erhaltene Loopstruktur konnte nicht mit den kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Einklang gebracht werden. Auf eine Modellierung der β -Hairpinstruktur wurde daher beim weiteren Aufbau des M_2 -Rezeptor-Modells verzichtet.

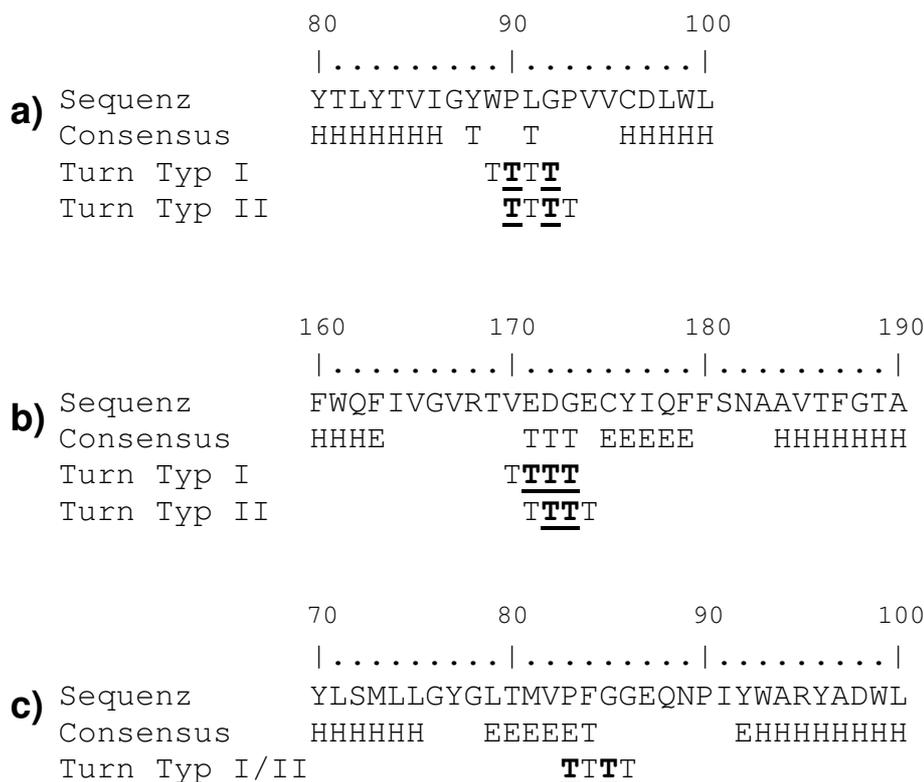


Abbildung 3.5: Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage für den ersten und zweiten extrazellulären Loop des M_2 -Rezeptors (a+b) und für den ersten extrazellulären Loop des Bacteriorhodopsins (c). Die Consensus-Vorhersage enthält zusätzlich die β -Turnvorhersage der GOR-Methode (T). Die Zeilen darunter geben die Ergebnisse der BTPred-Methode wieder. Unterstrichene Positionen kennzeichnen die Lage von Aminosäuren, deren Auftreten an der entsprechenden Position im β -Turn gehäuft auftreten.

3.3 Aufbau des M₂-Rezeptormodells

3.3.1 Auswahl der Modellvorlage

Zu Beginn dieser Arbeit standen die Koordinaten mehrerer GPCR-Modelle von Vertretern der Rhodopsinfamilie zur Verfügung. Es erschien daher sinnvoll, bei dem Aufbau des M₂-Rezeptors von einem dieser Modelle auszugehen. Die Modelle umfaßten ausschließlich den Bereich der sieben transmembranären Helices. Die Unterschiede zwischen den einzelnen GPCR-Modellen sind dabei hauptsächlich auf die Methoden und die experimentellen Ergebnisse zurückzuführen, die beim Aufbau verwendet wurden, der phylogenetische Verwandtschaftsgrad ist für die Auswahl der Vorlage dagegen bedeutungslos.

3.3.1.1 Strukturaufklärung bei GPCRs

Jede der sieben transmembranären Helices kann als rigides Strukturelement des Rezeptors aufgefaßt werden. Beschränkt man sich auf den transmembranären Bereich des Rezeptors, so besteht das Hauptproblem bei der Modellierung in der korrekten Ausrichtung der einzelnen Helices zueinander und zur Lipidmembran. Sequenzvergleiche und die Untersuchung von Rezeptormutanten geben hierbei Hinweise auf die Lage der Helices bzw. einzelner Aminosäuren.

So kennzeichnen konservierte hydrophobe Bereiche in GPCR-Alignments die Regionen der Helices, die innerhalb der Membran liegen. Einzelne konservierte Aminosäuren deuten auf eine wichtige Funktion bei der Proteinfaltung oder der Ligandbindung hin. Arginine und Lysine im Bereich der Helixenden können mit Phosphatidylgruppen der Membranlipide wechselwirken und so den Rezeptor in der Membran stabilisieren [72]. In Rezeptormutanten lassen sich weiterhin gezielt *spinlabels* oder Fluoreszenzmarker einbringen. Durch spektroskopische Verfahren erhält man hierdurch Hinweise, ob die markierte Aminosäure innerhalb oder außerhalb der Membran liegt und ob sie in Kontakt zu den Membranlipiden steht [79]. Eine Möglichkeit, die räumliche Lage von Aminosäuren zu untersuchen, besteht in der Konstruktion von Zink-bindenden Domänen. Dabei werden Aminosäuren zu Histidinen mutiert, die bei geeigneter

Anordnung in der Lage sind, ein Zinkion zu komplexieren [80]. Weitere Beispiele experimenteller Verfahren, die Aussagen über die Lage von Aminosäuren in transmembranären Helices erlauben, werden bei Herzyk et al. beschrieben [81]. Anhand von Mutationsstudien kann nicht nur die Lage von Aminosäuren aufgeklärt werden, sondern auch ihr Einfluß auf die Ligandenbindung, Signalweiterleitung und Rezeptorexprimierung untersucht werden. Eine Verminderung der Expressionsrate zum Beispiel weist auf eine inkorrekte Proteinfaltung der Rezeptormutante hin, was sich durch den Verlust interhelikaler Kontakte erklären läßt.

3.3.1.2 Modellierung von GPCRs

Die Ergebnisse der oben vorgestellten Untersuchungen erlauben in den meisten Fällen keine genaue Positionsangabe, sondern ordnen den Aminosäuren nur einen bestimmten Bereich zu (siehe Abbildung 3.6). Erst durch die Berücksichtigung einer großen Zahl solcher Hinweise wird der Verlauf der Helices eindeutig definiert. Modelle, die allein aufgrund dieser Methode gebaut wurden, bezeichnet man als Ab-initio-Modelle.

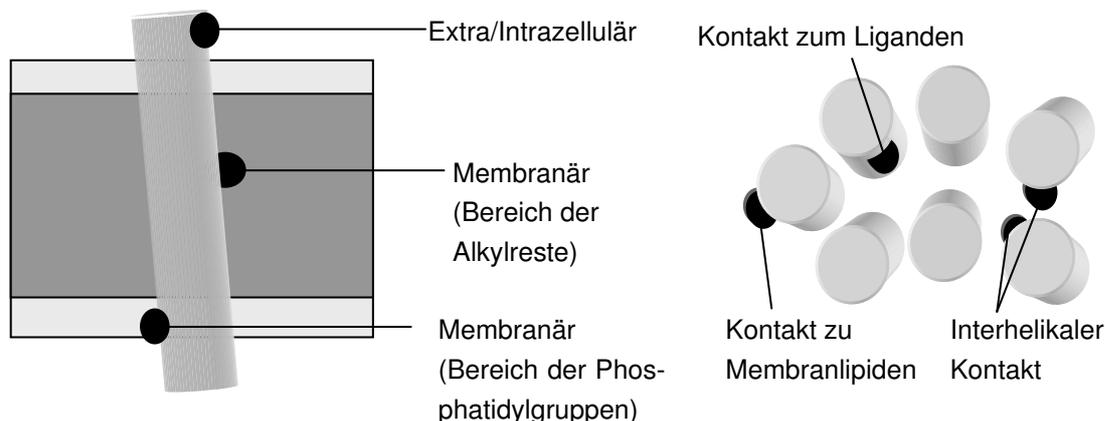


Abbildung 3.6: Anhand von Sequenzvergleichen und experimentellen Ergebnissen lassen sich den Aminosäuren bestimmte Bereiche zuordnen. Links: Blick auf eine Helix entlang der Membranebene; Rechts: Blick auf das Helixbündel

Ein wichtiger Impuls ging von der ersten kryoelektronenmikroskopischen Aufnahme eines GPCRs aus. In der 2-D-Elektronendichtekarte des bovinen

Rhodopsins kennzeichnen sieben Peaks die helikalen transmembranären Bereiche. Dies bestätigte zwar die grundlegenden Vermutungen zum Aufbau der GPCRs, zeigte aber auch eine deutliche Abweichung zu den vorangegangenen Strukturen. Neben den Ab-initio Modellen betraf dies auch Modelle, die aus der Struktur des Bacteriorhodopsins entwickelt worden waren. Bacteriorhodopsin ähnelt in seinem Aufbau den GPCRs, denn auch hier sind sieben transmembranäre Helices in einem Bündel angeordnet. Die Strukturaufklärung war beim Bacteriorhodopsin bereits sehr viel weiter fortgeschritten, als bei den GPCRs, so daß bereits auf der Basis hoch aufgelöster kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen dreidimensionale Modelle verfügbar waren [82]. Erschwert wurde die Verwendung dieser Strukturen allerdings durch die Tatsache, daß keinerlei Sequenzhomologie zwischen Bacteriorhodopsin und GPCRs gefunden werden konnte. Die kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Rhodopsins zeigten nun weiterhin deutliche Unterschiede in der Anordnung und Neigung der Helices (siehe Abbildung 3.7). Trotz ihrer geringen Auflösung von 9 Å wurde nun versucht die Anordnung der sieben Helices aus der Dichtekarte des Rhodopsins abzuleiten.

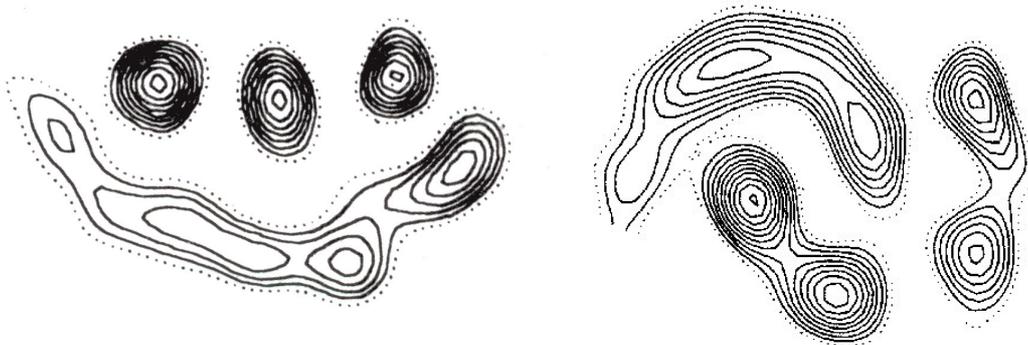


Abbildung 3.7: Vergleich der kryoelektronenmikroskopischen Aufnahme von Bacteriorhodopsin (links) und Rhodopsin (rechts).

Das von Joyce Baldwin erstmals 1993 vorgestellte Rhodopsinmodell basierte neben dieser Elektronendichtekarte auf der Analyse eines Sequenzalignments von 204 GPCRs [83]. Untersucht wurde vor allem die Verteilung hydrophober und hydrophiler Bereiche in der Sequenz. Aufgrund des unterschiedlich stark

ausgeprägten amphiphilen Charakters der helikal angeordneten Sequenzabschnitte, konnten diese den Peaks der Elektronendichtekarte zugeordnet werden (vgl. Abbildung 3.8). Hierdurch wurde auch die Orientierung der einzelnen Aminosäuren in der Helix festgelegt. Die Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen konnten die Vorstellung eines generellen ‚Bauplans‘ für die Familie der Rhodopsin-ähnlichen GPCRs bestätigen.

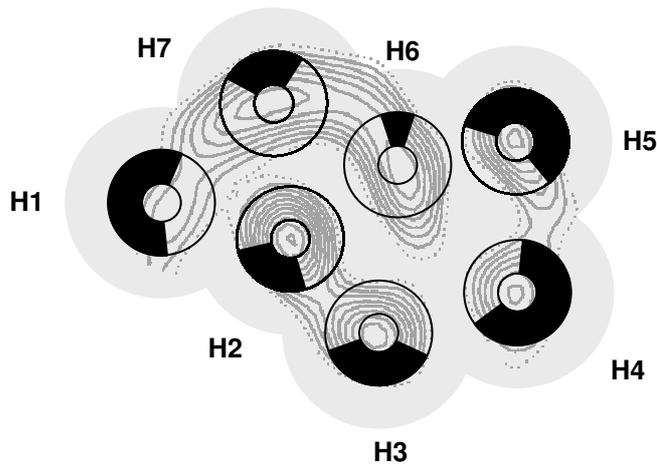


Abbildung 3.8: Zuordnung der Sequenzabschnitte der transmembranären Helices zu den Peaks der Dichtekarte aufgrund ihres unterschiedlichen amphiphilen Charakters. Jeder Kreis symbolisiert eine transmembranäre Helix. Hydrophobe Oberflächen der Helices sind schwarz gehalten (modifiziert nach Ballesteros/Weinstein in [72]).

3.3.1.3 Rhodopsinmodell von Pogozeva

Basierend auf einem Modell des Rhodopsins, das unter Verwendung des Baldwin-Modells und einer verbesserten Dichtekarte des Froschrhodopsins (Auflösung 7 Å) entstand, wurde von Pogozeva et al. ein chimärer Rezeptor aufgebaut, der polare Aminosäuren aus 410 GPCRs berücksichtigt [84]. Schon Baldwin hatte aufgrund ihrer Ergebnisse vermutet, daß die meist im Inneren des Rezeptors gelegenen polaren Seitenketten interhelikale Kontakte ausbilden können bzw. an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Entsprechend wurden anhand des Sequenzalignments schrittweise Seitenketten im Modell verändert und die Ausbildung möglicher Wasserstoffbrücken untersucht. Die Geometrie der auf diese Weise neu gefundenen Wechselwirkungen wurde optimiert und während des weiteren Aufbaus fixiert. Hierbei änderte sich schrittweise auch die

Anordnung der Helices zueinander. Auch die Ausbildung von Disulfidbrücken benachbarter Cysteine wurde in einer späteren Phase des Aufbaus berücksichtigt. Im finalen Modell bilden Wasserstoff- und Disulfidbrücken ein Netz aus interhelikalen Kontakten, die die Lage der einzelnen Helices zueinander definieren.

Aus diesem Chimären-Modell wurde wiederum das veröffentlichte Rhodopsin-Modell entwickelt, dessen Struktur über die PDB (1BOK) zugänglich war und das als Vorlage für den Aufbau des M₂-Rezeptors ausgewählt wurde. Folgende Entscheidungskriterien waren hierfür ausschlaggebend:

- Die als Vorlage benutzte Dichtekarte lieferte neue wichtige Informationen über die Rhodopsin-Struktur. Die Helices 1, 2, 3 und auch Helix 5 zeigten eine stärkere Neigung als aus den älteren Aufnahmen zu entnehmen war. Hieraus lassen sich zu einem Teil die großen Unterschiede zu älteren Modellen erklären, die noch auf der alten Dichtekarte basierten. So liegt der RMSD-Wert der C α -Atome beim Vergleich mit Modellen von Oliveira et al. [85], Donnelly et al. [86] und Lin et al. [87] bei etwa 6 Å, beim Vergleich mit dem Modell von Herzyk und Hubbard bei 3,9 Å [88].
- Die oben skizzierte Vorgehensweise bei der Modellentwicklung benutzt einen distanzgeometrischen Ansatz, der in Verbindung mit einem Multialignment eine Weiterführung der Sequenzanalyse des Baldwinmodells ermöglicht. Wichtig erscheint hierbei die große Zahl der verwendeten Sequenzen und die Maximierung der Anzahl intramolekularer Wasserstoffbrücken. Analysen von Strukturen globulärer Proteine zeigen, daß ein Großteil der polaren Seitenketten im Inneren eines Proteins Wasserstoffbrücken ausbilden. Dies wurde bei der Aufstellung des Modells berücksichtigt.
- Eine Vielzahl experimenteller Ergebnisse, die beim Aufbau nicht berücksichtigt wurden, können mit dem Pogozheva-Modell in Einklang gebracht werden. Wichtig erscheint hierbei vor allem die gute Übereinstimmung mit der später veröffentlichten 3D-Dichtekarte des bovinen Rhodopsins. Auch die hierauf beruhende Überarbeitung des Baldwin-Modells ist dem Modell ähnlich und bestätigt so die von Pogozheva gewählte Vorgehensweise [84].

3.3.2 Sequenzalignment

Mithilfe von Multialignments G-Protein gekoppelter Rezeptoren konnten in jeder der sieben transmembranären Regionen konservierte Aminosäuren identifiziert werden [85]. Alignments für transmembranäre Bereiche beliebiger GPCR-Sequenzen lassen sich nun einfach durch Überlagerung dieser Aminosäuren erstellen. Abbildung 3.9 zeigt das Alignment, das nach dieser Methode für Rhodopsin und den M₂-Rezeptor aufgestellt wurde. Die Überlagerung erfolgte anhand von Aminosäuren, die sowohl in der Familie des Rhodopsins (Opsine) als auch in Rezeptoren der biogenen Amine konserviert sind [84]. Für jeden transmembranären Bereich gab es nur eine einzige Möglichkeit, die konservierten Aminosäuren zu überlagern. Die Sequenzidentität der gemeinsamen Bereiche beträgt 23 %.

Helix 1			
opsd_bovin	34	PWQFSMLAAYMFLLIMLGFPINF TLYVTVQHK	65
acm2_pig	20	TFEVVFIVLVAGSLSLVTII GNILVMVSIKVN	50
		↑ ↑	
Helix 2			
opsd_bovin	71	PLNYILLNLAVADLFMVFGGFTT LYTSLN	100
acm2_pig	57	VNN YFLFSLACADLIIGVFS MNLYTLYTVI	86
		↑↑ ↑↑	
Helix 3			
opsd_bovin	111	CNLEGGFATLGGEIALW SLVVLAIERYVVVCK	142
acm2_pig	96	CDLWLALDYVVSNASVM LLIISFDRYFCVTK	127
		↑↑	
Helix 4			
opsd_bovin	151	ENHAIMGVAF TWVMALACAAPPLVGWSRY	179
acm2_pig	137	TKMAGMMIAAAWVLSF ILWAPAILFWQFI	165
		↑ ↑	
Helix 5			
opsd_bovin	200	NESFVIYMFVVHFI IPLIVIFFCYGQL	226
acm2_pig	183	NAAVTFGT AIAAFYLPVIIMTVLYWHI	210
		↑ ↑	
Helix 6			
opsd_bovin	247	EKEVTRMVIIMVIAFL ICWLPYAGVAFYIFT	277
acm2_pig	390	EKKVTRTILAILLAF IITWAPYNVMVLIINTF	420
		↑ ↑ ↑	
Helix 7			
opsd_bovin	286	PIFMTIPAFFAKT SAVYNPVIYIMMN	311
acm2_pig	419	NTVWTIGYWLCYIN STINPACYALCN	444
		↑↑ ↑	

Abbildung 3.9: Sequenzalignment für die transmembranären Helices des bovinen Rhodopsins (opsd bovin) und des M₂-Rezeptors vom Schwein (acm2 pig). Die Pfeile kennzeichnen konservierte Aminosäuren der Opsin- und der Amin-Familie. Fett gedruckte Bereiche kennzeichnen die transmembranären Helices des Rhodopsin- bzw. M₂-Modells.

3.3.3 7-Helix-Modell des M₂-Rezeptors

Der Aufbau des M₂-Rezeptors erfolgte zunächst mit dem HOMOLOGY-Modul des Programms INSIGHTII [89]. Entsprechend dem in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Sequenzalignment konnten die Koordinaten der Aminosäuren für die transmembranären Helices 2, 3, 5 und 6 vom Rhodopsin-Modell (vgl. Kapitel 3.3.1) übernommen werden. Dabei wurden die Koordinaten der Seitenketten der Aminosäuren soweit wie möglich übertragen. Bei den Helices 2 und 5 gab die Sekundärstrukturvorhersage längere Helices für den M₂-Rezeptor an, als sie das Rhodopsin-Modell aufweist (siehe Abbildung 3.9), daher wurden die entsprechenden Aminosäuren in helikaler Konformation ergänzt.

Für die Helices 1, 4 und 7 war eine Modifizierung der Koordinaten der Rückgrat- atome nötig, da diese Helices weniger Proline enthalten als diejenigen des Rhodopsins (siehe Abbildung 3.9). Ein Prolin an Position *i* einer Helix verursacht eine Störung der helikalen Konformation, da sonst energetisch ungünstige van-der-Waals-Kontakte zwischen dem Pyrrolidinring des Prolins und dem Carbonylsauerstoff der Aminosäure an Position *i*-4 auftreten würden. Außerdem kann zwischen dem Carbonylsauerstoff und dem Stickstoff des Pyrrolidinrings keine Wasserstoffbrücke gebildet werden. Bei den bisher aufgeklärten Strukturen transmembranärer Proteine findet man als Ergebnis der durch ein Prolin induzierten Störung einen Knick in der transmembranären Helix. Dieser sogenannte Prolin-*kink* wurde auch beim Aufbau des Rhodopsinmodells von Pogozheva et al. für alle Proline berücksichtigt. Da es in den Helices 1, 4 und 7 des M₂-Rezeptors keine Entsprechung für Pro53, Pro172 und Pro292 des Rhodopsins gibt, mußten die Koordinaten verändert werden. Das alleinige ‚Begradigen‘ der Prolin-*kinks*, d.h. die Wiederherstellung der α -helikalen Konformation dieses Bereichs, reicht nicht aus, um diesem Unterschied gerecht zu werden. Wie Abbildung 3.10 zeigt, muß die Position der gesamten Helix verändert werden, um unrealistische Packungsverhältnisse zwischen den Helices zu verhindern. Die drei transmembranären Helices

wurden daher zuerst außerhalb des Modells in idealer α -helikaler Konformation aufgebaut, Seitenketten wurden in gestreckter Form ergänzt. In den Bereichen der Helices 3 und 7, wo im M_2 -Rezeptor die Proline Pro157 und Pro437 den regulären Verlauf der Helix stören, wurden Prolin-*kinks* eingefügt. Die Konformation der Prolin-*kinks* wurde dabei nicht vom Pogozheva-Modell übernommen, da diese speziell den Packungsverhältnissen im Rhodopsin entsprechen. Statt dessen wurde die für Prolin-*kinks* von Sankaramakrishnan et al. vorgeschlagene Konformation verwendet. Anhand von Untersuchungen von Prolin-*kinks* in Röntgenkristallstrukturen und Kraftfeldberechnungen an helikalen Modellpeptiden wurde von dieser Arbeitsgruppe eine energetisch optimierte Konformation der Störung entwickelt [90].

Der Einbau der drei Helices in das Rezeptormodell erfolgte anschließend durch Superpositionierung der $C\alpha$ -Atome auf die entsprechenden Koordinaten des Rhodopsinmodells. Hierdurch bleiben die Lage und Orientierung der drei Helices im Rezeptorbündel weitgehend erhalten. Die Methode wurde zuerst von Nordvall und Hacksel beschrieben [91]. Zuletzt wurde beim C-terminalen Ende der Helix 7 die Länge der Helix dem Rhodopsinmodell angepaßt. (vgl. Kapitel 3.2.3.4)

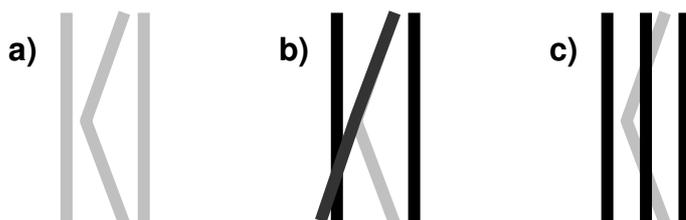


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Aufbaus eines 3-Helix-Modells aus einer Strukturvorlage. Die mittlere Helix enthält einen Prolin-*kink* und soll durch eine reguläre Helix ersetzt werden. a) Anordnung der Helices in der Vorlage; b) 'Begradigen' der Helix innerhalb des Modells führt zu sterischen Konflikten im Modell; c) Anordnung nach Superpositionierung der mittleren Helix auf die Vorlage

Der Protonierungsgrad basischer und saurer Seitenketten entsprach dem physiologischen pH-Wert von 7,4. Die Helices wurden an den N- und C-terminalen Enden durch Acetyl- bzw. Methylaminogruppen erweitert, da zu

diesem Zeitpunkt die Loopbereiche noch nicht modelliert waren. Während der Kraftfeldberechnungen wurde hierdurch die Bildung von Artefakten infolge elektrostatischer Wechselwirkungen der Carboxylat- oder Ammoniumgruppen verhindert.

Anschließend erfolgte die Optimierung der Seitenkettenkonformationen durch das HOMOLOGY-Modul von INSIGHTII. Das Programm greift dabei auf eine Seitenkettenbibliothek zurück, die auf der Analyse von Röntgenstrukturen basiert und die häufigsten Seitenkettenkonformationen der einzelnen Aminosäuren enthält.

Im letzten Schritt wurde die Geometrie des 7-Helix-Modells mit dem Programm DISCOVER [89] unter Verwendung des *consistent-valence*-Kraftfelds (CV-Kraftfelds) optimiert und das Verhalten in einer Moleküldynamik-Simulation (MD-Simulation) untersucht. Da bei der Simulation der stabilisierende Einfluß der Membran und der Loops fehlte, wurde das Proteinrückgrat mit einer Kraft von $200 \text{ kcal/mol}\cdot\text{\AA}^2$ auf den Ursprungskoordinaten gehalten (*Tethering*). Die notwendige Größe der *Tethering*-Konstanten wurde mit Hilfe der Struktur des Bacteriorhodopsins (PDB-Eintrag 2BRD) in einer MD-Simulation ermittelt. Die Methode wurde in unserem Arbeitskreis entwickelt, ihre genaue Beschreibung findet sich in der Arbeit von Jendretzki, wobei dort die *Tethering*-Konstante noch anhand einer älteren Bacteriorhodopsinstruktur von geringerer Auflösung (PDB-Eintrag 1BRD) [82] abgeleitet worden war [92]. Der damals ermittelte Wert für die *Tethering*-Konstante entsprach allerdings ebenfalls $200 \text{ kcal/mol}\cdot\text{\AA}^2$. Aus der Arbeit von Jendretzki wurde auch die Höhe der Dielektrizitätskonstante $\epsilon=4$ übernommen.

Die Dauer der MD-Simulation betrug 250 ps. Das Ergebnis der Rechnung zeigt, daß das Modell nach einer Äquilibrationsphase von 20 ps über den restlichen Verlauf stabil bleibt, d. h. die gemessene Energie schwankt um einen Mittelwert (siehe Abbildung 3.11). Für die weiteren Modellierungsschritte wurde eine über den Bereich der letzten 100 ps gemittelte Struktur verwendet. Da in dieser Durchschnittsstruktur flexible Seitenketten einzelner Aminosäuren stark verzerrt wiedergegeben werden, wurde ihre Geometrie durch eine erneute Energieminimierung optimiert.

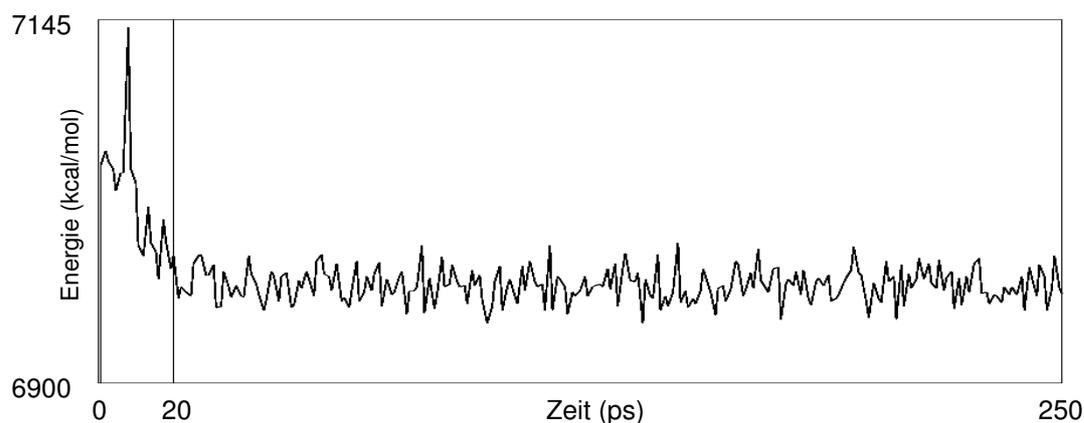


Abbildung 3.11 : Verlauf der Gesamtenergie über die Dauer der MD-Simulation des 7-Helix-Modells. Die senkrechte Linie zeigt das Ende der Äquilibrationsphase an.

3.3.3.1 Modellabsicherung

Der Modellcharakter der Vorlage, die Modifikationen im Bereich des Proteinrückgrats und die hierdurch veränderte Lage einzelner Helices führten zur Überlegung, bereits in dieser Phase des Modellaufbaus eine Überprüfung der Rezeptorstruktur durchzuführen. Hierzu wurde das Programm PROCHECK verwendet, das stereochemische Parameter des Modells mit einem Satz idealer Werte und ihrer Standardabweichung vergleicht [93]. Diese Idealwerte wurden aus hochaufgelösten Molekülstrukturen abgeleitet. Die Abweichungen werden in Form eines G-Faktors bewertet. Im Idealfall sollte dieser einen Wert von $-0,5$ nicht unterschreiten. G-Faktoren bis $-1,0$ kennzeichnen noch akzeptable Abweichungen, Werte darunter gelten als verbesserungsbedürftig. Die Ergebnisse der PROCHECK-Überprüfung sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Hinsichtlich der Bindungswinkel und -längen des Proteinrückgrats, sowie der Planarität der ω -Winkel ergaben sich für das Modell G-Faktoren unter -1 . Diese drei Größen werden direkt über Kraftfeldterme des CV-Kraftfelds berechnet. Die Abweichungen der Bindungslängen und -winkel traten nur in dieser ersten Untersuchung auf und sind daher nicht auf das Kraftfeld direkt zurückzuführen. Wahrscheinlich lassen sie sich durch die entsprechenden Geometrien in der Vorlage erklären, die über das *Tethering* des Proteinrückgrats teilweise erhalten

blieben. Der Einfluß der Abweichungen der Bindungswinkel und -längen auf die Geometrie der Struktur ist allerdings als gering anzusehen, denn die absolute Abweichung von den Idealwerten ist relativ klein. Bei den Bindungslängen beträgt die Abweichung ca. 0,05 Å, bei den Bindungswinkeln ca. 5 Grad. Die hohen G-Faktoren erklären sich durch die geringe Standardabweichung, die diese Idealwerte aufweisen. Die hohen Abweichungen bei den ω -Winkeln sind nach Untersuchungen von Paulin eine generelle Erscheinung bei Rechnungen mit dem CV-Kraftfeld [52] und können daher im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen nicht beeinflußt werden.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der PROCHECK-Ergebnisse für das 7-Helix-Modell

Ramachandran-Plot (Φ/Ψ-Winkel-Verteilung)		Idealwert	Modell
Aminosäuren in erlaubter Region (Kerngebiet)		> 90%	96,5%
Aminosäuren in erlaubter Region (Umgebung)			3,5%
Aminosäuren in erweiterter erlaubter Region			0,0%
Aminosäuren in verbotener Region			0,0%
G-Faktoren			
Torsionswinkel		Bindungslängen und -winkel (Proteinrückgrat)	
Φ -/ Ψ -Winkelverteilung	0,41	Bindungslängen	-1.16
χ_1 -/ χ_2 -Winkelverteilung	-0,27	Bindungswinkel	-1.09
χ_1 -Winkel	0,27		
χ_3 -/ χ_4 -Winkel	0,72		
ω -Winkel	-1,74		

3.3.4 Datenbanksuche nach Loopfragmenten

Zur Modellierung der extrazellulären Loops wurde eine Datenbanksuche in der PDB nach Loopkonformationen durchgeführt, die denen des M₂-Rezeptors entsprechen könnten, d.h. es wurde nach Strukturfragmenten gesucht, die in die verbliebenen Lücken im extrazellulären Bereich des Rezeptormodells eingepaßt werden konnten. Die hierzu verwendete Methode geht ursprünglich auf die Arbeit von Jones und Thirup zurück [94], denen es hiermit gelang, Bereiche eines Proteins aus Fragmenten nicht verwandter Strukturen zu rekonstruieren. Viele der heute zur Modellierung von Loopbereichen eingesetzten Programme orientieren sich an dieser Vorgehensweise. Im INSIGHTII-Softwarepaket ist sie durch die *search-loop*-Routine vertreten, mit der in dieser Arbeit die Auswahl von Fragmenten aus der PDB erfolgte. Neben der Paßgenauigkeit eines Fragments wurden hierbei auch weitere Auswahlkriterien berücksichtigt (vgl. Kapitel 3.3.4.3). Letztendlich konnte die Methode jedoch nur beim ersten extrazellulären Loop erfolgreich angewendet werden .

3.3.4.1 ,*search-loop*'-Routine

Sequenzabschnitte, denen bisher im Modell noch keine Konformation zugewiesen wurde, werden als flexible Bereiche bezeichnet. Der Anwender definiert im Modell zwei Aminosäurebereiche variabler Länge, die direkt an einen flexiblen Bereich angrenzen. Entsprechend ihrer Lage vor oder hinter dem flexiblen Abschnitt unterscheidet man Aminosäuren im Prä- bzw. Postflexbereich. Das Programm wählt aus der Datenbank Fragmente aus, die in der Sequenzlänge dem flexiblen Bereich sowie dem Prä- und Postflexbereich entsprechen. Alle Abstände zwischen den C α -Atomen innerhalb und zwischen den Prä- und Postflexbereichen im Modell werden nun mit den entsprechenden Werten aus dem gewählten Fragment verglichen. Ein Beispiel für ein solches Loopfragment zeigt Abbildung 3.12.

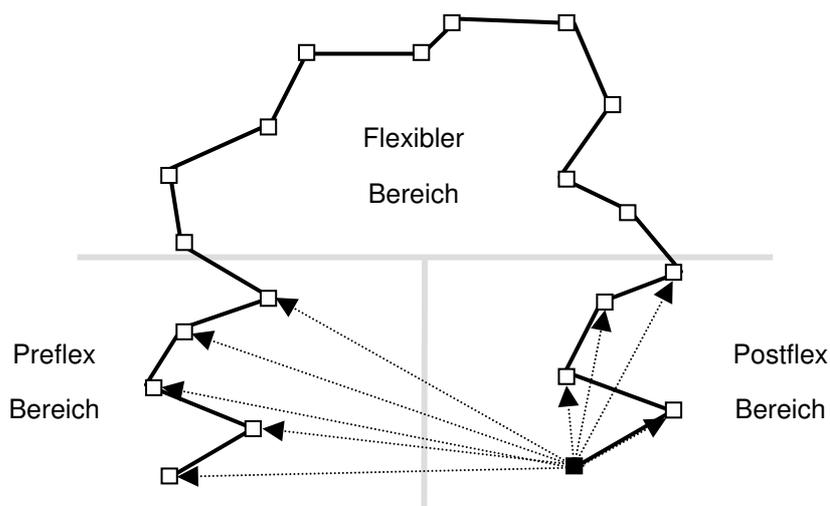


Abbildung 3.12: $C\alpha$ -Trace eines Loopfragments. Prä- und Postflexbereiche werden mit dem Rezeptormodell verglichen. Die Position eines $C\alpha$ -Atoms wird hierbei über die Abstände zu den anderen $C\alpha$ -Atomen dieser Regionen definiert, wie es am Beispiel eines $C\alpha$ -Atoms (■) gezeigt wird.

Eine Bewertung erfolgt über die Berechnung der Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (*root mean square deviation* RMSD) der Abstände nach Gleichung (4.1). Die zehn Loopfragmente mit den kleinsten RMSD werden als Ergebnis ausgegeben.

$$\text{RMSD} = \left(\sum_{i=1}^N \frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 + (z - z_0)^2}{N} \right)^{1/2} \quad (3.1)$$

N	Anzahl der bestimmten Abstände zwischen zwei $C\alpha$ -Atomen
x, y, z	Raumrichtungskordinaten der $C\alpha$ -Atome der Prä-/Postflexregionen
x_0, y_0, z_0	Raumrichtungskordinaten der $C\alpha$ -Atome des Fragments

3.3.4.2 Durchführung

Die extrazellulären Enden der Helices im 7-Helix-Modell waren aufgrund der Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage festgelegt worden. Da hierbei keine eindeutige Aussage über das extrazelluläre Ende der sieben transmembranären Helices möglich war, sollten bei der Datenbanksuche auch Strukturfragmente berücksichtigt werden, deren Einbau in das Modell die Helixenden

verändert (siehe Abbildung 3.13). Die Datenbanksuche selbst erfasst in diesem Zusammenhang nur Strukturfragmente, bei denen das Ende der Helix innerhalb der flexiblen Region liegt (siehe Abbildung 3.13 b - linke Helix). Um auch Strukturfragmente zu erfassen, deren transmembranäre helikale Bereiche im Vergleich zum Modell kürzer sind, wurde die Lage der Prä- oder Postflexbereiche variiert und somit der flexible Bereich vergrößert (siehe Abbildung 4.9 b - rechte Helix).

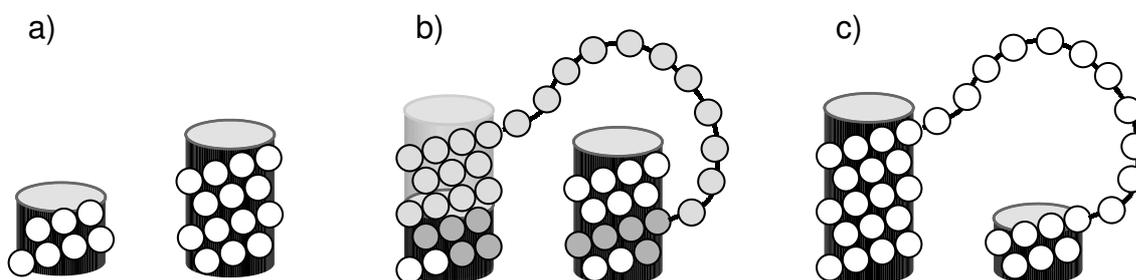


Abbildung 3.13: Beim Einbau eines Loopfragments können sich die Helixenden ändern. Kreise stellen einzelne Aminosäuren, die Säulen im Hintergrund helikale Regionen dar. a) Helixenden des Rezeptormodells. b) Überlagerung eines passenden Loopfragments (hellgrau) mit den Helixenden anhand der Prä- und Postflexregion (dunkelgrau). c) Modell nach Einbau des Loopfragments.

Abbildung 3.14 kennzeichnet die Variationsbreite der Prä- und Postflexbereiche, die für die einzelnen Loops definiert wurden. Bei allen Helices wurden der Prä- bzw. Postflexbereich um maximal drei Aminosäuren verschoben, nur bei Helix2 wurde ein größerer Bereich gewählt, da hier die Sekundärstrukturvorhersage unklar war (vgl. Kapitel 3.2.3.4).

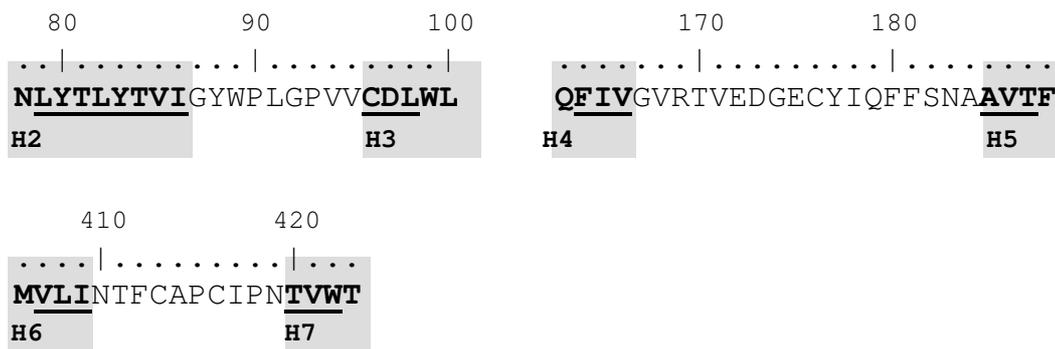


Abbildung 3.14: Variation der Prä- und Postflexbereiche in den drei extrazellulären Loops. Helikale Bereiche sind grau unterlegt. Jede der unterstrichenen Aminosäuren kennzeichnet ein mögliches Ende der Prä- bzw. einen möglichen Beginn der Postflexbereiche eines Suchlaufs.

Jede Kombination der möglichen Prä- und Postflexpositionen der extrazellulären Loopbereiche bildete den Ausgangspunkt für einen Suchlauf. Für den ersten extrazellulären Loop wurden danach 24 Suchläufe, für die anderen beiden extrazellulären Loops jeweils neun Suchläufe durchgeführt. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 3.15 die Prä- und Postflexbereiche der neun Suchläufe für den dritten extrazellulären Loop dargestellt.

- | | |
|---|---|
| 1) PYN <u>MVLI</u> INTFCAPCIPN <u>TVWT</u> IGYW | 6) PYN <u>MVLI</u> INTFCAPCIPN <u>TVWT</u> IGYW |
| 2) PYN <u>MVLI</u> INTFCAPCIPN <u>TVWT</u> IGYW | 7) PYN <u>MV</u> LINTFCAPCIPN <u>TVWT</u> IGYW |
| 3) PYN <u>MVLI</u> INTFCAPCIPN <u>TVWT</u> IGYW | 8) PYN <u>MV</u> LINTFCAPCIPN <u>TVWT</u> IGYW |
| 4) PYN <u>MVLI</u> INTFCAPCIPN <u>TVWT</u> IGYW | 9) PYN <u>MV</u> LINTFCAPCIPN <u>TVWT</u> IGYW |
| 5) PYN <u>MVLI</u> INTFCAPCIPN <u>TVWT</u> IGYW | |

Abbildung 3.15: Prä- und Postflexbereiche aller neun Suchläufe für den dritten extrazellulären Loop

3.3.4.3 Kriterien für die Auswahl geeigneter Strukturfragmente

Die Auswahlkriterien für Strukturfragmente ergeben sich mit Ausnahme des Sequenz- und Sekundärstrukturvergleichs aus den einzelnen Schritten beim Einbau eines Loopfragments mit dem HOMOLOGY-Modul in INSIGHTII, wie sie in Abbildung 3.16 beschrieben werden.

1	Superpositionierung der C α -Atome der Pre- und Postflexbereiche des Strukturfragments und des Modells
2	Entfernen der überzähligen Aminosäuren der Pre- und Postflexbereich aus dem Strukturfragment
3	Bildung der Peptidbindungen zwischen Strukturfragment und Modell verknüpft beide miteinander
4	Austausch der Seitenketten des Strukturfragments gegen die Seitenketten, die an den entsprechenden Positionen im M ₂ -Rezeptor vorliegen.
5	Geometrieoptimierung der Peptidbindung (<i>splice repair</i>), der Seitenketten (Seitenkettenbibliothek) und des gesamten Loops

Abbildung 3.16: Einbau eines Loopfragments mit dem HOMOLOGY-Modul von INSIGHTII.

RMSD nach Superpositionierung des Fragments: Die Auswahl der Strukturfragmente während der Datenbanksuche bietet die Möglichkeit, Ähnlichkeiten unter Berücksichtigung der Größe des Datensatzes in einer vertretbaren Geschwindigkeit zu erfassen. So entfällt durch den Vergleich der C α -Abstände eine zeitaufwendige Superpositionierung der Atomkoordinaten. Nur die zehn ausgewählten Fragmente werden bei der Darstellung der Ergebnisse auf die Prä- und Postflexregionen des Modells superpositioniert und der RMSD-Wert der Überlagerung berechnet. Da der flexible Bereich des Strukturfragments in genau dieser Lage in das Modell integriert wird, gibt der RMSD-Wert nach der Superpositionierung Aufschluß über die Paßgenauigkeit des Fragments. Je größer der RMSD-Wert, desto stärker wird die Geometrie der beiden Peptidbindungen verzerrt, über die Fragment und 7-Helix-Modell verbunden werden. Bei der Auswahl wurden daher Fragmente mit niedrigem RMSD-Wert bevorzugt. Kleine Abweichungen von der idealen Peptidbindungsgeometrie können durch eine Geometrieoptimierung mit der *splice-repair*-Routine aufgehoben werden.

Van-der-Waals-Kontakte: Energetisch ungünstige van-der-Waals-Kontakte mit dem Proteinrückgrat führten zum Ausschluß eines Fragments. Mit dem Einbau eines Fragments in das Modell erfolgte der Austausch der ursprünglichen Seitenketten gegen die Seitenketten des M₂-Rezeptors. Für die weitere

Berücksichtigung des Fragments müssen dabei auftretende ungünstige van-der-Waals-Kontakte durch eine Geometrieoptimierung beseitigt werden können. Polare und dispersive Wechselwirkungen, die die Faltung des Loops stabilisieren könnten, sollten jedoch in der endgültigen Struktur erhalten bleiben.

Sequenzhomologie: Im Bereich der flexiblen Region wurden zudem die Sequenzen des M₂-Rezeptors und der Fragmente verglichen. Dabei wurde die Sequenzhomologie unter Verwendung der Identitäts- bzw. Mutationsmatrix (Dayhoff-Matrix [95]) der *compare*-Routine in INSIGHTII bestimmt. Die ermittelten Homologien waren jedoch mit Werten von unter 20% sehr niedrig, so daß sie als Auswahlkriterium nicht verwendet werden konnten.

Sekundärstrukturvorhersage: Die Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersagen (vgl. Kapitel 3.2.4) wurden mit den Sekundärstrukturen der Fragmente verglichen. Dabei wurde die Analyse der Sekundärstruktur für die Strukturfragmente mit Hilfe des Programms Stride durchgeführt [96].

Disulfidbrücke: Für den zweiten extrazellulären Loop wurde weiterhin die Disulfidbrücke zwischen der dritten Helix des Modells und dem zweiten extrazellulären Loop berücksichtigt. Dafür wurde nach der Superpositionierung von Fragment und 7-Helix-Modell der C_α-Abstand zwischen Cys96 im Modell und der dem Cys176 entsprechenden Aminosäure im Loopfragment gemessen.

3.3.4.4 Ergebnisse der Datenbanksuche

Erster extrazellulärer Loop

Insgesamt wurden 53 Fragmente mit RMSD-Werten zwischen 0,6 und 3,6 Å² über die Datenbanksuche ausgewählt. Ein Fragment der bovinen Cytochrom-C-Oxidase² (1OCC) konnte aufgrund der guten Übereinstimmung in das Modell eingebaut werden (siehe Abbildung 3.17). Bei dem Fragment handelte es sich ebenfalls um eine Loopregion zwischen zwei transmembranären Helices. Bei der Superpositionierung ergab sich ein RMSD-Wert von 0,9 Å². Beim Einbau in das Rezeptormodell ergaben sich leichte Verzerrungen in der Peptidbindungsgeometrie, die mit der *splice-repair*-Routine behoben wurden. Nach dem Austausch der Seitenketten konnten energetisch ungünstige van-der-Waals-Kontakte bei der Geometrieoptimierung beseitigt werden. Die Struktur des Loopfragments blieb dabei weitgehend erhalten. Besonders auffallend war die gute Übereinstimmung zwischen Phe227 des Fragments und dem Tyr88, das im M₂-Rezeptor diesen Platz einnimmt. Der aromatische Ring des Phenylalanins liegt in der Cytochrom-C-Oxidase eingebettet zwischen den Aminosäuren der beiden Helices. In ähnlicher Weise steht der Tyrosinring in dieser Position in Kontakt mit lipophilen Anteilen der Aminosäuren Leu82, Tyr83, Pro93, Val95, Cys96. Im weiteren Verlauf des Loops folgt zwischen den Aminosäuren 89-92 ein β-Turn, dessen Lage mit einem der zwei für diesen Loop vorhergesagten β-Turns übereinstimmt. Das Pro90 liegt an Position i+1 des β-Turns in einer für diesen Aminosäuretyp bevorzugten Lage. In dieser Hinsicht erschien auch die Lage von Pro93 direkt vor Beginn der dritten transmembranären Helix günstig. Untersuchungen an Röntgenkristallstrukturen von Richardson et al. zeigen ein gehäuftes Auftreten von Prolinen an dieser Position [97].

² Es handelt sich um das gleiche Protein, auf das bereits bei der Strukturvorhersage in Kapitel 3.2.3.3 zurückgegriffen wurde. Allerdings stammt das Fragment aus der P-Kette, die bei der Strukturvorhersage nicht berücksichtigt wurde.

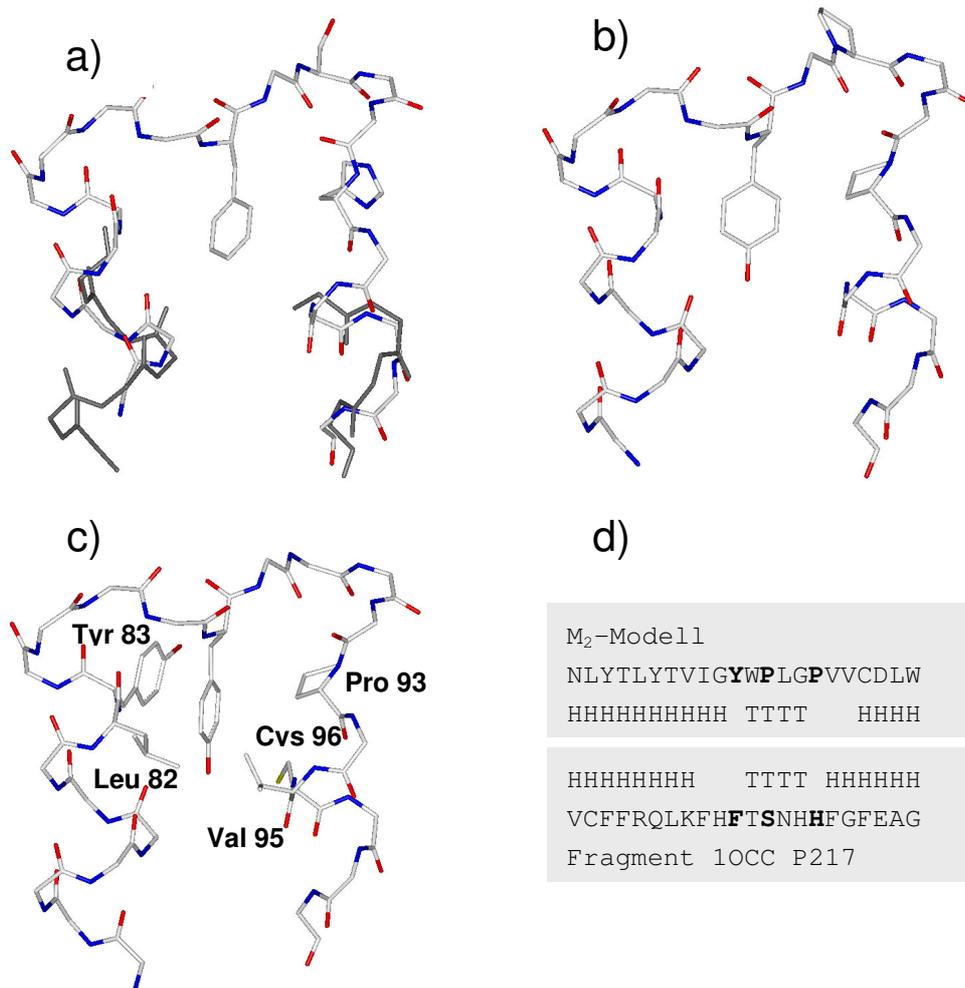


Abbildung 3.17: Aufbau der Konformation des ersten extrazellulären Loops aufgrund eines Fragments der Cytochrom-C-Oxidase. a) Superpositionierung des Fragments auf die Helix, b) Austausch der Seitenketten, c) Nach der Geometrieoptimierung, d) Sequenz- und Sekundärstrukturvergleich des 7-Helix-Modells mit dem Loopfragment (1OCC: PDB-Eintrag; P217: Beginn des Loopfragments bei Val217 in der P-Kette).

Zweiter extrazellulärer Loop

Keines der 43 selektierten Fragmente erlaubte die Bildung der Disulfidbrücke. So lag der kleinste gemessene Abstand zwischen den C α -Atomen der beiden Cysteine bei etwa 11 Å und damit weit über dem Abstand von 5-6 Å, der normalerweise bei einer Disulfidbrücke in Röntgenkristallstrukturen gefunden wird [97].

Dritter extrazellulärer Loop

Auch für diesen Bereich konnte mit Hilfe der Datenbanksuche kein passender Loop gefunden werden. Nur ein Fragment (PDB-Eintrag: 2HMQ) [98] kam wegen seiner sehr geringen Abweichung im Prä- und Postflexbereich für den Einbau in Frage. Doch wurde es nach der Übernahme der Seitenketten verworfen. Wie Abbildung 3.18 zeigt, ersetzen Pro90 und Pro93 Aminosäuren, deren NH-Wasserstoffatome in der Peptidbindung an Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Diese gingen beim Austausch in der Konformation des M_2 -Rezeptors nicht nur verloren, sondern die beiden Proline erzeugten auch energetisch ungünstige van-der-Waals Kontakte mit dem Rest des Fragments, die bei der anschließenden Energieminimierung zu einer starken Verzerrung der ursprünglichen Loopgeometrie führten.

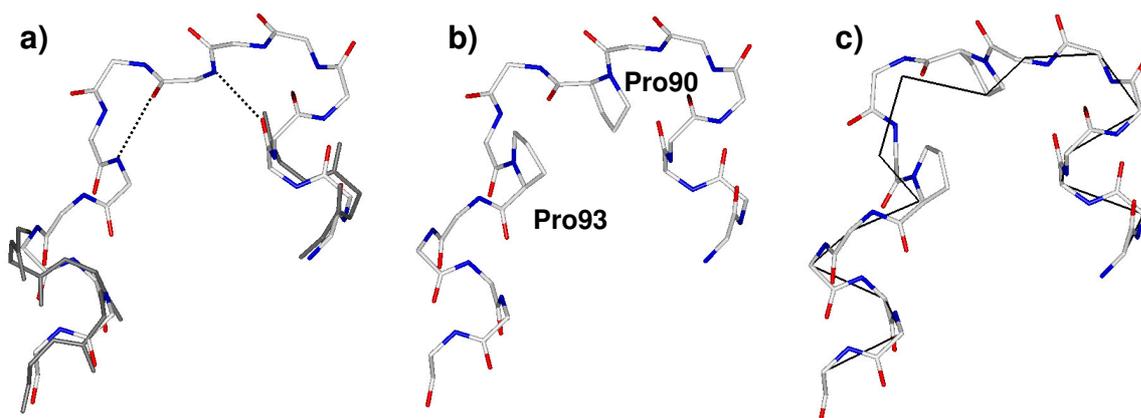


Abbildung 3.18: Der Einbau des 2HMQ-Fragments in den Rezeptor im Bereich des dritten extrazellulären Loops führte zum Verlust zweier Wasserstoffbrücken (a+b). c) zeigt die veränderte Geometrie des Loops nach der Optimierung (Die Ausgangsstruktur ist als schwarzer C α -Trace dargestellt).

3.4 Aufbau des zweiten und dritten extrazellulären Loops

3.4.1 Einführung in das *Simulated-Annealing*-Verfahren

Für die extrazellulären Loops 2 und 3 ergab die Datenbanksuche keine sinnvollen Konformationen. Deshalb wurde zur Generierung von Loops MD-Simulationen mit einem *Simulated-annealing*-Protokoll durchgeführt. Dieses Verfahren wurde von Colson et al. und Moro et al. erfolgreich bei der Modellierung von Loopkonformationen für GPCRs eingesetzt [98][99].

Bei der Generierung einer Konformation mit dem *Simulated-annealing*-Protokoll können zwei Phasen unterschieden werden. In der ersten Phase erfolgt die Simulation der Molekülbewegungen bei hohen Temperaturen gefolgt von einer Abkühlphase. Werden mit dieser Methode mehrere Konformationen generiert, so hängt ihr Divergenzgrad von der Temperatur und der Simulationsdauer der vorhergehenden Hochtemperaturphase ab. Die hohe kinetische Energie der Atome in der ersten Phase erlaubt die Überwindung hoher Energiebarrieren und ermöglicht eine schnelle ‚Bewegung‘ des Moleküls durch seinen Konformationsraum. Je länger die Simulationsdauer, desto weiter kann sich die Konformation von der Ausgangsstruktur entfernen. In der anschließenden Abkühlphase nimmt die Beweglichkeit des Moleküls ab. Gleichzeitig werden nun stabile Konformationen gegenüber energetisch ungünstigen Zuständen häufiger auftreten. Je langsamer abgekühlt wird, desto wahrscheinlicher wird sich das Molekül einer energiearmen Konformation nähern. Durch eine anschließende Geometrieoptimierung erhält man die Konformation des nächstgelegenen Energieminimums.

3.4.2 Ausgangsstruktur für die MD-Simulation

Zur Durchführung der MD-Simulation mußte der extrazelluläre Bereich des Rezeptors zuerst vervollständigt werden, d.h. die beiden fehlenden Loops mußten ergänzt werden. Die Konformation der Loops spielte hierbei keine Rolle, da diese Rezeptorstruktur nur als Ausgangspunkt für die Generierung der

eigentlichen Loopkonformationen dienen sollte. Allerdings mußte beim Aufbau des zweiten extrazellulären Loop die Disulfidbrücke zur Helix 3 berücksichtigt werden. Für diesen Loop war auch eine β -Turnstruktur vorhergesagt worden, wobei zwei mögliche Positionen im Loop in Betracht kamen (vgl. Kapitel 3.2.4.2). Eine Datenbanksuche in der PDB sollte daher Klärung bringen, ob und in welcher Position der Einbau eines β -Turns sinnvoll wäre.

3.4.2.1 Untersuchung der Turnstruktur im Loop 2

Wie in Kapitel 3.2.4.2 gezeigt wurde, kommen zwei mögliche β -Turns im zweiten extrazellulären Loop in Betracht, beginnend mit Val171 bzw. Glu172. Die Sequenzabfolge Glutamat, Aspartat, Glycin ist beiden Turns gemeinsam. Aus der PDB wurden daher alle Fragmente mit dieser Sequenz extrahiert und untersucht, ob sie in einer β -Turnstruktur vorliegen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt. Von den 27 gefundenen Fragmenten entsprechen 23 der Definition für β -Turns (Kapitel 3.2.4). Bei weiteren zwei Strukturen führte eine geringfügige Überschreitung des geforderten maximalen $C\alpha_i$ - $C\alpha_{i+3}$ -Abstands von 7 Å zum Ausschluß (2POR und 1IOW). Bei visueller Überprüfung waren allerdings beide Strukturen den anderen gefundenen β -Turns sehr ähnlich, so daß sie mit in die Auswertung einbezogen wurden. Danach zeigten 21 Strukturen einen β -Turn mit den drei gesuchten Aminosäuren in Position (i+1) bis (i+3), wobei der Turntyp I mit 15 Strukturen am häufigsten vertreten war. Die zweite Variante, in der das Aspartat an der ersten Position liegt, fand sich nur in 7 Segmenten. Dreimal lagen beide β -Turns nebeneinander vor und zwar jedesmal als Kombination eines β -Turns Typ IV mit einem β -Turn Typ I'. Die in den Datenbanksuche gefundene Präferenzen für den Sequenzabschnitt EDG, lassen für den zweiten extrazellulären Loop einen Turn erwarten, der mit Val171 eingeleitet wird. Dies wurde entsprechend bei der Loop-Generierung berücksichtigt.

Tabelle 3.3: Strukturen, die die Sequenz EDG enthalten und einen β -Turn bilden. **Eintrag:** Kurzbezeichnung unter der das Protein in der PDB geführt wird. **Start:** Nummer der ersten Aminosäure der angegebenen Sequenz im PDB-Eintrag. Die für die Definition der Turnstruktur und des Turntyps wichtigen Angaben sind in den weiteren Spalten enthalten. (vgl. Kapitel 3.2.4.1). **Hb +:** zwischen den Aminosäuren i und $i+4$ ist eine Wasserstoffbrücke vorhanden.

Eintrag	Start	Sequenz	Typ	Position (i+1)		Position (i+2)		Cadist	Hb
				Phi	Psi	Phi	Psi		
1AYL	316	REDG	I	-52,5	-31,8	-83,9	16,1	5,5	+
1CHD	215	KEDG	I	-56,4	134,7	76,8	-9,7	5,9	+
1CLC	82	REDG	I	-62,7	-21,2	-79,4	-2,4	5,5	+
1CNV	14	REDG	I	-69,2	-8,6	-76,9	-18,0	6,1	+
1EMA	131	KEDG	I	-53,9	-25,7	-115,5	-17,2	4,9	+
1EMA	171	IEDG	I	-52,4	-21,2	-89,8	5,1	5,6	+
4FGF	77	KEDG	I	-45,1	-31,6	-99,4	9,8	5,3	+
1FKJ	30	LEDG	I	-65,5	-19,7	-91,5	7,5	5,4	+
1GES	246	LEDG	I	-59,0	-46,2	-68,8	-5,3	5,3	+
1LTS	158	AEDG	I	-56,6	-35,0	-84,7	-16,3	5,1	+
1NCX	66	DEDG	I	-70,7	-23,4	-84,1	-0,5	5,4	+
2POR	56	GEDG	I	-74,3	-34,4	-129,0	159,6	<u>7,1</u>	
9RNT	27	HEDG	I	-63,8	-36,4	-79,3	-4,4	5,2	+
5RXN	15	PEDG	I	-67,0	-30,7	-94,7	-30,5	4,9	
1XEL	224	TEDG	I	-52,4	-39,3	-114,0	-1,2	4,8	
1HRN	206	CEDG	II	-64,2	132,0	94,7	-9,3	5,3	+
1IOW	67	IEDG	IV	-111,8	-95,9	97,7	-17,1	<u>7,2</u>	
1VHH	130	DEDG	IV	-92,6	-18,0	-112,3	34,4	6,5	
8DFR	171	EEDG	IV	-157,9	137,1	51,3	40,4	6,3	
	172	EDGI	I'	51,3	40,4	74,2	1,3	5,4	+
1DYR	191	NEDG	IV	-151,2	125,0	53,1	34,3	6,1	
	192	EDGF	I'	53,1	34,4	83,3	-1,4	5,5	+
1KAZ	212	IEDG	IV	-156,2	129,6	58,8	37,7	6,4	
	213	EDGI	I'	58,8	37,7	72,0	3,1	5,4	+
1CHD	215	EDGE	II	-56,4	134,7	76,8	-9,7	5,9	+
1GLQ	56	EDGD	IV	-125,8	98,5	56,0	-117,0	6,9	
1UBI	51	EDGR	I	-45,2	-45,7	-75,4	-17,0	5,7	+
1WAP	16	EDGV	IV	-71,3	156,7	67,5	31,3	6,8	

3.4.2.2 Vervollständigung des Rezeptormodells

Die Startstrukturen für den zweiten und dritten extrazellulären Loop wurden mit der Methode zur Loop-Generierung im HOMOLOGY-Modul erzeugt. Ähnlich der Datenbanksuche nach Loopfragmenten werden hierbei Prä- und Postflexbereiche definiert. Diese werden in diesem Fall vom Programm selbst festgelegt und umfassen die Rückgratome der zwei Aminosäuren, die an den zu ergänzenden Bereich angrenzen. Die Abstände zwischen diesen Atomen dienen

als Distanzbeschränkungen für die Loopauswahl. Bei der Loop-Generierung werden die ϕ - und ψ -Winkel seiner Aminosäuren variiert, um sich diesen Distanzbeschränkungen anzupassen. Die Loopfragmente, die die Distanzbeschränkung am besten erfüllten, wurden in das Modell integriert. Da van-der-Waals-Kontakte bei der Loop-Generierung nur eingeschränkt berücksichtigt werden, sind die Loopfragmente meist stark verzerrt. Deshalb wurde die Geometrie der Struktur anschließend mit dem Programm DISCOVER optimiert. Für die Energieberechnung wurden das CV-Kraftfeld verwendet. Gleichzeitig wurden auch die Disulfidbrücke und der β -Turn in den zweiten extrazellulären Loop eingefügt. Für den Aufbau der Disulfidbrücke wurde ein zusätzlicher distanzabhängiger Energieterm bei der Berechnung eingeführt, der zu einer Annäherung der beiden Cysteine führte. Die Struktur wurde energieminiert, gefolgt von einer 100 ps dauernden MD-Simulation bei 310 K. Über den Verlauf der letzten 50 ps wurde der Abstand zwischen den Schwefelatomen der beiden Seitenketten gemessen. Die Konformation mit dem kleinsten Abstand wurde ausgewählt, und die Bindung zwischen den Schwefelatomen hergestellt. Die resultierende Bindungslänge von 2,62 Å wurde mittels einer zweiten Energieminimierung auf den Idealwert von 2 Å verringert.

Zum Aufbau des β -Turns wurde ebenfalls über einen distanzabhängigen Kraftfeldterm der Abstand der C_{α} -Atome der Aminosäuren Val122 und Asp125 innerhalb eines Bereichs von 5 Å gehalten (Kraftkonstante = 100 kcal/mol·Å). Dieser Wert entspricht dem Abstand, der bei einer idealen Geometrie des β -Turns gefunden wird.

3.4.3 Simulation mit Lösungsmittel

Die bisherigen Berechnungen wurden ohne Berücksichtigung von Lösungsmittel-Molekülen durchgeführt. Für die folgende MD-Simulation, mit der Konformationen für die extrazellulären Loops 2 und 3 modelliert wurden, sollte jedoch im extrazellulären Bereich die wässrige Umgebung mitberücksichtigt werden. Ansonsten könnten fehlende polare und dispersive Wechselwirkungen zwischen Protein und Umgebung die Bildung artifizieller Strukturen begünstigen. Dies konnte an MD-Simulationen mit Kristallstrukturen gezeigt

werden. Auch bei Verwendung hoher Dielektrizitätskonstanten ($\epsilon=80$) konnten bei MD-Simulationen im Vakuum die Auflösung von Sekundärstrukturelementen und die Verkleinerung der Bindungstasche beobachtet werden. Wurde in den MD-Simulationen zusätzlich eine Hydrathülle in Form von expliziten Wassermolekülen simuliert, konnten diese beiden Effekte erheblich vermindert werden [100].

3.4.3.1 Nutzung von GROMACS

Bisher wurden alle Rechnungen mit dem Programm DISCOVER unter Verwendung des CV-Kraftfelds durchgeführt. Der hohe rechentechnische Aufwand, den die Simulation der Hydrathülle mittels expliziter Wassermoleküle erfordert, verlangsamte die Simulationen mit diesem Programm in solchem Maße, daß eine vernünftige Simulationsdauer den Zeitrahmen für diese Arbeit gesprengt hätte. Daher wurden die Berechnungen mit der Hydrathülle mit dem Programm GROMACS durchgeführt [102],[103]. Das Programm verwendet ein eigenes Protein-Kraftfeld, das auf dem GROMOS-Kraftfeld basiert. Dieses Kraftfeld ermöglicht unter Verwendung sogenannter „*united atom*“-Modelle Vereinfachungen, die die Rechenzeit deutlich verkürzen:

- **SPC-Wassermodell**

Beim SPC-Wassermodell (SPC = *simple point charge*) werden für Wasserstoff- und Sauerstoffatome Coulomb-Wechselwirkungen getrennt berechnet. Für die Berechnung der Lennard-Jones-Wechselwirkung wird das Wassermolekül als einzelnes, sphärisches Teilchen mit dem Sauerstoff als Mittelpunkt betrachtet. Bindungswinkel und Längen werden ebenfalls nicht berechnet, sondern über den SETTLE-Algorithmus [104] starr gehalten.

- **„united atom“-Proteinmodell**

Ähnlich wie beim SPC-Wassermodell, werden gesättigte Kohlenstoffatome mit ihren kovalentgebundenen Wasserstoffatomen als eine Einheit betrachtet, womit die Berechnung der Bindungsgeometrien zwischen diesen Atomen entfällt. Wechselwirkungsenergien werden ebenfalls für die gesamte Gruppe in bezug auf die Position des Kohlenstoffatoms berechnet.

3.4.3.2 Verwendung periodischer Randbedingungen

Die Simulation der Hydrathülle erfolgte mittels einer Wasserbox, d.h. eines mit dem Protein und Wassermolekülen gefüllten Quaders, unter Verwendung periodischer Randbedingungen. Bei diesem Verfahren werden die gegenüberliegenden Seiten über einen Algorithmus virtuell miteinander verbunden. Hierzu wird ein vergrößertes Molekülensemble aufgebaut, daß aus 27 identischen Wasserboxen besteht. Die zentrale Wasserbox ist dabei an jeder Seite, Kante und Ecke von einer ihrer Kopien umgeben. In diesem System erfolgen die Berechnung der Energien und der neuen Koordinaten der Atome. Aus der zentralen Wasserbox wird anschließend wieder ein vergrößertes System aufgebaut, mit dem der nächste Schritt der MD-Simulation berechnet wird. Das hierdurch geschaffene geschlossene Modell erlaubt es, die freie Bewegung der Moleküle kontinuierlich zu simulieren.

3.4.3.3 Verwendung eines Rezeptorfragments

Die Verwendung periodischer Randbedingungen ist nur möglich, wenn hierbei das Protein vollständig von der Wasserbox umschlossen wird. Die Verwendung eines solchen Modells würde für den M_2 -Rezeptor zu einer vollkommen unphysiologischen Umgebung der transmembranären Regionen führen. Eine hieraus resultierende Umstrukturierung dieser Region ließ sich jedoch ausschließen, da die helikalen Bereiche schon aufgrund der hohen Simulationstemperatur während der Dynamik über eine starke Rückstellkraft stabilisiert werden mußten. Trotzdem würde ein Großteil der berechneten Wechselwirkungen kein sinnvolles Ergebnis darstellen, gleichzeitig aber die benötigte Rechenzeit beträchtlich erhöhen. Die Simulation wurde deshalb nur mit einem Fragment durchgeführt, welches die extrazellulären Loops und angrenzende transmembranäre Bereiche umfaßt. Die Einbeziehung eines Teils des transmembranären Bereichs erschien sinnvoll, da somit mögliche Wechselwirkungen mit der Loopregion berücksichtigt werden konnten. Auch sollte hierdurch sichergestellt werden, daß das Modell den Bereich der allosterischen Bindungsstelle vollständig beinhaltet. Unter der Annahme, daß dieser Bereich des Rezeptors

extrazellulär zur Bindungsstelle des orthosterischen Liganden liegt, diente die Aminosäure Asp103, die einen Bindungspartner für das Acetylcholin darstellt, als Begrenzung. Das Fragment umfaßte also Aminosäuren, die mit dem Aspartat in einer Ebene in der Membran bzw. extrazellulär zu dieser Ebene liegen. Die Membranebene ließ sich dabei anhand der Projektionskarten des Rhodopsins abschätzen. Das neue Modell umfaßte somit in vier zusammenhängenden Bereichen die Aminosäuren Phe21-Gly31, Phe75-Asp103, Trp155-Ile192, Trp400-Trp427.

Das Rezeptorfragment wurde in eine kubische Wasserbox mit einer Seitenlänge von 53 Å zentriert, so daß der minimale Abstand des Fragments zu den Wänden 10 Å betrug. Wasseratome, die mit dem Volumen des Fragments überlappten wurden entfernt (siehe Abbildung 3.19).

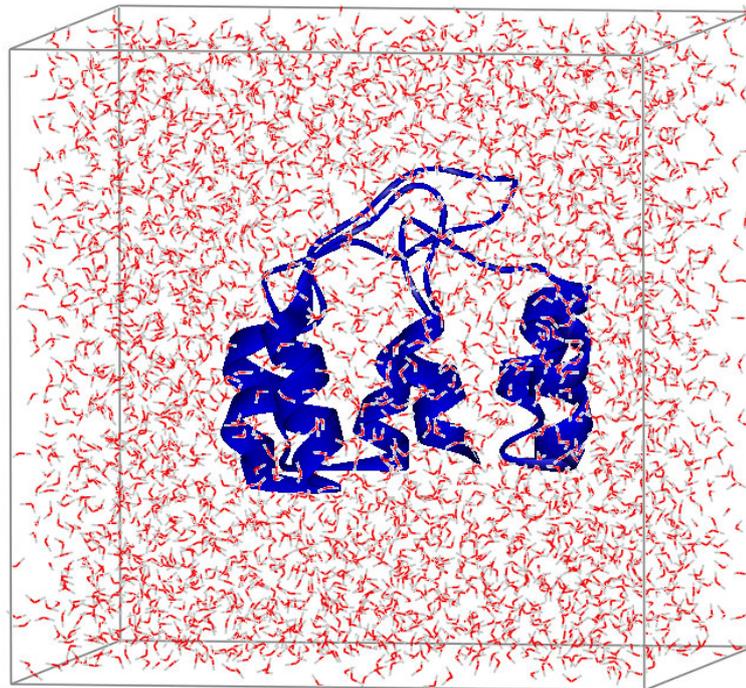


Abbildung 3.19: Rezeptorfragment in Wasserbox

3.4.4 Simulated-Annealing-Protokoll

3.4.4.1 Stabilisierung strukturierter Bereiche

Da die MD-Simulation in GROMACS bei hohen Temperaturen durchgeführt werden sollte, bestand die Gefahr, daß festgelegte Sekundärstrukturelemente verändert werden. Diese Elemente wurden deshalb durch zusätzliche Kraftfeldterme stabilisiert. Die Rückgratátome der Helices wurden durch eine Kraftkonstante von 10000 kJ/mol·Å in ihrer Ausgangsposition festgehalten. Der neu eingefügte β -Turn im zweiten extrazellulären Loop wurde ebenfalls durch einen distanzabhängige Kraftfeldterm stabilisiert, der gemäß der β -Turn-Definition einen maximalen Abstand von 7 Å zwischen den $C\alpha$ -Atomen von Val171 und Gly174 erlaubte. Größere Entfernungen wurden durch die hohe Kraftkonstante von 5000 kJ/mol·Å unterbunden, die bei Übertretung des Limits wirksam wurde.

Eine hohe Temperatur kann zudem auch die Umwandlung einer Peptidbindung von der trans- in die cis-Form ermöglichen. Diese cis-Konfiguration ist zwar prinzipiell möglich, im Vergleich zur trans-Form jedoch energetisch ungünstiger, so daß sie in Kristallstrukturen fast nie auftritt. Ausnahme sind Peptidbindungen, an denen das Stickstoffatom eines Prolins beteiligt ist, da hier der Unterschied zwischen den beiden isomeren Formen geringer ist als bei den übrigen Aminosäuren. Bei der Moleküldynamik wurde deshalb die Bildung einer cis-Bindung für alle Aminosäuren außer Prolin unterbunden. Hierzu war eine Neudefinition der Kraftfeldterme nötig, die die entsprechende Energie des ω -Torsionswinkel beschreiben. Diese werden normalerweise im GROMACS-Kraftfeld durch eine Sinusfunktion wiedergegeben. Für die Dynamik wurden diese Terme durch eine quadratische Gleichung ersetzt, wobei mit einer Kraftkonstante von 1000 kJ/mol der trans-Winkel erhalten blieb.

3.4.4.2 Initialisierung

Anschließend wurde das Modell minimiert und eine MD-Simulation bei 310 K und einem Druck von 1 bar über 100 ps durchgeführt um das System zu relaxieren. Der gewählte *cutoff*-Bereich für die Berechnung der Wechselwirkungsenergien betrug hier wie auch in den folgenden Simulationen 10 Å für van-der-Waals-Energien und 15 Å für elektrostatische Wechselwirkungen. Die Box verkleinerte sich bei der MD-Simulation nur leicht auf ca. 52 Å Seitenlänge.

3.4.4.3 Temperaturverlauf der MD-Simulation

Die Dynamik wurde über 500 ps bei 1200 K und konstantem Volumen durchgeführt. Versuche höhere Temperaturen (1300 K) zu verwenden, führten zum vorzeitigen Abbruch der MD-Simulation. Alle 25 ps wurde eine Struktur gespeichert. Die hieraus resultierenden 20 Strukturen wurden über 200 ps schrittweise auf 310 K abgekühlt. Zuletzt erfolgte eine Energieminimierung mit *steepest descent*. Bei diesem Schritt wurde keine der in Kapitel 3.4.4.1 beschriebenen Stabilisierungsmaßnahmen verwendet.

3.4.5 Kontrolle der Proteingeometrie mit PROCHECK

Nach der Ergänzung der extrazellulären Loopbereiche wurde wiederum die Proteingeometrie mit PROCHECK bewertet. Zum einen sollte hierbei untersucht werden, ob die Probleme, die im 7-Helix-Modell aufgetreten waren, beseitigt werden konnten, zum anderen sollten verzerrte Proteingeometrien lokalisiert werden, die die Struktur der Bindungsstelle beeinflussen könnten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 dargestellt

Tabelle 3.4: G-Faktoren der PROCHECK-Untersuchung

Struktur G-Faktor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Φ -/ Ψ - Winkelverteilung	-0,62	-0,72	-0,66	-0,62	-0,73	-0,44	-0,63	-0,65	-0,62	-0,63
χ_1 -/ χ_2 - Winkelverteilung	-0,99	-0,93	-0,91	-0,98	-1,11	-0,72	-0,84	-1,14	-0,86	-0,84
χ_1 -Winkel	-0,08	0,00	0,04	-0,04	0,05	0,14	0,18	-0,06	-0,13	-0,12
χ_3 -/ χ_4 -Winkel	0,68	0,77	0,72	0,4	0,57	0,2	0,49	0,48	0,53	0,44
ω -Winkel	-0,26	-0,4	-0,36	-0,28	-0,47	-0,41	-0,43	-0,39	-0,45	-0,53
Bindungslängen Proteinrückgrat	0,34	0,33	0,31	0,32	0,32	0,32	0,33	0,31	0,32	0,30
Bindungswinkel Proteinrückgrat	-0,18	-0,11	-0,11	-0,23	-0,20	-0,10	-0,20	-0,11	-0,13	-0,1
Struktur G-Faktor	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Φ -/ Ψ - Winkelverteilung	-0,57	-0,56	-0,61	-0,61	-0,58	-0,6	-0,46	-0,63	-0,64	-0,6
χ_1 -/ χ_2 - Winkelverteilung	-1,07	-0,86	-1,26	-0,82	-0,84	-0,9	-0,81	-1,12	-1,02	-1,09
χ_1 -Winkel	-0,12	-0,25	-0,28	-0,06	-0,03	0,06	-0,33	-0,11	-0,06	-0,17
χ_3 -/ χ_4 -Winkel	0,4	0,44	0,33	0,4	0,73	0,32	0,32	0,64	0,28	0,35
ω -Winkel	-0,36	-0,42	-0,32	-0,27	-0,47	-0,37	-0,42	-0,56	-0,43	-0,49
Bindungslängen Proteinrückgrat	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,33
Bindungswinkel Proteinrückgrat	-0,11	-0,16	-0,13	-0,14	-0,09	-0,2	-0,05	-0,09	-0,11	-0,12

3.4.5.1 ϕ - ϕ -Winkelverteilung

Der Ramachandran-Plot in Abbildung 3.20 zeigt die ϕ - ϕ -Winkelverteilung aller generierten Konformationen. 80,6% der Aminosäuren liegen in den bevorzugten Kernregionen (A, B, L) und insgesamt 96,8% im erlaubten Bereich (A, B, L und

a, b, l, p). Nur 2,2% der Aminosäuren liegen im Grenzbereich um die erlaubte Region ($\sim a$, $\sim b$, $\sim l$, $\sim p$). 1% der Aminosäuren schließlich zeigt eine ungewöhnliche Verteilung der φ - und ϕ -Winkel (weißer Bereich). Auch Colson et al. haben die Verteilung der Aminosäuren ihrer generierten Strukturen in den unterschiedlichen Regionen des Ramachandran-Plot untersucht. Der Anteil der Aminosäuren im erlaubten Bereich betrug nur 86% und damit knapp 10% unter dem in unserem Modell erreichten Wert [98]. Eine Erklärung für diese Verbesserung stellt möglicherweise die Verwendung der Wasserbox dar. Die ungünstige Energie ‚unerlaubter‘ φ - ϕ -Winkelverteilungen wird meistens durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen zwei benachbarten Aminosäuren kompensiert [101]. Berechnungen im Vakuum erhöhten eventuell den artifiziellen Anteil solcher Konformationen, da hier intramolekulare Wechselwirkungen überbewertet werden.

Für die einzelnen Strukturen gibt Tabelle 3.4 die G-Faktoren der φ - ϕ -Winkelverteilung wieder. Keine Struktur unterschreitet den Grenzwert von -1,0. Allerdings besitzen sechs Strukturen eine, fünf Strukturen zwei Aminosäuren und die Struktur 2 sogar vier Aminosäuren im unerlaubten Bereich. Die weitaus größten Verzerrungen in der Proteinstruktur gehen von Aminosäuren aus, die in unerlaubten Regionen des Ramachandran-Plots liegen. Artifizielle φ - oder ϕ -Winkel einer Aminosäure beeinflussen die Lage ihrer Seitenkette. Weiterhin können Auswirkungen auf die Struktur der angrenzenden Aminosäuren nicht ausgeschlossen werden. Sie sollten daher nicht im Bereich einer potentiellen Bindungsstelle liegen.

3.4.5.2 Bindungslängen und -winkel

Die Geometrie der Bindungslängen und -winkel konnte im Vergleich zum 7-Helix-Modell deutlich verbessert werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das *Tethering* diesmal nur über die $C\alpha$ -Atome erfolgte. So konnte sich die Geometrie im Proteinrückgrat an die Kraftfeldparameter anpassen.

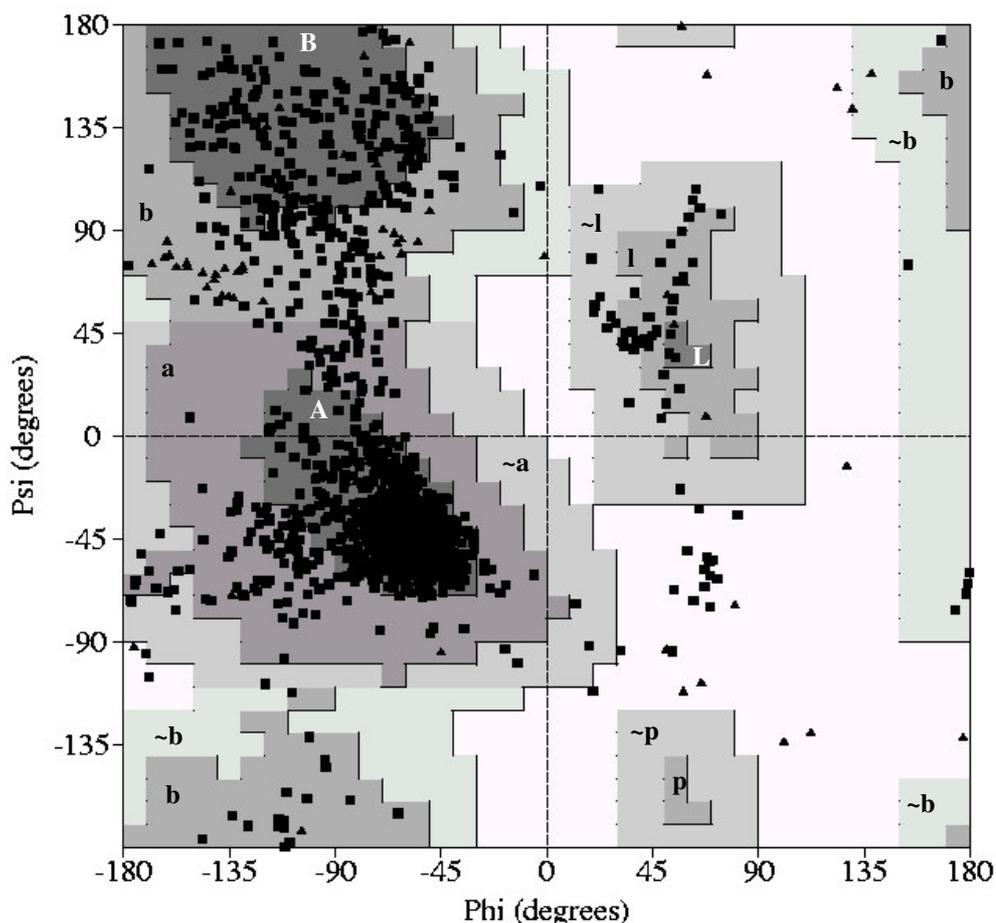


Abbildung 3.20: Ramachandran-Plot mit einer Übersicht über die ϕ - ψ -Winkelverteilung in allen 20 Strukturen. (Dreieckige Markierung symbolisieren Glycine)

3.4.5.3 ω -Winkel

Auch der G-Faktor für die ω -Winkel konnte im Vergleich zum 7-Helix-Modell verbessert werden. Während in den Hochtemperatur-Dynamiken zusätzliche starke Rückstellkräfte die Peptidbindung planar hielten, wurde bei der folgenden Geometrieoptimierung hierauf verzichtet. Dies führte zu der scheinbar verkehrten Entwicklung, in der die G-Faktoren der ω -Winkel in den nichtoptimierten Strukturen höher liegen, als nach der Energieminimierung. Es zeigte sich allerdings, daß die Verschlechterung des G-Faktors in diesem Fall nicht mit einer nennenswerten Änderung der Struktur einherging, wie die RMSD-Abweichungen in Tabelle 3.5 zeigen. Ein Einfluß auf die Geometrie der Bindungsstelle ist damit auszuschließen. Alle Proline behielten ihre trans-Konfiguration.

Tabelle 3.5: Zusammenhang zwischen der Änderung des G-Faktors für den ω -Winkel und dem RMSD des Proteinrückgrats der Strukturen vor und nach der Geometrieoptimierung. Es wurden die drei Strukturen ausgewählt, bei denen die Differenz der G-Faktoren vor und nach der Optimierung am höchsten war.

Struktur	G-Faktor vor Optimierung	G-Faktor nach Optimierung	RMSD (Å)
Struktur 2	0,06	-0,40	0,17
Struktur 10	-0,15	-0,49	0,19
Struktur 20	0,09	-0,47	0,17

3.4.5.4 Seitenkettengeometrie

Bei allen Strukturen fiel der niedrige G-Faktor bezüglich der χ_1 - χ_2 -Winkelverteilung auf, der im günstigsten Fall bei -0,72, im schlechtesten Fall bei -1,12 lag. Mit PROCHECK war es möglich, einzelne Aminosäuren mit stark verzerrter Seitenkettengeometrie im Protein zu lokalisieren. Für die einzelnen Strukturen konnten jeweils 4-6 Aminosäuren gefunden werden, deren Seitenkette starke Verzerrungen aufwies und somit entscheidenden Einfluß auf den G-Faktor hatten. In Struktur 4, die später zum Aufbau der Ligand-Rezeptor-Komplexe herangezogen wurde (vgl. Kapitel 3.6.10), konnten zum Beispiel 5 Aminosäuren (Tyr23, Ile25, Trp29, Trp46, Trp52) identifiziert werden. Wurden diese Aminosäuren gegen Alanine ersetzt, stieg der G-Faktor von -0,98 auf -0,68. Die G-Faktoren für die Geometrie der einzelnen Torsionswinkel χ_1 , χ_3 und χ_4 zeigten keine ungewöhnlichen Abweichungen.

3.5 Liganden

3.5.1 Einleitung

Ziel dieses Abschnitts der Arbeit war die Auswahl geeigneter Ausgangskonformationen allosterischer Modulatoren für den Aufbau der Rezeptor-Ligand-Komplexe. Hierzu wurden für jeden der ausgewählten Liganden Konformationen mithilfe der Simulated-Annealing-Methode generiert. Die generierten Konformationen wurden anschließend in Familien zusammengefaßt und die energieärmste Konformation für jede Familie ermittelt. Anhand dieses Verfahrens erhält man einen Überblick über die energetisch günstigen Konformationen eines Liganden im Vakuum. Wechselwirkungsenergien zwischen Ligand und Protein werden hierbei nicht berücksichtigt. Die energieärmste Konformation der Vakuumberechnungen muß somit nicht unbedingt die Konformation des gebundenen Liganden darstellen, auf jeden Fall wird es sich bei der Konformation des gebundenen Liganden aber um eine energiearme Konformation in der Nähe des globalen Energieminimums handeln. Dies gilt im gleichen Maße für die Konformation einer Verbindung im Kristall oder in Lösung. Röntgenkristallographische Untersuchungen und die Interpretation von Kernresonanzspektren können somit ebenfalls bei der Suche nach der bioaktiven Konformation herangezogen werden.

3.5.2 Auswahl der Liganden

Die Auswahl der bioaktiven Konformation gestaltet sich bei rigiden Verbindungen einfacher als bei flexiblen Strukturen, denn mit zunehmender Flexibilität des Liganden steigt auch seine Möglichkeit energetisch gleichwertige, aber strukturell stark abweichende Konformationen einzunehmen. Eine möglichst genaue Kenntnis der Lage pharmakophorer Elemente eines Liganden ist wiederum hilfreich bei der Suche nach seiner Bindungsstelle am Rezeptor. Daher wurden allosterische Modulatoren ausgewählt, die eine möglichst rigide Struktur besitzen, nämlich Diallylcara-

curin V und Alcuronium. Außerdem wurde Tubocurarin gewählt, das ähnliche pharmakophore Strukturen zeigt, allerdings nicht ganz so rigide ist. Unter physiologischen Bedingungen ist der tertiäre Stickstoff im Tubocurarin protoniert, womit die Verbindung wie Diallylcaracurin V und Alcuronium über zwei positiv geladene Zentren verfügt. Weiterhin finden sich in der Struktur vier aromatische Ringsysteme.

Ein zweites Auswahlkriterium war die hohe Affinität, die Diallylcaracurin V und Alcuronium gegenüber dem M_2 -Rezeptor besitzen. Die hohe Affinität könnte in einer besseren Paßgenauigkeit in die Bindungsstelle begründet liegen. Hochaffine Substanzen gestatten somit eine genauere Aussage hinsichtlich des Aufbaus ihrer Bindungsstelle. Im Unterschied zu Alcuronium und Diallylcaracurin V besitzt Tubocurarin dagegen nur eine etwa 130fach schwächere Affinität zum besetzten M_2 -Rezeptor. Auch dieser Unterschied kann Informationen zum Aufbau der Rezeptor-Ligand-Komplexe liefern, denn er könnte sich in einem veränderten Bindungsverhalten widerspiegeln.

Als vierte Substanz wurde mit W84 der Versuch unternommen einen Rezeptor-Ligand-Komplex zu modellieren. Auf eine Konformationsanalyse der Verbindung W84 wurde aufgrund ihrer Flexibilität verzichtet. Bei der Untersuchung wurde vielmehr die im Arbeitskreis Holzgrabe entwickelte pharmakophore Konformation des W84 berücksichtigt, die sich an die Struktur des Alcuroniums anlehnt (vgl. Kapitel 1.2.5). Abbildung 3.21 zeigt die Strukturformeln der gewählten Liganden.

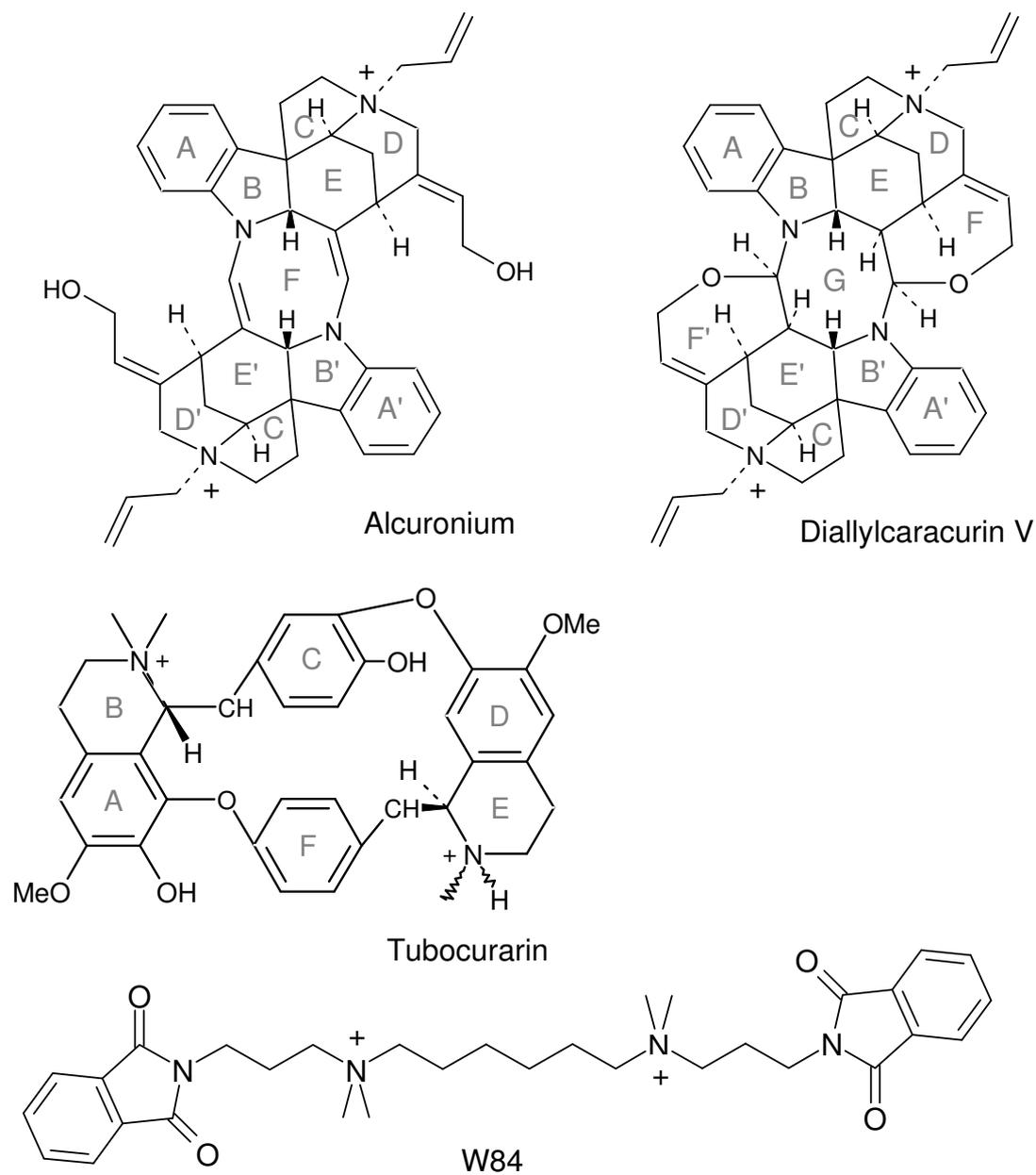


Abbildung 3.21: Strukturformeln der ausgewählten Liganden

3.5.3 Durchführung der Konformationsanalyse

3.5.3.1 Ausgangsstrukturen

Die Strukturen von Alcuronium und Diallylcaracurin V wurden mit Hilfe der Fragmentbibliothek des Programms SYBYL [105] aufgebaut. Die Konfiguration für Alcuronium wurde aus [33], die Konfiguration für das Diallylcaracurin V aus [32] entnommen.

Zur Durchführung der MD-Simulation mußten weiterhin den Strukturen Kraftfeldparameter zugeordnet werden. Für Alcuronium und Diallylcaracurin V trat hierbei die Frage auf, durch welche Parameter die Geometrie des Stickstoffs im Indolinringsystem am besten beschrieben werden kann. Das TRIPOS-Kraftfeld enthält Parameter für Stickstoffe mit tetraedrischer (N.3) oder planarer Geometrie (N.pl3), wobei der Stickstoff im Indolinringsystem der Sybyl-Fragmentbibliothek eine tetraedrische Geometrie besitzt. Die Höhe des Stickstoffs über der von seinen Bindungspartnern aufgespannten Fläche beträgt 0,42 Å. Eine Suche in der Cambridge Structural Database (CSD) [106] nach Indolinringsystemen, deren Stickstoff mit einem sp^3 -hybridisierten Kohlenstoff substituiert ist, zeigt Geometrien, bei denen die Höhe des Stickstoffs zwischen 0,48-0,16 Å liegt. Die starke Abflachung in einigen Strukturen läßt sich über den mesomeren Effekt in der Struktur erklären. In diesen Fällen würde eine planare Geometrie die Struktur besser wiedergeben. Speziell für das Alcuronium kann die Geometrie des Indolinstickstoffs auch durch den mesomeren Effekt der Enaminstruktur beeinflusst werden, deren Bestandteil der Indolinstickstoff ist. Mit einer Datenbanksuche nach Indolin-Enamin-Fragmenten konnte allerdings keine vergleichbare Struktur gefunden werden. In allen gefundenen Verbindungen war die Enaminstruktur Bestandteil eines Merocyanins (vinyloges Amid). Da an dieser Stelle keine genaue Aussage zur Geometrie des Indolinringsystems gemacht werden konnten, wurde die MD-Simulation für Alcuronium einmal mit N.3-Parametern und einmal mit N.pl3-Parametern durchgeführt. Eine Optimierung der so generierten Konformationen erfolgte danach durch die Verwendung semiempirischer Verfahren, mit denen die mesomeren Effekte besser beschrieben werden konnten (vgl. Kapitel 3.5.3.4)

In der Cambridge Structural Database (CSD) finden sich zwei unterschiedliche Kristallstrukturen von Tubocurarin, die auf Röntgenstrukturanalysen des Dichlorid-Pentahydrat- [108] und des Dibromid-Salzes [109] basieren. Sie wurden als Ausgangsstrukturen bei der Generierung neuer Konformationen verwendet. Die Unterschiede zwischen den Konformationen beruhen auf Abweichungen in den Torsionswinkeln der flexiblen Ether- und Methylenbrücken, die die vier Ringsysteme miteinander verknüpfen, außerdem unterscheidet sich die Konfiguration des protonierten, tertiären Stickstoffs in Ring E. Dieser ist beim Dibromidsalz S-konfiguriert, beim Dichlorid-Pentahydrat dagegen R-konfiguriert. Bei gleicher Konformation dieses Rings in den beiden Konformationen nimmt die Methylgruppe am Stickstoff im Dichloridsalz eine axiale, im Dibromidsalz eine äquatoriale Stellung ein. Da beide Konformationen für die bioaktive Konformation in Frage kommen, wurden auch hier zwei MD-Läufe durchgeführt, wobei jeweils eine der beiden Kristallstrukturen als Ausgangskonformation verwendet wurde.

3.5.3.2 Simulated annealing

Zur Generierung unterschiedlicher Konformationen wurde das Simulated-Annealing-Verfahren verwendet. Folgende Einstellungen wurden verwendet:

Simulationsdauer: 100 Zyklen (100 x 6000 fs)

Heizphase: 1000 fs auf 2000 K

Abkühlphase: 5000 fs auf 200 K

Abkühlfunktion: exponentielle Abnahme der Temperatur

Während der MD-Simulation des Alcuroniums wurde die trans-Konfiguration der beiden Hydroxymethylgruppen durch das Einführen eines zusätzlichen Kraftfeldterms stabilisiert und so eine mögliche Isomerisierung während der Heizphase verhindert. Im Anschluß an die MD-Simulation erfolgte die Geometrieoptimierung der 100 Konformationen. Hierbei wurde für die ersten 100 Iterationen die steepest descent Methode verwendet und danach die Optimierung mit der conjugate gradient Methode bis zu einem Abbruchkriterium von 0,01 kcal/mol Energiedifferenz weitergeführt.

Die MD-Simulation und die anschließende Geometrieoptimierung wurden mit dem Programm SYBYL unter Verwendung des TRIPOS-Kraftfelds durchgeführt. Da die Kraftfeldrechnungen im Vakuum durchgeführt wurden, mußte mit der Bildung artifizierlicher Strukturen aufgrund der Überbewertung elektrostatischer Wechselwirkungen gerechnet werden (vgl. Kapitel 3.4.3). Dieses Problem wurde umgangen, indem der elektrostatische Term bei den Energieberechnungen unberücksichtigt blieb. Strukturen, die mit dieser Methode berechnet werden, weisen meist eine sehr gute Übereinstimmung mit Proteingebundenen Konformationen auf [110].

3.5.3.3 Xcluster

Während der MD-Simulation sollten für die Verbindungen die lokalen Energieminima ihres gesamten Konformationsraums erreicht werden. Dies gewährleistete neben dem Temperaturverlauf die lange Laufzeit und die hieraus resultierende große Anzahl von jeweils 100 generierten Konformationen. Für die sich nun anschließende Analyse war jedoch eine Reduktion der Datenmenge wünschenswert.

Zu diesem Zweck wurde das Programm Xcluster [111] verwendet, das die Zusammenfassung ähnlicher Strukturen in Konformationsfamilien ermöglicht. Als Grundlage dienen dem Programm hierbei die RMSD-Werte, die für jedes mögliche Konformerpaar nach Superpositionierung berechnet werden. Die Gesamtheit der RMSD-Werte läßt sich in Form einer Matrix darstellen, in der jedes Feld A_{ik} den RMSD-Wert aus dem Vergleich der Konformation i mit der Konformation k enthält. Eine anschaulichere Entsprechung dieser Matrix ist der Cluster-Graph, bei dem jedes Feld als farbiges Rechteck dargestellt wird. Die Farbe richtet sich dabei nach dem RMSD-Wert des entsprechenden Feldes. XCluster verwendet bei dieser Darstellung nicht die ursprüngliche zeitliche Reihenfolge, in der die Strukturen in der MD-Simulation generiert wurden, sondern ordnet die Strukturen in einer neuen Reihenfolge, so daß ähnliche Strukturen beieinander liegen. Mögliche Konformationsfamilien können so im Cluster-Graphen als zusammenhängende Blöcke einheitlicher Färbung unterschieden werden. Die Möglichkeit zur Neuordnung der Reihenfolge der generierten Strukturen ergibt sich aus der Methode, mit der das Programm

stufenweise Konformationsfamilien entwickelt. Zu Beginn des Prozesses bildet jede Struktur eine eigene Familie. Danach werden in jeder neuen Stufe die zwei Familien vereinigt, die jeweils eine Konformation des Paares mit dem geringsten RMSD-Wert enthalten. Am Ende dieses Prozesses bilden dann alle Konformationen eine Familie. In jeder Stufe erfolgt eine Änderung der Reihenfolge, wobei die Konformationen der zwei vereinigten Familien in der Reihe nebeneinander angeordnet werden, ohne daß sich die Reihenfolge innerhalb dieser Familien ändert. Bei dem in einem MD-Lauf generierten 100 Strukturen stehen also 100 mögliche Einteilungen zur Auswahl. Für jede Stufe werden von XCluster Kennzahlen berechnet, mit denen die Einteilungen bewertet werden können. Besonders aussagekräftig ist hierbei das Trennungsverhältnis (*separation ratio*). Ein hoher Wert zeigt, daß der RMSD-Wert innerhalb der Familien einer Einteilung deutlich geringer ist als zwischen den Familien. Nach Einschätzung der Autoren des Programms ist bei einer Gesamtzahl von weniger als sechs Familien ein Trennungsverhältnis im Bereich von 2 ein Indiz für eine sinnvolle Einteilung.

3.5.3.4 Geometrieoptimierung mit AM1

Nach Einteilung der Strukturen in Konformationsfamilien wurde für jede Familie die Struktur mit der geringsten Energie ausgewählt. Mit diesen Strukturen wurde mit dem semiempirischen Verfahren AM1 (Austin Method 1) [112] eine zweite Geometrieoptimierung durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm SPARTAN [113]. Durch die Verwendung von AM1 war eine bessere Beschreibung der Strukturen möglich, bei der auch mesomere Effekte berücksichtigt wurden. Für alle Liganden wurden mit AM1 in SPARTAN Partialladungen mit der ESP-Methode (ESP = *electrostatic potential*) berechnet [114].

3.5.4 Alcuronium

Die Berechnung der RMSD-Werte durch XCluster erfolgte aufgrund der Superpositionierung der Atome des gesamten Ringsystems der Verbindung, wobei Wasserstoffatome nicht berücksichtigt wurden. Die Konformation der

Allylreste und Hydroxymethylgruppen wurde ebenfalls nicht in die XCluster-Analyse miteinbezogen.

Zuerst sollen die Ergebnisse für die Konformationen vorgestellt werden, die mit dem N.3-Parameter (sp^3 -hybridisierter Stickstoff) generiert wurden. In diesem Fall lag das höchste Trennungsverhältnis mit 6,86 bei Stufe 99. Dies entspricht einer Unterteilung in 2 Familien. Das Charakteristikum beider Familien ist die Konformation des zentralen Ringes F, die die lateralen Ringsysteme A-D bzw. A'-D' in eine unterschiedliche Lage dirigiert. So bilden in der Familie A die Indolinringe in etwa eine Ebene, während sie in der Familie B im spitzen Winkel zueinander liegen (siehe Abbildung 3.22). Die Einteilung in zwei Familien war jedoch noch sehr grob, da sich die Konformationen innerhalb der Familie stark voneinander unterscheiden. So beträgt der maximale RMSD in Familie A 0,9 Å und in Familie B 0,92 Å. Diese Unterschiede ließen auch für die Ringsysteme A-E bzw. A'-E' unterschiedliche Konformationen erwarten. Deshalb wurden die Konformationen der beiden Ringsysteme jeweils unabhängig vom restlichen Molekül mit XCluster untersucht.

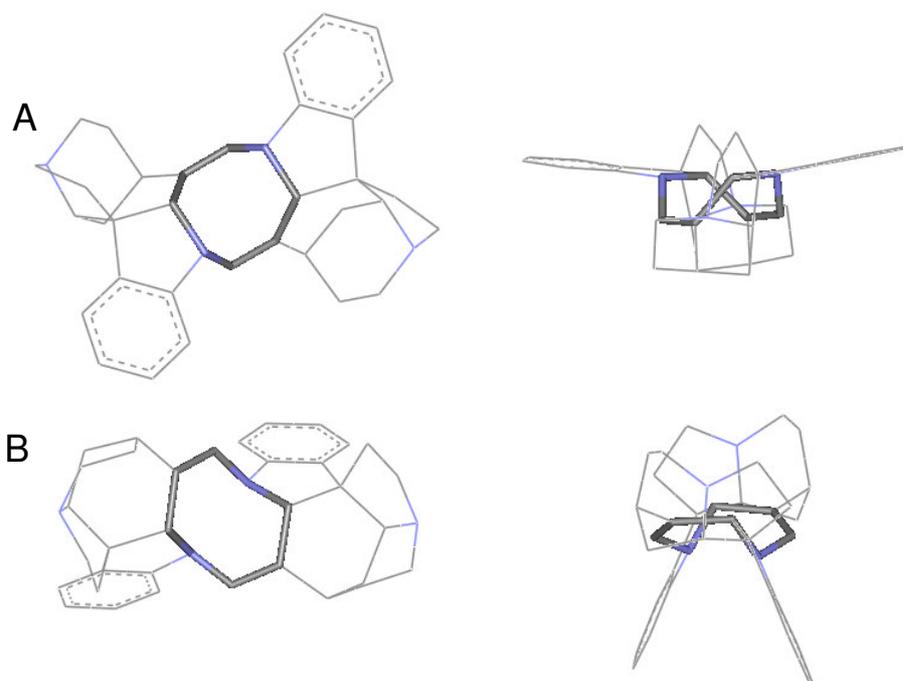


Abbildung 3.22: Ringkonformation der Familien A und B des Alcuroniums

Sowohl im Ringsystem A-E als auch im Ringsystem A'-E' wurden dieselben drei Konformationsfamilien gefunden. Abbildung 3.23 zeigt den zugehörigen Cluster-Graphen. Die drei Konformationen sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Zwei Strukturen, die XCluster der Familie II zuordnet, lassen sich nicht mit diesem Schema beschreiben. Da diese Strukturen sehr selten gefunden wurden und zudem bei der Analyse des Ringsystems A'-D' überhaupt nicht auftraten, wurden sie nicht weiter untersucht.

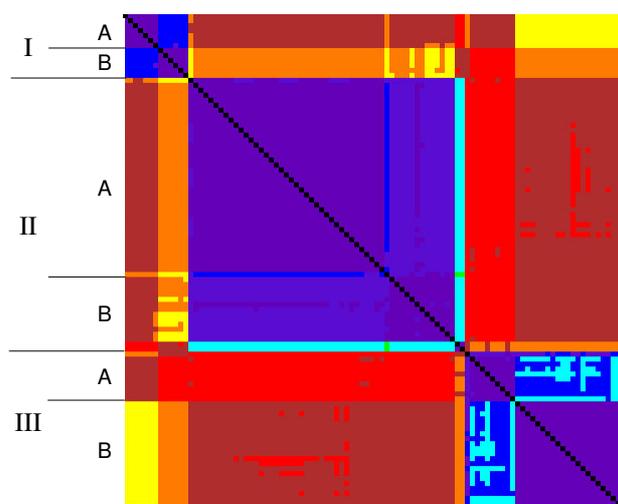
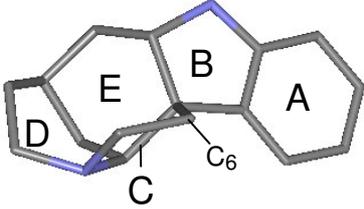
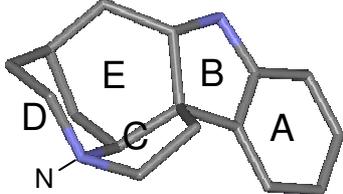
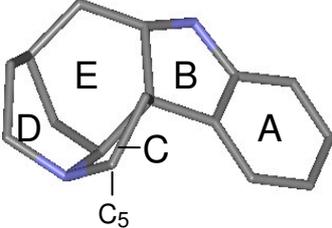


Abbildung 3.23: Clustergraph für das Ringsystem A-D des Alcuronium. Den entlang der Diagonalen sichtbaren blau-violettgefärbten Blöcken entsprechen drei Familien. Innerhalb der drei Blöcke erkennt man jeweils zwei größere, dunkelviolet abgesetzte Zonen. Diese entsprechen jeweils den beiden Konformationen A und B des zentralen Rings, der über die drei mit dem lateralen Ringsystem gemeinsamen Atome Eingang in diese Konformationsanalyse findet

Kombiniert man die Ergebnisse, die sich aus der Analyse der Teilstrukturen ableiten ließen, sollte man unter Berücksichtigung der Symmetrie des Ringsystems bei Alcuronium zwölf Konformationen unterscheiden können. Sie lassen sich anhand der oben eingeführten Kurzbezeichnungen beschreiben. Gehören zum Beispiel die Ringsysteme A-D zur Familie II und A'-D' zur Familie I und liegt der zentrale Ring in der Konformation B vor, so wird die Konformation des gesamten Ringsystems über das Kürzel BII/I eindeutig beschrieben. Aufgrund der Symmetrie des Alcuroniums ist diese Konformation mit der Konformation BI/II identisch. Anhand der oben beschriebenen Unterschiede der

Tabelle 3.6: Unterschiedliche Konformationen der Ringsysteme A-D

Familie	Konformation	Ring D	Ring C
I		Wanne	C ₆ außerhalb der Ringebene
II		Sessel	N außerhalb der Ringebene
III		Wanne	C ₅ außerhalb der Ringebene

Ringe C bzw. C' und F konnten die 100 Konformationen in zehn Familien eingeteilt werden. Die theoretisch möglichen Konformationen AI/I und BI/I wurden nicht generiert und dies läßt die Annahme zu, daß sie keine stabilen Konformationen des Ringsystems darstellen. Die Häufigkeit mit der die zehn Familien in der MD-Simulation auftraten, läßt sich aus Tabelle 3.7 erkennen.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde die XCluster-Analyse für die Konformationen der N.pl3-Struktur mit planarem Stickstoff des Indolinrings durchgeführt. Für die Ringsysteme A-D bzw.- A'-D' konnten hierbei die gleichen drei Familien gefunden werden, wie sie in Tabelle 3.6 dargestellt sind. Für den zentralen Ring F wurde im Gegensatz zur ersten Analyse nur eine Konformation gefunden. Diese ähnelt der Ringkonformation der Familie A (RMSD 0,48 Å). Auch die Verteilung der Konformationen auf die sechs möglichen Konformationsfamilien ähnelt der in Familie A (vgl. Tabelle 3.7). Auch hier konnte eine I/I-Konformation nicht gefunden werden. Insgesamt

wurden somit in beiden MD-Läufen 15 unterschiedliche Konformationen generiert.

Die Geometrie dieser 15 Konformationen wurde nun mit AM1 erneut optimiert. Die Anzahl der Konformationen verminderte sich dabei auf fünf. Die Unterschiede in Ring F der N.3-Strukturen der Familie A und der N.pl3-Strukturen finden sich bei den AM1-Konformationen nicht mehr. Die Höhe des Stickstoffs über der Fläche, die von den Bindungspartnern aufgespannt wird beträgt in der AM1-Struktur 0,16 Å und nimmt somit eine Zwischenstellung zwischen der N.3-Geometrie (Höhe: 0,4 Å) und der N.pl3 Struktur (Höhe:0,03 Å) ein. Auch die Geometrie der Konformationen in der Familie B änderte sich während der Optimierung entsprechend (Höhe 0,17 Å). Weiterhin wurden alle Ringstrukturen der Familie I während der Geometrieoptimierung in Konformationen der Familie III umgewandelt. Auch die Konformation BII/II konnte mit AM1 nicht erhalten werden. Aus ihr bildete sich bei der Optimierung die Konformation AII/II. Die mit AM1 berechneten Energien sind ebenfalls in Tabelle 3.7 aufgeführt. Die Konformation AII/AII ist deutlich energieärmer, als die anderen generierten Strukturen. Sie wurde daher zum Aufbau des Rezeptor-Ligand-Komplexes ausgewählt.

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Konformationsanalyse für Alcuronium.

Konformation	Anzahl in der MDS		AM1 Energie (kcal/mol)	Konformation	Anzahl in der MDS	AM1 Energie (kcal/mol)
	N.3	N.pl3				
A/I	-	-	-	BI/I	-	-
A/II	10	11	-	BI/II	5	-
A/III	4	5	-	BI/III	4	-
AII/II	30	47	458,96	BII/II	5	-
AII/III	11	21	462,15	BII/III	13	465,20
AIII/III	1	4	464,01	BIII/III	15	463,80

Auf eine Konformationsanalyse der Hydroxymethyl- und Allylreste wurde verzichtet. Der Vergleich ihrer Konformationen in den Ringsystemen der Familie I zeigte eine hohe Flexibilität, so daß eine Reihe energetisch gleich-

wertiger Strukturen zu erwarten ist. Eine endgültige Konformation für diesen Bereich läßt sich erst beim Aufbau der Rezeptor-Ligand-Komplexe festlegen. Die gewählte Konformation des Ringgerüsts steht in Einklang mit den Ergebnissen experimenteller Daten. Wenkert et al. [115] fanden aufgrund des Vergleichs von ^{13}C -NMR-Spektren, daß die Methylierung von N(4) in Nortoxiferin einen stärkeren γ -Effekt auf C(14) hervorruft, als die entsprechende Methylierung von Strychnin. Dies zeigt sich im NMR-Spektrum des Toxiferins in einer größeren Hochfeldverschiebung. Dieser Unterschied läßt sich laut Wenkert et al. begründen, wenn man für Toxiferin eine von der Wannenform abweichende Konformation des Rings D postuliert, die in Strychnin und Strychninderivaten gefunden wurde. Eine entsprechende Hochfeldverschiebung für C(14) ist auch im ^{13}C -NMR-Spektrum des Alcuroniums zu finden [116].

3.5.5 Diallylcaracurin V

Diallylcaracurin V ist in seiner Konstitution dem Alcuronium ähnlich. Durch die Verknüpfung der Hydroxymethylreste mit dem zentralen Ring nimmt die Rigidität des gesamten Ringgerüsts jedoch weiter zu. Da durch die Verwendung der N.pl3-Parameters zur Beschreibung des Indolstickstoffs beim Alcuronium letztendlich keine zusätzlichen Konformationen entdeckt werden konnten, wurde die MD-Simulation nur unter Verwendung des N.3-Parameters durchgeführt. Für die XCluster-Analyse wurden nur die schweren Atome des Ringgerüsts berücksichtigt. Das höchste Trennungsverhältnis von 4,3 berechnete XCluster bei der Einteilung in nur drei Konformationsfamilien. In der größten Familie mit 85 Strukturen liegen die Ringe F bzw. F' in der gleichen Konformation vor. In den beiden anderen Familien unterscheidet sich die Konformation der beiden Ringe voneinander. Aufgrund des symmetrischen Baus der Verbindung sind somit die Konformationen der beiden kleineren Familien identisch. Diese Symmetrie wird bei der einfachen Superpositionierung, die XCluster durchführt, nicht berücksichtigt, da hierbei immer nur Ring F mit Ring F und Ring F' mit Ring F' überlagert wird. Das restliche Ringsystem entspricht der Konformation der Familie BII/II beim Alcuronium. Insgesamt handelt es sich also nur um zwei unterschiedliche

Konformationen, die in Abbildung 3.24 dargestellt sind. Nach der Geometrieoptimierung der beiden gefundenen Konformationen mit AM1 ergab sich eine Energie von 467,95 kcal/mol für die Struktur aus Familie B und 474,522 kcal/mol für die Struktur aus Familie A/C. Die Geometrie des Stickstoffs im Indolinring entsprach der bei Alcuronium gefundenen Geometrie (Höhe N: 0,17 Å). Aufgrund des deutlichen Energieunterschiedes wurde für den Ligand-Rezeptor-Komplex die Konformation der Familie B gewählt. Abbildung 3.24 gibt einen Überblick über die untersuchten Konformationen.

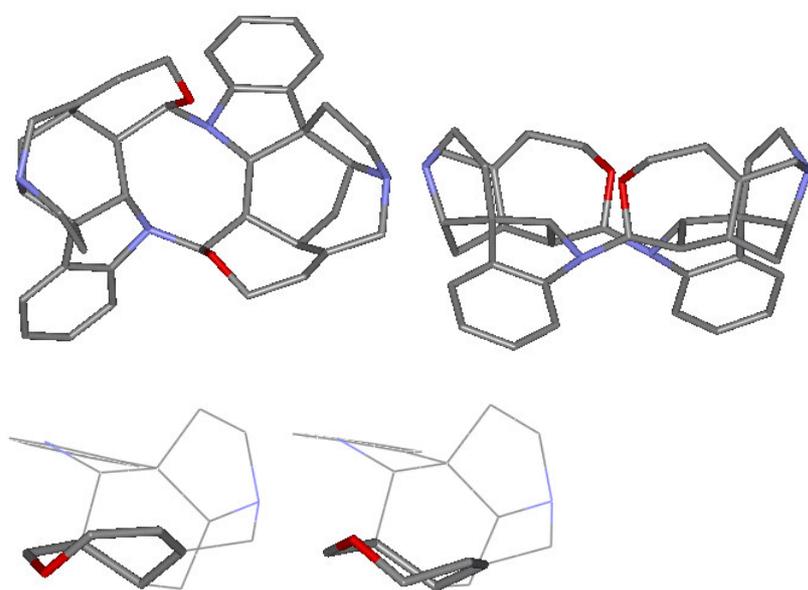


Abbildung 3.24: Konformationen des Diallylcaracurins V. Oben: Das vollständige Ringgerüst in der energetisch günstigeren Konformation aus zwei unterschiedlichen Blickwinkeln; unten: Die zwei unterschiedlichen Konformationen der Ringe A-F. Rechts ist die energetisch günstigere Konformation dargestellt.

3.5.6 Tubocurarin

Die beiden Kristallstrukturen wurden in das Programm SYBYL überführt und fehlende Wasserstoffatome ergänzt. Entsprechend den vorangegangenen Verbindungen wurden für beide Strukturen mit dem oben beschriebenen Simulated-Annealing-Verfahren neue Konformationen generiert. Sauerstoff- und Kohlenstoffatome der Methyl-, Methoxyl- und Hydroxylgruppen wurden bei der Superpositionierung nicht berücksichtigt. Ebenfalls unberücksichtigt blieben die

vier unsubstituierten Kohlenstoffatome des Ringes F. Während der MD-Simulation tauschten die jeweils gegenüberliegenden Atome aufgrund einer Drehung dieses Rings um 180 Grad mehrmals ihre Position. Die Konformation bleibt hierbei jedoch erhalten. Bei der Superpositionierung und RMSD-Berechnung würde jedoch von XCluster die unterschiedliche Lage der einzelnen Kohlenstoffatome in den Strukturen berücksichtigt und diese dementsprechend zwei unterschiedlichen Familien zugeordnet. Durch die nachfolgende visuelle Überprüfung der Konformationen in den einzelnen Familien wurde sichergestellt, daß durch den Ausschluß der vier Atome keine unterschiedlichen Konformationen in einer Familie zusammengefaßt wurden.

Die Auswertung mit XCluster gestaltete sich bei Tubocurarin schwieriger als bei den anderen beiden Liganden, da das maximale Trennungsverhältnis in allen Stufen sehr niedrig und der Unterschied zwischen den Stufen klein war. Daher wurde die Einteilung auch auf Grund einer visuellen Überprüfung der einzelnen Konformationsfamilien getroffen. Für die Strukturen mit der S-Konfiguration des Tubocurarinbromids betrug das maximale Trennungsverhältnis 1,3 bei einer Einteilung in 17 Familien. Die maximale RMSD-Abweichung zweier Strukturen innerhalb einer Familie war mit 0,43 relativ klein. Für die Strukturen mit der R-Konfiguration des Tubocurarinchlorids betrug das maximale Trennungsverhältnis 1,2 bei einer Einteilung in 9 Familien. Der maximale RMSD-Wert innerhalb der Familien betrug 0,7 Å und die Abweichungen erschienen bei visueller Überprüfung relativ hoch. Deshalb wurde eine Einteilung mit 19 Familien gewählt, die der Einteilung der S-konfigurierten Strukturen entspricht. Der maximale RMSD innerhalb einer Familie beträgt 0,43. Um die Zahl der Familien weiter zu vermindern, blieben alle Strukturen bei der weiteren Analyse unberücksichtigt, deren Energie um mindestens 10 kcal/mol höher lag als die niedrigste gefundene Energie. Erfahrungen in unserem Arbeitskreis zeigen, daß die Energie der bioaktive Konformation unterhalb dieser Grenze liegt [92]. Durch den Ausschluß dieser Konformationen wurden kleine Familien mit maximal 3 Mitgliedern entfernt. Von den 17 Familien der Tubocurarinchlorid-Gruppe blieben sieben Familien, von den 19 Familien der Tubocurarinbromid-Gruppe 11 Familien erhalten. Eine weitere Reduzierung in der Zahl der

Konformationen wurde durch die anschließende Geometrieoptimierung mit AM1 erreicht, da sich einige der Kraftfeldstrukturen in eine andere Konformation umlagerten. Die jeweils verbleibenden sechs Konformationen waren bis auf die unterschiedliche Konfiguration in beiden Gruppen identisch. Unabhängig von der Konfiguration sollen daher die AM1-Konformationen entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den Familien 1-6 als Konformationen 1-6 bezeichnet werden. Die Berücksichtigung der Ladungsverhältnisse bei der AM1-Berechnung bringt das Problem mit sich, daß die Konformation der Strukturen ungünstig beeinflusst werden kann. Dies zeigte sich beim Vergleich der einzelnen Konformationen mit den beiden Röntgenkristallstrukturen. Konformation 1 entsprach der Kristallstruktur des Tubocurarinbromids (RMSD-Wert 0,43 Å). Die Konformation 2 kam der Kristallstruktur des Tubocurarinchlorids am nächsten, wies aber dennoch deutliche Abweichungen auf. So betrug der RMSD-Wert (schwere Atome) der beiden Strukturen nach Superpositionierung 0,72 Å. Generell sind solche Unterschiede in der Konformation von Röntgenkristallstrukturen und relaxierten Strukturen nicht ungewöhnlich. Allerdings fiel bei diesem speziellen Fall auf, daß die Übereinstimmung zwischen der Kristallstruktur mit der nicht AM1-optimierten Konformation aus der Kraftfeldberechnung, bei der elektrostatische Wechselwirkungen unberücksichtigt geblieben waren, deutlich besser war (RMSD von 0,32 Å). Weiterhin trat die Abweichung nach der AM1-Geometrieoptimierung im Vergleich zur Röntgenkristallstruktur nicht auf, wenn die Struktur des Tubocurarins an zwei Stellen geringfügig modifiziert wurde: Zum einen wurde hierbei der tertiäre Stickstoff deprotoniert, zum anderen die Hydroxylgruppe an Ring C entfernt. Der RMSD-Wert dieser modifizierten Struktur mit der Kristallstruktur betrug 0,26 Å. Das Ergebnis ist in Hinblick auf die Hydroxylgruppe leicht zu erklären, da diese in der AM1-Struktur eine interne Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff der Methoxygruppe des Rings D bilden kann und sich hierbei die Lage der beiden Ringe C und D zueinander ändert. Aber auch die Protonierung des Stickstoffs in Ring E führt unabhängig von der Hydroxylgruppe zur Bildung der von der Kristallstruktur abweichenden Konformation. Offensichtlich wird diese Konformation auch durch die Verringerung der Abstoßungskräfte der zwei positiven Zentren im Molekül energetisch

begünstigt. Beide Effekte werden in der Vakuumberechnung überbewertet und somit erschien die modifizierte Struktur besser geeignet, die Verhältnisse in einer Lösungsmittel- bzw. Proteinumgebung wiederzugeben. Dafür spricht auch der Vergleich mit der Kristallstruktur. Hier bilden sowohl die Hydroxylgruppe des Rings C als auch der protonierte Stickstoff keine interne Wasserstoffbrücke, sondern eine Wasserstoffbrücke zum benachbarten Chloridion. Im gebundenen Zustand ist die Bildung solcher Wasserstoffbrücken ebenfalls denkbar. Tubocurarin könnte an der Oberfläche des M₂-Rezeptors sowohl mit polaren Aminosäuren als auch mit Wassermolekülen entsprechende Wasserstoffbrücken ausbilden.

Als Konsequenz aus diesen Überlegungen wurden die elf bzw. sieben Konformationen der Kraftfeldberechnungen in entsprechender Weise modifiziert und erneut einer AM1-Geometrieoptimierung unterzogen. Allerdings konnten im Vergleich zur ersten AM1-Rechnung außer bei der erwähnten Konformation 2 nur geringe Änderungen zwischen den originären und modifizierten Strukturen gefunden werden, obwohl außer Konformation 5 alle Familien die beschriebene interne Wasserstoffbrücke aufwiesen. Bei Konformation 2 ergibt sich beim Vergleich der Energien ein wichtiger Unterschied (vgl. Tabelle 3.8). Während bei der protonierten Form des Tubocurarins die Energie der Konformation 2 deutlich größer ist als die der Konformation 1, besitzen beide in ihrer modifizierten Form einen ähnlichen Energiegehalt. Beide Strukturen kommen daher als bioaktive Konformationen in Betracht. Die anderen Konformationen liegen in ihrem Energiegehalt um mindestens 3,5 kcal/mol höher als die Konformationen 1 und 2 und wurden daher nicht beim Aufbau des Ligand-Rezeptor-Komplexes verwendet. Beide Konformationen sind in Abbildung 3.25 dargestellt. Die Unterschiede in den Energiegehalten der R- und S-Konfiguration des protonierten Stickstoffs sind relativ gering. Eine Aussage, in welcher Konfiguration die bioaktive Struktur vorliegt konnte aufgrund dieser Ergebnisse nicht gemacht werden.

Tabelle 3.8: AM1-Energien der Konformationen des Tubocurarins. In der Spalte HB wurden die Konformationen gekennzeichnet, die eine interne Wasserstoffbrücke bilden. AM1_{org} beinhaltet die Energien des protonierten Tubocurarins, AM1_{mod} die Energien der modifizierten Strukturen.

Familie	N _{prot} Konfig.	HB	AM1 _{org}	AM1 _{mod}	Familie	N _{prot} Konfig.	HB	AM1 _{org}	AM1 _{mod}
1	R	+	232,25	96,99	4	R	+	238,47	103,52
	S	+	232,25	97,40		S	+	238,62	103,54
2	R	+	236,41	98,13	5	R	-	238,30	103,14
	S	+	236,95	98,27		S	-	238,88	102,76
3	R	+	235,75	102,70	6	R	+	241,35	107,53
	S	+	236,62	102,22		S	+	241,64	105,88

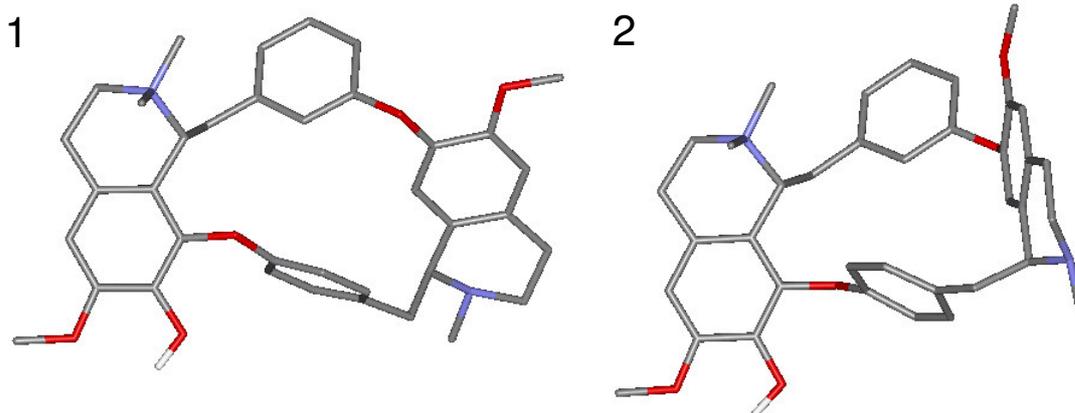


Abbildung 3.25 : Die ausgewählten Strukturen 1 und 2 (vgl. Tabelle 3.8) für Tubocurarin in ihrer modifizierten Form.

3.5.7 Vergleich mit anderen Modellen

Für alle der hier untersuchten Strukturen lagen bereits Modelle vor, die im Arbeitskreis Holzgrabe erstellt wurden. Alcuronium und Tubocurarin wurden dort mit dem Programm CORINA generiert, das in der Lage ist 2D-Strukturen in 3D-Strukturen umzuwandeln [117]. Die Geometrie der generierten Struktur wurde anschließend mit AM1 optimiert [42]. Während die Konformation des Alcuroniums mit der hier entwickelten Konformation übereinstimmt, ist die Tubocurarin Konformation mit keiner der hier gefundenen sechs Konformationen identisch. Aufgrund der guten Übereinstimmung der Ergebnisse im Vergleich zu den Röntgenkristallstrukturen erscheint die hier getroffene Auswahl sinnvoller. Diallylcaracurin V wurde anhand der Kristallstruktur des Strychnins von Zlotos et al. modelliert [32]. Auch in diesem Fall stimmt die Konformation mit unserem Ergebnis überein.

3.6 Rezeptor-Ligand-Komplexe

3.6.1 Einleitung

Insgesamt waren 20 Strukturen des extrazellulären Bereichs des M₂-Rezeptors generiert worden (nachfolgend beschrieben als Struktur 1-20), die neben den Ligandenkonformationen die Grundlage für den Aufbau der Rezeptor-Ligand-Komplexe bildeten. Der Aufbau der Rezeptor-Ligand-Komplexe läßt sich in zwei Phasen unterteilen. Zuerst mußte eine passende Bindungsstelle für die Liganden gefunden werden. Hierzu wurden die physikochemischen Eigenschaften der generierten Rezeptorstrukturen mit den in Kapitel 3.6.5 bis 3.6.7 beschriebenen Verfahren (Surfnets, MOLCAD, Grid) untersucht. Alle Verfahren erlaubten es, die Ergebnisse direkt an der untersuchten Rezeptorkonformation darzustellen und ermöglichten so eine manuelle Ausrichtung des Liganden im Rezeptor. Wichtige Anhaltspunkte waren hierbei auch die experimentellen Daten, die für die Bindung allosterischer Liganden am M₂-Rezeptor vorliegen. Mutationsstudien und vergleichbare Experimente sowie Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Liganden und das hieraus entwickelte Pharmakophormodell (vgl. Kapitel 1.2.5) bieten Informationen über die Lage der Bindungsstelle und über die Ausrichtung der Liganden im gebundenen Zustand.

Die hieraus entwickelten Initialkomplexe wurden im zweiten Teil mit Hilfe von Kraftfeldberechnungen optimiert.

3.6.2 Mutationsstudien

In verschiedenen Untersuchungen wurde die Bindungsaffinität des allosterischen Modulators Gallamin an Rezeptormutanten gemessen. Bisher konnte allerdings noch keine Aminosäure gefunden werden, deren Mutation zu einem fast vollständigen Verlust der Bindungsaffinität führte, wie dies bei Mutationsstudien der orthosterischen Bindungsstelle beobachtet worden war. Da gezeigt werden konnte, daß Alcuronium und Gallamin sich gegenseitig von ihren Bindungsstellen verdrängen, kann von einer zumindest teilweisen Überschneidung dieser Bindungsstellen ausgegangen werden [26]. Insofern half die Position der nachfolgend beschriebenen Mutationen im Rezeptormodell, die Lage der Bindungsstelle einzugrenzen.

Am M_1 -Rezeptor wurde eine Affinitätsabnahme für die Mutationen Trp101Ala und Trp400Ala beschrieben [118]. Diese Aminosäuren finden sich am extrazellulären Ende der Helix 3 bzw. Helix 7 aller muscarinerger Rezeptoren und es erscheint daher wahrscheinlich, daß für die entsprechenden Aminosäuren Trp99 und Trp422 des M_2 -Rezeptors ein ähnlicher Effekt zu erwarten ist. Die Mutation von Trp101 beeinflussten daneben auch die Bindung orthosterischer Liganden an den M_1 -Rezeptor.

Zwei weitere Arbeiten untersuchen die Affinitätsunterschiede von Subtypen anhand von Rezeptorchimären. Bindungsstudien an unterschiedlichen M_2/M_5 - bzw. M_2/M_3 -Rezeptorchimären lassen vermuten, daß Aminosäuren in der M_2 -Sequenz 391-421 für die erhöhte Affinität des M_2 -Rezeptors zum Gallamin verantwortlich sind [119]. Dieser Abschnitt umfaßt den dritten extrazellulären Loop und die angrenzenden helikalen Regionen. Interessanterweise grenzt dieser Bereich direkt an das bereits erwähnte Trp422. In einer weiterführenden Untersuchung konnte mit Asn419 eine einzelne Aminosäure in diesem Bereich des M_2 -Rezeptors identifiziert werden, deren Mutation die Affinität von Gallamin erniedrigt [120]. Die drei Aminosäuren Trp99, Trp422 und Asn419 liegen im helikalen Bereich des Rezeptors, wobei ihre Seitenketten ins Innere des Rezeptors zeigen. Ein weiterer wichtiger Bereich wurde im zweiten

extrazellulären Loop gefunden. Bei der Überführung des Sequenzabschnitts EDGE (Glu172 bis Glu175) des M₂-Rezeptors in die im M₁-Rezeptor vorliegende LAGQ-Sequenz (Leu174 bis Gln177) konnte ebenfalls eine Affinitätsabnahme für Gallamin beobachtet werden [121].

3.6.3 Chemische Modifikation der Bindungsstelle

Hinweise auf eine Beteiligung saurer Aminosäuren an der allosterischen Bindungsstelle wurden auch für den Ligand-Rezeptor-Komplex zwischen Alcuronium und dem M₂-Rezeptor gefunden. Bei der chemischen Modifikation von Carboxylatgruppen mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) konnten in Bezug auf die allosterische Modulation zwei Effekte beobachtet werden. Niedrigere Konzentrationen beeinflussten den Kooperationsgrad α , höhere Konzentrationen beschleunigten die Dissoziationsgeschwindigkeit des orthosterischen Liganden [³H]-NMS [122]. Beide Effekte stehen mit der Bindungsaffinität des allosterischen Liganden in Verbindung. Die Autoren dieser Studie folgern hieraus, daß zwei saure Aminosäuren die Bindung des Alcuroniums beeinflussen können. In Anlehnung an die Ergebnisse der Mutationsstudien wurde eine der sauren Aminosäuren der EDGE-Sequenz des zweiten extrazellulären Loops und das tiefer im Rezeptor gelegene Asp97 als Angriffspunkte für das EDC postuliert. Bei der Mutation von Asp97Asn hatte sich zwar keine nennenswerte Abnahme der Bindungsaffinität des Gallamins gezeigt, jedoch konnte eine signifikante Erniedrigung des Kooperationsgrads α beobachtet werden [121]. Die Aminosäure folgt dem an der Disulfidbrücke beteiligten Cys96 auf der dritten Helix und nimmt einen Raum zwischen der dritten und vierten Helix auf der Außenseite des Rezeptors ein.

Die Autoren der hier vorgestellten Untersuchung vermuten einen Zusammenhang zwischen der Konzentration des EDC und der Lage der Aminosäure. Zuerst soll der Angriff an einer der nahe bzw. an der Oberfläche gelegenen sauren Aminosäuren im zweiten extrazellulären Loop erfolgen, erst bei höheren EDC-Konzentrationen würde auch das tiefer im Rezeptorinneren liegende Asp97 erfaßt.

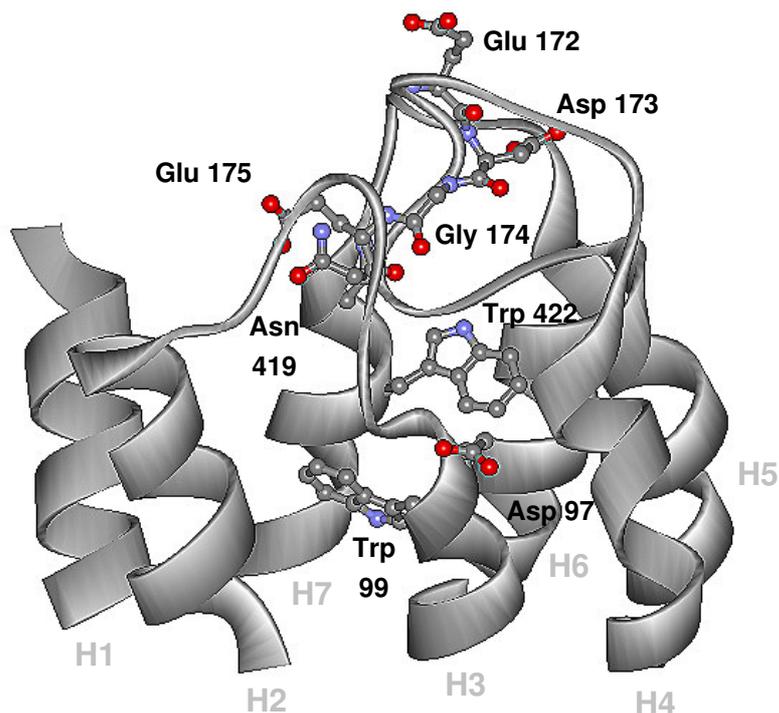


Abbildung 3.26 : Modell des extrazellulären Bereichs mit den Aminosäuren, deren Veränderung die Bindung von Gallamin beeinflusst. Die Position der Aminosäuren im EDGE-Fragment des zweiten extrazellulären Loops ist allerdings stark von dessen Konformation abhängig und variiert in den unterschiedlichen Strukturen stark (Hier ist Struktur 4 dargestellt).

3.6.4 Informationen aus dem Pharmakophormodell

3.6.4.1 Volumen der Bindungstaschen

Die Liganden Alcuronium, Caracurin und Tubocurarin zeichnen sich durch ein umfangreiches Ringgerüst aus. Generell kann hieraus jedoch nicht auf die Größe der Bindungstasche geschlossen werden. So ist es durchaus vorstellbar daß nur ein kleiner Teil des Liganden mit dem Rezeptor in Kontakt steht, wenn der Ligand an der Oberfläche bindet. Auch die Analyse von Röntgenkristallstrukturen hat gezeigt, daß kein zwingender Zusammenhang zwischen der Größe des Liganden und der Bindungstasche bestehen muß [123]. Trotzdem erscheint ein solcher Zusammenhang für die hier behandelten Liganden vorstellbar, wenn man das Pharmakophormodell von Holzgrabe et al. (vgl Kapitel 1.2.5) in die Überlegung miteinbezieht. Wenn für beide aromatischen Ringsysteme und die quartären Ammoniumgruppen entsprechende Wechselwirkungsdomänen in der Bindungsstelle existieren sollten, so muß aufgrund

ihrer peripheren Lage auch der Mittelteil der Ligandstrukturen einen Platz in der Bindungstasche finden.

3.6.4.2 Wechselwirkung der Liganden mit dem Rezeptor

Für die quartären Ammoniumgruppen werden zwei mögliche Arten von Wechselwirkungen mit Proteinstrukturen diskutiert. Wechselwirkungskomplexe zwischen geladenen Stickstoffgruppen und aromatischen Systemen wurden erstmals von Höltje und Kier beschrieben [125]. Sie finden sich unter anderem in Röntgenkristallstrukturen der Acetylcholinesterase und werden auch für die orthosterische Bindungsstelle der Muscarin-Rezeptoren diskutiert [23]. In den Kristallstrukturen stehen meistens zwei bis drei aromatische Aminosäuren in Kontakt mit der quartären Ammoniumgruppe. Der Verlust der Affinität von Gallamin bei der Mutation von Tryptophanen kann in dieser Weise gedeutet werden. Als zweite Möglichkeit käme die Interaktion mit negativ geladenen Carboxylatgruppen von Aspartat oder Glutamat in Betracht. Auch hierfür finden sich experimentelle Ergebnisse sowohl für Gallamin als auch für Alcuronium (vgl. Kapitel 3.6.2 und 3.6.3).

Für die aromatischen Ringsysteme ist die Wechselwirkung mit lipophilen Bereichen des Rezeptors zu erwarten. Unterschieden werden kann hierbei weiterhin die Wechselwirkung mit aliphatischen oder aromatischen Seitenketten. Gerade die Interaktionen zwischen aromatischen Systemen spielen häufig eine wichtige Rolle bei der spezifischen Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein [125].

3.6.5 Darstellung möglicher Bindungstaschen mit SURFNET

Um eine mögliche Angriffsstelle für die allosterischen Liganden zu definieren, wurde die Oberflächenstruktur der einzelnen Rezeptormodelle mit dem Programm SURFNET [124] untersucht. Anhand der atomaren Abstände und Atomradien werden durch eine entsprechende Prozedur zuerst Zwischenräume mit Kugeln unterschiedlicher Größe ausgefüllt. Überlappende Kugeln, deren Radius in einem zuvor definierten Bereich liegt, werden in einem zweiten Schritt zu einer einzelnen Struktur zusammengefaßt. Diese Strukturen stellen somit ein ‚negatives‘ Abbild der Oberfläche dar, das sich mit den Volumina der Liganden

direkt vergleichen läßt. Die bei der Durchführung verwendeten Parameter sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: SURFNET-Parameter

Minimaler Kugelradius	4 Å
Maximaler Kugelradius	1 Å
Abstand zwischen Molekül und Gitterbegrenzung in xyz-Richtung	6 Å
Abstand der Gitterpunkte	0,8 Å

Das Programm erlaubt weiterhin die getrennte Darstellung der einzelnen Strukturen, die Berechnung ihres Rauminhalts und die Erfassung der angrenzenden Aminosäuren. Für jede Struktur ermittelt SURFNET außerdem ein Zentrum. Dieses entspricht dem Massenschwerpunkt der Struktur unter der Annahme, es handle sich hierbei um einen soliden Körper.

3.6.6 Darstellung des elektrostatischen Potentials mit MOLCAD

Verwendet wurde die in SYBYL implementierte Version von MOLCAD [127]. Das Programm ermöglicht die Darstellung molekularer Oberflächen und die Visualisierung physikochemischer Eigenschaften. In unserem Fall wurde das Programm genutzt, um das elektrostatische Potential von Rezeptor und Ligand zu vergleichen. Die Berechnung der Oberflächen erfolgte über das Connolly-Verfahren. Es berechnet die Kontaktfläche zwischen der van-der-Waals-Oberfläche der Struktur und einer Kugel, die sich über diese Oberfläche bewegt. Der Kugelradius wurde auf den Standardwert 1,4 Å festgelegt, der dem Radius eines idealisierten Wassermoleküls entspricht. Die Berechnung des elektrostatischen Potentials erfolgte für die Liganden anhand der mit semiempirischen Verfahren berechneten ESP-Ladungen (vgl. Kapitel 3.5.3.4). Für die Rezeptorfragmente wurden die Ladungen für die einzelnen Aminosäuren dem MMFF94-Kraftfeld entnommen. Die erneute Zuweisung der Punktladungen war nötig, da bei der notwendigen Konvertierung in das von SYBYL lesbare PDB-Format die ursprünglichen Ladungen des GROMACS-Kraftfelds verloren gingen und in SYBYL nicht verfügbar waren. Für die hier

durchgeführte visuelle Analyse der Ladungsverteilung sind eventuell hieraus resultierende Unterschiede allerdings nicht relevant.

3.6.7 Darstellung molekularer Wechselwirkungsfelder mit GRID

Das von Goodford entwickelte Programm GRID [127] berechnet Wechselwirkungsenergien zwischen einer molekularen Sonde und einem Molekül. Die Sonde wandert dabei entlang den Punkten eines Gitters und erfaßt so schrittweise die Umgebung des Moleküls. Mit dem hieraus resultierenden Wechselwirkungsfeld lassen sich die energetisch günstigen Wechselwirkungsbereiche anhand isoenergetischer Oberflächen darstellen. Die physikochemischen Eigenschaften der Sonden und Molekülatome werden durch einen GRID-internen Parametersatz definiert. Das Programm berechnet hieraus Energien für dispersive und elektrostatische Wechselwirkungen. Über einen dritten Energieterm werden Wasserstoffbrückenbindungen gesondert berücksichtigt.

Das Verfahren wurde hier zur Festlegung von Rezeptorregionen eingesetzt, für die eine Wechselwirkung mit den aromatischen Ringsystemen der Liganden energetisch günstig erscheint. Die Umgebung des Rezeptorfragments wurde hierzu mit der Aryl/Olefin-Sonde vermessen. Der Abstand zwischen Molekül und Gitterbegrenzung betrug in xyz-Richtung jeweils 2 Å, der Abstand der Gitterpunkte 0,5 Å.

3.6.8 Charakterisierung der Bindungstaschen

Für alle 20 Konformationen wurden die Strukturen der Öffnungen und Hohlräume im Rezeptormodell mit SURFNET ermittelt und ihre Volumina berechnet. Taschen mit einem Volumen kleiner als 500 Å³ wurden nicht berücksichtigt, da das Volumen aller Liganden über diesem Wert lag. Zahlreiche kleine Öffnungen und Hohlräume konnten so zur besseren Übersicht bei der visuellen Auswertung entfernt werden. Zwei Beispiele für die Visualisierung der gefunden Volumina finden sich in Abbildung 3.27.

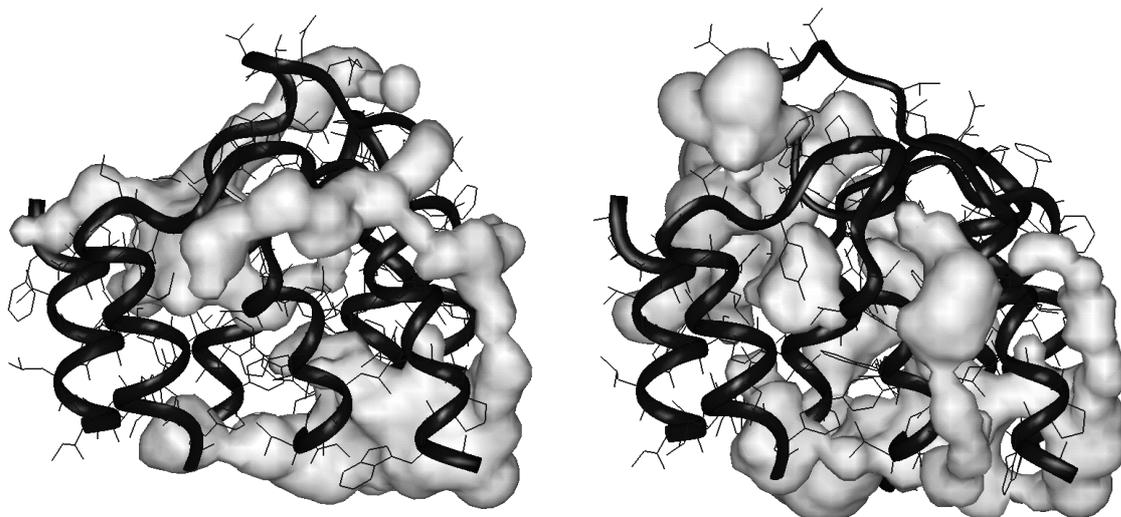


Abbildung 3.27: Beispiele der ermittelten Surfnets-Ergebnisse. Abgebildet sind Struktur 5 (links) und Struktur 16 (rechts).

Als hilfreich bei der Auswertung erwies sich weiterhin die in Abbildung 3.28 gezeigte Darstellung der Ergebnisse, bei der die Lage der verbleibenden Öffnungen jeweils durch ihr Zentrum angezeigt wird. Diese stark vereinfachte Darstellung ermöglichte es, einen ersten Überblick über die Position möglicher Bindungsstellen zu erhalten. Es ließen sich hierbei sechs Regionen unterscheiden. Durch Kreise markiert sind drei Regionen A, B und C, in denen sich die Zentren ausgedehnter Hohlräume befinden, die in fast allen Strukturen auftraten. An diese kompakten Volumina schlossen sich weitere Bereiche mit langgestreckter Form an, die entlang der Furchen in der Proteinoberfläche verliefen. Häufig traten solche Furchen zwischen benachbarten Helices und Loopbereichen auf (siehe Abbildung 3.27). Die Volumina in den Bereichen a und c bestanden fast ausschließlich aus diesen Furchenregionen. Sie bildeten nur in seltenen Fällen eigenständige Volumina. In den Bereichen A,B und C entfernten sich die Furchenregionen weit vom Zentrum und führten so zu der in Abbildung 3.28 erkennbaren Streuung der Markierungen innerhalb einer Region. Teilweise erfolgte über sie aber auch eine Verbindung zweier Volumen unterschiedlicher Regionen, wobei hierbei in allen Fällen Volumina der Regionen A oder B beteiligt waren. Da diese beiden Volumina deutlich größer waren als die der anderen Regionen, lag das aus der Verbindung resultierende Zentrum in den Bereichen A oder B. In 2 Fällen bildeten Öffnungen der Region

A und B ein gemeinsames Volumen. Die hierzu gehörigen Zentren sind in der Region b zusammengefaßt.

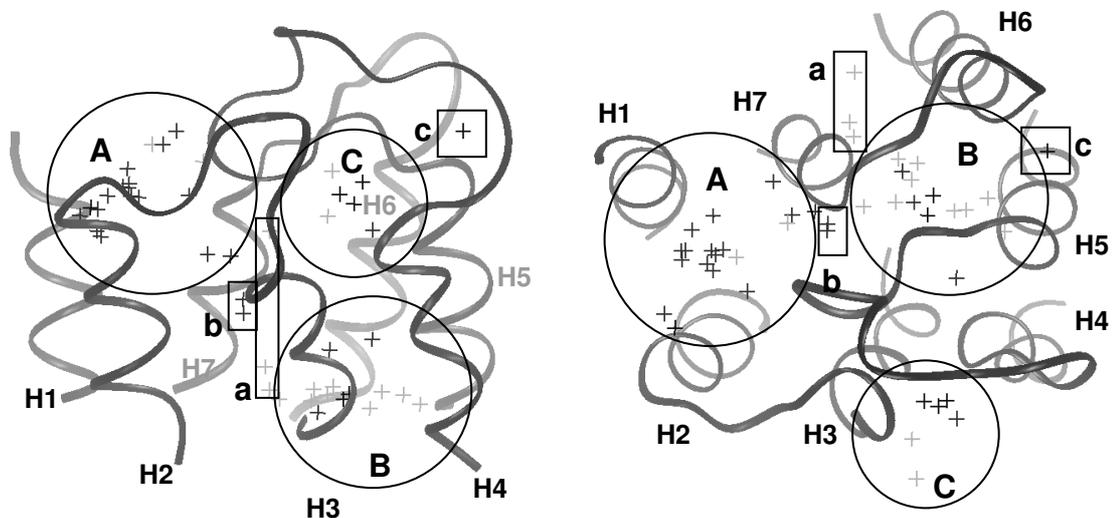


Abbildung 3.28: Lage der Surfnet-Volumina aller Rezeptorstrukturen dargestellt in Struktur 1. Kreuze kennzeichnen das jeweilige Zentrum eines Volumens. Kreise und Rechtecke veranschaulichen die Einteilung in die Regionen A-C bzw. a-c (vgl. Text). Links: Blickrichtung parallel zur Membranebene. Rechts: Blickrichtung aus dem extrazellulären Bereich senkrecht zur Membranebene

Die Furchenregionen wurden bei der weiteren Untersuchung nicht weiter berücksichtigt. Sie bieten den Liganden als potentielle Bindungsstellen nur eine geringe Kontaktfläche und liegen auf der Außenseite des Rezeptors, weit entfernt von Aminosäuren, deren Mutation die Bindung von Gallamin beeinflussen.

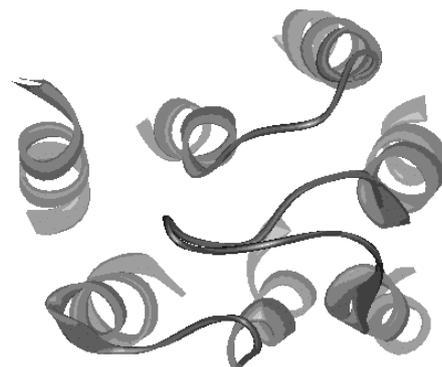
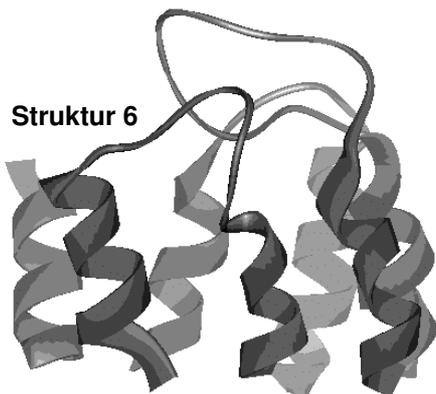
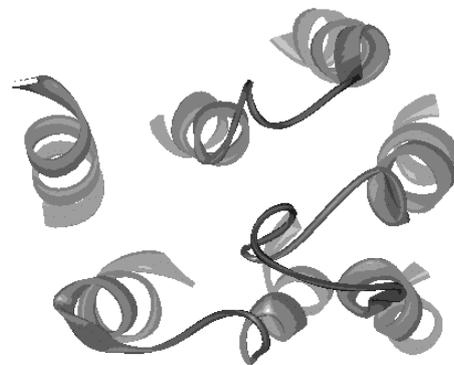
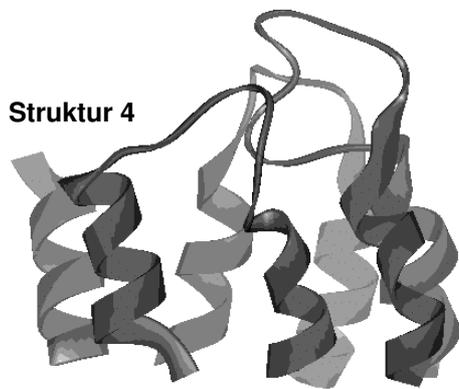
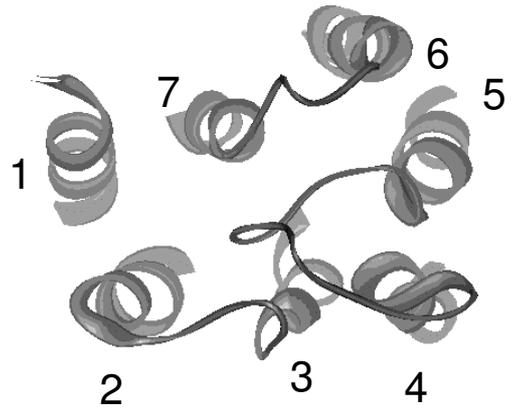
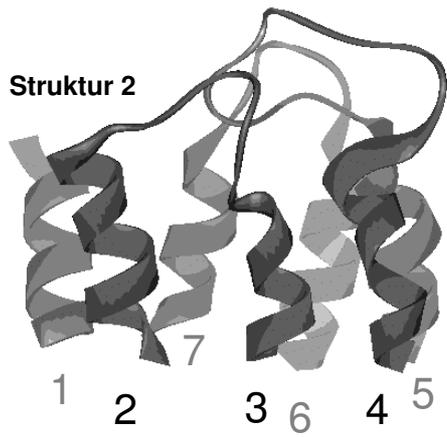
Berücksichtigt man die Ergebnisse der Mutationsstudien allosterischer Liganden, so erscheint Region A als Bindungsstelle am wahrscheinlichsten, da sich an ihren Rändern in allen Konformationen die in Kapitel 3.6.2 aufgeführten Aminosäuren wiederfinden lassen. Läge die allosterische Bindungsstelle dagegen im Bereich C so könnte hierdurch nicht der Einfluß der Aminosäuren Asn419 und Trp422 der Helix 7 erklärt werden. Bei den Taschen in der Region B handelt es sich um Bestandteile der Bindungsstelle der orthosterischen Liganden. Die Taschen sind zum intrazellulären Bereich an der Bruchstelle des Fragments geöffnet, würden also im vollständigen Modell einen Hohlraum darstellen. An ihren Rändern finden sich die vier Aminosäuren Trp99, Asp103,

Trp400 und Tyr526. Für diese über alle Subtypen konservierten Aminosäuren konnte in Mutationsstudien ein Einfluß auf die Bindung sowohl von Agonisten als auch Antagonisten bei Muscarin-Rezeptoren nachgewiesen werden [23].

Zwischen den beiden beschriebenen Taschen finden sich die beiden Tryptophane Trp99 und Trp422. In 15 Konformationen findet sich zwischen diesen beiden Aminosäuren eine schlauchförmige Erweiterung des Hauptvolumens der extrazellulären Bindungstasche, die in Richtung der orthosterischen Bindungsstelle verläuft.

3.6.9 Volumen der Bindungstaschen

Die als allosterische Bindungsstelle postulierten Taschen in Region A finden sich, wenn auch in unterschiedlicher Gestalt, in allen generierten Strukturen. Es mußten daher weitere Auswahlkriterien herangezogen werden, um eine geeignete Konformation für den Aufbau der Rezeptor-Ligand-Komplexe zu finden. Bei der Untersuchung fiel auf, daß Größe und Form dieser Bindungstasche in besonderem Maße durch die unterschiedlichen Konformationen des zweiten extrazellulären Loops beeinflusst wurden. Betrachtet man die in Abbildung 3.29 dargestellten Strukturen so lassen sich gestreckte und gestauchte Konformationen erkennen. Die Streckung des Loops erfolgt in Richtung der Helices 1, 2 und 7 und führt zu einer Verkleinerung des Taschenvolumens. Beispiele hierfür sind die Strukturen 6, 10 und 18. Im Gegensatz hierzu gibt ein gestauchter Loop das Volumen der Tasche frei. Die größte Bindungstasche in diesem Bereich fand sich damit in Struktur 4, bei der der 2. extrazelluläre Loop am stärksten gestaucht war.



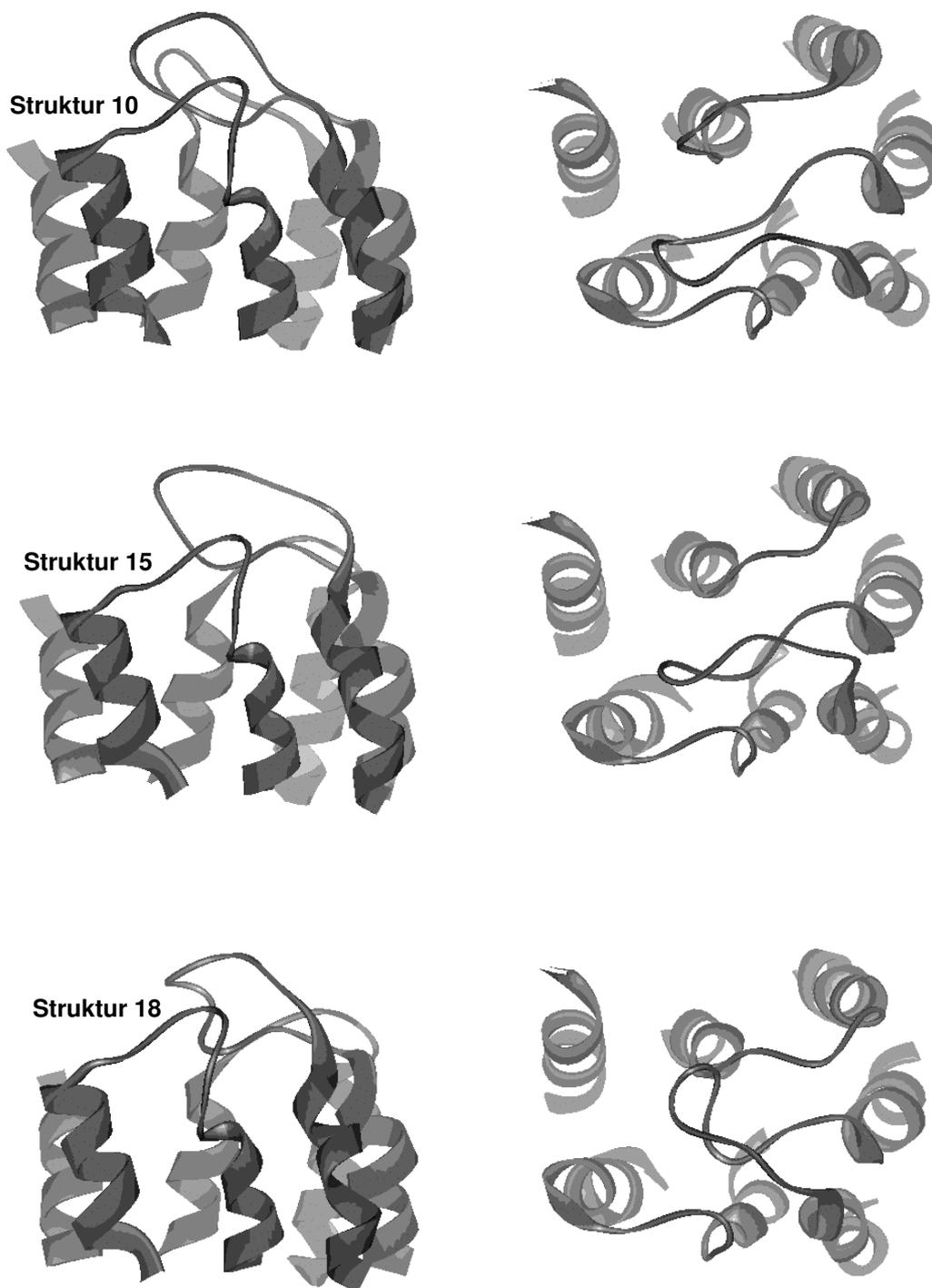


Abbildung 3.29: Sechs Strukturen, die mit der Hochtemperatur-MD-Simulation generiert wurden, veranschaulichen den Einfluß des zweiten extrazellulären Loops auf das Volumen der potentiellen Bindungsstelle zwischen den Helices 1, 2, 3 und 7. Stellvertretend für alle dargestellten Strukturen kennzeichnen die Indices in Struktur 2 die Nummern der einzelnen Helices. Jeweils auf der linken Seite: Blickrichtung parallel zur Membranebene. Jeweils auf der rechten Seite: Blickrichtung aus dem extrazellulären Bereich senkrecht zur Membranebene

3.6.10 Initialmodelle der Ligand-Rezeptor-Komplexe

Abbildung 3.30 zeigt die MOLCAD-Darstellung der elektrostatischen Potentiale für Alcuronium und für Struktur 4. Als mögliche Wechselwirkungspartner der positiv geladenen Zentren im Bereich der quartären Stickstoffe finden sich in Struktur 4 die zwei Carboxylatgruppen der Aminosäuren Glu22 und Glu175 in der ersten transmembranären Helix bzw. im dritten extrazellulären Loop. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der in Kapitel 3.6.3 erwähnten Untersuchung. Auch hier war aufgrund der Ergebnisse eine Beteiligung saurer Aminosäuren an der Bindungsstelle des Alcuroniums vermutet worden. Glu175 ist weiterhin Teil des EDGE-Aminosäurefragments (Glu172-Glu175), dessen Mutation die Bindungsaffinität von Gallamin am M_2 -Rezeptor verminderte (vgl. Kapitel 3.6.2).

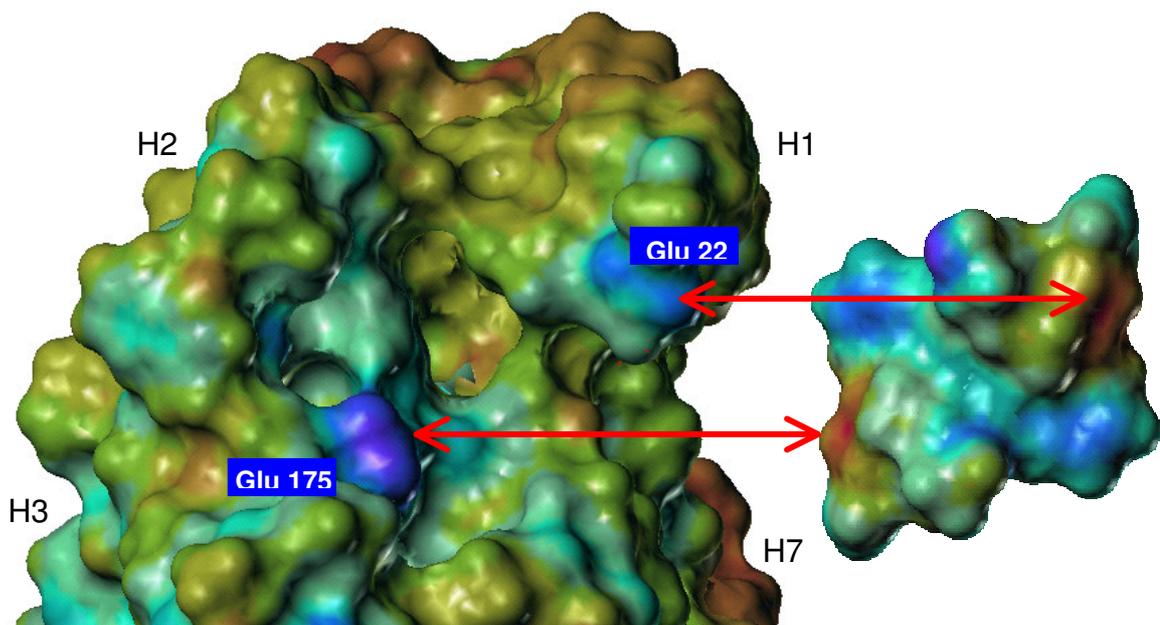


Abbildung 3.30: Darstellung des elektrostatischen Potentials des M_2 -Rezeptors (links) und des Alcuroniums (rechts). Die Pfeile verweisen auf die möglichen Wechselwirkungsbereiche zwischen Rezeptor und Ligand. Die Indices H1,H2,H3 und H7 kennzeichnen die Lage der Helices. Blickrichtung aus dem extrazellulären Bereich senkrecht zur Membranebene

Um günstige Wechselwirkungsbereiche für die aromatischen Ringe der Liganden im Rezeptor zu lokalisieren, wurden für die Struktur 4 GRID-Wechselwirkungsfelder mit der Arylprobe berechnet. Wie Abbildung 3.31 zeigt, konnten zwei der gefundenen Felder mit den Aromaten der Indolinringe des Alcuroniums

zur Deckung gebracht werden. Hierbei konnte auch die zuvor gefundene Orientierung der quartären Ammoniumgruppen zu Glu22 und Glu175 beibehalten werden. Das Einfügen des Alcuroniums erfolgte in dieser Phase per Hand durch Translation und Rotation des gesamten Liganden. Der Raumbedarf der peripheren funktionellen Gruppen mit frei drehbaren Bindungen (Allyl- und Hydroxymethylreste) wurde noch nicht berücksichtigt. Der Ligand liegt im Bereich des für die Struktur 4 berechneten Surfnet-Volumens. In diesem groben Modell traten noch Kontakte mit Seitenketten des Rezeptors auf, Kontakte mit dem Proteinrückgrat und C β -Atomen wurden dagegen nicht gefunden.

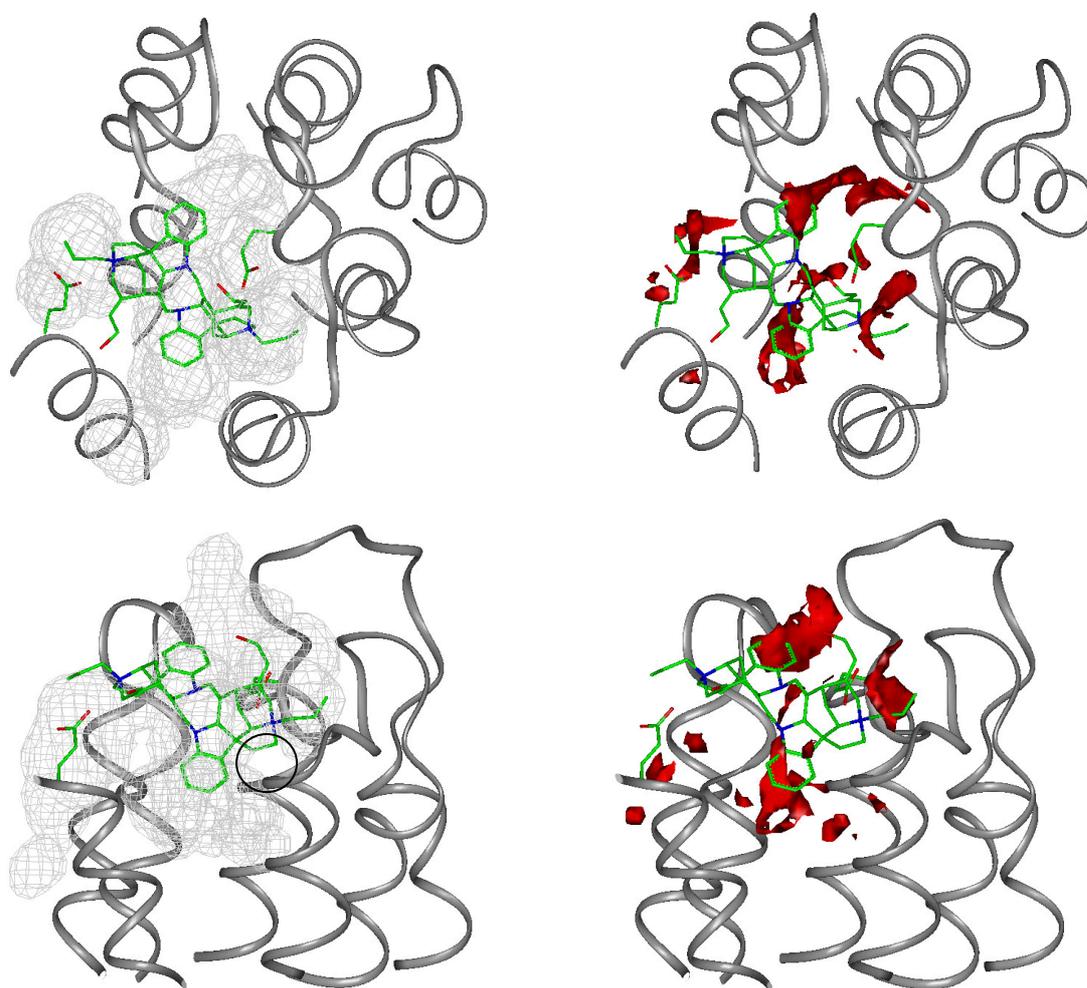


Abbildung 3.31: Initiales Rezeptor-Ligand-Modell für Alcuronium. Die linke Seite zeigt die mit Surfnet berechnete Bindungstasche, die rechte Seite die GRID-Felder für die Arylprobe. Darstellungen oben: Blickrichtung aus dem extrazellulären Bereich senkrecht zur Membranebene. Darstellungen unten: Blickrichtung parallel zur Membranebene. Zusätzlich sind Glu22 (jeweils links in der Helix 1) und Glu175 (jeweils rechts im zweiten extrazellulären Loop) dargestellt. Der Kreis markiert die Lage von Tyr83 (vgl. Text)

In gleicher Weise wurden die Rezeptor-Ligand-Komplexe für Diallylcaracurin V und Tubocurarin aufgebaut (siehe Abbildung 3.32 und Abbildung 3.33). Für das Diallylcaracurin V wurden hierbei ebenfalls die Indolinringe mit den entsprechenden Wechselwirkungsfeldern der GRID-Rechnungen überlagert. Für Tubocurarin konnte zudem eine Entscheidung für eine der beiden energiearmen Konformationen getroffen werden, die bei der Konformationsanalyse gefunden wurden. Nur die energieärmere der beiden Konformationen konnte in einer dem Alcuronium entsprechenden Lage in die Rezeptorstruktur eingepaßt werden, ohne daß energetisch ungünstige Kontakte mit Rückgrat- oder den C β -Atomen der Proteinstruktur beobachtet wurden.

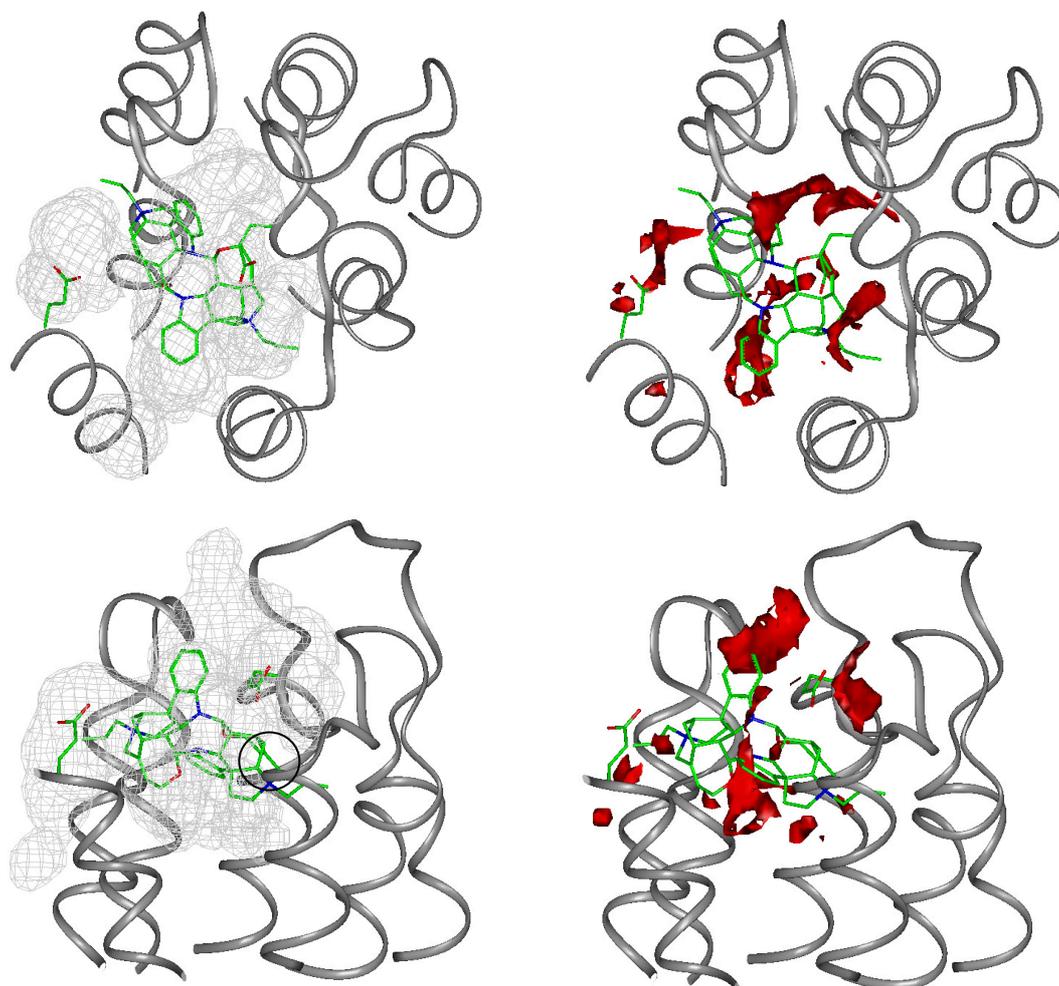


Abbildung 3.32: Initiales Rezeptor-Ligand-Modell für Diallylcaracurin V. Zur Erklärung der Darstellung siehe Abbildung 3.31

In der Seitenansicht der Abbildungen erkennt man im Bereich der Helix 2 einen mit einem Kreis markierten Bereich, in dem das Ringgerüst der Liganden außerhalb des Surfnets-Volumens liegt. Dieser Bereich wird in der Rezeptorstruktur durch die Seitenkette der Aminosäure Tyr83 belegt. Diese Aminosäure war bereits aufgrund ihrer unrealistischen χ_1/χ_2 -Winkelverteilung bei der PROCHECK-Analyse der Struktur 4 aufgefallen. Es war somit anzunehmen, daß die Seitenkettenkonformation von Tyr83 im Rezeptorfragment inkorrekt wiedergegeben wurde. Die Änderung der Konformation, die sowohl die Qualität der Rezeptorstruktur verbesserte, als auch die Bindungstasche vergrößerte, erfolgte bei der Optimierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe (vgl. Kapitel 3.6.12).

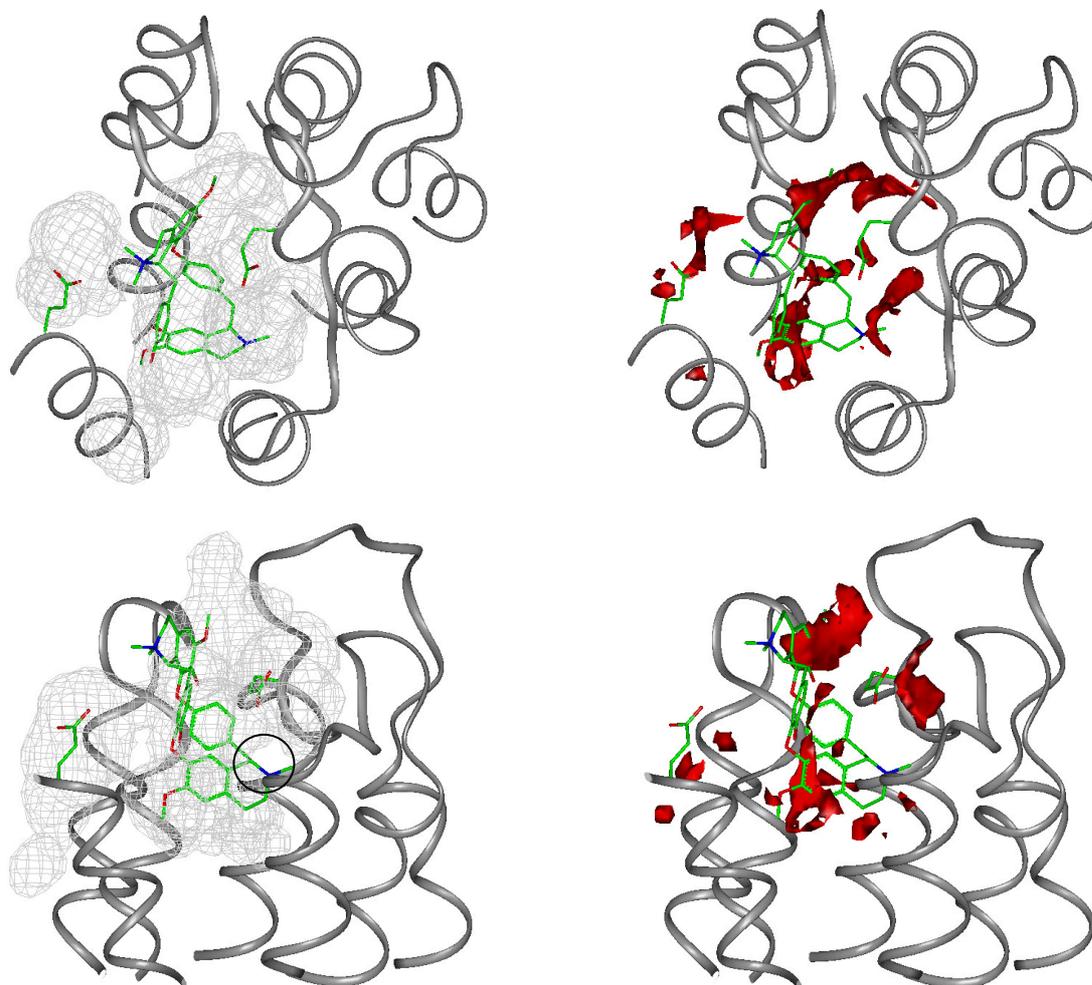


Abbildung 3.33: Initiales Rezeptor-Ligand-Modell für Tubocurarin. Zur Erklärung der Darstellung siehe Abbildung 3.31

Versuche, die Liganden in einer Position einzupassen, die die Wechselwirkung zwischen einer quartären Stickstoffgruppe mit den Tryptophanen Trp99 und Trp422 erlaubte, waren nicht erfolgreich. Es zeigte sich hierbei, daß die Tryptophane in keiner der untersuchten Rezeptorkonformationen für die Liganden wirklich zugänglich waren. So gelang es nicht die Liganden in eine Position zu bringen, die einer quartären Ammoniumgruppe den Kontakt zu beiden Tryptophanen ermöglichte, ohne daß der Ligand deutlich mit dem Volumen des Rezeptors überlappte. In diesem tiefer gelegenen Bereichen verengt sich die Bindungstasche zu einem schmalen Schlauch, so daß das voluminöse Ringgerüst der Liganden, in das die Stickstoffgruppe fest integriert ist, keinen Platz findet.

Für den Aufbau des Rezeptor-W84-Komplexes diente der Komplex mit Alcuronium als Vorbild. W84 wurde entsprechend dem im Kapitel 1.2.5 vorgestellten Pharmakophormodell in der S-Form auf das Alcuronium superpositioniert. Anschließend wurde Alcuronium aus der Struktur entfernt.

3.6.11 Disulfidbrücke im dritten extrazellulären Loop

Bei der Untersuchung der Struktur 4 auf potentielle Bindungsstellen für die allosterischen Modulatoren waren die zwei Cysteine Cys413 und Cys416 im dritten extrazellulären Loop aufgefallen. Ihre Lage zueinander erlaubte die Ausbildung einer Disulfidbrücke, ohne daß eine starke Verzerrung der Loopstruktur zu erwarten gewesen wäre. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, wurde mit dem Rezeptorfragment eine MD-Simulation über 250 ps durchgeführt. Die Einstellungen entsprachen dabei denen in der Hochtemperatur-MD-Simulation, nur die Simulationstemperatur wurde auf 310 K reduziert. Abbildung 3.34 zeigt die Abstände zwischen den C α -Atomen der beiden Cysteine während der MD-Simulation. Die gemessenen Abstände waren vergleichbar mit Abständen, wie sie auch bei der Analyse von Röntgenkristallstrukturen für Disulfidbrücken gefunden wurden [97].

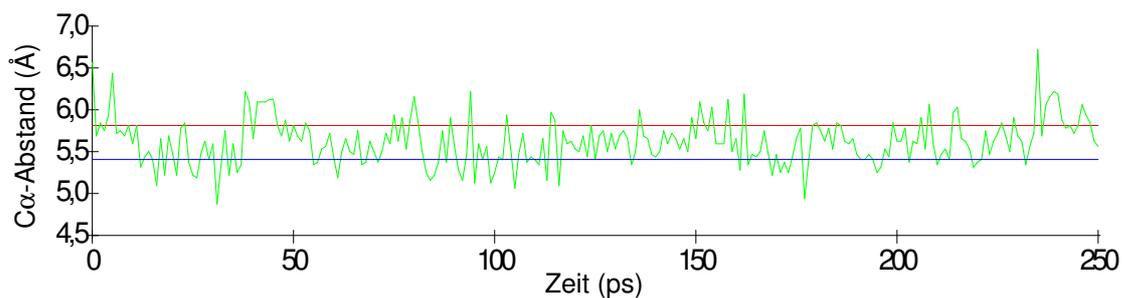


Abbildung 3.34: Abstand der C α -Atome von Cys413 und Cys416 während der MD-Simulation. Die beiden Linien markieren C α -Abstände idealer linkshändiger Konformationen (5,8 Å) und rechtshändiger Konformationen (5,4 Å)

Die Abstände der Seitenkettenatome ließen sich erwartungsgemäß nicht reproduzieren, da hier Abstoßungskräfte die Annäherung der beiden SH-Gruppen verhindern. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Disulfidbrücke in das Rezeptor-Ligand-Modell übernommen. Abbildung 3.35 zeigt die geometrieoptimierte Struktur des dritten extrazellulären Loops mit der Disulfidbrücke im Vergleich zu Strukturen aus der MD-Simulation. Die generierte Disulfidbrücke besaß eine rechtshändige Konformation.

Die beiden Cysteine des dritten extrazellulären Loops sind über alle Muscarin-Rezeptorsubtypen konserviert. Mutationsstudien haben allerdings keinen Hinweis auf die Existenz einer Disulfidbrücke ergeben [18]. Es ist hierbei anzumerken, daß in der MD-Simulation die Struktur auch ohne Disulfidbrücke stabil blieb (siehe Abbildung 3.35). Daher ist es vorstellbar, daß ein Verlust der Disulfidbrücke in den Mutationsstudien keine Auswirkung zeigte. Die mögliche Funktion der Disulfidbrücke bleibt somit unklar.

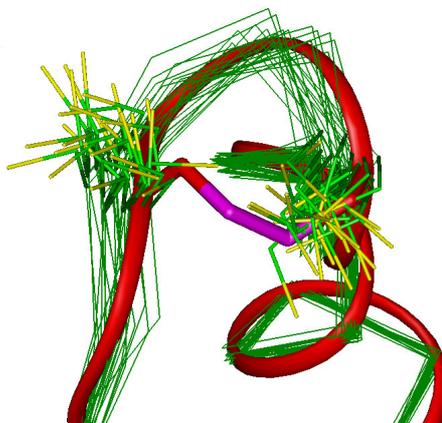


Abbildung 3.35: Strukturen des dritten extrazellulären Loops während der MD-Simulation (C-Atome: grün; Schwefelatome: gelb) und nach Einbau der Disulfidbrücke (Band und C-Atome: rot; Schwefelatome: violett)

3.6.12 Optimierung der Initialkomplexe

Die Initialkomplexe geben die Lage des Liganden im Rezeptor nur näherungsweise wieder. Energetisch ungünstige Kontakte zwischen Ligand und Rezeptor konnten beim manuellen Einpassen nicht genügend berücksichtigt werden. Daher wurden die Geometrien der Komplexe nun in einer MD-Simulation optimiert. Die Simulation wurde mit dem CV-Kraftfeld im Programm INSIGHTII durchgeführt. Die Berechnungen wurden dabei ohne Verwendung expliziter Wassermoleküle durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.3.1), statt dessen wurde eine abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante ($\epsilon=2r$) verwendet. Diese vereinfachte Beschreibung der Proteinumgebung erschien in dieser Phase des Modells im Gegensatz zur Generierung von Loopkonformationen nicht problematisch, da jetzt das Augenmerk auf der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung lag.

3.6.12.1 Kontrolle der CV-Kraftfeldparameter

Das CV-Kraftfeld erschien im Vergleich zum GROMACS-Kraftfeld für die Simulation von Rezeptor-Ligand-Komplexen besser geeignet, da sein Parametersatz auch für die Parametrisierung kleinerer Moleküle ausgelegt ist. Das GROMACS-Kraftfeld ist dagegen speziell zur Berechnung von Proteinen und Membranen entwickelt worden. Parameter für die Liganden müßten hier in teilweise aufwendigen Verfahren abgeleitet werden [128]. Den Liganden wurden in INSIGHT II automatisch Atomtypen zugeordnet. Den Stickstoff-

atomen der Indolinringsysteme bei Alcuronium und Diallylcaracurin V wurden dabei der npl-Atomtyp zugewiesen, der sp²-hybridisierte Stickstoffatome in Fünf- bzw. Sechsringen beschreibt. Zur Überprüfung dieses Parameters wurden mit den beiden Liganden eine MD-Simulation über 100 ps im Vakuum durchgeführt ($\epsilon=2r$). Als Partialladungen wurden die EPS-Ladungen verwendet, die bei der Geometrieoptimierung mit AM1 berechnet wurden (vgl. Kapitel 3.5). Jeweils eine über die gesamte Trajektorie gemittelte Struktur wurde minimiert und mit der AM1-Struktur verglichen. Die Überlagerung der Ringsysteme ergab für keinen Liganden einen RMSD-Wert von über 0,6 Å. Die Parameter des CV-Kraftfelds sind somit in der Lage, die Ligandenstrukturen ausreichend genau wiederzugeben.

3.6.12.2 Protokoll der MD-Simulation

Während der gesamten MD-Simulation wurden die C α -Atome der helikalen Fragmente mit einer hohen Rückstellkraft von 100 kcal/mol·Å² fixiert. C α -Atome des restlichen Rezeptors und das Ringgerüst der Liganden wurden zu Beginn der MD-Simulation über einen Zeitraum von 10 ps mit einer Kraftkonstante von 5 kcal/mol·Å² auf ihrer ursprünglichen Position gehalten. Für die nächsten 10 ps wurde die Rückstellkraft auf 1 kcal/mol·Å² reduziert und dann alle 10 ps um jeweils weitere 0,2 kcal/mol·Å² verringert. In dieser Phase konnten sich Seitenketten des Proteins und die flexiblen Gruppen des Liganden umorientieren, deren Konformation beim manuellen Einpassen unberücksichtigt geblieben waren. Die flexiblen Gruppen umfassen die Hydroxymethylgruppe des Alcuroniums, den Allylrest des Alcuroniums und des Diallylcaracurins V, sowie die Hydroxyl- und Methoxygruppen des Tubocurarin. Nach dieser 60 ps dauernden Phase wurde die MD-Simulation noch 300 ps ohne Rückstellkräfte auf Loopregionen und Liganden fortgesetzt. Am Ende wurde über die letzten 100 ps der MD-Simulation eine Durchschnittsstruktur berechnet und ihre Energie minimiert.

3.6.12.3 Ergebnisse der Optimierung

Bei der Darstellung der Ergebnisse der ersten Optimierung soll hier nur auf die Beobachtungen eingegangen werden, die für die weitere Vorgehensweise

ausschlaggebend waren. Eine vollständige Beschreibung der Rezeptor-Ligand-Komplexe folgt in Kapitel 3.6.14. Allen initialen Rezeptor-Ligand-Komplexen gemeinsam war die Überlappung des Liganden mit Tyr81. Während der Optimierung bildeten sich bei allen Liganden in diesem Bereich eine Wechselwirkung zwischen einem aromatischen Ring des Liganden und demjenigen des Tyrosins aus. Besonders ausgeprägt waren diese Veränderungen beim Diallylcaracurin V. Abstoßungskräfte im Bereich des zweiten extrazellulären Loops führten zu einer Bewegung dieses Liganden in Richtung der ersten Helix. Hierbei kam es gleichzeitig zu einer Drehbewegung, bei der sich ein Indolinringsystem in eine schmale Spalte einpaßte, die unter anderem von Tyr81 gebildet wird. Im Endzustand hatte sich das zweite Indolinringsystem dabei vollkommen aus dem Wechselwirkungsbereich, den er im Initialmodell innehatte, entfernt. Wie in Abbildung 3.36 gezeigt lag er nun im Bereich der Helix 1.

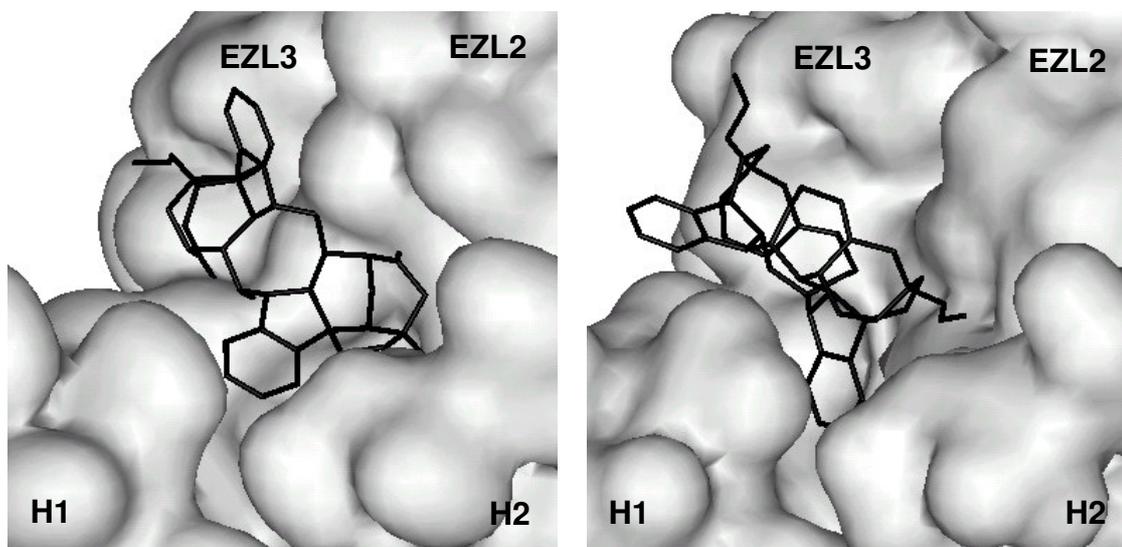


Abbildung 3.36: Lage des Diallylcaracurins V vor und nach der MD-Simulation. H1/2 = Helix 1/2; EZL2/3 = zweiter/dritter extrazellulärer Loop

Die S-Form des W84 blieb während der Optimierung nicht erhalten. Es ist durchaus möglich, daß dies durch energetisch ungünstige Wechselwirkungen der Struktur zu Beginn des MD-Simulation hervorgerufen wurde. Andererseits läßt sich bei dem Liganden während der MD-Simulation eine ähnliche

Entwicklung wie beim Diallylcaracurin V beobachten. Hierbei paßte sich das Phthalimidringsystem in die entsprechende Spalte der Rezeptorkonformation ein. Auch der zweite Phthalimidrest verließ seine ursprüngliche Lage und paßte sich an die Strukturen des Rezeptors an. Insgesamt ist also eine Erhöhung der Wechselwirkungskontakte zwischen dem W84 und M₂-Rezeptor zu beobachten. Gleichzeitig werden dabei intramolekulare Wechselwirkungen der Phthalimidgruppen mit dem aliphatischen Mittelteil des W84 gelöst. Hierdurch kommt es schließlich zur Auflösung der S-Form. Für die Phthalimidgruppe, der ein dem Indolinringsystem der Liganden Diallylcaracurin V und Alcuronium entsprechendes Bindungsverhalten mit dem Rezeptor zeigt, erscheint dieses Ergebnis sinnvoll, denn es erklärt die experimentelle Beobachtung, daß Alcuronium und W84 sich gegenseitig von ihrer Bindungsstelle verdrängen können [26]. Andererseits kann aufgrund dieser Beobachtung aber nicht davon ausgegangen werden, daß die in der Ausgangsstruktur verwendete S-Konformation des Liganden, seiner bioaktiven Konformation entspricht. Aufgrund der extremen Flexibilität des Liganden erscheint es problematisch für die Hexamethoniumgruppe und der zweiten Phthalimidgruppe mittels der hier durchgeführten MD-Simulationen alternative Bindungsstellen aufzuzeigen. Hierfür erscheinen zusätzliche Informationen nötig, wie sie z.B. aus Mutationsstudien abgeleitet werden können. Die Untersuchung des W84-Komplex wurde daher nicht weitergeführt.

3.6.13 Einbau des N-terminalen Fragments

In der veränderten Lage, die das Diallylcaracurin V am Ende der MD-Simulation einnahm, hatte der Aromat des einen Indolinringes, den Wechselwirkungsbereich am extrazellulären Ende der Helix 7 verlassen. Es stellte sich die Frage, ob Diallylcaracurin V eventuell mit Aminosäuren des N-terminalen Endes interagieren kann, um den Energieverlust im Vergleich zu den beiden anderen Liganden auszugleichen. Auf die Modellierung des 20 Aminosäuren umfassenden N-Terminus des M₂-Rezeptors war bis jetzt verzichtet worden, da Mutationsstudien bei Gallamin keinen Einfluß von Aminosäuren in diesem Bereich nachweisen konnten. Aufgrund der Lage der hier untersuchten Liganden im Rezeptormodell, erschien aber eine Wechselwirkung mit dem N-Terminus möglich.

Die Modellierung des N-terminalen Endes beschränkte sich auf die sechs Aminosäuren, die direkt an die transmembranäre Helix angrenzen (Thr15 – Thr20). Das Fragment wurde in gestreckter Form in den jeweiligen Rezeptor-Ligand-Komplex integriert, wobei die Aminogruppe des Thr15 acetyliert wurde. Anhand dieser Ausgangsstruktur wurden jeweils 50 Konformationen des N-terminalen Fragments mit einem Simulated-Annealing-Protokoll generiert. Folgende Einstellungen wurden dabei verwendet:

- Simulationsdauer: 50 Zyklen (50 x 10 ps)
- Heizphase: 2 ps bei 800 K
- Abkühlphase: 4 ps auf 310 K und weitere 4 ps bei 310 K
- Abkühlfunktion: exponentielle Abnahme der Temperatur

Die MD-Simulation beschränkte sich auf das N-terminale Fragment, während die Struktur des restlichen Ligand-Rezeptor-Komplexes fixiert wurde. ω -Winkel wurden bis auf Pro17 in der trans-Stellung gehalten. Die Geometrie jeder Struktur wurde anschließend über 100 Iterationen mit dem *steepest descent* Verfahren optimiert.

3.6.13.1 Diallylcaracurin V

Abbildung 3.37 faßt die Ergebnisse der MD-Simulation zusammen. Von den generierten Strukturen zeigten die drei energieärmsten Strukturen die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen dem Tyr18 und dem Aromaten des Indolinringsystems. Für die weiteren Berechnungen wurde hiervon die Struktur mit der zweitniedrigsten Energie ausgewählt (a), da bei der energieärmsten Struktur (c) das N-terminale Ende in die Membran ragen würde.

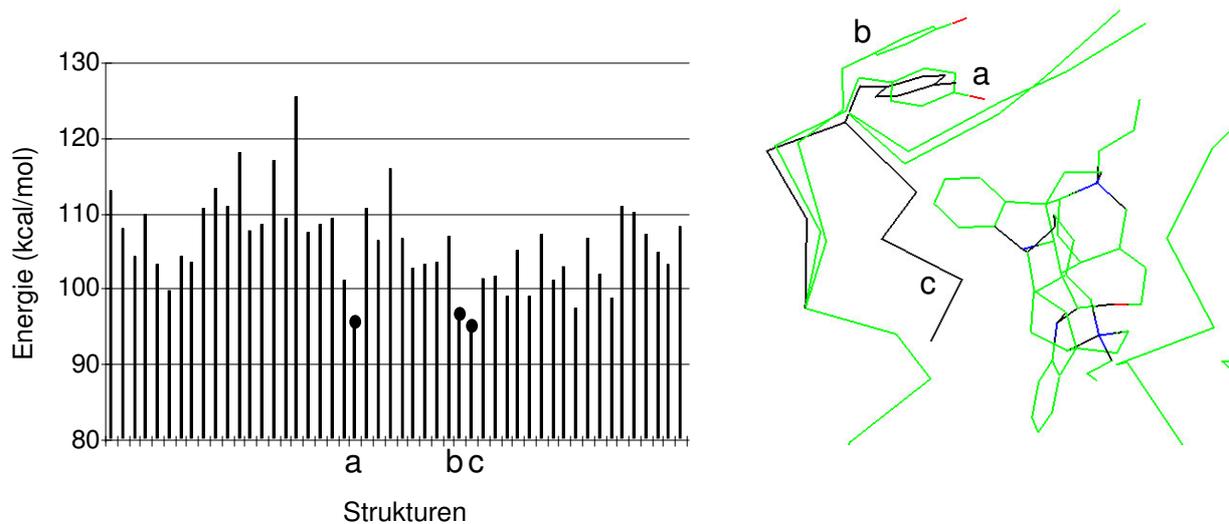


Abbildung 3.37: Ergebnis der Generierung N-terminaler Fragmente für das Diallylcaracurin V. Linke Seite: Übersicht der Energien der generierten Strukturen. Die drei energieärmsten Strukturen (a-c) wurden mit einem gefüllten Kreis hervorgehoben. Rechte Seite: Ausschnitt aus dem Rezeptor-Ligand Komplex zeigt die drei energieärmsten Fragmente des N-Terminus.

3.6.13.2 Alcuronium

Auch beim Rezeptor-Alcuronium-Komplex konnten zwei Konformationen des N-Terminus gefunden werden, bei denen Tyr18 mit einem der Indolinringsysteme in Wechselwirkung treten kann. Die energieärmste Struktur (b) wurde in das Modell integriert.

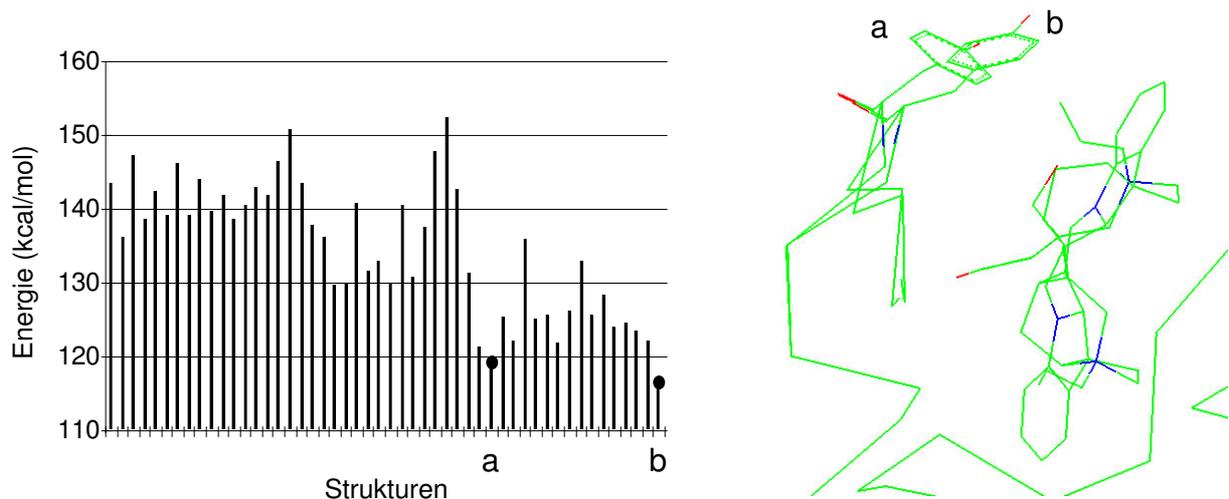


Abbildung 3.38: Ergebnis der Generierung N-terminaler Fragmente für das Alcuronium. Zur Erklärung der Darstellung siehe Abbildung 3.37

3.6.13.3 Tubocurarin

Im Unterschied zu den beiden vorangegangenen Liganden, war es mit der Methode nicht möglich einen vergleichbaren Wechselwirkungskomplex zwischen Tyr18 und Tubocurarin zu generieren. Für den Komplex mit dem am tertiären Stickstoff R konfigurierten Tubocurarin konnte die in Abbildung 3.39 dargestellte Konformation des N-Terminus viermal in den generierten Strukturen gefunden werden. Im Diagramm in Abbildung 3.39 fanden sich im Vergleich zu diesen vier Strukturen nur zwei energieärmere Strukturen. Bei beiden ragte das N-terminale Ende, wie bei Struktur a des Caracurins in den Membranbereich. In den Rezeptor-Ligand-Komplex wurde somit die energieärmste der vier Strukturen eingebaut.

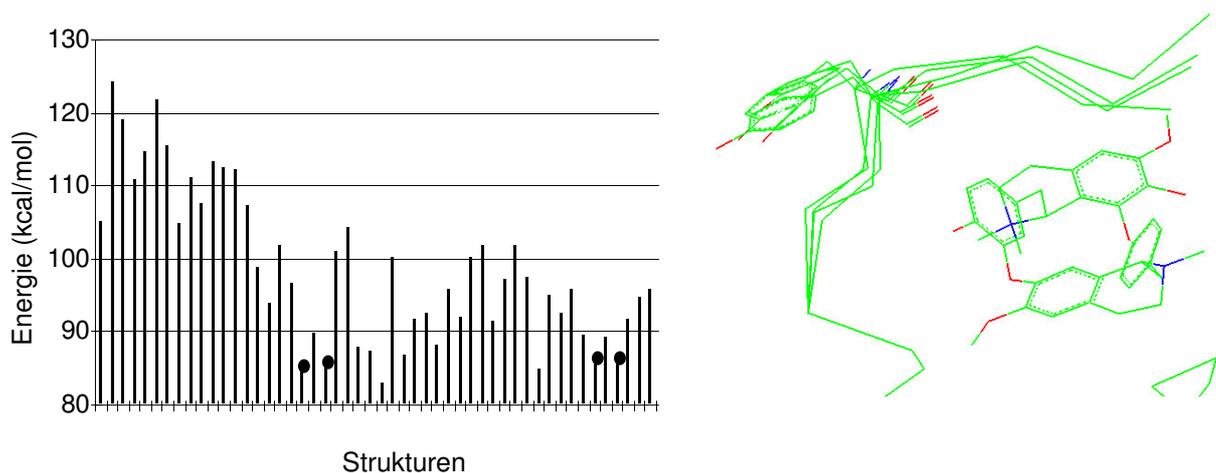


Abbildung 3.39: Ergebnis der Generierung N-terminaler Fragmente für Tubocurarin. Zur Erklärung der Darstellung siehe Abbildung 3.37

Für den zweiten Rezeptor-Tubocurarin-Komplex, bei dem das Tubocurarin am tertiären Stickstoff S konfiguriert ist, konnte eine ähnliche Struktur gefunden werden. Wie Abbildung 3.40 zeigt, besteht der grundlegende Unterschied nur in der Lage des Acetylrests an Thr15.

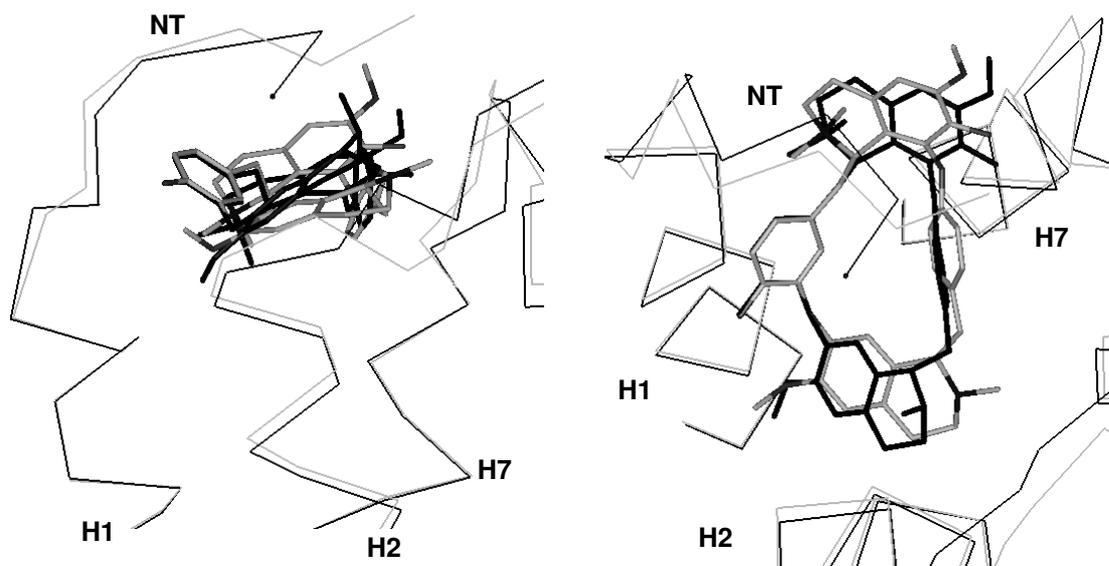


Abbildung 3.40: Vergleich der beiden N-terminalen Enden, die für die Rezeptor-Tubocurarin-Komplexe ausgewählt wurden. Der Komplex mit dem am tertiären Stickstoff S-konfigurierten Tubocurarin ist schwarz, die entsprechend R-konfigurierte Form grau dargestellt. Links: Blickrichtung parallel zur Membranebene. Rechts: Blickrichtung aus dem extrazellulären Bereich senkrecht zur Membranebene. H = Helix; NT = N-Terminus

3.6.14 Zweite Optimierung

Wiederum wurde eine Optimierung der Geometrie des Rezeptor-Ligand-Komplexes an die Modellierung angeschlossen. Die Durchführung entsprach hierbei der in Kapitel 3.6.12 beschriebenen Vorgehensweise. Am Ende wurde wiederum über die letzten 100 ps der MD-Simulation eine Durchschnittsstruktur berechnet und ihre Energie minimiert. Zu diesem Zeitpunkt der MD-Simulation hatten sich alle drei Rezeptor-Ligand-Komplexe stabilisiert. Im Folgenden sollen die Ergebnisse für die einzelnen Liganden beschrieben werden.

3.6.14.1 Alcuronium

Im initialen Rezeptor-Ligand-Komplex waren die Indolinringe des Alcuroniums anhand der GRID-Felder ausgerichtet worden, in denen eine günstige Wechselwirkungsenergie für diese Struktur erwartet werden konnte. Im Bereich der beiden Indolinringsysteme finden sich nun entsprechend lipophile Aminosäuren, die mit dem Ligand in Wechselwirkung treten können (siehe Abbildung 3.41). Ein Indolin liegt an der Öffnung der Bindungstasche zum extrazellulären Raum. Neben dem Tyr18 des N-terminalen Endes finden sich hier Aminosäuren im zweiten und dritten extrazellulären Loop. Der zweite Wechselwirkungsbereich

liegt tiefer im Rezeptor, in Höhe der extrazellulären Enden der transmembranären Helices. Entsprechend sind auch die Aminosäuren, die hier in Wechselwirkung mit dem Liganden stehen, Bestandteile der transmembranären Helices 1,2 und 7. Das Indolin steht in diesem Fall senkrecht auf dem Phenylring des Tyr83. Untersuchungen an Röntgenkristallstrukturen und theoretische Untersuchungen haben gezeigt, daß eine solche *T-shaped*-Konformation im Vergleich zu einer planaren Anordnung der Ringe ebenfalls energetisch günstig ist [129].

Während der MD-Simulation änderte sich die Orientierung der beiden quartären Stickstoffgruppen zu Glu175, das nun zwischen den beiden positivgeladenen Zentren liegt. Es bleibt aber in direktem Kontakt mit dem Liganden. Beim Thr420 trat eine Wechselwirkung des Methylrestes der Seitenkette mit dem Indolinringsystem auf.

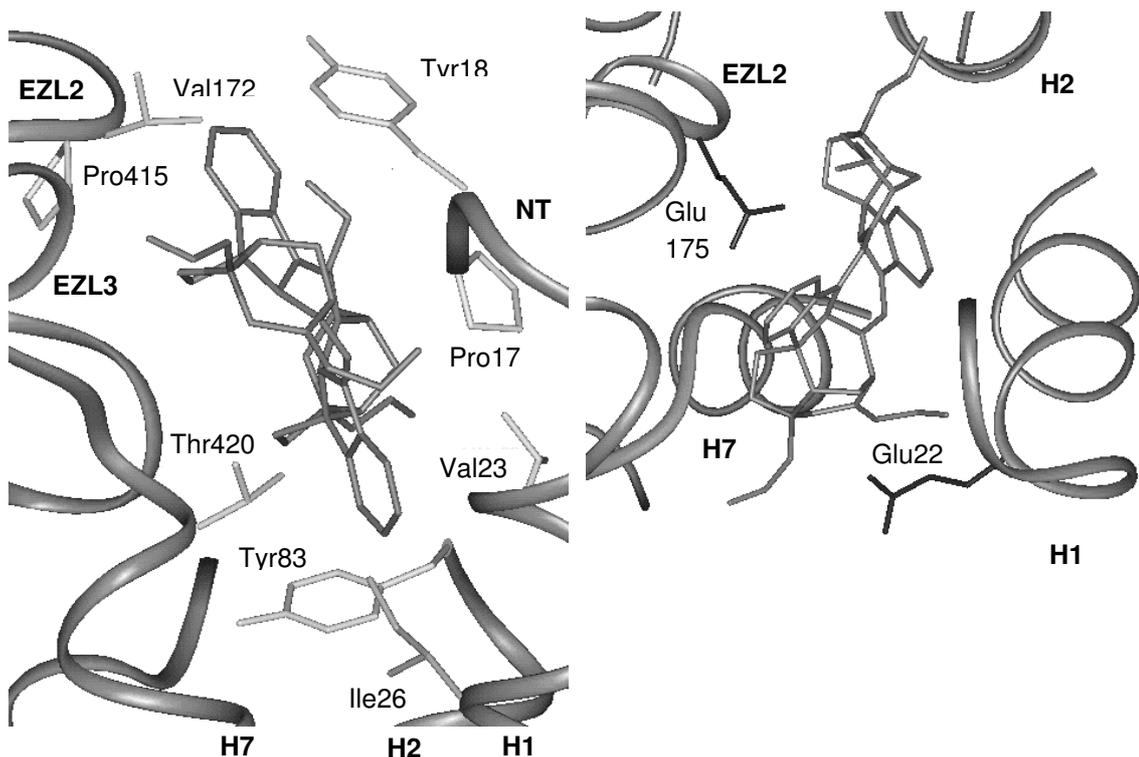


Abbildung 3.41: Wechselwirkung zwischen M₂-Rezeptor und Alcuronium. Die Wechselwirkungen mit lipophilen Aminosäuren sind auf der linken Seite, die Wechselwirkungen mit Glu22 und Glu175 auf der rechten Seite dargestellt. (EZL = extrazellulärer Loop; H = Helix; NT = N-Terminus)

3.6.14.2 Diallylcaracurin V

Wie beim Alcuronium lassen sich beim Diallylcaracurin V Wechselwirkungsbereiche für beide Indolinringe finden. Wie Abbildung 3.42 zeigt, findet sich der Bindungsbereich zwischen den Helices 1,2 und 7 auch beim Diallylcaracurin V wieder. Bis auf Ile26 stehen hier auch die gleichen lipophilen Aminosäuren wie beim Alcuronium in Wechselwirkung mit dem Liganden. Der zweite Bindungsbereich liegt dagegen abweichend vom Alcuronium im Bereich der Helix 1 und des N-terminalen Endes. Nur Tyr18 findet sich hier ebenfalls als Wechselwirkungspartner. Die Aminosäure Val23 ist im Falle des Dimethylcaracurin V Bestandteil beider Wechselwirkungsbereiche. Pro415 ist zwar wie bei Alcuronium Wechselwirkungspartner des Liganden, interagiert aber hier mit dem Ring F. Obwohl sich die Lage des Liganden im Vergleich zur Ausgangsstruktur stark verändert hat, blieb die Orientierung der beiden quartären Stickstoffgruppen in bezug auf Glu22 und Glu175 erhalten.

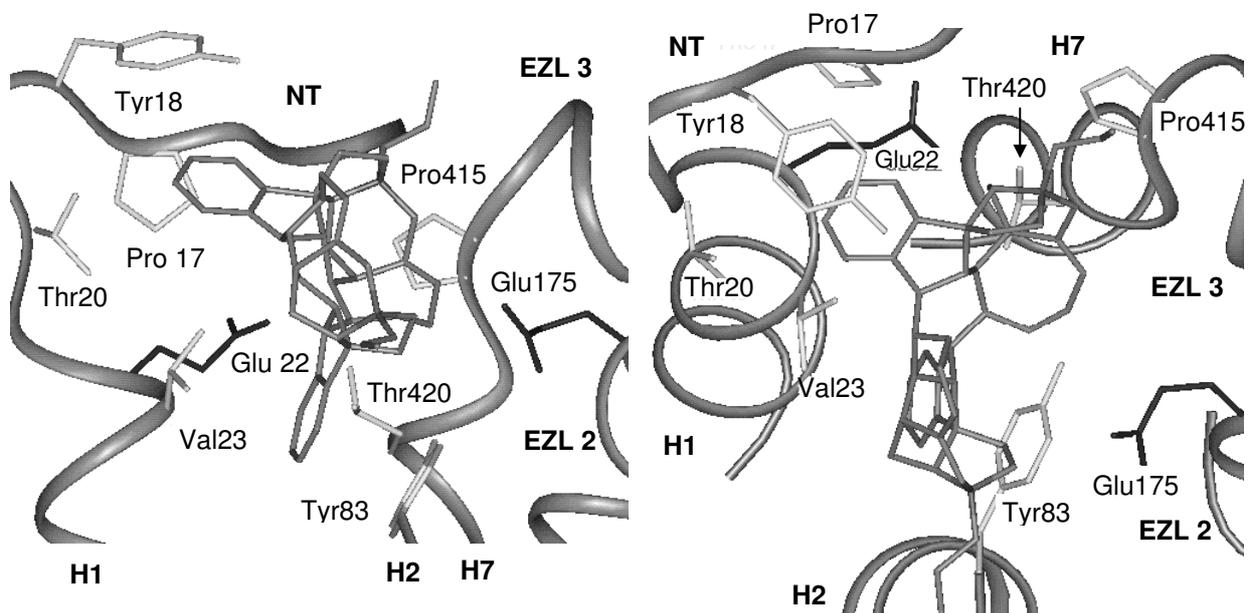


Abbildung 3.42: Wechselwirkung zwischen M₂-Rezeptor und Diallylcaracurin V. (EZL = extrazellulärer Loop; H = Helix; NT = N-Terminus). Das extrazelluläre Ende von Helix 2 nach Tyr 83 ist übersichtlichkeitshalber nicht dargestellt.

3.6.14.3 Tubocurarin

Unabhängig von der Konfiguration am tertiären Stickstoff zeigte Tubocurarin in beiden Rezeptor-Ligand-Komplexen die gleichen Wechselwirkungspartner. Die in Abbildung 3.43 gezeigten Ergebnisse für das R-konfigurierte Tubocurarin gelten in gleicher Weise auch für das S-konfigurierte Tubocurarin. Im Vergleich zu den anderen Liganden besitzt Tubocurarin keine endständigen Aromaten, die sich in die oben beschriebenen Taschen einpassen könnten. Die lipophilen Aminosäuren, die den Liganden umgeben, verteilen sich vielmehr auf die vier aromatischen Ringe des Liganden. Thr15 und Val23 interagieren mit Ring C, Tyr83 mit Ring D, Pro418 mit Ring F und Thr402 mit Ring A. Auch in diesem Fall liegen Glu22 und Glu175 im Bereich der positiv geladenen quartären bzw. tertiären Ammoniumgruppe.

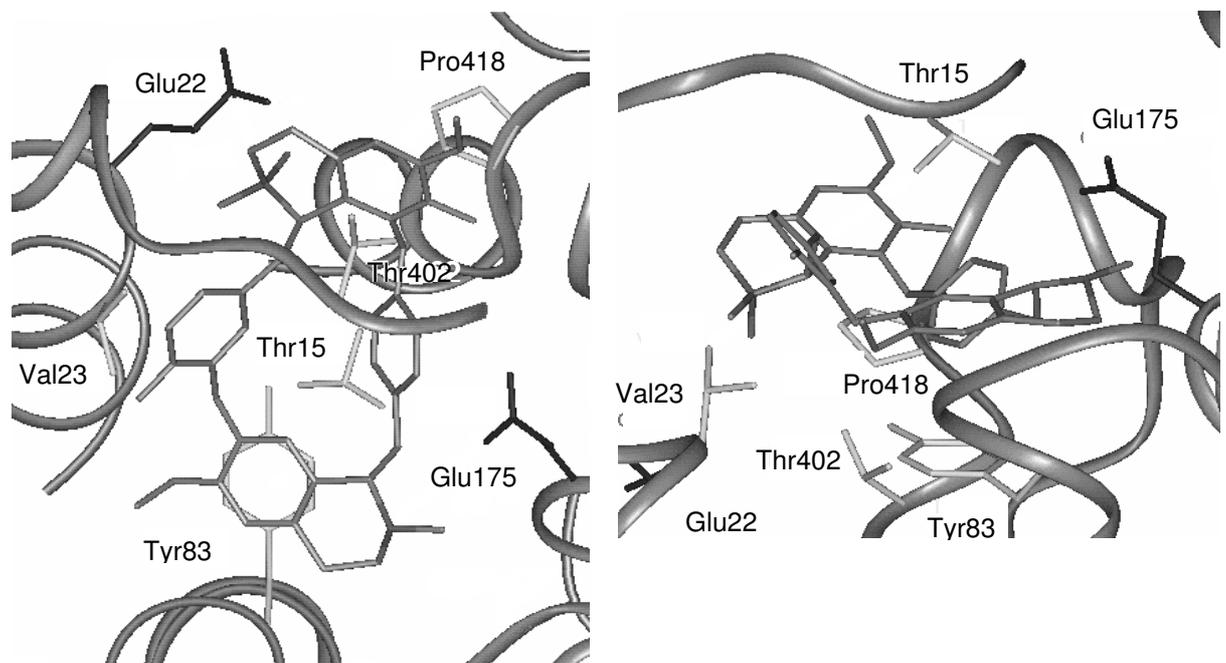


Abbildung 3.43: Wechselwirkung zwischen M₂-Rezeptor und Tubocurarin. (EZL = extrazellulärer Loop; H = Helix; NT = N-Terminus)

3.6.15 PROCHECK-Analyse

Tabelle 3.10 zeigt die PROCHECK-Ergebnisse der drei Rezeptor-Ligand-Komplexe, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden. Bis auf die ω -Winkel besitzen alle G-Faktoren Werte > -1 . Auf die Problematik der ω -Planarität im

Zusammenhang mit der Verwendung des CV-Kraftfelds wurde bereits in Kapitel 3.3.3.1 bei der PROCHECK-Analyse des Sieben-Helix-Modells verwiesen. Im Vergleich zu den dort erhaltenen Werten ist eine leichte Verbesserung zu erkennen. Eine positive Entwicklung zeigte sich bei der χ_1 -/ χ_2 -Winkelverteilung, im Vergleich zur PROCHECK-Analyse der Rezeptorfragmente (vgl. Kapitel 3.4.5.4). In allen drei Strukturen liegen die G-Faktoren für die χ_1 -/ χ_2 -Winkelverteilung nun unter -0,5. Bei der Φ -/ Ψ -Winkelverteilung liegt im Rezeptor-Alcuronium-Komplex eine Aminosäure (Ile164), bei den anderen beiden Rezeptor-Ligand-Komplexen je zwei Aminosäuren (Phe163 und Ile164) im unerlaubten Bereich. Die Position, an der diese verzernte Rezeptorgeometrie gefunden wurde, liegt am Übergangsbereich von der transmembranären Helix 4 (Phe163) zum zweiten extrazellulären Loop (Ile164) und damit räumlich weit entfernt von der Bindungsstelle der allosterischen Modulatoren. Auch in Hinblick auf die beobachtete hohe Flexibilität des bei Ile164 beginnenden zweiten extrazellulären Loops erscheint ein Einfluß auf die Geometrie der Bindungsstelle wenig wahrscheinlich.

Tabelle 3.10 : Ergebnisse der PROCHECK-Analyse für die Proteinstruktur der drei Rezeptor-Ligand-Komplexe

Ligand G-Faktor	Alcuronium	Diallylcaracurin V	Tubocurarin
Φ -/ Ψ -Winkelverteilung	-0,60	-0,46	-0,40
χ_1 -/ χ_2 -Winkelverteilung	-0,45	-0,41	-0,42
χ_1 -Winkel	0,03	-0,04	0,07
χ_3 -/ χ_4 -Winkel	0,68	0,72	0,67
ω -Winkel	-1,24	-1,18	-1,15
Bindungslängen Proteinrückgrat	-0,8	-0,81	-0,8
Bindungswinkel Proteinrückgrat	-0,54	-0,6	-0,6

3.6.16 Berechnung der Bindungsenergien

Für einen nichtkovalenten Bindungsprozeß kann die freie Bindungsenthalpie ΔG in eine elektrostatische und eine unpolare Komponente unterteilt werden.

$$\Delta G = \Delta G_{ele} + \Delta G_{npl} \quad (3.2)$$

Ein Teilaspekt von ΔG , nämlich die Wechselwirkungsenergie zwischen Ligand und Rezeptor, läßt sich wiederum getrennt in den elektrostatischen und den unpolaren Anteil direkt aus dem Modell ableiten. Die Berechnung basiert auf den empirischen Kraftfeldtermen und -parametern für die Beschreibung nichtkovalenter Wechselwirkungen, wie sie auch beim Aufbau des Komplexes berücksichtigt wurden. Der unpolare Anteil wird durch die Berechnung der van der Waals-Wechselwirkungen (E_{vdW}) anhand des Lennard-Jones-Potentials (Gleichung (3.3)), der elektrostatische Anteil (E_C) durch das Coulomb-Potential (Gleichung (3.4)) beschrieben.

$$E_{vdW} = \sum \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (3.3)$$

A_{ij} Koeffizient des repulsiven Terms für das Atompaar ij

B_{ij} Koeffizient des attraktiven Terms für das Atompaar ij

r_{ij} Abstand der Atome i und j

$$E_C = \sum \frac{1}{\epsilon} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (3.4)$$

q_i, q_j Partiaalladung Atom i und Atom j

ϵ Dielektrizitätskonstante

r_{ij} Abstand der Atome i und j

Die Wechselwirkungsenergien $\Delta E_{vdW,LR}$ bzw. $\Delta E_{C,LR}$ zwischen Ligand und Rezeptor ergeben sich in beiden Fällen aus der Differenz zwischen der Summe nichtkovalenter Wechselwirkungsenergien von ungebundenem Liganden und

freiem Rezeptor und den nichtkovalenten Wechselwirkungsenergien des Rezeptor-Ligand-Komplexes:

$$\Delta E_{vdW,LR} = (E_{vdW,L} + E_{vdW,R}) - E_{vdW,K} \quad (3.5)$$

$E_{vdW,L}, E_{vdW,R}, E_{vdW,K}$ van der Waals-Wechselwirkungen in Ligand (L), Rezeptor (R) und im Ligand-Rezeptor-Komplex (LR)

$\Delta E_{vdW,LR}$ van der Waals/-Wechselwirkungsenergie zwischen Ligand und Rezeptor

$$\Delta E_{C,LR} = (E_{C,L} + E_{C,R}) - E_{C,K} \quad (3.6)$$

$E_{C,L}, E_{C,R}, E_{C,K}$ van der Waals-Wechselwirkungen in Ligand (L), Rezeptor (R) und im Ligand-Rezeptor-Komplex (LR)

$\Delta E_{C,LR}$ van der Waals/-Wechselwirkungsenergie zwischen Ligand und Rezeptor

Unberücksichtigt bleibt bei dieser Darstellung jedoch der Einfluß der wäßrigen Umgebung, also die aus der Bindung resultierende Energieänderung, wenn Ligand und Rezeptor einen Teil ihrer Solvathülle einbüßen. Diese Effekte konnten im Falle der von uns postulierten Bindungsstelle für die allosterischen Modulatoren nicht einfach vernachlässigt werden, da diese zum extrazellulären Raum hin geöffnet ist. Da das Modell selbst nicht über eine Solvathülle aus expliziten Wassermolekülen verfügte, wurden Verfahren bzw. Vorstellungen berücksichtigt, die das Lösungsmittel als kontinuierliches Medium beschreiben, das Rezeptor und Ligand umgibt. Die Solvatationseffekte lassen sich ebenfalls getrennt in einen elektrostatischen und einen nichtpolaren Anteil berechnen.

3.6.16.1 Elektrostatischer Anteil der Bindungsenergie

Abbildung 3.44 beschreibt die von Gilson und Honig entwickelte Methode zur Berechnung des elektrostatischen Anteils der freien Bindungsenthalpie (ΔG_{ele}), die auch in unserer Arbeit verwendet wurde [129]. Hierbei wurde der Bindungsprozeß in einzelne Schritte gegliedert, bei denen die Energieänderungen einem bestimmten Anteil von ΔG_{ele} entsprechen. $\Delta G_{C,LR}$ wird durch den elektrostatischen Anteil der nichtkovalenten Bindungsenergie $\Delta E_{C,LR}$ wiedergegeben (vgl. Gleichung (3.6)). Die ΔG_S -Komponenten beschreiben die

Energieänderung, die Ligand ($\Delta G_{S,L}$), freier Rezeptor ($\Delta G_{S,R}$) und der Ligand-Rezeptor-Komplex ($\Delta G_{S,LR}$) erfahren, wenn sich die Dielektrizitätskonstante ihrer Umgebung erhöht.

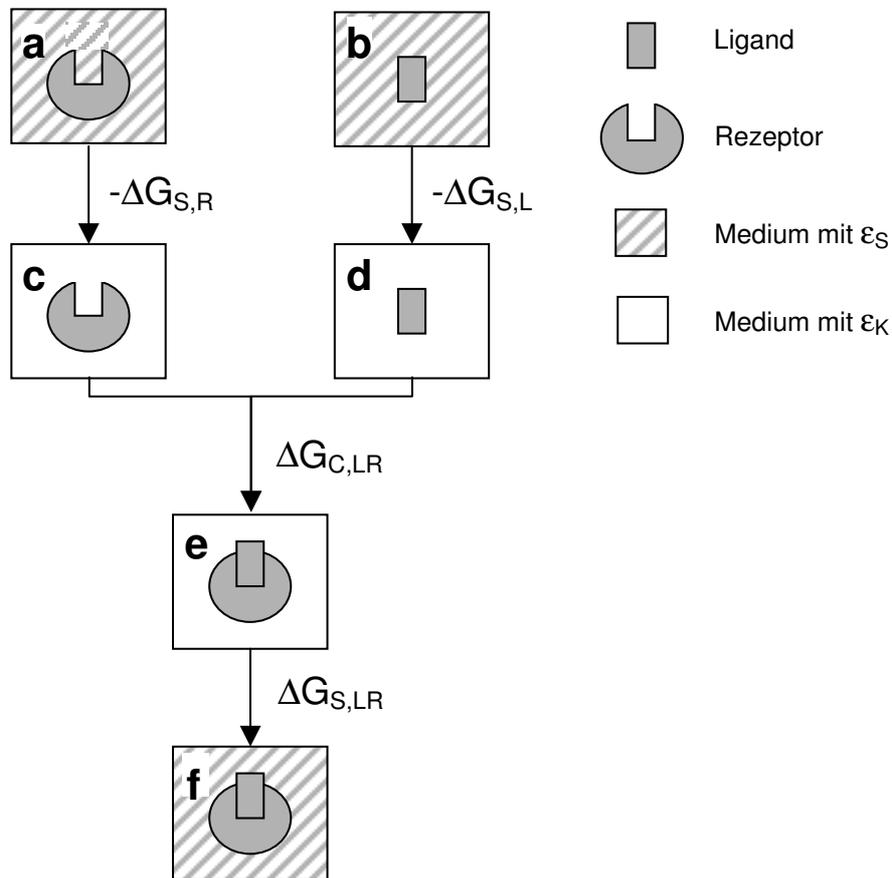


Abbildung 3.44: Schematische Darstellung der Methode zur Berechnung von ΔG_{ele}

Hierbei beschreibt ϵ_S die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und ϵ_K die Dielektrizitätskonstante im Inneren des Rezeptors bzw. des Liganden. ΔG_{ele} ergibt sich entsprechend dem Schema aus Gleichung (3.7) :

$$\Delta G_{ele} = -(\Delta G_{S,L} + \Delta G_{S,R}) + \Delta G_{C,LR} + \Delta G_{S,LR} \quad (3.7)$$

Für die Berechnung des elektrostatischen Anteils der Bindungsenergie (ΔG_{ele}) wurde das Programm DelPhi verwendet, das die Berechnung von ΔG_{S} über die Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung mit Hilfe einer finiten-Differenz-Methode (FDPB-Methode) ermöglicht [129]. Bei diesem Verfahren wird die Ladungsverteilung wie sie das Molekülmodell anhand der Partialladungen auf den Atomkoordinaten beschreibt, auf Punkte eines regelmäßigen Gitters übertragen, das um das zu untersuchende Molekül gelegt wird. Für den Gitterbereich innerhalb der Moleküle (Ligand, Rezeptor und Ligand-Rezeptor-Komplex) wurde eine Dielektrizitätskonstante von 4, für die Gitterpunkte in der wässrigen Umgebung eine Dielektrizitätskonstante von 80 verwendet. Bei allen Rechnungen wurde eine sogenannte Fokussierung vorgenommen. Die Ausmaße für das initial verwendete kubische Gitter betragen hierbei auf jeder Seite 56 Punkte mit einem Abstand von 1 Å. Die endgültige Berechnung wurde mit einem Gitter von 93 Punkten und 0.25 Å durchgeführt. Für die Werte $\Delta G_{\text{S,L}}$, $\Delta G_{\text{S,R}}$ und $\Delta G_{\text{S,K}}$ wurden sogenannte korrigierte Solvatationsenergien verwendet, die für die Systeme a,b und f der Abbildung 3.44 ermittelt wurden. Es handelt sich hierbei um die Energie, die aufgewendet werden muß, um das Molekül aus einer Umgebung mit seiner ‚inneren‘ Dielektrizitätskonstante $\epsilon_{\text{K}}=4$ in eine Umgebung mit $\epsilon_{\text{S}}=80$ zu überführen. Das hierbei von DelPhi verwendete Verfahren liefert genauere Werte, als sie durch die Differenzbildung der totalen Gitterenergien (siehe Abbildung 3.44: c-a, d-b und f-e) erhalten werden können [130]. Allerdings konnte mit dieser Methode die Ionenstärke des Lösungsmittels nicht berücksichtigt werden. Dieser Parameter der Gleichung wirkt sich zwar auf ΔG_{S} und damit auch auf ΔG_{ele} aus, zeigt aber keinen Einfluß auf die Werte von $\Delta \Delta G_{\text{ele}}$, die zum Vergleich der Bindungsenergien der allosterischen Modulatoren berechnet wurden. So konnten Shen und Wendoloski für verschiedene Rezeptor-Ligand-Komplexe zeigen, daß bei einer Variation der Ionenstärke über einen Bereich von drei Zehnerpotenzen, die berechneten $\Delta \Delta G_{\text{ele}}$ -Werte konstant bleiben [131]. Für die Berechnung der Wechselwirkungsenergie $\Delta G_{\text{C,K}}$ wurde wie bereits oben erwähnt, die Differenz der Coulombenergien zwischen den einzelnen Komponenten und des Komplexes bei einer Dielektrizitätskonstanten $\epsilon=4$ gebildet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.12 zusammengefaßt.

3.6.16.2 Apolarer Anteil der Bindungsenergie

Prinzipiell sollten die Überlegungen, die anhand Abbildung 3.44 für die Berechnung des elektrostatischen Anteils der Bindungsenergie dargestellt sind, auch für den unpolaren Anteil Gültigkeit besitzen. Eine adäquate Darstellung der Umgebung von Ligand, Rezeptor und Rezeptor-Ligand-Komplex wäre mit der Einführung expliziter Wassermoleküle gegeben, z.B. durch die Verwendung einer Wasserbox, wie sie bei der Generierung der Loopregionen des Rezeptors eingesetzt wurde. Entsprechend der ΔG_s -Komponenten in Abbildung 3.44 lassen sich dann in gleicher Weise für Ligand, Rezeptor und Rezeptor-Ligand-Komplex die entsprechenden dispersiven Wechselwirkungsenergien mit der Solvathülle bestimmen.

Allerdings erscheint dieser Ansatz nicht unproblematisch, wie die Untersuchungen von Hansson, Mareliuz und Åqvist zeigen [133]. Hansson et al. hatten für die Voraussage von Bindungsaffinitäten die Wechselwirkungsenergien eines Liganden im freien und gebundenen Zustand herangezogen. Hierzu wurden MD-Simulationen des freien Liganden und des Protein-Ligand-Komplexes in einer Wasserbox durchgeführt. In beiden MD-Simulationen wurden die van-der-Waals-Wechselwirkungsenergien des Liganden mit seiner Umgebung berechnet und jeweils ein Durchschnittswert ermittelt. Die Wechselwirkungsenergie ΔG_{vdW} wurde aus der Differenz dieser beiden Durchschnittswerte berechnet und neben anderen Parametern zur Vorhersage der Bindungsaffinitäten eingesetzt. Mit den ΔG_{vdW} -Werten war allerdings eine sinnvolle Korrelation mit den experimentell gemessenen Daten erst in Verbindung mit einem Proportionalitätsfaktor möglich. Die Einführung eines Proportionalitätsfaktors wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß die ΔG_{vdW} -Werte nicht nur die Packungsverhältnisse zwischen Ligand und Rezeptor beschreiben, sondern auch ein Maß für ihre Kontaktfläche sind. Die Kontaktfläche ist wiederum proportional zu apolaren Anteilen der Solvatationsenergie: Die Verdrängung von Wassermolekülen von dieser Oberfläche führt zum Verlust von dispersiver Wechselwirkungsenergie und zur Erhöhung der Entropie (hydrophober Effekt) [132].

Der Zusammenhang zwischen gemessenem ΔG_{vdW} und der Kontaktfläche ist bei Hansson et al. durch die unterschiedliche Teilchendichte des Wassers und des Proteins gegeben. Eine entsprechende Betrachtung sollte demnach generell für jedes Modell gültig sein, das einen solchen Dichteunterschied aufweist und zwar auch bei vollständiger Vernachlässigung der Lösungsmitteldichte, wie es für die hier durchgeführten Berechnungen im Vakuum zutrifft. Insofern erscheint die Einführung eines Proportionalitätsfaktors für die hier untersuchten Rezeptor-Ligand-Komplexe zulässig. Nach den oben dargestellten Überlegungen erscheint sie sogar notwendig, wenn apolare Solvationseffekte berücksichtigt werden sollen. Die freie Bindungsenthalpie für einen Liganden berechnete sich dann als

$$\Delta G = \Delta G_{ele} + k \cdot \Delta G_{vdW,LR} \quad (3.8)$$

3.6.16.3 Vergleich mit experimentellen Daten

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, inwiefern die nach den oben dargestellten Gleichungen berechneten Bindungsenergien mit experimentell gefundenen Bindungsenergien übereinstimmen. Bindungsstudien von Tränkle et al. charakterisieren das allosterische Potential der Verbindungen Alcuronium, Diallylcaracurin V und Tubocurarin anhand der durch sie hervorgerufenen Verzögerung der Dissoziations- und Assoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden [³H]NMS [40][134]. Aus diesen Bindungsstudien stehen $EC_{50,diss}$ -Konzentrationen für Alcuronium, Diallylcaracurin V und Tubocurarin, sowie $EC_{50,ass}$ -Konzentrationen für Alcuronium und Diallylcaracurin V zur Berechnung der freien Bindungsenthalpie zur Verfügung (vgl. Kapitel 1.2.2). Die $EC_{50,ass}$ -Konzentration für Tubocurarin konnte anhand seines Kooperationsfaktors α abgeschätzt werden, der von Waelbroeck mit einem Wert von 3,45 ermittelt wurde [135]. Die experimentellen Daten sind in Tabelle 3.11 zusammengefaßt.

Tabelle 3.11 : Allosterische Potenz der Verbindungen Alcuronium, Diallylcaracurin V und Tubocurarin. $EC_{50,diss}$ -Konzentrationen geben die Affinität zum mit [3H]NMS besetzten Rezeptor, $EC_{50,ass}$ -Konzentrationen die Affinität zum freien Rezeptor wieder. ΔG_{exp} ist die freie Bindungsenthalpie der Liganden zum freien Rezeptor.

	Alcuronium	Diallylcaracurin V	Tubocurarin
$EC_{50,diss}$	3,80 nmol	3,39 nmol	860 nmol
$EC_{50,ass}$	6,46 nmol	8,32 nmol	249 nmol ^a
ΔG_{exp} ^b	-11,09 kcal/mol	-10,94 kcal/mol	-8,94 kcal/mol

^a Berechnet nach $EC_{50,diss} / EC_{50,ass} = \alpha$ ($\alpha = 3,45$)

^b Berechnet nach $\Delta G_{exp} = RT \ln EC_{50,ass}$; mit $R = 1,985 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (allgemeine Gaskonstante) und $T = 296,16 \text{ K}$

In den Bindungsstudien konnte bei keinem der ermittelten Werte für Alcuronium und Diallylcaracurin V ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verbindungen festgestellt werden. Entsprechend diesen Beobachtungen wurde der Proportionalitätsfaktor k für die Berechnung der Bindungsenergie (vgl. Gleichung (3.8)) so gewählt, daß sich für Alcuronium und Diallylcaracurin V die Werte der freien Bindungsenthalpie entsprechen. Mit dem so ermittelten Proportionalitätsfaktor wurde die freie Energie für die beiden Tubocurarin-Rezeptor-Komplexe berechnet. Tabelle 3.12 gibt einen Überblick über die berechneten Energieunterschiede $\Delta\Delta G$.

Tabelle 3.12: Unterschiede der freien Bindungsenthalpie (in kcal/mol) der modellierten Ligand-Rezeptor-Komplexe. In jeder Spalte wurde der kleinste ΔG -Wert als Bezugspunkt zur Berechnung der Energieunterschiede ($\Delta\Delta G$) ausgewählt. Er ist in Klammern in der entsprechenden Zelle der Tabelle vermerkt.

	$\Delta\Delta G_s$	$\Delta\Delta G_{C,K}$	$\Delta\Delta G_{ele}$	$\Delta\Delta E_{vdW,K}$	$\Delta\Delta G_{npl}^a$	$\Delta\Delta G_{kalk}^b$	$\Delta\Delta G_{exp}^c$
Alcuronium	10,12	4,68	12,89	0,00 (-115,02)	0,00 (-50,90)	0,00 (-28,10)	0,00 (-11,08)
Caracurin	0,00 (70,18)	1,63	0,00 (9,91)	29,15	12,89	0,00	0,15 ^d
Tubocurarin R ^e	5,53	0,00 (-61,91)	3,89	25,55	11,34	2,3	2,00
Tubocurarin S ^e	0,48	4,4	13,14	29,57	13,11	3,41	2,00

^a Berechnet nach $\Delta\Delta E_{vdW,K} \cdot k$ mit $k = 0,4422$

^b Berechnete Bindungsenergie nach Gleichung (3.8) mit $k = 0,4422$

^c Experimentelle Bindungsenergien

^d Unterschied zum Alcuronium nicht signifikant

^e R-,S-Konfiguration des protonierten tertiären Stickstoffs

Interessanterweise liefert der elektrostatische Anteil ΔG_{ele} keinen negativen Beitrag zur freien Bindungsenthalpie. Die gemessenen Coulomb-Energien zwischen Liganden und Rezeptor können in keinem der drei Fälle, den Anstieg der elektrostatischen Energie kompensieren, der durch den teilweisen Verlust der Solvathülle verursacht wird. Dies muß nicht unbedingt bedeuten, daß die Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Liganden und den negativ geladenen Glutamaten der Bindungsstelle keinen Einfluß auf die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor besitzt. Die Anziehungskraft zwischen den geladenen Molekülen wirkt über eine große Distanz und kann so die Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes beschleunigen.

Die treibenden Kräfte bei der Bindung zwischen Ligand und Rezeptor werden nach der hier vorgestellten Analyse durch den apolaren Anteil der freien Bindungsenthalpie beschrieben. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von Struktur-Wirkungsbeziehungen an Derivaten des W84, bei denen eine Korrelation zwischen dem Volumen der lateralen Ringsysteme und der $EC_{50,diss}$ -

Konzentration festgestellt wurde [36]. Aus dem vergrößerten Volumen resultiert hierbei eine Vergrößerung der zwischenmolekularen Kontaktfläche und hieraus eine erhöhte Affinität. Da nach unserem Modell mindestens eine der lateralen Phthalimidgruppen des W84 im Bereich der hier vorgestellten allosterischen Bindungsstelle angreift, besitzen die hier gefundenen Zusammenhänge und die Ergebnisse der Struktur-Wirkungsbeziehungen wahrscheinlich den gleichen Ursprung.

Um die Unterschiede im Bindungsverhalten der einzelnen Liganden zu erklären, sind elektrostatischer und apolarer Anteil der freien Bindungsenthalpie von Bedeutung. Diallylcaracurin V und Alcuronium besitzen trotz ähnlicher Konstitution deutlich unterschiedliche Strukturen und nehmen erwartungsgemäß auch eine unterschiedliche Lage in der Bindungstasche ein. Dieser Beobachtung widerspricht scheinbar die sehr ähnliche Affinität der beiden Verbindungen zum M_2 -Rezeptor. In unserem Modell erklärt sich dies aus der Möglichkeit, daß sich die Energieunterschiede zwischen Alcuronium und Diallylcaracurin V bei ihren elektrostatischen und apolaren Anteilen gegenseitig kompensieren können. Wird unter dieser Annahme der Proportionalitätsfaktor zur Berechnung von ΔG_{npl} gewählt, so findet man auch für Tubocurarin eine gute Übereinstimmung der theoretischen und gemessenen freien Bindungsenthalpie. In diesem Zusammenhang kann auch eine Auswahl zwischen den beiden Konfigurationen des Tubocurarin getroffen werden: Der Komplex mit dem am protonierten Stickstoff R-konfigurierten Tubocurarin wird aufgrund der niedrigeren freien Bindungsenthalpie bevorzugt gebildet werden.

4 Diskussion

4.1 Vergleich mit der Rhodopsin-Struktur

Nach der Fertigstellung der Rezeptor-Ligand-Komplexe wurde eine Röntgenkristallstruktur des GPCRs Rhodopsin veröffentlicht (PDB-Eintrag: 1F88) [16]. Bis auf Bereiche im dritten intrazellulären Loop und im C-terminalen Ende konnte die Struktur aller Aminosäuren des Rezeptors aufgeklärt werden. Die Auflösung der Kristallstruktur lag bei 2,8 Å. Der Vergleich mit dem von uns verwendeten 7-Helix-Modell von Pogozheva et al. zeigte eine gute Übereinstimmung mit den entsprechenden Bereichen in der Röntgenkristallstruktur. So betrug der RMSD-Wert nach Superpositionierung der beiden Strukturen für die C_{α} -Atome 3,2 Å [136]. Eine entsprechende Superpositionierung der Röntgenkristallstruktur mit unserem 7-Helix-Modell (vgl. Kapitel 3.3.3) ergab einen vergleichbaren RMSD-Wert von 3,4 Å (siehe Abbildung 4.1).

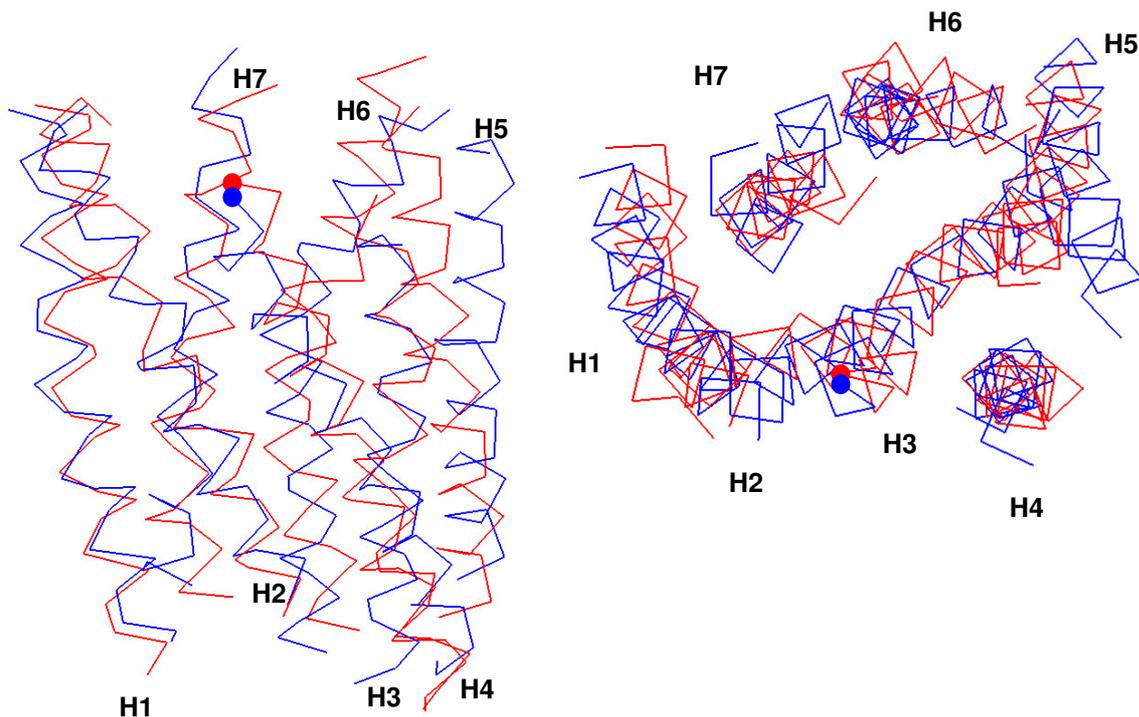


Abbildung 4.1: Überlagerung der C_{α} -Atome der Rhodopsin-Röntgenstruktur (blau) mit dem 7-Helix-Modell des M_2 -Rezeptors (rot). Der rote bzw. blaue Punkt kennzeichnet die Lage der Cysteine, die an der Disulfidbrücke zum zweiten extrazellulären Loop beteiligt sind.

Der größte Unterschied zeigte sich in der Lage der Helix 5. Obwohl diese Helix ein Prolin enthält, verläuft sie in der Röntgenkristallstruktur relativ gerade, während im Pogozeva-Modell ein Prolin-*kink* eingefügt wurde, der in unser Modell übernommen wurde. Der genaue Verlauf der Helix konnte beim Aufbau des Pogozeva-Modells nicht aus der kryoelektronenmikroskopischen Aufnahme des Rhodopsins abgeleitet werden. Der Einbau des Prolin-*kinks* in das Pogozeva-Modell erschien allerdings vernünftig, da er ein allgemeines Strukturmerkmal transmembranärer Helices darstellt. Die höher aufgelöste Röntgenstruktur gibt die Struktur der Helix 5 besser wieder und zeigt hier eine Abweichung vom erwarteten Verlauf. Helices 4,6 und 7 enthalten sowohl in der Röntgenstruktur als auch in unserem Modell einen Prolin-*kink*.

Für die Struktur der in dieser Arbeit postulierten allosterischen Bindungsstelle hat die veränderte Lage der Helix 5 wahrscheinlich wenig Einfluß. Die Lage von Glu175 im zweiten extrazellulären Loop, das in Kontakt mit den hier untersuchten allosterischen Modulatoren steht, wird hauptsächlich durch die Disulfidbrücke des benachbarten Cys176 bestimmt, die den Loop mit Helix 3 verknüpft. Die Position des Bindungspartners Cys96 in unserem Modell stimmt mit der Lage des entsprechenden Cysteins der Rhodopsin-Kristallstruktur gut überein (siehe Abbildung 4.1).

Nicht alle Unterschiede zwischen dem Pogozeva-Modell und der Röntgenstruktur müssen prinzipiell auf der verbesserten Auflösung der Röntgenstruktur basieren, wenn man berücksichtigt, daß das Pogozeva-Modell auf einer Vielzahl von Informationen aus unterschiedlichen GPCRs der Rhodopsinfamilie basiert. Da innerhalb dieser Familie die Sequenzidentität bis auf 20% fallen kann, sind Abweichungen zwischen den einzelnen GPCR-Strukturen zu erwarten, die ebenfalls in das Pogozeva-Modell eingeflossen sind. So beträgt zum Beispiel die Sequenzidentität im Bereich der transmembranären Helices des M₂-Rezeptor-Modells im Vergleich zum Rhodopsin 23%. Als grobes Maß für die natürliche Abweichung zwischen den beiden Strukturen kann ein RMSD-Wert von 1,8 Å angenommen werden, wie ihn Chothia et al. aus dem Vergleich von Strukturen mit ähnlicher Sequenzhomologie abgeleitet haben [137].

Die Aminosäuren, die die Bindungsstelle der untersuchten Liganden im helikalen Bereich des M₂-Rezeptormodells bilden, liegen alle im ersten und zweiten extrazellulären Turn der Helices 1, 2 und 7. Ein Vergleich der Lage und Orientierung dieser Aminosäuren mit den entsprechenden Aminosäuren der Rhodopsin-Röntgenstruktur zeigt Abbildung 4.2. Während in Helix 1 und 2 die drei wichtigen Aminosäuren Val23, Ile26 und Tyr83 eine ähnliche Lage und Orientierung einnehmen, weicht die Lage Thr420 (M₂-Rezeptor) und dem entsprechenden Ile287 (Rhodopsin) voneinander ab. Obwohl Ile287 eine ähnliche Orientierung ins Innere des Rezeptors aufweist, liegt es etwa 2,4 Å höher als Thr420. Jacobson und van Rhee hatten tatsächlich eine solche Verschiebung von Helix 7 in Betracht gezogen, da hierdurch widersprüchliche experimentelle Ergebnisse für verschiedene GPCRs erklärt werden könnten [15]. Die Ergebnisse waren jedoch nicht eindeutig genug, um sie für das M₂-Modell zu übernehmen. Verschiebt man das Helix 7-Fragment im M₂-Rezeptor, so daß Thr420 und Ile287 sich überlagern, so kann Thr420 in dieser Position nicht mehr mit den Liganden interagieren. Allerdings liegt in dieser neuen Anordnung jetzt Ile424 an der ursprünglichen Position des Threonins. Seine voluminöse Seitenkette kann ebenfalls in Kontakt mit dem aromatischen Ring der allosterischen Liganden treten und so die bisherige Rolle von Thr420 übernehmen. Es kann daher vermutet werden, daß selbst wenn die Röntgenstruktur die Lage der Aminosäuren der Helix 7 besser wiedergeben sollte als das Pogozheva-Modell, dies wenig Einfluß auf die hier postulierte Form der Bindungsstelle hätte.

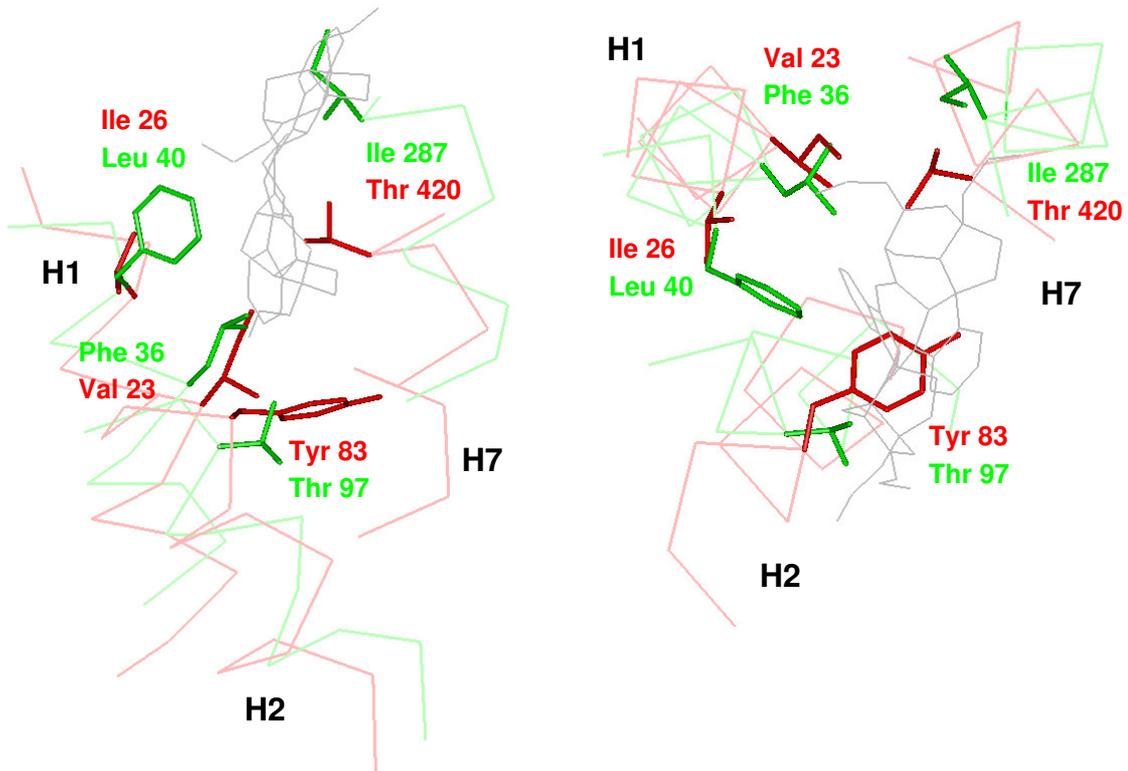


Abbildung 4.2: Vergleich der extrazellulären Enden der Helices 1, 2 und 7 zwischen dem M₂-Rezeptor-Modell (rot) und der Röntgenstruktur des Rhodopsins (grün). Alcuronium (grau) ist als Beispiel für einen gebundenen allosterischen Liganden dargestellt. Links: Sicht parallel zur Membranebene; Rechts: Sicht auf die Membranebene von der extrazellulären Seite

Aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie ist eine Übereinstimmung zwischen den extrazellulären Loopbereichen des Rhodopsins und des M₂-Rezeptors nicht zu erwarten. Interessanterweise findet man nun in der Röntgenstruktur des Rhodopsins einen β -Hairpin im zweiten extrazellulären Loop. In diesem Bereich war auch aufgrund der Sekundärstrukturvorhersagen für den M₂-Rezeptor das Auftreten eines β -Hairpins in Betracht gezogen worden (vgl. Kapitel 3.2.4). Da in der Bacteriorhodopsinstruktur (PDB-Eintrag: 2BRD) trotz einer sehr ähnlichen Sekundärstrukturvorhersage im ersten extrazellulären Loop kein β -Hairpin gefunden werden konnte, wurde auf einen direkten Einbau dieses Strukturmerkmals verzichtet und nur ein β -Turn modelliert (vgl. Kapitel 3.4.2). Auch in der endgültigen Struktur trat im zweiten extrazellulären Loop kein β -Hairpin auf. Obwohl sich die Loops in beiden GPCRs in ihrer Länge deutlich unterscheiden und auch keine Sequenz-

homologie in diesem Bereich besteht, wäre in Hinblick auf die gefundene Übereinstimmung zwischen der Sekundärstrukturvorhersage des M₂-Rezeptors und der Röntgenstruktur des Rhodopsins denkbar, daß beide GPCRs hier eine ähnliche Hairpinstruktur aufweisen. Allerdings blockiert der Loop in der Röntgenstruktur mit seiner ausladenden Struktur den Zugang zur Bindungsstelle des Liganden (Retinal) vollständig. Bourne et al. haben daher die Vermutung geäußert, daß dieser Aufbau für GPCRs eher die Ausnahme bildet, da die Blockade nicht im Einklang mit der raschen Assoziation und Dissoziation von Liganden steht, die reversibel an einen GPCR binden. Rhodopsin ist hier insofern einzigartig, als sein Ligand sowohl im inaktivierten als auch im aktivierten Zustand kovalent an den Rezeptor gebunden vorliegt. Auch beim M₂-Rezeptor stellt sich die Frage, wie Liganden bei einem dem Rhodopsin ähnlichen Aufbau des zweiten extrazellulären Loops zur orthosterischen Bindungsstelle gelangen könnten [137]. Wie in Kapitel 4.3 gezeigt wird, kann das hier vorgestellte M₂-Modell dafür eine plausible Erklärung liefern. Wir vermuten daher, daß im M₂-Rezeptor keine β -Hairpinstruktur auftritt.

4.2 Bindungsstelle des W84

Für die Verbindung W84, die im Rahmen dieser Arbeit stellvertretend für die Hexamethonium- bzw. Bispyridiniumderivate berücksichtigt wurde, konnte kein vollständiger Rezeptor-Ligand-Komplex entwickelt werden. Es konnte gezeigt werden, daß der aromatische Ring der endständigen Phthalimidgruppe sich in eine Bindungstasche einpassen kann, die von den Aminosäuren Tyr83, Val23 und Thr402 gebildet wird. Die gleiche Beobachtung konnte für jeweils eines der Indolinringsysteme von Alcuronium und Diallylcaracurin V gemacht werden. Ausgehend von der Annahme, daß die Lage des Phthalimidrings im Modell richtig wiedergegeben wird, wurde versucht, eine mögliche Bindungsstelle für die restliche Struktur des W84 zu skizzieren. Die gestreckte Konformation der Hexamethonium-Kette aus der S-förmigen Konformation wurde beibehalten (vgl. Kapitel 1.2.5). Sie läßt sich in dieser Konformation in eine Furchenregion zwischen dem zweiten und dritten extrazellulären Loop einfügen.

Abbildung 4.3 zeigt ein einfaches Modell, das ausgehend von diesen Vorstellungen mit Hilfe von Kraftfeldberechnungen aus Struktur 4 erstellt wurde. Hier-

bei wurde der Ligand durch den Einsatz zusätzlicher abstandsabhängiger Kraftfeldterme so positioniert, daß die gestreckte Konformation erhalten blieb. Das abgebildete Modell ist somit nicht vergleichbar mit den anderen Rezeptor-Ligand-Komplexen, die über MD-Simulationen berechnet wurden, sondern kann lediglich eine Vorstellung der räumlichen Verhältnisse in einem postulierten Rezeptor-W84-Komplex vermitteln.

Der zweite Phthalimidring des W84 liegt bei gestreckter Konformation der ihm folgenden Propylkette im Bereich der extrazellulären Enden der Helices 5 und 6. Da der Vergleich mit der Rhodopsin-Röntgenstruktur vermuten läßt, daß dieser Bereich im M_2 -Modell nicht vollständig korrekt wiedergegeben wird, können mögliche Wechselwirkungspartner hier nur näherungsweise bestimmt werden. So finden sich in diesem Bereich drei aromatische Aminosäuren, die als mögliche Wechselwirkungspartner in Betracht kommen: Phe179 und Phe180 am C-terminalen Ende des zweiten extrazellulären Loops und Phe412 am N-terminalen Ende des dritten extrazellulären Loops. Eine Überprüfung des hier postulierten Bindungsverhaltens von W84 wäre somit durch Mutationsstudien in diesem Bereich möglich. Die flexiblen Propyl- bzw. Hexylketten zwischen den beiden Phthalimiden fungieren in diesem Modell als Abstandshalter, die die beiden aromatischen Ringsysteme in günstige Wechselwirkungsbereiche dirigieren. Insofern lassen sich hierdurch die steigenden $EC_{50,diss}$ -Werte erklären, die bei Kürzung dieser Alkylketten des W84 gefunden wurden (vgl. Kapitel 1.2.4).

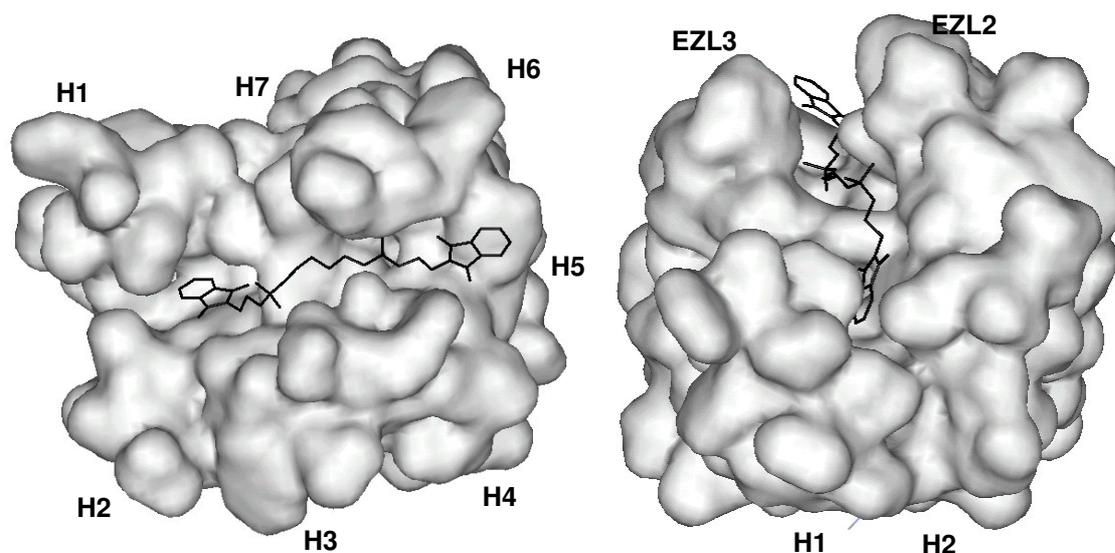


Abbildung 4.3: Mögliche Bindungsstelle der Verbindung W84. Darstellung; links: Blickrichtung aus der extrazellulären Region senkrecht zur Membranebene; rechts: Blickrichtung parallel zur Membranebene

4.3 Blockade der orthosterischen Bindungsstelle

Die Ergebnisse experimenteller Untersuchungen lassen vermuten, daß der allosterische Modulator Alcuronium die Assoziation und Dissoziation von orthosterischen Liganden vollständig blockieren kann [24][25]. Eine mögliche Erklärung wäre ein direkter Einfluß des allosterischen Modulators, indem dieser den Ein- bzw. Ausgang der orthosterischen Bindungsstelle blockiert. Hinweise für eine Bestätigung dieser Hypothese, fanden sich bereits bei der Analyse der SURFNET-Ergebnisse. In den meisten untersuchten Konformationen lagen die Bindungstaschen des allosterischen und des orthosterischen Liganden nahe beieinander. Da die allosterische Bindungstasche zum extrazellulären Raum geöffnet war, könnte ein orthosterischer Ligand über diesen Bereich zu seiner Bindungstasche vordringen. Allerdings konnte nur in einer Konformation eine tatsächliche Verbindung zwischen den beiden Bindungstaschen im Inneren des Rezeptors beobachtet werden. Abbildung 4.4 zeigt die Verhältnisse bei der

Struktur 4, die für den Aufbau der Rezeptor-Ligand-Komplexe ausgewählt worden war. Hier konnte eine schlauchartige Erweiterung der allosterischen Bindungstasche in Richtung orthosterischer Bindungstasche gefunden werden. Allerdings blockierte die Seitenkette von Trp162 den freien Zugang zur orthosterischen Bindungsstelle (siehe Abbildung 4.4).

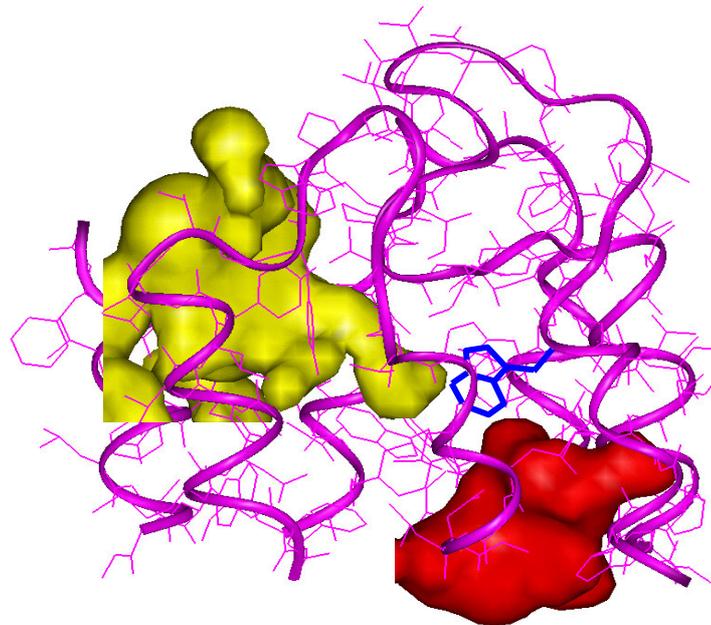


Abbildung 4.4: Struktur 4 mit orthosterischer (rot) und allosterischer (gelb) Bindungsstelle. Trp162 ist blau gekennzeichnet

Eine einfache Lösung für dieses Problem zeigte sich beim Vergleich der Rhodopsin-Röntgenstruktur mit dem M_2 -Rezeptor-Modell. In der Rhodopsin-Struktur endet Helix 4 auf ihrer extrazellulären Seite bei Val174, was bei Übernahme in den M_2 -Rezeptor zu einer Verkürzung der vierten Helix um vier Aminosäuren führen würde. Das bisherige Helixende lag bei Phe164, die angepaßte Helix dagegen würde schon bei Leu160 enden. Unter diesen Umständen wäre Trp162 nicht mehr Bestandteil der Helix und seine Lage nicht mehr an die helikale Konformation gebunden. In der Rhodopsin-Struktur ist mit Trp176 zudem ein Analogon für Trp 162 vorhanden, dessen Seitenkette außerhalb des Helixbündels liegt. Um die neuen räumlichen Bedingungen der Bindungstaschen ohne die störende Seitenkette von Trp162 nachzustellen,

wurde sie für eine neue SURFNET-Berechnung entfernt. Abbildung 4.5 zeigt einen entsprechend modifizierten M₂-Alcuronium-Komplex. Das dargestellte Surfnet-Volumen wurde ohne den allosterischen Liganden berechnet. Man erkennt hier einen durchgehenden Kanal, der bei der allosterischen Bindungsstelle beginnt und bei der orthosterischen Bindungsstelle endet. Auf diesem Weg könnten orthosterische Liganden ihre Bindungsstelle erreichen. Nur bei Bindung eines allosterischen Liganden würde dieser Zugang blockiert werden. Ein solches Modell stände somit in Einklang mit den experimentellen Beobachtungen.

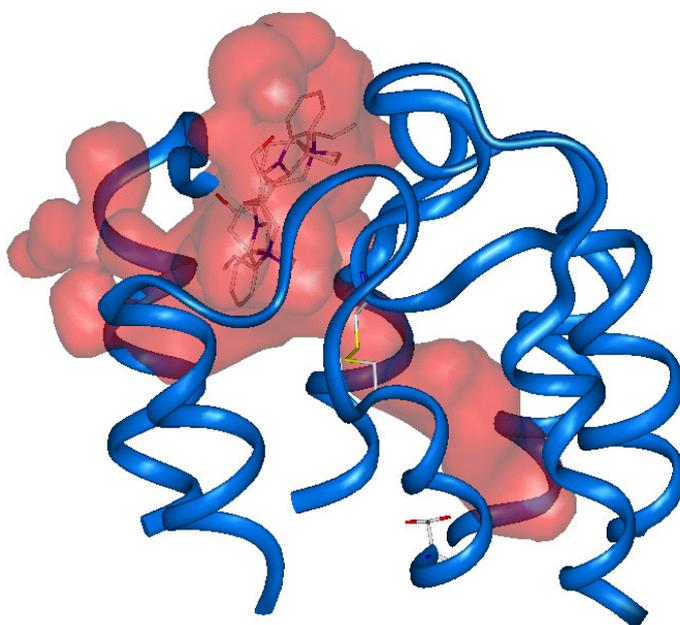


Abbildung 4.5: Das dargestellte Surfnet-Volumen wurde nach Entfernung der Seitenkette von Trp162 berechnet. Ebenfalls dargestellt sind der Ligand, die Disulfidbrücke zwischen Cys96 und Cys176 sowie Asp103, welches bei der Bindung orthosterischer Liganden eine Rolle spielt.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Molecular Modelling Methoden ein Modell für die extrazellulär gelegene Bindungsstelle allosterischer Modulatoren am muscarinergen M_2 -Rezeptor entwickelt.

Ausgehend vom Rhodopsinmodell von Pogozeva et al. [84] wurde ein Modell der sieben transmembranären Helices des M_2 -Rezeptors erstellt. Dieses Modell diente als Grundlage für den Aufbau der extrazellulären Loopregion. Der erste extrazelluläre Loop konnte anhand eines Loopfragments aus der Protein Data Bank modelliert werden. Für den zweiten und dritten extrazellulären Loop wurden unterschiedliche Strukturvorschläge mit Hilfe einer Moleküldynamik-Simulation generiert. Hieraus resultierten unterschiedliche Modelle der extrazellulären Region des M_2 -Rezeptors. Als Liganden der allosterischen Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors wurden die Verbindungen Alcuronium, Diallylcaracurin V und Tubocurarin modelliert. Die Analyse der physikochemischen Eigenschaften der extrazellulären Region erlaubte die Lokalisation der allosterischen Bindungsstelle in einem der generierten M_2 -Modelle. Die Liganden konnten in die ausgewählte Rezeptorstruktur eingepaßt werden. Das Rezeptor-Modell wurde um einen Teilbereich des N-terminalen Endes ergänzt, da die Lage der Liganden Wechselwirkungen mit dieser Region wahrscheinlich erscheinen ließ. Mithilfe von Moleküldynamik-Simulationen konnten anschließend stabile Rezeptor-Ligand-Komplexe generiert werden.

Mit dem Modell war es möglich, die Unterschiede in den Bindungsaffinitäten der Liganden wiederzugeben. Das Modell steht in Einklang mit den Ergebnissen von Struktur-Wirkungsbeziehungen, die hydrophoben Wechselwirkungen bei der Bindung allosterischer Modulatoren eine wichtige Rolle zuweisen. Es bestätigt experimentelle Untersuchungen, nach denen allosterische Liganden den Zugang des orthosterischen Liganden blockieren können. Aus der Lage der Liganden lassen sich Vorschläge für zukünftige Mutationsstudien ableiten.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Kubo, T.; Fukuda, K.; Mikami, A.; Maeda, A.; Takahashi, H.; et al.: Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **1986**, 323, 411-416
- [2] Kubo, T.; Maeda, A.; Sugimoto, K.; Akiba, I.; Mikami, A.; et al.: Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.* **1986**, 209, 367-372
- [3] 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
- [4] Bonner, T. I.; Young, A. C.; Brann, M. R.; Buckley, N. J.: Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1988**, 1, 403-410
- [5] Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J. M.: International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Reviews* **1998**, 50, 279-290
- [6] Dittman, A. H.; Weber, J. P.; Hinds, T. R.; Choi, E.-J.; Migeon, J. C.; Nathanson, N. M.; Storm, D. R.: A novel mechanism for coupling of m4 muscarinic acetylcholine receptors to calmodulin-sensitive adenylyl cyclases: Crossover from G protein-coupled inhibition to stimulation. *Biochemistry* **1994**, 33, 943-951
- [7] Jones, S. V. P.: Muscarinic receptor subtypes: Modulation of ion channels. *Life Sci.* **1993**, 52, 457-467
- [8] Wotta, D.R.; El Fakahany, E. E.: Muscarinic receptor-mediated activation of nitric oxide synthase. *Drug. Dev. Res.* **1997**, 40, 205-214
- [9] 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
- [10] Levey, A. I.: Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine in peripheral tissues and brain. *Life Sci.* **1993**, 52, 441-448
- [11] Sharma, V. K.; Colecraft, H. M.; Rubin, L. E.; Sheu, S.-S.: Does mammalian heart contain only the M₂ muscarinic receptor subtype? *Life Sci.* **1997**, 60, 1023-1029
- [12] Eglén, R. M.; Reddy, H.; Watson, N.; Challiss, R. A. J.: Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci.* **1994**, 15, 114-119
- [13] Eglén, R.M.; Whiting, R.L.: Heterogeneity of vascular muscarinic receptors. *J. Auton. Pharmacol.* **1990**, 10, 233-255
- [14] Forth, W.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag **1998**
- [15] van Rhee, A. M.; Jacobson, K. A.: Molecular Architecture of G Protein-Coupled Receptors. *Drug Development Res.* **1996**, 37, 1-38
- [16] Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, 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
- [17] Kurtenbach, E.; Curtis, C. A.; Pedder, E. K.; Aitken, A.; Harris, A. C.; Hulme, E. C.: Muscarinic acetylcholine receptors: Peptide sequencing identifies residues involved in antagonist binding and disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 13702-13708
- [18] Savarese, T. M.; Wang, C. D.; Fraser, C. M.: Site-directed mutagenesis of the rat m1 muscarinic acetylcholine receptor: Rule of conserved cysteines in receptor function. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 11439-11448

- [19] Van Koppen, C. J.; Nathanson, N. M.: Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine muscarinic receptor: Analysis of the rule of N-glycosylation in receptor expression and function. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 20887-20892
- [20] Hayashi, M. K.; Haga, T.: Palmitoylation of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes: Reduction in their ability to activate G proteins by mutation of a putative palmitoylation site, cysteine 457, in the carboxyl-terminal tail. *Arch. Biochem. Biosphys.* **1997**, 340, 376-382
- [21] Wess, J.: Molecular Basis of Receptor/G-Protein-Coupling Selectivity. *Pharmacol. Ther.* **1998**, 80(3), 231-264
- [22] Farrens, D. L.; Altenbach, C.; Yang, K.; Hubbell W. L.; Khorana H. G.: Requirement of rigid body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **1996**, 274, 768-770
- [23] 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
- [24] Tuček, S.; Proška, J.: Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *TIPS* **1995**, 16, 205-212
- [25] Jakubík, J.; Tuček, S.: Protection by Alcuronium of Muscarinic receptors Against Chemical Inactivation and Location of the Allosteric Binding Site for Alcuronium. *J. Neurochem.* **1994**, 63, 1932-1940
- [26] Tränkle, C.; Mies-Klomfass, E.; Botero Cid, M. H.; Holzgrabe, U.; Mohr, K.: Identification of a [³H]Ligand for the Common Allosteric Site of Muscarinic Acetylcholine M₂Receptors. *Mol. Pharmacol.* **1998**, 54, 139-145
- [27] Ehlert, F. J.: Estimation at the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol. Pharmacol.* **1988**, 35, 187-194
- [28] Lazareno, S.; Birdsall, N. J. M.: Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: Interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **1995**, 48, 362-378
- [29] Holzgrabe, U.; Mohr, K.: Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug Discovery Today* **1998**, 3(5), 214-222
- [30] Clark, A. L.; Mitchelson, F.: The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1976**, 58, 323-331
- [31] Proška, J.; Tuček, S.: Mechanisms of steric and cooperative actions of alcuronium on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **1994**, 45, 709
- [32] Zlotos, D. P.; Buller, S.; Tränkle, C.; Mohr, K.: Bisquaternary Caracurine V Derivates as Allosteric Modulators of Ligand Binding to M₂ Acetylcholine Receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, 10, 2529-2532
- [33] Rimpler, H.: *Biogene Arzneistoffe*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1990**, S. 417 ff
- [34] Proška, J.; Tuček, S.: Positive allosteric action of eburnamonine on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, 305, 201-205
- [35] 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
- [36] 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

- [37] Lee, N. H.; El- Fakahany, E. E.: Allosteric Antagonists of the Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 42(2), 199-205
- [38] 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.* **1998**, 58, 304-312
- [39] 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 (UH-AH 37) at Muscarinic Receptors, via Distinct Epitopes. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 181-186
- [40] Tränkle, C.; Kostenis, E.; Burgmer, U.; Mohr, K.: Search for Lead Structures to Develop New Allosteric Modulators of Muscarinic Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, 279(2), 926-933
- [41] Nassif-Makki, T.; Tränkle, C.; Zlotos, D.; Bejeuhr, G.; Cambareri, A.; Pfletschinger, C.; Kostenis, E.; Mohr, K.; Holzgrabe, U.: Bisquaternary Ligands of the Common Allosteric Site of M₂ Acetylcholine Receptors: Search for the Minimum Essential Distances between the Pharmacophoric Elements. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 849-858
- [42] Holzgrabe, U.; Hopfinger, A. J.: Conformational analysis, molecular shape comparison and pharmacophore identification of different allosteric modulators of muscarinic receptors. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1996**, 36, 1018-1024
- [43] Eglén, R. M.; Choppin, A.; Dillon, M. P.; Hegde, S.: Muscarinic receptor ligands and their therapeutic potential. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 426-432
- [44] Avery, E. E.; Baker, L. D.; Asthana, S.: Potential role of muscarinic agonists in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* **1997**, 11, 450-459
- [45] Growdon, J. H.: Muscarinic agonists in Alzheimer's Disease. *Life Sci.* **1997**, 60(13/14), 993-998
- [46] Ellis, J.; Huyler, J.; Brann M. R.: Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 42, 1927-1932
- [47] Jakubík, J.; Bacáková, L.; El-Fakahany E. E.; Tuček, S.: Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M₁-M₅ muscarinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, 274, 177-183
- [48] Christopoulos, A.; Sorman, J. L.; Mitchelson, F.; El- Fakahany, E. E.: Characterization of the Subtype Selectivity of the Allosteric Modulator Heptane-1,7-bis(dimethyl-3'-phthalimidopropyl) Ammonium Bromide (C₇/3-phth) at Cloned Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 171-179
- [49] Birdsall, N. J. M.; Farries, T.; Gharagozloo, P.; Kobayashi, S.; Kuonen, D.; Lazareno, S.; Popham, A.; Sugimoto, M.: Selective allosteric enhancement of the binding and actions of acetylcholine at muscarinic receptor subtypes. *Life Sci.* **1997**, 60(13/14), 1074-1052
- [50] Hirschberg, B. T.; Mosser, V. A.; Peterson, G. L.; Toumadje, A.; Vogel, W. K.; Johnson, W. C.; Schimerlik, M. I.: Kinetic and biophysical analysis of the m2 muscarinic receptor. *Life Sci.* **1995**, 56(11/12), 907-913
- [51] Rost, B.; Sander, C.: Prediction of Protein Secondary Structure at Better than 70% Accuracy. *J. Mol. Biol.* **1993**, 232, 584-599
- [52] Paulin, G.: Molecular Modelling Untersuchungen zur Substratspezifität der Breitspektrum-β-Laktamase MEN1 aus *Escherichia coli*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät, Diss., **1997**
- [53] Schappach, A.: Molecular Modelling Untersuchungen an Steroidhydroxylasen mit therapeutischer Bedeutung. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät, Diss., **2000**

- [54] Garnier, J.; Gibrat, J.-F.; Robson, B.: GOR Method for Predicting Protein Secondary Structure from Amino Acid Sequence. *Methods Enzymol.* **1996**, 266, 540-553
- [55] Jones, D. T.: Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-specific Scoring Matrices. *J. Mol. Biol.* **1999**, 292, 195-202
- [56] Frishman, D.; Argos, P.: Seventy-Five Percent Accuracy in Protein Secondary Structure Prediction. *Proteins* **1997**, 27, 329-335
- [57] White, J. V.; Stultz, C. M.; Smith, T. F.: Protein Classifications by Stochastic Modelling and Optimal Filtering of Amino-Acid Sequences. *Mathemat. Biosciences* **1994**, 119, 35-75
- [58] Kneller, D., G.; Cohen, F. E.; Langridge, R.: Improvements in Protein Secondary Structure Prediction by An Enhanced Neural Network. *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 171-182
- [59] Solovyev, V. V.; Salamov, A. A.: Predicting α -helix and β -strand segments of globular proteins. *CABIOS* **1994**, 10(6), 661-669
- [60] Salamov, A. A.; Solovyev, V.V.: Prediction of Protein Secondary Structure by Combining Nearest-neighbor Algorithms and Multiple Sequence Alignments. *J. Mol. Biol.* **1995**, 247, 11-15
- [61] Salamov, A. A.; Solovyev, V. V.: Protein Secondary Structure Prediction Using Local Alignments. *J. Mol. Biol.* **1997**, 268, 31-35
- [62] Geourjon, C.; Deléage, G.: SOPMA : significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *CABIOS* **1995**, 11(6), 681-684
- [63] Sander, C.; Schneider, R.: Database of homology-derived structures and the structurally meaning of sequence alignment. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1991**, 9, 56-68
- [64] Sander, C.; Schneider, R.: The HSSP-Database of protein structure-sequence alignment. *Nucleic. Acids Res.* **1994**, 22, 3597-3599
- [65] Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, O. E.: The Protein Data Bank. *Nucleic. Acids Res.* **2000**, 28, 235-242
- [66] Grigorieff, N.; Ceska, T. A.; Downing, K. H.; Baldwin, J. M.; Henderson, R.: Electron-crytalographic Refinement of the Structure of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 393-421
- [67] Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S.: The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome-c-oxidase at 2.8 Å. *Science* **1996**, 272, 1136-1144
- [68] Rost, B.; Fariselli, P.; Casadio, R.: Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* **1996**, 5, 1704-1718
- [69] Bairoch, A.; Boeckmann, B.: The SWISS-PROT protein sequence data bank. *Nucleic. Acids Res.* **1991**, 19, 2247-2249 (URL: <http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>)
- [70] Baldwin, J. M.; Schertler, G. F. X.; Unger, V. 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
- [71] King, R. D.; Ouali, M.; Strong, A. T.; Aly, A.; Elmaghraby, A.; Kantardzic, M.; Page, D.: Is it better to combine predictions? *Protein Eng.* **2000**, 13, 15-19
- [72] 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

- [73] Farahbakhsh, Z. T.; Ridge, K. D.; Khorana, H. G.; Hubbell, W. L.: Mapping Light-Dependent Structural Changes in the Cytoplasmic Loop Connecting Helices C and D in Rhodopsin: A Site-Directed Spin Labeling Study. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8812-8819
- [74] Aurora, R.; Rose, G. D.: Helix capping. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 21-38
- [75] Lewis, P. N.; Momany, F. N.; Scheraga, H. A.: Chain reversal in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211-229
- [76] Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M.: A revised set of potentials for β -turn formation in proteins. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 2207-2216
- [77] Shepherd, A. J.; Gorse, D.; Thornton, J. M.: Prediction of the location and type of beta-turns in proteins using neural networks. *Protein Sci.* **1999** (to be published) (URL: <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/btpred/>)
- [78] Sibanda, B. L.; Thornton, J. M.: Beta-hairpin families in globular proteins. *Nature* **1985**, *316*, 170-174
- [79] Chollet, A.; Turcatti, G.: Biophysical approaches to G protein-coupled receptors: Structure, function and dynamics. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1999**, *13*, 209-219
- [80] Elling, C. E.; Schwarz, T. W.: Connectivity and orientation of the seven helical bundle in the tachykinin NK-1 receptor probed by zinc site engineering. *EMBO J.* **1996**, *15*(22), 6213-6219
- [81] Herzyk, P.; Hubbard, R. E.: Combined Biophysical and Biochemical Information Confirms Arrangement of Transmembrane Helices Visible from the Three-dimensional Map of Frog Rhodopsin. *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 741-754
- [82] Henderson, R.; Baldwin, J.; Ceska, T. H.; Zemlin, F.; Beckmann, E.; Downing, K.: Model of the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution electron cryo- microscopy. *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 899-929
- [83] Baldwin, J. M.: The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **1993**, *12*(4), 1693-1703
- [84] Pogozeva, I. D.; Lomize, A.L.; Mosberg, H. I.: The Transmembrane 7- α -bundle of Rhodopsin: Distance Geometry Calculations with Hydrogen Bonding Constraints. *Biophys. J.* **1997**, *70*, 1963-1985
- [85] Oliveira, L.; Paiva, A. C. M.; Vriend, G.: A common motif in G-protein-coupled seven transmembrane helix receptors. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1993**, *7*, 649-658
- [86] Donnelly, D.; Findlay, J. B. C.; Blundell, T. L.: The Evolution and Structure of Aminergic G Protein-coupled Receptors. *Receptors and Channels* **1994**, *2*, 61-78
- [87] Lin, S. W.; Imamoto, Y.; Fukada, Y.; Shichida, Y.; Yoshizawa, T.; Mathies, R. A.: What makes red visual pigments red? A resonance Raman microprobe study of retinal chromophore structure in iodopsin. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2151-2160
- [88] Herzyk, P.; Hubbard, R. E.: Automated Method for Modeling Seven-Helix Transmembrane Receptors from Experimental Data. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 2419-2442
- [89] INSIGHTII/DISCOVER/HOMOLOGY/DelPhi, Biosym Technologies, Inc./Molecular Simulations (MSI), 9685 Scranton Road, San Diego CA 92121-2777, USA (Version 3.0/2.95 – 98.0)
- [90] Sankararamkrishnan, R.; Vishveshwara, S.: Conformational Studies on Peptides with Proline in the Right-Handed Alpha-Helical Region. *Biopolymers* **1990**, *30*, 287-298
- [91] Nordvall, G.; Hacksell, U.: Binding-Site Modeling of the Muscarinic m1 Receptor: A Combination of Homology-Based and Indirect Approaches. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 967-976

- [92] Jendretzki, U.: Molecular Modelling Untersuchungen zum Bindungsverhalten von 5-HT_{2a}-Rezeptor-affinen Substanzen. Berlin, Freie Universität Berlin, Fachbereich Pharmazie, Diss., **1993**
- [93] Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M.: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 283-291
- [94] Jones, T. A.; Thirup, S.: Using known substructures in protein model building and crystallography. *EMBO J.* **1986**, *5*(4), 819-822
- [95] Dayhoff, M. O.; Barker, W. C.; Hunt, L. T.: Establishing Homologies in Proteins Sequences. *Methods in Enzymology* **1983**, *91*, 524
- [96] Frishman, D.; Agros, P.: Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* **1995**, *23*, 566-579
- [97] Petersen, M. T. N.; Jonson, P. H.; Petersen, S. B.: Amino acid neighbours and detailed conformational analysis of cysteines in proteins. *Protein Engng.* **1999**, *12*(7), 535-548
- [98] Colson, A.-O.; Perlman, J. H.; Smolyar, A.; Gershengorn, M. C.; Osman, R.: Static and Dynamic Roles of Extracellular Loops in G-Protein-Coupled Receptors: A Mechanism for Sequential Binding of Thyrotropin-Releasing Hormone to Its Receptor. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1087-1100
- [99] Moro, S.; Hoffmann, C.; Jacobson, K. A.: Role of the Extracellular Loops of G Protein-Coupled Receptors in Ligand Recognition: A Molecular Modeling Study of the Human P2Y₁ Receptor. *Biochemistry* **1999**, *38*, 3498-3507
- [100] Höltje, H.-D.; Folkers, G.: Molecular Modeling –Basic Principles and Applications. In *Methods and Principles in Medicinal Chemistry Vol.5*, VCH, Weinheim **1996**
- [101] Karplus, P. A.: Experimentally observed conformation-dependent geometry and hidden strain in proteins. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1406-1420
- [102] BIOSON Research Institute and Laboratory of Biophysical Chemistry, University of Groningen, 9747 AG Groningen, The Netherlands
- [103] Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Brunnen, R.: GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 43-56
- [104] Miyamoto, S.; Kollman, P. A.: SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithms for rigid water models. *J. Comp. Chem.* **1992**, *13*, 952-962
- [105] SYBYL 6.5, Tripos Associates, St. Louis, Mo., USA
- [106] Cambridge Structural Database, Dr. Olga Kennard, F.R.S., Cambridge Crystallographic Data Centre, UK.
- [107] Allen, F. H.; Kennard, O.: 3D Search and Research using the Cambridge Structural Database, *Chemical Design Automation News* **1993**, *8*(1), 31-37
- [108] Coddington, P. W.; James, M. N. G.: The Crystal and Molecular Structure of a Potent Neuromuscular Blocking Agent: d-Tubocurarine Dichloride Pentahydrate. *Acta Cryst.* **1973**, *29*, 935-942
- [109] Reynolds, C. D.; Palmer, R. A.: The Crystal Structure, Absolute Configuration and Stereochemistry of (+)-Tubocurarine Dibromide Methanol Solvate: a Potent Neuromuscular Blocking Agent. *Acta Cryst.* **1976**, *32*, 1431-1439
- [110] Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H.: *Wirkstoffdesign*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **1996**
- [111] Shenkin, P. S.; McDonald, D. Q.: Cluster Analysis of Molecular Conformations. *J. Com. Chem.* **1993**, *15*(8), 899-916

- [112] Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P.: AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902
- [113] SPARTAN, Wavefunction, Inc., Irvine, California, USA
- [114] Momany, F. A.: Determination of partial atomic charges from ab initio molecular electrostatic potentials. Application to formamide, methanol and formic acid. *J. Phys. Chem.* **1978**, 82(5), 592-601
- [115] Wenkert, E.; Cheung, H. T. A.; Gottlieb, H. E.: Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Naturally Occurring Substances. *J. Org. Chem.* **1978**, 43(6), 1099-1105
- [116] Verpoorte, R.; Hylands, P. J.; Bisset, N. G.: Carbon-13 N.m.r. Spectroscopy of Some Strychnos Alkaloids. *Org. Mag. Reson.* **1977**, 9(10), 567-571
- [117] Gasteiger, J.; Rudolph, C.; Sadowski, J.: Automatic generation of 3D atomic coordinates for organic molecules. *Tetrahedron Comp. Method.* **1990**, 3, 537-547
- [118] Matsui, H.; Lazareno, S.; Birdsall, N. J. M.: Probing of the Location of the Allosteric Site on m1 Muscarinic Receptors by Site-Directed Mutagenesis. *Mol. Pharmacol.* **1995**, 47, 88-98
- [119] Ellis, J.; Seidenberg, M.; Brann, M. R.: Use of Chimeric Muscarinic Receptors to Investigate Epitopes Involved in Allosteric Interactions. *Mol. Pharmacol.* **1992**, 44, 583-588
- [120] Ellis, J.; Porter, D. J.; Seidenberg, M.: Separate epitopes contribute to gallamine's affinities for M₁ and M₅ muscarinic receptors. *Life Sci.* **1999**, 64(6/7), 562
- [121] Leppik, R. A.; Miller, R. C.; Eck, M.; Paquet, J.-L.: Role of Acidic Amino Acids in the Allosteric Modulation by Gallamine of Antagonist Binding at the m2 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Mol. Pharmacol.* **1994**, 45, 983-990
- [122] Jakubik, J.; Tuček, S.: Positive allosteric interactions on cardiac muscarinic receptors: effects of chemical modifications of disulphide and carboxyl groups. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 289, 311-319
- [123] Laskowski, R. A.; Luscombe, N. M.; Swindells, M. B.; Thornton, J. M.: Protein clefts in molecular recognition and function. *Protein Sci* **1996**, 5, 2438-2452
- [124] Laskowski, R. A.: SURFNET: A program for visualizing molecular surfaces, cavities and intermolecular interactions. *J. Mol. Graph.* **1995**, 13, 323-330
- [125] Hunter, C.A.; Singh, J.; Thornton, J.M.: Pi-pi interactions: The geometry and energetics of phenylalanine phenylalanine interactions in proteins. *J. Mol. Biol.* **1991**, 218(4), 837-846
- [126] Brickmann, J.; Goetze, T.; Heiden, W.; Moeckel, G.; Reiling, S.; Vollhardt, H.; Zachman, C.-D.: Interactive visualisation of molecular scenarios with MOLCAD/SYBYL. *Molecular Science. Data visualisation in molecular science*, Addison-Wesley Publishing Company Inc., Reading, Mass. **1995**, 83-97
- [127] Goodford, P.: A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 849-857
- [128] Gaedt, K.: Theoretische Untersuchungen zur Bindungsstelle von Dopamin-D₃-Rezeptor-Agonisten. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät, Diss., **1998**
- [129] Gilson, M. K.; Honig, H.: Calculation of the Total Electrostatic Energy of a Macromolecular System: Solvation Energies, Binding Energies, and Conformational Analysis. *PROTEINS, Structure, Function, and Genetics* **1988**, 4, 7-18
- [130] Insight II User Guide - DelPhi, February 2000. San Diego: Biosym/MSI, 2000

- [131] Shen, J.; Wendoloski, J.: Electrostatic Binding Energy Calculation Using the Finite Difference Solution to the Linearized Poisson-Boltzmann Equation; Assessment of Its Accuracy. *J. Comp. Chem.* **1996**, 17(3), 350-357
- [132] Insight II User Guide - Solvation, February 2000. San Diego: Biosym/MSI, 2000
- [133] Hansson, T.; Marelus, J.; Aqvist, J.: Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, 12, 27-35
- [134] Tränkle, C.; Holzgrabe, U., Mohr, K.: A novel alcuronium-derived allosteric enhancer of ligand binding to muscarinic M₂-receptors. Posterpräsentation
- [135] Waelbroeck, M.; Robberecht, P.; De Neef, P.; Christophe, J.: Effects of d-Tubocurarin on rat cardiac muscarinic receptors: a comparison with gallamine. *J. Recept. Res.* **1988**, 8, 787-808
- [136] Bourne, H. R.; Meng, E. C.: Rhodopsin Sees the Light. *Science* **2000**, 289, 733-734
- [137] Chothia, C.; Lesk, A. M.: The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* **1986**, 5(4), 823-826

7 Anhang

A Sekundärstrukturvorhersagen

Die verwendeten Zeichen und Symbole richten sich nach

A1 Bacteriorhodopsin

	10	20	30	40	50
Sequenz	MLELLPTAVEGV	SQAQITGRP	EWIWLALGTAL	MGLGTLFLVK	GMGVSDP
GOR	HHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	EEEEET HHH
PHDsec	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH
Psipred	HHHH	EEEE	EEEE	EEE	
Predator	EEEE		EEEE	EEE	
PSA	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH
nnpredict	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	H HHHH	
ssp	HHHHH	HHHHHHHHE		EEEEEEEE	H
nnssp	HHHHHHHHHH		EEEEHHHHHH	HHHHHH	
sspal	HHHHHHHHHH	HHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	
SOPMA	HHH HHHH	EEEE	HEEEHH HHH	EEEEEE	
Consensus	+HHHHHHHHH	+++	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	+

	60	70	80	90	100
Sequenz	DAKKFYAITTL	VPAIAFTMYL	SMLLGYGLTM	VPFGGEQNP	IYWARYADWL
GOR	HHHHHHHEHEE	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	TTTT EEEEE	TEEEETTTT
PHDsec	HHHEEEEEEE	HHHHHHHHHH	EEEEEE	EEEEEE	EEHHHHHHHH
Psipred	EEEEHHHHHH	HHHHHHHHHH	EEEEEE	EEEEEE	EEEEHHHHHH
Predator	EEEEHHHHHH	HHHHHHHHHH	EEE	EEE	EE
PSA	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH
nnpredict	HH HHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHH HHHHHH	
ssp	HHHHHHHH	HHHHHHHHHH	EEEEEE	HHHHHHHH	
nssp	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	EEEE	HHHHHHHH	
sspal	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	EEEE	HHHHHHHHHH	
SOPMA	EEEEH HHH	HEEHHHHE	EEEE	EEHHHHHHE	
Consensus	HH+HHH+HH	HHHHHHHHHH	EEEE	+EHHHHHHHH	

	110	120	130	140	150
Sequenz	FTTPLLLLDL	LALLVDADQ	GILALVGADG	IMIGTLVGAL	TKVYSYRFVW
GOR	TE HHHHHHH	HHHHHHHHHH	EEEEHHHHE	EEEEEE	HHHEEEEEEE
PHDsec	HHHHHHHHHH	EEEEEEEEEE	HHHHHHHH	EEEE	EEEE
Psipred	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	EEEE	EEEE
Predator	EE HHHHHHH	HHHHHHHH	EEE	EEEEEEEEEE	EEEE
PSA	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHH	HHHH	HHHH
nnpredict	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHH HH	HHHHHH	HHHH
ssp	H HHHHHHH	EEEEEE	EEEEHHHH	HHHHHH	EEE
nssp	H HHHHHHH	EEEE	EEE	HHHHHHHH	EEE
sspal	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHH	HHHH	HHHH
SOPMA	EEHHHHHHHE	HHHEEEEE	EEEE	HHHHHHHHHH	HEEE
Consensus	HH+HHHHHH	HHHHHHHH	HEEEHHH+HEE	+HHHHHHHHH	+EEEE

	160	170	180	190	200
				
Sequenz	WAISTAAMLYILYVLFFGFTSKAESMRPEVASTFKVLRNVTVVLWSAYPV				
GOR	HHHHHHHHHHHEEEEEHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHEEEEEEE EE				
PHDsec	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHEEEEEEE E				
Psipred	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHEEEEEEEEEEE E				
Predator	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHEEEEEEEEEEE				
PSA	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
nnpredict	HHHHHHHHHHHHHHHHHH HH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
ssp	HHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHEEEEEEE E				
nssp	HHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHEEEEEEE E				
sspal	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
SOPMA	EHHHHHHHHHHHEEEEEEE H HHHHHHHHHHHHEEEEEEE E				
Consensus	HHHHHHHHHHHHHHHHHHH +HHHHHHHHHHHEEEEEEE+ E				

	210	220	230	240	250
				
Sequenz	VWLI 6 GSEGAGIVPLNIETLLFMVLDVSAKVGFLILLRSRAIFGEAEAPE				
GOR	EEEE T EEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEEHHHHHHHHHHHHHHHH				
PHDsec	EEEEEE EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHH				
Psipred	EEEE EEEHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHH				
Predator	EEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHH				
PSA	HHHHHHH H HH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
nnpredict	H HHH H HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHH				
ssp	EEEE HHHHHHHHHHHHHHEEEEEEE				
nssp	EEEE HHHHHHHHHHHHH EEEHHHHHH				
sspal	HHH EEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHH				
SOPMA	EEEE HHHHEEHHHHHH EEEE HHH				
Consensus	EEEE +++HHHHHHHHHHHHHHHHHHH+HHHHHHHHHH				

	260	270
	
Sequenz	PSAGDGAAATSD	
GOR	HHHHHHHHHHHH	
PHDsec		
Psipred		
Predator		
PSA		
nnpredict		
ssp		
nssp		
sspal		
SOPMA	TT HHH	
Consensus		

A2 Cytochrom-C-Oxidase

		10	20	30	40	50
Sequenz	MFINRWLFSTNHKDIGTLYLLFGAWAGMVG	TALSLLIRAE	L	GQPGTLLGD	
GOR	EEEEHHHH T	TTEEEHHHHHHHHHHHHHEEHHHHHHE	EEEE		TEEEEE	
PHD	EEEEEE	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
Psipred	EEEEEEEE	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
Predator	EEEE	HHHHHHHH		HHHHHHHHHH		
PSA	HHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
Nnpred	HH H H	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
Ssp		EEEEEEEE		HHHHHHHHHHHH		EEEE
Nnssp	EEE EEE	EEEEEE		HHHHHHHHHH		
Sspal	EEE EE	EEEEEE		HHHHHHHHHHHH		
SOPMA	EEEEEH	EEEEHHHHHHHHHHHHHHHEEHHH				EE
Consensus	++EEEE+	+++HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				

		60	70	80	90	3	100
Sequenz	DQIYNVVTAHAFVMIFFMVM	IMIGGF	GNWL	VPLMIGAPDMAF	PRMNNM	
GOR	EEEEEEEEE	HHHHHHHHHHHHHHHHHEEEET	T	EEEEEEE	HHHHHHHTTT		
PHD	EHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHH					H
Psipred	EEEEEEEE	HHHHHHHHHHHHHHHEE		EEE			
Predato	EEEEEEHHHHHHHHHHHEEEEE		EEE				
PSA	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH H	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
Nnpred	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH H	HHHH					HH
Ssp	EEEEEEEE	EEEEEEEE	EEEE	EEEEEEEE			E
Nnssp	EEEEEE	EEEEEE	EE				
Sspal	EEEE	EEHHHHHHHHH		EE			
SOPMA	HHEEEHHHHHEEEEEEEEEEEEE		EEEEEE				E
Consensus	+EEEEHHHHHHHHHHHHHHEE+		+EE+++				

		110	120	130	140	150
Sequenz	SFWLLPPSFL	LLASSMVEAGAGT	GWTVYP	PLAGNLAHAGASV	DLTIFSL
GOR	EEEE	T	HHHHHHHHHHHHHHHH	TEEEEE	HHHHHHHHHHHHHEEHHH	
PHD	HHH	HHHHHEEEEEEE		EEEE	HHHHHHHHH	
Psipred		HHHHHHHHHHHHHHHH		EEEE	HHHHHHHHH	
Predato	EEE	HHHHHHH		EEE	HHHHH	EEEE
PSA	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHH		HHHHHHHHHHHHHHHH		
Nnpred	H	HHHHHHHHHHHH H		HHHHHHHHHHHHHH		
Ssp	EEEEEH	HHHHHHHHH		EEEE		EEEEEEEE
Nnssp		HHHHHHHHHHH		EE		EEEEEE
Sspal	EEE	HHHHHHHHHHH		EE		EEEE
SOPMA	EEEE	EEEEEH	EEH	EEEE		HHHHHEEHH
Consensus	+EEE	++HHHHHHHHHHH		EEE+		HHHHEEHH

	160	170	180	190	200
Sequenz				
GOR	HLAGVSSILGAINFITTIINMKPPAMSQYQTPLFVWSVMITAVLLLLSLP				
PHD	HHHHHEEEEEEEEEEEEEET TEEEEEEEEEEEEHHHHHHHHHHHEEH				
Psipred	HH				
Predato	EEEEEEEEEEEEEEEEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
PSA	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH H HH HHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
Nnpred	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH H HH HHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
Ssp	EE EEEEEEE EEEEEEEEEEE EEEEEEE				
Nnssp	EEEE EEEEEHHHHHHHHHH				
Sspal	HHH EE EEEEEHHHHHHHHHH				
SOPMA	HHHHHHHHHHHHHHHEEEEE EEEEEEEHHHHEEEEE				
Consensus	HHHHHHHHHHHHHHHEEEEE+ EEEEEHHHHHHHHHHH+				

	210	220	230	240	250
Sequenz				
GOR	VLAAGITMLLTDNRNLNTTFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYILILPG				
PHD	HHHHHHEEEEEETTT EEEEE TTT EEEEEEEEEET THEEEEEET				
Psipred	HHHHHHHHHHE EEEEEHHHHH EEEEE				
Predator	EEEEEE E HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
PSA	HHHHHHHHHH HHH HHHHHHH				
Nnpred	EEEEEE HHHHHHHHH EEEEE				
Ssp	EEEE EEE EEE EEEEE				
Nnssp	HHHHHHHHHH EEE EEEEE EEEEE				
Sspal	HHHH EEEEE EEEE EEEEEEEEH EEEEE				
SOPMA	HHHHHHEEEEE EEEE EEEEEEEEE EEEEE				
Consensus	HHHHHHEEEEE+ +E+ +++HHEEE EEEEE				

	260	270	280	290	300
Sequenz				
GOR	FGMISHIVTYYS GKKEPFGYMGMVWAMMSIGFLGFIVWAHHMFTVGMVD				
PHD	T EEEEEEEETTT EEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
Psipred	HHHHHHHHHH E HHHHHHHHHHH EEEEEEEEEEE				
Predato	H HE EEEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
PSA	H HH H HHHHHHHHH HH HHHHHHH H				
Nnpred	EEEEEEEE HHHHHHHHHEEEEEEEEE EEEEE				
Ssp	EEEEEE EEEE EE				
Nnssp	EEEEEE EEEEE EEEEE EEEEE				
Sspal	HHHEEEEEEEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEEEEE				
SOPMA	EEEEEEEE HEEHHHHHHHH HHEEEE HEEEE				
Consensus	+EEEEEEEE +HHHHHHHHHHH+HHH+++HHHEEEEE				

	310	320	330	340	350	
Sequenz	TRAYFTSATMIIAIP TGVKVFSWLATLHG GNIKWSPAMMWALGFIFLFTV				
GOR	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	HHH TTT T	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	
PHD	HHHHHHHEEEEE	HHHHHHHHHH	EEE	HHHHHHHHHHHHHE	HHHHHHHHHHHHHHHE	
Psipred	HHHHHHHEEEEE	HHHHHHHHHH	EEEE	HHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHH	
Predato	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
PSA	HHHHHHHHHHHH HH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHH H HH	HHHHHH H HH	
Nnpred	EEEEEEEEEEEE	EEEEEEEEEEEE	EEEEEEEEEEEE	HHHHHEEEEEEEEEEEEE	HHHHHEEEEEEEEEEEEE	
Ssp	EEEEEE	EEE	EEEEEEEEEEEE	HHHHHH EEEEE	HHHHHH EEEEE	
Nnssp	EEE EEEEE	EEHHHHHH	EEEEEEEEEEEE	HHHHHH EEEEE	HHHHHH EEEEE	
Sspal	EE EEEEE	HHHHHHHHHH	EEEEEEEEEEEE	HHHHHH HHEEH	HHHHHH HHEEH	
SOPMA	HEE EEEEE	HHHHHH	EEEEEEEEEEEE	HHHHHH EEEEE	HHHHHH EEEEE	
Consensus	+HHHHHEEEEE	HHHHHHHHHH	EEEEEEEEEEEE	HHHHHH HHEE+E	HHHHHH HHEE+E	

	360	370	380	390	400	
Sequenz	GGLTGIVLANSSLDIVLHDTYYVVAHFHYVLSMGAVFAIMGGFVHWFPLF				
GOR	T EEEEEHHHHEEEEEHHHEEEHHEEH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
PHD	HHHHHHEE	EEE	EEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	
Psipred	EEEE EEEEE	EEEEEEEE	EEEEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	
Predato	HHHHHHHHH	EEE	EEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	
PSA	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHH	
Nnpred	EEEEEEEE	EEEE	EEEEEEEEEEEE	EEEE EEEEE	EEEEEEEE	
Ssp	EEEE	EEE	EEEE	EEEEEEEEEEEE	EEEEEEEEEEEE	
Nnssp	EEEE	EEE	EEEE	HHHHH	EEEEEEEEEEEE	
Sspal	EEEE	EEEE	EHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHEEEEE	EEEEEEEEEEEE	
SOPMA	EEEE	HEEEE	EEEEHHHHHHHH	HHHHHHHHHEEEEE	EEEEEEEEEEEE	
Consensus	+EEEE+	EEE	+EEEEHHHHHHH	+HHHHHHHHHH	+EE+	

	410	420	430	440	450	
Sequenz	SGYTLNDTWAKIHFAIMFVGVNMTFFPQHFLGLSGMPRRYS DYPDAYTMW				
GOR	TTT HHHHHHHHHHHHHHHH	EEEEHHT TT	EEEEETT	E	EEEEEE	
PHD	HHHHHHHHHHHEEEEE	EEE	EEEEEEEEEEEE	HHHH	HHHH	
Psipred	EE EEEEEEEEEEEHHHH	EEEEEEEE	EEEEEEEE	HHHHH	HHHHH	
Predator	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HHH	HHH	
PSA	HHHHHHHHHHHHHHH	H	HHHHHHHHHHHH	H HH	H HH	
Nnpred	EEEEHHHHHEEEEEEEEE	EEEEEEEE	EEEEEEEE	EEEE	EEEE	
Ssp	EEEEEE	EEEEEE	EEEEEE	EEEE	EEEE	
Nnssp	EEEEEE	EEEEEE	EE	HHHH	HHHH	
Sspal	HHHHHHHEEEEE	HHEE	HHHEE	EEH	EEH	
SOPMA	HHHHH EEEEE	EEE	HHHEE	EEH	EEH	
Consensus	HHHHHHHEEEEE	++	EEEEEEEE	HHHH	HHHH	

	110	120	130	140	150	
Sequenz	ALDYVVSNASVMNLLIISFDRYFCVTKPLTYPVKRTTKMAGMMIAAAWVL				
GOR	HHHHHHHHHHHHHHHEEEHTTTTTT TT EHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
PHDseq	EEE E EHHHHH EEEEE EEEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
Psipred	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH EEEE HHHHEHHHHHHHHHH				
PREDATOR	HHHHH HHHHHHHHHHHH EEEE EEEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
PSA	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH EEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
nnpred	HH				
ssp	HHEEEEE HHHHHHHHHHEEEEEEEEEEE EEEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
nnssp	HHHHEE EEE EEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
sspa	HHHEEEE EE EE EE HHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
SOPMA	HHHEEEE HEHEE E EE HHHHHHHHHHHHE				
Consensus	HHHH++++HHHHHHH+H+H EEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHH				

	160	170	180	190	200	
Sequenz	SFILWAPAILFWQFIVGVRTVEDGECYIQFFSNAAVTFGTAAIAAFYLPVI				
GOR	HHHHHHHHHHHHHHE TTHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHE				
PHDseq	EEEEEE EEEE EEEEE EEEEEEEEEEEEE EE				
Psipred	HHHHHHHHHHHHHHE EEE EEEHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
PREDATOR	HHHH HHHHHHHHHHHHHH EEEEE HHHHHHHHHHH HHHH				
PSA	HHHHHHHHHHHHH EEEEEEEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
nnpred	HHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
ssp	HHHHHH HHHHHHHHE EEEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEEE				
nnssp	HHHH EEEEEEE EE EEEEE HHHHHHHH EE				
sspa	HHHHH HHHHHHH EEE EEEEE HHHHHHHHHHHH E				
SOPMA	EEEEEE HEEHH EE EEEEE HHEHH HHHEE E				
Consensus	HHHHHHHHHHHHHHHE EEEEE HHHHHHHHHHHHHHHHHHE				

	210	220	230	240	250	
Sequenz	IMTVLYWHISRASKSRIKKDKKEPVANQEPVSPSLVQGRIVKPNNNNMFG				
GOR	EEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHTHHHHHHHH TT EHHEEEEE TTT				
PHDseq	EEHH				
Psipred	HH				
PREDATOR	HHHHHHHHH HHHHHHHH EE				
PSA	HHHHHEEEEE E E				
nnpred	HHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHH H HHHH				
ssp	EE EEEEEEE EEEEE				
nnssp	EEEEEEEE EE				
sspal	EEEEEEEE HHH EEE				
SOPMA	EEEEEEEE EEEEE				
Consensus	EEHHH++HH+ H++ E				

	360	370	380	390	400
Sequenz	GQNGDEKQ	NIVARKIVKMTKQPAK	KKPPPSREKKVTR	ILAILLAFIITW
GOR		HHHHHHHHHHHHHHHHHHHTTT		HHHHHHHHHHHHHHHHHHEEET	
PHDseq		HHHHHHHHHHHHHHHH		HHHHHHHHHHHHHHHHHHEEE	
Psipred		HHHHHH	HHH	HHHHHHHHHHHHHHHHHH	
PREDATOR		HHHHHHHHHHHHHHHH		HHHHHHHHHHHHHHHHHH	
PSA		HHHHHHHHHH		HHHHHHHHHHHHHHHH	
nnpred		HHHHHHHHHHHHHHHHHH		HHHHHHHHHHHHHHHH H	
ssp		HHHHHHHHHH		HHHHHHHHHHHHHHHH	
nnssp		HHHHHHHHHHHHHH		HHHHHHHHHHHHHHHHHH	
sspa		HHHHHHHHHH		HHHHHHHHHHHHHHHHHH	
SOPMA		HHHHHHHHHHHHHH		HH HHHHHHHHHHHHE	
Consensus		HHHHHHHHHHHHHH		HHHHHHHHHHHHHHHH	

	410	420	430	440	450
Sequenz	APYNVMVLINTFCAPCIPNTVWTIGYWLCYINSTINPACYALCNATFKKT			
GOR		T EEEEEETTETT TTEEEEEETTEETTTTTTTT TTEHHHHHHHHHH			
PHDseq		EE EEEEEHHH	HHHHHHHEEEEEEE	EEE HHHHHHH	
Psipred		HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHH	
PREDATOR		EEEEEE	EEEEEEEEEEEEEE	HHHHHHHHHHHH	
PSA		HHHHHHHHHH	EEEEEEEEEEEEEEEE	HHHHHHHHHH	
nnpred		HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHHH H HHHH	
ssp		EEEEEE	EEEEEEEEEEEE	HHHHHHHHHH	
nnssp		EEEE	EEE EEEEE	HHHH	
sspal		EEEE	EE HHHH	HHHH HHH	
SOPMA		EEEE	EEEEEEEEEE	EHHH	
Consensus		+EEEE	+EEEEEEEEEE+	+HHHHHHHHHH	

	460	470	480	490	500
Sequenz	FKHLLMCHYKNIGATR			
GOR		HHHHHHHHHTTTTTEE			
PHDseq		HHHHH E			
Psipred		HHHHH			
PREDATOR		HHHHHHH			
PSA		HHHHHHHHH H H H			
nnpred		HHHHHHHHH			
ssp		HHHH			
nnssp		HHHHHEE	H		
sspal		HHH EE			
SOPMA		HHHHH H			
Consensus		HHHHHHH			

B Hardware

Silicon Graphics Workstations

IRIS INDIGO² R10000

IRIS O2 R5000

IRIS O2 R12000

Silicon Graphics Origin 2000

mit 38 R10000 Prozessoren (am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

C Software

DELPHI	Programm zur Untersuchung elektrostatischer Eigenschaften von Molekülen (INSIGHTII-Modul).
DISCOVER	Programm zur Durchführung molekülmechanischer und moleküldynamischer Berechnungen mit dem CV-Kraftfeld (INSIGHTII-Modul).
GRIN/GRID	Programm zur Berechnung molekularer Interaktionsfelder
GROMACS	Molecular Modelling-Software zur Durchführung molekülmechanischer und moleküldynamischer Berechnungen mit dem GROMACS-Kraftfeld.
INSIGHTII	Molecular Modelling-Software-Paket der Firma MSI/BIOSYM
MOLCAD	Programm zur Untersuchung und Visualisierung physikochemischer Eigenschaften von Molekülen (SYBYL-Modul).
PROCHECK	Programm zur Überprüfung der stereochemischen Eigenschaften von Proteinen
SPARTAN	Software-Paket zur Durchführung quantenchemischer und semiempirischer Berechnungen
SURFNET	Programm zur Untersuchung und Visualisierung von Moleküloberflächen
SYBYL	Molecular Modelling-Software-Paket der Firma TRIPOS
XCLUSTER	Programm zur Einteilung von Molekülkonformationen in Gruppen entsprechend Ihrer strukturellen Ähnlichkeiten

D Aminosäuren: Ein- und Dreibuchstabencode

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Iso	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	O
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 Einheiten

Å	Ångstrom, 10^{-10} m
K	Kelvin (0 K = 273,15 °C)
Kcal	Kilokalorie (1 kcal = 4,186 kJ)
Ps	Picosekunde (1 ps = 10^{-12} s)

Lebenslauf

Name	Arne Kuhn
Geburtstag/-ort	9. April 1970 in Berlin
Eltern	Hannelore Kuhn, geb. Glitzky Dr. Horst Kuhn
Schulbildung	
1976 - 1980	Bodelschwingh-Grundschule, Gladbeck
1980 - 1989	Städtisches Ratsgymnasium, Gladbeck
Studium	
9/1989 – 10/1994	Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin
10/1994	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/1995	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
12/1995	Approbation als Apotheker
11/1994 – 10/1995	Pharmaziepraktikum in der Arminius-Apotheke, Berlin
Berufstätigkeit	
03/1996 – 02/2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
12/1995 – 02/1996 und seit 06/2000	Angestellter in der Dr. Kuhns Apotheke, Gladbeck
Promotion	
seit 03/1996	Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje