

**Molecular Modelling Untersuchungen
zur allosterischen Modulation
muskarinischer Rezeptoren**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Frau Jasmin Corinna Dorothee Schrobang

aus Schwelm

April 2008

Aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje

Koreferent: Prof. Dr. M. Kassack

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2008

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2004 bis April 2008 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje für die Überlassung des interessanten Themas und seine hervorragende Betreuung, die durch eine stete Ansprechbarkeit, Diskussionsbereitschaft und zahlreiche Anregungen gekennzeichnet war.

Herrn Prof. Dr. K. Mohr danke ich für die hervorragende Kooperation, die Überlassung der experimentellen Daten und hilfreichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. M. Kassack danke ich herzlich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung in das Thema	1
1.1	Einleitung	3
1.2	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	4
1.2.1	Aufbau	4
1.2.2	Nomenklatur und Pin Points	5
1.2.3	Struktur	6
1.2.4	Signaltransduktion	7
1.2.5	Neuere Erkenntnisse in Zusammenhang mit GPCRs	8
1.3	Begriffsdefinitionen	10
1.4	Allosterische Modulation	11
1.4.1	Das allosterische ternäre Komplex-Modell	11
1.4.2	Affinitätsparameter für allosterische Modulatoren	12
1.5	Muskarinische Rezeptoren	13
1.5.1	Acetylcholin	13
1.5.2	Vorstellungen zur Aktivierung der muskarinischen Rezeptoren	14
1.5.3	Muskarinische Rezeptorsubtypen	15
1.5.4	Bindungsstellen der muskarinischen Rezeptoren	17
1.5.5	Orthosterische Liganden	19
1.5.6	Allosterische Liganden	23
1.5.7	Rezeptormodelle	24
2	Methoden	25
2.1	Modellbau	27
2.1.1	Sequenzanalyse	27
2.1.2	Sequenzalignment	27
2.1.3	Übertragung von Koordinaten auf die Zielsequenz	28
2.1.4	Seitenkettenplatzierung	28
2.1.5	Bestimmung des Protonierungszustandes	28
2.2	Kraftfeldverfahren	29
2.2.1	Molekülmechanik	29
2.2.2	Moleküldynamik	30
2.3	Protein-Ligand-Komplexe	32
2.3.1	Konformationsanalyse	32

2.3.2	Docking-Verfahren	32
2.3.3	GRID-Wechselwirkungsfelder	32
2.3.4	Parametrisierung der Liganden für Moleküldynamiksimulationen	32
2.3.5	Quantenchemische Verfahren	33
2.4	Weitere Methoden	33
2.4.1	PROCHECK	33
2.4.2	SURFNET	34
2.4.3	Datenbank-Recherche	34
I	Charakterisierung des humanen M5- und M2-Rezeptors	35
3	Zielsetzung	39
4	Durchführung und Ergebnisse	43
4.1	Vorarbeiten zur Erstellung der Rezeptormodelle	45
4.1.1	Sequenzanalyse	45
4.1.2	Rhodopsin Kristallstruktur	47
4.2	Bau des M5-Rezeptormodells	48
4.2.1	Modellierung des zweiten extrazellulären Loops	48
4.2.2	Geometrieoptimierung	50
4.2.3	Überprüfung der Protein-Geometrie	50
4.3	Bau des M2-Rezeptormodells	51
4.3.1	Modellierung des N-Terminus	51
4.3.2	Überprüfung der Protein-Geometrie	53
4.4	Aufbau der Moleküldynamiksimulationen	54
4.4.1	Parametrisierung der Rezeptormodelle	54
4.4.2	Parametrisierung von Liganden	55
4.4.3	Simulationsbedingungen	56
4.4.4	Auswertung	58
4.5	MDS der unbesetzten Rezeptormodelle	59
4.5.1	MDS des M5-Rezeptors	59
4.5.2	MDS des M2-Rezeptors	61
4.6	Charakterisierung der orthosterischen Bindungstasche	62
4.6.1	Bindungsmodus N-Methylscopolamin (NMS)	62
4.6.2	MDS des NMS-besetzten M5-Rezeptormodells	65
4.6.3	MDS des NMS-besetzten M2-Rezeptormodells	66
4.6.4	Vergleich der NMS-besetzten Rezeptoren	66
4.7	Charakterisierung der allosterischen Bindungstasche	68
4.7.1	Bindungsmodus W84	68
4.7.2	MDS mit W84 am M5-Rezeptor	72
4.7.3	MDS mit W84 am M2-Rezeptor	74
4.8	Vergleich der ternären Komplexe mit NMS und W84	77

5	Diskussion	79
5.1	Homologiemodelle des M5- und M2-Rezeptors	81
5.1.1	Kürzung der Sequenz des i3-Loops	82
5.1.2	Modellierung der flexiblen Loop-Regionen	83
5.1.3	Stereochemische Qualität	84
5.1.4	Berücksichtigung expliziter Wassermoleküle	85
5.2	Moleküldynamiksimulationen	86
5.2.1	Auswahl des Kraftfeldes	86
5.2.2	Wahl des Protonierungszustandes	86
5.2.3	Parametrisierung von Liganden	87
5.2.4	Moleküldynamiksimulationen ohne Rückhaltekräfte	87
5.2.5	Vergleich der beiden unbesetzten Rezeptormodelle	88
5.3	Protein-Ligand-Komplexe	91
5.3.1	N-Methylscopolamin	91
5.3.2	W84	93
II	Allosterische Modulation des M2-Rezeptors	97
6	Zielsetzung	99
7	Durchführung und Ergebnisse	103
7.1	Einfluss von Rezeptormutanten auf die Bindung von W84	105
7.1.1	Mutationen E172L und E175Q im M2-Rezeptor	105
7.1.2	Mutationen Y177Q, W422A und T423H im M2-Rezeptor	106
7.2	Bindungsmodus weiterer orthosterischer Liganden	111
7.2.1	Acetylcholin	111
7.2.2	Pilocarpin	112
7.2.3	Vergleich zwischen Agonist, Partialagonist und inversem Agonist	113
7.3	Bindungsmodus weiterer Alkanbisammonium-Derivate	114
7.3.1	Docking von Alkanbisammoniumverbindungen	115
7.3.2	Untersuchungen zum Bindungsmodus von Naphmethonium	117
7.3.3	Vergleich von Naphmethonium und W84	119
7.3.4	Vergleich verschiedener ternärer Naphmethonium-Komplexe	120
7.3.5	MDS von verkürzten Naphmethonium-Derivaten am M2-Rezeptor	122
7.3.6	Bedeutung von W427 im M2-Rezeptor für Naphmethonium/-Derivate	125
7.4	Bindungsmodus Gallamin	128
7.4.1	Bindung von Gallamin am M2-Rezeptor	129
7.4.2	GRID-Wechselwirkungsfelder an Mutanten des M2-Rezeptors	130
7.4.3	MDS mit Gallamin am freien und NMS-besetzten M2-Rezeptor	133
7.5	Bindungsmodus von Hybridsubstanzen im M2-Modell	135
7.5.1	Erstellung eines offenen Rezeptormodells	136
7.5.2	Docking	138
7.5.3	Moleküldynamiksimulationen	138
7.5.4	Vergleich der Bindungsmodi von DDT-5	140
7.6	Einfluss aromatischer Aminosäuren am M2-Rezeptor	141
7.6.1	Aromatische Aminosäuren des M2-Rezeptors	142
7.6.2	Aromatisches Cluster	145
7.6.3	Einzelne Aminosäuren	147

8	Diskussion	149
8.1	Bindungsmodus von W84	151
8.1.1	Mutationen E172L und E175Q	151
8.1.2	Mutationen Y177Q und W422A, T423H	152
8.2	Vergleich Agonist, Partialagonist und inverser Agonist	154
8.3	Vergleich Alkanbisammoniumverbindungen	155
8.3.1	Docking von Alkanbisammoniumverbindungen	155
8.3.2	Vergleich W84 – Naphmethonium	158
8.3.3	Vergleich verschiedener ternärer Naphmethonium-Komplexe	160
8.3.4	Einfluss von W427 auf Alkanbisammoniumderivate	161
8.4	Vergleich W84 – Gallamin	162
8.4.1	Bindungsmodus Gallamin	162
8.4.2	Einfluss von Mutationen auf die Gallamin-Bindung	163
8.5	Bindungsmodi von Hybridsubstanzen	165
8.5.1	Offenes Rezeptormodell	165
8.5.2	Docking und Moleküldynamiksimulationen	166
8.6	Vorhersage affinitätsgebender aromatischer Aminosäuren	166
8.6.1	Aromatisches Cluster	167
8.6.2	Einzelne Aminosäuren	168
8.7	Abschließende Bemerkung und Ausblick	169
9	Zusammenfassung	173
A	Anhang	189
A.1	Abkürzungsverzeichnis	191
A.2	Einheiten	192
A.3	Hardware	192
A.4	Software	192
A.5	Nomenklatur von Aminosäuren	193
A.6	Sequenzanalyse muskarinischer Rezeptoren	194
A.7	Sekundärstrukturvorhersagen	195
A.8	Moleküldynamik-Skript	197
A.9	Informationen zu aromatischen Aminosäuren	201

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors	5
1.2	Zwei-Zustände-Modell der konstitutiven Aktivität	9
1.3	Das allosterische ternäre Komplexmodell	12
1.4	Biosynthese und Biotransformation Acetylcholin	14
1.5	Signaltransduktion muskarinischer Rezeptoren	16
1.6	Agonisten an muskarinischen Rezeptoren	19
1.7	Partialagonisten an muskarinischen Rezeptoren	20
1.8	Antagonisten vom Tropin und Scopin-Typ	21
1.9	vollsynthetische Antagonisten	21
1.10	Antagonisten mit Subtyp-Präferenz	22
1.11	Allosterische Modulatoren	23
4.1	ClustalW-Alignment	46
4.2	PROCHECK - Rhodopsin-Kristallstruktur	47
4.3	Struktur-Sequenz-Alignment M ₅ -Rezeptor	48
4.4	Lage des β -Faltblattes im Rhodopsin	49
4.5	PROCHECK - M5-Ausgangsmodell	50
4.6	Struktur-Sequenz-Alignment M ₂ -Rezeptor	52
4.7	PROCHECK - M2-Ausgangsmodell	53
4.8	Aufbau des Membransystems für MDS	56
4.9	Dynamikprotokoll für MDS	58
4.10	MDS des unbesetzten M ₅ -Rezeptors	60
4.11	Geometrieüberprüfung des unbesetzten M ₅ -Rezeptors aus MDS	60
4.12	MDS des unbesetzten M ₂ -Rezeptors	61
4.13	Geometrieüberprüfung des unbesetzten M ₂ -Rezeptors aus MDS	62
4.14	Bindungsmodus NMS im Ausgangsmodell des M ₅ -Rezeptors	64
4.15	Bindungsmodus NMS im Ausgangsmodell des M ₂ -Rezeptors	64
4.16	MDS des NMS-besetzten M ₅ -Rezeptors	65
4.17	MDS des NMS-besetzten M ₂ -Rezeptors	66
4.18	RMSD-Werte der NMS-besetzten Rezeptormodelle	67
4.19	Komplexgeometrie NMS besetzter Rezeptormodelle	67
4.20	Bindungsmodus von W84 am M ₅ -Rezeptor	69
4.21	Bindungsmodus von W84 am M ₂ -Rezeptor	70
4.22	MDS des M ₅ -W84-Komplexes	72

4.23 MDS des M ₅ -NMS-W84-Komplexes	73
4.24 MDS des M ₂ -W84-Komplexes	75
4.25 MDS des M ₂ -NMS-W84-Komplexes	75
4.26 MDS zu W84 - Übersicht der Bindungstaschen	77
5.1 Vergleich der dritten intrazellulären Loops von OPSD, M ₂ und M ₅	83
5.2 Vergleich der RMSD-Werte der unbesetzten Rezeptormodelle	88
5.3 RMSF-Werte der unbesetzten Rezeptormodelle	90
5.4 Energie-Werte der unbesetzten Rezeptormodelle	90
7.1 Mutationen M ₂ E172L/4.74 und M ₂ E175Q/4.77	105
7.2 Mutation M ₂ T423H/7.36	107
7.3 Mutationen M ₂ Y177Q/5.29 und M ₂ W422A/7.35	107
7.4 Vergleich ternärer Komplexe am M ₂ wt und an M ₂ W422A,T423H	108
7.5 Abstände von NMS und W84 am M ₂ wt und an M ₂ W422A,T423H	109
7.6 MDS ternärer Komplexe am M ₂ wt und an M ₂ W422A,T423H	110
7.7 MDS des M ₂ -Acetylcholin-Komplexes	112
7.8 MDS des M ₂ -Pilocarpin-Komplexes	112
7.9 Fluktuationen der orthosterisch besetzten M ₂ -Rezeptoren	114
7.10 Strukturen von Alkanbisammonium-Verbindungen und Derivaten	115
7.11 Docking-Geometrien der Alkanbisammoniumverbindungen	117
7.12 MDS des M ₂ -Naphmethonium-Komplexes	118
7.13 MDS des M ₂ -NMS-Naphmethonium-Komplexes	118
7.14 MDS des M ₂ -Pilocarpin-Naphmethonium-Komplexes	121
7.15 Vergleich der Fluktuationen orthosterischer M ₂ -Ligand-Komplexe	122
7.16 MDS des M ₂ -EHW477-Komplexes	123
7.17 MDS des M ₂ -NMS-EHW477-Komplexes	123
7.18 MDS des M ₂ -MM7A-Komplexes	124
7.19 MDS des M ₂ -NMS-MM7A-Komplexes	125
7.20 H-Brückenmuster zwischen M ₂ W427/7.40 und Naphmethonium und - Derivaten	126
7.21 Einfluss von M ₂ W427/7.40 auf die Alkanbisammonium-Bindung	127
7.22 Bindungsmodus von Gallamin im M ₂ wt	129
7.23 Einfluss von M ₂ N419 auf die Gallamin-Bindung	130
7.24 Einfluss von M ₂ E172 und M ₂ E175 auf die Gallamin-Bindung	132
7.25 Einfluss von M ₂ Y177 und M ₂ W422/7.35 auf die Gallamin-Bindung	133
7.26 Bindungsmodus von Gallamin im M ₂ wt	133
7.27 MDS des M ₂ -Gallamin-Komplexes	134
7.28 MDS des M ₂ -NMS-Gallamin-Komplexes	134
7.29 orthosterisch-allosterische Hybridsubstanzen	135
7.30 Lokalisation von Y104/3.33 im M ₂ -Rezeptormodell	137
7.31 Vergleich geschlossener - offener M ₂ -Rezeptor	137

7.32	RMSD-Werte für MDS mit DDT-5	139
7.33	Energiewerte für MDS mit DDT-5	139
7.34	orthosterisch-allosterische Hybridsubstanzen	140
7.35	Lokalisation aromatischer Aminosäuren im M ₂ -Rezeptor-Modell	142
7.36	Für Mutationsstudien interessante aromatische Aminosäuren	143
7.37	Aromatisches Cluster als Trennebene zwischen den Bindungstaschen	145
7.38	Lokalisation von Y80/2.61 im M ₂ -Rezeptormodell	146
8.1	Aufbau des Membransystems für MDS	159

Tabellenverzeichnis

1.1	Kristallstrukturen des bovinen Rhodopsin	7
1.2	Subtypen der muskarinischen Rezeptoren	15
1.3	wichtige Aminosäuren der orthosterischen Bindungstasche	18
4.1	ungünstige Aminosäure-Geometrien der Rhodopsin-Kristallstruktur	47
4.2	ungünstige Aminosäure-Geometrien des M ₅ -Ausgangsmodells	51
4.3	ungünstige Aminosäure-Geometrien des M ₂ -Ausgangsmodells	54
4.4	System-Zusammensetzung für MDS	57
4.5	Simulations-Parameter für GROMACS	58
4.6	Transmembranäre helikale Bereiche der muskarinischen Rezeptoren	59
4.7	GRID-Sonden	63
4.8	Zusammenfassung der RMSD-Werte für den M ₅ -Rezeptor	73
4.9	Geometrieüberprüfung des M ₅ -NMS-W84-Komplexes aus MDS	74
4.10	Zusammenfassung der RMSD-Werte für den M ₂ -Rezeptor	76
4.11	Geometrieüberprüfung des M ₂ -NMS-W84-Komplexes aus MDS	76
7.1	RMSD-Werte der orthosterisch besetzten M ₂ -Rezeptoren	113
7.2	Docking-Ergebnis der Alkanbisammonium-Verbindungen	116
7.3	Vergleich Naphmethonium - W84	120
7.4	Einfluss einer H-Brücke zu M ₂ Trp427/7.40 auf die Bindung von verkürzten Alkanbisammonium-Derivaten	128
7.5	Docking-Ergebnisse Hybrid-Substanzen	138
7.6	Geometrieüberprüfung - repräsentative Struktur des M ₅ -NMS-W84- Komplexes	141
7.7	Sequenzen Rezeptoren für biogene Amine	144
7.8	Konservierung aromatischer Aminosäuren innerhalb der Rezeptorfamilie für biogene Amine	144
8.1	Affinitätsdaten für Alkanbisammonium-Verbindungen	156

Kapitel 1

Einführung in das Thema

1.1 Einleitung

Funktionelle Proteine, wie z.B. Rezeptoren, entfalten ihre natürliche Wirkung durch die Bindung einer körpereigenen Substanz, dem physiologischen Liganden, im aktiven Zentrum des Proteins, der sogenannten orthosterischen Bindungstasche. Der Begriff Orthosterie entstammt dem Griechischen und leitet sich von „ortho“ für „aufrecht, richtig“ und „steros“ für „Ort“ ab. Das aktive Zentrum ist entsprechend die „richtige“ Bindungsstelle. Dem gegenüber steht der Begriff Allosterie. „Allo“ bedeutet soviel wie „anders“ und meint, dass Proteine nicht nur über das aktive Zentrum beeinflusst werden können, sondern auch durch Stoffe, die außerhalb an einer weiteren Bindungsstelle angreifen. Allosterische Modulatoren entfalten ihre Wirkung durch eine Veränderung der Proteinstruktur und einer dadurch geänderten Bindungsneigung der orthosterischen Liganden im aktiven Zentrum.

Die allosterische Modulation eines Proteins wurde 1904 erstmalig von Christian Bohr beschrieben [1]. Er beobachtete bei der Untersuchung der Oxygenierung von Hämoglobin statt eines hyperbolischen einen sigmoidalen Kurvenverlauf und schloss auf eine positive kooperative Bindung des Sauerstoffs. Die Bindung eines Sauerstoffmoleküls wird durch bereits gebundene Sauerstoffmoleküle an einer anderen Untereinheit erleichtert. Eine weitere Beobachtung war, dass Kohlendioxid die Affinität von Sauerstoff für Hämoglobin senkt. Beide Beobachtungen können durch eine allosterische Modulation des Hämoglobins erklärt werden.

Lange Zeit kannte man neben Hämoglobin nur wenige Proteine, die ebenfalls allosterisch modulierbar sind. In den 1960er Jahren wurden mit den Benzodiazepinen Substanzen in die Therapie eingeführt, die ihre Wirkung ebenfalls über eine allosterische Modulation vermitteln. Sie greifen an einer Benzodiazepin-Bindungsstelle im $GABA_A$ -Rezeptor an und verstärken den Chlorid-Einstrom durch eine Erhöhung der Kanalöffnungsfrequenz. Der genaue Wirkungsmechanismus, nämlich die allosterische Modulation des $GABA_A$ -Rezeptors, war zu dieser Zeit allerdings noch unbekannt [2].

Mittlerweile ist für viele Proteine eine allosterische Modulation nachgewiesen worden, die zum Teil bereits in der Arzneimittel-Therapie Einzug gehalten hat [3]. Auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), welche in der Zellmembran lokalisiert sind, sind allosterisch modulierbar. Ein Beispiel hierfür sind muskarinische Acetylcholinrezeptoren. Lüllmann zeigte 1969, dass diese Rezeptoren allosterisch beeinflussbar sind (siehe Kapitel 1.5.6) [4]. Da ihr körpereigener Botenstoff, der Neurotransmitter Acetylcholin einer der wichtigsten chemischen Überträgerstoffe im vegetativen Nervensystem ist, bietet eine Beeinflussung der muskarinischen Rezeptoren durch allosterische Modulatoren ein großes Potenzial in der Entwicklung neuer Arzneistoffe. Denn sie weisen gegenüber Substanzen, die mit Acetylcholin um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, einige Vorteile auf (vgl. Abschnitt 1.5.6) [5]. Zusätzlich eignen sich allosterische Modulatoren als Testsubstanzen der experimentellen Pharmakologie, um das Verständnis zum Aufbau und zur Aktivierung von GPCRs weiter zu vertiefen [5].

In der vorliegenden Arbeit wird ein Schwerpunkt auf die Betrachtung der allosterischen Bindungsstelle muskarinischer Rezeptoren gelegt. Mittels theoretischer Methoden des *Molecular Modelling* werden Rezeptormodelle des M₂- und M₅-Rezeptors erstellt, die einen tieferen Einblick in die Rezeptorgeometrie der muskarinischen Rezeptoren geben und bei der Entwicklung potenter allosterischer Modulatoren helfen sollen. Ergebnisse dieser Arbeit sind möglicherweise auf andere GPCRs übertragbar oder können helfen, offene Fragen im Zusammenhang mit der physiologisch wichtigen Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zu klären.

1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren gehören zur Gruppe der Transmembran-Rezeptoren. Das menschliche Genom enthält mehr als 1000 unterschiedliche GPCRs, die damit eine der größten Protein-Familien darstellen [6, 7]. Dies wird auch dadurch deutlich, dass zur Zeit etwa die Hälfte aller Arzneimittel auf dem Markt die Funktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren beeinflussen [8, 9, 10]. Damit stellen sie eines der größten Targets (engl., Ziele) bei der Behandlung der unterschiedlichsten Erkrankungen dar [11].

GPCRs ermöglichen einer Zelle, auf externe Stimuli zu reagieren, da sie ein von extrazellulär ankommendes Signal über die Zellmembran hinweg in das Cytosol, das Zellinnere, weiterleiten können, ohne dass das Signalmolekül durch die Membran gelangt. Die Struktur dieser Signale ist unterschiedlich. Einzelne Lichtquanten, Ionen, kleinere Moleküle wie z.B. biogene Amine oder auch Peptide, Hormone, Nucleotide, Lipide und Eicosanoide können als Liganden für GPCRs dienen [8, 12, 13, 14], was auf eine hohe strukturelle Diversität des aktiven Zentrums hinweist.

Die Einteilung der GPCRs in Familien wurde mehrfach modifiziert. Etwa 60% der GPCRs haben sensorische Funktionen (z.B. für Geruchs- und Geschmacks-Sinn) und werden auch als olfaktorische Rezeptoren bezeichnet. Die Einteilung der nicht-sensorischen GPCRs in fünf Hauptfamilien wird derzeit durch das GRAFS-System vorgenommen: *Glutamat*, *Rhodopsin*, *Adhesion*, *Frizzled/taste2* und *Secretin* [7, 15]. Eine andere Bezeichnung der Familien unterscheidet zwischen Klasse A (Rhodopsin-ähnlich), B (Secretin-ähnlich) und C (Glutamat-Rezeptoren) und weiteren Klassen [7, 13]. Muskarinische Rezeptoren werden der Klasse A zugeordnet, welche die größte Gruppe der nicht-sensorischen GPCRs bildet [7].

1.2.1 Aufbau

G-Protein gekoppelte Rezeptoren werden auch 7TM-Rezeptoren genannt [16, 17], da sie aus einem Bündel von sieben überwiegend hydrophoben α -Helices bestehen, die die Plasmamembran einer Zelle durchdringen (vgl. Abb. 1.1) [9, 18]. Die Helices werden durch jeweils drei extra- und intrazelluläre *Loops* (engl., Schleifen) miteinander

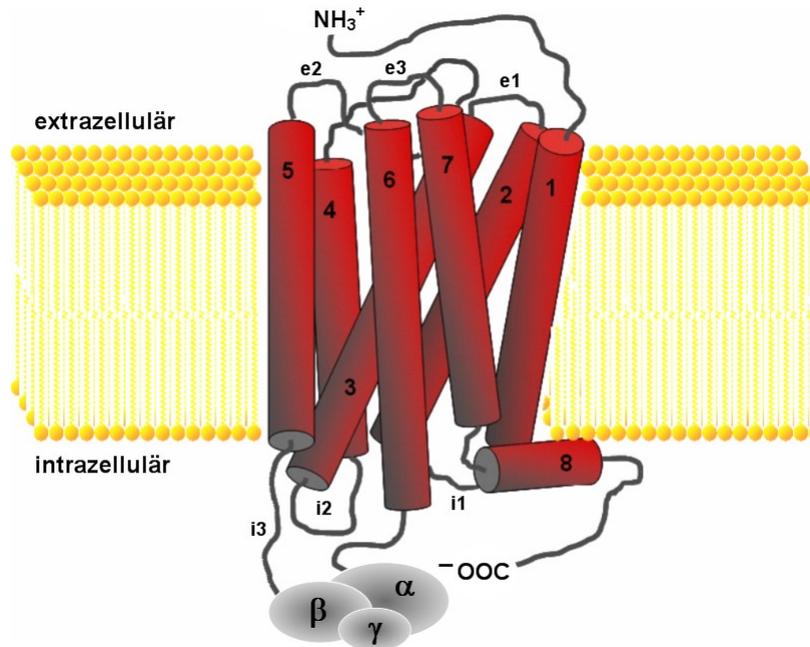


Abbildung 1.1: Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors innerhalb der Plasmamembran, bestehend aus einer Phospholipiddoppelschicht. Helices sind als rote Zylinder dargestellt. Lokalisation des G-Proteins am dritten intrazellulären Loop (i3), bestehend aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Das Größenverhältnis Rezeptorprotein/G-Protein ist nicht naturgetreu wiedergegeben.

verbunden. Der N-Terminus ist extra- und der C-Terminus intrazellulär lokalisiert. Im C-terminalen Bereich befindet sich eine achte Helix, die amphiphile Eigenschaften hat und im Bereich der Grenzschicht zwischen der Phospholipidmembran und dem Cytosol lokalisiert ist [19]. Der zweite extrazelluläre Loop ist bei Rezeptoren der Familie A über eine Disulfidbrücke mit der dritten transmembranären Helix verbunden. Es existieren weitere hochkonservierte Aminosäuren, die als *Pin Points* (engl., Nadelspitzen, genau bestimmte Punkte) bezeichnet werden und von Baldwin identifiziert wurden [20].

Die Rezeptoren vermitteln ihre Information für die Zelle über ein an sie gekoppeltes G-Protein, welches daraufhin eine Signalkaskade in Gang setzt. Das G-Protein besteht aus drei Untereinheiten und ist im aktivierten Zustand des Rezeptors am dritten intrazellulären Loop und dem C-Terminus des GPCRs gebunden [19, 21].

1.2.2 Nomenklatur und Pin Points

Mittlerweile existieren mehrere Bezifferungssysteme für G-Protein gekoppelte Rezeptoren. In dieser Arbeit wird die Nomenklatur von Ballesteros und Weinstein verwendet [22]. Hier wird die am höchsten konservierte Aminosäure jeder transmembranären Helix mit der Helixnummer und der Zahl 50 gekennzeichnet. Die entsprechenden Positionen im bovinen Rhodopsin (Sehpurpur des Rindes), welches der Namensgeber für Familie A der GPCRs ist, sind N55/1.50, D83/2.50, R135/3.50, W161/4.50, P215/5.50, P267/6.50 und P303/7.50 [20].

Aminosäuren, N-terminal zu dieser Position, erhalten niedrigere Positionsnummern. C-terminal gelegene Aminosäuren erhalten höhere Ziffern. Diese Nomenklatur beschränkt sich auf die helikalen Bereiche, da die flexiblen Loops häufig unterschiedliche Längen aufweisen. Für die vorliegende Arbeit wird für die muskarinischen Rezeptoren eine Erweiterung der Nomenklatur auf Loop-Regionen vorgenommen. Durch diese orientierende Bezifferung ist vor allem für den langen zweiten extrazellulären Loop (e2) ein einfacherer Vergleich zwischen den muskarinischen Rezeptoren möglich. Alle Aminosäuren die in der e2-Sequenz vor der Disulfidbrücke auftreten und das Cys der Disulfidbrücke selbst, erhalten analog zum vierten transmembranären Bereich (TM4) eine vier vor ihrer Positionsnummer. Alle Aminosäuren nach der Disulfidbrücke und vor der fünften transmembranären Helix (TM5) werden mit einer fünf vor ihrer Positionsnummer gekennzeichnet.

1.2.3 Struktur

Die Aufklärung der Kristallstruktur von G-Protein gekoppelten Rezeptoren erweist sich als äußerst schwierig. Zum einen ist eine Kristallisation des Proteins innerhalb der strukturell stabilisierenden Phospholipidmembran schwierig, zum anderen erfolgt meist keine ausreichende Expression der Rezeptoren in der Membran und es fehlt eine ausreichende Menge an Proteinmaterial, um eine Kristallisation zu ermöglichen [23]. Bis vor kurzem existierten nur Kristallstrukturen für das bovine Rhodopsin in hoher Auflösung, welches beim Sehvorgang eine Rolle spielt.

Die erste Struktur von Rhodopsin wurde von Palczewski mit einer Auflösung von 2,8Å vorgestellt [19]. Es hat eine Sequenzlänge von 348 Aminosäuren und ist einzigartig unter den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, da der physiologische Ligand 11-*cis*-Retinal im Rezeptor kovalent an K296/7.43 gebunden wird [19]. Der Rezeptor liegt im inaktiven Grundzustand vor. Während der Aktivierung erfolgt durch die Aufnahme eines Lichtquants eine Konfigurationsumkehr des Retinals zum *all-trans*-Retinal. Der aktive Zustand des Rhodopsin hält allerdings nur sehr kurz an, was eine Kristallisation dieser Rezeptorzustände schwierig macht [24, 25].

Die Kristallstruktur des Rhodopsins zeigt sieben Helixbündel, die zum Teil strukturbrechende Glycine oder Proline enthalten und gewinkelt vorliegen. Weiterhin findet sich ein β -Faltblatt im Bereich des N-Terminus und des e2-Loops. Die Disulfidbrücke befindet sich zwischen den beiden Cysteinen C110/3.25 im transmembranären Bereich (TM3) und C187 im e2. Der N-terminale Bereich weist einige glykolisierte Aminosäuren auf. Im C-Terminus gibt es zwei Cysteine, die palmitoyliert sein können [26, 27].

Seither gelang die Auflösung mehrerer Röntgenstrukturen in höherer Auflösung. Eine Übersicht über diese Einträge in der RCSB-Protein-Datenbank [28] gibt Tabelle 1.1. Die erste Kristallstruktur, die die gesamte Aminosäuresequenz des bovinen Rhodopsins aufklären konnte, ist die Struktur 1U19 aus dem Jahr 2004 [27].

Alle bisherigen Kristallstrukturen zeigen das bovine Rhodopsin im inaktiven Grundzustand. Der Aktivierungsprozess von GPCRs ist noch nicht vollständig verstanden. Eine

PDB-Code	Datum der Veröffentlichung	Auflösung [Å]	Anzahl Aminosäuren pro Monomer	
1F88 [19]	06/2000	2,80	A: 338	B: 305
1HZX [29]	01/2001	2,80	A: 340	B: 301
1GZM [30]	05/2002	2,65	A: 329	B: 329
1L9H [31]	05/2002	2,60	A: 340	B: 301
1U19 [27]	07/2004	2,20	A: 348	B: 348

Tabelle 1.1: Röntgenkristallstrukturen des bovinen Rhodopsin in der Proteindatenbank.

größere Konformationsänderung der helikalen Bereiche und Loops wird allerdings angenommen [32, 33, 34]. Vor kurzem wurde eine neue Kristallstruktur veröffentlicht, die dem aktiven Zustand des bovinen Rhodopsins ähneln soll [26]. Gegenüber dem inaktiven Rhodopsin liegt hier ein Rezeptor vor, in dem *all-trans*-Retinal gebunden ist. Durch die niedrige Auflösung von 4,15Å konnten allerdings nicht alle Aminosäure-Seitenketten der Helices und Loops aufgeklärt werden. Da sich in dieser Kristallstruktur kaum Änderungen der Struktur des gesamten Rezeptors ergeben, muss diese Veröffentlichung kritisch betrachtet werden.

Kürzlich gelang nun zum ersten Mal die Kristallisation eines weiteren Rezeptors, des adrenergen β_2 -Rezeptors [35, 36]. Die Struktur unterstützt die These der strukturellen Konservierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und ist ein Hinweis darauf, dass die Erstellung von Homologie-Modellen auf Basis anderer Kristallstrukturen nützlich für die Arzneimittelentwicklung sind. Beim β_2 -Rezeptor wurden zwei verschiedene Strategien angewendet um eine Kristallisation des Membran-Proteins zu ermöglichen. Eine Übersicht über diese neuesten Kristallstrukturen findet sich bei Shukla [37].

1.2.4 Signaltransduktion

Die Signaltransduktion der G-Protein gekoppelten Rezeptoren erfolgt hauptsächlich über verschiedene heterotrimere G-Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften [38]. Sie verfügen über drei funktionelle Untereinheiten, G_α , G_β und G_γ . Die Einteilung der G-Proteine erfolgt über die Eigenschaften der G_α -Untereinheit in die vier Klassen G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$. Wichtige Effektorproteine für die Untereinheiten der G-Proteine sind die Adenylatcyclase, die Phospholipasen C und A_2 , die cGMP-Phosphodiesterase sowie Ionenkanäle. Die Signalübertragung verläuft über einen Zyklus unterschiedlicher Funktionszustände der G-Proteine:

1. Zunächst liegt im inaktiven Grundzustand das G-Protein als Heterotrimer vor, welches *Guanosindiphosphat* (GDP) gebunden hat.
2. Die Kopplung des G-Proteins an den GPCR erfolgt nach der Aktivierung des Rezeptors durch ein extrazelluläres Signalmolekül. Die Bindung des G-Proteins an

den Rezeptor führt zu einer Dissoziation von GDP und einer Assoziation von *Guanosintriphosphat* (GTP) an die G_{α} -Untereinheit.

3. Nach Bindung von GTP dissoziieren die $G_{\beta\gamma}$ - und G_{α} -Untereinheiten als Komplex. Die Bindung zum GPCR wird unterbrochen und die freie G_{α} -Untereinheit mit gebundenem GTP überträgt das Signal an das nachgeschaltete Effektorprotein. Damit stellt die G_{α} -GTP-Form die aktivierte Form des G-Proteins dar. Durch Bildung der *second messenger* (engl., sekundäre Botenstoffe) wird das Signal innerhalb der Zelle weitergeleitet. Der $G_{\beta\gamma}$ -Komplex ist ebenfalls aktiv an der Signalweiterleitung beteiligt. Bevor der an den Rezeptor gebundene Ligand dissoziiert, kann der noch aktive Rezeptor weitere G-Proteine aktivieren.
4. Der Zyklus der Signaltransduktion wird durch die Hydrolyse von GTP geschlossen. GTP hydrolysiert durch die intrinsische GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheit wieder zu GDP. Die G_{α} -Untereinheit assoziiert mit dem $G_{\beta\gamma}$ -Komplex und der heterotrimeren Grundzustand wird wieder hergestellt.

In Abschnitt 1.5.3 auf Seite 15 werden die intrazellulären Signalwege und die Effektorsysteme der G-Protein-Familien $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ detaillierter betrachtet.

1.2.5 Neuere Erkenntnisse in Zusammenhang mit GPCRs

Da G-Protein gekoppelte Rezeptoren eines der wichtigsten Targets auf dem Gebiet der Arzneimittelforschung sind, findet man hierzu entsprechend sehr weitreichende Forschungen. Zwei wichtige Gebiete, in denen in den letzten Jahren intensive Forschungen betrieben wurden, betreffen die konstitutive Aktivität von Rezeptoren und die Möglichkeit der Dimerisierung oder Oligomerisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Wichtige Erkenntnisse zu beiden Gebieten werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Konstitutive Aktivität

Die erste Beobachtung der konstitutiven Aktivität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren machten Costa und Herz 1989 [39]. Sie beobachteten, dass GPCRs auch ohne Anwesenheit von Agonisten in der Lage sind, ihre an sie gekoppelten G-Proteine zu aktivieren. Diese Beobachtungen führten zu einer Redefinition der Begriffe Agonismus und Antagonismus (vgl. Abschnitt 1.3, S. 10). Einen Überblick gibt Seifert [40].

Für die Erklärung der konstitutiven Aktivität von Rezeptoren und ihre Interaktion mit Liganden ist das „Zwei-Zustände-Modell“ ausreichend [40], welches in Abbildung 1.2 dargestellt wird. Es geht von zwei möglichen Rezeptorzuständen eines GPCRs aus. Das Protein liegt entweder in seiner inaktiven R- oder der aktiven R*-Konformation vor. Beide Konformationen stehen im Gleichgewicht zueinander. Der Übergang vom R zum R*-Zustand kann spontan ablaufen und ist unabhängig von der Anwesenheit eines Agonisten. Dadurch, dass einige Rezeptoren im aktiven Zustand vorliegen, kommt eine Basalaktivität des Effektorsystems zustande [41, 42].

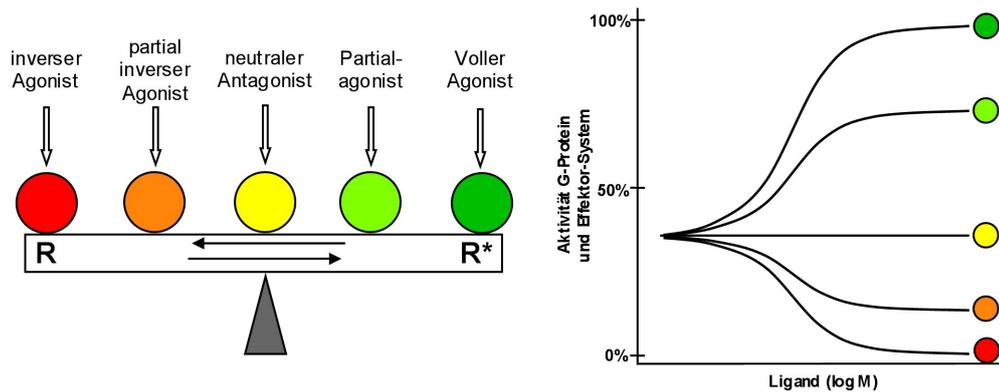


Abbildung 1.2: Zwei-Zustände-Modell der konstitutiven Aktivität. links, Beeinflussung des Gleichgewichtes zwischen inaktivem R und aktivem R*-Zustand durch Liganden mit unterschiedlichen Eigenschaften; rechts, Einfluss der Liganden auf die Aktivität des Rezeptors (modifiziert nach [40]).

Ähnlich einer Wippe können die unterschiedlichen Liganden das Gleichgewicht auf die eine oder andere Seite bewegen (vgl. Abbildung 1.2, linke Seite). Volle Agonisten stabilisieren den R*-Zustand maximal und verschieben das Gleichgewicht auf die rechte Seite. Weiterhin besitzen sie intrinsische Aktivität und steigern die basale Austauschrate von GDP gegen GTP, was zu einer verstärkten Aktivität des Effektor-Systems führt. Dies spiegelt sich in einem Anstieg in der Konzentration-Effekt-Kurve wieder (vgl. Abbildung 1.2, rechte Seite). Partialagonisten sind weniger effizient am Rezeptor und können den R*-Zustand nicht maximal stabilisieren. Auch können sie nur in einem geringeren Maße die Austauschrate zwischen GDP und GTP erhöhen, was nur zu einer submaximalen Aktivierung des Effektorsystems führt.

Inverse Agonisten, die früher als kompetitive Antagonisten bezeichnet wurden, stabilisieren den inaktiven R-Zustand und reduzieren den basalen GDP-GTP-Austausch. Dadurch werden die Effektorsysteme blockiert, und der antagonistische Effekt kommt zustande. Partiale inverse Agonisten können den R-Zustand nicht maximal stabilisieren. Ebenso ist noch eine Rest-Aktivität der Effektorsysteme zu verzeichnen. Neutrale Antagonisten ändern nichts an dem Gleichgewichtszustand der Rezeptorgeometrien oder der Basalaktivität der G-Proteine, aber sie blockieren sowohl die hemmenden Effekte der inversen Agonisten als auch die aktivierenden Effekte der Vollagonisten.

Viele inverse Agonisten wurden früher für reine Antagonisten gehalten, da sie neben einer Reduzierung des basalen GDP-GTP-Austausches auch den Effekt von Agonisten blockieren. Für die Messung von konstitutiver Aktivität sind sensitive Testsysteme notwendig. Wenn z.B. eine zu geringe Anzahl an Rezeptoren exprimiert wird ist eine Maskierung des inversen Agonismus möglich. Dies hat in der Vergangenheit zu Fehlinterpretationen und -definitionen der Eigenschaften von Liganden an GPCRs geführt [40].

Dimerisierung/Oligomerisierung

Früher ging man davon aus, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit ihren G-Proteinen im Verhältnis 1:1 interagieren. In jüngerer Zeit hat es bei vielen Rezeptoren Hinweise gegeben, dass sie nicht nur monomer sondern auch als Dimere und Oligomere vorliegen [43, 44]. Diese werden mit verschiedenen Aspekten der Rezeptorpharmakologie in Verbindung gebracht. Hierzu gehören unter anderem Ligand-Bindung, Aktivierung, Signal-Transduktion und Rezeptor-Reifung [45]. Auch für muskarinische Rezeptoren sind solche Komplexe beschrieben worden [45, 46].

1.3 Begriffsdefinitionen

Um die Forschungsergebnisse der letzten Jahre, z.B. auf dem Gebiet der konstitutiven Aktivität bei der Nomenklatur und Klassifikation von Rezeptoren einzubinden, hat die NC-IUPHAR (The International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification) im Jahr 2003 einige Begriffe der quantitativen Pharmakologie neu definiert [47]. In Anlehnung an diese Definitionen werden im Folgenden einige Begriffe und ihre Bedeutung, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, kurz definiert:

- **Agonist:** Ein Ligand, der an einen Rezeptor bindet und dessen Status so verändert, dass eine biologische Antwort resultiert. Konventionelle Agonisten steigern die Rezeptoraktivität, während *inverse Agonisten* (s.u.) diese reduzieren. Agonisten besetzen entweder die gleiche Bindungsstelle wie der endogene Agonist, oder sie binden an eine andere Bindungsregion, die räumlich von der orthosterischen Bindungsstelle entfernt liegt. Diese Agonisten werden auch als *Allosterische Aktivatoren* (s.u.) beschrieben.
- **Voller Agonist:** Ein Agonist, der den Rezeptor maximal stimulieren kann, d.h. dass es zu einer maximalen Antwort des angesprochenen Effektorsystems kommt.
- **Partialagonist:** Ein Agonist, der in einem bestimmten Gewebe und unter bestimmten Bedingungen nicht den gleichen Effekt erzielen kann als ein anderer Agonist unter gleichen Bedingungen. Selbst sehr hohe Konzentrationen des Partialagonisten können keine maximale Antwort des Effektorsystems erzielen.
- **Inverser Agonist:** Ein Ligand, der den Anteil der Rezeptoren, die in einem aktiven Zustand vorliegen, minimiert. Hierdurch erfolgt eine verminderte oder unterbrochene Signalweiterleitung.
- **Rezeptoraktivität:** Anteil der Rezeptoren, die in einer aktiven Konformation vorliegen (R^*).
- **Antagonist** Ein Arzneistoff, der die Wirkung eines anderen Arzneistoffes, normalerweise eines Agonisten, reduziert.

- **Allosterischer Modulator:** Ein Ligand, der die Affinität (Bindungsneigung) eines Agonisten oder Antagonisten der orthosterischen Bindungsstelle durch Bindung an einer anderen Bindungsstelle als der orthosterischen beeinflusst.
- **Allosterischer Verstärker:** Ein Ligand, der die orthosterische Ligand-Affinität oder Wirksamkeit verstärkt, ohne selbst einen Effekt auszulösen.
- **Allosterischer Inhibitor:** Ein Ligand, der die orthosterische Ligand-Affinität oder Wirksamkeit vermindert.
- **Allosterischer Aktivator:** Ein Ligand, der selbst agonistisch wirkt, aber an einer anderen als der orthosterischen Bindungsstelle bindet.
- **Allosterische Interaktion:** Eine Wechselwirkung zwischen Liganden, die an verschiedenen, nicht überlappenden Bindungsstellen des Rezeptor-Proteins bindet.

1.4 Allosterische Modulation

Wie eingangs erwähnt, beruht die allosterische Modulation auf einer Beeinflussung der Ligand-Bindung im aktiven Zentrum eines Proteins durch Bindung an einer von diesem Zentrum entfernten Stelle im Protein (vgl. Abschnitt 1.1). Die Einflussnahme der orthosterischen und allosterischen Liganden auf ihre Bindungsneigung zum Rezeptor ist gegenseitig. Hierbei gibt es zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen kann der allosterische Modulator die Geometrie des aktiven Zentrums verändern, was zu einer veränderten Bindungsneigung des orthosterischen Liganden führt. Zum anderen kann der allosterische Modulator bevorzugt an einem bestimmten Rezeptorzustand binden. Das Gleichgewicht der Rezeptorzustände wird dann auf die entsprechende Seite verschoben. Ein allosterischer Modulator kann die Bindung hemmen, unbeeinflusst lassen oder auch fördern. Man spricht dann von einer negativen, neutralen oder positiven Kooperativität [48]. Zur Beschreibung der allosterischen Modulation ist das allosterische ternäre Komplex-Modell geeignet.

1.4.1 Das allosterische ternäre Komplex-Modell

Das allosterische ternäre Komplexmodell, welches in Abbildung 1.3 dargestellt ist, wurde 1988 von Ehlert eingeführt [49]. Es betrachtet die gegenseitige Einflussnahme von orthosterischem Liganden und allosterischem Modulator auf die Bindung zum Rezeptor. Dabei werden mehrere Rezeptor-Ligand-Komplexe betrachtet.

Das allosterische ternäre Komplex-Modell berücksichtigt nicht die Aktivitätszustände der Rezeptoren, die Bindung von G-Proteinen und die Effektivität der Liganden und ist daher nur für die Erklärung von reinen Bindungsstudien an Rezeptoren geeignet. Weiterhin sind einige weitaus kompliziertere Modelle eingeführt worden, die zusätzlich zur reinen

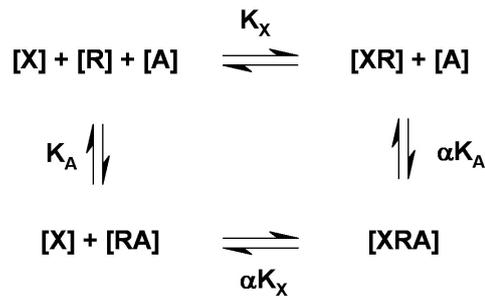


Abbildung 1.3: Das allosterische ternäre Komplex-Modell nach Ehlert [49]. [R], Konzentration des Rezeptors; [X], Konzentration des orthosterischen Radioliganden; [A], Konzentration des allosterischen Modulators; [XR]/[RA], einfacher Rezeptor-Ligand-Komplex; [XRA], ternärer Komplex; K_X/K_A , Geschwindigkeitskonstante für die Bindung von X bzw. A am Rezeptor R; α , Kooperativitätsfaktor.

Bindung der orthosterischen und allosterischen Liganden auch z.B. die Bindung des G-Proteins und die Effektivität des Komplexes berücksichtigen [48]. Da sich die meisten allosterischen Modulatoren wie Antagonisten verhalten, ist das ternäre Komplex-Modell von Ehlert für die Fragestellungen in dieser Arbeit ausreichend [50, 51].

1.4.2 Affinitätsparameter für allosterische Modulatoren

Durch Dissoziations- bzw. Gleichgewichtsbindungsexperimente mit radioaktiv markierten orthosterischen Liganden (Radioliganden) können Affinitätsparameter des allosterischen Liganden am untersuchten Rezeptor bestimmt werden [50, 51]. Hierzu werden experimentell bestimmte Geschwindigkeitskonstanten der Liganden mit dem allosterischen ternären Komplex-Modell ausgewertet. Der $pEC_{0,5diss}$ -Wert repräsentiert hierbei den negativen dekadischen Logarithmus der Modulator-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der Dissoziation des orthosterisch gebundenen Radioliganden führt. Dieser Wert ist ein Maß für die Bindungsstärke eines allosterischen Modulators am orthosterisch besetzten Rezeptor, da eine veränderte Dissoziationsgeschwindigkeit des orthosterischen Liganden durch den Modulator verursacht wird. Ein direkter Affinitätsparameter ist der pK_A -Wert, der den negativen dekadischen Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Modulators am Rezeptor wiedergibt. Dieser Wert ist ein Maß für die Bindung des allosterischen Modulators am orthosterisch unbesetzten Rezeptor (freier Rezeptor).

Ist die Affinität des allosterischen Modulators zum orthosterisch besetzten Rezeptor ($pEC_{0,5diss}$) kleiner als zum freien Rezeptor (pK_A), so spricht man von negativer Kooperativität. Dies kann auch durch den Kooperativitätsfaktor α ausgedrückt werden, denn das Produkt aus K_A und α gibt ebenfalls die Affinität des allosterischen Modulators zum orthosterisch besetzten Rezeptor wieder. Der Wert für α liegt hier zwischen Null und Eins. Die Dissoziation des Radioliganden von der orthosterischen Bindungsstelle wird weniger stark verzögert als die Assoziation.

Ist die Affinität zum freien Rezeptor (pK_A) kleiner als zum orthosterisch besetzten Rezeptor ($pEC_{0,5diss}$), spricht man von positiver Kooperativität. Die Dissoziation des Radioliganden wird hier stärker verzögert als die Assoziation. Der Wert für α ist in diesem Fall größer Eins. Sind die Affinitätsparameter gleich groß, ist die Kooperativität zwischen orthosterischem und allosterischem Liganden neutral.

1.5 Muskarinische Rezeptoren

Muskarinische Rezeptoren sind wichtiger Bestandteil des parasympathischen Nervensystems. Sie bilden zusammen mit den nikotinischen Rezeptoren, die ligandengesteuerte Ionenkanäle darstellen, einen Gegenpart zum sympathischen Nervensystem und seinem Botenstoff Noradrenalin. Der Neurotransmitter Acetylcholin ist der physiologische Ligand der muskarinischen Rezeptoren.

1.5.1 Acetylcholin

Die Entdeckung des Acetylcholin als Neurotransmitter geht auf Otto Loewi zurück. Er war der erste, der 1921 eine chemische Substanz entdeckte, die für die Auslösung eines Nervenimpulses verantwortlich war. Es gelang ihm, Vagusnerven von Fröschen in einer Kochsalzlösung zu stimulieren, in der vorher bereits Herzen stimuliert worden waren. Auslöser der Stimulation konnte hierfür nur eine chemische Substanz sein, die er „Vagusstoff“ nannte. Henry Dale identifizierte diese Substanz dann später als Acetylcholin. „Für ihre Entdeckungen bei der chemischen Übertragung der Nervenimpulse“ erhielten Loewi und Dale 1936 den Nobelpreis für Medizin.

Biosynthese und Biotransformation

Die Biosynthese und Biotransformation von Acetylcholin (ACh) ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Zunächst wird durch Decarboxylierung von Serin das biogene Amin Ethanolamin gebildet. Dieses wird danach durch eine dreifache Übertragung eines Methylrestes zu Cholin umgewandelt. Die Cholin-Acyltransferase überträgt zur Bildung von Acetylcholin anschließend einen Acetyl-Rest von Acetyl-Coenzym A auf Cholin.

Im synaptischen Spalt erfolgt eine Deaktivierung der ACh-Wirkung durch die spezifische Acetylcholin-Esterase (AChE). Diese spaltet bis zu 25.000 Acetylcholinmoleküle pro Sekunde in Cholin und Acetat [53]. Acetylcholin wird durch diese hydrolytische Reaktion sehr schnell unwirksam und kann daher nicht zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden. Im Serum findet sich eine unspezifische Cholinesterase, die ACh ebenfalls in Cholin und Acetat spalten kann.

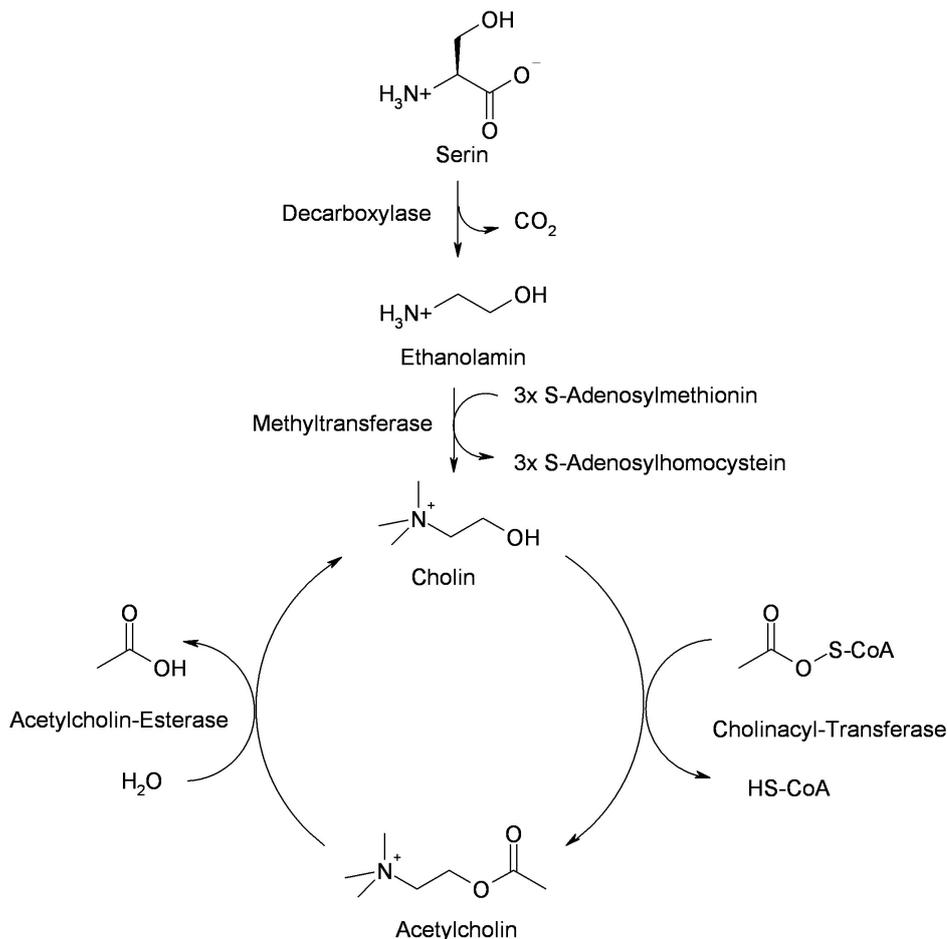


Abbildung 1.4: Biosynthese und Biotransformation von Acetylcholin; modifiziert nach [52].

1.5.2 Vorstellungen zur Aktivierung der muskarinischen Rezeptoren

Allgemein wird für die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine größere Konformationsänderung vor allem der drei transmembranären Bereiche TM3, TM6 und TM7 angenommen [32, 33, 34]. Hierdurch soll es auch zu größeren Konformationsänderungen des i3 und des C-Terminus kommen. Diese Bereiche binden das G-Protein. Neuere Vorstellungen gehen von einem sogenannten „Kipp-Schalter-Modell“ aus, bei dem sich während der Aktivierung die intrazellulären Bereiche nach außen bewegen, während die extrazellulären Bereiche der Helices eine Einwärtsbewegung vollziehen [54]. Der zweite extrazelluläre Loop soll ebenfalls eine Rolle im Aktivierungsprozess spielen.

Für den inaktiven Grundzustand der muskarinischen Rezeptoren wird ein Netzwerk aus stabilisierenden hydrophoben Wechselwirkungen postuliert [55]. Durch die Bindung von Acetylcholin im aktiven Zentrum soll eine Konformationsänderung der Helices und eine Änderung des Wasserstoffbrücken-Musters stattfinden, die den Rezeptor in den aktiven Zustand überführen. Bedeutung hat hierbei auch die Größe der positiv geladenen Kopfgruppe. Tetramethylammonium-Ionen wirken agonistisch an muskarinischen Rezeptoren. Im Gegensatz hierzu führt eine Ethylsubstitution von Acetylcholin zu einer deutlichen Verminderung der Signal-Weiterleitungsstärke [55].

1.5.3 Muskarinische Rezeptorsubtypen

Durch Klonierungsstudien konnten die fünf unterschiedlichen Rezeptorsubtypen M_1 - M_5 identifiziert werden. Basisinformationen über die einzelnen Rezeptorsubtypen gibt Tabelle 1.2. Die Homologie der muskarinischen Rezeptoren untereinander beträgt über die gesamte Länge der Aminosäuresequenzen, je nach Rezeptorpaarung, zwischen 42% (M_2 - M_5) und 54% (M_2 - M_4) [56]. Die N- und C-Termini sowie der dritte intrazelluläre Loop variieren zum Teil stark in ihrer Länge [57].

Merkmal [58]	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5
SWISS-Prot Eintrag	P11229	P08172	P20309	P08173	P08912
Chromosomen-Lokalisation	11q13	7q31-q35	1q41-q44	11p12-p11.2	15q26
Sequenzlänge	460	466	590	479	532
Länge des N-Terminus	24	22	67	31	29
Länge des i3-Loops	157	181	240	185	229
Länge des C-Terminus	39	23	43	23	34
G-Protein-Familie	$G_{q/11}$	$G_{i/o}$	$G_{q/11}$	$G_{i/o}$	$G_{q/11}$
Effekt	PLC \uparrow	AC \downarrow	PLC \uparrow	AC \downarrow	PLC \uparrow

Tabelle 1.2: Charakteristika der fünf humanen muskarinischen Rezeptorsubtypen.

Funktionelle Einordnung und Signaltransduktion

Basierend auf den unterschiedlichen G-Protein-Kopplungsprofilen werden die muskarinischen Rezeptoren in zwei funktionelle Klassen eingeteilt. Muskarinische M_1 -, M_3 - und M_5 -Rezeptoren koppeln vorwiegend an G-Proteine der $G_{q/11}$ -Familie, während M_2 - und M_4 -Rezeptoren selektiv die $G_{i/o}$ -Familie zur Signaltransduktion nutzen [57]. Einen schematischen Überblick über die Signaltransduktion durch muskarinische Rezeptoren gibt Abbildung 1.5. Die Familie der $G_{q/11}$ -Proteine vermitteln die Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ (PLC β). Diese katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu den beiden *second messengers* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) [57]. IP₃ fördert die Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Ca²⁺-Ionen, während DAG allosterisch die Proteinkinase C aktiviert. Ausgelöste Prozesse sind z.B. die Sekretion von Mediatoren und Signalstoffen sowie die Kontraktion der glatten Muskulatur [52]. M_1 -, M_3 - und M_5 -Rezeptoren können außerdem Einfluss auf die Aktivität der Phospholipase A₂ (PLA₂) und D sowie von Tyrosinkinasen ausüben [59].

Die G-Proteine der $G_{i/o}$ -Familie inhibieren die Adenylatcyclase (AC). Diese hat die Aufgabe, den *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu produzieren. Durch den verminderten cAMP-Spiegel in der Zelle wird die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) herabgesetzt. Dies führt zu einer verminderten Phosphorylierung der entsprechenden Zielproteine [57]. Prozesse, die durch den erniedrigten cAMP-Spiegel vermindert werden, sind unter anderem die Lipolyse, die Glykolyse und die Relaxation der glatten

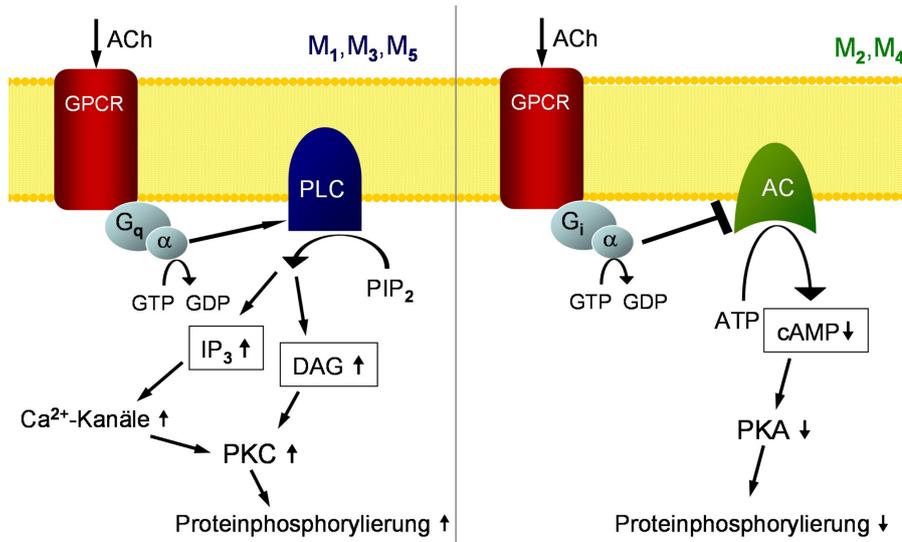


Abbildung 1.5: links, Signaltransduktion vermittelt durch den M_1 , M_3 bzw. M_5 -Rezeptor; rechts, Signaltransduktion vermittelt durch den M_2 bzw. den M_4 Rezeptor.

Muskulatur [52]. M_2 - und M_4 -Rezeptoren sind nicht nur an der Blockade der AC beteiligt, sondern können auch die Aktivität der PLA_2 beeinflussen [59].

Neben den klassischen Signaltransduktionswegen über G-Proteine konnte für muskarinische Rezeptoren auch eine davon unabhängige Signalweiterleitung beobachtet werden [17, 16].

Gewebsverteilung und -funktion

Muskarinische Rezeptoren sind als Rezeptoren des Parasympathikus sowohl im zentralen Nervensystem, als auch in peripheren Geweben weit verbreitet. Eine Übersicht hierüber findet sich in der GPCR-Datenbank der NC-IUPHAR. Als Quelle sei hierauf und Referenzen hierin [60] verwiesen. Die wichtigsten Punkte werden im Folgenden zu den einzelnen Rezeptorsubtypen vorgestellt.

M_1 -Rezeptor:

- ZNS: zerebraler Cortex, Basal Ganglien, Limbisches System; Peripherie: Vestibularapparat, glatte Muskulatur (Blase).
- auslösende Effekte: Bronchokonstriktion, Autorezeptor: Modulation der ACh Freisetzung.

M_2 -Rezeptor:

- ZNS: Zerebraler Cortex, Thalamus, Hirnstamm, Medulla, Hypothalamus; Peripherie: Herz, Vestibularapparat, Ziliarmuskulatur, glatte Muskulatur (Blase).
- auslösende Effekte: Auslösung der Colon-Bewegung nach Nahrungsaufnahme, Autorezeptor: Modulation der ACh Freisetzung.

M₃-Rezeptor:

- ZNS; Peripherie: Lunge, Ziliarmuskulatur, glatte Muskulatur (Blase), Drüsen.
- auslösende Effekte: Kontraktion glatter Muskulatur.

M₄-Rezeptor:

- ZNS: Striatum; Peripherie: glatte Muskulatur (Blase).
- auslösende Effekte: Autorezeptor: Modulation der Ach-Freisetzung, Zellwanderung von Keratinozyten, Kontraktion glatter Muskulatur.

M₅-Rezeptor:

- ZNS: nur geringe Expression, Substantia nigra; Peripherie: nur geringe Expression, Vestibularapparat, Ziliarmuskulatur, glatte Muskulatur (Blase).
- auslösende Effekte: Modulation der dopaminischen Neurotransmission, Stimulation der Freisetzung von Magen-Säure, Vasodilatation.

Neuere Untersuchungen mit *Knockout-Mäusen* geben tiefere Einblicke in die Physiologie und Pathophysiologie der muskarinischen Rezeptoren. Sie stellen ein Werkzeug zur pharmakologischen Charakterisierung einzelner Gene oder Proteine dar. Es handelt sich hierbei um gesunde Tiere, die ein oder mehrere Gene nicht exprimieren können. Dadurch steht dem Organismus z.B. ein bestimmter Subtyp eines Proteins nicht mehr zur Verfügung. Veränderungen in der Physiologie dieser Tiere lassen Rückschlüsse auf die Aufgaben und Funktionen des ausgeschalteten Gens und seines entsprechenden Proteins zu. Hierdurch ergeben sich auch neue Möglichkeiten in der Arzneistoffentwicklung zur Behandlung von Alzheimer, Schizophrenie, Schmerz, Übergewicht und Diabetes [61, 62].

1.5.4 Bindungsstellen der muskarinischen Rezeptoren

Orthosterische Bindungstasche

Die orthosterische Bindungstasche ist bei muskarinischen Rezeptoren hochkonserviert was eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Subtypen schwierig macht [63].

Aminosäuren, die für die Bindung von orthosterischen Liganden wichtig und im aktiven Zentrum der muskarinischen Rezeptoren lokalisiert sind, wurden in den 1990er Jahren durch Mutationsstudien mit verschiedenen muskarinischen Rezeptorsubtypen identifiziert [57]. Die hierzu korrespondierenden Aminosäuren des M₂- und des M₅-Rezeptors sind in Tabelle 1.3 aufgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit sind zusätzlich die allgemeine Nomenklatur der Aminosäuren und die korrespondierenden Aminosäuren des bovinen Rhodopsin angegeben. Man unterscheidet zwischen Aminosäuren, die in Mutations- und Bindungsstudien einen Einfluss sowohl auf die Bindung von Agonisten als auch von Antagonisten ausüben oder die jeweils nur eine Art von Liganden in ihrer Bindungsstärke

allgemeine Nomenklatur	humaner M ₂ -Rezeptor	humaner M ₅ -Rezeptor	bovines Rhodopsin
A			
Agonisten und Antagonisten			
3.28	W99	W106	E113
3.32	D103	D110	A117
6.48	W400	W455	W265
7.39	Y426	Y481	A292
B			
Agonisten			
3.33	Y104	Y111	T118
5.39	T187	T194	V204
5.42	T190	T197	M207
6.51	Y403	Y458	Y268
7.43	Y430	Y485	K296
C			
Antagonisten			
2.57	S76	S83	G90
6.52	N404	N459	A269

Tabelle 1.3: Für die Bindung von orthosterischen Liganden wichtige Aminosäuren. A, Aminosäuren, die in Mutationsstudien einen Einfluss auf die Bindung von orthosterischen Agonisten und Antagonisten zeigen; B, Aminosäuren, die in Mutationsstudien einen Einfluss auf die Bindung von Agonisten zeigen; C, Aminosäuren, die in Mutationsstudien einen Einfluss auf die Bindung von Antagonisten zeigen.

beeinflussen [57]. Beim Vergleich der muskarinischen Rezeptoren mit Rhodopsin fällt auf, dass nur W6.48 und Y6.51 konserviert vorliegen. Weiterhin ist auffällig, dass die Bindungstasche der muskarinischen Rezeptoren im Vergleich mit Rhodopsin über sehr viele aromatische Aminosäuren verfügt. Für diese wird die Geometrie eines aromatischen Käfigs postuliert, der die positiv geladene Ammonium-/Amino-Kopfgruppe des muskarinischen Rezeptor-Liganden aufnimmt [64, 57]. Diese positive Ladung ist auf die benachbarten aliphatischen Kohlenstoff- und Wasserstoffatome verteilt. Dadurch verhält sich diese Gruppe wie eine schwach positiv geladene Kugel. Der aromatische Käfig bildet mit ihr, ähnlich zur Cholinesterase [65], Kation- π -Wechselwirkungen aus [65, 66, 67].

Allosterische Bindungsstelle

Viele allosterische Modulatoren zeigen gegenüber anderen muskarinischen Rezeptoren eine erhöhte Affinität zum M₂-Rezeptor. Häufig ist die Subtypselektivität zwischen M₂ und M₅ maximal [50]. Aus Mutationsstudien waren zu Beginn dieser Arbeit bereits einige Rezeptor-Epitope bekannt, die für die Bindung allosterischer Modulatoren wichtig sind. Für die Affinität und Subtypselektivität von Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ werden die beiden Aminosäuren M₂Y177/5.29 im e2 und M₂T423/7.36 in TM7

verantwortlich gemacht. Die korrespondierenden Aminosäuren im M_5 -Rezeptor sind $M_5Q184/5.29$ und $M_5H478/7.36$ [68]. Für den allosterischen Modulator Gallamin konnten am M_1 -Rezeptor die Aminosäuren $M_1W101/3.28$ und $M_1W400/7.35$ als wichtig identifiziert werden [69]. Weiterhin werden für die Gallamin-Bindung eine saure Sequenz im e2 des M_2 -Rezeptors und weitere Aminosäuren des e3 als wichtig für die Rezeptorbindung angesehen [70].

1.5.5 Orthosterische Liganden

Im Folgenden werden beispielhaft einige Liganden der orthosterischen Bindungstasche vorgestellt. Diese können Eigenschaften eines Vollagonisten, Partialagonisten oder eines inversen Agonisten/Antagonisten haben.

Agonisten

Abbildung 1.6 zeigt einige wichtige Vollagonisten an muskarinischen Rezeptoren [52]. Das gemeinsame Strukturelement der muskarinischen Rezeptorliganden ist in der Abbildung rot hervorgehoben. Sie besitzen entweder einen tertiären, basischen Stickstoff, der

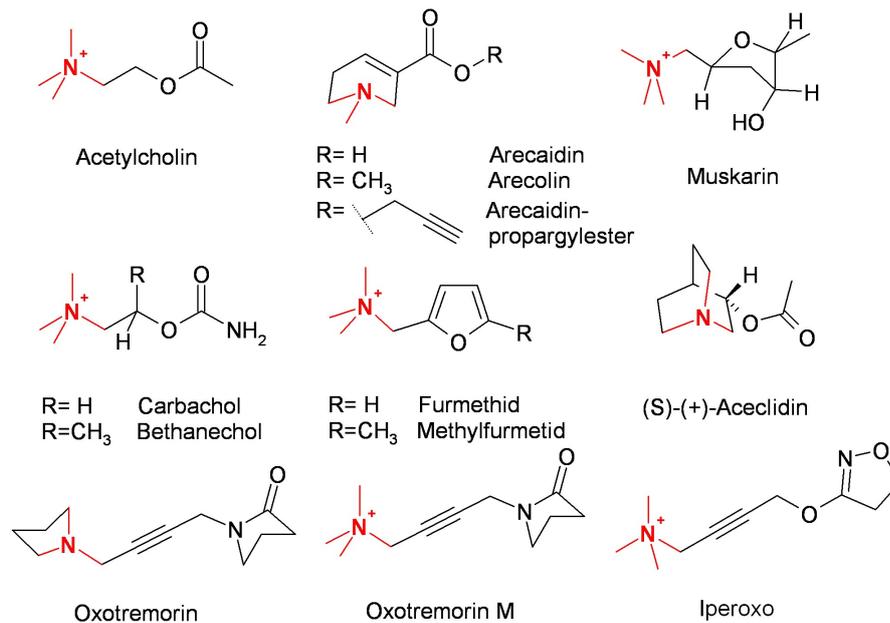


Abbildung 1.6: Agonisten an muskarinischen Rezeptoren.

in physiologischem Milieu protoniert vorliegt, oder eine quartäre Ammoniumgruppe, die permanent positiv geladen ist. Für eine agonistische Wirkung ist außerdem der Abstand zwischen dem positiven Kopf und dem Wasserstoffbrücken-Akzeptor, der oft durch einen Ester repräsentiert wird, essenziell. Wird der Substituent am Ester vergrößert, verschiebt sich die Wirkung in Richtung Antagonismus. Eine Volumenvergrößerung der Amino- bzw. Ammoniumgruppe führt zu einer verstärkten nikotinartigen Wirkung [71]. Carbachol und Bethanechol gehören wie Acetylcholin zur Gruppe der cholinartigen Substanzen und werden therapeutisch bei postoperativer Darm- und Blasenatonie eingesetzt. Carbachol wird

zusätzlich bei Glaukom eingesetzt. Arecolin ist Inhaltsstoff der Betelnuss (*Areca catechu*), welche in Indien und Ostasien traditionell zusammen mit Kalk gekaut wird. Muskarin ist der Namensgeber der muskarinischen Rezeptoren. Es stammt aus dem Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) und dient der experimentellen Pharmakologie als Testsubstanz. Oxotremorin und Oxotremorin M haben Einsatz gefunden in der experimentellen Pharmakologie. Ein weiteres Oxotremorin-Analogon ist Iperoxo.

Partialagonisten

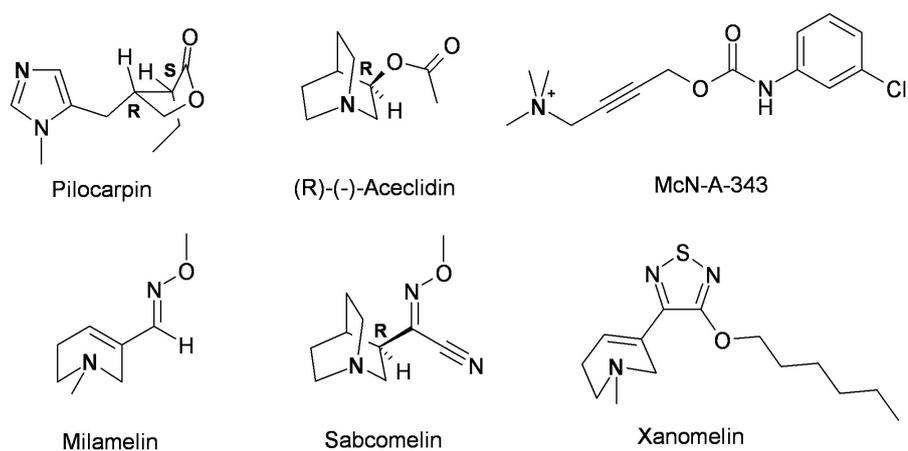


Abbildung 1.7: Partialagonisten an muskarinischen Rezeptoren.

In Abbildung 1.7 sind partialagonistisch wirkende Substanzen dargestellt. Pilocarpin ist ein Alkaloid und stammt aus *Pilocarpus jaborandus* [52]. Pilocarpin wird wie Carbachol bei Glaukom eingesetzt, da beide den Kammerwasserabfluss erleichtern und den Augeninnendruck senken.

Inverse Agonisten

Tropan-Alkaloide und davon abgewandelte partialsynthetische Substanzen (vgl. Abbildung 1.8), haben antagonistische Eigenschaften an muskarinischen Rezeptoren und werden als klassische Parasympatholytika angesehen. Ein natürlich vorkommendes Alkaloid ist (S)-(-)-Hyoscyamin, welches bei der Gewinnung aus Belladonnablättern (*Atropa belladonna* L., Tollkirsche) zu dem Enantiomeregemisch Atropin racemisiert. Ein weiteres natürliches Alkaloid ist (S)-(-)-Scopolamin. Ipratropiumbromid wird bei obstruktiven Atemwegserkrankungen inhalativ angewendet. N-Butylscopolaminiumbromid wird bei Spasmen an der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes eingesetzt. Tiotropiumbromid wurde 2002 als kinetisch selektiver M_3 -Antagonist in die Asthma-Therapie eingeführt. Es dissoziiert nur sehr langsam vom M_3 -Rezeptor und entfaltet so seine Selektivität gegenüber den anderen muskarinischen Rezeptorsubtypen. Durch die inhalative Anwendung wird die gezielte Wirkung an muskarinischen M_3 -Rezeptoren weiterhin verstärkt. N-Methylscopolamin (NMS) wird häufig in radioaktiv-markierter Form zur Charak-

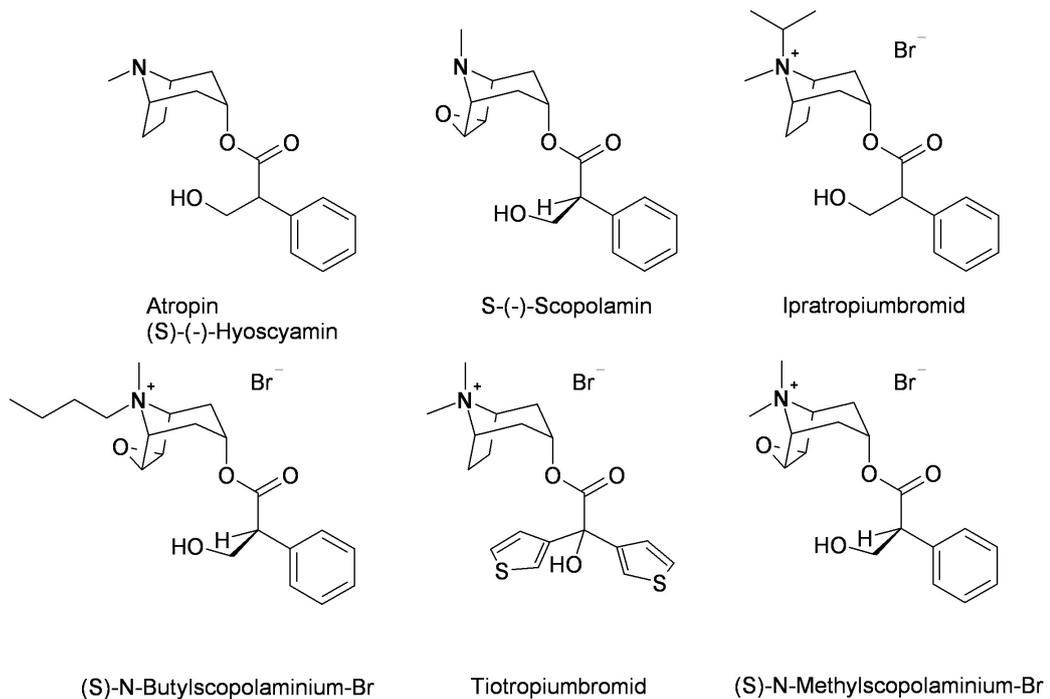


Abbildung 1.8: Antagonisten vom Tropin und Scopin-Typ: natürlich vorkommende Alkaloide und partialsynthetische Derivate.

terisierung der Bindungseigenschaften allosterischer Liganden genutzt.

Wie Agonisten verfügen inverse Agonisten ebenfalls über einen tertiären oder quartären Stickstoff. Eine Wasserstoffbrücken-akzeptierende Funktion, die häufig durch eine Esterkomponente repräsentiert wird, ist ebenfalls vertreten. Die antagonistische Wirkung beruht auf einer Vergrößerung des Acetylsubstituenten [71]. Auch die Vergrößerung der positiv geladenen Kopfgruppe führt zu einer antagonistischen Wirkung.

Durch die Quarternierung des Stickstoffes wird die ZNS-Gängigkeit der Substanzen stark herabgesetzt. Dadurch werden bei Anwendung von Parasympatholytika die zentralnervösen anticholinergen Nebenwirkungen verringert. Die Anwendung solcher Substanzen erfolgt häufig lokal, was systemische Nebenwirkungen zusätzlich verringert.

Abbildung 1.9 zeigt weitere Antagonisten, die Vollsynthetika darstellen. Hexahydrodifeni-

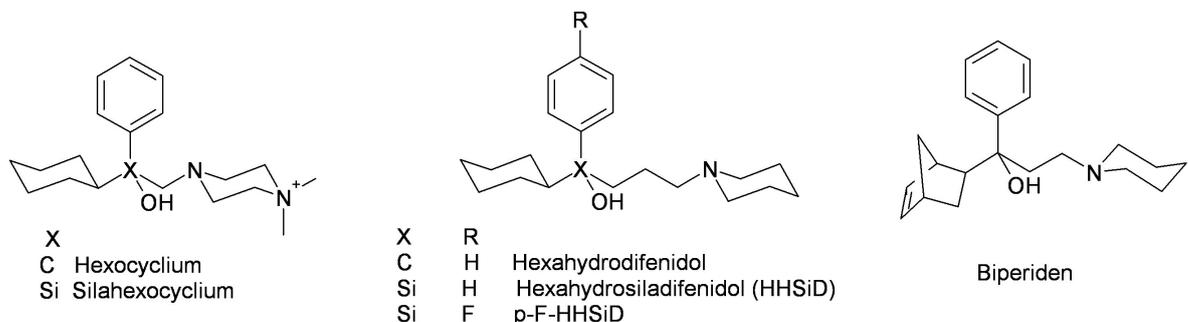


Abbildung 1.9: vollsynthetische Antagonisten.

dolderivate und ihre Siliciumanaloga sind strukturell mit dem Phenylpropanolaminderivat Biperiden verwandt, welches als Anticholinergikum in der Behandlung des iatrogenen und idiopathischen Parkinsonismus eingesetzt wird.

Die fehlende Subtypselektivität der klassischen Antagonisten führte zu intensiven Bemühungen, um subtypselektivere Substanzen zu erhalten. Bisher sind aber nur wenige Substanzen mit moderater Präferenz für einen muskarinischen Rezeptorsubtyp identifiziert worden. Einige Strukturen sind in Abbildung 1.10 dargestellt. Pirenzepin wird als

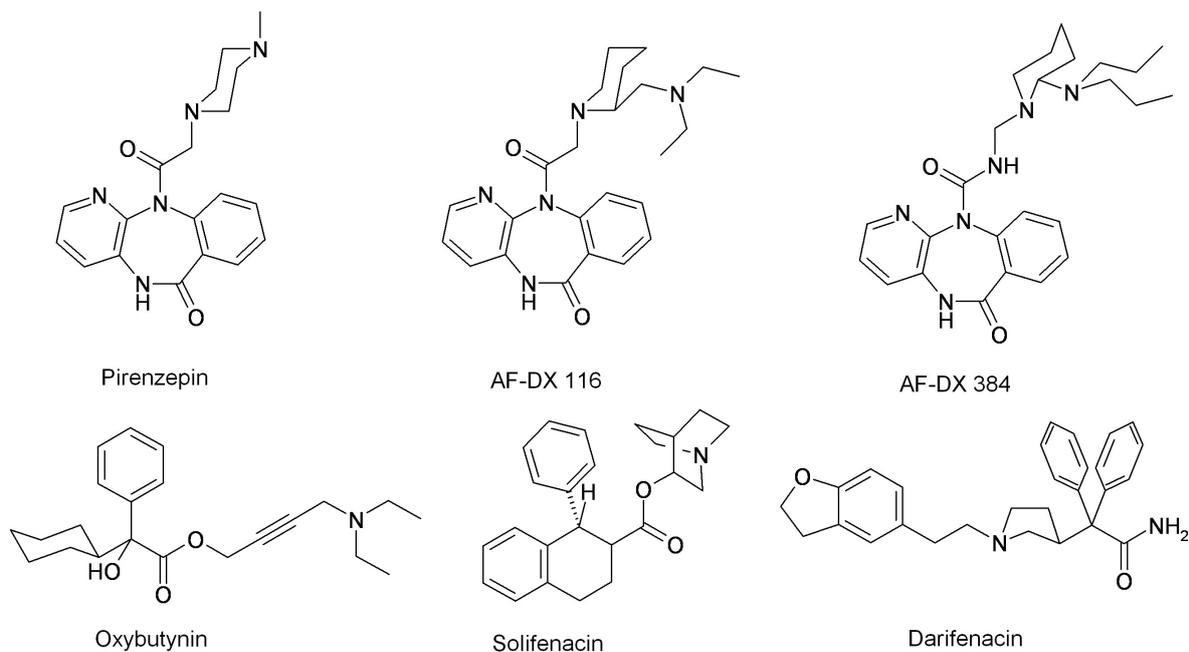


Abbildung 1.10: Antagonisten mit Präferenz für einen oder mehrere Subtypen der muskarinischen Rezeptoren.

subtypselektiver M_1 -Antagonist beschrieben. Untersuchungen von Dörje [72] ergaben allerdings nur eine M_1/M_2 -Subtypselektivität von 1,5 Dekaden. Obwohl die maximale Subtypselektivität nur einen Faktor von ca. 30 beträgt, treten in therapeutischen Dosen nur geringe anticholinerge Nebenwirkungen auf.

Für die Pirenzepin-Analoga AF-DX 116 und AF-DX 384 wurde eine recht deutliche Präferenz zu M_2 - und M_4 -Rezeptoren im Vergleich zu den M_1 -, M_3 und M_5 -Rezeptoren beschrieben [72]. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese Derivate allerdings zumindest teilweise die allosterische Bindungsstelle mitbenutzen. Solifenacin und Darifenacin weisen eine Subtyppräferenz für den M_3 -Rezeptor auf und werden bei Dranginkontinenz eingesetzt. Sie greifen spezifischer als Oxybutynin an der Blase an [73].

Die geringe Verfügbarkeit von Substanzen mit ausreichender Subtypselektivität spiegelt sich darin wider, dass in der Therapie Substanzen als subtypselektiv angesehen werden, deren Affinitätsunterschiede den Faktor 100 ausmachen. Dies verdeutlicht die Notwen-

digkeit einer intensiven Forschung auf dem Gebiet der allosterischen Modulation von muskarinischen Rezeptoren. Denn allosterische Liganden binden häufig in weniger konservierten extrazellulären Bereichen der Rezeptoren und entfalten dort ihre Subtypselektivität [50].

1.5.6 Allosterische Liganden

Wie bereits eingangs erwähnt, konnten Lüllmann 1969 erstmals für die damals neu synthetisierte Substanzklasse der Alkan-Bisammonium-Verbindungen zeigen, dass diese muskarinische Rezeptoren nicht in gleicher Weise wie Atropin beeinflussen, sondern dass ihr Wirkungsmechanismus allosterischer Natur war [4]. 1976 postulierten Clark und Mitchelson für Gallamin ebenfalls einen allosterischen Wirkungsmechanismus [74]. In Abbildung 1.11 sind die klassischen Verbindungen W84 und Gallamin sowie weitere Beispiele für allosterische Modulatoren aufgeführt. W84 und Naphmethonium sind

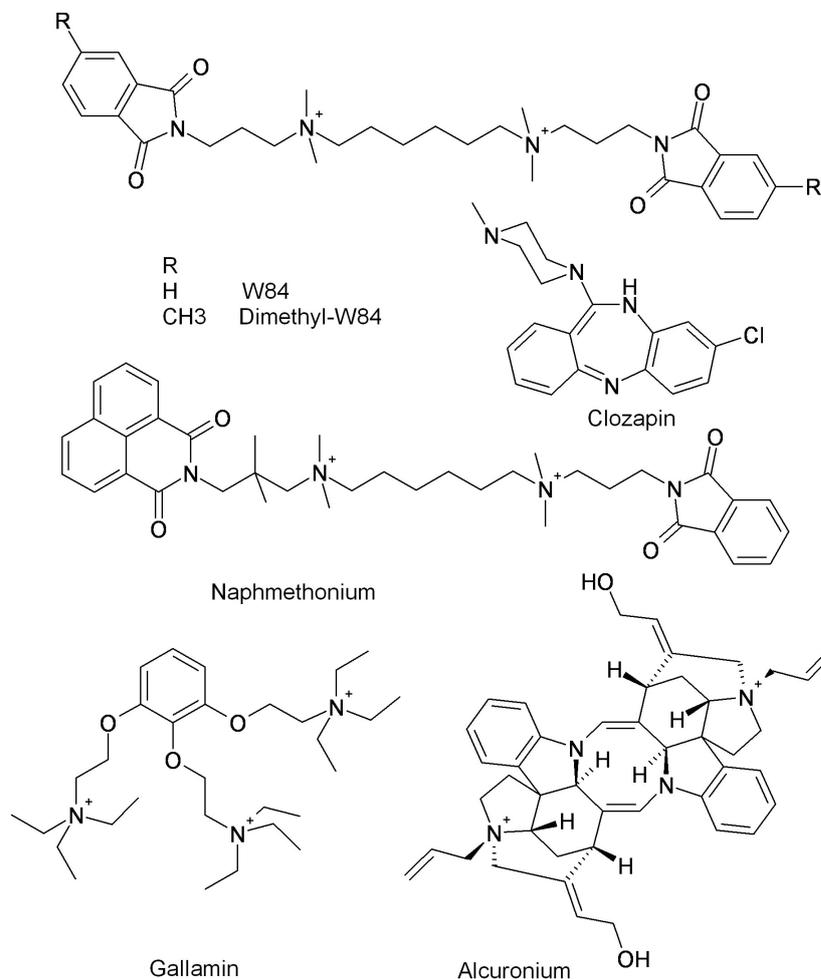


Abbildung 1.11: Allosterische Modulatoren.

Alkan-Bisammoniumverbindungen. Während sich W84 am humanen muskarinischen M_2 -Rezeptor negativ kooperativ mit [3 H]NMS verhält, stellt Naphmethonium hier einen allosterischen Verstärker dar [75]. Für allosterische Modulatoren wie W84, Gallamin und Al-

curonium ist ein inverser Agonismus nachgewiesen worden [50].

Die allosterische Modulation eines Rezeptors weist einige Vorteile auf [5]. So kann zum Beispiel durch die geringer konservierte allosterische Bindungstasche eine erhöhte Subtyp-Selektivität erreicht werden. Ein weiterer Punkt ist, dass der Effekt der Modulatoren sättigbar ist, was zu einer verminderten Toxizität und einer größeren therapeutischen Breite führt. Allosterische Verstärker sind auf die Anwesenheit des physiologischen Liganden angewiesen, um wirken zu können. Hierdurch bleiben die physiologischen Eigenschaften der Rezeptoren erhalten.

1.5.7 Rezeptormodelle

Die Auflösung der Struktur des Rhodopsins bedeutete einen erheblichen Fortschritt im Bereich des Wirkstoffdesign, da sich nun neue Möglichkeiten auf dem Gebiet der GPCR-Forschung ergeben. Auf Basis der Kristallstruktur können Rezeptormodelle entwickelt werden, die einen besseren Einblick in die Funktionsweise der GPCRs geben. Solche Modelle können z.B. dazu eingesetzt werden, ein Rezeptor-basiertes *in silico screening* (Computergestützte Datenbank-Suche) durchzuführen, um neue Leitstrukturen zu finden [76]. Ist das Rezeptormodell erstellt und von guter Qualität, stellt es eine kostengünstige und zeitsparende Methode im Bereich der Arzneistoff-Entwicklung dar [77]. Der kritische Punkt ist allerdings die Erstellung des Rezeptormodells, welches von automatisierten Verfahren, die frei im Internet verfügbar sind [78], bis zur detaillierten Rezeptorvalidierung durch individuelle Anpassung des Modells an bereits experimentell ermittelte Daten reicht. Da hierdurch die Qualität der Rezeptormodelle stark variieren kann, muss bei jedem Rezeptormodell kritisch überprüft werden, ob z.B. das Verfahren der Rezeptorerstellung der Fragestellung angepasst war und den heutigen Methoden des *Molecular Modelling* entspricht.

In der Literatur sind verschiedene muskarinische Rezeptormodelle zu finden. Aus unserer Arbeitsgruppe stammt das M₂-Modell von Jöhren [79, 68], welches frühere Modelle von Kuhn [80] bzw. Kerkhoff [81] abgelöst hat. Kürzlich wurde ein weiteres M₂-Modell veröffentlicht [82]. Ein Rezeptormodell des M₁-Rezeptors wird zur Untersuchung von systematischen Alanin-Mutationsstudien (engl., alanine scanning mutageneses) verwendet [83]. Ein M₃-Modell der Ratte wurde von Han vorgestellt [84].

Kapitel 2

Methoden

Die Erstellung von Homologiemodellen G-Protein gekoppelter Rezeptoren auf Basis der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsin ist mittlerweile eine weit verbreitete Prozedur im Bereich der theoretischen Medizinischen Chemie. Dass dieses Verfahren geeignet ist, um z.B. neue Leitstrukturen für Arzneistoffe zu finden oder Struktur-Wirkungs-Beziehungen erklären zu können, konnte bereits mehrfach erfolgreich belegt werden [76, 77, 85].

2.1 Modellbau

Der gleichartige Aufbau der GPCRs, die sieben transmembranären Helices, und die darin enthaltenen z.T. hoch konservierten Aminosäuren, ermöglichen eine relativ einfache Erstellung von GPCR-Modellen. Hierbei werden konservierte dreidimensionale Strukturinformationen des Templates, also der Vorlage, auf die Aminosäuresequenz der unbekannt Struktur übertragen. Sequenzabschnitte, die nicht zugeordnet werden können, wie z.B. flexible Loop-Strukturen, müssen im Anschluss individuell untersucht und modelliert werden. Auch in unserer Arbeitsgruppe ist die Vorgehensweise bei der Erstellung von GPCR-Modellen langjährig erprobt. Die hierbei standardmäßig verwendeten Methoden wurden in einigen Dissertationen unserer Arbeitsgruppe bereits mehrfach und ausführlich beschrieben und gehören zum Basiswissen der theoretischen Medizinischen Chemie. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit darauf verzichtet, auf solche Standardmethoden ausführlich einzugehen. Der interessierte Leser wird im Text auf Primärliteratur verwiesen. Verwendete Methoden werden im Folgenden in der Reihenfolge ihrer Verwendung während des Modellbau-Prozesses beschrieben.

2.1.1 Sequenzanalyse

Der erste Schritt zur Erstellung eines Homologiemodells besteht aus einer Analyse der Aminosäuresequenz. Bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört hierzu die Vorhersage der transmembranären Bereiche sowie der Sekundärstruktur. Mittlerweile sind viele Programme hierzu frei im Internet zu finden. Für die Bestimmung der transmembranären Bereiche wird das Programm TMHMM [86] verwendet. Die Sekundärstruktur wird mit den Programmen PHDsec [87] und PSIPRED [88] vorhergesagt, welche auf neuronalen Netzwerken beruhen und als Methoden der Wahl anzusehen sind [89]. Außerdem wird das Consensus-Vorhersage Programm JPRED [90] verwendet.

2.1.2 Sequenzalignment

Der nächste Schritt ist ein Vergleich (engl., Alignment) der Aminosäuresequenzen der Vorlage und der Zielstruktur(en). Sequenzalignments dienen dazu, gleiche oder ähnliche Sequenzmuster in Proteinen zu identifizieren. Bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren nutzt man Pin Points [20], die in den transmembranären Bereichen des Proteins lokalisiert sind, zur Erstellung und Überprüfung des Alignments. In dieser Arbeit wird das Programm ClustalW [56] für ein multiples Sequenzalignment verwendet.

2.1.3 Übertragung von Koordinaten auf die Zielsequenz

Die Koordinaten der strukturell konservierten transmembranären Bereiche der Rhodopsin-Kristallstruktur 1U19 [27] werden mit dem Homology-Modul aus Insight II 2000 [91] auf die Aminosäuresequenzen des humanen M₂- bzw. M₅-Rezeptors übertragen. Die Geometrien einiger extrazellulärer und intrazellulärer Loops sowie der N- und der C-Terminus werden mit der *LoopSearch*-Routine modelliert. Diese arbeitet mit einer distanz-abhängigen C_α-Kohlenstoff-Matrix und durchsucht eine programminterne Protein-Datenbank, die ca. 300 diverse, repräsentative Kristallstrukturen der PDB-Datenbank guter Qualität enthält [92]. Berücksichtigt wird hierbei die Geometrie der an den Loop angrenzenden Aminosäuren, der Abstand zwischen den C_α-Atomen der Start- und End-Aminosäuren sowie die Anzahl der Aminosäuren im Loop.

2.1.4 Seitenkettenplatzierung

Da bei der Übertragung der Koordinaten des Protein-Rückgrats artifizielle Seitenkettengeometrien auftreten können, werden die Seitenketten mit dem Programm SCWRL3 (SideChain placement With a Rotamer Library) angefügt [93].

2.1.5 Bestimmung des Protonierungszustandes

Saure oder basische Aminosäuren liegen in wässriger Lösung geladen vor. Durch deutlich niedrigere Dielektrizitätskonstanten von Proteinen und eine mögliche Desolvatisierung der Aminosäureseitenketten kann es zu einer Veränderung des pK_a-Wertes, einem sogenannten pK_a-Shift (engl., Verschiebung) kommen [94]. Zur Vorhersage der pK_a-Werte wird das Programm PROPKA verwendet [95]. Hierbei handelt es sich um ein empirisches Verfahren, welches die Berechnung von pK_a-Verschiebungen in sehr kurzer Zeit ermöglicht. Einflüsse der Desolvatisierung, Wasserstoffbrückenbindung und ionischen Wechselwirkungen auf den pK_a-Wert einer Aminosäureseitenkette werden berücksichtigt. Hierbei wird z.B. für die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung ein konstanter, empirisch ermittelter, Wert mit der Anzahl der H-Brücken multipliziert. Die Stärke einer H-Brücke geht über verschiedene Distanz-Funktionen ein. Der ermittelte Wert wird dann zum Standardwert der Aminosäuren in wässriger Lösung addiert. Weitere Terme werden auf ähnliche Weise erhoben. Neben anderen Aminosäuren werden die Standard-pK_a-Werte (pK_{Model}) für Asp, Glu und His mit 3,8, 4,5 und 6,5 festgelegt.

Der pK_a-Wert einer Aminosäureseitenkette in einem Protein (pK_{Temp}) wird aus folgenden Termen zusammengesetzt:

$$pK_{Temp} = pK_{Model} + \Delta pK_{GlobalDes} + \Delta pK_{LocalDes} + \Delta pK_{SDC-HB} + \Delta pK_{chgchg} \quad (\text{Gl. 1})$$

Die Terme $\Delta pK_{GlobalDes}$ bzw. $\Delta pK_{LocalDes}$ aus Gleichung 1 beschreiben den Einfluss der Desolvatisierung des gesamten Proteins bzw. der lokalen Umgebung der betrachteten Aminosäure-Seitenkette. ΔpK_{SDC-HB} beschreibt den Einfluss der Bildung von H-

Brücken zur untersuchten Seitenkette. ΔpK_{chgchg} betrachtet ionische Wechselwirkungsmöglichkeiten der untersuchten Seitenkette. Bereits bekannte pK_a -Werte die durch experimentelle oder andere Verfahren erhalten wurden, werden von PROPKA mit einer mittleren Standardabweichung von 0,79 pK-Einheiten vorhergesagt. Die Güte der Methode ist mit anderen Vorhersage-Programmen vergleichbar.

2.2 Kraftfeldverfahren

2.2.1 Molekülmechanik

Die Molekülmechanik erlaubt die Berechnung der totalen sterischen Energie eines Moleküls im Hinblick auf Abweichungen von definierten Referenz-Bindungslängen, -winkeln und -torsionswinkeln. Hierbei werden die Atome je nach Atomtyp als Kugeln unterschiedlicher Größe und die Bindungen als Sprungfedern unterschiedlicher Länge betrachtet. Die potentielle Energie des untersuchten Systems wird mit dem Hook'schen Gesetz berechnet, welches das elastische Verhalten von Festkörpern beschreibt. Die totale Energie eines Systems setzt sich aus einzelnen Energietermen zusammen, wie z.B. der Bindungslängen-, Bindungswinkel- und Torsionswinkel-Energie sowie einem van-der-Waals-Energierterm für hydrophobe Wechselwirkungen und einem elektrostatischen Term. Ein Kraftfeld enthält Standard-Parameter und empirisch ermittelte Kraft-Konstanten [89].

Eine Struktur kann in diesem Kraftfeld entsprechend der Idealparameter des Kraftfeldes optimiert werden, um die Kraftfeldenergie des Moleküls zu minimieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Minimierungsroutinen sind der *steepest descent*- und der *conjugate gradient*-Algorithmus, die in den Programmen Insight II 2000 [91] und GROMACS3.2 [96] implementiert sind.

Der *steepest descent* Algorithmus

Der *steepest descent*-Algorithmus nutzt die mathematische erste Ableitung einer Energie-Funktion um das Minimum zu finden. Die Energie wird zunächst für die Start-Geometrie eines Moleküls berechnet. Anschließend wird eins der Atome geringfügig in eine der drei Raumrichtungen des Koordinatensystems bewegt und die Energie wird erneut berechnet. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis alle Atome eine neue und energetisch günstigere Position auf der Energie-Hyperfläche eingenommen haben. Wird ein definierter Endpunkt, wie z.B. eine bestimmte minimale Energieabweichung, erreicht, endet der Minimierungsprozess. Dieser Algorithmus wird häufig für Strukturen verwendet, die weit von einem Minimum entfernt liegen und für eine zunächst grobe Vorminimierung des Systems genutzt. Im Anschluss wird häufig noch der genauere *conjugate gradient*-Algorithmus zur weiteren Geometrieoptimierung verwendet [89].

Der conjugate gradient Algorithmus

Der *conjugate gradient*-Algorithmus ist genauer, als *steepest descent*, da er die Informationen über die Energie-Funktion von einem Schritt zum nächsten sammelt. Hierdurch wird ein Rückschritt im Minimierungsprozess vermieden. Nach jedem Schritt wird die Steigung berechnet und als zusätzliche Information verwendet, um den Minimierungsprozess in eine neue Richtung zu lenken. Der Rechenaufwand ist zwar für diesen Algorithmus höher als für *steepest descent*, sie ist aber Methode der Wahl für größere Systeme, wie z.B. Proteine [89].

2.2.2 Moleküldynamik

Da die Geometrie-Optimierung mittels Molekülmechanik nur zu einem lokalen Minimum der Struktur und nur einer möglichen Konformation des untersuchten Moleküls führt, ist dies bei der Modellierung von Homologiemodellen zur Strukturoptimierung bei weitem nicht ausreichend. Hier kann das Verfahren der Moleküldynamik angewendet werden. Der Konformationsraum wird deutlich besser ausgenutzt und z. B. artifizielle Loop-Strukturen können relaxieren. Weiterhin kann die Beeinflussung eines Proteins durch einen gebundenen Liganden beobachtet werden. Beim Moleküldynamik-Verfahren werden die klassischen Bewegungsgleichungen über die Zeit integriert. Die resultierende Trajektorie beinhaltet Informationen über die durchschnittlichen bzw. zeitabhängigen Eigenschaften des untersuchten Systems. Moleküldynamiksimulationen haben einen großen Teil zum Verständnis von dynamischen Prozessen auf atomarem Level beigetragen [89].

In dieser Arbeit werden Moleküldynamiksimulationen mit dem *mdrun*-Programm, welches im Programmpaket GROMACS [96] implementiert ist, durchgeführt. Ein Moleküldynamik-Input-File findet sich in Anhang A.8. Als Kraftfeld wird das *ffgmx*-Kraftfeld verwendet. Das *ffgmx*-Kraftfeld wird analog zu Schlegel [97, 77] für die Simulation von Proteinen in einer Phospholipidmembran modifiziert und enthält Parameter des für aliphatische Alkane entwickelten GROMOS96 45a3 Kraftfeldes [98].

Simulationsbedingungen

Für die Simulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren wird mittlerweile häufig eine membranähnliche Umgebung gewählt, die eine Simulation des Proteins ohne Rückhaltekräfte ermöglicht. Die Membran wird hierbei extrazellulär und intrazellulär von einer Wasserbox umgeben. Durch Austausch einzelner Wassermoleküle gegen Natrium- oder Chlorid-Ionen können Ladungen des Rezeptorproteins ausgeglichen werden. Der Ladungsausgleich erfolgt mit Hilfe einer Potential-Berechnung, die favorisierte Positionen für positive bzw. negative Gegenionen findet. Anschließend wird die wässrige Phase so lange zufällig mit Ionen aufgefüllt, bis neutrale, physiologische Bedingungen herrschen.

Die Zahl der Ionen ist von der Anzahl der Ladungen des Proteins und der Liganden abhängig. Die Ionen-Konzentration entspricht ungefähr 156 mVal l^{-1} . Eine Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,4 ist nicht möglich, da das Programm nach außen hin nur ungeladene Systeme ohne Fehler rechnen kann.

Zu Beginn der Dynamiksimulation enthält die Phospholipid-Doppelschicht ein gleichmäßiges zylindrisches Loch, in das das Rezeptorprotein eingepasst wird. Durch eine Equilibrierung des Systems, bei der hohe Rückhaltekräfte auf dem Protein liegen, passt sich die Membran zunächst an die Struktur des Proteins an [99]. Anschließend werden die Rückhaltekräfte des Proteins langsam herunter gefahren bis eine freie Dynamiksimulation erreicht wird.

Auswertung von Moleküldynamiksimulationen

Folgende Programme, die im Programm GROMACS implementiert sind, werden zur Auswertung der Moleküldynamik-Trajektorien verwendet.

- *g_rms*: Berechnet die Standardabweichung über die Zeit, die im Folgenden als RMSD-Wert (*Root Mean Square Deviation*; engl., mittlere Quadratwurzel-Abweichung) angegeben wird. Der RMSD-Wert ist die Standardabweichung einer Struktur zum Zeitpunkt t_1 bezogen auf die Geometrie der Ausgangsstruktur zum Zeitpunkt t_0 . Die Geometrie des Protein-Rückgrats zum Zeitpunkt t_1 wird hierfür über die Methode der kleinsten Quadrate auf die Startgeometrie platziert [96].
- *g_rmsf*: Berechnet den RMSF-Wert (*Root Mean Square Fluctuation*; engl., Standard-Abweichung der Fluktuation), der die mittlere Fluktuation einer Aminosäure über einen bestimmten Zeitraum darstellt.
- *g_cluster*: Die Ermittlung einer repräsentativen Struktur erfolgt im equilibrierten Bereich einer Dynamik, da die Protein-Strukturen hier eine gleichmäßige, periodische Bewegung ausführen und sich nicht sehr stark verändern. Hierzu wird die Trajektorie einer sogenannten Cluster-Analyse unterzogen. Ähnliche Strukturen werden zu Gruppen (engl., *clusters*) zusammengefasst, um das Datenmaterial zu reduzieren. Jede einzelne Struktur wird über eine Matrix mit den anderen Strukturen verglichen. Zunächst werden die Strukturen nach der Methode der kleinsten Quadrate übereinander gelegt und der RMSD-Wert berechnet. Ein Abbruchkriterium (engl., *cutoff*) wird definiert. Strukturen, die geringere Abweichungen voneinander zeigen als der festgelegte *cutoff*-Wert, werden einer Gruppe zugeordnet. Die mittlere Struktur des Clusters wird ermittelt. Im Anschluss erfolgt eine Energie-Minimierung.
- *g_hbond*: Berechnet die Existenz einer H-Brücke über die Zeit
- *g_energy*: Die Energie setzt sich aus dem kurzreichenden Coulomb-Term für elektrostatische und dem Lennard-Jones-Potential für hydrophobe Wechselwirkungen zusammen. Durch diese Vereinfachung der energetischen Verhältnisse stellen die

berechneten Werte keine realistischen Energiewerte dar. Ein Vergleich mit Energiewerten anderer Kraftfelder ist nicht zulässig.

- *g_dist*: Berechnet die Abstände zweier betrachteter Atome über die Zeit.

2.3 Protein-Ligand-Komplexe

2.3.1 Konformationsanalyse

Flexible Liganden können eine Vielzahl an Konformationen eingehen, allerdings sind nur wenige dieser Konformationen energetisch bevorzugt bzw. biologisch aktiv. Häufig ist die biologisch aktive Konformation des Liganden unbekannt. Um energetisch günstige Ligand-Konformationen zu erhalten, die für ein automatisches oder manuelles Docking genutzt werden sollen, wird das *simulated annealing*-Protokoll, welches im Software-Paket Sybyl 7.2 [100] implementiert ist, verwendet. Dabei werden die Moleküle über mehrere Zyklen langsam erhitzt und anschließend wieder abgekühlt. Beim Aufheizen können Energiebarrieren zu anderen Konformationen des Liganden überwunden werden. Dadurch wird der mögliche Konformationsraum besser ausgenutzt. In der Abkühl-Phase wird die energetisch günstigste Konformation des jeweiligen Zyklus vom Programm herausgeschrieben. Im Anschluss muss immer noch eine Energieminimierung durchgeführt werden.

2.3.2 Docking-Verfahren

Um Protein-Ligand-Komplexe zu generieren, können automatisierte Docking-Verfahren verwendet werden. Wie bei jedem automatisierten Verfahren ist eine kritische Betrachtung der Ergebnisse notwendig. In dieser Arbeit wird das Programm GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) [101] verwendet. Zur Bewertung (engl., scoring) der erstellten Komplexe werden die Scoring-Funktionen GOLDScore und der CHEMScore verwendet, die beide im Programm implementiert sind.

2.3.3 GRID-Wechselwirkungsfelder

Eine andere Methode um Protein-Ligand-Komplexe zu generieren ist die Verwendung von GRID-Wechselwirkungsfeldern [102]. Bevorzugte Wechselwirkungsmöglichkeiten für verschiedene funktionelle Gruppen des Liganden können im Protein dargestellt werden. Im Anschluss wird der Ligand manuell in die Wechselwirkungsfelder der Proteinstruktur platziert und eine Geometrieoptimierung durchgeführt.

2.3.4 Parametrisierung der Liganden für Moleküldynamiksimulationen

Für Aminosäuren liegen Kraftfeldparameter vor, die Partiaalladungen und Ladungsgruppen enthalten. Diese Ladungen sind Basisparameter für bestimmte Atom- und Bindungstypen. Liganden müssen für MDS an diese Werte angepasste Parameter enthalten. Für

die Parametrisierung der Liganden für das GROMACS-Kraftfeld ist eine Definition von sogenannten Ladungsgruppen nötig. GROMACS berechnet einzelne Atom-Gruppen eines Moleküls, innerhalb einer Gruppe weisen die Atome gegensätzliche Partialladungen auf. Die Gruppe muss nach außen ungeladen vorliegen, außer es ist explizit eine Ladung an dieser Stelle im Molekül vorhanden. Für die Berechnung von Ladungen eignen sich quantenchemische Verfahren.

2.3.5 Quantenchemische Verfahren

Quantenchemische Verfahren sind besser als Kraftfelder dazu geeignet, Eigenschaften von kleinen Molekülen wiederzugeben, da sie sehr viel genauer sind. So werden die Punktladungen der einzelnen Atome genauer berechnet, und Polarisationswechselwirkungen werden mit einbezogen, während im Kraftfeld nur Standardladungen für bestimmte Atomtypen vorhanden sind. In dieser Arbeit wird die *ab initio*-Methode zur Berechnung von Ladungen verwendet. Die Ergebnisse werden für die Parametrisierung der Liganden für das *ffgm*x-Kraftfeld und anschließende Moleküldynamiksimulationen mit GROMACS verwendet. Für das Kraftfeld können berechnete Punktladungen nicht direkt übernommen werden, sondern müssen an Kraftfeld-Ladungen angepasst werden. Hierzu werden die Ladungen soweit herunter skaliert, dass sie im Verhältnis zu den Kraftfeld-Ladungen von Aminosäuren ähnliche Werte annehmen. Ladungsberechnungen werden in dieser Arbeit mit dem Programm Spartan, Version 5.1.3 durchgeführt [103].

2.4 Weitere Methoden

2.4.1 PROCHECK

Die Qualität der Proteingeometrie der erstellten Homologiemodelle wird mit dem Programm PROCHECK [104] überprüft. Dieses untersucht vor allem die Φ - (Phi) und Ψ - (Psi) Winkel des Protein-Rückgrats. Es berechnet die Φ - und Ψ -Winkelkombination jeder Aminosäure eines Proteins und stellt sie im sogenannten Ramachandran-Plot dar. Das Programm basiert auf einer Untersuchung an 118 hochaufgelösten Kristallstrukturen. Der Ramachandran-Plot besitzt vier verschiedene Zonen, die aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens einer Φ/Ψ -Kombination zustande kommen. Die *most favoured regions* (engl., meistbegünstigte Regionen) beinhalten vor allem Φ/Ψ -Kombinationen, die in α -Helices und β -Faltblättern auftreten. Die anderen Regionen sind nach Häufigkeit gestaffelt und werden als *additional allowed regions* (engl., zusätzlich erlaubte Regionen), *generously allowed regions* (engl., großzügig/grundsätzlich erlaubte Regionen) und als *disallowed regions* (engl., nicht erlaubte Regionen) bezeichnet. Glycine und Proline werden aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften unter den Aminosäuren nicht berücksichtigt. Ein Protein soll möglichst wenige Aminosäuren in den ungünstigeren Bereichen, also in den *generously allowed* und den *disallowed regions* aufweisen. Allerdings finden sich häufig auch in hochaufgelösten Kristallstrukturen Aminosäuren in diesen Bereichen.

2.4.2 SURFNET

Das Programm SURFNET [105] wird zur Identifizierung der freien Volumina innerhalb der Rezeptor-Modelle und zur Darstellung der orthosterischen und allosterischen Bindungstasche genutzt.

2.4.3 Datenbank-Recherche

In dieser Arbeit werden folgende Datenbanken benutzt:

- Atlas of Protein Side-Chain Interactions [106]: enthält alle 400 möglichen Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen zwei Aminosäureseitenketten der 20 proteinogenen Aminosäuren und basiert auf einer Druckversion von Singh und Thornton [107].
- GPCRDB (GPCR Data Base) [13]: Informationssystem für G Protein gekoppelte Rezeptoren, enthält u.a. publizierte Mutationsdaten zu den einzelnen Rezeptoren.
- NC-IUPHAR Receptor Database (The International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification) [60]: enthält Informationen zur Pharmakologie von Rezeptoren, u.a. findet man hier publizierte Affinitätsdaten von Liganden.
- NCBI PubMed (National Center for Biotechnology Information) [108]: Datenbank zur Literaturrecherche.
- RCSB-PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank) [28]: enthält Kristall- und NMR-Strukturen im PDB-Format.
- UniProtKB/SwissProt [58]: enthält verfügbare Informationen zu Proteinen, wie Primärsequenz, mögliche Sekundärstruktur, Chromosomenlokalisierung der codierenden Gene etc.

Teil I

Charakterisierung des humanen M5- und M2-Rezeptors

Für die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und die sich anschließenden Diskussionen wird aus folgenden Gründen eine Aufteilung in zwei Teile vorgenommen.

Muskarinische Rezeptoren sind exzellente Testsysteme zur Beschreibung der allosterischen Modulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren [5]. Zu Beginn dieser Arbeit liegt das Hauptziel in der Erstellung eines Homologiemodells des humanen M_5 -Rezeptors. Primär sollen Vergleiche zwischen dem M_5 -Modell und einem bereits in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen M_2 -Modell [79] gezogen werden, denn viele allosterische Modulatoren weisen die größte Subtypselektivität zwischen M_2 und M_5 auf [109]. Die Fragestellung liegt daher zunächst darin, die molekularen Gegebenheiten des M_2 - und M_5 -Rezeptors näher zu beschreiben und erste Einblicke in die unterschiedlichen Verhaltensweisen der Rezeptoren zu gewinnen.

Das existierende M_2 -Modell wurde allerdings mit älteren Methoden erstellt: Protein-Ligand-Komplexe werden überwiegend im Vakuum untersucht. In MDS liegen Rückhalterkräfte auf den Helices, um das Protein stabil zu halten und die Dauer der Simulationen ist sehr kurz. Außerdem können mit diesem Modell einige wichtige experimentelle Erkenntnisse zu Bindungsmodi von allosterischen Modulatoren nicht nachvollzogen werden. Da die Vorgehensweise somit nicht mehr aktuell ist und das Modell offenbar unzureichend, wird entschieden, ein vollkommen neues M_2 -Modell zu erstellen, das den heutigen Methoden des *Molecular Modelling* angepasst ist. Durch eine sorgfältige Erstellung beider Modelle soll eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Rezeptoren hergestellt werden.

Viele neue und interessante Ergebnisse aus pharmakologischen Untersuchungen werfen vermehrt Fragen zum M_2 -Rezeptor auf, so dass sich die Zielsetzung dieser Arbeit auf diesen Rezeptorsubtyp verlagert. Die neuen Erkenntnisse aus vorgenommenen Mutations- und Bindungsstudien stammen von dem Kooperationspartner dieser Arbeit, der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Mohr (Pharmazeutisches Institut, Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn). Dankenswerterweise werden zum Teil unveröffentlichte pharmakologische Daten zur Verfügung gestellt, die eine Validierung der Modelle ermöglichen.

Um eine gewisse Übersicht zu wahren, wird daher für diese Arbeit eine Aufteilung in

Teil I Charakterisierung des humanen M_5 - und M_2 -Rezeptors

und

Teil II Allosterische Modulation des M_2 -Rezeptors vorgenommen.

Kapitel 3

Zielsetzung

Teil I beschreibt die Erstellung der beiden Rezeptormodelle des humanen muskarinischen M_5 - und M_2 -Rezeptors und die Charakterisierung der orthosterischen und allosterischen Bindungstasche, die für beide Rezeptoren durchgeführt werden. Da das Vorgehen soweit wie möglich für beide Modelle einheitlich sein soll, wird die Erstellung und nähere Charakterisierung beider Modelle parallel vorgenommen, obwohl sie bei Durchführung dieser Arbeit zeitlich voneinander versetzt erstellt wurden. Dem Leser soll hierdurch ein erleichterter Vergleich der beiden Modelle ermöglicht werden.

Die Ziele für Teil I dieser Arbeit *Charakterisierung des humanen M_5 - und M_2 -Rezeptors* können damit wie folgt formuliert werden:

- (1) Erstellung von Homologiemodellen des M_5 - und M_2 -Rezeptors auf Basis der hochauflösenden Kristallstruktur 1U19 der PDB-Datenbank [27].
- (2) Untersuchung des dynamischen Verhaltens der Rezeptoren in einer annähernd physiologischen Umgebung. Es sollen Moleküldynamiksimulationen der Rezeptoren durchgeführt werden, die hierzu in eine Phospholipid-Membran eingebettet sind, welche extra- und intrazellulär von einer wässrigen Phase mit physiologischen Konzentrationen an Natrium- und Chlorid-Ionen umgeben wird. Hierdurch soll eine Simulation ohne Rückhaltekräfte ermöglicht werden. Die Stabilität und Qualität der Protein-Modelle soll durch diese freien Dynamiksimulationen überprüft werden. Dieses Vorgehen ist zur Untersuchung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren heute üblich, wie andere Beispiele belegen [77, 97].
- (3) Zunächst soll die orthosterische Bindungstasche in beiden Rezeptoren über eine Untersuchung des Bindungsmodus von N-Methylscopolamin (NMS) identifiziert werden. NMS wird häufig zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften allosterischer Modulatoren verwendet. Es wird in radioaktiv markierter Form als [^3H]NMS an Wildtyp-Rezeptoren (M_5 wt, M_2 wt) und an Rezeptormutanten eingesetzt. Über bekannte Aminosäuren der orthosterischen Bindungstasche soll ein geeigneter Bindungsmodus in beiden Rezeptoren ermöglicht werden.
- (4) Anschließend soll die allosterische Bindungstasche beider Modelle identifiziert und näher charakterisiert werden. Hierzu sollen GRID-Sonden eingesetzt werden, die Wechselwirkungsmöglichkeiten des Proteins mit bestimmten funktionellen Gruppen eines Liganden imitieren. Als Bindungspartner soll W84, ein klassischer Prototyp-Modulator, eingesetzt werden. Für ihn wird ein sandwichartiger Bindungsmodus mit zwei aromatischen Aminosäureseitenketten der allosterischen Bindungstasche postuliert [110]. Dieser Bindungsmodus soll anhand des neuen M_2 -Modells überprüft und mit einem möglichen Bindungsmodus von W84 im M_5 -Rezeptor verglichen werden. Die Bindungsmodi von allosterischen Modulatoren werden im bisherigen Modell von Jöhren zu keinem Zeitpunkt ihrer Arbeit detailliert beschrieben, sondern es erfolgen nur Darstellungen von vereinzelt Aminosäuren, was einen Abgleich

mit experimentellen Daten erschwert. Daher sollen in dieser Arbeit die an der Bindungstasche beteiligten Aminosäuren beider Rezeptormodelle detailliert dargestellt werden, um eine objektive Überprüfung der Ergebnisse dieser Arbeit zu erleichtern.

- (5) Moleküldynamiksimulationen verschiedener Protein-Ligand-Komplexe in einer membranähnlichen Umgebung sollen weiterhin erste Einblicke in die Unterschiede des dynamischen Verhaltens der beiden Rezeptoren liefern. Die Ergebnisse erlauben möglicherweise Rückschlüsse auf experimentelle Resultate. Hierzu werden die unbesetzten, die einfach besetzten Rezeptoren sowie die ternären Komplexe, bestehend aus Rezeptor-Protein, NMS als orthosterischem und W84 als allosterischem Liganden, untersucht.

Kapitel 4

Durchführung und Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten zur Erstellung der Rezeptormodelle

4.1.1 Sequenzanalyse

Die Vorhersage der transmembranären Bereiche des bovinen Rhodopsin wurde von Schlegel [99] ausführlich untersucht. Da das Vorhersage-Programm TMHMM [86] vergleichbare Ergebnisse mit anderen Programmen und der UniProtKB/SwissProt-Datenbank [58] liefern, wird es auch für die Sequenzanalyse des muskarinischen M_2 - bzw. M_5 -Rezeptors verwendet. Die Ergebnisse werden mit den Vorhersagen der UniProtKB/SwissProt-Datenbank verglichen und sind in Anhang A.6 dargestellt. Vergleicht man die durchschnittlich vorhergesagte Aminosäure-Anzahl pro Segment mit der des bovinen Rhodopsin, so fällt auf, dass zwar die Anzahl der Aminosäuren in den transmembranären Bereichen vergleichbar ist, dass es aber z. T. große Unterschiede in den Loop-Bereichen und Termini der Rezeptoren gibt. Die größten Unterschiede weist der dritte intrazelluläre Loop (i3) auf. Während dieser Loop im bovinen Rhodopsin mit weniger als 30 Aminosäuren eher kurz ist, besteht der i3 im M_2 - bzw. im M_5 -Rezeptor aus ungefähr 180 bzw. 230 Aminosäuren. Da keinerlei Strukturinformationen für diese Loops der muskarinischen Rezeptoren existieren, ist es auch nicht möglich diese Bereiche für die Homologie-Modellierung zu berücksichtigen. Weitere Unterschiede sind, dass die Termini und der zweite extrazelluläre Loop (e2) in den muskarinischen Rezeptoren z. T. deutlich kürzer sind, als im bovinen Rhodopsin. Aus diesem Grund müssen sich diese Bereiche der Rezeptoren auch strukturell voneinander unterscheiden. Eine einfache Übernahme der Koordinaten dieser Bereiche aus der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsin ist schwierig.

Die Sekundärstruktur des M_2 - und M_5 -Rezeptors wird mit den Programmen PHDsec [87] und PSIPRED [88] sowie dem Consensus-Programm JPRED [90] vorhergesagt. Vorhergesagte Helices und β -Faltblätter, die mit einer Sicherheit von ≥ 5 (bei einer Spanne von 0 bis 9) auftreten, sind in Anhang A.7 farbig markiert und werden mit den vorhergesagten transmembranären Bereichen der UniProtKB/SwissProt-Datenbank verglichen. Sinnvolle Ergebnisse liefert vor allem das Programm PSIPRED, da beim Vergleich der Sekundärstrukturvorhersagen für das bovine Rhodopsin und seiner Kristallstruktur die größte Übereinstimmung zwischen Vorhersage und wirklicher Sekundärstruktur gefunden wird [99]. Das mit dem Programm ClustalW [56] erstellte multiple Sequenzalignment der M_2 - und M_5 -Rezeptorsequenzen und der Rhodopsin-Sequenz bildet die Grundlage für das anschließende Struktur-Sequenzalignment. Es werden die PAM250-Matrix (Percent Accepted Mutation-Matrix, engl., Prozent/Anteil akzeptierter Mutation) [56] und voreingestellte Parameter verwendet. Das Alignment wird anhand der hoch konservierten Pin Points überprüft [20]. Bis auf die Pin Points des fünften transmembranären Bereiches werden alle hoch konservierten Aminosäuren korrekt untereinander ausgerichtet. Um auch TM5 korrekt ausrichten zu können, wird ein weiteres Alignment durchgeführt, da die deutlichen Unterschiede in der Länge der dritten intrazellulären Loops zu einer falschen

nischen Rezeptormodelle nutzen zu können [110].

4.1.2 Rhodopsin Kristallstruktur

Als Vorlage für beide Rezeptormodelle dient die A-Kette der Rhodopsin-Kristallstruktur 1U19 aus der PDB-Datenbank [27], die mit einer Auflösung von 2,2Å die erste Struktur ist, bei der die Lage aller Aminosäuren aufgeklärt werden konnte. Diese Kristallstruktur repräsentiert den inaktiven Zustand des Rhodopsins. Konsequenterweise werden durch Verwendung dieser Vorlage Rezeptormodelle erstellt, die auch im inaktiven Grundzustand vorliegen. Zunächst wird die Qualität der Proteinstruktur mit dem Programm PROCHECK [104] überprüft (Abbildung 4.2). Das Protein-Rückgrat von 95,4% der Aminosäuren befindet sich in günstigen Bereichen des Ramachandran-Plots.

Residues in most favoured regions [A,B,L]	242	79.9%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	47	15.5%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	12	4.0%
Residues in disallowed regions	2	0.7%
	----	-----
Number of non-glycine and non-proline residues	303	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	23	
Number of proline residues	20	

Total number of residues	348	

Abbildung 4.2: PROCHECK der Rhodopsin-Kristallstruktur 1U19 Kette A, Zusammenfassung des Ramachandran-Plots.

Aminosäuren, die ungünstige Geometrien der Φ - und Ψ -Winkel aufweisen und deren Koordinaten aus der Kristallstruktur übernommen werden, können im späteren Modell ebenfalls zu ungünstigen Geometrien führen. Dies ist aber vor allen Dingen für Bereiche der Modelle relevant, die später für die Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen genutzt werden, also vor allem für die transmembranären und extrazellulären Bereiche. Insgesamt hat die Kristallstruktur eine gute Qualität, und da die meisten ungünstigen Geometrien intrazellulär in den Loops und im C-Terminus lokalisiert sind (Tabelle 4.1), ist sie für die Erstellung von Homologie-Modellen geeignet.

Bereich des Ramachandran-Plots	Aminosäuren und Lokalisation
grundsätzlich erlaubt	K141 (i2), N145 (i2), H195 (e2), F212 (TM5), S240 (i3), A241 (i3), K325 (C-Term), L328 (C-Term), D331 (C-Term), A333 (C-Term), S338 (C-Term), E341 (C-Term), P344 (C-Term)
nicht erlaubt	Q238 (i3), C323 (C-Term)

Tabelle 4.1: Aminosäuren mit ungünstigen Geometrien des Protein-Rückgrats der Rhodopsin-Kristallstruktur 1U19, Kette A.

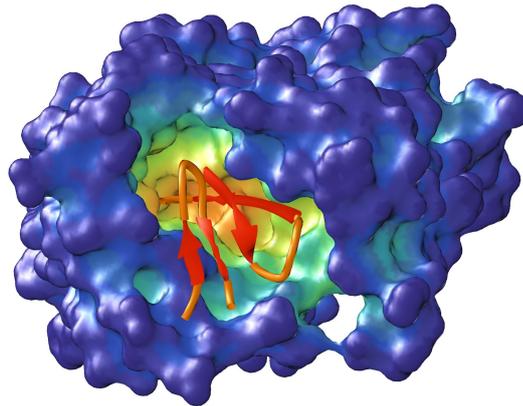


Abbildung 4.4: Lage des β -Faltblattes zwischen dem N-Terminus und dem zweiten extrazellulären Loop in der Rhodopsin-Kristallstruktur.

in Form einer Haarnadel-Schleife zwischen den Helices und bildet mit dem N-Terminus ein β -Faltblatt aus vier Strängen. Dadurch steht relativ wenig Raum für den Loop zur Verfügung. Die Position der konservierten Disulfidbrücke ist relativ rigide, da die Verknüpfung zur dritten transmembranären Helix (TM3) erfolgt [57]. Aus dem Alignment ist ersichtlich, dass der e2 vor der Disulfidbrücke für die muskarinischen Rezeptoren um zwei Aminosäuren länger und nach der Disulfidbrücke um sechs Aminosäuren kürzer ist als im Rhodopsin. Das bedeutet, dass er bei den muskarinischen Rezeptoren eine andere Geometrie haben muss und wahrscheinlich kein β -Faltblatt ausbildet. Das Programm PSIPRED [88], welches die beste Sekundärstruktur-Vorhersage für das bovine Rhodopsin liefert, sagt für das Rhodopsin ein β -Faltblatt für den e2 voraus [99], während für die muskarinischen Rezeptoren kein β -Faltblatt für diesen Bereich vorhergesagt wird (s. Anhang, Abbildung A.0). Bei der Loopsuche erweist sich bereits die N-terminale Verlängerung des e2-Loops um zwei Aminosäuren vor der Disulfidbrücke als schwierig, da viele gefundene Loop-Strukturen mit den helikalen Bereichen kollidieren. Eine mögliche Lösung ist es, relativ viele Aminosäuren der Rhodopsinstruktur zu übernehmen und eine Loop-Suche nur für einen kurzen Loop vor der Disulfidbrücke durchzuführen.

C-terminal zur Disulfidbrücke müssen deutlich weniger Aminosäuren als im Rhodopsin eine Verbindung zu TM5 ausbilden. Das bedeutet, dass der Loop C-terminal zur Disulfidbrücke zwar deutlich kürzer ausfällt, aber dennoch eine ähnliche Distanz wie im Rhodopsin überwinden muss. Auch hier kann ein Loop gefunden werden, der die Distanz zwischen Disulfidbrücke und Beginn von TM5 überbrückt, ohne mit anderen Bereichen des Rezeptors zu kollidieren. Die Koordinaten des N-Terminus werden aus der Kristallstruktur übernommen, da keine Strukturinformationen für den muskarinischen M₅-Rezeptor vorhanden sind. Der N-Terminus des bovinen Rhodopsin bildet Wasserstoffbrücken zu allen extrazellulären Loops aus und wird dadurch in seiner Position fixiert. Auch im M₅-Rezeptor ist die Ausbildung von Wasserstoffbrücken des N-Terminus zu allen extrazellulären Loops möglich.

Die Verknüpfungspunkte zwischen den Helices und Loops, an denen z.T. artifizielle Bindungslängen, -winkel oder Torsionswinkel bei der *LoopSearch*-Routine auftreten können, werden durch eine Minimierung im *cvff*-Kraftfeld (*consistent valence force field*, engl., gleich bleibendes Valenz-Kraftfeld) des *Discover*-Moduls in Insight II 2000 relaxiert. Erst wird die Minimierung über 250 Schritte mit dem *steepest descent*-Algorithmus durchgeführt, danach 500 Schritte mit dem *conjugate gradient*-Algorithmus. Im Anschluss wird die Disulfidbrücke zwischen C103/3.25 und C183/4.78 gebildet. Die Seitenketten werden mit dem Programm SCWRL angefügt.

4.2.2 Geometrieoptimierung

Nach Erstellung des Rezeptormodells wird eine Energieminimierung für das gesamte Protein durchgeführt. Erst werden 500 Schritte mit dem *steepest descent*-Algorithmus minimiert. Anschließend werden 1000 Minimierungsschritte mit dem *conjugate gradient*-Algorithmus im *cvff*-Kraftfeld durchgeführt. Nach dieser Geometrie-Optimierung ist das Ausgangsmodell des muskarinischen M₅-Rezeptors erstellt.

4.2.3 Überprüfung der Protein-Geometrie

Wie bei der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsin wird das Protein mit dem Programm PROCHECK auf seine stereochemische Qualität geprüft, da bei der Erstellung von Homologiemodellen artifizielle Rückgrat-Geometrien auftreten können. Es muss sicher gestellt werden, dass z. B. an den Verknüpfungsstellen zwischen Helices und Loops keine unnatürlichen *cis*- oder *D*-Aminosäuren auftreten. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Die Qualität des Modells ist vergleichbar gut mit der der Rhodopsin-Kristallstruktur. 96,1% der Aminosäuren liegen in bevorzugten Regionen des Ramachandran Plots. Dies ist sogar etwas besser, als die Kristallstruktur. Neun Aminosäuren liegen in den grundsätzlich erlaubten Regionen und drei Aminosäuren weisen unerlaubte phi/psi-Winkelkombinationen auf.

Residues in most favoured regions [A,B,L]	240	78.2%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	55	17.9%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	9	2.9%
Residues in disallowed regions	3	1.0%
	----	-----
Number of non-glycine and non-proline residues	307	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	1	
Number of glycine residues (shown as triangles)	12	
Number of proline residues	12	

Total number of residues	348	

Abbildung 4.5: PROCHECK des Ausgangsmodells des M₅-Rezeptors, minimiert, vor Moleküldynamiksimulation.

Aminosäuren, mit ungünstigen Protein-Rückgrat-Geometrien sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Einige sind in extrazellulären Bereichen lokalisiert, was durch die Loop-Suche begründet wird. Vor allem die Verknüpfungspunkte zwischen Loops und übernommenen Kristallstruktur-Koordinaten können ungünstige Geometrien aufweisen. Im M₅-Modell betrifft dies zum Beispiel die Aminosäuren R176 im e2 sowie D469 und V474 im e3. Ungünstige Geometrien können auch dann auftreten, wenn Prolin-Koordinaten des Templates auf die Sequenz anderer Aminosäuren übertragen werden, da die Geometrie des Prolin-Rings ungünstig für andere Aminosäuren ist. Dies betrifft die Aminosäuren V64 im i2 und R176 im e2, da hier die entsprechende Aminosäure im Templat ein Prolin darstellt. Wie bereits oben erwähnt, können ungünstige Geometrien auch im Modell auftreten wenn das Templat bereits ungünstige Aminosäure-Geometrien enthält. Dies ist der Fall für A431 im i3 sowie C512 und R513 im C-Terminus. Nur eine Minimierung des Modells ist nicht ausreichend, um ungünstige Geometrien der Aminosäuren zu entfernen. Durch eine anschließende Moleküldynamiksimulation (MDS) soll überprüft werden, ob die Protein-Geometrie erhalten bleibt und verbessert werden kann.

Bereich des Ramachandran-Plots	Aminosäuren und Lokalisation
grundsätzlich erlaubt	V12 (N-Term), E23 (N-Term), D110 (TM3), R176 (e2), A431 (i3), D269 (e3), K470 (e3), C512 (C-Term), R513 (C-Term)
nicht erlaubt	V64 (i2), A222 (i3), V474 (e3)

Tabelle 4.2: Aminosäuren mit ungünstigen Geometrien des Protein-Rückgrates des minimierten M₅-Ausgangsmodells, vor Moleküldynamiksimulation.

4.3 Bau des M₂-Rezeptormodells

Wie das M₅-Modell wird das M₂-Modell mit dem Homology-Modul aus Insight II 2000 erstellt. Das Struktur-Sequenz-Alignment ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Eine Loop-Suche wird für die Termini, alle extrazellulären und die intrazellulären Loops i2 und i3 durchgeführt.

4.3.1 Modellierung des N-Terminus

Der N-Terminus ist im muskarinischen M₂-Rezeptor deutlich kürzer als im bovinen Rhodopsin. Eine einfache Übertragung der Protein-Rückgrat-Koordinaten führt zu einem sehr flexiblen N-Terminus der artifiziell weit in den Extrazellulärraum hineinragt und kaum Kontakte zu den extrazellulären Loops ausbilden kann. Er erhält dadurch eine erhöhte Flexibilität verglichen zum N-Terminus des bovinen Rhodopsin und des M₅-Rezeptors. Da keine Strukturinformationen für die Termini der muskarinischen Rezeptoren existieren, kann vermutet werden, dass der extrazelluläre Bereich wie im bovinen Rhodopsin durch

	N-Terminus	TM1				
1U19	MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRS PFEAPQYYLAE	PWQFSMLAAYMF	45			
M2	MN-----nsthssnslaltspyKT	FEVVFIVLVA	30			
					
	TM1	i1	TM2			
1U19	FLLIMLGFPINFLTLVTV	QHKKLRT	PLNYILLNLAVADLFMVFG	90		
M2	GSLSLVTII GNILV	MVSIKVNRLQTVNNYFLF	SLACADLIIGVF	75		
					
	TM2	e1	TM3			
1U19	GFTTTLYTSLH	GYFVF	GPTGCNLEGGFFATLGGETALWSLVVLAIE	135		
M2	SMNLYTLYTVIgywpl	GPVVC	DLWLALDYVVSNA SVMNLLIISFD	120		
					
	i2	TM4				
1U19	RYVVV CKPMSNFRF-	GENHAIMGVAF	TWVMALACAAPPL	VGWS-- 177		
M2	RYFCV TKPltypvkr	tTKMAGMMIAAA	VLSFILWAPAIL	fwqfi 165		
					
	e2	TM5				
1U19	RYIPEGMQSC	CGIDYYTPHEET	NNESFVIYMFVVHFIIP	LIVIFF	222	
M2	vgvrtvEDGE	CYIQ Ffs-----	nAAVTFGT	IAAFYLP	VIIMTV	204
					
	i3	TM6				
1U19	CYQQLVFTVKEAA--	AQQQESAT	TQKAEKEVTRMVIIM	VIAFLIC	277	
M2	LYWHI sraaaaaaaaa	aaaaaaaaA	PPSREK	KVTRTILAILLAF	IIT	249
					
	TM6	e3	TM7			
1U19	WLPYAGVAFYIF	THQGSDFG	PIFMTIPAFFAKT	SAVYNPVIYIMM	322	
M2	WAPYNVMVLINT	Fcap-cip	NTVWTIGY	WLCY INSTINPAC	YALC	309
					
	H8	C-Terminus				
1U19	NKQFRNCMVTTL	CCGKNPLGDDEAST	TVSKTETS	QVAPA	348	
M2	NAT FKK TFKHL	Lmchyknigatr			332	
					

Abbildung 4.6: Struktur-Sequenz-Alignment des M₂-Rezeptors mit der Kristallstruktur 1U19 des bovinen Rhodopsin. rot, α -Helices der Kristallstruktur; blau, Pin Points; Großbuchstaben, Aminosäuren, deren Koordinaten des Protein-Rückgrates aus der Kristallstruktur übernommen werden; Kleinbuchstaben, Aminosäuren, deren Koordinaten über eine Loopsuche bestimmt werden.

Kontakte zwischen Loops und N-Terminus stabilisiert wird. Eine erhöhte Flexibilität des extrazellulären Bereiches, die z.B. auch durch eine Entfernung des N-Terminus erreicht werden kann, führt bei Moleküldynamiksimulationen des bovinen Rhodopsin zu einer Destabilisierung von TM1 und e2 [97].

Für die Modellierung des N-Terminus im M₂-Rezeptor wird zunächst eine Loop-Suche durchgeführt, um den N-Terminus des M₂-Rezeptors auch durch die extrazellulären Loop-Bereiche stabilisieren zu können und dadurch eine bessere Vergleichbarkeit zwischen dem M₂- und M₅-Modell zu erreichen. Hierfür werden die Koordinaten der ersten beiden Aminosäuren des bovinen Rhodopsin auf die des M₂-Loops übertragen. Ankerpunkte für den zu suchenden Loop sind N2 und K19. Die geometrisch ungünstigen Verknüpfungsstellen zwischen den Aminosäuren des Loops und seiner Anker-Aminosäuren werden entsprechend des M₅-Rezeptors relaxiert. Die Modellierung der anderen Loops und das weitere Vorgehen inklusive der Geometrieoptimierung erfolgte analog zum M₅-

Modell (vgl. Abschnitt 4.2, S. 48). Die Disulfidbrücke wird im M₂-Rezeptor durch die beiden Aminosäuren C96/3.25 und C176/4.78 gebildet.

Anschließend wird die Geometrie des erstellten N-Terminus alleine zunächst weiter relaxiert, bevor das gesamte Protein einer Moleküldynamiksimulation unterzogen wird. Denn die Geometrie des N-Terminus hat im Modell auch Einfluss auf die Größe und Form der allosterischen Bindungstasche. Hierfür werden die ersten 27 Aminosäuren des M₂-Modells, also der N-Terminus plus sieben Aminosäuren der ersten transmembranären Helix aus dem Protein extrahiert und für eine kurze Dynamiksimulation im *ffgmx*-Kraftfeld des Programmes GROMACS parametrisiert. Er wird in eine Wasserbox platziert, die zum Ladungsausgleich physiologische Konzentrationen an Natrium- und Chlorid-Ionen enthält (s. Abschnitt 2.2.2 auf S. 30). Die Box hat eine Größe von 4,981nm x 3,950nm x 5,300nm und enthält 3359 Wassermoleküle. Zum Ausgleich der Netto-Ladung des N-Terminus von +1 werden 19 Wassermoleküle durch neun Natrium- und zehn Chlorid-Ionen ersetzt. Die sieben Aminosäuren der ersten transmembranären Helix werden mit einer Rückhalteenergie von 1000kJ·mol⁻¹ belegt und die Dynamik wird über 500ps durchgeführt. Anschließend erfolgt eine Cluster-Analyse und Minimierung der repräsentativen Cluster-Strukturen. Die unterschiedlichen Geometrien werden dann mit der Struktur des restlichen M₂-Modell verglichen. Es wird eine Geometrie des N-Terminus gewählt, die keine ungünstigen Kontakte zu extrazellulären Loop- oder Helix-Bereichen aufweist. Diese Geometrie wird wieder mit dem restlichen M₂-Rezeptorprotein vereinigt und erneut minimiert. Damit ist das Ausgangsmodell des humanen muskarinischen M₂-Rezeptors erstellt.

4.3.2 Überprüfung der Protein-Geometrie

Nach der Geometrieoptimierung des M₂-Modells erfolgt ebenfalls eine erste Überprüfung der stereochemischen Qualität der Modellstruktur mit dem Programm PROCHECK. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.7 und Tabelle 4.3 dargestellt. Die Qualität des Protein-Rückgrates des M₂-Modells ist vergleichbar gut mit der des bovinen Rhodopsin. 97,2% aller Aminosäuren liegen in günstigen Bereichen des Ramachandran Plots. Wie beim

Residues in most favoured regions [A,B,L]	242	83.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	42	13.8%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	4	1.4%
Residues in disallowed regions	2	0.7%
	----	-----
Number of non-glycine and non-proline residues	290	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	11	
Number of proline residues	13	

Total number of residues	316	

Abbildung 4.7: PROCHECK des Ausgangsmodells des M₂-Rezeptors. minimiert, vor Moleküldynamiksimulation.

M_5 -Rezeptormodell finden sich im M_2 -Modell ungünstige Aminosäuregeometrien an Verknüpfungspunkten zwischen den Helices und Loops. Dies betrifft alle Aminosäuren, die in extra- oder intrazellulären Loops lokalisiert sind (vgl. Tab. 4.3). Die ungünstigen Geometrien der beiden C-terminal gelegenen Aminosäuren kommen durch eine schlechte Kristallstruktur in diesem Bereich des bovinen Rhodopsin zustande (vgl. Tab. 4.1, S. 4.1). Der N-Terminus des Modells enthält keine Aminosäuren aus unerlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots. Allerdings enthält der N-Terminus, der aus der kurzen Dynamiksimulation stammt, mit A13 eine Aminosäure, deren Rückgrat-Geometrie eher selten in Proteinen auftritt und so in einem Bereich des Ramachandran Plots zu liegen kommt, der nur grundsätzlich erlaubt ist.

Bereich des Ramachandran-Plots	Aminosäuren und Lokalisation
grundsätzlich erlaubt	A13 (N-Term), S182 (e2), S210 (i3), C457 (C-Term),
nicht erlaubt	F181 (e2), I462 (C-Term)

Tabelle 4.3: Aminosäuren mit ungünstigen Geometrien des Protein-Rückgrates des minimierten M_2 -Ausgangsmodells, vor Moleküldynamiksimulation.

4.4 Aufbau der Moleküldynamiksimulationen

Nach Erstellung der beiden Rezeptormodelle sollen zunächst zur weiteren Relaxierung und Geometrieoptimierung Moleküldynamiksimulationen der unbesetzten Rezeptoren durchgeführt werden. Diese dienen zur Überprüfung der Stabilität der Proteinstrukturen, und ob sie sich als Ausgangsmodelle für weitere Verfahren zur Erstellung von Protein-Ligand-Komplexen eignen. Für beide unbesetzten Modelle und alle weiteren in dieser Arbeit betrachteten Protein-Ligandkomplexe wird bei Durchführung der MDS auf gleiche Art und Weise vorgegangen. Daher wird im Folgenden zunächst der Aufbau der Moleküldynamiksimulationen allgemein beschrieben.

4.4.1 Parametrisierung der Rezeptormodelle

Alle MDS dieser Arbeit werden mit dem *mdrun*-Programm, welches in GROMACS3.2 [96] implementiert ist, durchgeführt. Es wird prinzipiell die gleiche Vorgehensweise wie bei Schlegel [97] gewählt. Alle Rezeptor-Proteine werden für das *ffgm*-Kraftfeld parametrisiert. Histidine werden standardmäßig dem Typ HisB zugeordnet. Hier liegt der Stickstoff des Imidazolringes protoniert vor, der dem Anknüpfungspunkt zur Protein-Seitenkette gegenüber liegt.

Wahl des Protonierungszustandes

Verschiedene experimentelle Untersuchungen zum Protonierungszustand von Rhodopsin und Metarhodopsin I und II zeigen eine Protonierung der Aminosäuren D83/2.50, E122/3.37 und E181/4.70 [111, 112, 113]. In biogenen Amin-Rezeptoren ist von diesen drei Aminosäuren nur D2.50 konserviert. pK_a -Shift-Berechnungen am bovinen Rhodopsin, die von Schlegel mit dem Programm UHBD (University of Houston Brownian Dynamics) [114] durchgeführt wurden, stehen in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden [99]. Auch für das Homologie-Modell des humanen histaminergen H_3 -Rezeptors wurde von Schlegel eine pK_a -Verschiebung berechnet, die zu einer Protonierung des Aspartates an dieser Position im Protein führt [99]. Da die Parametrisierung der Modelle für das Programm UHBD zum Teil recht aufwändig ist, wird für diese Arbeit das Programm PROPKA [95] verwendet, das eine empirisch ermittelte Methode zur schnellen Berechnung von pK_a -Werten von Aminosäuren innerhalb eines Proteins darstellt. Mit der neueren Version des Programms, PROPKA2.0 [115], können auch Rezeptor-Ligand-Komplexe berechnet werden. Um entscheiden zu können, ob diese Methode ähnliche Ergebnisse liefert wie UHBD, wird die Methode mit der Kristallstruktur 1U19 des bovinen Rhodopsin validiert. Für alle drei Aminosäuren wird eine deutliche Zunahme des pK_a -Wertes verglichen mit der Säurestärke in Lösung ermittelt. Die Werte sind allerdings nicht so hoch, wie mit dem Programm UHBD [99].

Während für ein Aspartat in Lösung ein Referenzwert von 3,8 angenommen wird, berechnet PROPKA für D83/2.50 einen Wert von 7,65. Glutaminsäure ist mit einem pK_a von 4,5 in Lösung etwas schwächer sauer als Asparaginsäure. Für E122/3.37 und E181/4.70 werden Werte von 7,76 bzw. 7,52 ermittelt.

Für den M_2 und M_5 -Rezeptor wird eine polare Aminosäure dann als undissoziiert betrachtet, wenn die Differenz zum Referenzwert in Lösung genauso deutlich ausgeprägt ist wie beim bovinen Rhodopsin. Für beide Modelle berechnet PROPKA nur für D2.50 einen pK_a -Wert, der deutlich über dem Referenzwert in Lösung liegt. Alle anderen Aminosäuren zeigen ähnliche Abweichungen wie bei der Berechnung des bovinen Rhodopsins. Im M_5 -Rezeptor wird für D76 ein Wert von 7,51 berechnet. Die korrespondierende Aminosäure im M_2 -Rezeptor, D69, erhält einen pK_a -Wert von 7,53. Die Aminosäure D2.50 wird für alle anschließenden Moleküldynamiksimulationen als Asparaginsäure parametrisiert, während die restlichen sauren Aminosäuren dissoziiert und als Aspartate und Glutamate parametrisiert werden.

4.4.2 Parametrisierung von Liganden

Die Parametrisierung der Liganden für MDS im *ffgmx*-Kraftfeld erfolgt manuell. Hierzu werden zunächst quantenchemische Ladungsberechnungen des Liganden mit dem Programm Spartan durchgeführt [103]. Die Ladungen werden zuerst *ab initio* mit dem kleineren 3-21G*-Basissatz und Geometrieoptimierung berechnet. Anschließend wird eine

verfeinerte Berechnung mit dem 6-31G*-Basissatz durchgeführt. Ein Vergleich mit quantenchemischen Ladungen von Aminosäuren erlaubt eine Herunterskalierung der deutlich genaueren *ab initio*-Ladungen der Liganden auf das Niveau der Kraftfeld-Parameter.

4.4.3 Simulationsbedingungen

Für die Moleküldynamiksimulationen wird das Rezeptorprotein bzw. der Protein-Ligand-Komplex in eine Phospholipid-Membran [116] eingebettet, die extrazellulär und intrazellulär von einer wässrigen Phase umgeben ist, welche physiologische Natrium- und Chlorid-Ionen-Konzentrationen enthält. Ein Beispiel für einen solchen System-Aufbau gibt Abbildung 4.8, in der das Membransystem zusammen mit einem ternären M_2 -Rezeptor-Komplex abgebildet ist [109]. In der orthosterischen Bindungstasche ist N-Methylscopolamin (NMS), in der allosterischen ist W84 lokalisiert. Die Phospholipid-Doppelschicht besteht aus DPPC-Molekülen (*Dipalmitoylphosphatidylcholin*), die wässrige Phase aus einer variablen Anzahl von Wassermolekülen und Ionen.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Simulationen zu gewährleisten, liegt zu Beginn der Parametrisierung für beide Modelle ein System mit 96 DPPC-Molekülen und 7228 Wassermolekülen vor. Die Simulationsbox hat eine Dimension von 6,788nm x 6,815nm x 9,528nm. Das M_5 - bzw. M_2 -Modell besitzen eine Gesamt-Ladung

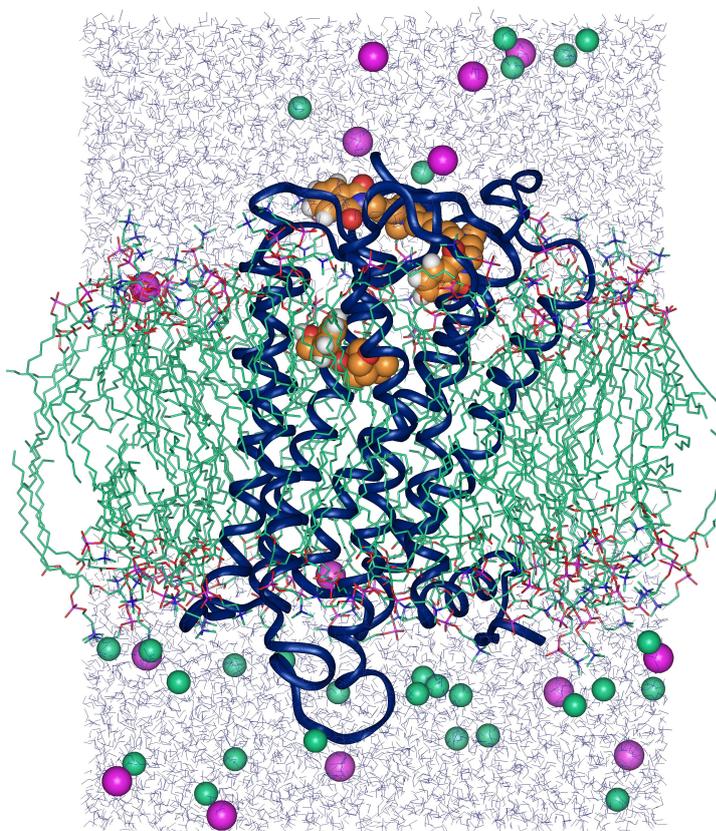


Abbildung 4.8: Aufbau des Membran-Systems für Moleküldynamiksimulationen. Equilibrierte Struktur nach MDS, dargestellt ist der ternäre Komplex des M_2 -Rezeptors mit NMS in der orthosterischen und W84 in der allosterischen Bindungstasche.

von +16 bzw. + 11. Intrazellulär sind mehr positive Ladungen als extrazellulär lokalisiert. Durch orthosterische und allosterische Liganden oder durch Bildung ternärer Komplexe erhöht sich die Zahl der positiven Ladung auf bis zu +20 bzw. +15. Eine genaue Übersicht über die Zusammensetzung der Simulationssysteme gibt Tabelle 4.4.

	DPPC	H ₂ O	Na ⁺	Cl ⁻
M ₂ -Modell unbesetzt	96	7187	15	26
+ 1 Ligand ⁺	96	7188	14	26
+ 1 Ligand ²⁺ oder + 2x Ligand ⁺	96	7187	14	27
+ 1 Ligand ⁺ + 1 Ligand ²⁺ oder + 1 Ligand ³⁺	96	7188	13	27
+ 1 Ligand ⁺ + 1 Ligand ³⁺	96	7187	13	28
M ₅ -Modell unbesetzt	96	7188	12	28
+ 1 Ligand ⁺	96	7187	12	29
+ 1 Ligand ²⁺ oder + 2x Ligand ⁺	96	7188	11	29
+ 1 Ligand ⁺ + 1 Ligand ²⁺ oder + 1 Ligand ³⁺	96	7187	11	30

Tabelle 4.4: Zusammensetzung der Membranbausteine in Abhängigkeit von der Anzahl der Ladungen innerhalb des Rezeptor-Ligand-Komplexes.

Hier sind allgemein alle möglichen Kombinationen aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet werden. Ein Beispiel für einen Liganden mit einer positiven Ladung ist NMS. Liganden, die zweifach positiv geladen sind, sind allosterische Modulatoren wie W84 und Naphmethonium. Gallamin trägt drei positive Ladungen. Weiterhin sind Kombinationen aus einem einfach positiv geladenen orthosterischen Liganden mit einfach/mehrfach geladenen allosterischen Modulatoren möglich.

Für das Herunterfahren der Rückhaltekräfte (vgl. Abschnitt 2.2.2 auf Seite 30) wird ein automatisiertes Unix-Shell-Skript entwickelt, welches in Anhang A.8 hinterlegt ist [109]. Hierbei wird in der Equilibrierungsphase der gesamte Protein-Rezeptor-Komplex mit einer Rückhaltekraft von 5000kJ·mol⁻¹ belegt. Anschließend werden die Rückhaltekräfte langsam herunter gefahren. Die Seitenketten und Liganden können sich durch etwas niedrigere Rückhaltekräfte im Sinne eines *induced fit* (engl., induzierte Passform) relativ schnell aneinander anpassen, während das Proteinrückgrat in seiner Bewegung stärker zurück gehalten wird. Dadurch soll eine zu schnelle artifizielle Bewegung der Helices vermieden werden, falls z. B. die Position eines Liganden nicht ideal ist.

Das entsprechende Dynamikprotokoll ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Auswertung erfolgt erst in der Phase der freien Moleküldynamiksimulation. Alle Simulationen werden mit einem Zeitschritt von 2fs durchgeführt. Die genauen Simulationsparameter sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

MDS-Schritt	Rückhaltekräfte (kJ·mol ⁻¹ ·nm ⁻¹)		Dauer [ps]
	Protein- Rückgrat	Seitenketten/ Liganden	
equilibr.	5000	5000	500
md_1	5000	4000	100
md_2	4000	2000	100
md_3	3000	1000	100
md_4	2000	800	100
md_5	1000	600	100
md_6	800	400	100
md_7	600	200	100
md_8	400	100	100
md_9	200	0	100
md_10	100	0	100
mdfrei	0	0	5000

Abbildung 4.9: Dynamikprotokoll für automatisiertes MDS-Shell-Skript.

Parameter für Nachbarschafts-Suche	nstlist: 5, nstype: grid, pbc: xyz, rlist: 0,9nm
Parameter zur Berechnung der Energien:	
elektrostatischer Term	Coulomb-Typ: PME, rcoulomb: 0,9nm
van-der-Waals Term	vdW-Typ: cutoff, rvdw: 0,9nm
Parameter zur Kontrolle von	
Temperatur	tcoupl: Berendsen, 310K, τ : 0,1
Druck	pcoupl: Berendsen, isotropisch, 1bar, τ : 0,5
Rückhaltekräfte auf Bindungen zu Wasserstoffatomen	LINCS-Algorithmus

Tabelle 4.5: Simulationsparameter zur Moleküldynamiksimulationen mit GROMACS [96].

4.4.4 Auswertung

Die Auswertung der RMSD-Werte erfolgt für alle Rezeptoren und alle Rezeptor-Ligand-Komplexe auf die gleiche Weise. Zunächst wird die Veränderung des Proteinrückgrats, berechnet als Standardabweichung, über die Zeit betrachtet. Hierzu werden drei Kurven ermittelt. Die oberste Kurve repräsentiert jeweils die Veränderung des gesamten Rückgrats verglichen mit dem Ausgangsmodell. Die zweite Kurve gibt die Veränderungen des Rückgrats ohne Termini an. Ausgewertet werden hierfür alle Aminosäuren der sieben transmembranären Helices, der Loops und der achten membranständigen Helix (Position 1.29 bis 7.70). Die dritte Kurve wird aus der Analyse des Proteinrückgrats der in den Rezeptormodellen transmembranären helikalen Bereiche ermittelt.

TM Bereich	allgemein	M ₅ -Modell	M ₂ -Modell
TM1	1.37-1.54	35-52	28-45
TM2	2.41-2.58	67-84	60-77
TM3	3.30-3.47	108-125	101-118
TM4	4.45-4.60	150-165	143-158
TM5	5.42-5.59	197-214	190-207
TM6	6.38-6.54	245-261 (445-461)	240-256 (390-406)
TM7	7.39-7.54	281-296 (481-496)	276-291 (426-441)

Tabelle 4.6: Transmembranäre helikale Bereiche der muskarinischen Rezeptormodelle, in Klammern: Original-Bezifferung der Aminosäuren von TM6 und TM7 der muskarinischen Rezeptoren. Abweichung der Nummerierung in TM6 und TM7 durch Kürzung des i3-Loops.

Diese Bereiche sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Bei TM6 und TM7 finden sich abweichende Bezifferungen in den Rezeptormodellen. Dies kommt durch die Kürzung des i3-Loops zustande. In Klammern sind die Bezifferungen der Originalsequenzen angegeben, die für diese Arbeit verwendet werden.

Für jede Dynamik werden zunächst der RMSD-Wert des Protein-Rückgrats, der die Veränderung des Proteins über die Zeit darstellt, und die intra- und intermolekularen Wechselwirkungsenergien berechnet (vgl. Abschnitt 2.2.2, S. 31). Die weitere Auswertung und Ermittlung einer repräsentativen Struktur wird im hinteren, equilibrierten Bereich der Dynamiken vorgenommen. Ein Bereich wird nur dann ausgewertet, wenn die Steigung der Ausgleichsgeraden der RMSD-Werte im Bereich von $\pm 10^{-7}$ nm oder darunter liegt. Die Auswertung erfolgt individuell jeweils zum Ende der Moleküldynamiksimulationen über mindestens 500ps.

Die Trajektorie wird einer Cluster-Analyse unterzogen. Als Grenzwert wird ein Abbruchkriterium zwischen 0,068nm und 0,07nm für das Proteinrückgrat gewählt. Die jeweils mittlere Struktur der einzelnen Cluster wird mit dem *steepest descent*-Algorithmus im GROMACS-Kraftfeld minimiert und mit PROCHECK auf ungünstige Geometrien überprüft. Die anschließende Auswahl einer repräsentativen Struktur erfolgt im equilibrierten Bereich jeder Dynamik anhand der Cluster-Größe, der RMSD- und Energie-Werte sowie der Ergebnisse des Ramachandran-Plots der mittleren Cluster-Strukturen.

4.5 MD-Simulationen der unbesetzten Rezeptormodelle

4.5.1 MDS des M5-Rezeptors

In Abbildung 4.10A ist der Verlauf der RMSD-Werte des unbesetzten M₅-Rezeptormodells über die Zeit, dargestellt. Abbildung 4.10B zeigt den Verlauf der intramolekularen Protein-Protein-Wechselwirkungsenergie. Der RMSD-Wert nimmt zunächst in Intervallen von 100ps stetig langsam zu. Dies wird durch die abnehmenden Rückhaltekräfte verursacht, die zu Beginn der Dynamik auf dem Protein liegen (vgl. Abb. 4.9, S. 58).

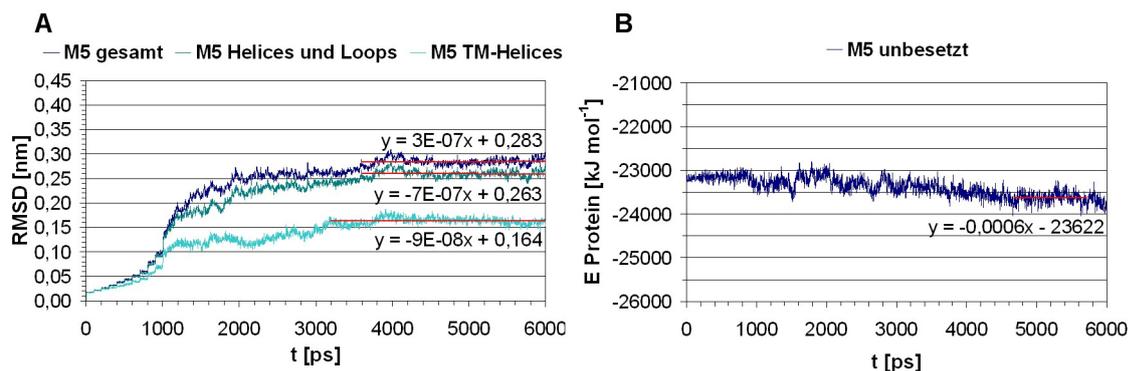


Abbildung 4.10: MDS des unbesetzten M₅-Rezeptors. A, RMSD-Werte des Proteinrückgrats. M5 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M₅-Modells; M5 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz L27/1.29 bis C512/7.70; M5 TM-Helices, Proteinrückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M₅-Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intramolekularen Wechselwirkungsenergie des Proteins des unbesetzten M₅-Rezeptormodells.

Die Dynamiksimulation wird nach 1000ps ohne Rückhaltekräfte fortgeführt und weist ab diesem Zeitpunkt zunächst größere Veränderungen auf. Das gesamte Protein-Rückgrat (*M5 gesamt*) fluktuiert ab etwa 3,6ns relativ gleichmäßig und zeigt mittlere Werte von 0,28nm. Der Wert für die Rückgrat-Bereiche ohne Termini (*M5 Helices und Loops*) beträgt im Mittel 0,26nm. Der Anteil der Termini an der Veränderung des Protein-Rückgrats beträgt damit etwa sieben Prozent der gesamten Bewegung. Die mittleren Werte der transmembranären Helices (*M5 TM Helices*) liegen im ausgewerteten Bereich bei 0,16nm.

Die Wechselwirkungsenergie des unbesetzten Rezeptors nimmt im Verlauf der Dynamiksimulation stetig langsam zu. In einem Bereich zwischen 4,6ns und 5,7ns zeigt der Energieverlauf eine gleichmäßige Fluktuation und mittlere Werte von -23622kJ·mol⁻¹. Für eine repräsentative Struktur aus diesem equilibrierten Bereich ist das Ergebnis der Geometrie-Überprüfung in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Werte sind mit dem Ausgangsmodell vergleichbar (vgl. Abb. 4.5, S. 50). 97,8% der Aminosäuren liegen in günstigen

Residues in most favoured regions [A,B,L]	247	80.5%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	53	17.3%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	4	1.3%
Residues in disallowed regions	3	1.0%
	----	-----
Number of non-glycine and non-proline residues	307	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	1	
Number of glycine residues (shown as triangles)	12	
Number of proline residues	12	

Total number of residues	332	

Abbildung 4.11: Geometrieüberprüfung des unbesetzten M₅-Rezeptors aus MDS. Zusammenfassung des Ramachandran-Plots für eine repräsentative, minimierte Struktur des unbesetzten M₅-Rezeptormodells.

Bereichen des Ramachandran-Plots. Drei Aminosäuren treten in unerlaubten Bereichen auf (A219 (i3), V474 (e3), L476 (e3)). Aminosäuren, deren Geometrie in grundsätzlich erlaubten Regionen des Ramachandran-Plots zu liegen kommen, sind T15 (N-Term), C141 (i2), A224 (i3) und V432 (i3).

4.5.2 MDS des M₂-Rezeptors

In Abbildung 4.12A sind die RMSD-Werte für den unbesetzten M₂-Rezeptor über die Zeit dargestellt. Der Verlauf der intramolekularen Protein-Protein-Wechselwirkungsenergie ist in Abbildung 4.12B zu sehen. Wie beim M₅-Rezeptor kommt es durch die anfänglichen

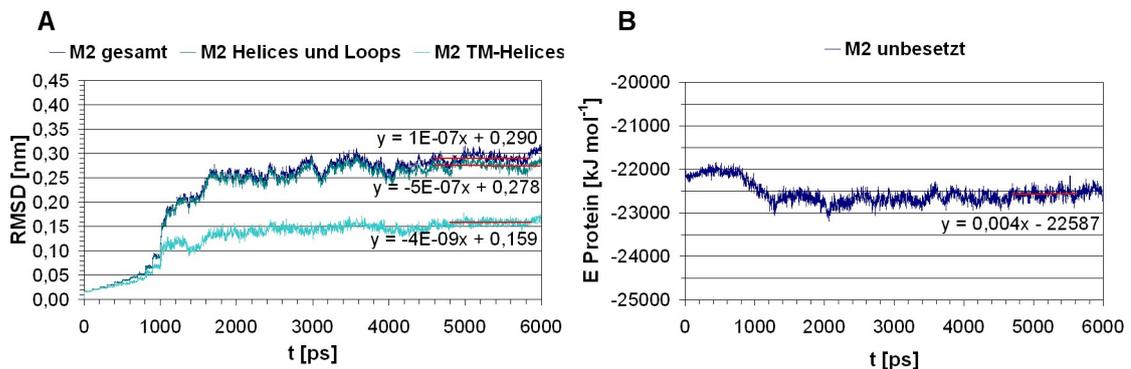


Abbildung 4.12: MDS des unbesetzten M₂-Rezeptors. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M₂-Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C457/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M₂-Modells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intramolekularen Wechselwirkungsenergie des Proteins des unbesetzten M₂-Rezeptormodells.

Rückhaltekräfte zunächst zu einem treppenartigen Anstieg der RMSD-Werte. In einem Bereich zwischen etwa 4,8ns und 5,8ns zeigt das Protein eine gleichmäßige Bewegung. Der mittlere RMSD-Wert des gesamten Protein-Rückgrats liegt hier bei 0,29nm. Die Werte für die Helices und Loops bzw. nur für die transmembranären Helices liegen bei 0,28nm und 0,16nm. Die Termini werden im M₂-Modell gut stabilisiert. Der Unterschied zwischen dem gesamten Protein-Rückgrat (*M2 gesamt*) und den Bereichen ohne Termini (*M2 Helices und Loops*) ist mit vier Prozent gering.

Bei Betrachtung des Energieverlaufs beobachtet man zunächst einen deutlichen Energiegewinn der Proteinstruktur, der bei 800ps einsetzt. Dies wird durch bessere intramolekulare Wechselwirkungsmöglichkeiten des Proteins bei Nachlassen der Rückhaltekräfte begründet, da sich hier unmittelbar nach Freilassen der Seitenketten (nach 800ps) bzw. des Protein-Rückgrats (nach 1000ps) z.B. weitere Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Die Energie fluktuiert zwischen 1ns und 4,5ns recht stark und nimmt stetig langsam ab. Im ausgewerteten Bereich zwischen 4,6ns und 5,5ns zeigt sie mittlere Werte von $-22587\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Das Ergebnis der Geometrie-Überprüfung für eine repräsentative Struktur, die im equilibrierten Bereich der Dynamik auftritt, ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Verglichen mit

Residues in most favoured regions [A,B,L]	242	83.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	40	13.8%
Residues in generously allowed regions [\sim a, \sim b, \sim l, \sim p]	5	1.7%
Residues in disallowed regions	3	1.0%
	----	-----
Number of non-glycine and non-proline residues	290	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	11	
Number of proline residues	13	

Total number of residues	316	

Abbildung 4.13: Zusammenfassung des Ramachandran-Plots für die repräsentative, minimierte Struktur des unbesetzten M₂-Rezeptormodells.

der Ausgangsstruktur zeigt das unbesetzte M₂-Rezeptormodell nur eine leichte Veränderung der Proteingeometrie (vgl. Abb. 4.7, S. 53). 97,2% der Aminosäuren zeigen günstige Ψ/Φ -Winkelkombinationen. Aminosäuren, deren Rückgrat-Geometrien in unerlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots auftreten, sind S8 (N-Term), V166 (e2) und C457 (C-Term). Grundsätzlich erlaubte Geometrien weisen die Aminosäuren A13 (N-Term), F181 (e2), A184 (e2), N444 (C-Term) und K462 (C-Term) auf. V166 liegt im N-terminalen, F181 und A184 liegen im C-terminalen Bereich des zweiten extrazellulären Loops. Diese Bereiche sind nicht unmittelbar an der Bindung der in dieser Arbeit betrachteten allosterischen Modulatoren beteiligt.

Im Folgenden werden Protein-Ligand-Komplexe an beiden Rezeptoren untersucht. Hierzu werden zunächst die orthosterische, anschließend die allosterische Bindungstasche betrachtet.

4.6 Charakterisierung der orthosterischen Bindungstasche

Bei beiden Rezeptormodellen wird die orthosterische Bindungstasche zunächst über eine Bestimmung der freien Volumina der Ausgangsmodelle mit dem Programm SURFNET identifiziert. Bei Betrachtung der beiden Rezeptormodelle sind alle Aminosäuren, die wichtig für die Bindung orthosterischer Liganden sind (vgl. Tabelle 1.3, S. 18), innerhalb der transmembranären Helices lokalisiert. Die Seitenketten bilden zusammen mit anderen Aminosäuren der Rezeptoren das aktive Zentrum. Beim Vergleich der orthosterischen Bindungstaschen des M₂- und des M₅-Rezeptormodells ergeben sich, auch im Hinblick auf das bereits früher erstellte M₂-Modell [79], nur leichte Unterschiede.

4.6.1 Bindungsmodus N-Methylscopolamin (NMS)

Für die Untersuchung der orthosterischen Bindungstasche wird der inverse Agonist N-Methylscopolamin (NMS) gewählt. Dieser Ligand wird in Form des Radio-Orthosters

[³H]-NMS für die pharmakologische Charakterisierung von allosterischen Modulatoren verwendet [117]. Daher soll zunächst überprüft werden, ob die beiden Rezeptormodelle den Bindungsmodus von NMS in der orthosterischen Bindungstasche wiedergeben können. Die Bindung dieses Liganden bildet außerdem die Grundlage für weitere Untersuchungen zu ternären Komplexen mit allosterischen Modulatoren.

Zunächst werden Untersuchungen der Bindungstaschen mit dem Programm GRID [102] durchgeführt. Dieses kann bevorzugte intermolekulare Wechselwirkungen eines Proteins mit verschiedenen Sonden berechnen. Die verwendeten Sonden imitieren funktionelle Gruppen des Liganden und sind in Tabelle 4.7 zusammen mit ihren wichtigsten Eigenschaften aufgeführt. Anschließend wird die Struktur von NMS mit dem *Sketch*-

GRID-Sonde	NM3	C1=	O	O1
VDWR (Å)	2,55	1,90	1,60	1,65
NEFF	33	6	6	7
ALPH (Å ³)	7,6	2,07	0,84	1,20
Q	0,84	0,0	-0,25	-0,10
EMIN (kcal·mol ⁻¹)	0,0	0,0	-5,0	-4,5
RMIN (Å)	0,0	0,0	1,40	1,40
JD	0	0	0	1
JA	0	0	2	2

Tabelle 4.7: Eigenschaften der verwendeten GRID-Sonden. *NM3*, Trimethylammonium-Kation; *C1=*, aromatische oder vinyloge CH-Gruppe; *O*, sp²-hybridisierte Carbonylfunktion; *O1*, aliphatische Hydroxylgruppe; *VDWR*, van der Waals Radius; *NEFF*, effektive Anzahl an Elektronen; *ALPH*, Polarisierbarkeit α ; *Q*, elektrostatische Ladung; *EMIN*, optimale Wasserstoffbrücken-Energie; *RMIN*, Wasserstoffbrücken-Radius; *JD*, Anzahl der Wasserstoffbrücken-Donoren; *JA*, Anzahl der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren.

Modul des Programms Sybyl [100] erstellt und ein *simulated annealing* über 50 Zyklen durchgeführt. Die Struktur wird jeweils für 1000fs auf 1000K erhitzt und dann für 1000fs auf 200K abgekühlt. Die vom Programm herausgeschriebenen Strukturen werden mit dem *conjugate gradient*-Algorithmus minimiert und anschließend mit der Konformation von NMS im bereits bestehenden M₂-Modell verglichen. Es kann für jedes Modell eine NMS-Konformation gefunden werden, die energetisch günstig ist und sowohl dem Bindungsmodus im bereits existierenden M₂-Modell ähnelt, als auch mit den GRID-Feldern in beiden Rezeptoren in Einklang gebracht werden kann. Die entsprechenden Konformationen werden manuell in die Bindungstaschen der beiden Modelle eingebracht. Das Ergebnis der GRID-Untersuchungen und der Bindungsmodus von NMS im Ausgangsmodell des M₅- bzw. M₂-Rezeptors ist in den Abbildungen 4.14 und 4.15 dargestellt. Die Abbildungen 4.14A und 4.15A zeigen jeweils die korrespondierenden essentiellen Aminosäuren der orthosterischen Bindungstasche nach Tabelle 1.3 auf Seite 18, ihre Lokalisation in den transmembranären Helices sowie im Ausgangsmodell bestehende Wasserstoffbrücken-Bindungen (H-Brücken). Daneben (Abb. 4.14 und 4.15, B)

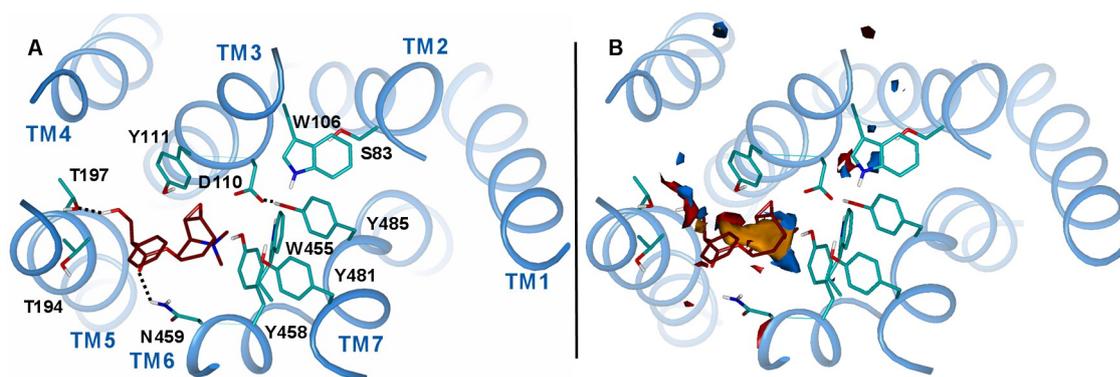


Abbildung 4.14: Bindungsmodus von NMS im Ausgangsmodell des M_5 -Rezeptors. A, Darstellung essentieller Aminosäuren des aktiven Zentrums; B, GRID-Wechselwirkungsfelder: blau, aromatische/Vinyl-Sonde, -4kcal; orange, Trimethylammonium-Kation-Sonde, -7kcal; rot, Sauerstoffsonde, -5,5kcal.

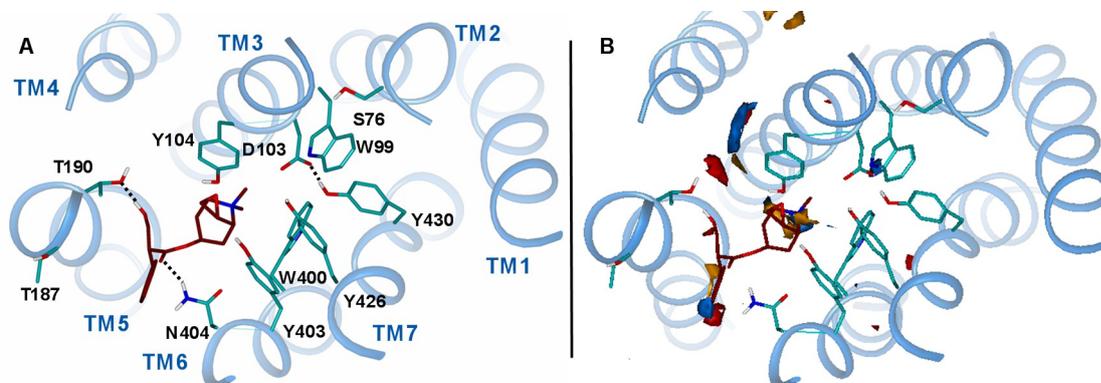


Abbildung 4.15: Bindungsmodus von NMS im Ausgangsmodell des M_2 -Rezeptors. A, Darstellung essentieller Aminosäuren des aktiven Zentrums; B, GRID-Wechselwirkungsfelder: blau, aromatische/Vinyl-Sonde, -4kcal; orange, Trimethylammonium-Kation-Sonde, -7kcal; rot, Sauerstoffsonde, -5,5kcal.

sind bevorzugte Wechselwirkungsfelder für drei der untersuchten GRID-Sonden dargestellt. Im M_5 -Rezeptor ist das Feld für bevorzugte Bindungen von quartären Ammoniumverbindungen bei -7kcal größer als im M_2 -Rezeptor. Die Positionierung des quartären Stickstoffes steht bei beiden Modellen in Einklang mit den entsprechenden Feldern. Diese Felder werden vor allem durch das saure Asp in Position 3.32 und die aromatischen Aminosäuren erzeugt, die zusammen einen aromatischen Käfig ausbilden. Dieser ist für die Bindung von orthosterischen Liganden an muskarinischen Rezeptoren essenziell und eignet sich vor allem für die Bindung quartärer Ammoniumgruppen, die häufig in diesen Rezeptorliganden zu finden sind. Liganden, die einen tertiären Stickstoff besitzen, der in physiologischer Umgebung protoniert vorliegt, können mit D3.32 eine H-Brücke ausbilden.

Die Carbonylfunktion des Tropasäure-Esters bildet in beiden Modellen eine H-Brücke zu N6.52 (M_5 N459, M_2 N404) aus. Diese Aminosäure ist vor allem für die Bindung von Antagonisten essenziell (vgl. Tabelle 1.3). In Nähe der Positionierung des aromatischen Phe-

nylrings der Tropasäure zeigt das M_2 -Modell eine gute Wechselwirkungsmöglichkeit auf einem Energieniveau von -4kcal. Im M_5 -Rezeptor ist hier kein Feld lokalisiert. Die Wechselwirkung ist unspezifischer. Die Hydroxylgruppe der Tropasäure-Seitenkette bildet in beiden Modellen eine H-Brücke zu T5.42 aus (M_5 197, M_2 T190). Diese Aminosäure hat allerdings größere Bedeutung für Agonisten als für Antagonisten.

Nach Parametrisierung von NMS für das *ffgmx*-Kraftfeld werden Moleküldynamiksimulationen der Rezeptor-Ligandkomplexe über 6ns durchgeführt.

4.6.2 MDS des NMS-besetzten M_5 -Rezeptormodells

In Abbildung 4.16A sind die RMSD-Werte des NMS-besetzten M_5 -Rezeptors über die Zeit dargestellt. Der Energie-Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie wird in Abbildung 4.16B gezeigt. Das gesamte Protein-

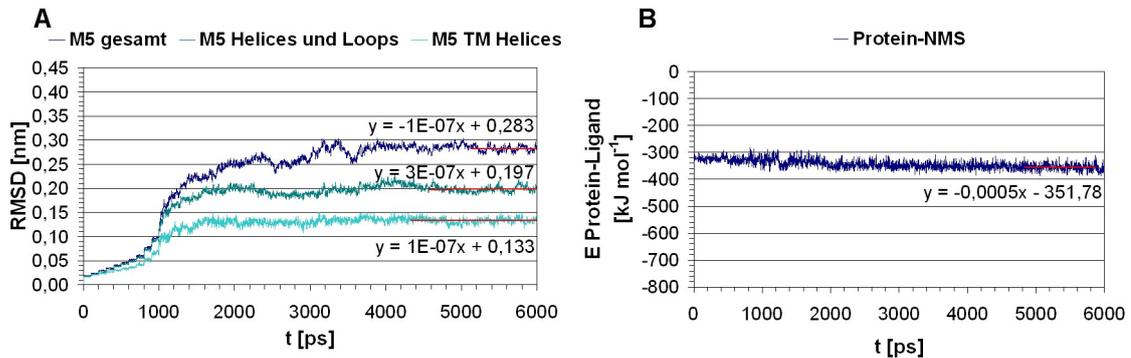


Abbildung 4.16: MDS des M_5 -NMS-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M5 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_5 -Modells; M5 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz L27/1.29 bis C512/7.70; M5 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_5 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

Rückgrat weicht um 0,28nm von der Ausgangsstruktur ab und zeigt damit die gleiche Abweichung wie der unbesetzte M_5 -Rezeptor (vgl. Abb. 4.10, S. 60). Die Bereiche ohne Termini (*M5 Helices und Loops*) weisen im Vergleich zum unbesetzten Rezeptorzustand (0,26nm) mit 0,2nm eine geringere Abweichung auf. Der Anteil der Veränderungen der Termini an der Gesamt-Veränderung ist im NMS-besetzten M_5 -Rezeptor deutlich größer und beträgt absolut fast 0,1nm bzw. etwa 30%.

Auch die transmembranären helikalen Bereiche verändern sich im NMS-besetzten Rezeptor nicht so stark wie im unbesetzten (0,13nm vs. 0,16nm). Die Anwesenheit von NMS im Rezeptorprotein führt zu einer Stabilisierung dieser Bereiche. Der Verlauf der intermolekularen Wechselwirkungsenergie zwischen dem M_5 -Rezeptor und NMS ist stabil und beträgt im Mittel $-352\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

4.6.3 MDS des NMS-besetzten M₂-Rezeptormodells

In Abbildung 4.17A sind die RMSD-Werte des NMS-besetzten M₂-Rezeptors über die Zeit dargestellt. Der Energie-Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie wird in Abbildung 4.17B gezeigt. Das gesamte Protein-

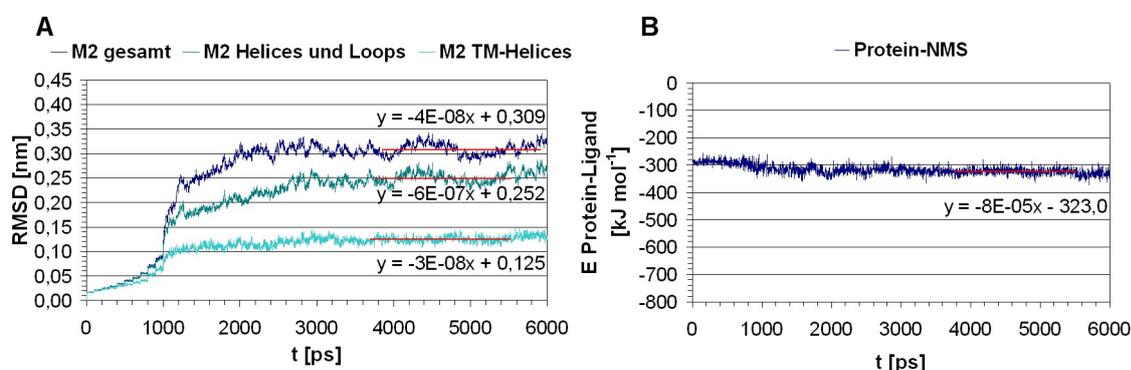


Abbildung 4.17: MDS des M₂-NMS-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M₂-Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C457/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M₂-Modells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

Rückgrat verändert sich hier etwas stärker als im unbesetzten Rezeptorzustand (vgl. Abb. 4.12, S. 61). Die Werte betragen im NMS-besetzten Rezeptor 0,31 nm. Die Bereiche ohne Termini (*M5 Helices und Loops*) zeigen mit 0,25 nm allerdings geringere Abweichungen vom Ausgangsmodell als der unbesetzte M₂-Rezeptor (0,28 nm). Der Anteil der Termini-Bewegungen an der Gesamt-Bewegung beträgt absolut 0,06 nm, was einem Anteil von etwa 18% entspricht. Auch die helikalen Bereiche werden durch die Bindung von NMS in der orthosterischen Bindungstasche stabilisiert. Die Veränderungen betragen 0,13 nm gegenüber 0,16 nm im unbesetzten Rezeptorzustand.

Die intermolekulare Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie zeigt einen stabilen Verlauf und mittlere Werte von $-323 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

4.6.4 Vergleich der NMS-besetzten Rezeptoren

Um beide Rezeptormodelle miteinander zu vergleichen, werden die RMSD-Werte der NMS-besetzten Rezeptoren in Abbildung 4.18 gegenüber gestellt. Wie im unbesetzten Rezeptorzustand zeigt der muskarinische M₅-Rezeptor ein etwas rigideres Verhalten als der M₂-Rezeptor. Die mittleren RMSD-Werte im ausgewerteten Bereich für das gesamte Protein-Rückgrat betragen 0,28 nm für M₅ und 0,31 nm für M₂. Die Werte für die Bereiche ohne Termini liegen bei 0,2 nm bzw. 0,25 nm. Hier kann man eine Stabilisierung der Helices und Loops durch die Bindung des inversen Agonisten NMS erkennen. Da man für die

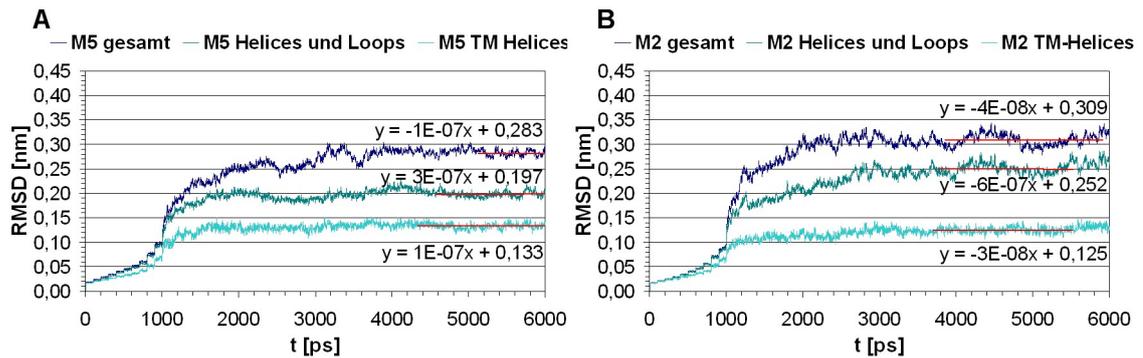


Abbildung 4.18: RMSD-Werte der NMS-besetzten Rezeptormodelle

Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren von einer deutlichen Konformationsänderung der Helices ausgeht (vgl. Abschnitt 1.5.2, S. 14), führen inverse Agonisten über eine Rigidisierung der inaktiven Helix- und Loop-Konformationen zu einer Stabilisierung des inaktiven Zustandes der GPCRs. Dieses Verhalten wird durch beide Rezeptormodelle nachvollzogen, und eine Stabilisierung und Rigidisierung der Rezeptorproteine wird auch durch die RMSD-Werte der transmembranären Bereiche deutlich.

Beide Rezeptoren zeigen hier gerundete Werte von 0,13nm. Die Stabilisierung der transmembranären helikalen Bereiche durch NMS ist bei M_2 allerdings tendenziell besser als bei M_5 .

Ein Vergleich der Energiewerte der Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien wird nicht vorgenommen.

In Abbildung 4.19 ist eine Übersicht über die repräsentativen Strukturen der NMS-besetzten Rezeptoren dargestellt. Die Lage von NMS in der orthosterischen Bindungs-

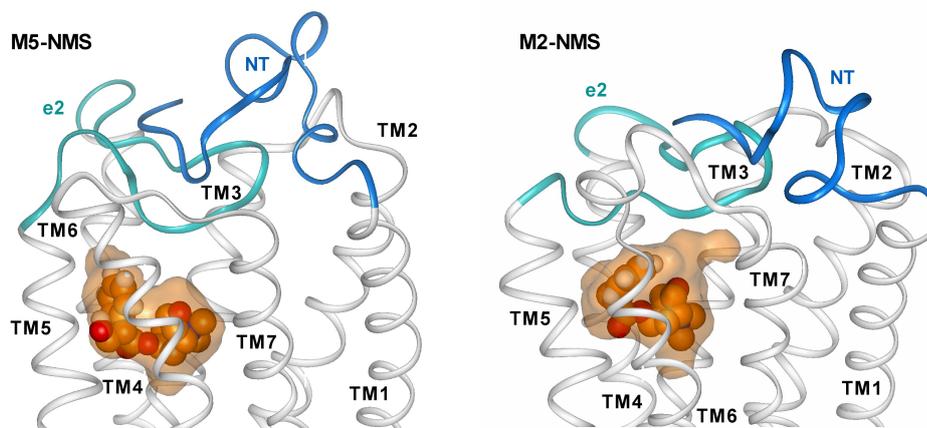


Abbildung 4.19: Übersichts-Darstellung der repräsentativen Strukturen aus MDS der muskarinischen Rezeptoren mit NMS. blau, N-Terminus; türkis, zweiter extrazellulärer Loop; orangefarbene Oberfläche, orthosterische Bindungstasche nach MDS; NMS ist als Kalottenmodell dargestellt; links, NMS-besetzter M_5 -Rezeptor, minimiert; rechts, NMS-besetzter M_2 -Rezeptor, minimiert.

tasche ist gut zu erkennen. Während der Dynamiksimulation wird NMS in beiden Rezeptoren vollständig von Aminosäuren umgeben, so dass der Rezeptor in einem geschlossenen Zustand vorliegt. Die orthosterische Bindungstasche des Rezeptors ist vom Extrazellulärraum aus nicht erreichbar. Die Abbildung zeigt die gleiche Ansicht der Rezeptoren nach einer Überlagerung der helikalen Bereiche. Die N-Termini der Modelle sind zwischen den extrazellulären Loops e2 und e3 lokalisiert. Der zweite extrazelluläre Loop (e2) ist im M₅-Rezeptor etwas tiefer im Protein eingebettet. Der extrazelluläre Bereich des M₂-Rezeptors erscheint weniger gepackt. Dies wird auch durch die Größe der Bindungstasche deutlich. Diese wird nach oben hin für den M₂-Rezeptor größer, während sie bei M₅ den inversen Agonisten fast vollständig umschließt.

4.7 Charakterisierung der allosterischen Bindungstasche

Für die Charakterisierung der allosterischen Bindungstasche der beiden Rezeptoren wird W84 als klassischer allosterischer Modulator gewählt. W84 weist mit einer etwa 100fach höheren Affinität zu M₂ verglichen mit M₅, eine deutliche M₂/M₅-Subtypselektivität auf [118, 119]. Zu Beginn dieser Arbeit sind bereits Aminosäuren bekannt, die diese Subtypselektivität erklären können [68]. Diese sind an Position 5.29 und 7.36 im e2 und TM7 lokalisiert.

4.7.1 Bindungsmodus W84

Bei beiden Rezeptormodellen wird die allosterische Bindungstasche zunächst über eine Bestimmung der freien Volumina der Ausgangsmodelle mit dem Programm SURFNET identifiziert. Anschließend erfolgen wie bei der orthosterischen Bindungstasche GRID-Untersuchungen. Aus Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Alkan-Bisammonium-Derivaten ist bekannt, dass die lateralen aromatischen Ringsysteme [120, 121] und mindestens eine positive Ladung [122] wichtig für die Bindung dieser Derivate sind. Für die GRID-Untersuchungen werden daher die quartäre Stickstoff-Sonde (NM3), die aromatische/Vinylsonde (C1=) und die Carbonyl-Sauerstoff-Sonde (O) eingesetzt. Die Positionierung von W84 erfolgt manuell in die GRID-Wechselwirkungsfelder. Hierbei wird für den M₂-Rezeptor die Konformation von W84 aus dem bereits bestehenden M₂-Modell übernommen. Diese Konformation ist energetisch günstig und stammt aus einer Dynamiksimulation in einer physiologischen Natrium-Chlorid-Lösung [110]. Für die Platzierung im M₅-Rezeptor wird die W84-Konformation manuell leicht angepasst. Die Abbildungen 4.20 und 4.21 zeigen den detaillierten Bindungsmodus von W84 an den beiden Ausgangsmodellen des M₅- bzw. M₂-Rezeptors. Da der Einfluss der Aminosäuren die im e2 bzw. in e3/TM7 lokalisiert sind (Position 5.29: M₅Q184, M₂Y177; 7.36: M₅H478, M₂T423), bereits bekannt ist, wird dieser Bereich der Bindungstasche zur besseren Orientierung als proximal (lat., nah) bezeichnet. Der Bereich der Bindungstasche, der zwischen e2 und e1/TM3 liegt, wird als distal (lat., fern) bezeichnet. Entsprechend

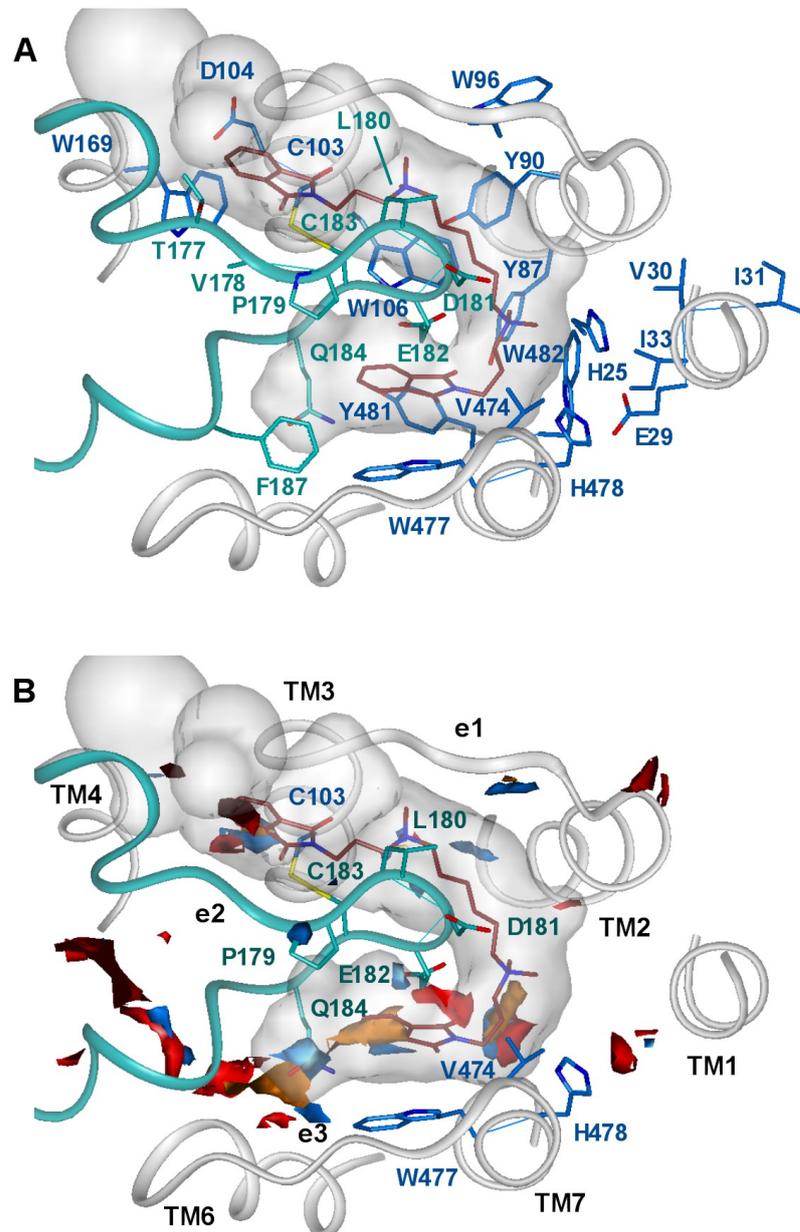


Abbildung 4.20: Bindungsmodus von W84 am M₅-Rezeptor. türkis, Aminosäuren des e2; blau, andere Aminosäuren. A, Aminosäuren der allosterischen Bindungstasche und Geometrie von W84 (dunkelrot); B, GRID-Felder: C1=: blau, -3,8kcal; NM3: orange, -7,8kcal; O: rot, -5,5kcal; dargestellte Aminosäuren haben Bedeutung für die Bindung strukturell diverser allosterischer Modulatoren [68, 109, 119, 70, 123].

gibt es bei den betrachteten allosterischen Modulatoren proximale und distale aromatische Ringsysteme und quartäre Ammoniumgruppen.

Am M₅-Rezeptor wird die allosterische Bindungstasche vor allem von aromatischen und aliphatischen Aminosäuren gebildet (Abb. 4.20A). Die beiden Phthalimid-Ringe sind in Feldern für aromatische Aminosäuren lokalisiert (Abb. 4.20B). Der proximale Phthalimid-Ring liegt annähernd parallel zu M₅W477/7.35. Oberhalb von M₅Q184/5.29 existiert ein weiteres, größeres aromatisches Feld, welches von W84 nicht genutzt wird. Auch der

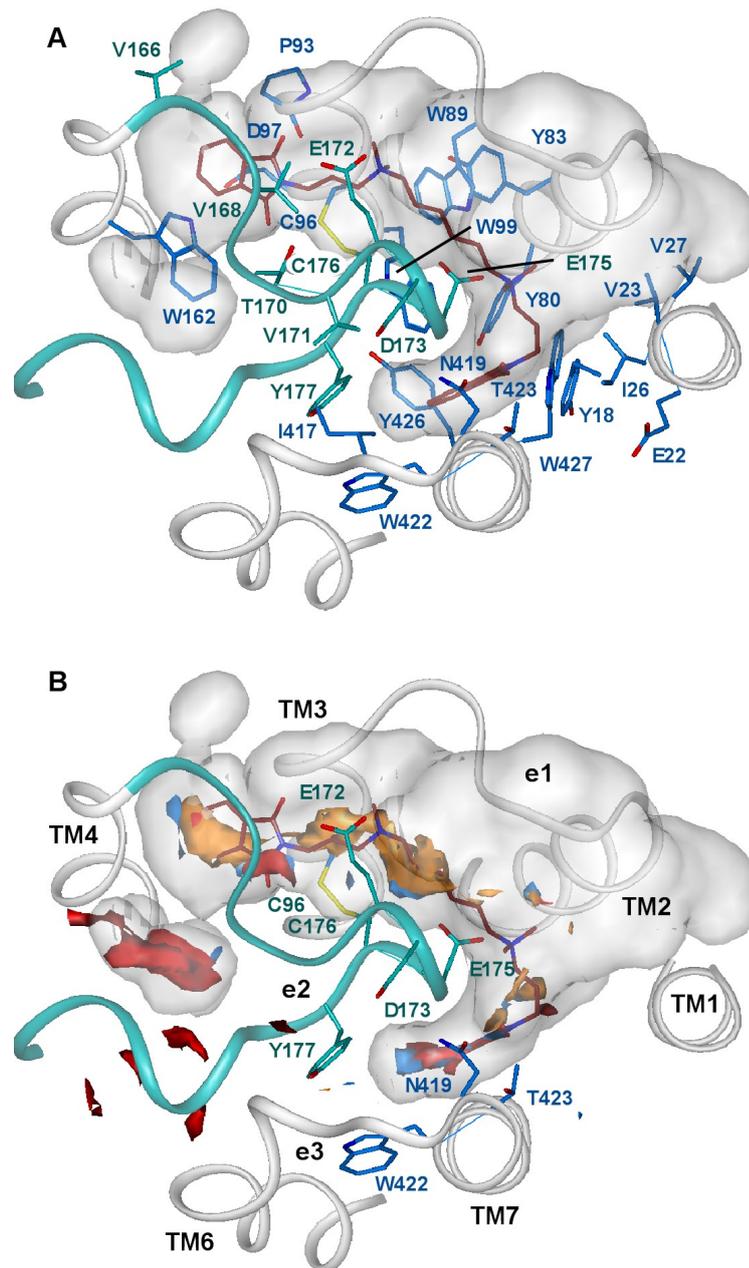


Abbildung 4.21: Bindungsmodus von W84 am M₂-Rezeptor. türkis, Aminosäuren des e2; blau, andere Aminosäuren. A, Aminosäuren der allosterischen Bindungstasche und Geometrie von W84 (dunkelrot); B, GRID-Felder: C1=: blau, -3,8kcal; NM3: orange, -7,8kcal; O: rot, -5,5kcal; dargestellte Aminosäuren haben Bedeutung für die Bindung strukturell diverser allosterischer Modulatoren [68, 70, 109, 119, 123].

Raum der allosterischen Bindungstasche wird in diesem Bereich von W84 nicht komplett ausgenutzt. M₅Q184/5.29 ist in der Lage, eine Wasserstoffbrücken-Bindung zu M₅Y281/7.39 auszubilden.

Für die proximale quartäre Ammoniumgruppe, in Nähe von M₅E182/4.77, sind gute Wechselwirkungsmöglichkeiten vorhanden, während für die distale Ammoniumgruppe bei -7,8kcal nur ein kleines Feld in unmittelbarer Nähe des quartären Stickstoffes existiert. Die Carbonylfunktionen sind auf einem Energieniveau von -5,5kcal nicht unmittelbar

in der Nähe von kleineren Feldern für diese Wechselwirkungsmöglichkeit positioniert.

Im M_2 -Rezeptor ist die allosterische Bindungstasche im Bereich zwischen TM1 und TM2 im Vergleich zum M_5 -Rezeptor deutlich größer. Sie wird durch mehrere aliphatische Aminosäuren des TM1 begrenzt. Im M_5 -Rezeptor wird die Verkleinerung der Bindungstasche in diesem Bereich vor allem durch ein nicht konserviertes His im N-Terminus verursacht (vgl. H25, Abb. 4.20A). Die aliphatischen Aminosäuren aus TM1 sind nicht mehr so stark an der Ausbildung der Bindungstasche beteiligt.

Am M_2 -Rezeptor sind die endständigen aromatischen Phthalimid-Ringe ebenfalls in Feldern für aromatische Wechselwirkungen positioniert (Abb. 4.21B). Obwohl die proximale Seite der Bindungstasche hier viel enger ist als im M_5 -Rezeptor, ist das aromatische Feld zwischen den beiden Aminosäuren $M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$ größer als im M_5 -Rezeptor. Ein Phthalimidring von W84 ist zwischen diesen beiden Aminosäuren positioniert. W84 nutzt den Raum der proximalen Bindungstasche nicht vollständig, aber annähernd aus. Der zweite distale Aromat ist in einem kleineren aromatischen Feld positioniert, das aber ebenfalls eine gute Wechselwirkung der hier positionierten aromatischen CH-Gruppen von W84 mit dem Protein verdeutlicht.

Die Wechselwirkungsmöglichkeiten für quartäre Ammoniumgruppen sind im M_2 -Rezeptor deutlich größer als im M_5 -Rezeptor. Die Felder werden vor allem durch Anwesenheit der beiden sauren Aminosäuren $M_2E172/4.74$ und $M_2E175/4.77$ erzeugt (vgl. Abschnitt 7.1.1, S. 105). Bei M_5 ist an Position 4.74 ein Leucin lokalisiert.

Der proximale quartäre Stickstoff selbst ist nicht direkt in den großen $MM3$ -Feldern platziert (Abb. 4.21B). In Nähe der proximalen Ammoniumgruppe sind allerdings innerhalb des van-der-Waals-Radius der Methylreste mehrere kleinere Felder zu finden, die eine Wechselwirkungsmöglichkeit mit quartären Ammoniumgruppen repräsentieren.

Wie im M_5 -Rezeptor gibt es kaum Wechselwirkungsmöglichkeiten für die Carbonylgruppen. Allerdings zeigt sich im distalen Bereich der Bindungstasche eine Möglichkeit zur Bildung von H-Brücken mit der Seitenkette von $M_2T170/4.72$, die auch ein entsprechendes GRID-Feld produziert (vgl. Abb. 4.21 A und B). Das Thr ist an dieser Position zwar konserviert ($M_5T177/4.72$), ist aber aufgrund einer anderen Geometrie des e2 im M_5 -Rezeptor auf keinen Fall in der Lage, eine H-Brücke mit W84 auszubilden.

Nach Platzierung von W84 in beide Rezeptormodelle werden Moleküldynamiksimulationen durchgeführt. Für jeden allosterischen Modulator werden in dieser Arbeit jeweils zwei Dynamiksimulationen durchgeführt. Zum einen wird der orthosterisch unbesetzte Rezeptor im Komplex mit dem allosterischen Modulator betrachtet. Zum anderen der ternäre Komplex bestehend aus dem Rezeptorprotein, dem orthosterischen Liganden NMS und dem entsprechenden allosterischen Modulator. Rezeptoren, die keinen Liganden in der orthosterischen Bindungstasche enthalten, werden im Folgenden aus Gründen der Vereinfachung als „freie Rezeptoren“ bezeichnet. Diese Bezeichnung lehnt an Begrifflichkeiten aus pharmakologischen Testungen an, bei denen die Affinität des Modulators am freien Rezeptor (pK_A) und am [3H]NMS-besetzten Rezeptor ($pEC_{0,5diss}$) bestimmt wird.

4.7.2 MDS mit W84 am M₅-Rezeptor

MDS des W84-besetzten M₅-Rezeptors

In Abbildung 4.22A sind die RMSD-Werte für den W84-besetzten M₅-Rezeptor dargestellt. Den Energieverlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien für W84 mit dem M₅-Rezeptor verdeutlicht Abbildung 4.22B. Das gesamte Protein-Rückgrat zeigt im equilibrierten Bereich mittlere Werte von 0,26nm.

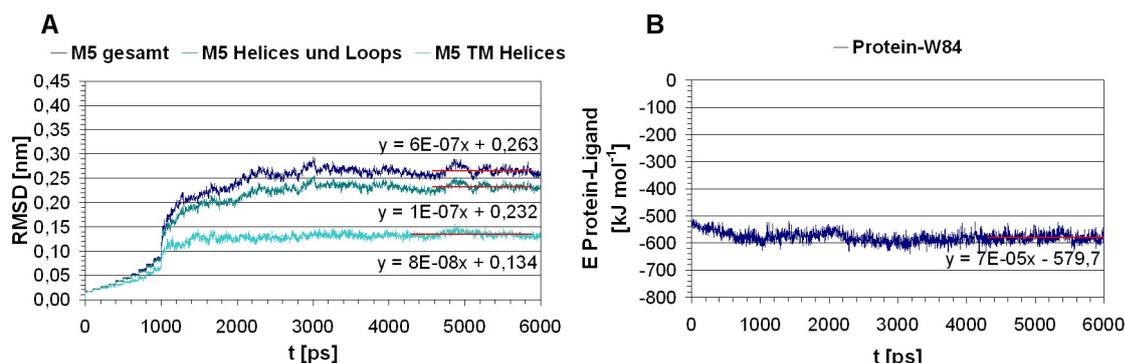


Abbildung 4.22: MDS des M₅-W84-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M5 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M₅-Modells; M5 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz L27/1.29 bis C512/7.70; M5 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M₅-Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

Die Bereiche ohne Termini weichen um 0,23nm von der Ausgangsstruktur ab. Im Vergleich mit dem unbesetzten Rezeptorzustand (0,28nm bzw. 0,26nm) zeigt sich eine leichte Stabilisierung beider Bereiche (vgl. Abb. 4.10, S. 60). Der Anteil der Bewegung der Termini beträgt etwa elf Prozent der Gesamtbewegung. Dies ist ein etwas höherer Wert als für den unbesetzten M₅-Rezeptor. Die transmembranären helikalen Bereiche zeigen mit mittleren Werten von 0,13nm ebenfalls eine Stabilisierung gegenüber dem unbesetzten Rezeptorzustand (0,16nm).

Die gemittelte intermolekulare M₅-Rezeptor-W84-Wechselwirkungsenergie beträgt $-579,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

MDS des ternären Komplexes mit NMS und W84 am M₅-Rezeptor

Abbildung 4.23A zeigt den Verlauf der RMSD-Werte des ternären M₅-NMS-W84-Rezeptorkomplexes. Die Abweichungen der verschiedenen Proteinerückgratbereiche von der Ausgangsstruktur für den ternären M₅-Rezeptorkomplex betragen 0,28nm für das gesamte Protein-Rückgrat, 0,24nm für die Helices und Loops und 0,14nm für die transmembranären helikalen Bereiche. Der Anteil der Termini beträgt absolut 0,04nm und relativ 14% der Gesamtbewegung.

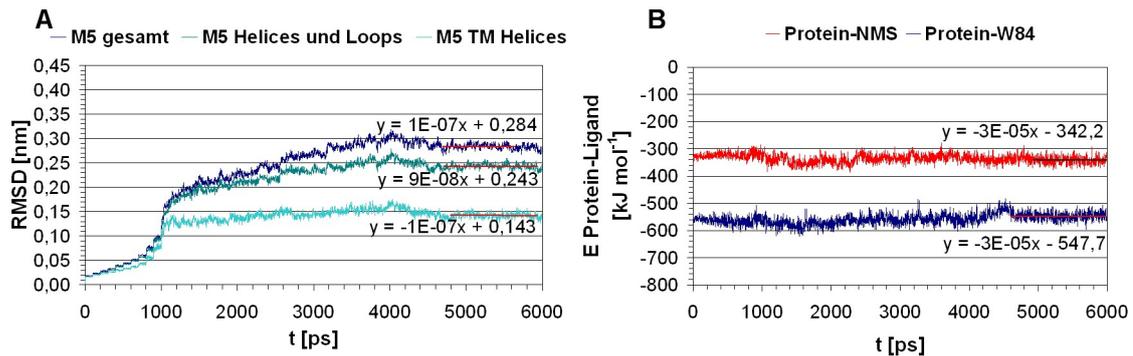


Abbildung 4.23: MDS des M_5 -NMS-W84-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M5 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_5 -Modells; M5 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz L27/1.29 bis C512/7.70; M5 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_5 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

Zum besseren Vergleich werden die RMSD-Werte der anderen Dynamiksimulationen mit dem M_5 -Rezeptor in Tabelle 4.8 dargestellt. Alle Dynamiksimulationen mit Liganden zei-

Protein-Bereich	M_5 wt	M_5 -NMS	M_5 -W84	M_5 -NMS-W84
	RMSD [nm]	RMSD [nm]	RMSD [nm]	RMSD [nm]
M5 gesamt	0,283	0,283	0,263	0,284
M5 Helices und Loops	0,263	0,197	0,232	0,243
M5 TM Helices	0,164	0,133	0,134	0,143

Tabelle 4.8: Zusammenfassung der RMSD-Werte für den M_5 -Rezeptor.

gen niedrigere RMSD-Werte der Loop- und Helixbereiche, aber auch nur der Helices, als der unbesetzte Rezeptor. In den beiden Dynamiksimulationen, mit jeweils nur einem Liganden, zeigt sich eine deutliche Stabilisierung der transmembranären helikalen Bereiche. Hier ist der Einfluss von NMS und W84 etwa gleich groß. W84 stabilisiert im einfach besetzten Rezeptor den N-Terminus besser als NMS, das selbst keinen Einfluss auf Veränderung der Termini ausübt. Im ternären Komplex zeigen sich höhere Werte als in den einfach besetzten Rezeptoren. Diese liegen aber unterhalb der Werte des unbesetzten Rezeptorzustandes.

In Abbildung 4.23B ist der Energie-Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungen von NMS und W84 mit dem M_5 -Rezeptor dargestellt. Die mittlere Wechselwirkungsenergie für NMS mit dem Protein beträgt $-342,2\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Am NMS-besetzten Rezeptor (M_5 -NMS) ist die Wechselwirkungsenergie für NMS mit $-351,8\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ um $9,6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ stärker (vgl. Abb. 4.16, S. 65). Die intermolekulare Protein-W84 Wechselwirkungsenergie weist im ternären Komplex Energiewerte von $-547,7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ auf. Verglichen mit dem W84-besetzten Rezeptor (M_5 -W84,

$-579,7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) ist hier die Wechselwirkung um $32\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ schwächer (vgl. Abb. 4.22, S. 72).

Das Ergebnis der Geometrieüberprüfung einer repräsentativen und minimierten Struktur ist in Tabelle 4.9 dargestellt. Im ternären Komplex kommt es zu einer Verbesserung

Bereich Ramachandran-Plot	M_5 -NMS-W84 [%]
bevorzugte Regionen	85,3
zusätzlich erlaubte Regionen	13,7
generell erlaubte Regionen	0,7
verbotene Regionen	0,3
nicht erlaubte Aminosäure-Geometrien (Lokalisation)	A228 (i3)

Tabelle 4.9: Geometrieüberprüfung der repräsentativen und minimierten Struktur des M_5 -NMS-W84-Komplexes.

der Protein-Rückgrat-Geometrie gegenüber dem Ausgangsmodell (vgl. Tab. 4.2, S. 51). Nur eine Aminosäure, die im i3 des Rezeptors lokalisiert ist, zeigt eine unerlaubte Φ -/ Ψ -Winkel-Kombination.

4.7.3 MDS mit W84 am M2-Rezeptor

MDS des W84-besetzten M2-Rezeptors

In Abbildung 4.24A sind die RMSD-Werte für den W84-besetzten M_2 -Rezeptor dargestellt. Der Energieverlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkung für W84 mit dem M_2 -Rezeptor wird durch Abbildung 4.24B verdeutlicht. Während der Verlauf für die transmembranären helikalen Bereiche ab einer Simulationsdauer von 4ns sehr stabil ist, zeigen die beiden strukturell flexibleren Bereiche *M2 gesamt* und *M2 Helices und Loops* keine Equilibrierung während der gesamten Dynamiksimulation. Daher wird für die Auswertung dieser Bereiche ein kurzer Zeitraum zwischen 5,2ns und 5,7ns ausgewählt, in dem die Fluktuation der Kurven relativ gleichmäßig und die Steigung annähernd parallel zur x-Achse verlaufen. Die RMSD-Werte betragen hier für das gesamte Proteinerückgrat 0,32nm und für die Bereiche ohne Termini 0,3nm. Verglichen mit dem unbesetzten Rezeptorzustand (0,29nm bzw. 0,28nm, vgl. Abb. 4.12, S. 61) sind diese Werte etwas höher. Der Anteil der Termini-Bewegungen ist mit 5,5% etwa gleich groß wie im unbesetzten Rezeptor (M_2 wt, 4%). Die transmembranären helikalen Bereiche werden durch W84 leicht stabilisiert. Hier zeigt sich eine Abweichung von der Ausgangsstruktur von 0,15nm gegenüber dem unbesetzten Rezeptorzustand von 0,16nm.

Der Verlauf der intermolekularen Wechselwirkungsenergie für W84 mit dem M_2 -Rezeptor zeigt eine relativ starke Schwankung. Zu Beginn kommt es zu einem Energiegewinn. Anschließend wird die Wechselwirkung für W84 aber wieder deutlich schwächer. Nach 5ns erreicht die Energiekurve ein energetisch günstigeres Niveau, das mittlere Werte von $-549,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ aufweist.

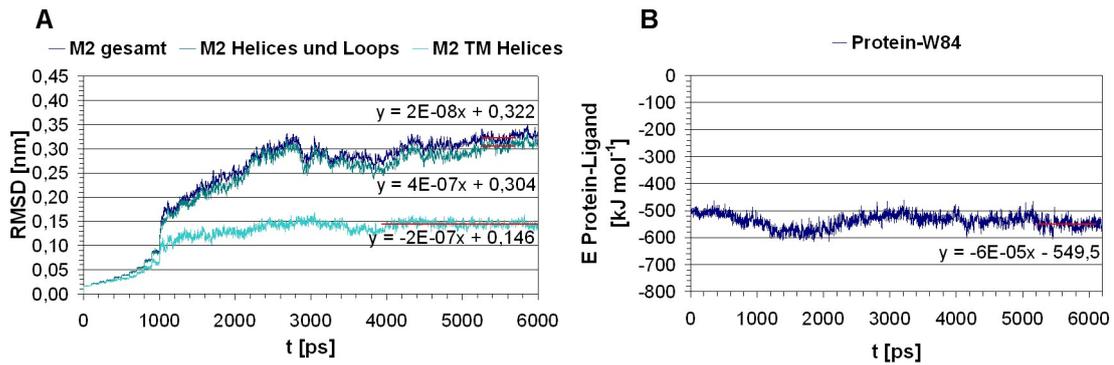


Abbildung 4.24: MDS des M_2 -W84-Komplexes. RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C457/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Modells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intramolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

MDS des ternären Komplexes mit NMS und W84 am M2-Rezeptor

In Abbildung 4.25A sind die RMSD-Werte des M_2 -NMS-W84-Komplexes über die Zeit dargestellt. Die Dynamiksimulation verläuft nach etwa 4ns sehr stabil. Die Abweichungen

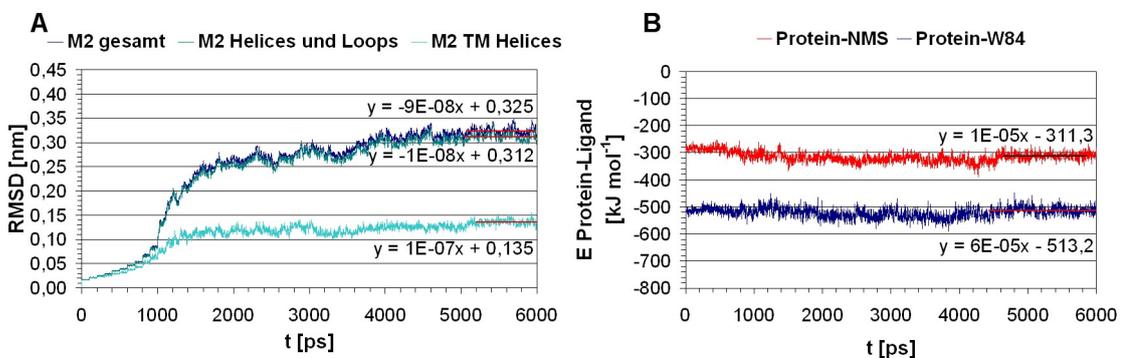


Abbildung 4.25: MDS des M_2 -NMS-W84-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt: alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells, M2 Helices und Loops: Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C457/7.70, M2 TM-Helices: Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

von der Ausgangsstruktur betragen für das gesamte Protein-Rückgrat 0,33nm und für die Bereiche ohne Termini 0,31nm. Der Anteil der Bewegung der Termini an der Gesamtbewegung beträgt vier Prozent. Die transmembranären helikalen Bereiche zeigen mittlere Werte von 0,14nm.

Protein-Bereich	M ₂ wt RMSD [nm]	M ₂ -NMS RMSD [nm]	M ₂ -W84 RMSD [nm]	M ₂ -NMS-W84 RMSD [nm]
M2 gesamt	0,290	0,309	0,322	0,325
M2 Helices und Loops	0,278	0,252	0,304	0,312
M2 TM Helices	0,159	0,125	0,146	0,135

Tabelle 4.10: Zusammenfassung der RMSD-Werte für den M₂-Rezeptor.

Zum besseren Vergleich werden die RMSD-Werte der anderen Dynamiksimulationen mit dem M₂-Rezeptor in Tabelle 4.10 dargestellt. Wie beim M₅-Rezeptor zeigen alle Dynamiken mit Liganden eine Stabilisierung der *M2 TM Helices*, verglichen mit dem unbesetzten Rezeptorprotein (vgl. Tab. 4.8, S. 73). Hier ist allerdings die Stabilisierung im ternären Komplex besser als im M₂-W84-Komplex. Der NMS-besetzte M₂-Rezeptor zeigt die beste Stabilisierung. Der ternäre Komplex weist stabilere Werte auf als der unbesetzte Rezeptor. Der Bereich *M2 Helices und Loops* wird im NMS-besetzten Rezeptor am besten stabilisiert. Durch Bindung von W84 kommt es in diesem Bereich sowohl bei *M₂-W84* als auch beim ternären Komplex zu stärkeren Abweichungen von der Ausgangsstruktur als im unbesetzten Rezeptor. Im *M₂-NMS-W84*-Komplex scheint die Anwesenheit von NMS diesen Effekt zusätzlich zu verstärken, da die Werte hier noch etwas höher sind. Der Anteil der Termini-Bewegungen an der Gesamtbewegung ist im NMS-besetzten Rezeptor am größten. Die Anwesenheit von Liganden führt beim M₂-Rezeptor zu einer verstärkten Veränderung des gesamten Proteinrückgrats (*M2 gesamt*).

Der Energie-Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie wird in Abbildung 4.25B gezeigt. Die Wechselwirkungsenergie für NMS mit dem Rezeptorprotein beträgt im Mittel $-311,3\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. W84 zeigt mit dem M₂-Rezeptor eine Wechselwirkungsenergie von $-513,2\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Das Ergebnis der Geometrieüberprüfung einer repräsentativen und minimierten Struktur ist in Tabelle 4.11 dargestellt. Gegenüber dem Ausgangsmodell (vgl. Tab. 4.3, S. 54) weist der ternäre Komplex eine Verbesserung der Rückgratgeometrie auf. Während im Ausgangsmodell sechs Aminosäuren in ungünstigen Regionen des Ramachandran-Plots liegen, zeigt die Geometrie hier nur drei Aminosäuren. Keine der Aminosäuren in ungünstigen Bereichen tritt mit einem der Liganden in Wechselwirkung.

Bereich Ramachandran-Plot	M ₂ -NMS-W84 [%]
bevorzugte Regionen	88,6
zusätzlich erlaubte Regionen	10,3
generell erlaubte Regionen	0,0
verbotene Regionen	1,0
nicht erlaubte Aminosäure-Geometrien (Lokalisation)	V94 (e1), F181 (e2), C457 (C-Term)

Tabelle 4.11: Geometrieüberprüfung der repräsentativen und minimierten Struktur des M₂-NMS-W84-Komplexes.

4.8 Vergleich der ternären Komplexe mit NMS und W84

Abbildung 4.26 zeigt zur Übersicht die Lage der beiden Liganden im ternären Komplex des M_5 - bzw. M_2 -Rezeptors. Auffällig ist, dass im M_5 -Rezeptor ein Kanal von der orthosterischen zur allosterischen Bindungstasche existiert, der im M_2 -Rezeptor nicht vorhanden ist. Den größten Unterschied macht hierbei die Position 5.29 im e2 der beiden Rezeptoren aus, da hier im M_2 -Rezeptor ein großer aromatischer Tyrosin-Rest lokalisiert ist. Er steht im ternären Komplex des M_2 -Rezeptors sowohl mit $M_2W422/7.35$ als auch mit W84 in π - π -Wechselwirkung. Im M_5 -Rezeptor ist hier ein Glutaminamid lokalisiert (vgl. Abb. 4.20, S. 69 und 4.21, S. 70). Dieses hat eine andere Geometrie und bildet mit $M_5Y481/7.39$ eine stabile H-Brücke aus. Die aromatische Wechselwirkung zwischen $M_2W422/7.35$ und $M_2Y177/5.29$ ist gegenüber dieser Wasserstoffbrücke schwächer einzuschätzen. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass NMS im ternären Komplex des M_2 -Rezeptors viel tiefer in der Bindungstasche liegt als im M_5 -Rezeptor.

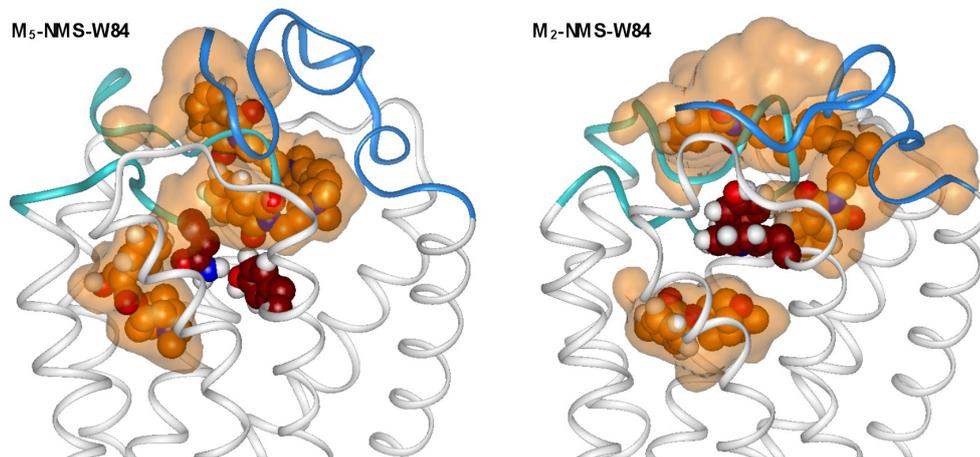


Abbildung 4.26: Übersicht über die ternären Komplexe mit NMS und W84 der muskarinischen M_2 - und M_5 -Rezeptoren. Helices und Loops, weiß; N-Terminus, blau; e2, türkis

Kapitel 5

Diskussion

Muskarinische Rezeptoren sind wichtige Neurotransmitter-Rezeptoren innerhalb der Klasse der GPCRs. Eine pharmakotherapeutische Beeinflussung dieser Rezeptoren zur Behandlung von wichtigen Krankheitsbildern wie Alzheimer, Schizophrenie, Schmerz, Übergewicht und Diabetes ist von großem Interesse, da diese Krankheiten zum Teil hohe Verbreitung in der Bevölkerung finden [60]. Die Möglichkeit der subtypselektiven Beeinflussung dieser Rezeptoren ist zur Zeit aber nur ungenügend gegeben [51]. Allosterische Modulatoren zeigen subtypselektive Eigenschaften und können hier möglicherweise neue Lösungsansätze bieten [119, 5]. Das Wissen über den molekularen Aufbau der unterschiedlichen Subtypen der muskarinischen Rezeptoren ist hierbei von sehr hohem Wert.

Ein Primär-Ziel dieser Arbeit ist daher, mit theoretischen Methoden des Molecular Modelling erste Erkenntnisse zu gewinnen, die eine unterschiedliche und häufig maximale Subtypselektivität von allosterischen Modulatoren an den beiden humanen muskarinischen M₂- und M₅-Rezeptoren verdeutlichen können.

Zur Verfolgung dieses Ziels werden im vorangestellten ersten Teil dieser Arbeit die Erstellung und erste Moleküldynamiksimulationen der beiden Rezeptoren beschrieben. Die Herangehensweise und die Ergebnisse dieses Teils *Charakterisierung des humanen M5- und M2-Rezeptors* werden im Folgenden diskutiert.

5.1 Homologiemodelle des M5- und M2-Rezeptors

Für die muskarinischen Rezeptoren ist die Struktur auf atomarer Ebene unbekannt. Bisher ist nur für zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren die Generierung einer Röntgenkristallstruktur in hoher Auflösung gelungen [19, 29, 30, 31, 27, 35, 36]. Daher kann nur über Homologiemodelle auf Basis der vorhandenen Kristallstrukturen gearbeitet werden, um nähere Einblicke in die Proteinstruktur zu erhalten. Die Erstellung von Homologiemodellen erfolgt zum Teil bereits in automatisierter Form [78]. Die Generierung dieser Modelle ist sehr schnell möglich, was einen klaren Vorteil darstellt. Die Ergebnisse sind dennoch kritisch zu betrachten, da die Gefahr von größeren Fehlern besteht. Die hier vorliegenden Modelle werden im Gegensatz dazu manuell erstellt. Diese Vorgehensweise ist erheblich aufwändiger. Da diese Modelle aber nicht nur z.B. einen groben Einblick in die ungefähre Lokalisation einer Aminosäure geben, sondern detailliert mögliche Bindungsmodi beschreiben sollen, ist eine individuelle Modellierung der Rezeptoren notwendig. Beide Modelle enthalten mit Ausnahme des dritten intrazellulären Loops die vollständige Sequenz der humanen muskarinischen M₂- bzw. M₅-Rezeptoren. Für die Erstellung der Modelle wird die mit 2,2Å hochaufgelöste Kristallstruktur 1U19 [27] des bovinen Rhodopsin aus der PDB-Datenbank als Vorlage verwendet. Die Sequenzidentität zwischen dem M₅- bzw. M₂-Rezeptor und Rhodopsin beträgt nur 18 bzw. 19 Prozent. Dies ist für eine Erstellung von Homologiemodellen eigentlich nicht ausreichend. Da aber die Homologie mit etwa 31 bzw. 38 Prozent für den M₅- bzw. M₂-Rezeptor deutlich höher ist und hoch

konservierte Aminosäuren existieren, die in den transmembranären Bereichen lokalisiert sind, kann dennoch ein Homologiemodell erstellt werden [20]. Dies wird dadurch belegt, dass sich Homologiemodelle von GPCRs als geeignet erweisen, verschiedene Fragestellungen im Bereich der Medizinischen Chemie beantworten zu können [76]. Weitere Evidenz geben die kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen des β_2 -Rezeptors [35, 36]. Dieser zeigt, wie erwartet, den gleichen Aufbau wie das bovine Rhodopsin. Für alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren wird dieser Aufbau aus sieben transmembranären Helices vorhergesagt.

Das prinzipielle Vorgehen bei der Erstellung von GPCR-Modellen ist in unserer Arbeitsgruppe recht einheitlich und wurde bereits mehrfach diskutiert [99, 110]. Im Folgenden werden daher einige kritische Punkte bei der Erstellung der Homologie-Modelle und Durchführung von Moleküldynamiksimulationen näher diskutiert.

5.1.1 Kürzung der Sequenz des i3-Loops

Bei der Erstellung der Homologiemodelle muss eine Kürzung der langen dritten intrazellulären Loops vorgenommen werden. Ein Versuch der Modellierung des i3-Loops erscheint nicht sinnvoll, da keine ausreichenden Strukturinformationen dieses Bereiches existieren. Dennoch gibt es in der Literatur sogar ein Beispiel für Modelle muskarinischer Rezeptoren, die mit voller Sequenzlänge modelliert wurden [124]. Hierbei handelt es sich um ein mit automatisierten Verfahren erstelltes Modell. Die Herangehensweise ist kritisch zu betrachten, da sie mit sehr viel Spekulation verbunden ist.

Zur Modellierung des i3-Loops sind in unserer Arbeitsgruppe bisher verschiedene Methoden gewählt worden [79, 77]. Zum einen kann die Sequenz des Loops gleichmäßig von den Helixenden her auf die Länge des Rhodopsin gekürzt werden [77]. Bei der Verknüpfung der beiden Enden des Loops kommen hier allerdings Aminosäuren verschiedener Bereiche artifiziall miteinander in Kontakt, da durch die Verbindung der Enden eine Annäherung erfolgt. Bei einer anderen Methode wird die Sequenz des Rezeptors an den Helixenden abgeschnitten. Der lange i3-Loop wird dann durch eine Alanin-Kette ersetzt. Diese soll genügend Stabilität, aber gleichzeitig auch Flexibilität gewähren, um mit dem Rezeptorprotein Moleküldynamiksimulationen durchführen zu können [79]. Diese Methode wird auch für die beiden neu zu erstellenden Rezeptormodelle verwendet.

Diese Vorgehensweise erscheint sinnvoller als die Methode, die von Schlegel gewählt wurde [77], denn bei den muskarinischen Rezeptoren sind viele lange basische Aminosäuren, Lysin und Arginin, genau in dem Bereich lokalisiert, der durch eine Kürzung angenähert wird. Abbildung 5.1 verdeutlicht diesen Sachverhalt. In der i3-Sequenz des Rhodopsin sind deutlich weniger geladene und häufiger kleinere und neutrale Aminosäuren lokalisiert. Der Loop, der sich über 29 Aminosäuren erstreckt, enthält nur je vier basische und saure Aminosäuren. Im Vergleich dazu enthält die M_2 -Sequenz, von beiden Enden gleichmäßig gekürzt auf die Rhodopsin-Sequenz, zwölf basische und zwei saure

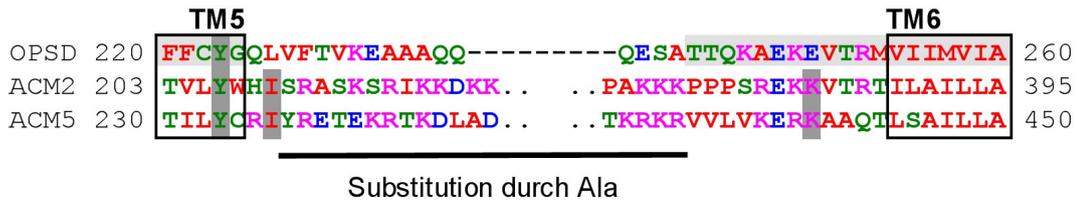


Abbildung 5.1: Alignment der i3-Loops von Rhodopsin, M₂, und M₅. Kennzeichnung der Aminosäuren nach ClustalW: rot, kleine/hydrophobe AS (AVFPMILW); blau, saure AS (DE); magenta, basische AS (RK); grün, neutrale AS/AS mit H-Brückenakzeptor/-donor-Funktionen (STYHCNGQ); schwarze Kästen, transmembranäre Bereiche; hellgraue Schattierung, überwiegend α -helikale Bereiche der Rhodopsin-Kristallstruktur 1U19; graue Schattierung, Pin Points.

Aminosäuren. Bei direkter Verbindung der beiden Termini liegen fünf Lysine in unmittelbarer Nähe zueinander. Die entsprechende M₅-Sequenz enthält auch zwölf basische und vier saure Aminosäuren.

Eine einfache Kürzung des i3 auf die Länge der Rhodopsin-Sequenz könnte durch die Annäherung dieser großen und geladenen Aminosäuren zu artifizialen Wechselwirkungen oder Abstoßungsreaktionen zwischen beiden Enden des Loops führen. Bei Alaninen ist diese Wechselwirkung nicht möglich, da sie nur eine sehr kurze Seitenkette besitzen und dadurch eine sterische Hinderung reduziert wird.

Bei MDS der Rezeptoren zeigt sich eine recht hohe Flexibilität der Alanin-Sequenz in diesem Bereich, was zu erwarten ist. Sie ist aber vergleichbar mit anderen längeren Loop-Bereichen, wie dem e2 oder auch dem C- oder N-Terminus. Der natürlich vorhandene i3-Loop der muskarinischen Rezeptoren wird wahrscheinlich in der Zelle ebenfalls eine größere Flexibilität zeigen, da hier bei der Aktivierung und Bindung des G-Proteins größere Konformationsänderungen angenommen werden [54]. Daher wird dieses Vorgehen als geeignet angesehen, den langen i3-Loop ersetzen zu können.

5.1.2 Modellierung der flexiblen Loop-Regionen

Häufig werden bei Homologiemodellen die Koordinaten der Loop-Regionen aus der Kristallstruktur übernommen. Dies ist kritisch zu betrachten, denn im Rhodopsin existiert im extrazellulären Bereich ein viersträngiges β -Faltblatt, welches durch den N-Terminus und den e2 gebildet wird. In der neuen Kristallstruktur des β_2 -Rezeptors 2RH1 [35] unterscheidet sich der extrazelluläre Bereich deutlich von dem des bovinen Rhodopsin. Er ist weit geöffnet, und der e2 enthält statt eines zweisträngigen β -Faltblattes eine α -Helix. Durch die deutlichen Unterschiede der Kristallstrukturen wird klar, dass diese Bereiche nicht einfach in eine andere Struktur übernommen werden können. Da allosterische Modulatoren den extrazellulären Bereich der Rezeptoren zur Bindung nutzen, muss der Modellierung der Loop-Bereiche besondere Aufmerksamkeit zukommen.

Die Sequenzen des muskarinischen M₂- und M₅-Rezeptors unterscheiden sich durch

verschiedene Positionierungen von strukturbrechenden Glycinen und Prolinen im extrazellulären Bereich. Daher werden diese Bereiche für jeden Rezeptor individuell modelliert. Bereits durch die Verwendung unterschiedlicher Ergebnisse aus der Loop-Suche ergeben sich strukturelle Unterschiede. Die Verifizierung der Rezeptor-Strukturen muss daher über experimentelle Daten erfolgen. Für den M₂-Rezeptor wird im zweiten Teil dieser Arbeit darauf eingegangen. Hier werden Einflüsse virtueller Rezeptormutanten mit experimentellen Daten verglichen. Dies wird für den M₅-Rezeptor zunächst nicht durchgeführt. Dennoch wird ein detaillierter Einblick der allosterischen Bindungstasche des M₅-Rezeptors gegeben. Zusammen mit den berechneten Mutanten des M₂-Rezeptors sind im zweiten Teil dieser Arbeit möglicherweise auch Rückschlüsse auf den M₅-Rezeptor bzw. auf Unterschiede beider Rezeptoren möglich. Daher kann das M₅-Modell durch Untersuchungen des Bindungsmodus von klassischen allosterischen Liganden Denkansätze bieten, die zu neuen Erkenntnissen zum Verständnis der unterschiedlichen Affinitäten dieser Modulator-Klasse an M₂- und M₅-Rezeptoren führen. Weiterführende Forschungen sind allerdings nötig, um für das bestehende M₅-Modell ebenfalls eine höhere Aussagekraft erreichen zu können.

5.1.3 Stereochemische Qualität

Die stereochemische Qualität eines Proteinmodells ist ein erster wichtiger Punkt bei der Struktur-Überprüfung. Da bereits die Vorlage für die hier erstellten Modelle einige ungünstige Aminosäuregeometrien enthält, werden diese z.T. in die Rezeptormodelle übernommen. Weiterhin besteht an Verknüpfungspunkten zwischen strukturell konservierten Helix-Bereichen, die aus der Kristallstruktur stammen, und flexiblen Loop-Regionen, die individuell modelliert werden, die Gefahr, dass hier durch ungünstige Verknüpfungen *cis*- oder *D*-Aminosäuren auftreten. Das Auftreten von *cis*-Aminosäuren kann zu schwerwiegenden Fehlern des gesamten Modells führen, da sich das Proteinerückgrat an dieser Stelle deutlich verändert. Bei Auftreten solcher artifiziellen Verknüpfungsstellen wird die Aussagekraft eines Modells stark vermindert. Die beiden hier vorgestellten Modelle weisen in keinem der Protein-Ligand-Komplexe oder auch der unbesetzten Rezeptoren solche Aminosäuren auf. Die Qualität beider Ausgangsmodelle ist vergleichbar mit der des bovinen Rhodopins und anderen Modellen unserer Arbeitsgruppe [99, 110].

Allerdings findet sich in beiden Modellen auch in extrazellulären Loop-Bereichen je eine Aminosäure mit unerlaubten Φ/Ψ -Winkelkombinationen. Beim M₅-Rezeptor ist diese Aminosäure (M₅V474/7.32) im e3 zu finden. Da für die Bindung allosterischer Modulatoren dieser Bereich ebenfalls wichtig ist, kann das für die Bindung dieser Strukturen problematisch sein. Um die Aussagekraft des Modells nicht zu gefährden, muss daher im Weiteren beobachtet werden, ob die ungünstige Geometrie auch bei MD-Simulationen von Protein-Ligand-Komplexen mit allosterischen Modulatoren erhalten bleibt oder ob sie sogar durch den allosterischen Modulator aufgehoben wird. Dies ist vorstellbar, da die Proteingeometrie möglicherweise durch die Anwesenheit eines Liganden beeinflusst und

durch eine leichte Konformationsänderung stabilisiert wird. Die ungünstigen Geometrien sind dann als Artefakte bei der Erstellung der Rezeptormodelle zu betrachten.

Im M₂-Rezeptor ist M₂F181/5.33 im C-terminalen Bereich des zweiten extrazellulären Loops lokalisiert. Die Bindung der in dieser Arbeit betrachteten allosterischen Modulatoren erfolgt nicht in der Nähe dieser Aminosäure.

5.1.4 Berücksichtigung expliziter Wassermoleküle

Von Schlegel wurden in unserer Arbeitsgruppe ausführliche moleküldynamische Untersuchungen zur Berücksichtigung expliziter Wassermoleküle an der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins vorgenommen [97]. In der Kristallstruktur ist in einigen konservierten Bereichen Kristallwasser zu finden, welches z.B. einen Knick in einer transmembranären Helix stabilisiert. Es kann angenommen werden, dass stabilisierende Wassermoleküle auch in anderen GPCRs zu finden sind. Bei Schlegel zeigen die betrachteten Wassermoleküle allerdings teilweise starke Fluktuationen während der MDS. Weiterhin ist die Auflösung bestimmter Wasserstoffbrückenmuster bei lang laufenden MDS zu beobachten [97]. Simulationen ohne explizite Wassermoleküle verlaufen über einen Zeitraum bis 10ns stabil. Erst ab einer längeren Simulationsdauer ergibt sich ein größerer Effekt. Die Berücksichtigung von Wassermolekülen in bestimmten Proteinregionen führt daher nicht notwendigerweise zu einer Stabilisierung des Proteins. Da in dieser Arbeit nur relativ kurz laufende Dynamiksimulationen durchgeführt werden, wird auf explizite Wassermoleküle in den vorliegenden Modellen verzichtet.

Weiterhin besitzen alle Protein-Ligand-Komplexe für jeden Rezeptorsubtyp in dieser Arbeit dieselbe Ausgangsstruktur. Die Nicht-Berücksichtigung von Wassermolekülen kann demnach als systematischer Fehler betrachtet werden. Die Anwesenheit oder Nicht-Anwesenheit eines Wassermoleküls wird alle Komplexe auf die gleiche Weise beeinflussen. Die Aussagekraft der Modelle bleibt dennoch erhalten, denn unterschiedliche Verhaltensweisen der Rezeptoren in Moleküldynamiksimulationen können auf die unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten allosterischen Modulatoren und orthosterischen Liganden zurück geführt werden. Die Tendenz der Veränderungen sollte mit oder ohne Berücksichtigungen der Wasser-Moleküle gleich bleiben. Da in dieser Arbeit keine Aussagen zu quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen gemacht, sondern nur relative Vergleiche gezogen werden, erscheint diese Vorgehensweise ausreichend. In einem kürzlich veröffentlichten Modell des histaminergen H₃-Rezeptors wird ein Wassermolekül berücksichtigt [77]. Dieses Wassermolekül ist aber nicht innerhalb der Bindungstaschen lokalisiert. Bei zukünftigen Untersuchungen mit den muskarinischen Rezeptor-Modellen sollte die System-Zusammensetzung für MDS möglichst auch unter Berücksichtigung dieses Wassermoleküls erfolgen. Eine Validierung der Modelle und ein Vergleich mit bisher erhaltenen Daten ist dann allerdings notwendig.

5.2 Moleküldynamiksimulationen

5.2.1 Auswahl des Kraftfeldes

Für das Programm GROMACS sind mittlerweile einige Kraftfelder etabliert, die auf unterschiedliche Fragestellungen im Bereich des Molecular Modelling spezialisiert sind. Das *ffgmx*-Kraftfeld ist unter den verwendeten GROMACS-Kraftfeldern zwar das älteste, aber aus folgenden Gründen wird es für die vorliegende Arbeit dennoch verwendet:

Das Kraftfeld besitzt nur relativ wenige Parameter zu unterschiedlichen Atom- und Bindungstypen. Dadurch ist eine schnelle Parametrisierung von neuen Liganden möglich. Für die Berechnung der Bewegung von Proteinen sind die Parameter des *ffgmx*-Kraftfeldes lange erprobt und für die meisten Fragestellungen ausreichend.

Das *ffgmx*-Kraftfeld, ist das Kraftfeld für welches in unserer Arbeitsgruppe die größten Erfahrungen vorhanden sind. Interne Vergleiche mit dem neueren GROMOS96-Kraftfeld, welches in modifizierter Form kürzlich von Schlegel für die Homologie-Modellierung des histaminergen H₃-Rezeptors [77] verwendet wurde, ergeben keine großen Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Moleküldynamiksimulationen unter Verwendung dieser beiden Kraftfelder (M. Höltje, persönliche Mitteilung). Weiterhin kann das Kraftfeld auch neueste Fragestellungen im Bereich des Molecular Modelling beantworten [125, 126].

Auch ist eine Anpassung des Kraftfeldes durch Einfügen neuer Parameter möglich. Dies ist z.B. für die Simulation der Rezeptoren in einer membranähnlichen Umgebung notwendig und wird für die vorliegende Arbeit analog zu Arbeiten von Schlegel durchgeführt [97].

5.2.2 Wahl des Protonierungszustandes

In Proteinen können bei titrierbaren Aminosäureseitenketten Verschiebungen des pK_a-Wertes auftreten. Saure Aminosäuren können z.B. in einer desolvatisierten Umgebung ungeladen vorliegen, da die ansonsten negative Ladung nicht mehr stabilisiert werden kann. Aus experimentellen Untersuchungen ist bekannt, dass einige saure Aminosäuren im Rezeptorprotein des Rhodopsins nicht dissoziiert, sondern protoniert vorliegen. Für eine dieser Aminosäuren, D2.50, die in den Rezeptoren für biogene Amine konserviert ist, weisen die theoretischen Untersuchungen von Schlegel an histaminergen Rezeptoren ebenfalls auf eine Protonierung hin [77]. Schlegel stellte durch eine Untersuchung mit verschiedenen Protonierungszuständen an Aminosäuren des Rhodopsins fest, dass ein falsch gewählter Dissoziationsgrad zu einer Destabilisierung des untersuchten Proteins führt [97]. Die Berücksichtigung einer möglicherweise protonierten, sauren Aminosäure sollte daher auch bei den muskarinischen Rezeptormodellen erfolgen.

Für die Berechnung wird eine neue Methode gewählt, da das von Schlegel verwendete Programm UHBD einigen Parametrisierungs-Aufwand erfordert. Da die Untersuchungen sowohl an Rhodopsin als auch an anderen biogenen Amin-Rezeptoren auf eine Protonierung dieser konservierten Aminosäure hindeuten, kann man vermuten, dass diese

konservierte Aminosäure auch in muskarinischen Rezeptoren vorhanden ist. Im Prinzip soll für diese Arbeit nur noch eine Bestätigung der Protonierung dieser Position in den muskarinischen Rezeptoren erfolgen. Hierfür scheint ein weniger aufwändiges Programm ausreichend.

Das empirisch arbeitende Verfahren PROPKA weist ähnliche Abweichungen zwischen experimentell gefundenen und theoretisch vorhergesagten pK_a -Werten auf wie andere Methoden und scheint daher geeignet zu sein. Es ist frei im Internet verfügbar und berechnet in Sekunden mögliche pK_a -Verschiebungen innerhalb einer Protein-Struktur. Um diese Methode zu validieren, werden zunächst pK_a -Werte der Rhodopsin-Kristallstruktur berechnet und mit Ergebnissen der theoretischen Untersuchungen zum Rhodopsin von Schlegel verglichen [97]. Hier berechnet PROPKA allerdings sowohl für Rhodopsin als auch für die beiden muskarinischen Modelle pK_a -Werte, die nur wenig über dem physiologischen pH-Wert liegen. Damit ist das Dissoziationsgleichgewicht nur geringfügig auf die undissoziierte Seite verschoben. Alle anderen untersuchten sauren Aminosäuren zeigen Werte, die sich nur wenig von den Literatur-Werten für Aminosäuren in wässriger Umgebung unterscheiden oder zum Teil sogar deutlich stärker sauer vorhergesagt werden. Insgesamt gibt dieses Programm also tendenziell die experimentellen und theoretischen Befunde für das bovine Rhodopsin wieder. Daher wird es für die Berechnung der pK_a -Werte bei beiden muskarinischen Rezeptormodellen als geeignet angesehen.

5.2.3 Parametrisierung von Liganden

Für die Parametrisierung von Liganden werden zur Bestimmung von Ladungsgruppen und Ladungen quantenchemische *ab initio* Berechnungen durchgeführt. Die erhaltenen Ladungen können allerdings nicht direkt für die Parametrisierung verwendet werden. Sie müssen herunterskaliert werden, da im *ffgmx*-Kraftfeld niedrigere Ladungen für Aminosäuren verwendet werden. Werden die quantenchemisch ermittelten Ladungen für die Dynamiksimulation nicht herunter skaliert, kann es zu artifiziellen Wechselwirkungen kommen, da durch höhere Ladungen z.B. stärkere Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken auftreten können, die normalerweise nicht existent sind. Das Auftreten von artifiziellen Protein-Geometrien ist hierdurch möglich. Eine Anpassung an die entsprechenden Kraftfeldladungen ist notwendig und wird für alle Liganden durchgeführt.

5.2.4 Moleküldynamiksimulationen ohne Rückhaltekräfte

Im bisher existierenden M_2 -Modell von Jöhren werden Moleküldynamiksimulationen überwiegend im Vakuum vorgenommen. Um die Proteinstruktur zu erhalten, müssen Rückhaltekräfte auf die helikalen Bereiche gelegt werden. Hierdurch und durch die sehr artifizielle Umgebung ist keine Möglichkeit gegeben, das dynamische Verhalten des Rezeptors beobachten bzw. beurteilen zu können. In einer anderen Arbeit von Schlegel werden distanzabhängige Rückhaltekräfte auf bestimmte interhelikale Kontakte des Rezeptormodells eingesetzt, um das Modell eines histaminergen H_3 -Rezeptors in einem

stabilen inaktiven Zustand zu halten [77]. Das Ziel ihrer Arbeit besteht allerdings auch in der Durchsuchung großer Datenbanken zur Leitstrukturfindung. Ein statisches Modell des H_3 -Rezeptors wird benötigt, um Unterschiede zwischen den Liganden bewerten zu können, da diese auch nur statisch betrachtet werden. Durch das Festhalten bestimmter Bereiche können dynamische Einflüsse von Liganden nicht mehr dargestellt werden, da das Protein zu stark in einer bestimmten Geometrie gehalten wird. Da in dieser Arbeit allerdings auch diese unterschiedlichen Einflüsse beobachtet werden sollen, ist eine Stabilisierung der muskarinischen Rezeptormodelle über Rückhaltekräfte nicht sinnvoll. Ein Herunterfahren von zunächst auferlegten Rückhaltekräften wird daher als geeigneter angesehen.

Hierfür wird ein Moleküldynamikskript entwickelt, das das sehr langsame Herunterfahren dieser Rückhaltekräfte ermöglicht. Hierbei wird das Proteinrückgrat stärker festgehalten als die Seitenketten. Im Sinne eines *induced fit* kann sich so eine möglicherweise leicht ungünstige Platzierung eines Liganden im Verlauf der Dynamik anpassen, ohne zu starke Veränderungen des Proteins zu verursachen. Nach Herunterfahren sämtlicher Rückhaltekräfte stellt die Veränderung und Flexibilität des Proteinrückgrats auch ein Maß für den Ligand-Einfluss dar.

5.2.5 Vergleich der beiden unbesetzten Rezeptormodelle

Bei den beiden Rezeptoren zeigen sich geringfügige Unterschiede im Charakter der Veränderung des Protein-Rückgrats der transmembranären Bereiche (*M5/M2 TM Helices*, Abb. 5.2). Der M_2 -Rezeptor verändert sich in diesen Bereichen zu Beginn recht stark und erreicht bereits nach kurzer Simulationsdauer (ca. 2,6ns) nur geringfügig andere Werte als zum Ende der Dynamiksimulation. Der M_5 -Rezeptor reagiert langsamer. Der

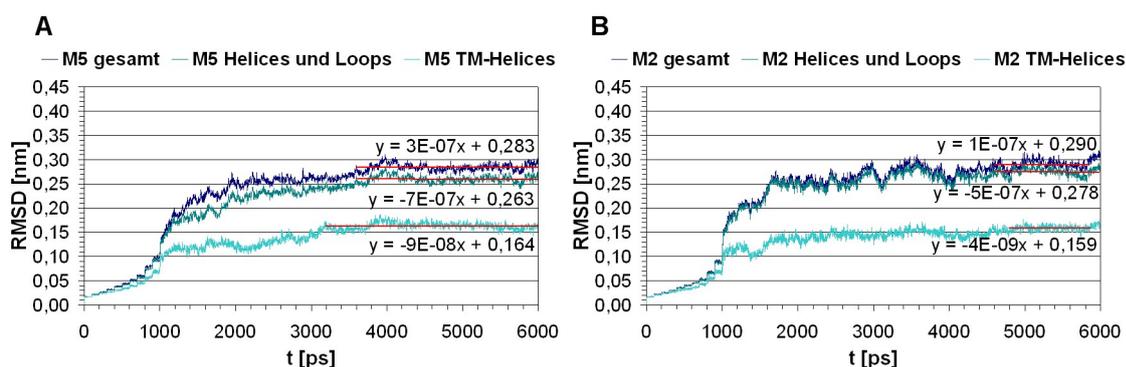


Abbildung 5.2: Verlauf der RMSD-Werte der Protein-Rückgrat-Strukturen der unbesetzten Rezeptormodelle, A, Veränderung des M_5 -Modells, B, Veränderung des M_2 -Modells.

Anstieg des RMSD-Wertes erfolgt nicht so schnell wie beim M_2 -Rezeptor, dafür dauert er länger. Weiterhin ist auffällig, dass die Kurve der transmembranären helikalen Bereiche des M_5 -Rezeptors nach ca. 3ns stärker ansteigt als beim M_2 -Rezeptor. Aber auch

der M_2 -Rezeptor zeigt am Ende noch eine kurze, stärkere Veränderung, die nicht in die Auswertung mit einbezogen wird. Die Abweichung des Protein-Rückgrats beider Rezeptormodelle (*M5/M2 gesamt*) ist gering und liegt im Bereich der Auflösung der Rhodopsin-Kristallstrukturen [19, 27, 29, 30, 31] und der kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen des adrenergen β_2 -Rezeptors [35, 36]. Die Strukturen bleiben demnach innerhalb der Phospholipidmembran sehr gut erhalten. Die Veränderungen der transmembranären Bereiche stimmen mit Werten von Moleküldynamiksimulationen der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins [99], die von Schlegel durchgeführt wurden weitgehend überein, was ebenfalls eine ausreichende Stabilisierung der Rezeptoren verdeutlicht.

Die Werte des gesamten Protein-Rückgrats (*M5/M2 gesamt*) verglichen mit den Werten ohne Termini (*M5/M2 Helices und Loops*) weisen im M_2 -Rezeptor geringere Unterschiede als im M_5 -Rezeptor auf. Diese Unterschiede lassen sich auf die längeren Termini des M_5 -Rezeptors zurück führen. Der N-Terminus ist sieben und der C-Terminus ist elf Aminosäuren länger als die Termini des M_2 -Rezeptors (vgl. Abb. 4.1, S. 46). Die Bewegung des gesamten Proteins im Verhältnis zu den Helices und Loops ist dadurch im M_5 -Rezeptor stärker als im M_2 -Rezeptor.

Andererseits zeigt das Protein-Rückgrat der Helices und Loops des M_5 -Rezeptors, verglichen mit dem M_2 -Rezeptor, niedrigere Absolutwerte, und auch die Fluktuation des Kurvenverlaufes ist ab 4ns für M_5 geringer als für M_2 . Dies ist darauf zurück zu führen, dass zwar die Termini des M_5 -Rezeptors länger sind als im M_2 -Rezeptor, aber auch stärkere Wechselwirkungen mit den Loops eingehen können.

Abbildung 5.3 verdeutlicht hierzu die Fluktuationen der einzelnen Aminosäuren beider Rezeptormodelle zwischen 5ns und 6ns, die durch den RMSF-Wert ausgedrückt werden. Die Kurven sind anhand des Alignments in Abbildung 4.1 auf Seite 46 angeordnet. Über den RMSF-Wert kann die Stärke der Beteiligung der einzelnen Aminosäuren an der Veränderung des Protein-Rückgrats dargestellt werden. Die transmembranären Bereiche werden durch die Phospholipidmembran sehr gut stabilisiert und zeigen Werte von 0,05nm bis 0,07nm. Die geringsten Änderungen weisen TM1, TM3 und TM7 bei beiden Rezeptoren auf. Zwischen den Rezeptoren sind auch einige Unterschiede erkennbar. Der C-Terminus des M_2 -Rezeptors fluktuiert deutlich stärker als der des M_5 -Rezeptors, da er weniger Wechselwirkungen mit anderen intrazellulären Loop- und Helix-Bereichen des Proteins eingeht. Der N-Terminus ist bei beiden Rezeptoren zwischen den extrazellulären Loops e2 und e3 eingebettet. Der zweite extrazelluläre Loop, der im M_2 -Rezeptor starken Schwankungen unterliegt, wird im M_5 -Rezeptor recht gut stabilisiert.

Da der N-Terminus im M_2 -Rezeptor kürzer ist, trägt er nicht so stark zur Stabilisierung des gesamten Proteins bei. Die ersten fünf Aminosäuren des M_5 -Rezeptors zeigen Fluktuationen, die im Bereich der transmembranären Helices liegen. Sie sind also recht stark in ihrer Position fixiert. Diese Haftpunkte fehlen im M_2 -Rezeptor und liefern eine mögliche Erklärung für die bessere Stabilisierung des zweiten extrazellulären Loops des M_5 -Rezeptors gegenüber dem M_2 -Rezeptor. Deutlich größere Schwankungen als der M_2 -

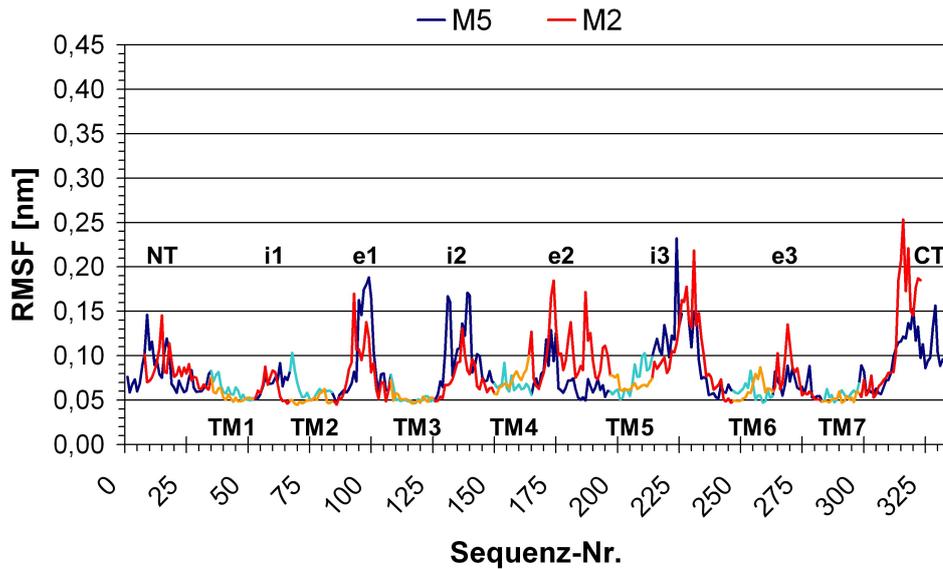


Abbildung 5.3: Fluktuation des Protein-Rückgrats der muskarinischen Rezeptoren, für jede Aminosäure gemittelt über den Zeitraum zwischen 5ns und 6ns. blau, Loop-Bereiche des M_5 -Rezeptors; hellblau, transmembranäre Bereiche des M_5 -Rezeptors; rot, Loop-Bereiche des M_2 -Rezeptors; orange, transmembranäre Bereiche des M_2 -Rezeptors.

Rezeptor zeigt der M_5 -Rezeptor im i2. Da dieser Bereich weit von der Bindungsstelle der muskarinischen Rezeptorliganden entfernt liegt, wird nicht weiter untersucht, welche Änderungen sich im i2 des M_5 -Rezeptors ergeben. Die etwas stärkere Stabilisierung des gesamten M_5 -Rezeptorproteins durch den N-Terminus ist möglicherweise auch eine Erklärung für die verzögerte Veränderung der transmembranären helikalen Bereiche im M_5 -Rezeptor, verglichen mit M_2 . Insgesamt ist der M_5 -Rezeptor also etwas rigider.

Ein Vergleich der intramolekularen Wechselwirkungsenergien des Proteins ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Zunächst zeigt der muskarinische M_5 -Rezeptor deutlich günstigere Wechselwirkungsenergien, als der M_2 -Rezeptor (Abbildung 5.4 A). Da der M_5 -Rezeptor

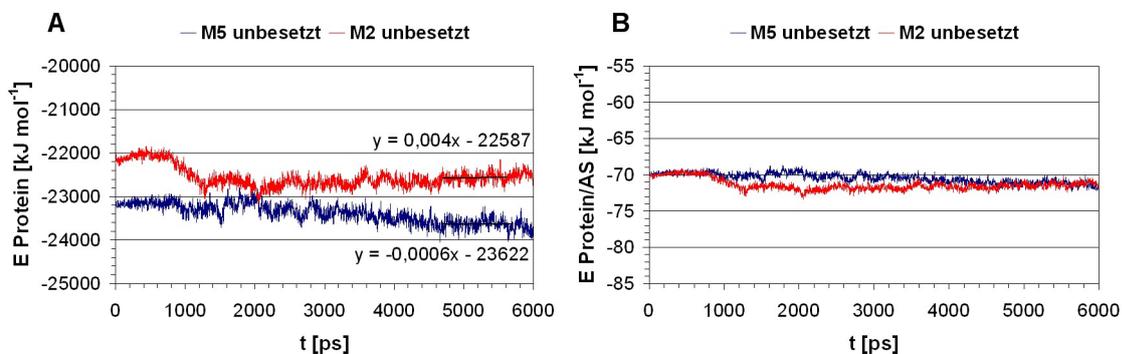


Abbildung 5.4: Energie-Werte der unbesetzten Rezeptormodelle. A, Verlauf der intramolekularen Protein-Wechselwirkungsenergie über die Zeit; B, Werte aus Abbildung A berechnet pro Aminosäure. Das M_5 -Modell enthält 332, das M_2 -Modell 316 Aminosäuren.

aber über zusätzliche 16 Aminosäuren in den Termini verfügt, kann auch mehr intramolekulare Wechselwirkungsenergie erzeugt werden. Berechnet man die Wechselwirkung pro Aminosäure, ergeben sich keine Unterschiede mehr (Abbildung 5.4 B).

Allerdings ist die Energie nicht direkt mit der Anzahl der Aminosäuren korrelierbar, da nicht jede Aminosäure gleich viel Wechselwirkungsenergie produziert. Ein Vergleich der absoluten Werte zwischen M_2 - und M_5 -Rezeptor ist demnach nicht möglich. Allerdings kann hier verdeutlicht werden, dass beide Rezeptormodelle im Kraftfeld, energetisch betrachtet, größenordnungsmäßig vergleichbar sind. Im Folgenden werden Energien nur innerhalb eines Rezeptor-Subtyps und auch nur relativ miteinander verglichen.

Die Dynamikstrukturen weisen eine ähnlich gute stereochemische Qualität auf und sind sowohl mit den Ausgangsmodellen als auch mit der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsin vergleichbar.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass beide Rezeptormodelle ähnliche RMSD- und Fluktuations-Werte und im Verhältnis ähnliche Energien aufweisen. Die Proteinstrukturen weisen eine stereochemisch erlaubte Struktur auf, die eine ähnliche gute Qualität wie die Kristallstruktur besitzen. Damit sind der M_2 - und M_5 -Rezeptor gut miteinander vergleichbar und für die anschließenden Untersuchungen zu Protein-Ligand-Komplexen geeignet.

5.3 Protein-Ligand-Komplexe

Die weiteren Ziele des ersten Teils dieser Arbeit bestehen in der näheren Charakterisierung der Bindungstaschen und Untersuchung der Bindungsmodi des orthosterischen Liganden NMS und des klassischen allosterischen Modulators W84. Hier sollen erste Einblicke in die molekularen Unterschiede der Bindung von allosterischen Liganden am M_5 - bzw. M_2 -Rezeptor erfolgen.

5.3.1 N-Methylscopolamin

Die Platzierung des inversen Agonisten NMS erfolgt in beide Rezeptormodelle manuell. Die etwas abweichende Positionierung von NMS in der orthosterischen Bindungstasche ist überraschend, da durch die hohe Konservierung dieses Bereiches anzunehmen ist, dass die Bindungsmodi in den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen eigentlich gleich sein sollten. Allerdings ist bei verschiedenen Liganden der orthosterischen Bindungstasche, wie z.B. Pirenzepin, eine leichte Subtyp-Präferenz trotz der Konservierung zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die Bindungstaschen der Rezeptoren nicht genau die gleichen Geometrien aufweisen. Daher ist eine etwas unterschiedliche Positionierung der Liganden denkbar.

In Moleküldynamiksimulationen mit NMS zeigen beide Modelle eine ähnlich starke Stabilisierung der transmembranären Bereiche und der Bereiche ohne Termini im Vergleich

zum unbesetzten Zustand. Dies ist zum einen ein weiterer Hinweis darauf, dass die etwas andere Positionierung von NMS toleriert wird. Zum anderen steht diese Stabilisierung im Einklang mit der invers agonistischen Wirkung von NMS an muskarinischen Rezeptoren. Der inaktive Grundzustand des Ausgangsmodells wird durch Ligandbindung zusätzlich stabilisiert. Dies macht sich in der geringeren Veränderung der RMSD-Werte der NMS-besetzten Rezeptoren gegenüber den unbesetzten Zuständen bemerkbar.

Tendenziell ist die Stabilisierung der transmembranären Bereiche im M_2 -Rezeptor etwas stärker als im M_5 -Rezeptor. NMS zeigt allerdings keine Subtypselektivität zwischen den muskarinischen Rezeptoren. In der Literatur werden dennoch leicht höhere Affinitäten für [^3H]-NMS an humanen M_2 -Rezeptoren gegenüber M_5 -Rezeptoren beschrieben. Prilla fand für [^3H]-NMS Affinitätsparameter (K_D -Werte) von 60-150pM für den M_2 -Rezeptor und von 80-350pM für den M_5 -Rezeptor [127]. Die etwas stärkere Stabilisierung der helikalen Bereiche im M_2 -Rezeptormodell steht somit tendenziell im Einklang mit den Affinitätsdaten von [^3H]-NMS. Allerdings darf man dieses Ergebnis nicht vollkommen unkritisch betrachten, da nicht klar ist, ob die beiden Rezeptormodelle tatsächlich diesen leichten Affinitätsunterschied wirklich wiedergeben können, oder ob die Ergebnisse nur mehr oder weniger zufällig sind. Nähere Untersuchungen hierzu sind daher nötig.

Das gesamte Proteinerückgrat weist in den NMS-besetzten Rezeptoren eine ähnlich starke Veränderung der RMSD-Werte wie der unbesetzte Zustand auf. Während also die Helices und Loops beider Rezeptoren stabilisiert werden, hat NMS offensichtlich keinen großen Einfluss auf die Beweglichkeit der Termini. Dieses Ergebnis steht ebenfalls im Einklang mit experimentellen Untersuchungen. Dort konnte kein Einfluss der Termini auf die Affinität von NMS gezeigt werden [128].

Das Verhältnis der RMSD-Werte der Helices und Loops zum gesamten Protein-Rückgrat weist bei beiden Rezeptoren deutliche Unterschiede auf. Wie bei den unbesetzten Rezeptoren verändern sich die längeren Termini des M_5 -Rezeptors, relativ betrachtet, stärker als im M_2 -Rezeptor. Der Anteil der Bewegung der Termini an der Gesamtbewegung liegt für den NMS-besetzten M_5 -Rezeptor bei etwa 30 Prozent und beim M_2 -Rezeptor bei etwa 18 Prozent. In scheinbarem Widerspruch dazu steht die Veränderung des gesamten Proteins, da der M_5 -Rezeptor hier absolut geringere Werte aufweist als M_2 . Dies kann wieder durch die längeren Termini des M_5 -Rezeptors erklärt werden, die zwar keinen Einfluss auf die Affinität von [^3H]-NMS haben, aber insgesamt die Loop- und Helixbereiche vermutlich besser stabilisieren können. Interessant ist in diesem Zusammenhang der Aspekt, dass die Dissoziations-Halbwertzeit von [^3H]-NMS am M_2 -Rezeptor deutlich kürzer ist als an M_5 . Prilla fand für [^3H]-NMS eine Dissoziationshalbwertzeit von 6,8 Minuten am humanen M_2 - und 121,7 Minuten am humanen M_5 -Rezeptor [109]. Auch andere Arbeiten zeigen diesen deutlichen Unterschied in der Dissoziations-Halbwertzeit [68, 119]. Eine leicht bessere Stabilisierung der extrazellulären Bereiche (insb. e2) des M_5 -Rezeptors durch den N-Terminus im Verhältnis zu M_2 , führt also möglicherweise auch zu einer verzögerten Dissoziation von NMS beim M_5 -

Rezeptor. In die gleiche Richtung geht die Beobachtung, dass das gesamte Rezeptorprotein im M_2 -Rezeptor nicht nur einen höheren Absolutwert der RMSD-Werte, sondern auch eine stärkere Fluktuation der Kurve an sich zeigt (vgl. Abb. 4.18, S. 67). Die größere Flexibilität des M_2 -Rezeptors führt möglicherweise zu einer erleichterten Assoziation und Dissoziation von orthosterischen Liganden.

Der zweite extrazelluläre Loop ist im M_5 -Rezeptor etwas tiefer im Protein eingebettet. Dies kann auch durch den Einfluss des längeren N-Terminus im M_5 -Rezeptor erklärt werden, der den e2-Loop stabilisiert und ihn tiefer zwischen die Helices drückt. Der Extrazellulärbereich im M_2 -Rezeptor erscheint weniger gepackt und bietet damit die Möglichkeit, flexibler zu sein. Auch dieses Ergebnis bietet einen Erklärungsansatz für die kürzere Dissoziationshalbwertszeit von NMS am M_2 -Rezeptor.

Die individuelle Positionierung von NMS in den beiden Rezeptormodellen scheint sich insgesamt nicht negativ auszuwirken und Moleküldynamiksimulationen stehen in Einklang mit experimentellen Ergebnissen. Die Startgeometrie von NMS wird daher bei beiden Modellen als geeignet angesehen, um nähere Untersuchungen zu ternären Komplexen mit allosterischen Modulatoren durchführen zu können.

5.3.2 W84

Die Geometrie von W84 wird für das neue M_2 -Modell aus dem bereits bestehenden Modell übernommen. Dort wird eine aromatische π - π -Wechselwirkung des einen Phthalimid-Ringes mit zwei aromatischen Aminosäuren der proximalen Bindungstasche postuliert. Weitere Aussagen zum Bindungsmodus von W84 werden allerdings nicht gemacht. Wichtige Erkenntnisse aus experimentellen Daten können daher vom alten Modell nicht nachvollzogen und erklärt werden.

Die aromatischen Wechselwirkungen des Phthalimidringes sind auch im neu erstellten M_2 -Rezeptormodell möglich. Für die Bindung im M_5 -Rezeptor wird die Konformation von W84 durch manuelle Rotation der flexiblen Alkanketten und anschließende Minimierung leicht modifiziert. Hierdurch ist ebenfalls eine Komplexbildung mit W84 möglich. Die flexiblen Mittelketten liegen fast in gestreckter Konformation vor. Die Positionierung stimmt gut mit den berechneten GRID-Feldern überein. Die lateralen Ringsysteme sind in aromatischen Feldern lokalisiert, die überwiegend an beiden Enden der Bindungstaschen zu finden sind. Interessant ist hierbei, dass in der proximalen Bindungstasche des M_5 -Rezeptors deutlich mehr Raum als im M_2 -Rezeptor vorhanden ist. Außerdem besitzt der M_5 -Rezeptor an Position 5.29 keine aromatische Seitenkette, die mit W84 wechselwirken kann. Das Glutaminamid kann die aromatische Wechselwirkung zwischen W84 und dem Tyrosin an dieser Position nicht ersetzen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit experimentellen Daten, die zeigen, dass die Position 5.29 wichtig für die erhöhte M_2/M_5 -Subtypselektivität von allosterischen Modulatoren ist [68].

Weiterhin ist auffällig, dass die Wechselwirkungsmöglichkeiten für die quartären Ammoniumgruppen im M_2 -Rezeptor gegenüber dem M_5 -Rezeptor deutlich erhöht sind. Dies steht

auch im Einklang mit experimentellen Daten, die eine Abhängigkeit der Bindung positiv geladener allosterischer Modulatoren von einer sauren Sequenz im M_2 -Rezeptor nachweisen [129, 70, 119]. Diese Sequenz ist im M_2 -Modell gut zu erkennen. Wie von einer Zange wird W84 zwischen den sauren Aminosäuren $M_2E172/4.74$ und $M_2E175/4.77$ festgehalten. $M_2E175/4.77$ liegt unterhalb der proximalen Ammoniumgruppe. $M_2E172/4.74$ ist oberhalb der distalen Ammoniumgruppe und weiter extrazellulär lokalisiert. Im M_5 -Rezeptor ist nur E4.77 konserviert ($M_5E182/4.77$). Zwar finden sich hier auch Wechselwirkungsmöglichkeiten für quartäre Ammoniumgruppen, allerdings sind diese nicht so spezifisch wie im M_2 -Rezeptor. Daher ist auch hier eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Affinitäten von allosterischen Modulatoren an den unterschiedlichen Rezeptor-Subtypen gegeben.

In Moleküldynamiksimulationen der ternären und der allosterischen Komplexe weisen beide Modelle eine Stabilisierung des Proteinerückgrats auf. Die transmembranären Bereiche verändern sich in allen Dynamiksimulationen nicht so stark wie in den unbesetzten Rezeptoren. Bei den ternären Komplexen weisen die transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptors niedrigere Werte auf als der M_5 -Rezeptor. Allerdings kommt es zu keiner weiteren Stabilisierung. Die Veränderung der helikalen Bereiche ist gegenüber der alleinigen Besetzung mit NMS höher. Dies wird möglicherweise durch eine gegenseitige Beeinflussung der Liganden auf die Stabilisierung des Proteinerückgrats verursacht. Da sich weitere Unterschiede in der Stärke der Veränderungen der transmembranären Bereiche ergeben, die auch für beide Rezeptoren unterschiedlich ausfallen, kann damit die Veränderung der RMSD-Werte in ternären Komplexen nicht unbedingt als Maß für die Bindungsstärke eines allosterischen Liganden angesehen werden. Hier müssen in Zukunft weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, die näheren Einblick in das unterschiedliche Verhalten der beiden Rezeptoren liefern. Allerdings bietet die Untersuchung der Rezeptoren mit GRID-Wechselwirkungsfeldern eine gute Möglichkeit, um erste Einblicke in die molekularen Unterschiede der beiden Rezeptoren zu geben.

Experimentell werden die Affinitätswerte für allosterische Modulatoren an ternären Komplexen über eine Verzögerung der Dissoziations-Halbwertszeit des orthosterischen Radioliganden bestimmt. Es ist vorstellbar, dass NMS im ternären Komplex mit dem M_5 -Rezeptor und dem allosterischen Modulator häufiger die Möglichkeit hat, an W84 vorbei aus dem Protein zu dissoziieren, da mehr Raum vorhanden ist. Dies würde sich entsprechend in einer verminderten Affinität des allosterischen Modulators am M_5 -Rezeptor bemerkbar machen. Dies steht auch im Einklang mit der unterschiedlichen Geometrie nach einer MDS der ternären Komplexe. Im M_5 -Rezeptor sind beide Bindungstaschen miteinander verbunden und der aromatische Ring von NMS ist sehr weit extrazellulär im orthosterischen Bereich lokalisiert, während im M_2 -Rezeptor die Bindungstasche auch im ternären Komplex verschlossen ist.

Dies ist jedoch keine Erklärung für die lange Halbwertszeit von NMS am M_5 -Rezeptor, verglichen mit dem M_2 -Rezeptor. Allerdings ergibt sich auch hier ein Erklärungsan-

satz. Im M_5 -Rezeptor stabilisiert die H-Brücke zwischen Position $M_5Q184/5.29$ und $M_5Y481/7.39$ den zweiten extrazellulären Loop. Im M_2 -Rezeptor ist diese Stabilisierung nicht möglich. Hier erfolgt im Vergleich nur eine leichte Stabilisierung durch einen Kontakt des aromatischen Tyrosin in Position $M_2Y177/5.29$ mit dem konservierten Tryptophan in Position $M_2W422/7.35$. Dieser Kontakt führt zwar auch zu einer Stabilisierung, die ist aber nicht so stark wie eine Wasserstoffbrücke. Daher ist der M_2 -Rezeptor in diesem Bereich möglicherweise flexibler und führt über eine Konformationsänderung des e2 zu einer erleichterten Assoziation und Dissoziation von orthosterischen Liganden. Hinzu kommt, dass der kürzere N-Terminus des M_2 -Rezeptors auch beweglicher ist und den e2 nicht so stark stabilisieren kann wie der N-Terminus des M_5 -Rezeptors.

Bei Überprüfung der Proteingeometrie ergibt sich im ternären Komplex eine Verbesserung gegenüber den Ausgangsmodellen. Durch die MDS sind mehr Aminosäuren in den am meisten bevorzugten Regionen zu finden, und auch die ungünstige Aminosäure ($M_5V474/7.32$) in Nähe der W84-Bindung ist nicht mehr existent.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Rezeptormodelle sorgfältig erstellt wurden und eine hohe Qualität aufweisen. Diese Qualität zeigt sich dadurch, dass die bisher vorgestellten Ergebnisse gut in Einklang mit experimentellen Daten gebracht werden können. Das M_2 -Modell bietet bereits hier sehr viel genauere Einblicke in den Bindungsmodus von W84 als das Vorgängermodell. Wie jedes Modell weisen die beiden Rezeptoren an einigen Stellen auch gewisse Defizite auf. So wird zum Beispiel kein internes Wasser berücksichtigt. Dies kann bei länger dauernden MDS, als in dieser Arbeit durchgeführt, möglicherweise zu Fehlern führen. Auch der Einfluss der Alanin-Sequenz des i3-Loops auf die Beweglichkeit kann möglicherweise zu artifiziellen Verhaltensweisen führen, die hier nicht erkannt werden. Da solche kleineren Defizite aber vermutlich auf alle betrachteten Liganden gleichermaßen wirken, sind die beiden Rezeptormodelle gut dazu geeignet, Fragen zur M_2/M_5 -Subtypselektivität nachvollziehen und erklären zu können. Ein derartiger Vergleich über theoretische Methoden ist bisher mit muskarinischen Rezeptoren nicht durchgeführt worden. Dennoch zeigen die beiden Rezeptormodelle, dass solche Vergleiche möglich sind. In dieser Arbeit ergeben sich daher neue Denkansätze, um die Forschung auf dem Gebiet der muskarinischen Rezeptoren voran zu treiben.

Teil II

Allosterische Modulation des M2-Rezeptors

Kapitel 6

Zielsetzung

Neue Fragestellungen in Bezug auf den M_2 -Rezeptor machen es notwendig, sich für die weitere Arbeit nur noch auf einen Rezeptorsubtypen zu konzentrieren. Die Koordinaten des M_5 -Rezeptors werden für weitere Untersuchungen Herrn T. Leutenantsmeyer, Doktorand der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Wiese (Pharmazeutisches Institut, Pharmazeutische Chemie I, Universität Bonn) überlassen. Teil II dieser Arbeit beschreibt die sich an Teil I anschließenden Untersuchungen zum M_2 -Rezeptor, die für das M_5 -Rezeptormodell in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden.

Die Ziele für Teil II dieser Arbeit *Allosterische Modulation des M_2 -Rezeptors* können damit wie folgt formuliert werden:

- (1) Zunächst soll der Bindungsmodus von W84 im M_2 -Rezeptormodell näher betrachtet werden. Eine Berücksichtigung bereits bekannter Ergebnisse aus Mutationsstudien soll eine Überprüfung des Modells ermöglichen. Das Vorgänger-Modell des M_2 -Rezeptors ist nicht in der Lage detaillierte Aussagen zu Bindungsmodi von allosterischen Modulatoren zu machen. Das neue M_2 -Modell soll daher die bekannten experimentellen Ergebnisse zunächst nachvollziehen. Ist es dazu in der Lage, soll es auch neuere Daten erklären.
- (2) Im ersten Teil dieser Arbeit wird gezeigt, dass Liganden die Veränderungen der Rezeptorproteine in einer stabilisierenden Art und Weise beeinflussen. Da bisher nur zwei Antagonisten, NMS in der orthosterischen und W84 in der allosterischen Bindungstasche, betrachtet wurden, soll zunächst geklärt werden, ob es Unterschiede im Verhalten des M_2 -Rezeptors bei Anwesenheit eines Agonisten oder Partialagonisten im Vergleich mit einem inversen Agonisten gibt. Hier soll überprüft werden, ob der Einfluss der Liganden auf das dynamische Verhalten des Rezeptors erklärbar ist und möglicherweise Schlüsse aus diesen unterschiedlichen Verhaltensweisen gezogen werden können.
- (3) Anschließend sollen weitere Modulatoren der Alkanbisammonium-Reihe untersucht werden. Unterschiedliche Aspekte dieser Substanzen sollen betrachtet werden. Zum einen soll das Modell neue Erklärungsansätze für ein unterschiedliches kooperatives Verhalten verschiedener Alkanbisammonium-Verbindungen finden. Zum anderen sollen neue Erklärungsansätze zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR, engl., *Structure Activity Relationships*) dieser Substanz-Gruppe geboten werden. Hierzu soll auch das Verhalten verkürzter Alkanbisammonium-Derivate untersucht werden. Die Bildung von Protein-Ligand-Komplexen soll hierbei mit einem Docking-Programm erfolgen. Aus Mutationsstudien erhaltene Daten sollen anhand des M_2 -Modells interpretiert und neue Erklärungsansätze geliefert werden.
- (4) Das Docking eines strukturell diversen allosterischen Modulators soll dazu genutzt werden, das M_2 -Modell weiter zu validieren. Hierzu wird der klassische Prototyp-Modulator Gallamin eingesetzt. Bereits bekannte und neu erstellte Ergebnisse aus Mutations- und Bindungsstudien sollen berücksichtigt werden, um einen möglichen

Bindungsmodus dieses Modulators postulieren zu können. Moleküldynamiksimulationen sollen diesen Bindungsmodus überprüfen.

- (5) Es sollen Lösungsvorschläge für die Bindung weiterer Alkanbisammoniumderivate gemacht werden, die allosterisch-orthosterische Hybrid-Substanzen darstellen. Pharmakologische Daten deuten für diese Hybride auf einen dualen Bindungsmodus hin. Es wird postuliert, dass sie sowohl die allosterische als auch die orthosterische Bindungstasche des muskarinischen M_2 -Rezeptors nutzen. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die vollagonistische Eigenschaft am M_2 -Rezeptor. Diese Substanzen weisen also vollkommen andere Eigenschaften auf, obwohl sie sich nur in einem relativ eng begrenzten Bereich der Moleküle strukturell von den allosterischen Modulatoren unterscheiden, die Antagonisten darstellen. Mögliche Bindungsmodi der orthosterisch-allosterischen Hybridsubstanzen sollen vorgeschlagen werden. Weiterhin soll auch ein möglicher allosterischer Bindungsmodus überprüft und mit einem möglichen dualen Bindungsmodus verglichen werden.
- (6) Abschließend sollen Vorschläge für Mutationsstudien am M_2 -Rezeptor gemacht werden. Hierdurch sollen neue affinitäts- oder subtypselektivitätsgebende Aminosäuren gefunden werden, die Kandidaten für Mutations- und Bindungsstudien an muskarinischen Rezeptoren darstellen.

Kapitel 7

Durchführung und Ergebnisse

7.1 Einfluss von Rezeptormutanten auf die Bindung von W84

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen zunächst die Bindungseigenschaften von W84 am M_2 -Rezeptor näher beschrieben werden. Zur Validierung des Rezeptormodells werden daher Punkt-Mutationen des M_2 -Rezeptors betrachtet, deren Bedeutung für die Bindungsneigung allosterischer Modulatoren bekannt ist. Anschließend werden weitere Aminosäuremutationen untersucht, deren Bedeutung in Kooperation mit der pharmakologischen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Mohr (Pharmazeutisches Institut, Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) geklärt werden soll. Hierzu werden verschiedene Einfach- und Doppel-Mutanten des M_2 -Rezeptors erstellt. Die Seitenketten werden in Insight II 2000 mutiert. Eine Platzierung der Seitenketten wird mit SCWRL durchgeführt. Um den Einfluss einer Aminosäure auf die Bindung von W84 beurteilen zu können, werden die veränderten Eigenschaften des Proteins mit GRID-Sonden untersucht.

7.1.1 Mutationen E172L und E175Q im M_2 -Rezeptor

Seit Mitte der 1990er Jahre ist bekannt, dass die Affinität für Gallamin, ein anderer klassischer allosterischer Modulator, von einer sauren Sequenz im zweiten extrazellulären Loop des muskarinischen M_2 -Rezeptors abhängt (M_2 172EDGE175) [129]. Neuere Untersuchungen mit W84 und Gallamin bestätigen dies und zeigen für W84 die gleiche Epitopabhängigkeit [119]. Um diese Wechselwirkungsmöglichkeiten im M_2 -Rezeptormodell zu überprüfen, werden die Mutationen M_2 E172L/4.74, M_2 E175Q/4.77 und die Doppelmutante mit der *MM3*-Sonde untersucht. In Abbildung 7.1 ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Im M_2 wt sind drei größere Felder zu erkennen, die mit a-c gekennzeichnet sind. Oberhalb des c-Feldes sind weitere kleinere Nebenfelder lokalisiert, die

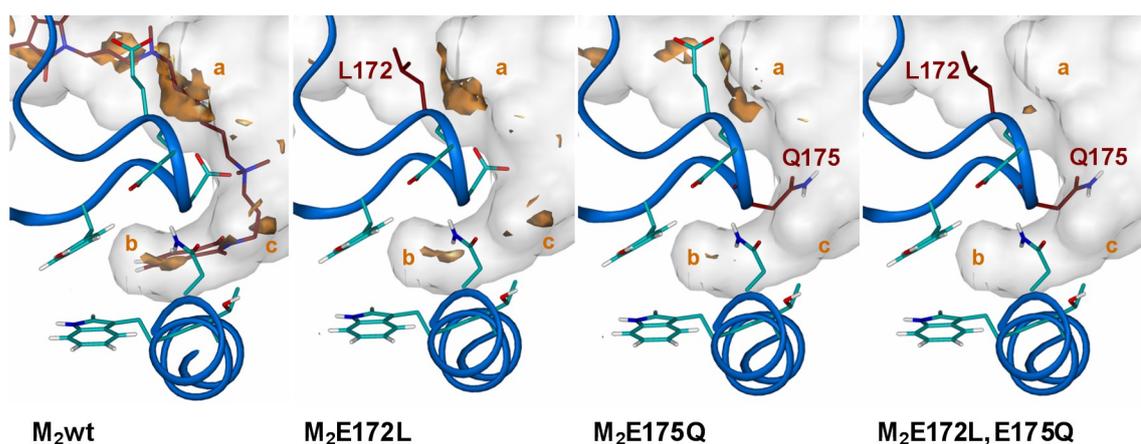


Abbildung 7.1: Einfluss der Mutationen M_2 E172L/4.74 und M_2 E175Q/4.77 auf die Wechselwirkungsstärke von W84. Aminosäuren im M_2 wt sind nach Abb. 4.21B auf S. 70 dargestellt; mutierte Seitenketten, dunkelrot und gekennzeichnet; weißes, durchsichtiges Volumen, Volumen der allosterischen Bindungstasche im M_2 wt; orangefarbene Felder, GRID-Felder der *MM3*-Sonde auf einem Energieniveau von -8,9kcal.

innerhalb des van-der-Waals-Radius der Methylreste der proximalen Ammoniumgruppe liegen. Bei der Mutation M_2E172L zeigt sich eine Verkleinerung des α -Feldes. Die anderen Felder und wichtige Wechselwirkungsmöglichkeiten des α -Feldes bleiben erhalten. Bei M_2E175Q zeigt sich eine deutliche Verkleinerung aller Felder. Feld c und die kleinen Nebenfelder verschwinden vollständig. In der Doppelmutante ist auf einem Energieniveau von $-8,9\text{kcal}$ fast keine Wechselwirkungsmöglichkeit für quartäre Ammoniumverbindungen vorhanden.

7.1.2 Mutationen Y177Q, W422A und T423H im M₂-Rezeptor

Zu Beginn dieser Arbeit waren zwei Aminosäuren bekannt, die vollständig die M_2/M_5 -Subtypselektivität von W84 erklären können [68]. Durch Austausch der korrespondierenden $M_2 \rightarrow M_5$ -Aminosäuren $M_2Y177Q/5.29$ im $\epsilon 2$ und $M_2T423H/7.36$ in TM7 wird die Affinität am M_2 -Rezeptor um den Faktor 75 auf M_5 -Niveau gesenkt. Das Vorgängermodell des M_2 -Rezeptors von Jöhren postuliert hier für $M_2T423/7.36$ einen stabilisierenden Einfluss. Die sandwichartige Anordnung des proximalen Phthalimidrings von W84 mit $M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$ soll durch $M_2T423/7.36$ stabilisiert werden. Dies gilt insbesondere für die Konformation von $M_2W422/7.35$ [110]. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Mohr (Pharmazeutisches Institut, Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) wird von Prilla die Bedeutung von $M_2W422/7.35$ für die Bindung von Alkanbisammoniumverbindungen experimentell untersucht [109, 127]. Hierzu werden auch erneute Untersuchungen zu den Aminosäuren $M_2Y177/5.29$ und $M_2T423/7.36$ durchgeführt. Ihre Ergebnisse deuten allerdings nicht auf einen stabilisierenden Einfluss von $M_2T423/7.36$ hin. Es wird hier eher ein störender Einfluss des Histidins bei Mutation $M_2T423H/7.36$ vermutet. Das Vorgängermodell ist nicht in der Lage diese Ergebnisse zu erklären. Daher wird eine theoretische Untersuchung der drei genannten Aminosäuren am hier vorgestellten M_2 -Modell durchgeführt, die Einblicke in die unterschiedlichen Einflüsse der Aminosäuren geben. Die Veröffentlichung der theoretischen und experimentellen Ergebnisse erfolgte im Jahr 2006 in internationaler Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. K. Mohr und Prof. Dr. J. Ellis (Departments of Psychiatry and Pharmacology, Penn State College of Medicine, Hershey, Pennsylvania) in der international anerkannten amerikanischen Fachzeitschrift *Molecular Pharmacology* [109]. Die Ergebnisse der theoretischen Untersuchungen hierzu werden im Folgenden vorgestellt.

Bei der Mutation $M_2T423H/7.36$ fällt eine deutliche Volumen-Verringerung der allosterischen Bindungstasche auf (vgl. Abb. 7.2). Der Imidazolring schränkt bei Platzierung durch SCWRL das Volumen der allosterischen Bindungstasche in Nachbarschaft zu $M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$ ein. Bei Durchsuchung der in Insight II 2000 implementierten Rotameren-Bibliothek existiert kein automatisches Seitenkettenrotamer an dieser Position, das nicht entweder das Volumen der Bindungstasche einschränkt oder mit anderen Aminosäure-Seitenketten oder Rückgrat-Atomen kollidiert. Der Zugang zu den affinitätsgebenden Aminosäuren $M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$ wird sterisch gehindert,

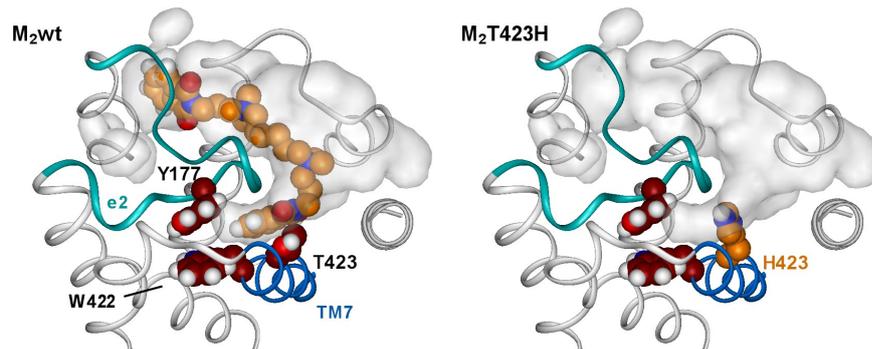


Abbildung 7.2: Einfluss der Mutation M_2T423H auf die Größe der allosterischen Bindungstasche. M_2wt , Lage von W84 zu den Aminosäuren Y177/5.29, W422/7.35 und T423/7.36 am M_2 -Rezeptor; M_2T423H , Positionierung von H423 in der Rezeptormutante durch SCWRL; das weiße, durchsichtige Volumen entspricht dem Volumen der allosterischen Bindungstasche im M_2wt ; modifiziert nach [109].

was in Einklang mit der erniedrigten Affinität von W84 an dieser Mutante steht.

GRID-Wechselwirkungsfelder

Nach Erstellung der Mutanten $M_2Y177Q/5.29$ und $M_2W422A/7.35$ werden erneut GRID-Untersuchungen mit der aromatischen $C1=-$ Sonde durchgeführt und Veränderungen der GRID-Felder mit dem M_2wt visuell verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 7.3 dargestellt. Gezeigt wird eine membranständige Ansicht der untersuchten Bindungsregion auf TM7, die im Vergleich zu Abbildung 7.1 um 90° gekippt ist. Gut zu erkennen ist die Positionierung des Phthalimid-Rings von W84 in einem großen aromatischen Feld des M_2wt . Alle Mutationen führen zu Verkleinerungen dieses Feldes. Die Wechselwirkungsmöglichkeiten werden an M_2W422A stärker eingeschränkt, als an M_2Y177Q . Bei der doppelten Mutation kommt es zu einer weiteren leichten Verkleinerung im unteren Bereich.

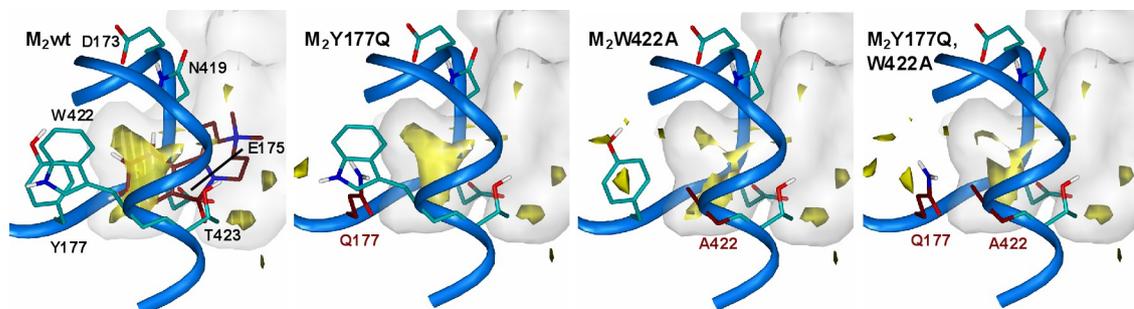


Abbildung 7.3: Einfluss der Mutationen $M_2Y177Q/5.29$ und $W422A/7.35$ auf die Wechselwirkungsstärke von W84. Mutierte Seitenketten, dunkelrot und gekennzeichnet; weißes, durchsichtiges Volumen, Volumen der allosterischen Bindungstasche im M_2wt ; gelbe Volumina, GRID-Felder der $C1=-$ Sonde auf einem Energieniveau von $-3,8kcal$.

Moleküldynamiksimulation der M_2 -W422A,T423H-Doppelmutante

Um den dynamischen Einfluss der betrachteten Aminosäuren zu klären, wird eine MDS der Doppelmutante M_2 W422A, T423H durchgeführt, da sie in Untersuchungen von Prilla einen 180fachen Affinitätsverlust von W84 gegenüber dem Wildtyp zeigt und gleichzeitig die Dissoziation von $[^3\text{H}]$ NMS auch bei maximalen Modulatorkonzentrationen nicht vollständig verzögern kann [109]. Hier müssen sich deutliche Änderungen des Bindungsmodus ergeben.

Die Seitenkette von H423 wird manuell zur Seite gedreht, um eine Bindung von W84 zu ermöglichen. Anschließend wird eine MDS des ternären Komplexes, bestehend aus der M_2 -Doppelmutante, NMS und W84 durchgeführt. Die RMSD-Werte werden mit den Ergebnissen des Wildtyps (M_2 -NMS-W84, vgl. auch Abb. 4.25, S. 75) verglichen und sind in Abbildung 7.4A dargestellt. Die Abweichungen des Proteinrückgrats von der Ausgangs-

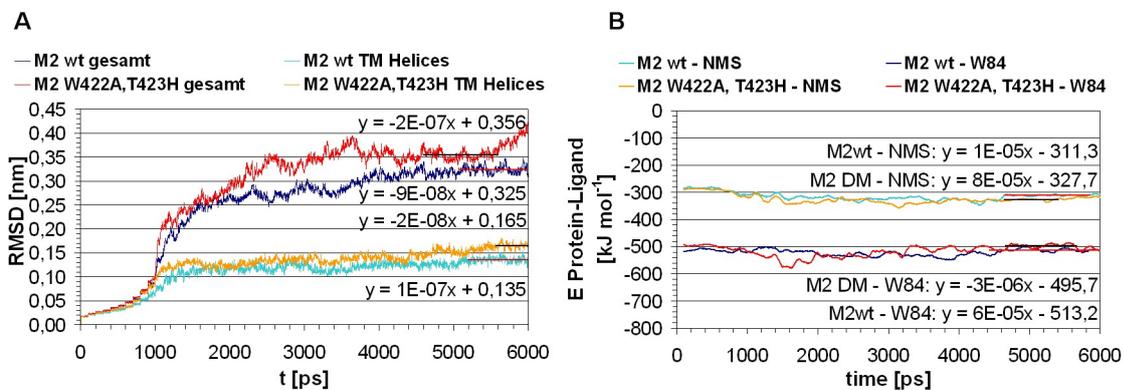


Abbildung 7.4: Vergleich von MDS der ternären M_2 -NMS-W84-Komplexe am M_2 wt und an M_2 W422A,T423H. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. gesamt: alle Rückgrat-Atome des Proteins; TM Helices: Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien für NMS und W84 im M_2 wt und in M_2 W422A,T423H; gleitender Mittelwert über 50 Perioden.

struktur sind an der Doppelmutante stärker ausgeprägt als am Wildtyp. Das vollständige Proteinrückgrat zeigt in einem Bereich zwischen 4,6ns und 5,6ns einen mittleren Wert von 0,36nm. Hier ist der Unterschied des RMSD-Werts zum Wildtyp minimal und beträgt etwa 0,03nm. Anschließend verändert sich das Protein-Rückgrat der Doppelmutante im Gegensatz zum Wildtyp noch einmal deutlich. Nach 6ns ist bereits ein Unterschied von etwa 0,1nm erreicht.

Die transmembranären helikalen Bereiche weisen bei M_2 W422A,T423H ebenfalls eine verstärkte Bewegung auf. Eine Auswertung ist hier schwierig, da nur ein kurzer Bereich am Ende der Dynamiksimulation equilibriert ist (5,6ns-6ns). Die Stabilisierung durch W84 im ternären Komplex des M_2 wt ist stärker. Der Wert für die Doppelmutante beträgt 0,17nm, der Wildtyp zeigt dagegen Werte von 0,14nm. Die Differenz beträgt 0,03nm.

Abbildung 7.4B zeigt den Energieverlauf beider Dynamiken für die Protein-Ligand-

Wechselwirkungen. Zur besseren Übersicht sind für die Energiewerte die gleitenden Mittelwerte über jeweils 50 Werte dargestellt. Der Energieverlauf für W84 in $M_2W422A,T423H$ fluktuiert stärker als im M_2wt . Am Ende der Dynamik weist W84 im Mittel eine geringere Wechselwirkungsenergie mit dem Protein als am Wildtyp auf. Die Werte betragen für den Wildtyp im Mittel $-513,2\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und für $M_2W422A,T423H$ $-495,7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Der Energieunterschied beträgt $17,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. NMS gewinnt in der Doppelmutante leicht an Wechselwirkungsenergie. Im M_2wt erzeugt NMS mit dem Protein $-311,3\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, in der Doppelmutante $-327,7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die Protein-NMS-Wechselwirkung ist in der Doppelmutante um $16,4\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ stärker.

Um verstehen zu können, welche Veränderungen sich für $M_2W422A,T423H$ im Vergleich zum M_2wt ergeben, werden weitere Auswertungen vorgenommen. Hierzu wird die Position des jeweiligen Liganden relativ zum Mittelpunkt des Proteins betrachtet. Beide Liganden sind im Rezeptor oberhalb dieses Protein-Schwerpunktes lokalisiert. Die absoluten Abstände der Masseschwerpunkte des jeweiligen Liganden zu dem des Proteins wird als Maß für eine mögliche Diffusions-Bewegung der Liganden betrachtet. Die Abstände der Liganden werden für beide Dynamiken über die Zeit berechnet und miteinander verglichen. In Abbildung 7.5 werden zur besseren Übersicht die gleitenden Abstands-Mittelwerte über 50 Perioden dargestellt.

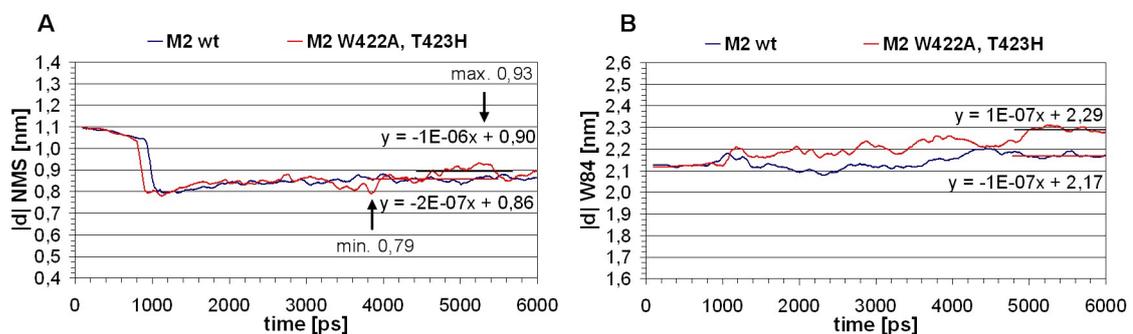


Abbildung 7.5: Vergleich der Abstände der Masseschwerpunkte von NMS und W84 zum Masseschwerpunkt des Proteins im Verlauf der MDS am M_2wt und an der $M_2W422A,T423H$ -Doppelmutante. A, Abstandsbeträge von NMS; B, Abstandsbeträge von W84.

Bei NMS (Abb. 7.5A) beobachtet man zunächst bei beiden Simulationen eine Positionsveränderung zu Beginn der Dynamik. NMS rutscht nach Aufhebung der Rückhaltekräfte tiefer zwischen die transmembranären Helices. Der Abstand zum Mittelpunkt des Proteins wird geringer. Anschließend erfolgt eine langsame Zunahme des Abstandes in beiden Modellen. Für den M_2wt ist der Verlauf sehr regelmäßig, während die Position von NMS bei $M_2W422A,T423H$ zum Teil stark fluktuiert.

Die gleitenden Mittelwerte zeigen in der Doppelmutante ab einer Simulationsdauer von 3ns minimale Werte von etwa 0,79nm und maximale Werte von 0,93nm. Im Wildtyp ist die Fluktuation geringer. Hier betragen die minimalen Werte von NMS etwa 0,83nm und die

maximalen etwa 0,88nm. Die Fluktuationsamplitude beträgt für den Wildtyp etwa 0,05nm und für die Doppelmutante fast den dreifachen Wert, 0,14nm. Am Ende der Dynamiksimulation ist NMS in der Doppelmutante nicht so tief in der Bindungstasche lokalisiert, wie im M_2wt . Die Abstände zum Mittelpunkt des Proteins betragen für NMS im M_2wt 0,86nm und in der Doppelmutante $M_2W422A,T423H$ etwa 0,90nm.

Für die Positionierung von W84 ergeben sich deutliche Änderungen in der Doppelmutante verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 7.5B). Die Position von W84 im M_2wt gegenüber der Ausgangsposition ändert sich nur leicht. W84 zeigt hier im ausgewerteten Bereich einen mittleren Abstand vom Protein-Masseschwerpunkt von 2,17nm. W84 ist damit etwa um 0,05nm weiter vom Masseschwerpunkt des Proteins entfernt als zu Beginn der Dynamik (2,12nm). In der Doppelmutante $M_2W422A,T423H$ zeigen sich deutlich stärkere Änderungen. Über den gesamten Verlauf der Dynamik hat W84 einen größeren Abstand zum Protein-Mittelpunkt als im Wildtyp. Im ausgewerteten Bereich beträgt der Abstand 2,29nm. Die Veränderung zur Ausgangsposition beträgt etwa 0,17nm.

Abbildung 7.6 zeigt einen Vergleich repräsentativer Strukturen aus beiden Dynamiksimulationen mit der jeweiligen Ausgangsstruktur. Die Proteinrückgrat-Atome der transmembranären helikalen Bereiche werden in beiden Modellen mit der *Fit Atoms*-Routine in Insight II 2000 überlagert. Die Position von NMS wird zur besseren Übersicht nicht dargestellt. Die Veränderung der W84-Geometrie in der allosterischen Bindungstasche des M_2wt ist gering. Die Positionen des proximalen Phthalimidrings und quartären Stickstoffes sowie der aromatischen Aminosäure-Seitenketten bleiben gegenüber der Ausgangsstruktur weitgehend erhalten. In der repräsentativen Struktur weist der Phthalimidring einen Abstand zum aromatischen Ring von $M_2Y177/5.29$ von 5,7Å auf. Die Abstände werden jeweils zwischen den Masseschwerpunkten der Aromaten gemessen. Die proximale Ammoniumgruppe verändert ihre Position um 1,8Å im Vergleich zur Ausgangsstruktur.

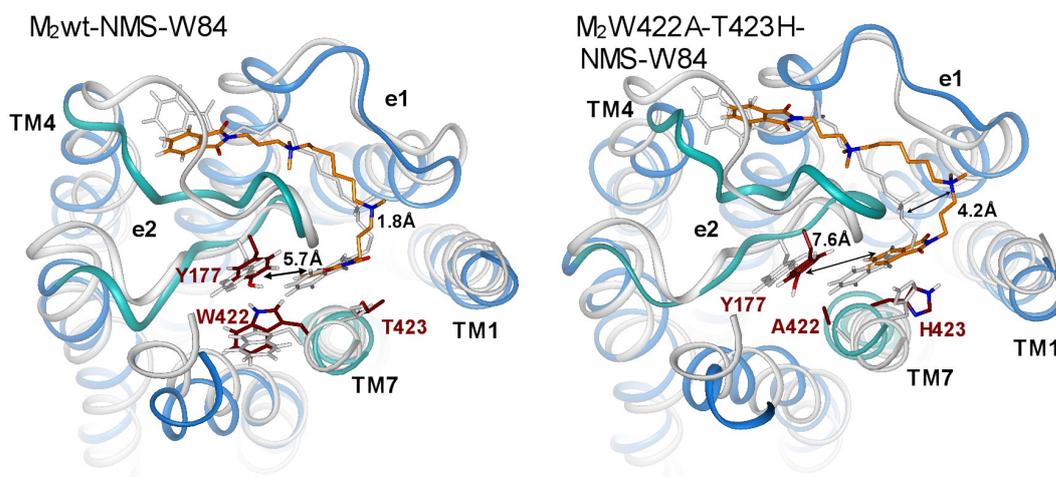


Abbildung 7.6: Vergleich repräsentativer Strukturen der ternären Komplexe des M_2 -Rezeptors mit NMS und W84 am M_2wt (M_2wt -NMS-W84) und an $M_2W422A,T423H$ ($M_2W422A,T423H$ -NMS-W84); Ausgangsgeometrie als Referenz jeweils in weiß dargestellt.

tur. Im distalen Bereich der allosterischen Bindungstasche sind leichte Veränderungen zu erkennen. Die Geometrie der helikalen Bereiche bleibt gut erhalten. Der e2 zeigt im proximalen Bereich der Bindungstasche nur geringe Änderungen.

Die repräsentative Struktur des ternären Komplexes von $M_2W422A, T423H$ zeigt größere Änderungen von W84 und den Aminosäureseitenketten. In der repräsentativen Struktur weist der proximale Phthalimidring einen Abstand von 7,6Å zu $M_2Y177/5.29$ auf. Im Vergleich zum M_2wt vergrößert sich der Abstand der aromatischen Ringe um 1,9Å. Die proximale Ammoniumgruppe zeigt eine deutliche Veränderung ihrer Position im Vergleich zur Ausgangsstruktur. Die Abstände der quartären Stickstoffe betragen 4,2Å. Weiterhin sind bei $M_2W422A, T423H$ im Vergleich zum M_2wt Änderungen des Proteinrückgrats an TM1, TM4, TM7, e1 und dem proximalen Bereich von e2 zu erkennen.

7.2 Bindungsmodus weiterer orthosterischer Liganden

Bisher wurde nur der Bindungsmodus von NMS als orthosterischem und W84 als allosterischem Liganden betrachtet. Beide Substanzen sind inverse Agonisten am M_2 -Rezeptor [50]. Im Modell zeigen sie in MDS eine Stabilisierung der transmembranären helikalen Bereiche im Vergleich zum unbesetzten Rezeptorzustand (vgl. Abschnitt 4.6 und 4.7). Unklar ist bisher, ob diese Ergebnisse auf einen wirklichen antagonistischen Effekt der Liganden am Rezeptor hindeuten und das Rezeptormodell diesen wiedergibt. Möglich ist auch, dass eventuell alle Liganden, also auch Agonisten, einen stabilisierenden Effekt auf das Rezeptorprotein ausüben und keine Schlüsse aus dem dynamischen Verhalten des Rezeptors gezogen werden dürfen.

Um das M_2 -Rezeptormodell daraufhin zu überprüfen, werden zunächst zwei weitere orthosterische Liganden und deren Einfluss auf die Flexibilität des M_2 -Rezeptors betrachtet. Hierzu werden Acetylcholin als Vollagonist und Pilocarpin als Partialagonist ausgewählt. Die Komplexe dieser beiden Liganden mit dem M_2 -Rezeptor wurden von Frau H. Öztürk und Frau E. Maciejuk während der Absolvierung des Wahlpflichtpraktikums im Rahmen des Pharmaziestudiums im Jahr 2007 in unserer Arbeitsgruppe erstellt. MDS wurden analog der vorherigen Simulationen durchgeführt und die Ergebnisse werden im Folgenden kurz vorgestellt.

7.2.1 Acetylcholin

In Abbildung 7.7A ist der Verlauf der RMSD-Werte des M_2 -Acetylcholin-Komplexes dargestellt. Der Kurvenverlauf der RMSD-Werte steigt für die transmembranären helikalen Bereiche bis 5ns beständig leicht an. Anschließend fällt der RMSD-Wert wieder etwas ab. Zwischen etwa 3,4ns und 5,4ns ist der RMSD-Wert stabil. Die M_2 TM Helices zeigen hier Abweichungen von der Ausgangsstruktur von mehr als 0,15nm. Die Kurven der anderen Proteinbereiche verlaufen ab 3,8ns stabil und weisen Werte von 0,31nm für M_2 *gesamt* und 0,27nm für M_2 *Helices und Loops* auf.

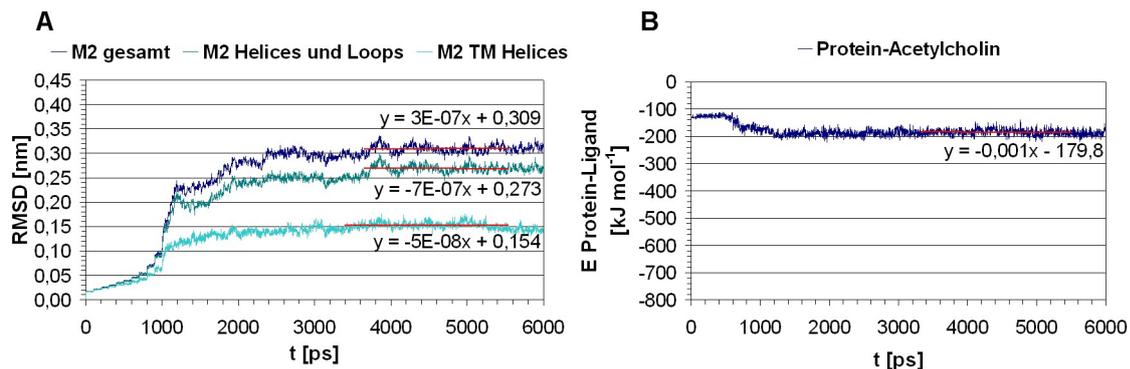


Abbildung 7.7: MDS des M_2 -Acetylcholin-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

Abbildung 7.7B zeigt die intermolekulare Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie über die Zeit. Für die Wechselwirkung von Acetylcholin mit dem M_2 -Rezeptor beträgt sie im Mittel $-179,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

7.2.2 Pilocarpin

In Abbildung 7.8A ist der Verlauf der RMSD-Werte des M_2 -Pilocarpin-Komplexes dargestellt. Die Bereiche *M2 gesamt* und *M2 Helices und Loops* zeigen zu Beginn einen sehr steilen Anstieg. Nach etwa 4ns erfolgt eine Equilibrierung auf hohem Niveau. Am Ende der Dynamiksimulation kommt es zu einer stärkeren Schwankung der RMSD-Werte. Die

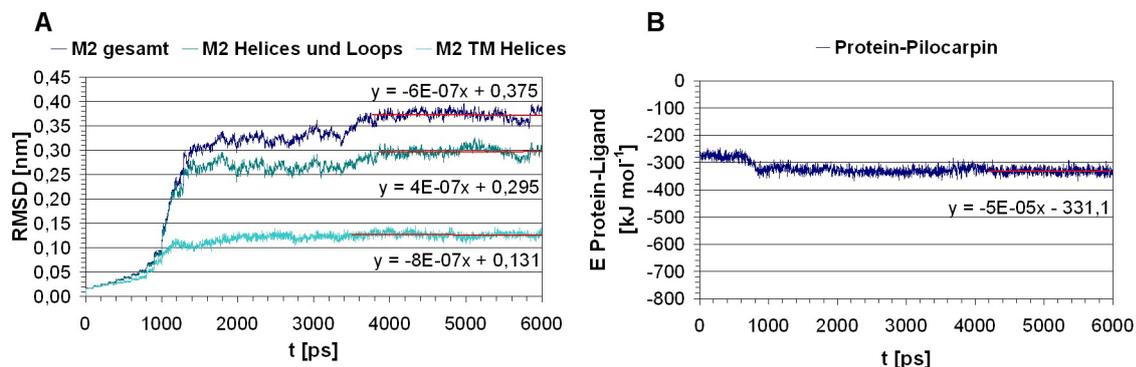


Abbildung 7.8: MDS des M_2 -Pilocarpin-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

mittleren Werte betragen ab etwa 4ns 0,38nm bzw. 0,30nm. Der Wert für die transmembranären helikalen Bereiche beträgt im Mittel 0,13nm.

In Abbildung 7.8B ist die intermolekulare Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie für den *M₂-Pilocarpin*-Komplex über die Zeit dargestellt. Der Energieverlauf ist in der Phase der freien Dynamiksimulation stabil und zeigt mittlere Werte von $-331,1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

7.2.3 Vergleich zwischen Agonist, Partialagonist und inversem Agonist

Tabelle 7.1 fasst die RMSD-Werte der MDS mit orthosterischen Liganden zusammen und vergleicht sie mit den Werten aus dem unbesetzten Rezeptormodell (*M₂wt*).

Protein-Bereich	<i>M₂wt</i> RMSD [nm]	<i>M₂-Acetylcholin</i> RMSD [nm]	<i>M₂-Pilocarpin</i> RMSD [nm]	<i>M₂-NMS</i> RMSD [nm]
M2 gesamt	0,290	0,309	0,375	0,309
M2 Helices und Loops	0,278	0,273	0,295	0,252
M2 TM Helices	0,159	0,154	0,131	0,125

Tabelle 7.1: Zusammenfassung der RMSD-Werte für den orthosterisch besetzten *M₂*-Rezeptor; Zum Vergleich sind die Werte des unbesetzten Rezeptors (*M₂wt*) angegeben.

Verglichen mit dem *M₂wt* weisen alle Protein-Ligand-Komplexe niedrigere Werte und damit eine Stabilisierung der transmembranären helikalen Bereiche auf. Das gesamte Protein-Rückgrat hingegen zeigt stärkere Veränderungen. Für die *M2 TM Helices* ist folgender Trend erkennbar. Die beste Stabilisierung der Bereiche *M2 TM Helices* und *M2 Helices und Loops* wird durch den inversen Agonisten NMS erreicht (0,125nm). Pilocarpin stabilisiert die transmembranären Bereiche nicht ganz so stark wie NMS (0,131nm). Acetylcholin zeigt hier die größte Abweichung bei den Ligand-besetzten Rezeptoren (0,154nm). Die Werte für Acetylcholin ähneln dem unbesetzten Rezeptorzustand (*M₂wt*, 0,159nm). Alle Proteinbereiche, außer den Termini, werden im Acetylcholin-besetzten *M₂*-Rezeptor nur leicht stabilisiert. Pilocarpin zeigt bei den *M2 Helices und Loops* die größten Änderungen und weicht stärker von der Ausgangsstruktur ab als der unbesetzte Rezeptor.

Da alle orthosterischen Liganden eine Stabilisierung der transmembranären Bereiche im Gegensatz zum unbesetzten Rezeptor zeigen, wird eine weitere Auswertung vorgenommen. Diese soll den Anteil der stark fluktuierenden Aminosäuren des Proteinrückgrats bei den unterschiedlichen Dynamiksimulationen vergleichen. Ziel ist weiterhin ein Maß für den Einfluss eines Modulators auf die Rezeptor-Flexibilität zu finden und damit möglicherweise Agonisten von Antagonisten unterscheiden zu können. Im Bereich zwischen 4ns und 5ns zeigen alle Dynamiksimulationen einen einigermaßen gleichmäßigen Verlauf. Für diesen Zeitraum der Dynamiksimulation wird der RMSF-Wert, die Fluktuation einer einzelnen Aminosäure, für alle vier MDS ermittelt. Beispielfhaft werden hier in Abbildung 7.9A die RMSF-Werte für den NMS-besetzten Rezeptor dargestellt.

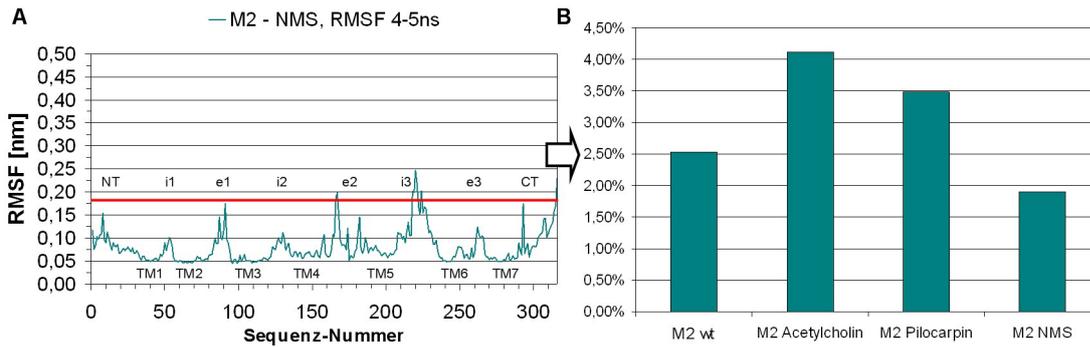


Abbildung 7.9: Vergleich der Protein-Rückgrat-Fluktuationen der M_2 -Rezeptor-Komplexe. A, Fluktuationen der einzelnen Aminosäuren zwischen 4ns und 5ns für den NMS-besetzten M_2 -Rezeptor; B, prozentualer Anteil der Aminosäuren mit RMSF-Werten $>0,18\text{nm}$ der unterschiedlichen MDS.

Die meisten Aminosäuren der transmembranären Bereiche zeigen im NMS-besetzten Rezeptor eine Fluktuation von unter $0,06\text{nm}$. Die flexibleren Loop-Regionen weisen höhere Werte auf. Dies betrifft vor allen Dingen Aminosäuren des i3 und des C-Terminus. Beide Bereiche sollen größere Konformationsänderungen während der Aktivierung von GPCRs unternehmen (vgl. Abschnitt 1.5.2, S. 14). Um die Fluktuationen der einzelnen MDS vergleichen zu können, wird der dreifache Wert der Helixfluktuationen ($0,18\text{nm}$) als Grenzwert ausgewählt. In Abbildung 7.9A ist dieser Wert als rote Linie markiert. Aminosäuren mit höheren Werten zeigen deutliche Konformations-Änderungen im Vergleich zu den Helices. Der Anteil der Aminosäuren, der höhere RMSF-Werte als $0,18\text{nm}$ aufweist, wird ins prozentuale Verhältnis zur Gesamtzahl aller Aminosäuren gesetzt.

Das Ergebnis der Untersuchungen aller M_2 -Komplexe mit orthosterischen Liganden bzw. des unbesetzten Rezeptors wird in Abbildung 7.9B dargestellt. M_2 -Acetylcholin und M_2 -Pilocarpin haben einen höheren Anteil stark fluktuierender Aminosäuren als der M_2 wt. M_2 -NMS weist niedrigere Werte als der unbesetzte Rezeptor auf. Obwohl die Liganden die helikalen Bereiche verglichen mit dem unbesetzten Rezeptor M_2 wt stabilisieren, wird die Fluktuation der Loop-Bereiche von Agonisten verstärkt, während der inverse Agonist auch die Loop-Bereiche zusätzlich stabilisiert. Hierdurch ist eine Unterscheidung von Agonisten und inversen Agonisten durch das M_2 -Modell möglich.

7.3 Bindungsmodus weiterer Alkanbisammonium-Derivate

Für weitere Untersuchungen war es interessant, wie sich andere Alkanbisammoniumderivate am M_2 -Rezeptor verhalten. Naphmethonium, ein W84-Derivat, hat z.B. eine höhere Affinität am M_2 -Rezeptor und zeigt ein anderes Verhalten als W84 [130, 127].

Verkürzte Alkanbisammoniumderivate weisen in Dissoziationsexperimenten mit dem orthosterischen Radioliganden [^3H]NMS deutliche Affinitätsverluste im Vergleich zu unge-

kürzten Modulatoren auf [127]. Im Folgenden wird untersucht, ob das M₂-Modell diese unterschiedlichen Aspekte von Alkanbisammoniumverbindungen verdeutlichen kann.

7.3.1 Docking von Alkanbisammoniumverbindungen

Alle bisher betrachteten Liganden wurden manuell in die Bindungstasche eingebracht. Im Folgenden wird zur Überprüfung des Bindungsmodus von W84 und der Erstellung weiterer Rezeptor-Ligand-Komplexe ein automatisiertes Docking-Verfahren verwendet. Das Docking wird mit dem Programm GOLD durchgeführt. Zunächst werden die Strukturen von W84 und Naphmethonium, sowie die verkürzten W84-Derivate SH30 und SH75 und die verkürzten Naphmethonium-Derivate EHW477 und MM7A (Seminaph) im Programm Sybyl erstellt. Die Strukturformeln sind in Abbildung 7.10 dargestellt. Nach einem *simu-*

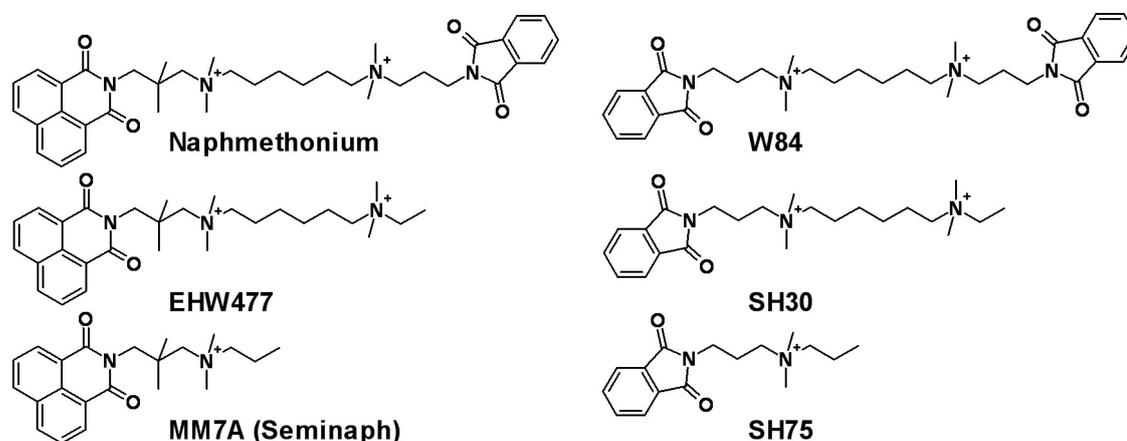


Abbildung 7.10: Strukturformeln von Alkanbisammoniumverbindungen und verkürzten Derivaten.

lated annealing erfolgt jeweils eine Minimierung einer energetisch günstigen Struktur, die die Startstruktur für das Docking darstellt. Die allosterische Bindungstasche wird in einem Radius von 20Å um ein zentral lokalisiertes Atom der Bindungstasche definiert (M₂E175/4.77, Atom CB). Innerhalb dieses Radius identifiziert GOLD selbständig die Bindungstasche. Für die Untersuchung werden für W84 und Naphmethonium 25 und für die verkürzten Derivate jeweils 50 verschiedene Komplex-Geometrien erzeugt, die anschließend mit der Scoring-Funktion *ChemScore* bewertet werden. Die zehn am höchsten bewerteten Komplexe jedes Modulators werden mit den GRID-Feldern der allosterischen Bindungstasche des M₂-Rezeptors verglichen. Eine Auswahl wird nach möglichst hoher Bewertung durch die Scoring-Funktion und gleichzeitig guter Übereinstimmung mit den GRID-Feldern des M₂-Rezeptormodells getroffen. Als Gegenprüfung erfolgt ein Vergleich mit den Bindungsmodi von den drei am schlechtesten bewerteten Komplexgeometrien jedes Modulators. Diese unterscheiden sich z.T. stark vom jeweils postulierten Bindungsmodus, der immer deutlich höher bewertet wird. Das Ergebnis ist in Tabelle 7.2 aufgeführt.

Modulator	n	Bewertungsbereich (Max-Min)	ausgewählte Geometrie	
			Bewertungszahl	Rang
Naphmethonium	25	+36,94 - (-2,23)	35,00	2
EHW477	50	+37,03 - (-4,26)	34,39	2
MM7A	50	+29,84 - (-3,18)	29,84	1
W84	25	+36,39 - (+11,39)	35,17	2
SH30	50	+34,85 - (+7,65)	34,85	1
SH75	50	+25,21 - (+3,52)	23,32	2

Tabelle 7.2: Docking-Ergebnis der Alkanbisammoniumverbindungen mit GOLD. n, Anzahl der mit GOLD erstellten Komplexgeometrien; Max-Min, Wertebereich der ChemScore Bewertungszahlen; Bewertungszahl, Wert der ausgewählte Komplexgeometrie; Rang, Bewertungsrang der ausgewählten Komplexgeometrie.

Aus dem Docking lassen sich mehrere Tendenzen ableiten. Zum einen werden die jeweils am höchsten bewerteten Strukturen der Naphmethonium-Reihe (Tab. 7.2, Spalte 3, Max-Wert) immer etwas höher bewertet als die gleichen Derivate der W84-Reihe. Zum anderen werden die absoluten Unterschiede zwischen der Naphmethonium-Reihe und der W84-Reihe tendenziell größer, je stärker die Verkürzung des Derivates ist.

Das Paar MM7A/SH75 zeigt maximale Werte von +29,84 bzw. +25,21. Die Differenz beträgt 4,63 Bewertungspunkte. Der Unterschied der maximal erreichten Bewertungszahl ist zwischen Naphmethonium und W84 mit 0,55 Bewertungspunkten am geringsten.

Ein dritter auffälliger Punkt ist, dass die beiden Modulatoren mit nur einer positiven Ladung (MM7A und SH75) deutlich niedriger bewertet werden als die anderen vier Modulatoren. Der Unterschied der maximal erreichten Bewertungszahlen beträgt für das Paar EHW477/MM7A 7,19 Bewertungspunkte und für das Paar SH30/SH75 sogar 9,64 Bewertungspunkte.

In Spalte vier und fünf der Tabelle sind die Werte der Komplexgeometrien aufgeführt, die für eine Überlagerung der Strukturen ausgewählt werden. Entweder wird die Struktur mit der höchsten oder häufiger mit der zweithöchsten Bewertung ausgewählt. Eine Überlagerung der entsprechenden Wechselwirkungskomplexe ist in Abbildung 7.11 dargestellt. Alle Modulatoren sind auf gleiche Weise im Rezeptor gebunden. Jeweils ein aromatischer Ring ist im proximalen Bereich der Bindungstasche lokalisiert. Naphmethonium und -Derivate zeigen hier eine einheitliche Platzierung, während W84 und -Derivate geringe Unterschiede aufweisen. Die Positionen der Ammoniumgruppen weichen geringfügig voneinander ab. Die beiden distalen Phthalimid-Ringe von W84 und Naphmethonium zeigen die gleiche räumliche Anordnung.

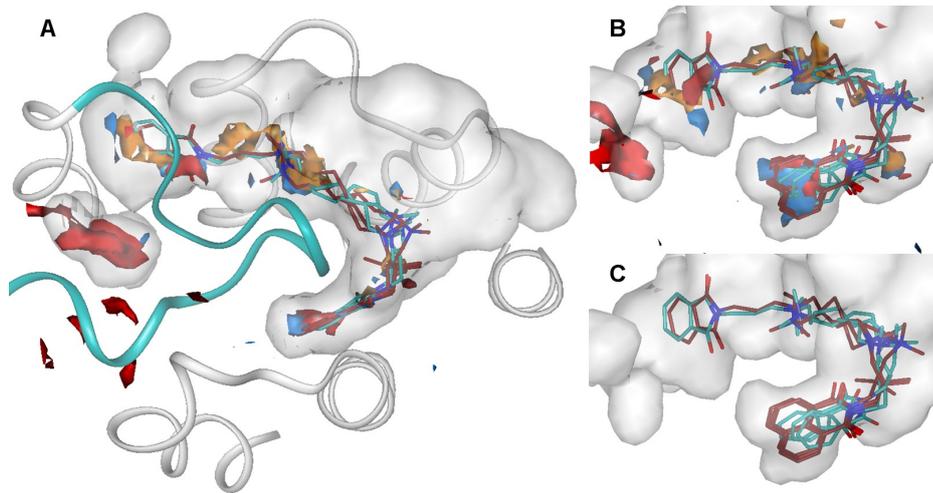


Abbildung 7.11: Docking-Ergebnis der Alkanbisammoniumverbindungen am M_2 -Rezeptor. Ausgewählte Geometrien nach Tabelle 7.2; A, Lokalisation im Rezeptor, Ansicht von oben; B und C, Seitenansicht mit und ohne GRID-Felder; W84 und -Derivate: türkis; Naphmethonium und -Derivate: dunkelrot; GRID-Felder: orange, NM3, -8,9kcal; rot, O, -5kcal; blau, C1=, -3,8kcal.

7.3.2 Untersuchungen zum Bindungsmodus von Naphmethonium

Im Anschluss an die Docking-Untersuchungen der Alkanbisammoniumderivate, wird zunächst der Bindungsmodus von Naphmethonium näher untersucht. Naphmethonium ist im Gegensatz zu W84 ein potenter allosterischer Verstärker der [^3H]NMS-Bindung am M_2 wt. Außerdem ist seine Affinität gegenüber W84 erhöht [75, 127, 131, 132].

Gründe hierfür müssen die beiden Strukturvariationen im Vergleich zu W84 sein. Zum einen wird bei Naphmethonium ein Austausch eines endständigen Phthalimid-Ringes gegen ein größeres Naphthalimid-System vorgenommen. Zum anderen erfolgt auf der gleichen Seite des Naphthalimidsystems eine Dimethylierung des mittleren Kohlenstoffes, eines Propyl-Linkers (engl., Verbrücker; chemischer Abstandhalter). Dieser verbindet das aromatische Ringsystem mit dem quartären Stickstoff. Experimentelle Untersuchungen zeigen, dass das größere aromatische Ringsystem hauptsächlich affinitätssteigernd sowohl an M_2 als auch an M_5 wirkt. Die Dimethylierung der Seitenkette vermittelt eine verstärkte M_2 -Präferenz gegenüber dem M_5 -Rezeptor [127, 133, 134]. Naphmethonium ist im Gegensatz zu W84 nicht mehr symmetrisch.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der MDS mit Naphmethonium vorgestellt. Anschließend erfolgt ein Vergleich mit W84 um möglicherweise neue Einblicke in das unterschiedliche Verhalten dieser beiden Modulatoren zu erhalten.

MDS von Naphmethonium am freien M_2 -Rezeptor

In Abbildung 7.12A ist der Verlauf der RMSD-Werte des M_2 -Naphmethonium-Komplexes dargestellt. Die RMSD-Werte für M_2 *gesamt* und M_2 *Helices und Loops* fluktuieren relativ stark. In einem Bereich zwischen 4,8ns und 5,8ns zeigen die beiden Kurven mittlere Werte von 0,28nm bzw. 0,25nm. Die transmembranären helikalen Bereiche weisen mittlere

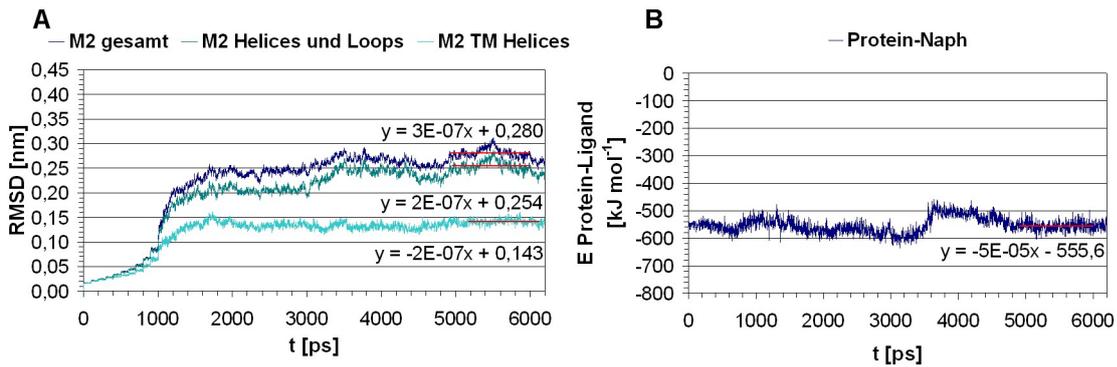


Abbildung 7.12: MDS des M_2 -Naphmethonium-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

Werte von 0,14nm auf. In Abbildung 7.12B ist der Verlauf der intermolekularen Wechselwirkungsenergie von Naphmethonium mit dem M_2 -Rezeptor dargestellt. Die Kurve zeigt zwischenzeitlich eine größere Schwankung, erreicht aber nach etwa 5ns ein stabiles Niveau. Die mittlere Wechselwirkungsenergie beträgt $-555,6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

MDS von Naphmethonium am NMS-besetzten Rezeptor

Der Verlauf der RMSD-Werte für den ternären Komplex mit Naphmethonium ist in Abbildung 7.13A dargestellt. Das Proteinerückgrat (*M2 gesamt*) zeigt ab etwa 4ns einen stabilen Verlauf und mittlere Werte von 0,32nm. Die Bereiche ohne Termini (*M2 Helices und*

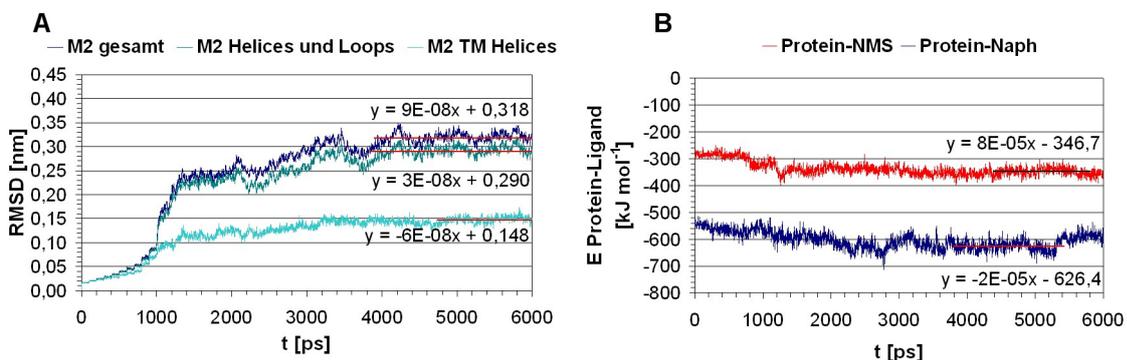


Abbildung 7.13: MDS des M_2 -NMS-Naphmethonium-Rezeptorkomplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

Loops) zeigen eine Abweichung von der Ausgangsstruktur von 0,29nm. Die transmembranären helikalen Bereiche zeigen mit mittleren Werten von 0,15nm eine etwas größere Abweichung als die MDS des M_2 -NMS-W84-Komplexes (0,14nm, vgl. Abb. 4.25, S. 75). Der Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie ist in Abbildung 7.13B dargestellt. Nach Aufhebung der Rückhaltekräfte ergibt sich für Naphmethonium zunächst ein Energiegewinn. Zwischen 3,8ns und 5,4ns zeigt die Energie mittlere Werte von $-624,4\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Danach verliert Naphmethonium an Wechselwirkungsenergie. In einem Bereich ab 5,8ns erzeugt der Protein-Naphmethonium-Komplex nur noch eine Wechselwirkungsenergie von $-582,8\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Ausgleichsgerade nicht dargestellt). Der Energie-Verlauf der Protein-NMS-Wechselwirkung ist relativ stabil und weist mittlere Werte von $-346,7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ auf.

Wie bei bisherigen MDS weist die Rückgrat-Geometrie der repräsentativen und minimierten Struktur keine Aminosäuren mit unerlaubten Rückgratgeometrien in der Nähe der orthosterischen oder allosterischen Liganden auf.

7.3.3 Vergleich von Naphmethonium und W84

Naphmethonium ist ein allosterischer Verstärker. Es zeigt mit [^3H]NMS am M_2 -Rezeptor eine positive Kooperativität. Das bedeutet, dass die Affinität beider Liganden im ternären Komplex höher ist als in den Einzelkomplexen. Die Dissoziation von [^3H]NMS im ternären Komplex wird stärker gehemmt als die Assoziation zum freien Rezeptor ($\text{pEC}_{0,5\text{diss}} = 9,04$, bzw. $\text{pK}_A = 8,19$) [127]. W84 zeigt ein genau entgegengesetztes Verhalten. Es weist mit [^3H]NMS negative Kooperativität und eine höhere Affinität zum freien M_2 -Rezeptor auf ($\text{pEC}_{0,5\text{diss}} = 7,40$, bzw. $\text{pK}_A = 7,82$) [127]. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen experimentellen Untersuchungen überein [130, 135].

Tabelle 7.3 vergleicht die Energiewerte der MDS mit NMS, W84 und Naphmethonium. Die Wechselwirkungsenergie für NMS mit dem Rezeptorprotein beträgt im ternären Komplex mit W84 im Mittel $-311,3\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und ist im Vergleich zum NMS-besetzten Rezeptor (M_2 -NMS, $-323,0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) um $11,7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ abgeschwächt. W84 selbst zeigt mit dem M_2 -Rezeptor im ternären Komplex ebenfalls eine geringere Wechselwirkungsstärke als im M_2 -W84-Komplex. Die Wechselwirkungsenergie ist im ternären Komplex mit $-513,2\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ um $36,2\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ geringer (M_2 -W84, $-549,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Verglichen mit M_2 -NMS, hat NMS im ternären Komplex mit Naphmethonium bessere Wechselwirkungsmöglichkeiten ($-346,7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Der Energiegewinn beträgt $23,7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Für Naphmethonium ist die Wechselwirkungsenergie am freien Rezeptor mit durchschnittlich $-555,6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ deutlich niedriger als im ternären Komplex ($-626,4\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Der Energiegewinn für Naphmethonium im ternären Komplex beträgt $70,8\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die hier erhaltenen Energiewerte der Protein-Ligandkomplexe stehen tendenziell mit den experimentell erhaltenen Daten in Einklang.

Interessanterweise unterscheiden sich die Wechselwirkungsenergien von W84 und Naphmethonium in den jeweiligen Einzelkomplexen kaum. Naphmethonium zeigt hier nur

MDS	$E_{Prot-NMS}$ [kJ·mol ⁻¹]	$ \Delta E_{M2TK-M2NMS} $ [kJ·mol ⁻¹]	$E_{Prot-Mod.}$ [kJ·mol ⁻¹]	$ \Delta E_{M2TK-M2Mod.} $ [kJ·mol ⁻¹]
M ₂ -NMS	-323,0	-	-	-
M ₂ -W84	-	-	-549,5	-
M ₂ -NMS-W84	-311,3	11,7 ↓	-513,2	36,3 ↓
M ₂ -Naphmethonium	-	-	-555,6	-
M ₂ -NMS-Naphm.	-346,7	23,7 ↑	-626,4	70,8 ↑

Tabelle 7.3: Vergleich der Energiewerte der MDS mit NMS, W84 und Naphmethonium am M₂-Rezeptor. E , Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie (WWE); $E_{Prot-NMS}$, WWE zwischen NMS und dem M₂-Rezeptorprotein; $|\Delta E_{M2TK-M2NMS}|$, Differenz der WWE von NMS im ternären Komplex und dem M₂-NMS-Komplex im Betrag; $E_{Prot-Mod.}$, WWE zwischen dem allosterischen Modulator (Naphmethonium/W84) und dem M₂-Rezeptorprotein; $|\Delta E_{M2TK-M2Mod.}|$, Differenz der WWE des Modulators im ternären Komplex und dem M₂-Modulator-Komplex im Betrag; ↓, Energieverlust im Vergleich zum freien Rezeptor; ↑, Energiegewinn im Vergleich zum freien Rezeptor.

eine um 6,1kJ·mol⁻¹ günstigere Wechselwirkungsenergie als W84. Dies steht auch im Einklang mit experimentellen Daten, die für W84 und Naphmethonium nur geringe Affinitätsunterschiede am freien M₂-Rezeptor zeigen. Naphmethonium bindet hier nur um 0,4 Log-Einheiten stärker als W84.

7.3.4 Vergleich verschiedener ternärer Naphmethonium-Komplexe

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Mohr (Pharmazeutisches Institut, Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) werden nähere Untersuchungen zu Naphmethonium und seinem Einfluss auf die Bindung und Aktivierung von Agonisten durchgeführt. Von Jäger wird festgestellt, dass Naphmethonium eine negative Kooperativität der Bindung auf Acetylcholin und der Aktivierung auf Pilocarpin ausübt [135]. Weiterhin kann gezeigt werden, dass die Kooperativitäten von Naphmethonium zwischen Pilocarpin und NMS korrelieren. Acetylcholin weist ein anderes Verhalten auf. Es wird daher postuliert, dass sich die allosterische Bindungstasche im inaktiven Zustand bei Bindung eines inversen Agonisten nur wenig von der eines Partialagonisten unterscheidet, während sie bei Anwesenheit eines Vollagonisten eine andere Geometrie haben muss [135]. Diese experimentellen Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Erkenntnissen zu der Geometrie von Loop-Bereichen bei verschiedenen Aktivierungszuständen von GPCRs [136].

In Abschnitt 7.2.3 wird ein unterschiedliches Verhalten des M₂-Rezeptors bei Bindung eines Agonisten, Partialagonisten bzw. inversen Agonisten beschrieben. Im Weiteren wird untersucht, ob das M₂-Modell auch den Einfluss von Naphmethonium auf das Verhalten von Agonisten wiedergeben kann. Daher wird der ternäre *M₂-Pilocarpin-Naphmethonium*-Komplex untersucht.

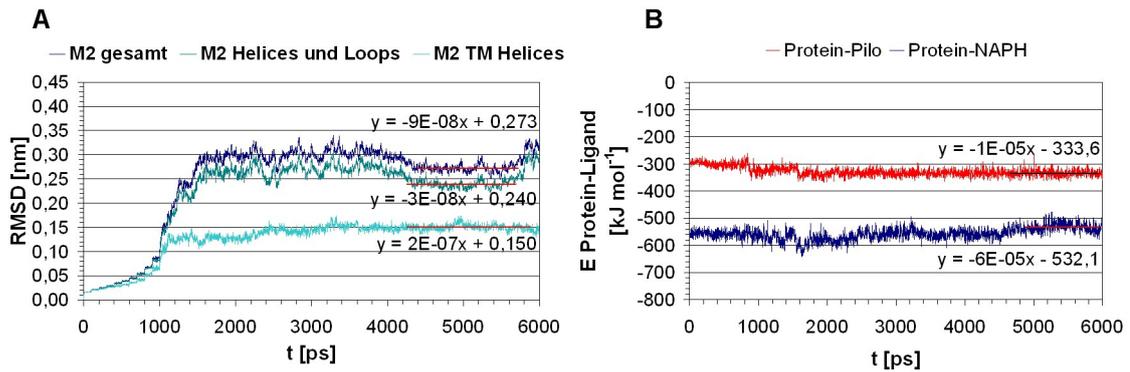


Abbildung 7.14: MDS des M_2 -Pilocarpin-Naphmethonium-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

In Abbildung 7.14A ist der Verlauf der RMSD-Werte des M_2 -Pilocarpin-Naphmethonium-Komplexes dargestellt. Die RMSD-Werte der Bereiche *M2 gesamt* und *M2 Helices und Loops* nehmen zu Beginn deutlich zu, fallen aber nach etwa 3,8ns auf ein mittleres Niveau von 0,27nm bzw. 0,24nm ab. Im Vergleich hierzu zeigt der M_2 -Pilocarpin-Komplex deutlich höhere Werte (0,38nm und 0,30nm, vgl. Abb. 7.8, S. 112). Nach etwa 5,5ns steigen die Kurven noch einmal an, bleiben aber unterhalb der Werte von M_2 -Pilocarpin. Bei den transmembranären helikalen Bereichen steigt der RMSD-Wert bis etwa 3,3ns auf maximale Werte an. Zwischen 4,2ns und 5,8ns zeigt der Verlauf einen mittleren Wert von 0,15nm. Nach etwa 5,7ns kommt es zu einer leichten Abnahme der RMSD-Werte. Pilocarpin zeigt im Einzelkomplex eine geringere Veränderung der *M2 TM Helices* (0,131nm). Ein ähnliches Ergebnis ergibt sich auch beim Vergleich der Komplexe M_2 -NMS und M_2 -NMS-Naphmethonium. Hier verändern sich die transmembranären Bereiche im Einzelkomplex ebenfalls weniger stark, als im ternären Komplex (0,125nm vs. 0,148nm, vgl. Abb. 4.17, S. 66 und Abb. 7.13, S. 118).

Der Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien von Pilocarpin und Naphmethonium mit dem M_2 -Rezeptor ist in Abbildung 7.14B dargestellt. Die Kurve für Pilocarpin zeigt einen stabilen Verlauf und mittlere Energie-Werte von $-333,6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Verglichen mit dem M_2 -Pilocarpin-Komplex zeigt sich hier ein leichter Energiegewinn. Der Energieunterschied beträgt allerdings nur $2,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Naphmethonium zeigt im ausgewerteten Bereich des ternären Komplexes mit Pilocarpin selbst niedrigere Wechselwirkungsenergien ($-532,1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), als im Einzelkomplex (vgl. Abb. 7.12, S. 118). Der Energieverlust beträgt $23,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Zur Beurteilung des Einflusses auf die Flexibilität werden die RMSF-Werte der Dynamiken mit Naphmethonium und NMS bzw. Pilocarpin zwischen 4ns und 5ns berechnet (vgl. Abschnitt 7.2.3). Der Anteil der Aminosäuren, der höhere RMSF-Werte als 0,18nm zeigt,

wird prozentual ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Aminosäuren gesetzt. Abbildung 7.15 zeigt die neu ermittelten und zum Vergleich die bereits in Abschnitt 7.2.3 abgebildeten Werte. Naphmethonium zeigt am Einzelkomplex eine etwas bessere Stabilisierung, als

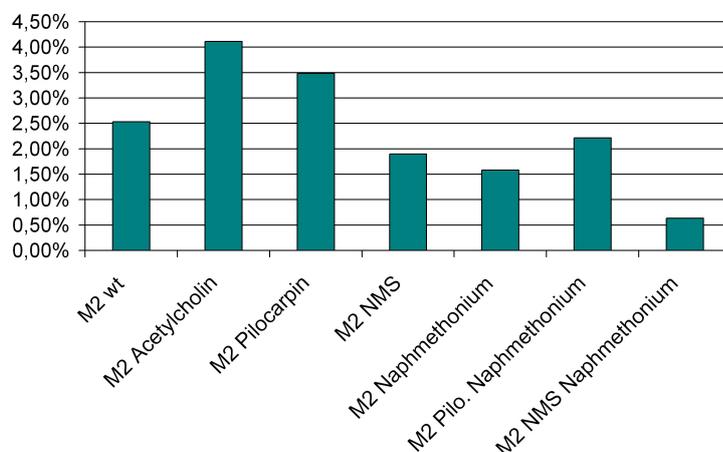


Abbildung 7.15: Vergleich der Protein-Rückgrat-Fluktuationen von MDS mit dem M_2 -Rezeptor; Prozentualer Anteil der Aminosäuren mit RMSF-Werten des Proteinrückgrats $>0,18\text{nm}$.

NMS. Im ternären M_2 -NMS-Naphmethonium-Komplex wird die Zahl der stark fluktuierenden Aminosäuren weiter reduziert. Im ternären M_2 -Pilocarpin-Naphmethonium-Komplex zeigen sich stärkere Fluktuationen als bei MDS mit NMS oder Naphmethonium. Allerdings ist die Fluktuation gegenüber dem Einzelkomplex mit Pilocarpin und auch dem unbesetzten Rezeptormodell ($M_2\text{wt}$) niedriger. Naphmethonium wirkt demnach nicht nur stabilisierend auf den unbesetzten oder den invers-agonistisch-besetzten Rezeptor, sondern auch auf den partialagonistisch besetzten Rezeptor.

7.3.5 MDS von verkürzten Naphmethonium-Derivaten am M_2 -Rezeptor

Nach Betrachtung der beiden langkettigen Modulatoren W84 und Naphmethonium werden im Folgenden die Ergebnisse der MDS von gekürzten Naphmethoniumderivaten vorgestellt.

MDS mit EHW477 am freien und NMS-besetzten M_2 -Rezeptor

In Abbildung 7.16A ist der Verlauf der RMSD-Werte des M_2 -EHW477-Komplexes dargestellt. Die Werte von M_2 *gesamt* und M_2 *Helices und Loops* steigen über den gesamten Verlauf der MDS an. In einem Bereich zwischen 4,8ns und 5,8ns sind diese Bereiche relativ stabil und zeigen mittlere Werte von 0,37nm und 0,33nm. Die transmembranären helikalen Bereiche weisen mittlere Werte von 0,16nm auf.

In Abbildung 7.16B ist der Verlauf der M_2 -EHW477-Wechselwirkungsenergie dargestellt. Nach einem anfänglichen Energiezuwachs erreicht sie zwischen 4,3ns und 5,9ns ein mittleres Energieniveau von $-478,1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

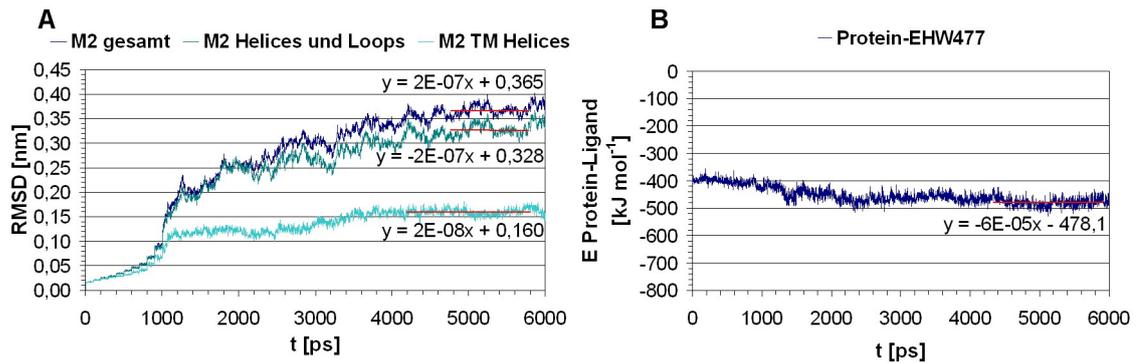


Abbildung 7.16: MDS des M_2 -EHW477-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

Die RMSD-Werte und die Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien für den ternären M_2 -NMS-EHW477-Komplex sind in Abbildung 7.17A und B dargestellt. Das Proteinrückgrat

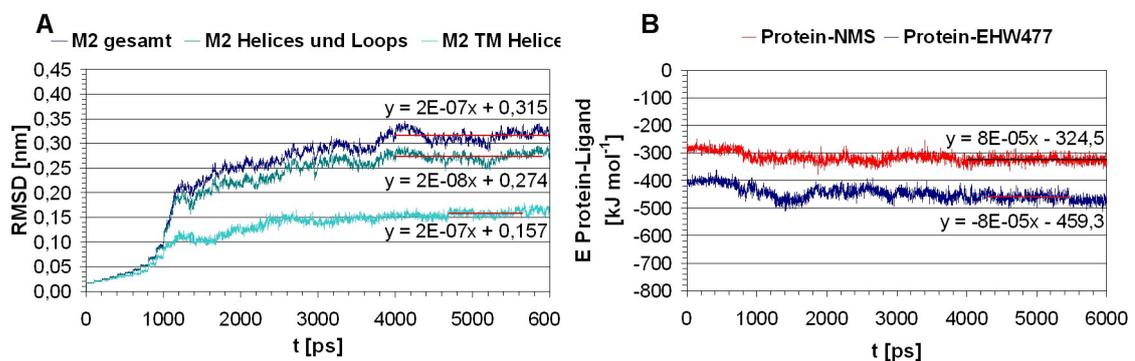


Abbildung 7.17: MDS des M_2 -NMS-EHW477-Rezeptorkomplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

mit und ohne Termini weist im ternären Komplex mittlere Werte von 0,32nm und 0,27nm auf. Die Abweichungen von der Ausgangsstruktur sind im Vergleich mit M_2 -EHW477 jeweils um etwa 0,05nm niedriger (vgl. Abb. 7.16). Die transmembranären helikalen Bereiche dagegen werden bei beiden Dynamiken gleichermaßen stabilisiert und zeigen Werte von 0,16nm. Die Stabilisierung der transmembranären Helices fällt im Vergleich zum ternären Komplex mit Naphmethonium etwas geringer aus (0,15nm, vgl. Abb. 7.13, S. 118). Die Wechselwirkungsenergie für EHW477 mit dem Rezeptorprotein beträgt zwischen

4,2ns und 5,4ns im Mittel $-459,3\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Nach etwa 5,5ns nimmt die Energie noch einmal zu und erreicht mittlere Werte von $-469,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Ausgleichsgerade nicht dargestellt). Die Wechselwirkung von EHW477 am M_2 -Rezeptor ist im M_2 -NMS-EHW477-Komplex mit $-459,3\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ um $-18,8\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ schwächer als am freien M_2 Rezeptor. Die Wechselwirkungsenergie für NMS beträgt hier $-324,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Der Energiegewinn von durchschnittlich $1,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ im Vergleich zum M_2 -NMS-Komplex (vgl. Abb. 4.17, S. 66) ist sehr gering.

Repräsentative und minimierte Strukturen aus dem equilibrierten Bereich werden auf ihre stereochemische Qualität geprüft. Sie sind vergleichbar mit anderen Dynamiken.

MDS mit MM7A am freien und NMS-besetzten M_2 -Rezeptor

In Abbildung 7.18A ist der Verlauf der RMSD-Werte des M_2 -MM7A-Komplexes dargestellt. Die Abweichungen des Protein-Rückgrats von der Ausgangsstruktur betragen für

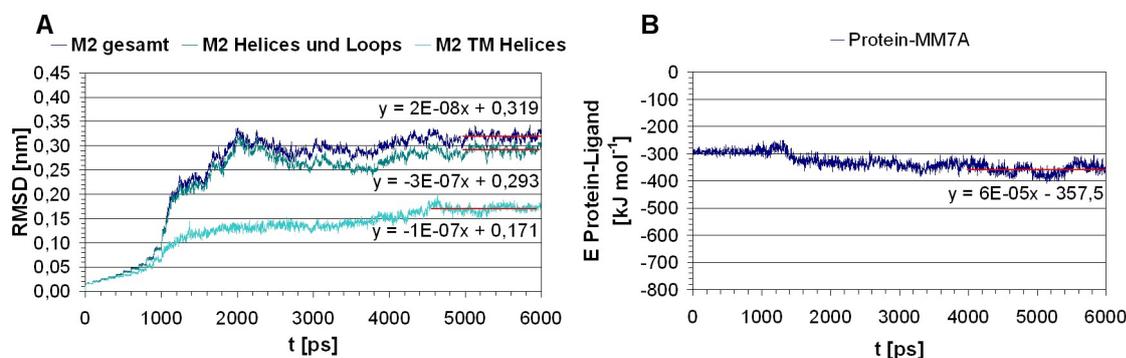


Abbildung 7.18: MDS des M_2 -MM7A-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M_2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M_2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M_2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

das gesamte Protein und die M_2 Helices und Loops 0,32nm bzw. 0,29nm. Die transmembranären Bereiche zeigen im M_2 -MM7A-Komplex mit Werten von 0,17nm die größten Abweichungen im Vergleich zu den anderen beiden Modulatoren (M_2 -EHW477, 0,16nm, M_2 -Naphmethonium, 0,15nm). Bei den RMSD-Werten der transmembranären Bereiche lässt sich eine Tendenz erkennen. Je größer der allosterische Modulator, desto geringer die RMSD-Werte der M_2 TM Helices. Die Wechselwirkungsenergie für MM7A zeigt während der MDS relativ große Schwankungen. Ab 4ns weist sie mittlere Werte von $-357,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ auf.

Bei der Simulation des ternären Komplexes mit MM7A (M_2 -NMS-MM7A) zeigen sich Unterschiede im Vergleich zu den Dynamiken mit Naphmethonium und EHW477. Abbildung 7.19A betrachtet die Veränderung der RMSD-Werte. Der Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie ist in Abbildung 7.19B dargestellt. Die M_2

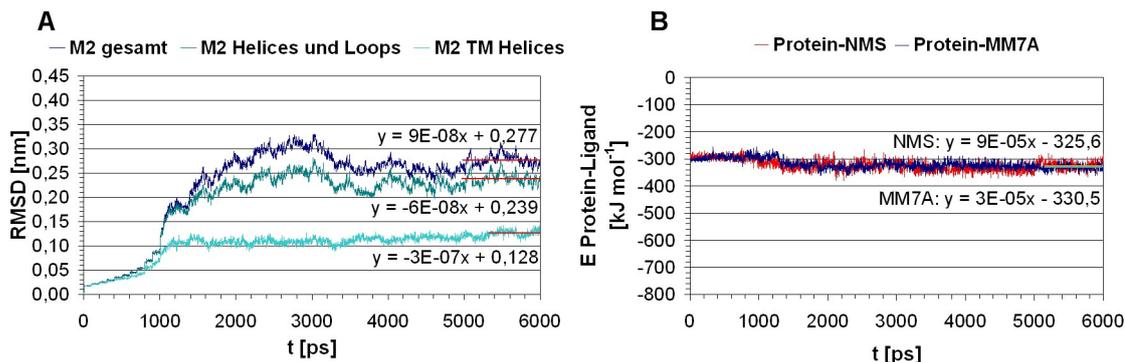


Abbildung 7.19: MDS des M_2 -NMS-MM7A-Rezeptorkomplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

TM Helices zeigen hier sehr niedrige Werte von 0,13nm. Dies entspricht einer gleich starken Stabilisierung, wie im M_2 -NMS-Komplex (vgl. Abb. 4.17, S. 66). In den anderen Bereichen weist M_2 -NMS-MM7A sogar niedrigere Werte auf als M_2 -NMS. Das vollständige Protein-Rückgrat zeigt Veränderungen von 0,28nm (M_2 -NMS, 0,31nm), die Bereiche ohne Termini 0,25nm (M_2 -NMS, 0,28nm).

Der Energieverlauf ist während der gesamten Dynamiksimulation stabil, und beide Liganden erzeugen annähernd gleiche Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien. NMS zeigt im ternären MM7A-Komplex eine mittlere Wechselwirkungsenergie von $-325,6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Im Vergleich zu M_2 -NMS ($-323,0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, vgl. Abb. 4.17, S. 66) ergibt sich ein leichter Energiegewinn von $2,6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. MM7A zeigt eine mittlere Wechselwirkungsenergie von $-330,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Da MM7A am freien Rezeptor eine mittlere Wechselwirkungsenergie mit dem Rezeptorprotein von $-357,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ erzeugt, ist sie für MM7A im ternären Komplex im Vergleich um $27\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ abgeschwächt.

Repräsentative und minimierte Strukturen aus dem equilibrierten Bereich werden mit PROCHECK auf ihre stereochemische Qualität überprüft. Keine der Aminosäuren mit unerlaubten Protein-Rückgratgeometrien sind in der Nähe der allosterischen oder orthosterischen Bindungstasche lokalisiert.

7.3.6 Bedeutung von W427 im M_2 -Rezeptor für Naphmethonium/-Derivate

Prilla stellt an der Mutante M_2 W427A/7.40 leichte Affinitätsgewinne für Alkanbisammoniumderivate im ternären Komplex mit NMS fest [127]. Hierbei besteht ein größerer Einfluss auf die Affinität je stärker die Verkürzung der Derivate ist. Im Folgenden werden daher die MDS der ternären Komplexe von Naphmethonium und seinen verkürzten Derivaten zur weiteren Untersuchung dieser Beobachtung herangezogen.

Bei Untersuchung der Trajektorien fällt auf, dass MM7A relativ regelmäßig dazu in der Lage ist, eine Wasserstoff-Brückenbindung (H-Brücke) mit dem Indol-Ringsystem von $M_2W427/7.40$ auszubilden. In Abbildung 7.20 wird eine Analyse der H-Brücken über die Zeit für die ternären Komplexe der drei Naphmethonium-Derivate dargestellt.

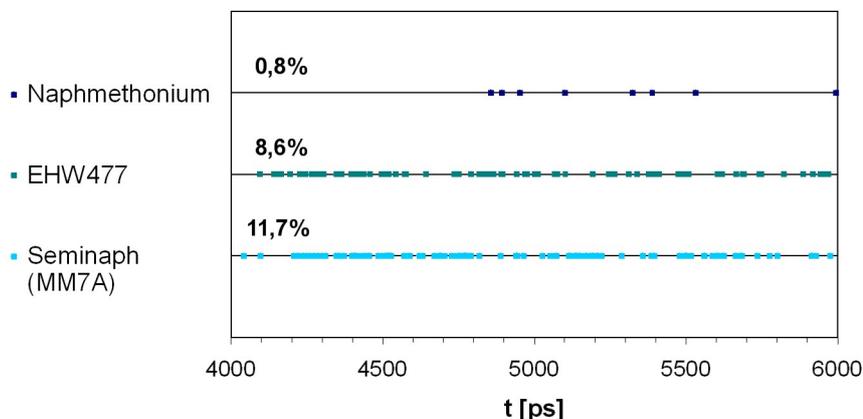


Abbildung 7.20: Wasserstoffbrücken zwischen $M_2W427/7.40$ und Naphmethonium, EHW477 und MM7A im Verlauf von Moleküldynamiksimulationen mit ternären M_2 -Rezeptorkomplexen.

Es wird der Zeitabschnitt zwischen 4ns und 6ns betrachtet, da hier alle ternären Komplexe über große Bereiche nur noch wenige Änderungen zeigen. Naphmethonium ist nur selten in der Lage eine Wasserstoff-Brückenbindung mit $M_2W427/7.40$ einzugehen. Die relative Anzahl beträgt nur 0,8%. EHW477 zeigt einen Wert von 8,6%. Die Anzahl der H-Brücken ist bei dem kürzesten Molekül (MM7A) mit 11,7% am größten. Zur weiteren Untersuchung wird jeweils die repräsentative Struktur der Dynamiken mit anderen Cluster-Strukturen der Trajektorien verglichen. Keine der Strukturen, die als repräsentativ betrachtet werden, zeigen eine Wasserstoff-Brückenbindung zu $M_2W427/7.40$. Für EHW477 und MM7A können Strukturen mit einer H-Brücke aus kleineren Gruppen der Clusteranalyse isoliert werden. Für Naphmethonium wird eine der Einzel-Strukturen aus der Trajektorie direkt ausgewählt. Die Strukturen werden minimiert. Anschließend folgt eine Überlagerung der Schweratome der aromatischen Seitenketten sowie der allosterischen Modulatoren mit der *Fit Atoms*-Routine aus Insight II 2000. Abbildung 7.21 zeigt die überlagerten Komplexgeometrien aller drei Naphmethonium-Derivate. Die repräsentativen Strukturen sind in der Abbildung in weiß dargestellt und sollen als Referenz dienen. Auffällig ist, dass die Komplexe mit Wasserstoffbrücken eine leichte Geometrieänderung des allosterischen Modulators im Protein zeigen. Bei Naphmethonium und EHW477 treten nur geringe Änderungen der Aminosäure-Seitenketten von $M_2W422/7.35$ und $M_2Y177/5.29$ und auch der Positionen des allosterischen Modulators auf. Bei Naphmethonium ist allerdings im hinteren Bereich des Moleküls eine Konformationsänderung des Phthalimid-Ringes zu erkennen. MM7A zeigt deutlichere Änderungen der Geometrie, wenn eine Wasserstoffbrücke zwischen $M_2W427/7.40$ und MM7A existiert. Hier ist eine Rechtsverschiebung des aromatischen Ringsystems von MM7A zu erkennen. Der allosterische Modulator entfernt sich leicht von den affinitätsgebenden Aminosäuren

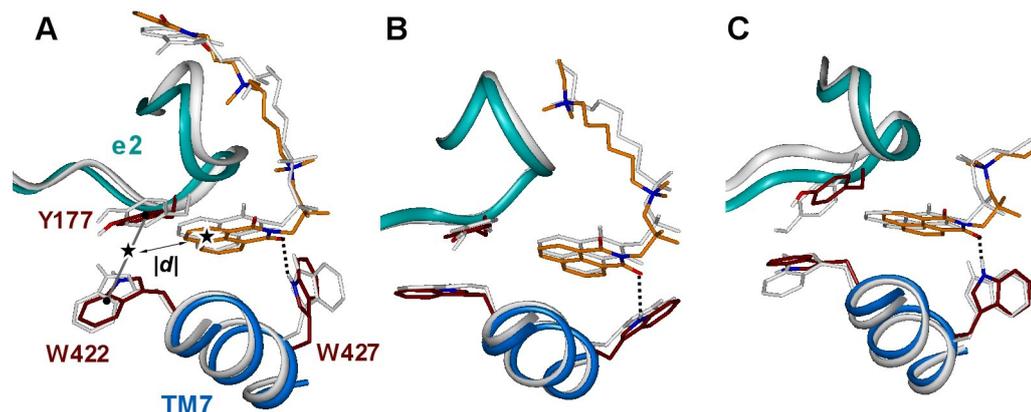


Abbildung 7.21: Einfluss von $M_2W427/7.40$ auf die Bindung von Naphmethonium und seine Derivate an ternären M_2 -NMS-Modulator-Komplexen. Überlagerung der repräsentativen Strukturen aus MDS (weiß) mit Komplex-Geometrien, die eine H-Brücke zu $M_2W427/7.40$ ausbilden. A, M_2 -NMS-Naphmethonium-Komplex. *, Pseudoatome der Masseschwerpunkte (vgl. Text); $|d|$, Abstand der Masseschwerpunkte; B, M_2 -NMS-EHW477-Komplex; C, M_2 -NMS-MM7A-Komplex

$M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$.

Um die Veränderungen in den Komplexen verstehen und quantitativ erfassen zu können, werden weitere Auswertungen vorgenommen. Da nicht nur der allosterische Modulator seine Positionierung ändert, sondern sich die aromatischen Seitenketten von $M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$ ebenfalls bewegen, werden die relativen Abstände der Modulator-Geometrien mit und ohne H-Brücke zu den aromatischen Aminosäuren überprüft. Hierzu werden Abstände in allen Modellen gemessen. Zunächst werden jeweils zwei Pseudoatome definiert, die in Abbildung 7.21 durch zwei Sterne repräsentiert werden. Das eine Pseudoatom repräsentiert den Masseschwerpunkt der Aminosäureseitenketten von $M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$ und liegt etwa mittig zwischen den aromatischen Seitenketten in der Bindungstasche. Das andere Pseudoatom repräsentiert den Masseschwerpunkt des aromatischen Teils des jeweiligen Naphthalimid-Systems. Die gemessenen Abstände zwischen diesen beiden Punkten werden in Tabelle 7.4 dargestellt. Zusätzlich werden die bei der Minimierung erhaltenen Energiewerte der einzelnen Protein-Ligand-Komplexe sowie die Energieunterschiede angegeben. Alle Modulatoren zeigen im Vergleich zu den Komplexen ohne H-Brücke (Hb^-) bei den Komplexen mit H-Brücke (Hb^+) eine leichte Distanzvergrößerung zu den aromatischen Aminosäuren in e2 und TM7 (Spalte 4, Tab. 7.4). Naphmethonium zeigt mit ca. $0,2\text{\AA}$ die geringsten Änderungen in diesem Bereich. EHW477 weist eine Distanzvergrößerung von etwa $0,3\text{\AA}$ auf. MM7A zeigt mit $0,5\text{\AA}$ die größte Verschiebung des aromatischen Ringes. Interessanterweise hat EHW477 insgesamt die größte Distanz zu $M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$.

Alle Modulatoren zeigen ungünstigere Wechselwirkungsenergien mit dem Protein, wenn eine Wasserstoffbrücke zu $M_2W427/7.40$ existiert. Bei Naphmethonium zeigt sich ein sehr starker Energieverlust von $41,6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Dies ist nicht alleine durch die geringe Ver-

Modulator	d(PSA) Hb- [Å]	d(PSA) Hb+ [Å]	$\Delta(\text{Hb+} - \text{Hb-})$ [Å]	$E_{P-Lig}(\text{Hb-})$ [kJ·mol ⁻¹]	$E_{P-Lig}(\text{Hb+})$ [kJ·mol ⁻¹]	ΔE_{P-Lig} [kJ·mol ⁻¹]
Naphmeth.	5,75	5,91	+0,16	-711,0	-669,4	-41,6 ↓
EHW477	7,24	7,52	+0,28	-486,4	-483,6	-2,8 ↓
MM7A	6,03	6,52	+0,49	-357,2	-344,3	-12,9 ↓

Tabelle 7.4: Einfluss der Existenz einer H-Brücke zu M₂W427/7.40 auf die Bindung von verkürzten Alkanbisammonium-Derivaten. d(PSA), Abstand der Pseudoatome zwischen aromatischen Seitenketten und allosterischem Modulator (vgl. Text); Hb-, Komplexgeometrie ohne H-Brücke; Hb+, Komplexgeometrie mit H-Brücke; $\Delta(\text{Hb+} - \text{Hb-})$, Differenz der Pseudoatom-Abstände der Komplexe mit und ohne H-Brücke; E_{P-Lig} , Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie der minimierten Komplex-Geometrien; ΔE_{P-Lig} , Differenz der Energiewerte der Komplex-Geometrien mit und ohne H-Brücke.

änderung der Komplex-Geometrie im proximalen Bereich der allosterischen Bindungsstelle erklärbar. EHW477 zeigt ein ganz anderes Verhalten. Hier ist der Energieverlust mit 2,8kJ·mol⁻¹ nur sehr gering. MM7A wiederum weist einen deutlichen Energieverlust von 12,9kJ·mol⁻¹ bei Erhöhung des Abstandes zu M₂Y177/5.29 und M₂W422/7.35 auf.

7.4 Bindungsmodus eines strukturell diversen allosterischen Modulators

Der Hauptteil dieser Arbeit liegt in der Betrachtung der Bindungsmodi und des Verhaltens von Alkanbisammonium-Verbindungen am muskarinischen M₂-Rezeptor. Um zu überprüfen, ob das Modell auch den Bindungsmodus eines strukturell diversen allosterischen Modulators wiedergeben kann, wird eine Untersuchung des M₂-Modells zur Bindung von Gallamin durchgeführt.

Für Gallamin wurde bereits sehr früh ein allosterischer Mechanismus beschrieben [74]. Es zeigt wie andere Modulatoren, wie z.B. W84, eine Präferenz für den M₂-Rezeptor. Die Subtypselektivität ist für beide Modulatoren zwischen M₂ und M₅ maximal [68, 70, 123, 137]. Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits für die beiden Modulatoren Rezeptorepitope bekannt, die jeweils für die Bindung und Subtyppräferenz der Modulatoren von Bedeutung sind. Für W84 sind dies die Aminosäuren M₂Y177/5.29 und M₂T423/7.36 [68, 123], deren Bindungseinfluss bereits in Abschnitt 7.1.2 beschrieben wird. Gallamin scheint zunächst andere Bindungs-Epitope zu nutzen, da die saure EDGE-Sequenz (M₂172EDGE175) im e2 sowie N419/7.32 im e3 des M₂-Rezeptors für die Subtypselektivität von Gallamin verantwortlich gemacht werden [70, 129]. Huang konnte später zeigen, dass W84 und Gallamin die genannten Epitope in einer gemeinsamen allosterischen Bindungsregion nutzen [119], die als „common allosteric site“ (engl., gemeinsame allosterische Bindungsregion) bezeichnet wird. Diese Region ist für die Bindung vieler allosterischer Modulatoren bekannt [138, 139].

7.4.1 Bindung von Gallamin am M₂-Rezeptor

Zunächst wird die Geometrie von Gallamin am M₂wt untersucht. Hierzu wird ein Docking mit dem Programm GOLD durchgeführt. Es wird das gleiche Vorgehen wie bei den Alkanisammoniumverbindungen gewählt (vgl. Abschnitt 7.3). Für die Untersuchung werden 50 verschiedene Komplex-Geometrien erzeugt, die anschließend mit dem *ChemScore* bewertet werden. Die unterschiedlichen Komplexe zeigen Scoring-Werte von +28,65 bis -2,94. Die Auswahl erfolgt über GRID-Felder der allosterischen Bindungstasche des M₂-Rezeptors (vgl. Abschnitt 4.21, S. 70). Der ausgewählte Komplex erhält mit einem Wert von 25,09 die dritthöchste Bewertung durch die Scoring-Funktion und ist in Abbildung 7.22 dargestellt. Die Position aus dem Docking stimmt recht gut mit den Wechsel-

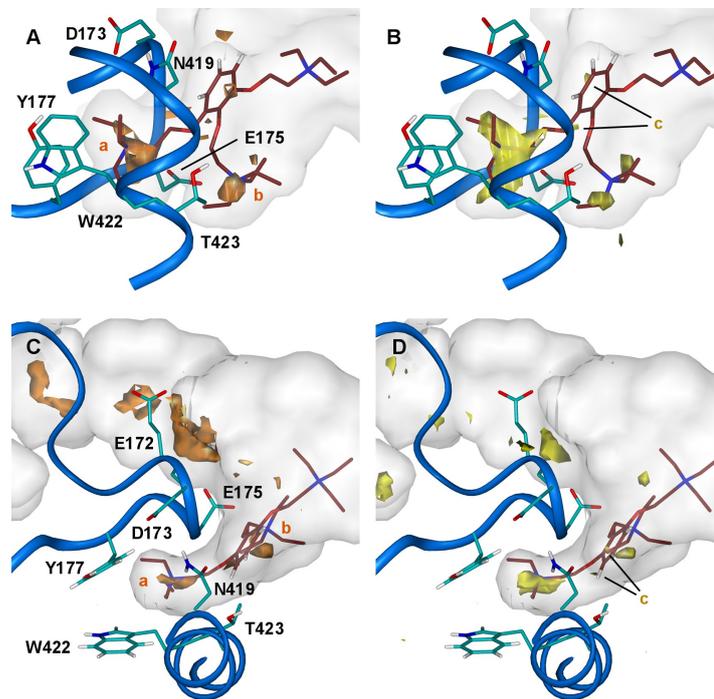


Abbildung 7.22: Bindungsmodus von Gallamin im M₂wt. Hervorgehobene Aminosäuren sind affinitätsgebend (s. Text); orange Felder (A,C): NM3-Felder mit einer Wechselwirkungsenergie von -8,9kcal, gelbe Felder (B, D): C1=Felder mit einer Wechselwirkungsenergie von -3,8kcal, A, B: membranständige Ansicht auf TM7, e2 liegt hinter TM7 C, D: Ansicht um 90° gedreht und vom Extrazellulärraum auf TM7 und e2.

wirkungsfeldern überein. Das quartäre Stickstofffeld (*NM3*-Sonde) ist auf einem Energieniveau von -8,9kcal, das aromatische Feld (*C1*=-Sonde) bei -3,8kcal abgebildet. Die wichtigste Interaktionsmöglichkeit für Gallamin ist die Wechselwirkung der positiv geladenen Seitenketten. Eine der Triethylammoniummethoxy-Seitenketten ist zwischen den aromatischen Aminosäuren M₂Y177/5.29 und M₂W422/7.35 positioniert, die sowohl für Aromaten als auch für quartäre Ammoniumverbindungen ein großes Wechselwirkungsfeld aufspannen. Dieses Feld (Abb 7.22 A, C, Feld a) wird im Folgenden als Hauptfeld bezeichnet. Die mittlere Seitenkette von Gallamin liegt in der Nähe eines anderen NM3-Feldes (Abb. 7.22 A, C, Feld b). Die dritte Ammonium-Seitenkette von Gallamin liegt in

Richtung der ersten transmembranären Helix. Für die Positionierung des Aromaten können zwei kleine aromatische Felder in Nähe des substituierten Trihydroxyphenyl-Ringes verantwortlich gemacht werden (Abb. 7.22 B, D, Felder c). Diese sind allerdings deutlich kleiner als die anderen aromatischen Felder.

7.4.2 GRID-Wechselwirkungsfelder an Mutanten des M₂-Rezeptors

Untersuchungen von Gnagey [70] und Huang [119] ergeben, dass Gallamin ein einzigartiges Bindungsverhalten unter den allosterischen Modulatoren zeigt, da es von anderen Bereichen chimärer Rezeptoren abhängt als für andere Modulatoren bekannt ist [119]. Vor allem der Position 7.32 im e3 wird für die Subtypselektivität von Gallamin einige Bedeutung beigemessen [70].

Bedeutung von N419 für die Gallamin-Bindung am M₂-Rezeptor

Gnagey stellt fest, dass die Affinität von Gallamin bei Substitution von Asn im M₂-Rezeptor durch die korrespondierenden sauren Aminosäuren des M₄- bzw. M₁-Rezeptors (M₄D432/7.32, M₁E397/7.32) leicht ansteigt, während die Substitution durch Lys aus dem M₃-Rezeptor (M₃K523/7.32) zu einer Verminderung der Gallamin-Affinität führt. Die reversen Mutationen zeigen im M₄-Rezeptor gegenüber dem M₄wt einen Affinitätsverlust (Faktor 3,5) wenn die saure Aminosäure entfernt wird (M₄D432N/7.32). Im M₃-Rezeptor kommt es gegenüber dem M₃wt zu einem deutlichen Affinitätsgewinn (Faktor 15,8) wenn die basische Aminosäure entfernt wird (M₃K523N/7.32). Dennoch haben beide Mutanten eine geringere Affinität als der M₂wt [70].

Zur Überprüfung des postulierten Bindungsmodus von Gallamin werden erneut Rezeptormutanten des M₂-Rezeptors erstellt. Die Aminosäure-Seitenkette wird mutiert und mit dem Programm SCWRL platziert. Anschließend werden GRID-Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.23 dargestellt. Bei Mutation zu Val (M₂N419V), der korrespondierenden M₅-Aminosäure (M₅V474/7.32), kommt es im Prinzip zu keiner

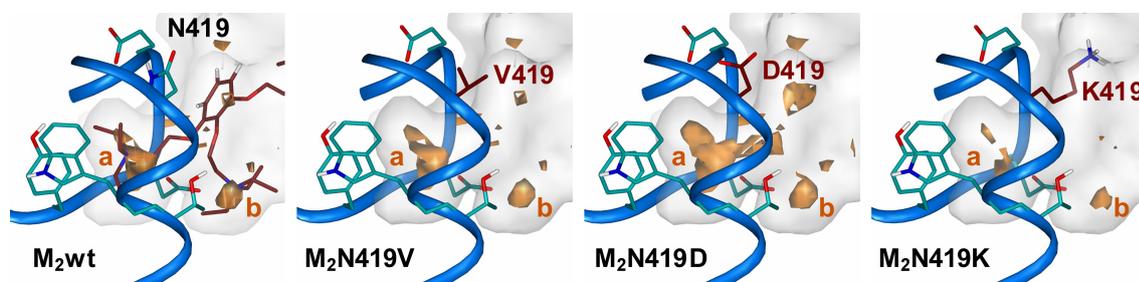


Abbildung 7.23: Veränderung der *MM3*-Felder durch Mutationen an Position M₂419/7.32. *MM3*-Felder: -8,9kcal; mutierte Aminosäureseitenketten, dunkelrot; durchsichtige weiße Oberfläche, Volumen der allosterischen Bindungstasche im M₂wt; a,b, Wechselwirkungsfelder, in denen quartäre Ammoniumkopfguppen von Gallamin positioniert sind.

Veränderung der Wechselwirkungsfelder. Gnagey geht an dieser Mutante von einer leichten Affinitätssteigerung des Gallamin am M_2 -Rezeptor um den Faktor 1,6 aus. Prilla führt hier ähnliche Untersuchungen durch [127]. Sie kann im Verhältnis zum M_2 wt keine Veränderung der Affinität durch Austausch von N419V feststellen.

Bei Mutation von Asn zu Asp (M_2N419D) zeigt sich eine deutliche Vergrößerung der beiden Wechselwirkungsfelder a und b im Vergleich zum M_2 wt. Die Wechselwirkungsmöglichkeiten für die Bindung quartärer Ammoniumgruppen werden deutlich besser. Die Mutante Glu wird ebenfalls untersucht und zeigt qualitativ keine Änderungen im Vergleich zur Asp-Mutante (nicht dargestellt). Die Lys-Mutante (M_2N419K) zeigt im Gegensatz zu den anderen Mutanten eine deutliche Verkleinerung der Wechselwirkungsfelder a und b. Auffällig ist, dass Lys einen starken Einfluss auf die Größe des Hauptfeldes ausübt, auch wenn die positive Ladung vom Hauptfeld weg zeigt. Bei Anwesenheit einer positiven Ladung werden die Wechselwirkungsmöglichkeiten für quartäre Ammoniumgruppen deutlich schlechter. Ein weiteres Merkmal ist, dass die lange Lys-Seitenkette den Raum der allosterischen Bindungstasche auch sterisch einschränkt.

Bedeutung der EDGE-Sequenz im e2 für die Gallamin-Bindung am M_2 -Rezeptor

Die Bindungsneigung von Gallamin hängt von einer sauren Sequenz im zweiten extrazellulären Loop des muskarinischen M_2 -Rezeptors ab. Leppik stellt fest, dass ein Austausch der sauren Aminosäuresequenz M_2 172EDGE175 gegen die korrespondierende neutrale Sequenz des M_1 -Rezeptors, M_1 184LAGQ187, zu einer Affinitätsabnahme von Gallamin um 0,8 Log-Einheiten führt [129]. Neuere Untersuchungen von Huang bestätigen dies und charakterisieren die Epitopabhängigkeit genauer [119]. Darüberhinaus wird auch ein Austausch zwischen M_2 und M_5 durchgeführt. Die Mutationen $M_2E172L/4.74$ und $M_2E175Q/4.77$ führen zu Affinitätsabnahmen von Gallamin. $M_2E175Q/4.77$ übt einen größeren Einfluss auf die Gallamin-Affinität aus [119].

Zur weiteren Überprüfung des postulierten Bindungsmodus von Gallamin werden die Einfach- und Doppelmutanten dieser beiden sauren Epitope sowie die GRID-Untersuchungen hierzu verwendet (vgl. Abb. 7.1, S. 105). Die Ergebnisse werden erneut in Abbildung 7.24 dargestellt und mit dem postulierten Bindungsmodus von Gallamin verglichen.

An der M_2E172L -Mutante ist zunächst eine starke Verminderung der Wechselwirkungsmöglichkeit für ein großes Feld im distalen Bereich der allosterischen Bindungstasche zu erkennen. In der postulierten Bindungsregion für Gallamin kommt es zu leichten Veränderungen. An der $M_2E175Q/4.77$ -Mutante erkennt man eine deutliche Verkleinerung des Hauptfeldes und eine komplette Eliminierung des Feldes b. Das bedeutet, dass auf einem Energieniveau von -8,9kcal keine Wechselwirkungsmöglichkeit mehr für quartäre Ammoniumgruppen vorhanden ist. Die Doppelmutante führt zu einer weiteren Verminderung der Wechselwirkungsmöglichkeiten, da hier auch das Hauptfeld vollständig verschwindet.

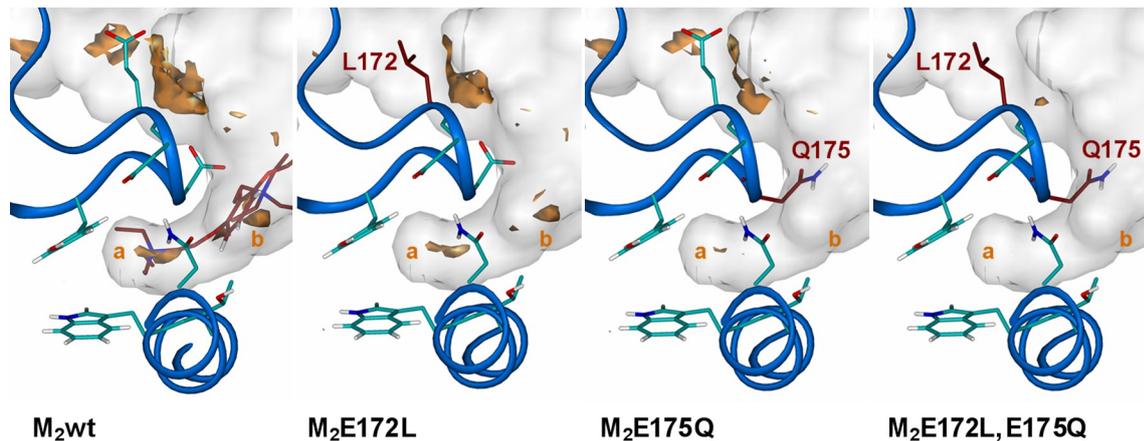


Abbildung 7.24: Veränderung der *NM3*-Felder durch Mutationen an Position $M_2E172/4.74$ und $M_2E175/4.77$. *NM3*-Felder: $-8,9\text{kcal}$; mutierte Aminosäureseitenketten, dunkelrot; durchsichtige weiße Oberfläche, Volumen der allosterischen Bindungstasche im $M_2\text{wt}$; a, b, Wechselwirkungsfelder, in denen quartäre Ammoniumkopfgruppen von Gallamin positioniert sind.

Bedeutung von Y177, W422 und T423 für die Gallamin-Bindung am M_2 -Rezeptor

Die Aminosäuren $M_2Y177/5.29$, $M_2W422/7.35$ und $M_2T423/7.36$ haben eine Bedeutung für die Affinität und Subtypselektivität allosterischer Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ (vgl. Abschnitt 7.1.2). Huang untersucht hierzu den Einfluss von $M_2Y177/5.29$ und $M_2T423/7.36$ auf die Bindung von Gallamin, da diese in der Nachbarschaft zu wichtigen affinitätsgebenden Epitopen dieses Modulators liegen. Ziel dieser Untersuchung ist, Ähnlichkeiten im Bindungsverhalten der beiden strukturell diversen Modulatoren W84 und Gallamin zu finden [119]. Anschließende Untersuchungen von Prilla zur Bedeutung von $M_2W422/7.35$ für die Gallamin-Bindung werden unter gleichen experimentellen Bedingungen vorgenommen [127]. Hierbei zeigt sich, dass die Epitope, die für die Bindung von Alkanbisammonium-Verbindungen wichtig sind, ebenfalls Einfluss auf die Affinität von Gallamin ausüben.

Die Mutation $M_2T423H/7.36$ führt in beiden experimentellen Untersuchungen zu einem Affinitätsverlust von Gallamin [119, 127]. Die Affinität für Gallamin an der Tripelmutante $M_2Y177Q,W422A,T423H$ ist verglichen mit dem $M_2\text{wt}$ mehr als 1800fach abgeschwächt [127]. Zur Überprüfung des postulierten Bindungsmodus für Gallamin werden erneut GRID-Untersuchungen mit der *NM3*-Sonde an entsprechenden M_2 -Rezeptormutanten durchgeführt. Die Ergebnisse sind für eine einfachere Übersicht in zwei Teile geteilt. Abbildung 7.25 zeigt die Mutationen der beiden aromatischen Aminosäuren. Abbildung 7.26 berücksichtigt zusätzlich die Mutation $M_2T423H/7.36$. Bei Mutationen des M_2 -Rezeptormodells führt der Ersatz der Tyr-Seitenkette (M_2Y177Q) nur zu geringen Änderungen der Größe der *NM3*-Felder, während bei Entfernung der Trp-Seitenkette (M_2W422A) eine deutliche Verkleinerung zu erkennen ist. In der Doppelmutante ($M_2Y177Q,W422A$) kommt es zu einer weiteren leichten Volumenabnahme des

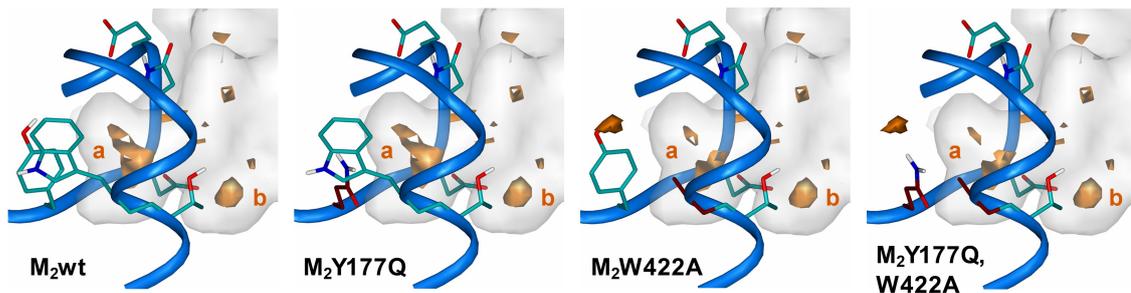


Abbildung 7.25: Veränderung der *NM3*-Felder durch Mutation von $M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$. *NM3*-Felder: $-8,9\text{kcal}$; mutierte Aminosäureseitenketten, dunkelrot; durchsichtige weiße Oberfläche, Volumen der allosterischen Bindungstasche im $M_2\text{wt}$; a, b, Wechselwirkungsfelder, in denen quartäre Ammoniumkopfguppen von Gallamin positioniert sind.

Hauptfeldes.

Im Rezeptormodell platziert SCWRL die Seitenkette von H423 in der $M_2T423H/7.36$ -Mutante in den freien Raum der allosterischen Bindungstasche (vgl. Abb. 7.26). Dadurch kommt es zu einer erheblichen sterischen Hinderung für Gallamin. Zusätzlich zur sterischen Hinderung wird auch die Größe der Wechselwirkungsfelder deutlich verringert.

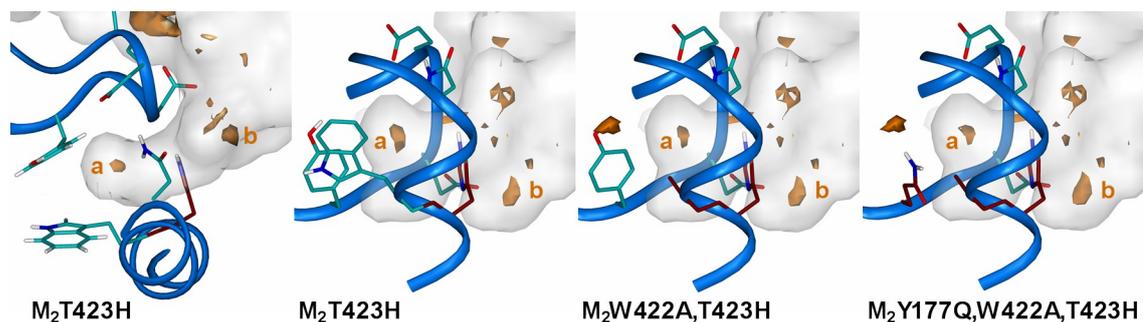


Abbildung 7.26: Veränderung der *NM3*-Felder durch Mutationen an wichtigen Epitopen für die Bindung von Alkanbisammonium-Verbindungen. M_2T423H , Ansicht von oben und membranständige Ansicht, Drehung 90° ; *NM3*-Felder: $-8,9\text{kcal}$; mutierte Aminosäureseitenketten, dunkelrot; durchsichtige weiße Oberfläche, Volumen der allosterischen Bindungstasche im $M_2\text{wt}$; a, b, Wechselwirkungsfelder, in denen quartäre Ammoniumkopfguppen von Gallamin positioniert sind.

7.4.3 MDS mit Gallamin am freien und NMS-besetzten M_2 -Rezeptor

Anschließende MDS sollen zeigen, ob der postulierte Bindungsmodus für Gallamin erhalten bleibt. In Abbildung 7.27A ist der Verlauf der RMSD-Werte für Simulationen mit Gallamin am freien M_2 -Rezeptor dargestellt. Die Abweichungen der untersuchten Protein-Rückgrat-Bereiche betragen $0,31\text{nm}$ für *M2* *gesamt*, $0,28\text{nm}$ für *M2 Helices und Loops* und $0,17\text{nm}$ für *M2 TM Helices*. Während sich die Bereiche mit Termini zunächst nur geringfügig von den Bereichen ohne Termini (*M2 Helices und Loops*) unterscheiden,

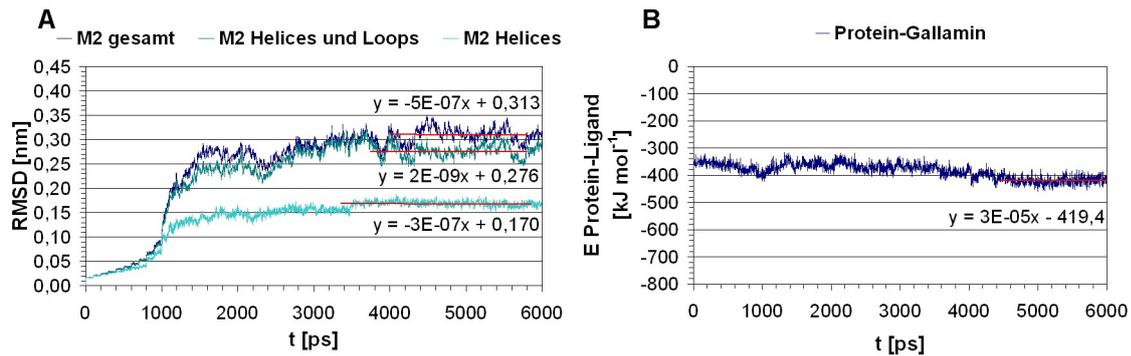


Abbildung 7.27: MDS des M_2 -Gallamin-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

zeigen sich ab etwa 4ns größere Änderungen für die Bereiche mit Termini. Die transmembranären helikalen Bereiche zeigen bereits ab 3,5ns einen stabilen Verlauf. In Abbildung 7.27B ist die intermolekulare Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie für Gallamin mit dem M_2 -Rezeptor dargestellt. Ab etwa 4,2ns ist der Energieverlauf stabil und weist mittlere Energiewerte von $-419,4\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ auf.

In Abbildung 7.28A ist der Verlauf der RMSD-Werte für den ternären M_2 -NMS-Gallamin-Komplex dargestellt. Die Abweichungen der untersuchten Protein-Rückgrat-Bereiche betragen $0,28\text{nm}$ für *M2 gesamt*, $0,26\text{nm}$ für *M2 Helices und Loops* und $0,16\text{nm}$ für *M2 TM Helices*. Die transmembranären helikalen Bereiche zeigen bereits

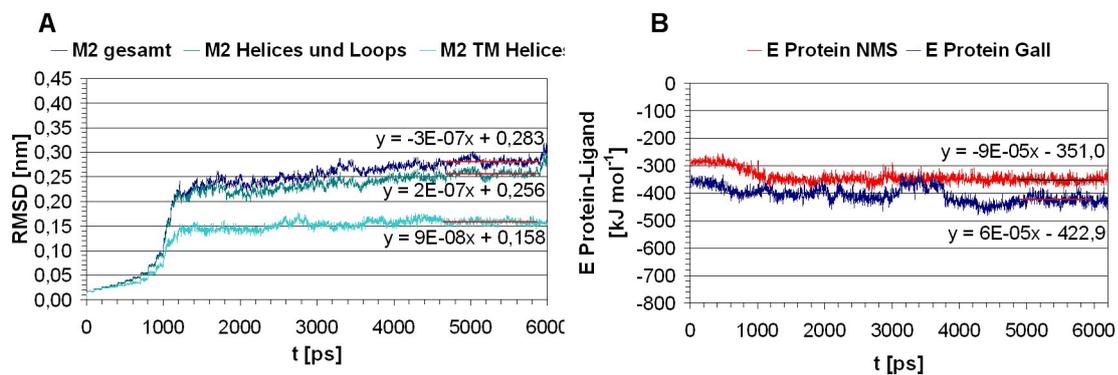


Abbildung 7.28: MDS des M_2 -NMS-Gallamin-Komplexes. A, RMSD-Werte des Protein-Rückgrats. M2 gesamt, alle Rückgrat-Atome des M_2 -Modells; M2 Helices und Loops, Atome der Aminosäuresequenz T20/1.29 bis C307/7.70; M2 TM-Helices, Protein-Rückgrat-Atome der transmembranären Bereiche des M_2 -Rezeptormodells (Tab. 4.6, S. 59); B, Verlauf der intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie.

ab 2,5ns einen sehr stabilen Verlauf. Alle Bereiche weisen niedrigere Werte auf als der Einzelkomplex *M₂-Gallamin*. Abbildung 7.28B stellt die intermolekularen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien dar. Gallamin weist im ternären Komplex relativ starke Schwankungen auf. Im Mittel ergeben sich Energiewerte von $-422,9\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Der Energiegewinn im Vergleich zum Einzelkomplex ist mit $3,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ gering. NMS erzeugt mit dem Protein im ternären Komplex eine mittlere Wechselwirkungsenergie von $-351\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

7.5 Bindungsmodus von Hybridsubstanzen im M₂-Modell

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Mohr (Pharmazeutisches Institut, Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) werden im Verlauf dieser Arbeit auch Untersuchungen zu allosterisch-orthosterischen Hybridsubstanzen vorgenommen. Diese Substanzen leiten sich von den Alkanbisammoniumverbindungen W84 und Naphmethonium ab. Die endständige Phthalimidgruppe wird bei beiden Substanzen durch einen vom orthosterischen Agonisten Iperoxo abgeleiteten Molekülteil ersetzt. Der allosterische Teil der Hybride stammt aus den verkürzten W84- und Naphmethonium-Derivaten SH30 und EHW477. Die Strukturen der entsprechenden Hybride DDT-5 und MMH5-6 werden in Abbildung 7.29 dargestellt.

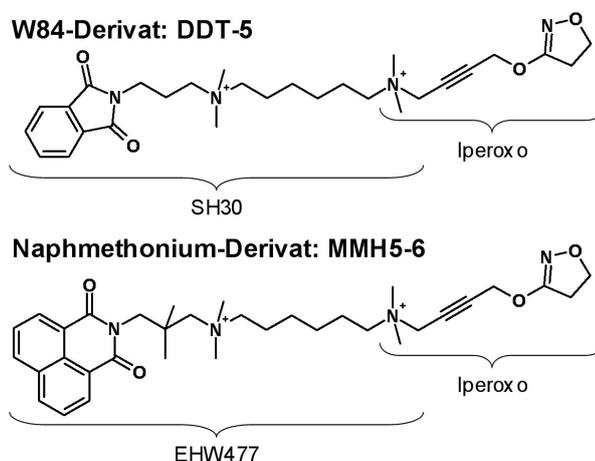


Abbildung 7.29: Strukturen der allosterisch-orthosterischen Hybrid-Substanzen.

Während Iperoxo ein unselektiver, aber potenter, Vollagonist an muskarinischen Rezeptoren ist [140], verhalten sich die Alkanbisammonium-Verbindungen wie inverse Agonisten und stabilisieren den inaktiven Zustand der Rezeptoren [141]. Eine interessante Eigenschaft der untersuchten Hybridsubstanzen ist, dass sie ebenfalls volle Agonisten am M₂-Rezeptor darstellen und gleichzeitig eine erhöhte M₂/M₅-Subtypselektivität zeigen. Bisher entwickelte Hybrid-Substanzen weisen eine antagonistische Wirkung auf [142, 143].

Mutations- und Bindungsstudien dieser neuen Hybrid-Substanzen zeigen, dass ihre Affinität sowohl von Aminosäuren der orthosterischen (M₂Y104/3.33) als auch der alloste-

rischen Bindungstasche ($M_2Y177/5.29$, $M_2T423/7.36$) abhängt. Es wird postuliert, dass die Hybride einen dualen Bindungsmodus besitzen, also sowohl Teile der allosterischen als auch der orthosterischen Bindungstasche besetzen [144]. Weiterhin wird postuliert, dass die Hybride auch nur in der allosterischen Bindungstasche binden können, wenn die orthosterische Bindungstasche bereits besetzt ist. Die Rezeptoraktivierung soll über den orthosterischen Teil, die Subtypselektivität über den allosterischen Teil vermittelt werden. Ein Manuskript zu diesen Ergebnissen, sowie der theoretischen Untersuchungen hierzu, ist zum Zeitpunkt der schriftlichen Niederlegung dieser Arbeit in Vorbereitung (Stand, April 2008) [145].

Um eine Vorstellung von einer möglichen Bindungs-Geometrie dieser Substanzen am M_2 -Rezeptor zu erhalten, werden nähere Untersuchungen dieser beiden Verbindungen am M_2 -Rezeptormodell durchgeführt. Hierzu ist eine Veränderung des Modells notwendig, da im Ausgangsmodell die allosterische Bindungstasche von der orthosterischen getrennt vorliegt (vgl. Abb. 4.26, S. 77). Es soll ein Modell erstellt werden, das einen Zugang zu der orthosterischen Bindungstasche vom Extrazellulärraum ermöglicht. Dieser Zugang ist natürlicherweise notwendig um eine Assoziation oder Dissoziation von orthosterischen Liganden zu ermöglichen. Im Folgenden werden die Modifikationen des in dieser Arbeit vorgestellten M_2 -Modells beschrieben, die zu einem Rezeptor führen, der als „offener“ M_2 -Rezeptor bezeichnet wird. Das unveränderte Modell wird entsprechend als „geschlossener“ M_2 -Rezeptor bezeichnet.

7.5.1 Erstellung eines offenen Rezeptormodells

Eine Trennung der beiden Bindungstaschen im ternären Komplex des M_2 -Rezeptors wird hauptsächlich durch drei Aminosäuren verursacht. Abbildung 7.30 stellt die repräsentative Struktur einer MDS des ternären M_2 -NMS-MM7A-Komplexes dar (vgl. Abschnitt 7.3.5, S. 124). Sie verdeutlicht, dass ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken und aromatischen Wechselwirkungen der Aminosäuren $M_2Y104/3.33$, $M_2Y403/6.51$ und $M_2Y426/7.39$ eine Ebene zwischen der allosterischen und der orthosterischen Bindungstasche ausbildet. Eine seitliche Begrenzung erfolgt durch $M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$, die oberhalb dieser Ebene liegen.

Durch Auflösung dieser trennenden Kontakte soll die Öffnung eines Kanals erreicht werden. Eine erste Untersuchung wird mit der in Insight II 2000 implementierten Rotamerenbibliothek durchgeführt. Allerdings bleibt die Suche nach möglichen Rotameren der Aminosäuren, die zur Öffnung eines Kanals führen, erfolglos. Daher werden die beiden Aminosäureseitenketten $M_2Y403/6.51$ und $M_2Y426/7.39$ manuell rotiert (vgl. Abb. 7.31A). Die Geometrie von $M_2Y104/3.33$ wird nicht verändert. An $M_2Y403/6.51$ und an $M_2Y426/7.39$ erfolgt eine Drehung des Torsionswinkels C-CA-CB-CG um etwa 54° bzw. etwa 17° in entgegen gesetzte Richtungen. Nach einer Energieminimierung ist das Ausgangsmodell des offenen M_2 -Rezeptors erstellt. Beim Vergleich der beiden Modelle ist die Öffnung eines Kanals zur orthosterischen Bindungstasche gut zu erkennen (vgl. Abb. 7.31). Zur

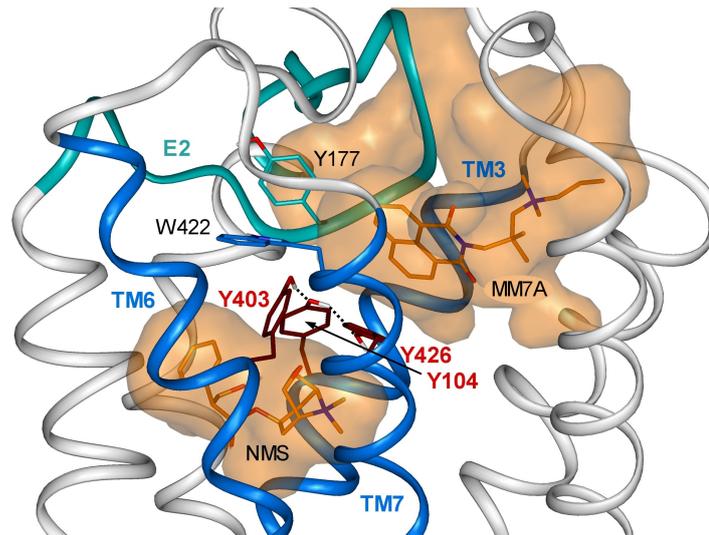


Abbildung 7.30: Lokalisation von Y104/3.33 im M₂-Rezeptormodell, repräsentative Struktur aus einer Moleküldynamiksimulation des ternären Rezeptorkomplexes, bestehend aus M₂-Rezeptor, NMS und MM7A.

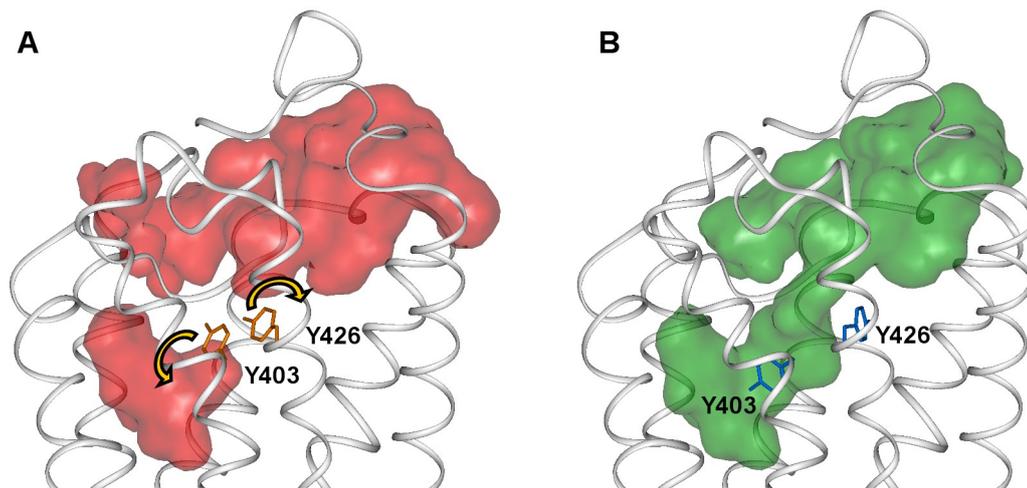


Abbildung 7.31: Vergleich des geschlossenen und offenen M₂-Rezeptors. A, geschlossenes Modell, Lokalisation von M₂Y403/6.51 und M₂Y426/7.39; rote Volumina, getrennte orthosterische und allosterische Bindungstasche; Pfeile, Rotationsrichtung der modifizierten Aminosäureseitenketten; B, offenes Modell, geänderte Konformationen von M₂Y403/6.51 und M₂Y426/7.39; grünes Volumen, gemeinsame orthosterische und allosterische Bindungstasche.

Überprüfung der Stabilität dieses Rezeptorzustandes wird eine MDS des unbesetzten offenen Rezeptors durchgeführt. Hier zeigt sich eine leicht erhöhte Flexibilität gegenüber dem geschlossenen Modell. Eine Geometrie-Überprüfung mit PROCHECK zeigt eine vergleichbare Qualität beider Rezeptoren.

7.5.2 Docking

Eine Untersuchung möglicher Bindungsmodi wird für DDT-5 und MMH5-6 mit dem Programm GOLD sowohl am geschlossenen, als auch am offenen Rezeptor durchgeführt. Hierbei wird das gleiche Vorgehen wie bei vorangegangenen Docking-Untersuchungen gewählt. Ein Radius von 20Å ist ausreichend, um im offenen Rezeptor die orthosterische Bindungstasche mit zu erfassen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.5 aufgeführt und werden hierin mit den Ergebnissen von W84 und Naphmethonium verglichen. Im ge-

Ligand	M ₂ -geschlossen	M ₂ -offen
DDT-5	23,47	32,32
W84	35,17	-
MMH5-6	30,84	41,61
Naphmethonium	35,00	-

Tabelle 7.5: Docking-Ergebnisse Hybrid-Substanzen. Bewertungszahlen des ChemScore für orthosterisch-allosterische Hybrids-substanzen DDT-5 und MMH5-6; W84 und Naphmethonium als Referenzwerte.

schlossenen Rezeptor zeigen die meisten Hybrid-Rezeptorgeometrien eine Anordnung des Phthalimid- bzw. Naphthalimid-Ringes von DDT-5 und MMH5-6 zwischen den beiden Aminosäuren M₂Y177/5.29 und M₂W422/7.35, wie dies für andere Alkanbisammonium-Verbindungen auch postuliert wird (vgl. Abschnitt 7.3.1). Am offenen Rezeptor werden beide Hybride bevorzugt in einem dualen Bindungsmodus gebunden. Sie besetzen gleichzeitig die allosterische und die orthosterische Bindungstasche und können Kontakte zu allen drei Aminosäuren ausbilden, die in Bindungsstudien an entsprechenden Mutanten zu Affinitätsverlusten führen.

Die Bewertungszahlen zeigen mehrere Tendenzen. Die Hybride erhalten im geschlossenen Rezeptor niedrigere Bewertungszahlen als ihre jeweilige Muttersubstanz. Hierbei erhält das kleinere DDT-5 eine niedrigere Bewertung als MMH5-6. Weiterhin werden die Hybrids-substanzen im allosterischen Bindungsmodus des geschlossenen Rezeptors niedriger bewertet als im dualen Bindungsmodus des offenen Rezeptors. Insgesamt wird im Docking der duale Bindungsmodus am günstigsten für die Bindung der allosterisch-orthosterischen Hybrids-substanzen eingeschätzt.

7.5.3 Moleküldynamiksimulationen

Zur Optimierung und Überprüfung, ob der duale Bindungsmodus keinen negativen Einfluss auf die Struktur des Proteins ausübt, werden kurze MDS für Komplexe mit DDT-5 durchgeführt. Der duale Bindungsmodus von DDT-5 im offenen Rezeptor wird mit einem allosterischen Bindungsmodus im geschlossenen Rezeptor verglichen. Zusätzlich wird eine MDS des ternären Komplexes bestehend aus dem geschlossenen M₂-Rezeptor, NMS und DDT-5 durchgeführt.

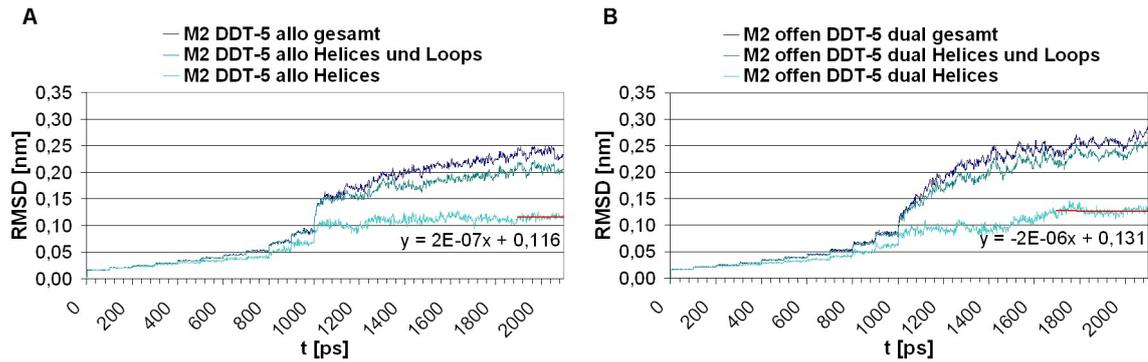


Abbildung 7.32: RMSD-Werte der MDS mit *M₂-DDT-5*-Komplexen. A, *M₂-DDT-5-allo*-Komplex, geschlossener *M₂*-Rezeptor, DDT-5 im allosterischen Bindungsmodus; B, *M₂-offen-DDT-5-dual*-Komplex, offener *M₂*-Rezeptor, DDT-5 im dualen Bindungsmodus.

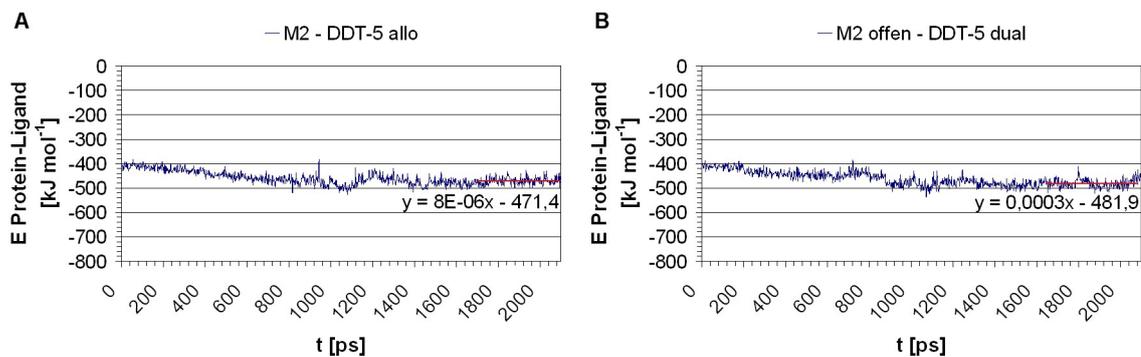


Abbildung 7.33: Energie-Werte der MDS mit *M₂-DDT-5*-Komplexen. A, *M₂-DDT-5-allo*-Komplex, geschlossener *M₂*-Rezeptor, DDT-5 im allosterischen Bindungsmodus; B, *M₂-offen-DDT-5-dual*-Komplex, offener *M₂*-Rezeptor, DDT-5 im dualen Bindungsmodus.

Die Ergebnisse für die Einzelkomplexe werden in den Abbildungen 7.32 und 7.33 vorgestellt. Im geschlossenen Rezeptor und einem allosterischen Bindungsmodus (*M₂-DDT-5-allo*-Komplex) weisen die transmembranären helikalen Bereiche (Abb. 7.32A) mittlere RMSD-Werte von 0,12nm auf. Bei der MDS des dualen Bindungsmodus im offenen *M₂*-Rezeptor (*M₂-offen-DDT-5-dual*-Komplex, Abb. 7.32B) zeigt sich mit 0,13nm eine etwas stärkere Veränderung dieser und auch der anderen Bereiche des Proteins. Die intermolekulare Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie beträgt für DDT-5 im allosterischen Bindungsmodus des geschlossenen Rezeptors $-471,4\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Im dualen Bindungsmodus zeigt sich eine leicht erhöhte Wechselwirkungsenergie. Hier erzeugt der *M₂-DDT-5*-Komplex im Mittel eine Energie von $-481,9\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Der Energiegewinn im Vergleich zum allosterischen Bindungsmodus beträgt $10,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Die Dynamiksimulation des ternären Komplexes (*M₂-NMS-DDT-5 allo*) weist, wie der *M₂-DDT-5 allo*-Komplex, RMSD-Werte von 0,12nm auf (Diagramme nicht dargestellt).

Die mittlere intermolekulare Protein-Ligand Wechselwirkungsenergie beträgt für DDT-5 $-477,5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Auch hier zeigt sich ein leichter Energiegewinn der Hybrids substanz im dualen gegenüber dem allosterischen Bindungsmodus. Der Energiegewinn beträgt im Mittel $4,4\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Der duale Bindungsmodus ist daher auch aus energetischen Gesichtspunkten bei allen untersuchten MDS für DDT-5 am M_2 -Rezeptor als bevorzugt zu betrachten.

7.5.4 Vergleich der Bindungsmodi von DDT-5

In Abbildung 7.34 werden zum Vergleich des allosterischen und des dualen Bindungsmodus von DDT-5 repräsentative Strukturen der MDS dargestellt. Im ternären Komplex

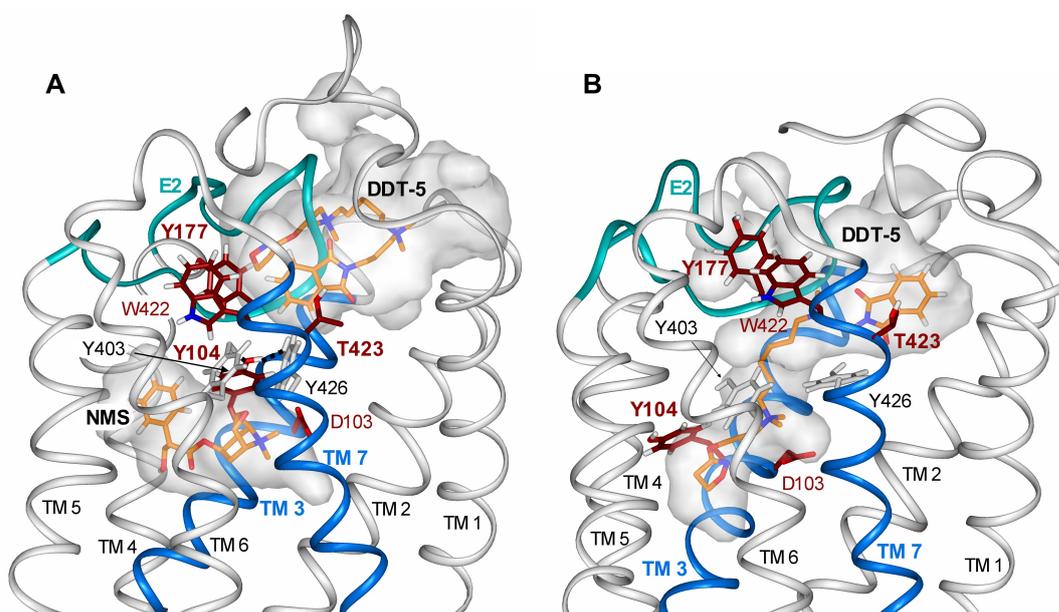


Abbildung 7.34: Repräsentative Strukturen der MDS mit DDT-5 am geschlossenen und offenen M_2 -Rezeptor, nach [145]. A, allosterischer Bindungsmodus im ternären Komplex mit NMS, geschlossener Rezeptor; B, dualer Bindungsmodus im offenen Rezeptor; Aminosäuren: weiß, modifizierte Aminosäureseitenketten; dunkelrot, untersuchte Mutanten; weißes Volumen, Bindungstasche des jeweiligen Rezeptors; blau, TM3 und TM7; türkis, e2.

mit NMS zeigt DDT-5 eine ähnliche Geometrie wie andere allosterische Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ (Abb. 7.34A). Der Iperoxo-Teil ist im distalen Bereich der allosterischen Bindungstasche lokalisiert. Die Trennung der beiden Bindungstaschen durch die drei Aminosäuren $M_2Y104/3.33$, $M_2Y430/6.51$ und $M_2Y426/7.39$ bleibt erhalten. Im dualen Bindungsmodus sind die drei affinitätsgebenden Aminosäuren $M_2Y104/3.33$, $M_2Y177/5.29$ und $M_2T423/7.36$ an der Ausbildung der Bindungstasche für DDT-5 beteiligt. Die Seitenkette von $M_2Y104/3.33$ zeigt gegenüber dem ternären Komplex eine Konformationsänderung in Richtung von TM5. Eine Kation- π -Wechselwirkung mit einer positiv geladenen Ammoniumgruppe von DDT-5 ist möglich. Weiterhin kann man eine stärkere Bewegung des e2 erkennen. Er ist nicht mehr so tief im Helixbündel lokalisiert. Die Positionen von $M_2Y177/5.29$ und $M_2W422/7.35$ verändern sich deutlich. Der Kontakt

zwischen den beiden Aminosäuren wird schwächer. Der Abstand zwischen e2 und e3 wird größer. Weiterhin zeigt der N-Terminus gegenüber dem geschlossenen Modell geringere Kontaktmöglichkeiten. Er ist nicht mehr so tief zwischen dem e2- und e3-Loop eingebettet. In Tabelle 7.6 ist das Ergebnis der Geometrieüberprüfung für alle drei Dynamiksimulationen dargestellt. Hier zeigen sich keine unerlaubten Aminosäuren in den

Bereich Ramachandran-Plot	M ₂ -offen-DDT-5 dual [%]	M ₂ -DDT-5 allo [%]	M ₂ -NMS-DDT-5 allo [%]
bevorzugte Regionen	85,9	84,8	85,5
zusätzlich erlaubte Regionen	11,4	12,1	11,7
generell erlaubte Regionen	1,7	1,7	2,1
verbotene Regionen	1,0	1,4	0,7
nicht erlaubte Geometrien (Lokalisation)	S8(NT),C457(CT), I462(CT)	V94(e1),A223(i3) C457(CT), I462(CT)	S8(NT),C457(CT)

Tabelle 7.6: Geometrieüberprüfung der repräsentativen und minimierten Strukturen der MDS mit DDT-5.

helikalen oder extrazellulären Bereichen. Die qualitativ beste Geometrie ist im offenen Rezeptor zu finden, in dem DDT-5 in einem dualen Bindungsmodus gebunden ist. Auch hier ist ein dualer Bindungsmodus der Substanzen bevorzugt.

7.6 Einfluss aromatischer Aminosäuren am M₂-Rezeptor

Für die Bindung von Acetylcholin und muskarinischen Rezeptorliganden sind aromatische Aminosäuren in der orthosterischen Bindungstasche essentiell (vgl. Abschnitt 1.5.4). Weiterhin zeigen verschiedene Untersuchungen an G-Protein gekoppelten Rezeptoren, dass einige aromatische Aminosäuren für den Erhalt der Tertiärstruktur von GPCRs, für die Ligandbindung bzw. für die Rezeptoraktivierung essentiell sind [146].

Am humanen muskarinischen M₂-Rezeptor können Mutations- und Bindungsstudien einen Einfluss der beiden aromatischen Aminosäuren, M₂Y177/5.29 und M₂W422/7.35, auf die Bindung von allosterischen Modulatoren nachweisen. Die theoretischen Untersuchungen hierzu werden in Abschnitt 7.1.2 und 7.4.2 dieser Arbeit beschrieben. Im vorangegangenen Abschnitt wird gezeigt, dass die Trennung der beiden Bindungstaschen ebenfalls von aromatischen Aminosäuren abhängt. Diese Beispiele zeigen die essentielle Bedeutung aromatischer Aminosäuren für G-Protein gekoppelte und insbesondere muskarinische Rezeptoren.

Dies führt zu der Fragestellung, ob weitere aromatische Aminosäuren für die Bindung von allosterischen Modulatoren verantwortlich gemacht und durch das M₂-Rezeptormodell erkannt werden können. Daher wird eine systematische Analyse aller aromatischer Aminosäuren des M₂-Rezeptors durchgeführt, die an der Ausbildung der allosterischen

und/oder orthosterischen Bindungsstelle beteiligt sind. Zunächst wird untersucht, welche der Aminosäuren einen Kontakt zur allosterischen Bindungstasche haben, bzw. Kontakte zu anderen aromatischen Aminosäuren dieses Bereiches ausbilden können. Ein möglicher Einfluss auf die Bindung von allosterischen Modulatoren soll herausgearbeitet werden, um neue Ziele für Mutationsstudien zu erhalten.

7.6.1 Aromatische Aminosäuren des M₂-Rezeptors

Der humane muskarinische M₂-Rezeptor verfügt über 43 aromatische Aminosäuren, die in verschiedenen Bereichen des Rezeptors lokalisiert sind. Wie in Abbildung 7.35 dargestellt, kann man unterscheiden zwischen extrazellulär, transmembranär und intrazellulär gelegenen Aminosäuren. Auffällig ist, dass viele aromatische Aminosäuren in direktem Kontakt zueinander stehen und Netzwerke ausbilden. Für die nachfolgenden

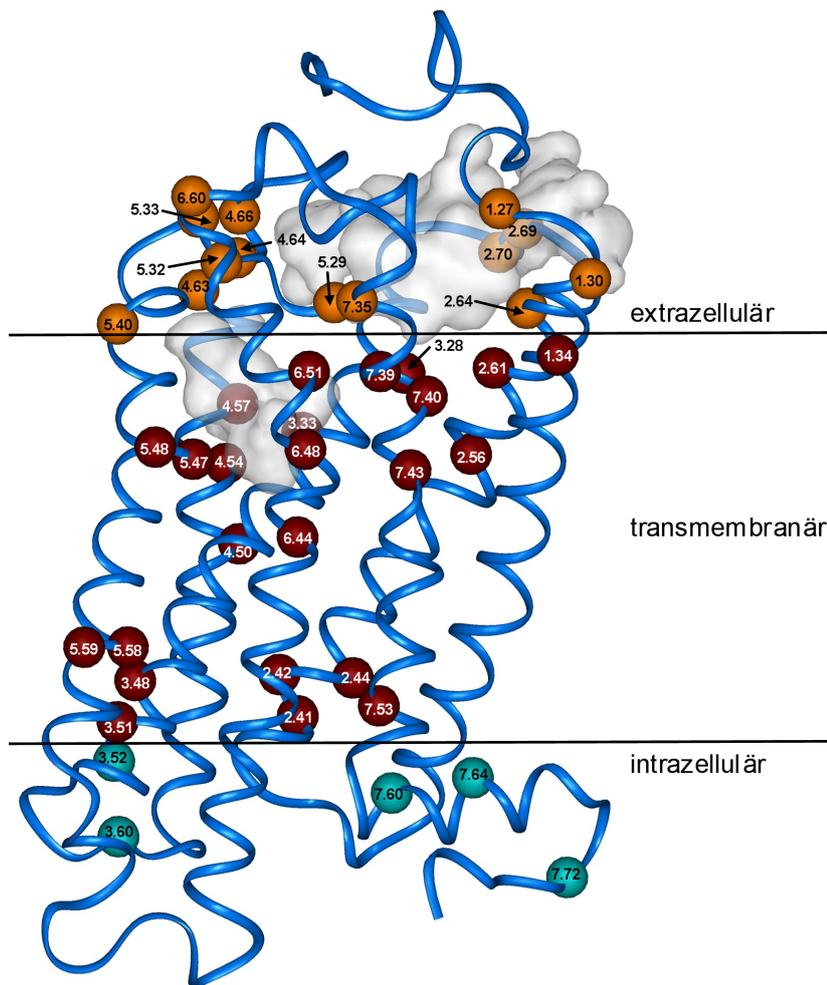


Abbildung 7.35: Lokalisation der aromatischen Aminosäuren im M₂-Rezeptor-Modell. Dargestellt sind die C_α-Atome als runde Kugeln und die orthosterische bzw. allosterische Bindungstasche als transparente Volumen.

Untersuchungen wird ein Grenzwert für den kürzesten Abstand zweier aromatischer Kohlenstoff-Atome von 5Å definiert. Dieser soll einen direkten Kontakt zweier aromatischer Gruppen widerspiegeln. Die Abstandsmessungen werden für das Ausgangsmodell

des M₂-Rezeptors vorgenommen. Weiterhin werden repräsentative Rezeptorgeometrien aus Moleküldynamiksimulationen von verschiedenen Rezeptor-Ligand-Komplexen untersucht. Systematisch werden der unbesetzte M₂-Rezeptor, sowie allosterische und ternäre Komplexe mit MM7A betrachtet. Steht eine Aminosäure in zwei oder mehr der untersuchten Modelle in Kontakt mit der ortho- bzw. allosterischen Bindungstasche oder einer anderen aromatischen Aminosäure dieses Bereichs, so wird sie als für Mutationsstudien möglicherweise interessant betrachtet. Die Anzahl der in Frage kommenden Aminosäuren kann so von 43 auf 12 verringert werden, welche in Abbildung 7.36 dargestellt sind. Für diese 12 aromatischen Aminosäuren im M₂-Rezeptor wird außerdem untersucht, wie

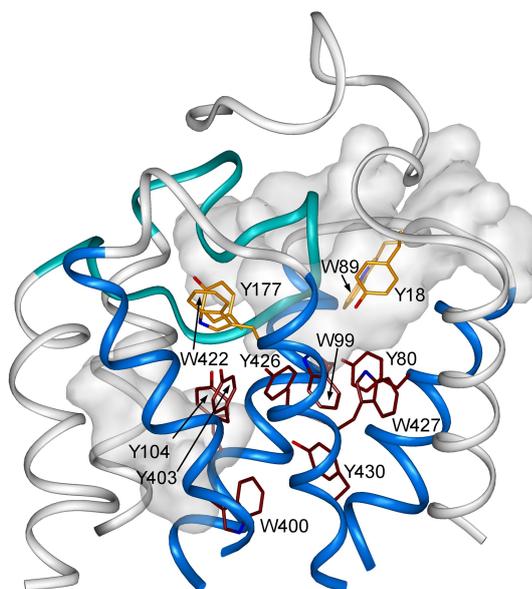


Abbildung 7.36: Lokalisation der für Mutationsstudien möglicherweise interessanten aromatischen Aminosäuren im M₂-Rezeptor-Modell. Farbgebung: orange, extrazellulär liegende Aminosäuren; dunkelrot, transmembranär liegende Aminosäuren; blau, TM2, TM3, TM6, TM7; türkis, e2.

stark die Konservierung innerhalb der Familie der Rezeptoren für biogene Amine ist, um hieraus ebenfalls eine mögliche Bedeutung der entsprechenden Aminosäuren für die Rezeptoren ablesen zu können. Die Sequenzen der 35 humanen Rezeptoren für biogene Amine werden über ein multiples Sequenzalignment miteinander verglichen. Die aus der Swiss-Prot-Datenbank verwendeten Sequenzen sind in Tabelle 7.7 aufgeführt und werden mit dem Programm ClustalW untereinander angeordnet. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 7.8 dargestellt. Ist an einer bestimmten Position in einem biogenen Amin-Rezeptor die Aminosäure identisch mit der gleichen Position im M₂-Rezeptor, so wird sie der Gruppe der identischen Aminosäuren zugeordnet. Tritt an dieser Position eine andere aromatische Aminosäure, z. B. Phe statt Trp, bzw. eine andere aliphatische Aminosäure, z. B. Lys statt Tyr, auf, so wird sie der Gruppe der anderen aromatischen bzw. der anderen aliphatischen Aminosäuren zugeordnet. Aus der Gesamtanzahl der untersuchten Sequenzen wird ein prozentualer Anteil für die jeweilige Aminosäure und

Unterfamilie biogene Amine	Verwendete Sequenzen
muskarinische Acetylcholin	M ₁ , M ₂ , M ₃ , M ₄ , M ₅
Adrenozeptoren	α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 , β_2 , β_3
dopaminerge	D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ , D ₅
histaminerge	H ₁ , H ₂ , H ₃ , H ₄
serotoninerge	5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} , 5-HT _{1E} , 5-HT _{1F} , 5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} , 5-HT _{2C} , 5-HT ₄ , 5-HT _{5A} , 5-HT ₆ , 5-HT ₇

Tabelle 7.7: Sequenzen von humanen Rezeptoren für biogene Amine.

AS in M ₂	identische AS		andere arom. AS		andere aliph. AS	
	[abs.]	[%]	[abs.]	[%]	[abs.]	[%]
Y18/1.27	6	17,1	1	2,9	28	80,0
Y80/2.61	6	17,1	2	5,7	27	77,1
W89/3.18	35	100,0	-	-	-	-
W99/3.28	25	71,4	8	22,9	2	5,7
Y104/3.33	8	22,9	-	-	27	77,1
Y177/5.29	3	8,6	2	5,7	30	85,7
W400/6.48	35	100,0	-	-	-	-
Y403/6.51	9	25,7	26	74,3	-	-
W422/7.35	7	20,0	7	20,0	21	60,0
Y426/7.39	5	14,2	8	22,9	22	62,9
W427/7.40	35	100,0	-	-	-	-
Y430/7.43	31	88,6	4	11,4	-	-

Tabelle 7.8: Konservierung der aromatischen Aminosäuren innerhalb der Rezeptorfamilie für biogene Amine.

Gruppe bestimmt.

Für die ausgewählten Aminosäuren werden zusätzlich bereits durchgeführte Mutationsstudien an muskarinischen Rezeptoren und anderen GPCRs der Unterfamilie für biogene Amine analysiert, um auch hierüber Aussagen über eine mögliche Bedeutung der einzelnen Aminosäuren zu erhalten. Ergebnisse zu den einzelnen Aminosäuren finden sich in Anhang A.9. Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Analysen zusammengefasst. Zunächst wird eine ganze Gruppe von Aminosäuren betrachtet, die durch aromatische Wechselwirkungen ein Netzwerk ausbilden. Dieses aromatische Cluster stellt ein interessantes Ziel für Mutationsstudien dar. Anschließend wird auf einzelne Aminosäuren eingegangen, die möglicherweise ebenfalls durch Mutationstudien neue Erkenntnisse über den muskarinischen M₂-Rezeptor liefern können.

7.6.2 Aromatisches Cluster

Ein sehr auffälliges aromatisches Cluster ergibt sich durch die Aminosäuren Y80/2.61, W99/3.28, Y104/3.33, Y403/6.51, Y426/7.39 und W427/7.40. Wie in Abbildung 7.37 deutlich wird, stehen diese Aminosäuren untereinander in engem Kontakt und bilden im M₂-

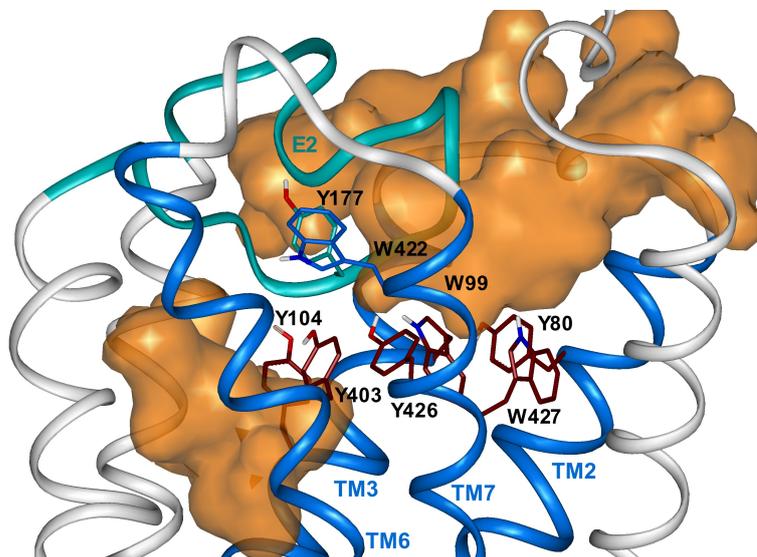


Abbildung 7.37: Aromatisches Cluster als Trennebene zwischen der orthosterischen und der allosterischen Bindungstasche, Ausgangsmodell des M₂-Rezeptors.

Rezeptormodell eine Ebene, welche zusammen mit den Aminosäuren Y177/5.29 und W422/7.35 die allosterische von der orthosterischen Bindungstasche trennt. Dieses Netzwerk aus aromatischen Aminosäuren, welche in TM2, TM3, TM6 und TM7 lokalisiert sind, stellt ein sehr interessantes Ziel für Mutationsstudien dar, da es sowohl teilweise an der Ausbildung der orthosterischen, als auch der allosterischen Bindungstasche beteiligt ist. Die Aminosäuren dieses Clusters können mit einem allosterischen Modulator vom Alkanisammoniumtyp in Wechselwirkung treten.

Im Folgenden soll kurz auf einzelne Aminosäuren dieses Clusters eingegangen werden: Y80/2.61 kann Kontakte zu aromatischen Aminosäuren anderer transmembranärer Bereiche ausbilden. Abbildung 7.38 verdeutlicht, dass Y80/2.61 in Wechselwirkung mit W99/3.28 und W427/7.40 tritt und die Helices TM2, TM3 und TM7 miteinander verbindet. Weiterhin ist Y80/2.61 an der Ausbildung der allosterischen Bindungstasche beteiligt und geht aromatische Wechselwirkungen mit Modulatoren wie MM7A ein. Im unbesetzten Rezeptor ist zusätzlich ein Kontakt zu Y426/7.39 möglich, welcher bei Besetzung der allosterischen Bindungstasche mit MM7A im Verlauf einer Moleküldynamiksimulation unterbrochen wird.

W99/3.28 hat im M₂-Rezeptormodell über Y80/2.61 und Y426/7.39 Kontakt zu TM2 bzw. TM7 (vgl. Abb. 7.38). Ein Kontakt zu MM7A bildet sich während einer MDS aus. Dieser Kontakt entsteht sowohl im ternären Komplex als auch im allosterisch besetzten M₂-Rezeptor. Längere Derivate wie Naphmethonium bilden ebenfalls während der MDS

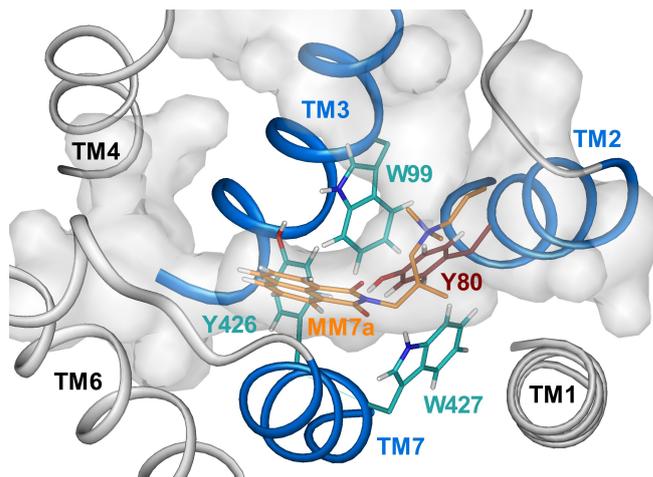


Abbildung 7.38: Lokalisation von Y80/2.61 im M_2 -Rezeptormodell.

einen Kontakt zu dieser Aminosäure aus.

$Y104/3.33$ ist an der Ausbildung der orthosterischen Bindungstasche beteiligt und zwischen den transmembranären Helices lokalisiert. In der Startstruktur des M_2 -Rezeptormodells geht dieses Tyrosin aromatische Wechselwirkungen mit $Y403/6.51$ und $Y426/7.39$ ein (vgl. Abb.7.37). Im Verlauf verschiedener Moleküldynamiksimulationen ist $Y104/3.33$ in der Lage stabile Wasserstoffbrücken zu den beiden oben genannten Aminosäuren auszubilden, und damit den Kontakt der transmembranären Helices TM3, TM6 und TM7 weiter zu verstärken. Die Trennung der allosterischen von der orthosterischen Bindungstasche durch dieses Netzwerk wird bereits in Abbildung 7.30 auf S. 137 deutlich gemacht. Ein direkter Kontakt von $Y104/3.33$ mit allosterischen Modulatoren vom Alkanbisammoniumtyp entsteht in MDS nicht. Diese Ergebnisse werden durch kürzlich durchgeführte Untersuchungen von Antony bestätigt. Während orthosterische Liganden und allosterisch-orthosterische Hybridsubstanzen einen Affinitätsverlust an der Mutante $M_2Y104/3.33$ aufweisen, ist die Bindung allosterischer Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ nicht von dieser Aminosäure abhängig [144].

$Y403/6.51$ stellt ein Epitop dar, welches für die Bindung von orthosterischen Liganden wichtig ist. In TM6 lokalisiert, steht es sowohl in Kontakt mit TM3 (über $Y104/3.33$) und TM7 (über $W422/7.35$ und $Y426/7.39$) als auch mit dem zweiten extrazellulären Loop (über $Y177/5.29$). Außerdem kann die phenolische Hydroxylgruppe des Tyrosins im allosterisch besetzten Rezeptor und im ternären Komplex mit der NH-Funktion des Protein-Rückgrats von $I178/5.30$ eine Wasserstoffbrücke ausbilden. Hierdurch wird der e2 stabilisiert. Ein direkter Kontakt zu allosterischen Modulatoren vom Alkanbisammoniumtyp ist im Startmodell des M_2 -Rezeptors vorhanden. Dieser geht aber im Laufe von Moleküldynamiksimulationen zu einem Großteil verloren. Bisherige Mutationsstudien ergeben, dass bereits die Entfernung der phenolischen Hydroxylgruppe eine Veränderung in der Aktivierbarkeit des Rezeptors bewirkt.

Im M₂-Rezeptormodell stellt Y426/7.39 zusammen mit Y104/3.33 und Y403/6.51 das trennende Element zwischen der orthosterischen und der allosterischen Bindungstasche (vgl. Abbildung 7.30 auf Seite 137) dar. Im Startmodell steht es über Y80/2.61 auch in Kontakt mit TM2. Dieser Kontakt wird im Laufe von Moleküldynamiksimulationen durch einen allosterischen Modulator, wie z. B. MM7A, unterbrochen. Y426/7.39 bildet in MDS direkte aromatische Kontakte mit allosterischen Modulatoren aus.

Im M₂-Rezeptormodell steht W427/7.40 in aromatischer Wechselwirkung mit Y80/2.61 und stabilisiert die Verbindung zwischen TM2 und TM7. Ein möglicher Einfluss dieser Aminosäure auf die Bindung von Alkanbisammonium-Verbindungen und verkürzten Derivaten wird bereits in Abschnitt 7.3.6 beschrieben.

7.6.3 Einzelne Aminosäuren

Y18/1.27 steht im M₂-Modell in Kontakt mit der allosterischen Bindungstasche und kann mit allosterischen Modulatoren in Wechselwirkung treten. Auffällig ist, dass an gleicher Position im M₅-Rezeptormodell ein His lokalisiert ist. Im M₂-Rezeptor begrenzt Y18/1.27 die Bindungstasche seitlich, während M₅H25/1.27 den Raum der allosterischen Bindungstasche an dieser Stelle einschränkt (vgl. Abb. 4.20, S. 69).

W89/3.18 bildet außer zu W99/3.28 zunächst keinen Kontakt zu anderen aromatischen Aminosäuren im M₂-Rezeptormodell aus. Es begrenzt den Eingangsbereich der allosterischen Bindungstasche. Im Verlauf von Moleküldynamiksimulationen kann W89/3.18 z.T. zusätzliche Kontakte zu Y80/2.61 ausbilden. An der Bindung von MM7A ist es nicht direkt beteiligt. Größere allosterische Modulatoren wie W84 oder Naphmethonium können schwache Wechselwirkungen mit dieser Aminosäure eingehen. W89/3.18 ist hochkonserviert innerhalb der Rezeptoren für biogene Amine, was auf eine generelle Bedeutung hinweist [20].

Die Bedeutung von Y177/5.29 im e2 für die Bindung von allosterischen Modulatoren wird durch Bindungsstudien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Mohr (Pharmazeutisches Institut, Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) bereits durch Einzel- und Mehrfachmutationen und Bindungsstudien mit verschiedenen allosterischen Modulatoren belegt. Der Einfluss auf die Bindung von strukturell diversen allosterischen Modulatoren wird in dieser Arbeit bereits in Abschnitt 7.1.2 und 7.4.2 beschrieben. Neben einer aromatischen Wechselwirkung mit W422/7.35 ist im M₂-Modell auch ein schwacher Kontakt der Seitenketten von Y177/5.29 und Y403/6.51 möglich. Damit hat der zweite extrazelluläre Loop neben TM7 zusätzlich Kontakt zu TM6.

W400/6.48 scheint keinen direkten Einfluss auf die Bindung von allosterischen Modulatoren zu haben, da es im M₂-Rezeptormodell sehr weit von der allosterischen Bindungsstelle entfernt liegt. Es begrenzt die orthosterische Bindungstasche von unten und ist von allen betrachteten Aminosäuren diejenige, die am tiefsten innerhalb des Rezeptors liegt (siehe Abbildung 7.36 auf Seite 143). Eine schwache Wechselwirkung mit Y430/7.43 ist möglich.

Die Bedeutung von *W422/7.35* ist wie *Y177/5.29* für die Bindung verschiedener allosterischer Modulatoren durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Mohr bereits bekannt. Der Einfluss dieser Aminosäure wird ebenfalls in vorangegangenen Abschnitten beschrieben (vgl. Abschnitt 7.1.2 und 7.4.2).

Ähnlich wie bei *W400/6.48* scheint *Y430/7.43* von der allosterischen Bindungstasche zu weit entfernt, um einen direkten Einfluss auf die Bindung von allosterischen Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ zu haben. Nach Moleküldynamiksimulationen steht *Y430/7.43* im allosterisch besetzten M_2 -Rezeptormodell und im ternären Komplex über *Y80/2.61* und *W99/3.28* in Kontakt mit TM2 und TM3. Weiterhin ist z. T. ein schwacher Kontakt mit *W400/6.48* in TM6 möglich.

Kapitel 8

Diskussion

Im zweiten Teil dieser Arbeit, *Allosterische Modulation des M₂-Rezeptors*, spielt der klassische allosterische Modulator W84 eine zentrale Rolle. Im ersten Teil wird gezeigt, dass ein Bindungsmodus von W84 wiedergegeben werden kann, der sehr gut mit experimentellen Daten übereinstimmt. Im zweiten Teil wird dieser Bindungsmodus zunächst näher betrachtet. Hier soll eine detaillierte Überprüfung der Bindungsgeometrie von W84 erfolgen. Der Modulator wird anschließend häufig für Vergleiche mit anderen Liganden herangezogen. Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Modulatoreigenschaften, die aus experimentellen Untersuchungen bekannt sind, sollen im Modell erklärt werden. Hierdurch soll verdeutlicht werden, dass das M₂-Modell ausgezeichnet in der Lage ist, unterschiedliche Aspekte der allosterischen Modulation nachzuvollziehen und zu erklären.

8.1 Bindungsmodus von W84

Eine Überprüfung des M₂-Rezeptormodells anhand experimenteller Daten soll Evidenz für den postulierten Bindungsmodus von W84 bringen. Hier sollen neue Erkenntnisse zu experimentellen Daten gewonnen werden, die bisher noch nicht mit theoretischen Methoden detailliert nachvollzogen und verdeutlicht werden konnten.

Die Positionierung von W84 wird bereits im ersten Teil dieser Arbeit diskutiert. Eine günstige Platzierung in GRID-Wechselwirkungsfelder ist möglich. Beim Vergleich der NM3-Felder des M₅- und M₂-Rezeptors, der im ersten Teil dieser Arbeit vorgenommen wird, zeigt sich, dass die Wechselwirkungsfelder für quartäre Ammoniumgruppen im M₂-Rezeptor überwiegend durch die sauren Aminosäuren M₂E172/4.74 und M₂E175/4.77 des e2-Loops zustande kommen. Das M₂-Modell postuliert für die W84-Bindung eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der Bindung der quartären methylysubstituierten Ammoniumgruppen. Dies steht im Einklang mit experimentellen Daten.

8.1.1 Mutationen E172L und E175Q

Alle virtuellen Mutationen werden am Ausgangsmodell des M₂-Rezeptors durchgeführt. Dieses liegt im inaktiven Zustand vor und kann NMS im aktiven Zentrum binden. Die Ergebnisse der GRID-Untersuchungen werden daher mit Affinitätsparametern der allosterischen Modulatoren verglichen, die in ternären Komplexen mit [³H]NMS vorliegen (pEC_{0,5diss}-Werte). Die betrachteten experimentellen Untersuchungen werden mit gleichen Testsystemen und unter gleichen Bedingungen durchgeführt und sind daher recht gut miteinander vergleichbar [68, 70, 109, 119, 127].

Die Mutationen M₂E172L/4.74 und M₂E175Q/4.77 des M₂-Rezeptors führen in experimentellen Untersuchungen zu Affinitätsabnahmen von W84 an der entsprechenden Rezeptormutante [119]. Allerdings weisen die Daten darauf hin, dass der Einfluss der Aminosäure M₂E175/4.77 auf die Bindung von W84 größer ist als von M₂E172/4.74 [119]. Die Affinität nimmt stärker durch Mutationen an M₂E175/4.77 ab. Dieser stärkere Einfluss

wird bereits früher postuliert [70]. Die Doppelmutante $M_2E172L,E175Q$ weist einen überadditiven Effekt im Vergleich zu den Affinitätsabnahmen der Einzelmutanten auf [119]. Die Entfernung beider saurer Aminosäuren des e2 wirkt sich schwerwiegender auf die Bindungsneigung des Modulators aus als die Addition der jeweiligen Entfernung jeweils nur einer Aminosäure.

Diese Ergebnisse können durch die Veränderungen der GRID-Wechselwirkungsfelder nachvollzogen werden. Wichtige Wechselwirkungsmöglichkeiten für die quartären Ammoniumgruppen von W84 bleiben bei der Mutation $M_2E172L/4.74$ weitgehend erhalten, während bei $M_2E175Q/4.77$ und der Doppelmutante deutlichere Änderungen zu sehen sind. Durch das fast vollständige Verschwinden der GRID-Felder in der Doppelmutante ist auch ein stärkerer überadditiver Effekt von W84 erklärbar.

Die Mutation $M_2E172P/4.74$, also zur korrespondierenden Aminosäure des M_5 wt, führt zu einem etwas stärkeren Affinitätsverlust für W84 als $M_2E172L/4.74$ [119]. Dies kann möglicherweise durch eine Konformationsänderung des e2-Loops erklärt werden, da der Affinitätsverlust bei Einführung des Prolins größer ist als bei reiner Entfernung der negativen Ladung [119]. Ein Austausch dieser Aminosäure ist im Rezeptormodell nicht so einfach möglich, weil sich die Protein-Rückgrat-Geometrie des gesamten Bereiches ändert. Auf eine Modellierung dieser Mutante wird verzichtet. Allerdings ist vorstellbar, dass in der engen allosterischen Bindungstasche des M_2 -Rezeptors die Geometrieänderung durch Einführung eines Prolins zu ungünstigen Veränderungen für die Bindung allosterischer Modulatoren führen kann.

Insgesamt stehen die Ergebnisse dieser GRID-Untersuchungen zur sauren Sequenz im e2-Loop sehr gut in Einklang mit experimentellen Ergebnissen. Die Bedeutung dieser wichtigen Aminosäuresequenz kann ausgezeichnet nachvollzogen werden und auch die unterschiedlichen Einflüsse der Aminosäuren und der überadditive Effekt der Doppelmutante werden durch das hier vorgestellte M_2 -Modell erklärt.

8.1.2 Mutationen Y177Q und W422A, T423H

Für zwei weitere Aminosäurepositionen sind bereits zu Beginn der Arbeit Einflüsse auf die Bindungsneigung allosterischer Modulatoren bekannt. Die beiden Positionen 5.29 im e2 und 7.36 in TM7 werden für die M_2/M_5 -Subtypselektivität verantwortlich gemacht [68]. *Der Einfluss der Mutanten $M_2Y177Q/5.29$ und $M_2T423H/7.36$ soll am M_2 -Modell näher betrachtet werden. Zusätzlich soll die Bedeutung des konservierten Tryptophans $M_XW7.35$ geklärt werden, das als Bindungspartner von W84 postuliert wird ($M_2W422/7.35$).*

Mutationsstudien von Prilla zeigen keine direkte Beteiligung der Position 7.36 für die Bindung des allosterischen Modulators. Allerdings kommt es bei Anwesenheit eines Histidins an dieser Position zu einer Verlängerung der [3H]NMS-Dissoziations-Halbwertszeit. Postuliert wird daher ein störender Einfluss des Histidins an dieser Position [109]. Die virtuelle Mutation M_2T423H weist ebenfalls einen störenden Einfluss auf, da durch die Geometrie

des Histidins der freie Raum der allosterischen Bindungstasche deutlich eingeschränkt wird. Eine Bindung von Modulatoren in Nähe der anderen beiden wichtigen Aminosäuren M₂Y177/5.29 und M₂W422/7.35 ist kaum noch möglich.

Weitere experimentelle Daten, die im Verlauf dieser Arbeit von unserem Kooperationspartner erstellt werden, zeigen, dass das in allen muskarinischen Rezeptoren konservierte M_XW7.35 in Bindungsstudien einen Einfluss auf die Basisaffinität von allosterischen Modulatoren ausübt [109, 127]. Die Ergebnisse der GRID-Untersuchungen können auch hier mit experimentellen Ergebnissen in Einklang gebracht werden. Verglichen werden die Veränderungen der GRID-Felder mit der Mutation M₂Y177Q/5.29, deren Einfluss bereits bekannt ist [68]. Für die Mutante M₂W422A/7.35 wird gegenüber M₂Y177Q/5.29 ein größerer Einfluss postuliert.

Einen deutlichen Affinitätsverlust im Vergleich zum M₂wt weist W84 an der Doppelmutante M₂W422A/T423H auf. Zusätzlich ist W84 hier auch bei maximalen Konzentrationen nicht mehr in der Lage, die Dissoziation von [³H]NMS vollständig zu hemmen [109]. Um tiefere Einblicke zu erhalten wird mit dieser Doppelmutante eine Moleküldynamiksimulation des ternären Komplexes durchgeführt. Da die automatische Positionierung von M₂H423 durch SCWRL allerdings zu einer starken Verengung der allosterischen Bindungstasche führt, ist mit dieser Geometrie eine Bindung von W84 in Nähe des Y177/5.29 nicht mehr möglich. Dass W84 aber wahrscheinlich dennoch in Nähe von M₂Y177/5.29 bindet, wird von Prilla postuliert, die bei Mutations- und Bindungsstudien an der Tripelmutante M₂Y177Q,W422A,T423H einen im Vergleich zur oben genannten Doppelmutante weiteren Affinitätsverlust für W84 zeigen kann [127]. Aus diesem Grund wird zur Positionierung von W84 eine manuelle Rotation der His-Seitenkette vorgenommen. Die minimierte Struktur weist keine ungünstigen Kontakte auf.

Die Ergebnisse der Mutationsstudien und Moleküldynamiksimulationen können mit den experimentellen Daten gut in Einklang gebracht werden, und sind z. T. zusammen mit den experimentellen Ergebnissen unserer Kooperationspartner Prof. Dr. K. Mohr und Prof. Dr. J. Ellis im Jahr 2006 in *Molecular Pharmacology* veröffentlicht worden [109]. Bei der Doppelmutante M₂W422A/T423H kommt es während der MDS zu einer starken Positionsveränderung von W84. Die Bewegung der proximalen Ammoniumgruppe des Modulators verdeutlicht hier möglicherweise eine beginnende Diffusion von W84 aus dem M₂-Rezeptor. Insgesamt ist W84 nicht mehr so tief in der Bindungstasche lokalisiert. Zusätzlich wird die Wechselwirkung mit der verbleibenden aromatischen Aminosäure M₂Y177/5.29 schwächer, was durch eine Abstandsvergrößerung der aromatischen Ringe erklärt werden kann. Dies ist möglicherweise eine Erklärung für die verminderte Hemmung der [³H]NMS-Dissoziation durch W84. Die Position von W84 ist nicht mehr ideal, um die Loop-Bereiche so stark zu fixieren, dass eine Dissoziation unterbunden werden kann. Die Wahrscheinlichkeit, dass NMS an W84 vorbei diffundieren kann, ist in der Doppelmutante M₂W422A,T423H gegenüber dem M₂wt höher.

Dies wird möglicherweise auch dadurch begünstigt, dass die Entfernung der großen Trp-Seitenkette zu einer Raumvergrößerung der allosterischen Bindungstasche führt. Außerdem geht ein wichtiger Kontakt zwischen e2 und TM7 verloren. Für den e2 wird in anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine Funktion zur Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes des Rezeptors postuliert [147, 148]. Eine Unterbrechung der Kontakte zwischen dem Loop und helikalen Bereichen führen dort zu erhöhter konstitutiver Aktivität. Diese Erkenntnisse können auch auf das M_2 -Modell übertragen werden. W84 füllt den Raum der allosterischen Bindungstasche zwischen e2 und den anderen extrazellulären Bereichen gut aus und stabilisiert dadurch den zweiten extrazellulären Loop. Eine Unterbrechung des Kontaktes M_2 Y177/5.29 und M_2 W422/7.35 durch Mutation führt im Rezeptormodell zu einer erhöhten Flexibilität und einer geringeren Fähigkeit zur Stabilisierung des e2 durch W84 im ternären Komplex.

Insgesamt betrachtet gibt das M_2 -Modell den Einfluss verschiedener Punktmutationen auf die Bindung von W84 recht genau wieder. Ein detaillierter Einblick in den Bindungsmodus von W84 ist möglich. Das in dieser Arbeit erstellte M_2 -Modell ist demnach sehr gut geeignet, die bisher untersuchten Fragestellungen der experimentellen Pharmakologie zu beantworten. Der Bindungsmodus von W84 wird daher für Vergleiche mit anderen Liganden des M_2 -Rezeptors verwendet.

8.2 Vergleich Agonist, Partialagonist und inverser Agonist

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, zu klären, ob die Ergebnisse der Moleküldynamiksimulationen mit den Eigenschaften der Liganden in Verbindung gebracht werden können. Der stabilisierende Einfluss der beiden Antagonisten NMS und W84 soll hierbei überprüft werden. Das Verhalten des M_2 -Rezeptors in unterschiedlichen Simulationen soll neue Erkenntnisse bringen.

Hierzu werden Untersuchungen mit Acetylcholin und Pilocarpin angestellt. Verglichen mit dem unbesetzten Rezeptorzustand stabilisieren alle Liganden die helikalen Bereiche des M_2 -Rezeptors. Dies kann dadurch begründet werden, dass der unbesetzte Rezeptorzustand durch den fehlenden Liganden viel flexibler ist. In MDS kommt es durch die Verkleinerung des unbesetzten aktiven Zentrums zu stärkeren Veränderungen der helikalen Bereiche. Die Stabilisierung des inaktiven Zustandes ist durch den inversen Agonisten am besten, während der Partialagonist und der Agonist nicht so gut in der Lage sind, den Rezeptor zu stabilisieren. Bei weiteren Auswertungen zeigt sich, dass die flexiblen Loop-Regionen, die zum Teil hohe Fluktuationen aufweisen, bei Bindung von Agonisten stärker fluktuieren als der unbesetzte Rezeptor. Der Antagonist NMS vermindert hingegen die Anzahl der stark fluktuierenden Aminosäuren. Dies steht im Einklang mit den Vorstellungen zur Aktivierung von GPCRs. Agonisten sollen hier auch zu einer größeren Konformationsänderung der flexiblen Loop-Bereiche führen, während inverse Agonisten diese Bereiche stabilisieren.

Diese theoretisch erhaltenen Ergebnisse sollen allerdings nicht so verstanden werden, dass der Rezeptor während der MDS durch die Agonisten in einen aktiven Zustand überführt wird. Hierzu fehlt jede Evidenz, denn die Kraftfeldparameter können die elektronischen Verhältnisse im Protein nur sehr grob wiedergeben, und die Moleküldynamiksimulationen sind mit sechs Nanosekunden viel zu kurz, um solche langwirkenden Änderungen nachahmen zu können. Dies wird auch nicht versucht, da mit der Ungenauigkeit eines Homologie-Modells die Fehlerquote in Moleküldynamiksimulationen viel zu schnell ansteigt, um noch aussagekräftige Ergebnisse erhalten zu können. Durch die relativ kurzen Dynamiksimulationen soll der Fehler des Homologie-Modells möglichst niedrig gehalten werden. Für die Konformationsänderung vom inaktiven in den aktiven Zustand von verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind Reaktionsgeschwindigkeiten im Millisekundenbereich gefunden worden [136]. Solche Zeiträume sind mit MDS nicht darstellbar. Hier wird bloß eine Tendenz gezeigt, die das unterschiedliche Verhalten der Substanzen im direkten Vergleich miteinander darstellen soll. Da immer das gleiche Ausgangsmodell verwendet wird, kann das unterschiedliche Verhalten auf den Einfluss der Substanzen zurück geführt werden.

8.3 Vergleich Alkanbisammoniumverbindungen

Untersuchungen der Bindungsmodi weiterer Alkanbisammoniumverbindungen sollen Aussagen zu mehreren Fragestellungen treffen. Durch ein Docking verschiedener Derivate soll der Bindungsmodus des manuell platzierten W84 überprüft und mit anderen Derivaten verglichen werden.

8.3.1 Docking von Alkanbisammoniumverbindungen

Beim Docking der Alkanbisammoniumverbindungen werden für die verkürzten Modulatoren mehr Komplexe erzeugt, um einen größeren Konformationsraum abdecken zu können. Für die ungekürzten Modulatoren bietet die Enge der allosterischen Bindungstasche nicht viele verschiedene günstige Bindungs-Möglichkeiten an. Daher scheint eine Beschränkung auf 25 Komplexgeometrien ausreichend. Die Lage von W84 aus dem Docking unterscheidet sich nur geringfügig von der manuellen Platzierung. Auch für Naphmethonium ist bereits ein möglicher Bindungsmodus bekannt, der überprüft werden soll. Im Jahr 2007 wurde im Rahmen einer Bachelor-Arbeit des Studienganges Biochemie von Herrn M. Kirov, an einer etwas modifizierten Version des hier vorgestellten M₂-Modells, der Bindungsmodus von Naphmethonium herausgearbeitet [149]. Zur Klärung des Bindungsmodus wurden dort unterschiedliche Geometrien von Naphmethonium betrachtet. Kirov verwendete eine Vorgänger-Version des in dieser Arbeit vorgestellten Modells. Dieses unterscheidet sich nur leicht in der Geometrie des N-Terminus, denn der letzte Schritt in der Erstellung des N-Terminus (eine kurze MDS zur Relaxierung der Verknüpfungspunkte, vgl. Abschnitt 4.3.1, S. 51) war in dem dort verwendeten Modell noch

nicht berücksichtigt. Die anderen Protein-Bereiche sind mit dem hier vorgestellten Modell identisch.

Die Interaktion des Naphthalimid-Ringes mit den beiden aromatischen Aminosäuren in e2/TM7 zeigte in seiner Arbeit insgesamt günstigere Wechselwirkungsenergien und eine bessere Stabilisierung des M₂-Rezeptors als eine ebenfalls mögliche Wechselwirkung mit dem Phthalimid-System. Die Ergebnisse aus dem hier vorgenommenen Docking mit GOLD postulieren eine bevorzugte Bindung des Naphthalimid-Ringes zwischen den beiden affinitätsgebenden Aminosäuren M₂Y177/5.29 und M₂W422/7.35 in TM7 und stehen daher im Einklang mit den Ergebnissen von Kirov.

Da die im Docking jeweils am höchsten bewerteten Strukturen der Naphmethonium-Reihe immer etwas höher bewertet werden als die gleichen Derivate der W84-Reihe, kann angenommen werden, dass die Wechselwirkungsmöglichkeiten des größeren aromatischen Ring-Systems und des dimethylierten Propyl-Linkers günstiger für die Bindung im Rezeptorprotein sind. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit erhaltenen Affinitätsparametern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Mohr. Hier wird für die verkürzten W84-Derivate eine niedrigere Affinität angenommen als für die Naphmethonium-Derivate. Zum besseren Vergleich, und da einige Daten bisher noch nicht publiziert worden sind, werden die Affinitätsparameter der untersuchten Substanzen, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. K. Mohr, in Tabelle 8.1 abgebildet.

Modulator	pEC _{0,5diss} (M ₂ wt)	pK _A (M ₂ wt)
Naphmethonium	9,04 ± 0,04	8,19 ± 0,11
EHW477	7,88 ± 0,05	7,79*# ± 0,01
MM7A	6,31 ± 0,05	6,31*# ± 0,02
W84	7,40 ± 0,03	7,82 ± 0,02
SH30	6,31 ± 0,05	6,35# ± 0,13
SH75	4,58 ± 0,06	4,87# ± 0,14

Tabelle 8.1: Affinitätsdaten für Alkanbisammoniumverbindungen. pEC_{0,5diss}, Negativer dekadischer Logarithmus der Modulator-Konzentration, welche zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt; pK_A, Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators; Nicht markierte Werte stammen aus [127]; *, pK_A-Wert berechnet über pEC_{0,5diss}, da nicht direkt messbar; #, unveröffentlichte Daten, mit freundlichem Dank erhalten von Prof. Dr. K. Mohr (Pharmazeutisches Institut, Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn).

Dass die beiden Modulatoren mit nur einer positiven Ladung (MM7A und SH75) im Docking deutlich niedriger bewertet werden als die anderen vier Modulatoren, steht ebenfalls in Einklang mit Untersuchungen von Prilla an ternären M₂-Rezeptor-Komplexen (vgl. Tab. 8.1, pEC_{0,5diss} (M₂wt)) [127]. Diese zeigen, dass die Entfernung einer der beiden positiven Ladungen einen stärkeren Affinitätsverlust zur Folge hat als die reine Eliminierung eines der lateralen Ringsysteme. Der Affinitätsverlust zwischen Naphmethonium

und EHW477 beträgt 1,2 Log-Einheiten, während der Affinitätsverlust zwischen EHW477 und MM7A ca. 1,6 Log-Einheiten beträgt. Für die W84-Reihe gilt ähnliches. Hier betragen die Unterschiede für das Paar W84-SH30 1,1 Log-Einheiten und für das Paar SH30-SH75 ca. 1,7 Log-Einheiten.

Die verkürzten Derivate weisen grundsätzlich eine ähnliche Anordnung in der allosterischen Bindungstasche auf, die gut mit bisherigen Vorstellungen zur Bindung dieser Modulatoren übereinstimmen. Hierbei ist die Positionierung des Naphthalimid-Ringes zwischen den affinitätsgebenden Aminosäuren M₂Y177/5.39 und M₂W422/7.35 sehr einheitlich, während die W84-Derivate leichte Unterschiede aufweisen. Daten von Mutations- und Bindungsstudien die während Durchführung dieser Arbeit erhoben wurden, können den hier postulierten Bindungsmodus von MM7A bestätigen. Sie ergeben, dass auch die verkürzten Alkanbisammonium-Derivate eine Epitopabhängigkeit von den aromatischen Aminosäuren M₂Y177/5.39 und M₂W422/7.35 aufweisen. Durch die experimentellen Ergebnisse und durchgeführte Moleküldynamiksimulationen mit MM7A werden mehrere Aspekte der allosterischen Modulation muskarinischer Rezeptoren verdeutlicht. Zum einen ist die Größe von MM7A ausreichend, um eine deutliche Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation vom M₂-Rezeptor zu erreichen. Zum anderen zeigen MDS des unbesetzten und MM7A-besetzten M₂-Rezeptors sowie des ternären Komplexes mit MM7A, dass die im inaktiven Zustand bestehende Verbindung zwischen den beiden aromatischen Aminosäuren M₂Y177/5.39 und M₂W422/7.35 durch die Anwesenheit eines allosterischen Modulators weiter verstärkt und rigidisiert wird. Dieser Kontakt hält möglicherweise den zweiten extrazellulären Loop in einer inaktiven Geometrie. Die theoretisch erhaltenen Ergebnisse stehen sehr gut in Einklang mit experimentellen Daten, die darauf hindeuten, dass M₂W422/7.35 an der Bindung von Acetylcholin bzw. Aktivierung durch Pilocarpin beteiligt ist. Eine Konformationsänderung dieser Aminosäure soll bei beiden orthosterischen Liganden eine Rolle spielen. Die Bindung von MM7A stabilisiert die Konformation von M₂W422/7.35, was z.B. zu einer verminderten Aktivierung des Rezeptors durch Pilocarpin führen könnte. Die große Bedeutung der hier vorgestellten Ergebnisse wird dadurch dokumentiert, dass sie im Jahr 2007 zusammen mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. K. Mohr und von Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe (Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg) in der international anerkannten Fachzeitschrift *Journal of Biological Chemistry* zur Publikation akzeptiert worden sind [135]. Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit Untersuchungen an anderen Rezeptoren, die ebenfalls einen größeren Einfluss des e2-Loops im Aktivierungsprozess von GPCRs postulieren. Die Ergebnisse der Arbeiten zu muskarinischen Rezeptoren geben allerdings nun zum ersten Mal Hinweise auf die mögliche Beteiligung einer direkten Verbindung zwischen dem e2 und TM7 beim Aktivierungsvorgang von G-Protein gekoppelten Rezeptoren [135].

8.3.2 Vergleich W84 – Naphmethonium

Aus Tabelle 8.1 auf Seite 156 geht hervor, dass Naphmethonium eine höhere Affinität zum NMS-besetzten als zum freien Rezeptor aufweist ($pEC_{0,5diss} > pK_A$). Es zeigt eine positive Kooperativität der NMS-Bindung. W84 hingegen weist negative Kooperativität auf ($pEC_{0,5diss} < pK_A$). Diese auffälligen Unterschiede stehen auch im Einklang mit früher erhaltenen Daten [75]. Diese grobe und rein tendenzielle Angabe der Kooperativität ist für die Fragestellungen dieses Modells ausreichend.

Das M_2 -Modell soll erste Einblicke liefern, die möglicherweise ein unterschiedliches kooperatives Verhalten von W84 und Naphmethonium wiedergeben können. Dieses unterschiedliche Verhalten wird in Moleküldynamiksimulationen der beiden Modulatoren am freien und am NMS-besetzten Rezeptor untersucht. Im freien M_2 -Rezeptor ist kein Ligand in der orthosterischen Bindungstasche lokalisiert.

Bindungsmodus Naphmethonium

Durch Simulation des ternären M_2 -Komplexes mit der Naphmethonium-Geometrie, die aus dem Docking stammt, soll überprüft werden, ob sich die Simulationen von Kirov und dieser Arbeit deutlich unterscheiden, oder ob sie vergleichbar bleiben. Deutlichere Unterschiede könnten durch die Änderungen der Startgeometrie des Rezeptors möglich sein. Aus den Ergebnissen geht allerdings hervor, dass die leichten Modifikationen des N-Terminus toleriert werden. Dies steht im Einklang mit experimentellen Untersuchungen, in denen kein direkter Einfluss des N-Terminus auf die Affinitäten von allosterischen Modulatoren festgestellt wird [128]. Auch eine leicht veränderte Positionierung des Liganden wird toleriert.

Vergleich der Energiewerte von W84 und Naphmethonium

Die aus den Moleküldynamiksimulationen erhaltenen Energiewerte stehen tendenziell in Einklang mit experimentellen Ergebnissen zum unterschiedlichen kooperativen Verhalten der beiden Verbindungen. Die Wechselwirkungsenergie von W84 ist am freien Rezeptor höher als am NMS-besetzten Rezeptor, während Naphmethonium ein gegenteiliges Verhalten zeigt. Auch im späten Bereich der MDS des ternären Naphmethonium-Komplexes, in dem es zu einer Verschlechterung der Wechselwirkungsenergie kommt, zeigt der Modulator dennoch eine stärkere Interaktion mit dem Protein als am freien Rezeptor. Für NMS gilt das gleiche. Im Komplex mit W84 weist es geringere Protein-Ligand-Wechselwirkungen auf als im rein orthosterisch besetzten Rezeptor bzw. im Komplex mit Naphmethonium. Diese Ergebnisse stehen gut in Einklang mit experimentellen Daten. Hier sind in Zukunft weitere Untersuchungen notwendig, die detaillierte Unterschiede der beiden Modulatoren in den jeweiligen Rezeptorkomplexen beleuchten.

Im ternären Komplex zeigt Naphmethonium im Vergleich mit W84 eine deutlich höhere Protein-Ligand-Wechselwirkung mit dem M_2 -Rezeptor. Erste Hinweise für die deutlichen

Affinitätsunterschiede von W84 und Naphmethonium in den ternären Komplexen können von repräsentativen Rezeptorgeometrien aus MDS abgeleitet werden. Zur Verdeutlichung sind diese Dynamikstrukturen in Abbildung 8.1 dargestellt. Die höhere Wechsel-

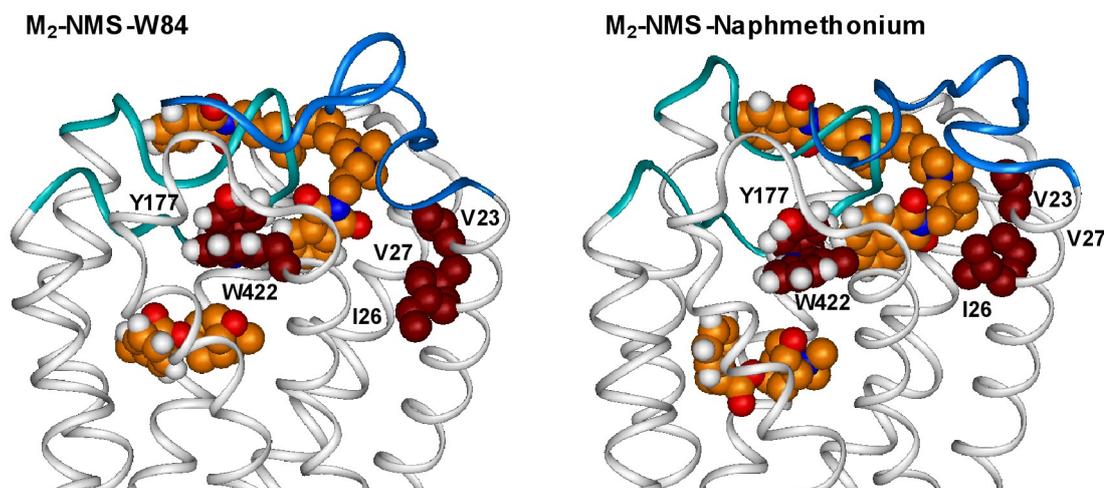


Abbildung 8.1: Strukturen von W84 und Naphmethonium im Komplex mit dem NMS-besetzten M₂Rezeptor. Repräsentative Strukturen aus Moleküldynamiksimulationen.

wirkungsenergie kann mit den unterschiedlichen Bindungsmodi in Einklang gebracht werden. Naphmethonium nimmt den Raum der allosterischen Bindungstasche fast vollständig ein. Zur Bindung nutzt es zusätzlich die in TM1 gelegenen aliphatischen Aminosäuren M₂V23/1.32, M₂I26/1.35 und M₂V27/1.36. Dies wird durch die Verzweigung des Propyl-Linkers verursacht. Die beiden zusätzlichen Methylgruppen können schwache disperse Wechselwirkungen mit den aliphatischen Aminosäuren eingehen. Hierdurch wird auch das größere aromatische Ringsystem besser stabilisiert. Dies ist für die Bindung von W84 nicht so gut möglich. Im Komplex mit Naphmethonium wird auch die Position von TM1 im Verhältnis zu TM7 stärker fixiert als im Komplex mit W84.

Der Einfluss der Strukturmodifikationen zwischen Naphmethonium und W84 könnte über diese bessere Wechselwirkung mit den drei aliphatischen Aminosäuren also erklärt werden. Die in TM1 liegenden aliphatischen Aminosäuren sind möglicherweise an der Ausbildung der Bindungstasche beteiligt. Weitere Untersuchungen mit Mutanten an dieser Position könnten hier Aminosäurepositionen in der ersten transmembranären Helix aufdecken, die eine Bedeutung für die Bindung von allosterischen Modulatoren haben. Eine Verlängerung der Seitenketten von Naphmethonium führt möglicherweise zu weiteren Affinitätssteigerungen. Dies könnte auch zu einer erhöhten M₂/M₅-Subtypselektivität führen, da im M₅-Rezeptor genau in diesem Bereich eine deutliche Volumeneinschränkung zu sehen ist. Naphmethonium bindet in ternären Komplexen am M₅-Rezeptor zwar stärker als W84 (0,8 Log-Einheiten, Faktor 6,5), aber am M₂-Rezeptor ist dieser Affinitätsunterschied viel deutlicher ausgeprägt (1,64 Log-Einheiten, Faktor 43,7) [109].

In Untersuchungen zu strukturmodifizierten W84-Derivaten werden in ternären M₂-NMS-

Komplexen schrittweise Affinitätssteigerungen erreicht, die durch eine Einführung von Methyl-, Ethyl- oder Propyl-Substituenten am mittleren Kohlenstoff des Propyl-Linkers verursacht werden [130]. Im ternären M_2 -Komplex führt die Einführung eines Isobutylrestes zu keiner weiteren Affinitätssteigerung [130]. Der Raum der proximalen Bindungstasche mit dem Phthalimidsystem und der Größe eines Isobutylrestes ist maximal ausgefüllt. Die Derivate werden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Sie liefern aber Evidenz für den hier postulierten Bindungsmodus von Alkanbisammoniumderivaten und eine leichte Beteiligung von Aminosäuren aus TM1.

8.3.3 Vergleich verschiedener ternärer Naphmethonium-Komplexe

Für Naphmethonium wird eine negative Kooperativität auf die Bindung von Acetylcholin im M_2 -Rezeptor und auf die Aktivierung des M_2 -Rezeptors durch Pilocarpin beschrieben [135]. Die Geometrie der inaktiven Rezeptorzustände von NMS und Pilocarpin sollen sich hierbei ähneln, da die Kooperativitäten der Bindung dieser beiden Liganden mit Naphmethonium übereinstimmen, während für den Acetylcholin-Rezeptorkomplex eine andere Geometrie postuliert wird. In Moleküldynamiksimulationen wird festgestellt, dass sowohl Pilocarpin als auch Acetylcholin in der Lage sind, die Anzahl der stark fluktuierenden Aminosäuren der Loop-Regionen zu erhöhen. Dies kann auf eine beginnende größere Konformationsänderung des Rezeptors hinweisen. MDS sollen zur Untersuchung des experimentellen Einflusses von Naphmethonium auf die Bindung eines Agonisten heran gezogen werden. Eine Untersuchung des ternären M_2 -Pilocarpin-Naphmethonium-Komplexes wird durchgeführt. Da für die Bindung von Acetylcholin eine andere Rezeptorgeometrie postuliert wird, erscheint eine Untersuchung des ternären Komplexes mit Acetylcholin nicht sinnvoll. Die Ergebnisse wären mit sehr viel Spekulation verbunden, da keine Strukturinformationen für aktiven Zustand des Acetylcholin-Komplexes existieren. Da für Pilocarpin und NMS ähnliche Geometrien der inaktiven Rezeptoren postuliert werden, ist eine Untersuchung des M_2 -Pilocarpin-Naphmethonium-Komplexes mit dem M_2 -Rezeptormodell möglich. Hier kann gezeigt werden, dass es bei Simulation von ternären Komplexen mit Naphmethonium sowohl bei Anwesenheit des inversen Agonisten NMS als auch des Partialagonisten Pilocarpin zu einer Verminderung der Anzahl stark fluktuierender Aminosäuren kommt. Naphmethonium selbst führt ebenfalls zu einer Stabilisierung des M_2 -Rezeptors. In Kombination mit einem inversen Agonisten kann Naphmethonium den M_2 -Rezeptor noch weiter stabilisieren. Der Einfluss von Pilocarpin, der normalerweise zu einer erhöhten Fluktuation des Rezeptors führt, wird im ternären Komplex allerdings reduziert. Auch hier kann gezeigt werden, dass das M_2 -Modell mit experimentellen Ergebnissen in sehr gutem Einklang steht.

8.3.4 Einfluss von W427 auf Alkanbisammoniumderivate

Moleküldynamiksimulationen der verkürzten allosterischen Modulatoren werden in dieser Arbeit auch dazu heran gezogen, den Einfluss einer anderen aromatischen Aminosäure auf die Bindung von Alkanbisammoniumverbindungen im M_2 -Rezeptor zu klären. Prilla stellt an der Mutante $M_2W427A/7.40$ leichte Affinitätsgewinne für Alkanbisammoniumderivate im ternären Komplex mit NMS fest [127]. Sie kann allerdings keine direkte Erklärung für diesen eher störenden Einfluss des Tryptophans finden. In den Moleküldynamiksimulationen kann das Auftreten einer Wasserstoffbrücke möglicherweise einen Erklärungsansatz für diesen Einfluss bieten. Dieses Ergebnis scheint zunächst widersprüchlich, da eine Wasserstoffbrücke normalerweise zu einer verstärkten Bindung eines Liganden führt und zwischen zwölf und $20\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ Bindungsenergie liefert [150]. Der Affinitätsgewinn durch Mutation $M_2W427A/7.40$ ist so nicht direkt erklärbar. Weitere Auswertungen können hier aber Lösungsansätze bieten.

Durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke kommt es zu einer leichten Abstandsvergrößerung des Naphthalimidrings zu $M_2Y177/5.29$. Der Einfluss wird tendenziell größer, je stärker die Verkürzung des allosterischen Modulators ist. Dies führt möglicherweise zu einer verminderten Hemmung der NMS-Dissoziation, da es zu einer leichten Destabilisierung der Verbindung zwischen den aromatischen Aminosäuren $M_2Y177/5.29$ in e2 und $M_2W422/7.35$ in TM7 kommt. Da die Konzentration der halbmaximalen Dissoziationshemmung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ ein Maß für die Affinität der Modulatoren an ternären Komplexen darstellt, ist hier möglicherweise ein Erklärungsansatz gegeben. Die Auflösung dieser aromatischen Verbindung wurde kürzlich im Zusammenhang mit dem Aktivierungsvorgang der Rezeptoren postuliert. Die Ergebnisse hierzu werden bereits in Abschnitt 8.3.1 diskutiert [135].

EHW477 zeigt grundsätzlich einen größeren Abstand zu $M_2Y177/5.29$ als die anderen beiden allosterischen Modulatoren. Die Wechselwirkung mit den Aromaten ist hier nicht so stark wie bei Naphmethonium oder MM7A. Während bei Naphmethonium und MM7A die Anzahl der positiven Ladungen und aromatischen Ringsysteme im Molekül jeweils gleich ist, besitzt EHW477 zwei positive Ladungen und nur ein aromatisches Ringsystem. Möglicherweise haben hier die positiven Ladungen einen größeren Einfluss auf die Ligandbindung als der Aromat. EHW477 könnte durch die zweite positive Ladung etwas von den aromatischen Aminosäuren weg gezogen werden. Der Energieverlust in der Geometrie mit Wasserstoffbrücke fällt niedrig aus, da sich die Positionierung bei EHW477 nur geringfügig ändert. Ein Affinitätsverlust ist nicht so groß, weil EHW477 immer noch in der Lage ist, den e2 deutlich zu rigidisieren. Hierdurch wird der extrazelluläre Bereich stabilisiert und eine Dissoziationsverzögerung von NMS kann aufrecht erhalten werden. Prilla kann zeigen, dass mit dem zweiten lateralen Phthalimid-System die Abhängigkeit der Modulatorbindung von $M_2Y177/5.29$ zunimmt [127]. Diese Ergebnisse können darauf hindeuten, dass der zweite laterale Ring den ersten aromatischen Ring eines Modulators aus sterischen Gründen besser in der proximalen Bindungstasche positioniert. Der

Kontakt zu den beiden aromatischen Aminosäuren wird durch die maximale Größe von Naphmethonium stabilisiert. Bei Naphmethonium ist der starke Energieverlust nicht über die unterschiedlichen Abstände im Bereich des aromatischen Clusters zu erklären. Hier zeigt sich allerdings eine Geometrieänderung im Bereich des Phthalimidringes. Vermutlich ist diese Geometrieänderung aber nicht auf die Existenz der Wasserstoffbrücke zwischen W427/7.40 zurück zu führen. Die beiden betrachteten ternären Naphmethoniumkomplexe stammen aus unterschiedlichen Phasen der Dynamiksimulation, während bei EHW477 und MM7A, durch das relativ regelmäßige Auftreten dieser Wasserstoffbrücke, die untersuchten Dynamikstrukturen stärkere Ähnlichkeiten aufweisen. Hier ist eine mögliche Erklärung für die deutlichen Energieunterschiede der Naphmethoniumkomplexe zu sehen.

Insgesamt betrachtet liefern die Anzahl der Wasserstoffbrücken und die damit verbundenen zwischenzeitlichen Distanz-Vergrößerungen zu den beiden aromatischen Aminosäuren eine gute mögliche Erklärung für den leicht störenden Einfluss von W427/7.40. Die erhaltenen Energiewerte können allerdings aus oben genannten Gründen nicht miteinander verglichen werden. Eine systematische Abstandsanalyse der aromatischen Systeme über die Zeit könnte hier weitere Einblicke liefern.

8.4 Vergleich W84 – Gallamin

Die bisherigen Untersuchungen betrachten ausschließlich allosterische Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ. *Ein weiteres wichtiges Ziel besteht darin, durch die Untersuchung des Bindungsmodus eines strukturell diversen allosterischen Modulators das Modell zu testen. Es soll sichergestellt werden, dass das M_2 -Modell die Bindungsmodi unterschiedlicher Modulator-Typen nachvollziehen kann.*

Für die Klärung des Bindungsmodus wird zunächst ein Docking von Gallamin durchgeführt. Anschließend wird ein Vergleich der Positionierung des Modulators mit GRID-Feldern und deren Veränderungen in Aminosäuremutanten des M_2 -Rezeptors vorgenommen.

8.4.1 Bindungsmodus Gallamin

W84 und Gallamin zählen zu den klassischen allosterischen Modulatoren. Sie haben zwar einige strukturelle Gemeinsamkeiten, weisen aber auch deutliche Unterschiede auf. Daher kann angenommen werden, dass die Bindungsmodi in der allosterischen Bindungstasche ebenfalls Unterschiede aufweisen müssen. Die Positionierung von Gallamin aus dem Docking mit GOLD stimmt gut mit berechneten GRID-Wechselwirkungsfeldern im M_2 wt überein.

Im Gegensatz zu W84 ist bei Gallamin nicht der Aromat zwischen den beiden Aminosäuren M_2 Y177/5.29 und M_2 W422/7.35 in der proximalen Bindungstasche lokalisiert, sondern es wird die Bindung einer der positiv geladenen Seitenketten an dieser Stelle

postuliert. Die Bindungsgeometrie von Gallamin ist hier allerdings eine deutlich andere als im M_2 -Modell von Jöhren [110]. Dort wird eine Wechselwirkung des Gallamin-Aromaten mit $M_2Y177/5.29$ angenommen. Ihre Untersuchungen wurden ebenfalls mit GRID-Wechselwirkungsfeldern durchgeführt. Die Platzierung von Gallamin erfolgte allerdings manuell in die Bindungstasche, und die Konturierung der Felder wurde auf einem deutlich niedrigeren Energieniveau vorgenommen (-2kcal, Aromaten; -5,5kcal, quartäre Ammoniumgruppen) [110]. Im hier vorgestellten M_2 -Modell ist dieser Bindungsmodus aus sterischen Gründen nicht möglich und wird von keiner der fünfzig Docking-Geometrien vorhergesagt. Hier abgebildete Wechselwirkungsmöglichkeiten für Trimethylammonium-Gruppen, die durch die *NM3*-Sonde dargestellt werden, sind auf einem Energieniveau von -8,9kcal sehr spezifisch.

Die Positionierung einer weiteren positiv geladenen Seitenkette in der Nähe eines zweiten spezifischen *NM3*-Feldes und die aromatischen Felder geben zusätzliche Sicherheit für den hier postulierten Bindungsmodus von Gallamin. Allerdings wird durch die kleinen aromatischen *C1*-Felder nur eine geringe Wechselwirkungsmöglichkeit für den Aromaten in diesem Bereich und auf diesem Energieniveau abgebildet. Dies ist ein weiterer Unterschied zum Bindungsmodus von W84. Hier ist eine deutlich stärkere aromatische Wechselwirkungsmöglichkeit gegeben. Damit hat der Aromat für die W84-Bindung vermutlich größere Bedeutung als die quartären Ammoniumgruppen. Dies steht im Einklang mit experimentellen Daten, die stärkere Affinitätsabnahmen für W84 an Mutationen der proximalen Bindungstasche feststellen als an Mutationen, die wichtig für die Bindung quartärer Ammoniumverbindungen sind ($M_2E172L/4.74, M_2E175Q/4.77$) [109, 127].

Die dritte Ammonium-Seitenkette von Gallamin liegt in Richtung der ersten transmembranären Helix und zeigt unspezifischere Wechselwirkungen. Die hier angrenzenden Aminosäuren sind wieder die verzweigt-kettigen Aminosäuren $M_2V23/1.32$, $M_2I26/1.35$ und $M_2V27/1.36$, für die in dieser Arbeit ein leichter Einfluss auf die Naphmethonium-Bindung postuliert wird.

8.4.2 Einfluss von Mutationen auf die Gallamin-Bindung

Mutationen an Position 7.32

Die Veränderungen der GRID-Felder durch Mutationen der Aminosäure $M_2N419/7.32$ geben weitere Evidenz für den postulierten Bindungsmodus von Gallamin. Während in experimentellen Untersuchungen kein großer Einfluss dieser Aminosäure auf die Bindung von W84 nachgewiesen werden kann [127], ist sie für die Subtypselektivität von Gallamin wichtig [70]. Hierbei wird festgestellt, dass die Affinität von Gallamin bei Substitution von Asparaginamid im M_2 -Rezeptor durch die korrespondierenden sauren Aminosäuren des M_4 - bzw. M_1 -Rezeptors leicht ansteigt, während die Substitution durch das basische Lysin aus dem M_3 -Rezeptor zu einer Verminderung der Gallamin-Affinität führt. In einer anderen, vergleichbaren Untersuchung kommt man bei der Mutation $M_2N419K/7.32$ zu

ähnlichen Ergebnissen [119]. Zusätzlich wird dort auch ein Vergleich zwischen dem M₂- und dem M₅-Rezeptor vorgenommen. Sowohl bei M₂N419V als auch bei der reversen Mutation, M₅V474N wird ein leichter Affinitätsgewinn im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp festgestellt. Daher scheint der M₂/M₅-Austausch an dieser Position keine große Bedeutung zu haben. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen von Prilla unterstützt [127] und steht gut in Einklang mit den Veränderungen der Wechselwirkungsfelder im M₂-Rezeptor, da sich hier keine großen Veränderungen durch Austausch von Asn → Val ergeben. Die Anwesenheit von sauren oder basischen Aminosäuren ist entscheidender, was den postulierten Bindungsmodus einer quartären Ammoniumgruppe von Gallamin in der proximalen Bindungstasche weiter stützt. Hier ergeben sich wieder deutliche Defizite des Vorgängermodells, da dort der Aromat in der proximalen Bindungstasche gebunden wird. Die Anwesenheit von sauren oder basischen Gruppen übt auf die Bindung von Aromaten nur geringe Einflüsse aus, was durch die Untersuchungen mit W84 deutlich wird. Die experimentell erhaltenen Daten können demnach nicht durch das Vorgängermodell erklärt werden. Das neu erstellte M₂-Modell steht also auch hier deutlich besser in Einklang mit experimentellen Daten als das bisher verwendete Modell.

Mutationen der Positionen 4.74 und 4.77

Die Mutationen der beiden sauren Aminosäuren im e2 des M₂-Rezeptors, M₂E172/4.74 und M₂E175/4.77 führen zu Affinitätsabnahmen von Gallamin an der entsprechenden Rezeptormutante [119]. Der Einfluss der Aminosäure M₂E175/4.77 ist, wie bei W84, für die Gallamin-Bindung stärker als der Einfluss von M₂E172/4.74 [70, 119]. Die Doppelmutante M₂E172L,E175Q weist ebenfalls einen überadditiven Effekt im Vergleich zu den Affinitätsabnahmen der Einzelmutanten auf [119]. Allerdings ist der überadditive Effekt bei der W84-Bindung stärker ausgeprägt als bei der Gallamin-Bindung. Diese Ergebnisse können durch die Veränderungen der GRID-Wechselwirkungsfelder nachvollzogen werden. Die beiden wichtigen Wechselwirkungsmöglichkeiten für die quartären Ammoniumgruppen von Gallamin bleiben bei der Mutation M₂E172L/4.74 weitgehend erhalten, während bei M₂E175Q/4.77 und der Doppelmutante deutlichere Änderungen zu sehen sind. Bereits an der Mutante M₂E175Q/4.77 ist die Wechselwirkungsmöglichkeit für Gallamin viel unspezifischer als am Wildtyp.

Der stärkere überadditive Effekt der Doppelmutante für die Bindung von W84 ist ebenfalls nachvollziehbar. Bei der doppelten Mutation verschwindet auch das dritte große Wechselwirkungsfeld fast vollständig. Während Gallamin diesen Bereich vermutlich weniger nutzt, ist hier die distale W84-Ammoniumgruppe lokalisiert. Damit hat W84 erst in der Doppelmutante kaum noch Wechselwirkungsmöglichkeiten für quartäre Ammoniumgruppen auf diesem Energieniveau.

Mutationen der Positionen 5.29, 7.35 und 7.36

Wie bei W84, wird auch für die Bindung von Gallamin ein störender Einfluss der Mutation M₂T423H/7.36 postuliert [109]. Diese Ergebnisse können durch die Verkleinerungen der NM3-Felder verdeutlicht werden. Zusätzlich existieren Verkleinerungen der NM3-Felder an den Mutanten M₂Y177Q/5.29 und M₂W422A/7.35, deren Einfluss ebenfalls durch experimentelle Untersuchungen belegt wird [109]. Dass der Einfluss von M₂W422A/7.35 für die Affinität von Gallamin hierbei größer ist als von M₂Y177Q/5.29, kann auch anhand der unterschiedlich starken Verkleinerungen der GRID-Felder erklärt werden.

Die experimentellen Befunde lassen sich insgesamt gut mit dem postulierten Bindungsmodus von Gallamin im M₂-Rezeptormodell erklären, der für die Bindung der quartären Seitenketten in der proximalen Bindungs-Region spricht. Weiterhin ist das Rezeptormodell in der Lage, das Verhalten der Rezeptormutanten und die Affinitätsänderungen von Gallamin zu verdeutlichen. Moleküldynamiksimulationen zeigen keine Abwanderung von Gallamin aus dem Rezeptor, und die Komplexe bleiben stabil. Das Rezeptormodell ist also auch in der Lage, den Bindungsmodus eines strukturell diversen allosterischen Modulators wiedergeben zu können.

8.5 Bindungsmodi von Hybridsstoffen

Nachdem das M₂-Rezeptor-Modell bereits Einblicke in unterschiedliche Aspekte der allosterischen Modulation geben kann, wird zum Ende dieser Arbeit überprüft, ob auch Unterschiede zwischen allosterischen Modulatoren und allosterisch-orthosterischen Hybridstoffen dargestellt und wiedergegeben werden können. Pharmakologische Daten deuten bei diesen Hybridstoffen auf einen dualen Bindungsmodus hin. Denn sie zeigen Affinitätsverluste sowohl an Mutanten von M₂Y104/3.33 in der orthosterischen als auch an Mutanten von M₂Y177/5.29 und M₂T423/7.36 [144]. Daher wird postuliert, dass sie sowohl die allosterische als auch die orthosterische Bindungstasche des muskarinischen M₂-Rezeptors nutzen. Einen weiteren interessanten Aspekt stellt die vollagonistische Eigenschaft am M₂-Rezeptor dar [145]. Die Hybride sind damit Substanzen, die vollkommen andere Eigenschaften aufweisen, obwohl sie sich nur in einem relativ eng begrenzten Bereich der Moleküle strukturell von den allosterischen Modulatoren, die Antagonisten darstellen, unterscheiden.

Daher sollen mögliche Bindungsmodi der orthosterisch-allosterischen Hybridstoffen vorgeschlagen werden. Weiterhin soll auch ein möglicher allosterischer Bindungsmodus überprüft und mit einem möglichen dualen Bindungsmodus verglichen werden.

8.5.1 Offenes Rezeptormodell

Um einen dualen Bindungsmodus der Hybridstoffen überhaupt erst zu ermöglichen, muss eine Modifikation des M₂-Modells erfolgen. Die manuelle Öffnung der orthosterischen Bindungstasche ist hier relativ kritisch zu betrachten, da jede manuelle

Veränderung die Unsicherheit des Modells erhöht. Allerdings zeigen Moleküldynamiksimulationen des unbesetzten Rezeptormodells nur eine leicht erhöhte Flexibilität und auch die Qualität der Protein-Geometrie bleibt erhalten. Daher wird dieses Modell für die Untersuchung des Bindungsmodus verwendet.

8.5.2 Docking und Moleküldynamiksimulationen

Die Ergebnisse aus dem Docking der Hybrids-substanzen führt zu der Vermutung, dass der duale Bindungsmodus für die Hybrid-Substanzen bevorzugt ist. In kurzen Moleküldynamiksimulationen bleiben alle Komplexe recht stabil und der duale Bindungsmodus führt nicht zu ungünstigen Geometrieänderungen der helikalen Bereiche. Die günstigere Wechselwirkungsenergie des dualen Bindungsmodus gegenüber allen anderen untersuchten Komplexen weist ebenfalls auf eine bevorzugte Bindung dieser Substanzen im M_2 -Rezeptor hin. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Mohr und geben demnach eine Vorstellung davon, wie die drei affinitätsgebenden Aminosäuren an der Bindung von Hybrid-Substanzen beteiligt sein können. Hier sind allerdings noch intensivere Untersuchungen nötig, da einige Unsicherheiten, z.B. bei Erstellung des offenen Rezeptorzustandes, herrschen.

8.6 Vorhersage von affinitätsgebenden aromatischen Aminosäuren

Abschließend sollen Vorschläge für Mutationsstudien am M_2 -Rezeptor gemacht werden. Hierdurch sollen neue affinitäts- oder subtypselektivitätsgebende Aminosäuren gefunden werden, die Kandidaten für Mutations- und Bindungsstudien an muskarinischen Rezeptoren darstellen.

Mutationsstudien an einzelnen oder mehreren Aminosäuren innerhalb des größeren aromatischen Clusters könnten neue Einblicke sowohl für die Bindung von allosterischen Modulatoren geben als auch Informationen über die Geometrie der muskarinischen Rezeptoren liefern. Die Entfernung mehrerer Aminosäure-Seitenketten innerhalb dieses Clusters kann möglicherweise zu einer Destabilisierung des Rezeptorproteins führen. Zudem ist eine Beteiligung dieses Clusters an der Informationsweiterleitung des von extrazellulär ankommenden Signals in den Intrazellulärraum vorstellbar. Durch die ungerichteten aromatischen Wechselwirkungen der Aminosäuren untereinander ist eine relativ leichte Konformationsänderung des Rezeptorproteins bei der Aktivierung des Rezeptors denkbar.

8.6.1 Aromatisches Cluster

Mutationsstudien an M₂Y80/2.61 könnten neue Informationen über das Bindungsverhalten von allosterischen Modulatoren in Zusammenhang mit dieser Aminosäure bieten. Die Aromatizität an dieser Position ist für muskarinische Rezeptoren möglicherweise spezifisch, da bei nur sehr wenigen anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren an dieser Position eine aromatische Aminosäure vorkommt. Daher ist das Verhalten der transmembranären Helices im Verlauf einer Moleküldynamiksimulation interessant, wenn durch Mutationen die Verbrückung von TM3 und TM7 über Y80/2.61 verloren geht.

Neue Mutationsstudien an M₂W99/3.28 könnten Aussagen über die Bedeutung dieses Tryptophans für den Erhalt der Rezeptorgeometrie bzw. für die verbleibende Aktivierbarkeit des M₂-Rezeptors machen. Bisherige Mutationsstudien ergaben, dass nicht nur die Affinität für Acetylcholin vermindert wird, sondern auch die Signalweiterleitung stark reduziert ist, wenn diese aromatische Seitenkette entfernt wird. Da im M₂-Rezeptormodell kein direkter Kontakt zu orthosterischen Liganden zustande kommt, lässt dies auf einen indirekten Einfluss dieser Aminosäure schließen. Weiterhin ist eine mögliche Beteiligung von M₂W99/3.28 an der Bindung von allosterischen Modulatoren interessant, da sich im Verlauf von Moleküldynamiksimulationen direkte Kontaktmöglichkeiten zu MM7A, aber auch anderen Derivaten wie Naphmethonium ergeben. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen von Frau N. Linsel (Arbeitsgruppe Prof. Dr. K. Mohr), die Bindungsstudien an der Mutante M₂W99A/3.28 durchgeführt hat, bestätigen dass diese Aminosäure einen Einfluss auf die Bindung typischer allosterischer Modulatoren ausübt (N. Linsel, persönliche Mitteilung). Sie kann zeigen, dass die Alkanbisammoniumverbindung WDuo3, die sich in ihren Bindungseigenschaften wie W84 oder Naphmethonium verhält, einen Affinitätsverlust von fast 0,9 Log-Einheiten an dieser Mutante aufweist. Hierdurch wird verdeutlicht, dass das M₂-Modell nicht nur sehr gut in der Lage ist, den Einfluss von Rezeptormutanten nach zu vollziehen, sondern auch die Bedeutung bisher unbekannter Rezeptorepitope auch vorhersagen zu können. Weiterführende theoretische Untersuchungen des Bindungsmodus von WDuo3 an dieser Mutante des M₂-Modells und am M₂wt sind nötig, um den genauen Einfluss dieser Mutante verdeutlichen zu können.

Für die Aminosäure M₂Y104/3.33 wird kein direkter Kontakt zu allosterischen Modulatoren vorhergesagt, obwohl sie räumlich gesehen nicht so weit von der Bindungsstelle entfernt liegt. Dies kann durch kürzlich durchgeführte Untersuchungen von Antony bestätigt werden. Er kann nachweisen, dass die Affinitäten der beiden allosterischen Modulatoren W84 und Naphmethonium nicht von dieser Aminosäure abhängen. keine Abhängigkeit Während orthosterische Liganden und allosterisch-orthosterische Hybridsubstanzen einen Affinitätsverlust an der Mutante M₂Y104/3.33 aufweisen, ist die Bindung allosterischer Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ nicht von dieser Aminosäure abhängig [144]. Diese experimentell erhaltenen Ergebnisse unterstützen die hier postulierte Bindungsgeometrie der Modulatoren, da sowohl im Experiment als auch hier gezeigt werden kann, dass W84 und Naphmethonium nicht tief genug zwischen die Helices ein-

dringen, um in Kontakt mit Y104 treten zu können. Hierdurch wird auch der postulierte geschlossene Zustand des M₂-Rezeptors im ternären Komplex mit NMS und W84 bestätigt.

Wie bereits oben erwähnt, kann Y403/6.51 im M₂-Rezeptormodell im Verlauf einer Moleküldynamiksimulation des ternären Komplexes eine Wasserstoffbrücke zu Y104/3.33 ausbilden (vgl. Abbildung 7.30 auf Seite 137). Zusammen mit M₂Y426/7.39 hat es die größte Bedeutung für die räumliche Trennung der orthosterischen und der allosterischen Bindungstasche im M₂-Rezeptormodell. Einzeln oder über den Kontakt zu M₂W422/7.35 könnte es möglicherweise auch einen Einfluss auf die Bindung von allosterischen Modulatoren haben. Mutationsstudien an dieser Position, in Kombination mit Bindungsstudien von allosterischen Modulatoren, könnten somit neue Einblicke in die Funktionsweise von muskarinischen Rezeptoren bringen. Eine Doppelmutante der Aminosäuren Y177/5.29 und Y403/6.51 könnte neue Einblicke in die Rezeptorgeometrie geben und möglicherweise zeigen, dass der zweite extrazelluläre Loop nicht nur über W422/7.35 Verbindungen zu TM7 besitzt, sondern auch Kontakte zu TM6 möglich sind.

M₂Y426/7.39 geht in MDS mit den allosterischen Modulatoren vom Alkanbisammoniumtyp wahrscheinlich direkte Wechselwirkungen ein und kann Einfluss auf deren Affinität nehmen. Mutationsstudien an dieser Position könnten somit weitere Einblicke in den Bindungsmodus solcher Liganden liefern.

Der Einfluss der Aminosäure M₂W427/7.40 auf die Bindung von allosterischen Modulatoren am M₂-Rezeptor wurde bereits experimentell und theoretisch untersucht. Interessant wäre eine Untersuchung dieser Mutante mit Alkanbisammoniumverbindungen, die keine Wasserstoffbrücken-Akzeptorfunktion in Nähe der aromatischen Ringsysteme aufweisen. Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen ergeben, dass solch eine Entfernung möglich ist [151]. Verbindungen ohne Akzeptorfunktionen sollten keinen Affinitätsgewinn an der Mutante M₂W427A/7.40 aufweisen, um den hier postulierten Einfluss nachvollziehen zu können. Daher sind weitere Untersuchungen an dieser Mutante durchaus als interessant zu betrachten.

8.6.2 Einzelne Aminosäuren

M₂Y18/1.27 stellt eine interessante Aminosäure für Mutationsstudien dar. Zum einen könnten diese Aufschluss über eine mögliche Beteiligung einer im N-Terminus gelegenen Aminosäure an der Bindung von allosterischen Modulatoren geben, und zum anderen ist die Position 1.27 innerhalb der muskarinischen Rezeptoren sehr unterschiedlich besetzt. Möglicherweise übt diese Position einen Einfluss auf die M₂/M₅-Subtypselektivität verschiedener allosterischer Modulatoren aus.

Da es für die Position M₂W89/3.18 in der GPCR Datenbank noch keine Daten zur Bedeutung innerhalb der Unterfamilie von Rezeptoren für biogene Amine gibt (Stand April 2008), wäre eine Untersuchung mittels Mutationsstudien interessant. Allerdings liegt diese Aminosäure im extrazellulären Bereich des e1, was möglicherweise zu einem gerin-

geren Einfluss dieser Aminosäure auf die Bindung von allosterischen Modulatoren führt. Für W400 ist nur ein indirekter Einfluss auf die Bindung von allosterischen Modulatoren denkbar, da eine Verbindung über andere aromatische Aminosäuren zu deren Bindungsstelle besteht. Die Position 6.48 ist in G-Protein gekoppelten Rezeptoren funktionell konserviert. In bereits durchgeführten Mutationsstudien konnte keine funktionsfähige Rezeptormutante erzeugt werden, die hier kein Tryptophan enthält. Dies könnte in Bindungsstudien von Rezeptormutanten mit allosterischen Modulatoren zu praktischen Problemen führen, da eventuell durch eine Instabilität in der Faltung des Rezeptorproteins nur eine ungenügende Expression des Rezeptors in den verwendeten Zellen zustande kommt. Daher sollten Mutationsstudien an dieser Position zunächst keine höhere Priorität haben.

Im M_2 -Modell liegt W422/7.35 im N-terminalen Bereich der siebten transmembranären Helix und bildet Kontakte zu Y177/5.29 im e2 und Y403/6.51 in TM6 aus. Eine aromatische Wechselwirkung zu allosterischen Modulatoren wie MM7A ist ebenfalls möglich. Eine Untersuchung dieser Aminosäure mittels Mehrfachmutationen, z.B. in Kombination mit Y403/6.51, könnten weitere Einblicke in die Rezeptorgeometrie und den Bindungsmodus von allosterischen Modulatoren liefern.

Mutationen an Position Y430/7.43 könnten möglicherweise eine Bedeutung dieser Aminosäure für die Rezeptorgeometrie des M_2 -Rezeptors aufdecken.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass von den betrachteten Aminosäuren vor allem M_2 Y18/1.27, M_2 Y80/2.61, M_2 W89/3.18, M_2 W99/3.28, M_2 Y403/6.51 und M_2 Y426/7.39 für Mutationsstudien am muskarinischen M_2 -Rezeptors interessant sind.

8.7 Abschließende Bemerkung und Ausblick

Die Ergebnisse zu Untersuchungen des in dieser Arbeit vollkommen neu erstellten M_2 -Modells stimmen sehr gut mit experimentellen Daten überein. Das Vorgänger-Modell des M_2 -Rezeptors [79] weist hingegen erhebliche Defizite auf, da es zum einen noch mit mittlerweile veralteten Methoden erstellt und untersucht wurde und zum anderen keinerlei detaillierten Einblicke zur allosterischen Modulation von muskarinischen Rezeptoren geben kann. Hierdurch wird verdeutlicht, dass die Erstellung von Homologiemodellen G-Protein gekoppelter Rezeptoren nicht trivial ist, da zwei verschiedene Modelle des selben Rezeptors deutliche Qualitätsunterschiede aufweisen können.

Eine Schwierigkeit bei muskarinischen Rezeptoren liegt darin, die Vielzahl der experimentellen Daten, die mittlerweile zur Verfügung stehen, in einem einheitlichen Modell erklären zu können. Dies ist kaum möglich. In dieser Arbeit gelingt es allerdings einen überwiegenden Teil der ermittelten Daten zur allosterischen Bindungstasche des M_2 -Rezeptors in einen Gesamt-Zusammenhang zu bringen und Vorstellungen zu unterschiedlichen Eigenschaften der allosterischen Modulatoren zu geben. Dies war bisher in

dieser detaillierten Form noch für kein vergleichbares Rezeptormodell möglich. Da viele Ergebnisse hervorragend mit experimentellen Untersuchungen übereinstimmen, kann vermutet werden, dass die allosterische Bindungsregion durch das M_2 -Modell recht genau wiedergegeben wird. Die z.T. internationale Kooperation mit pharmakologisch tätigen Arbeitsgruppen und die Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit in den international anerkannten Fachzeitschriften *Molecular Pharmacology* und *Journal of Biological Chemistry* verdeutlichen die Relevanz der in dieser Arbeit erstellten Daten.

Der vorgeschlagene Bindungsmodus von W84 stimmt detailliert mit Daten aus Mutations- und Bindungsstudien überein. Auch die Bindungseigenschaften mehrerer strukturell diverser allosterischer Modulatoren können sehr gut mit dem hier vorgestellten M_2 -Modell erklärt werden, was hilft, ein Gesamtbild der allosterischen Bindungstasche zu erstellen.

Auch das neu vorgestellte M_5 -Modell, das nur im ersten Teil dieser Arbeit untersucht wird, gibt an diesem Subtyp einen möglichen Bindungsmodus von W84 gut wieder. Es liefert bereits auch Einblicke in die Bedingungen der M_2/M_5 -Subtypselektivität muskarinischer Rezeptorliganden. So unterscheiden sich z.B. die allosterischen Bindungstaschen deutlich voneinander. Durch die Verfügbarkeit qualitativ vergleichbarer M_2 - und M_5 -Modelle können in zukünftigen Arbeiten z.B. verlässliche Vorhersagen zur M_2/M_5 -Subtypselektivität gemacht werden. Einige Vorhersagen zu Rezeptormutanten, die allerdings vom M_2 -Modell stammen, sind bereits durch Mutations- und Bindungsstudien bestätigt worden.

Durch die Vielzahl der in dieser Arbeit zu berücksichtigen experimentellen Daten wurden einige Themen nur relativ oberflächlich behandelt. Genauere Untersuchungen und weitere Vergleiche mit dem M_5 -Rezeptor sind nötig, um die beiden Modelle weiter zu bestätigen. Möglicherweise können beide Modelle helfen, zu neuen, subtypselektiveren Liganden zu gelangen.

Weitere Untersuchungen, die an beiden Rezeptormodellen durchgeführt werden sollten, werden im Folgenden aufgeführt.

Zunächst ist eine weitere Überprüfung der orthosterischen Bindungstaschen der Modelle notwendig.

Detaillierte Untersuchungen von Wasserstoffbrücken-Mustern und systematische Abstands-Messungen zwischen aromatischen Kontakten können möglicherweise neue Einblicke in die unterschiedlichen Bindungsmodi von allosterischen Modulatoren am freien und NMS-besetzten M_2 -Rezeptor liefern und detailliertere Aussagen zu unterschiedlichen Kooperativitäten von allosterischen Modulatoren ermöglichen.

Die Untersuchung weiterer strukturell diverser allosterischer Liganden führt möglicherweise zu neuen Erkenntnissen zur M_2/M_5 -Subtypselektivität.

Vorgeschlagene Rezeptormutanten könnten zu neuen pharmakologischen Werkzeugen führen, die neue Einblicke in den Aufbau der muskarinischen Rezeptoren liefern und die hier vorgeschlagenen Rezeptorgeometrien bestätigen können.

Durch die ausgezeichnete Charakterisierung der proximalen allosterischen Bindungstasche des M₂-Rezeptors können intensivere Untersuchungen zur distalen Bindungstasche durchgeführt werden, um möglicherweise neue wichtige Bindungspartner von allosterischen Modulatoren zu identifizieren und neue Strukturvariationen vorschlagen zu können.

Insgesamt ergeben sich durch die beiden hier vorgestellten Rezeptormodelle viele neue Ansatzpunkte, die die Forschung auf dem Gebiet der allosterischen Modulation muskarinischer Rezeptoren weiterbringen können.

Kapitel 9

Zusammenfassung

Muskarinische Rezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und sind wichtige Targets in der Behandlung verschiedener Erkrankungen. Ein Ansprechen einzelner Subtypen ist bisher aber nur unzureichend möglich. Therapeutische Vorteile verspricht ein subtypselektiverer Angriff mit allosterischen Modulatoren. Er erfolgt an den strukturell unterschiedlichen extrazellulären Regionen der Rezeptoren. Bei vielen allosterischen Modulatoren ist die M_2/M_5 -Subtypselektivität maximal. Untersuchungen der unterschiedlichen Bindungsmodi versprechen Einblicke in den Aufbau und die Funktionsweise dieser GPCRs.

Da keine Strukturinformationen zu den Rezeptoren existieren, werden im ersten Teil dieser Arbeit Homologiemodelle des M_2 - und M_5 -Rezeptors auf Basis einer hochauflösenden Rhodopsin-Kristallstruktur erstellt. Günstige Bindungsmöglichkeiten für Liganden werden mit molekularen Interaktionsfeldern (MIFs) untersucht. Hierdurch ergeben sich erste Einblicke in die Feinstruktur der unterschiedlichen Bindungstaschen. Moleküldynamiksimulationen (MDS) in einem Membransystem, das der physiologischen Umgebung der Rezeptoren ähnelt, die sowohl mit dem freien Rezeptor als auch mit Komplexen mit dem inversen Agonisten N-Methylscopolamin und dem allosterischen Modulator W84 durchgeführt werden, beweisen die gute Qualität und Stabilität der Rezeptormodelle. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse werden durch experimentelle Daten gestützt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Bindung von W84 am M_2 -Rezeptor anhand von Rezeptormutanten und mit Hilfe von MIFs und MDS näher betrachtet. Das M_2 -Modell gibt die Einflüsse von Mutationen auf die W84-Bindung tendenziell gut wieder. Ein unterschiedliches Verhalten des M_2 -Rezeptors bei Anwesenheit eines Agonisten, Partialagonisten oder inversen Agonisten kann durch MDS dargestellt werden. Im Besonderen werden Vorstellungen zu dem unterschiedlichen kooperativen Verhalten dieser Substanzen entwickelt. Die Charakterisierung der Gallamin-Bindung stützt die Aussagekraft des Modells, da hiermit der Bindungsmodus eines strukturell diversen Modulators gut wiedergegeben werden kann. Auch die Untersuchungen mit allosterisch-orthosterischen Hybridsubstanzen, stehen in Einklang mit experimentellen Daten, da auch diese einen dualen Bindungsmodus vermuten lassen.

Abschließend werden Vorschläge für Rezeptormutanten gemacht, die einen möglichen Einfluss auf die Bindung von allosterischen Modulatoren haben.

Muscarinic receptors belong to the class of G protein-coupled receptors (GPCRs) and represent important targets in the treatment of several diseases. So far, subtype-selective ligands do not exist, however. But therapeutical advantages may be reached by application of subtype-selective allosteric modulators. Such ligands address the structurally diverse, extracellularly localised regions of the receptors. Several allosteric modulators with maximal selectivity among the M_2 and M_5 subtype are known.

Hitherto no direct structural information is available, therefore the first part of this work describes the construction of homology models of the M_2 and M_5 receptor based on the high-resolution crystal structure of bovine rhodopsin. Favourable attachment points for ligands are described by molecular interaction fields (MIFs). Molecular dynamics simulations (MDS) within a membrane system, which mimics the physiological environment, which were performed for the empty receptors models as well as for complexes with the inverse agonist N-methylscopolamine and the allosteric modulator W84 confirm good quality and stability of the receptor models. The results of this work are supported by experimental data.

In the second part of this work the binding mode of W84 within the M_2 receptor is described in more detail by using receptor mutants and with the aid of MIFs and MDS. The influence of mutations on the binding of W84 can be reproduced by the proposed model. Also the diverse behaviour of the M_2 receptor towards agonists, partial agonists or inverse agonists can be demonstrated by MDS. First insights into a different co-operative behaviour of these compounds can be given. The characterisation of gallamine binding corroborates the correctness of the receptor model as the binding mode of this structurally diverse allosteric modulator can be reproduced. Also the investigations on the binding of an allosteric-orthosteric hybrid substance are in agreement with experimentally derived data which likewise suggest a dual binding mode.

Finally some suggestions for new point mutations which may influence the binding of allosteric modulators are made.

Literaturverzeichnis

- [1] C. BOHR: *Über einen in biologischen Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt.* Skandinavisches Archiv für Physiologie, 15:401–412, 1904.
- [2] R.L. MACDONALD UND R.W. OLSEN: *Gaba_A Receptor Channels.* Annual Review of Neuroscience, 17:569–602, 1994.
- [3] Z.G. GAO UND K.A. JACOBSON: *Allosterism in membrane receptors.* Drug Discovery Today, 11(5/6):191–202, 2005.
- [4] H. LÜLLMANN, F.K. OHNESORGE, G.C. SCHAUWECKER UND O. WASSERMANN: *Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds.* European Journal of Pharmacology, 6:241–247, 1969.
- [5] J. WESS: *Allosteric Binding Sites on Muscarinic Acetylcholine Receptors.* Molecular Pharmacology, 68:1506–1509, 2005.
- [6] S. TAKEDA, S. KADOWAKI, T. HAGA, H. TAKAESU UND S. MITAKU: *Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence.* FEBS Letters, 520:97–101, 2002.
- [7] R. FREDRIKSSON, M.C. LAGERSTRÖM, L.G. LUNDIN UND H.B. SCHIÖTH: *The G-protein coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups and fingerprints.* Molecular Pharmacology, 63:1256–1272, 2003.
- [8] T. KLABUNDE UND G. HESSLER: *Drug Design Strategies for Targeting G-Protein-Coupled Receptors.* ChemBioChem, 3(10):928–844, 2002.
- [9] J.D.A. TYNDALL UND R. SANDILYA: *GPCR Agonists and Antagonists in the Clinic.* Medicinal Chemistry, 17:405–421, 2005.
- [10] E. JACOBY, R. BOUHELAL, M. GERSPACHER UND K. SEUWEN: *The 7 TM G-protein-coupled receptor target family.* ChemMedChem, 1:760–782, 2006.
- [11] E. ARCHER, B. MAIGRET, C. ESCRIEUT, L. PRADAYROL UND D. FOURMY: *Rhodopsin crystal: new template yielding realistic models of G-protein-coupled receptors?* Trends in Pharmacological Sciences, 24:36–40, 2003.
- [12] U. GETHER: *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors.* Endocrine Reviews, 21:90–113, 2000.
- [13] F. HORN, E. BETTLER, L. OLIVEIRA, F. CAMPAGNE, F.E. COHEN UND G. VRIEND: *GPCRDB information system for G protein-coupled receptors.* Nucleic Acids Res, 31:294–297, 2003.
- [14] A. WISE, K. GEARING UND S. REES: *Target validation of G-protein coupled receptors.* Drug Discovery Today, 7(4):235–246, 2002.

- [15] H.B. SCHIÖTH UND R. FREDRIKSSON: *The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective*. General and Comparative Endocrinology, 142(1-2):1–264, 2005.
- [16] L. HUNYADY UND K.J. CATT: *Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II*. Molecular Endocrinology, 20:953–970, 2006.
- [17] L.M. LUTTRELL: *Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors*. Methods in Molecular Biology, 332:3–49, 2006.
- [18] P.A. HARGRAVE, J.H. MCDOWELL, D.R. CURTIS, J.K. WANG, E. JUSZCZAK, S.L. FONG, J.K. RAO UND P. ARGOS: *The structure of bovine rhodopsin*. Biophysics of Structure and Mechanism, 9:235–244, 1983.
- [19] K. PALCZEWSKI, T. KUMASAKA, T. HORI, C.A. BEHNKE, H. MOTOSHIMA, B.A. FOX, I. LE TRONG, D.C. TELLER, T. OKADA, R.E. STENKAMP, M. YAMAMOTO UND M. MIYANO: *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. Science, 289(5480):739–745, 2000.
- [20] J.M. BALDWIN, G.F.X. SCHERTLER UND V.M. UNGER: *An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors*. Journal of Molecular Biology, 272(1):144–164, 1997.
- [21] J. WESS, N. BLIN, E. MUTSCHLER UND K. BLÜML: *Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G protein coupling*. Life Sciences, 56(11-12):915–22, 1995.
- [22] J.A. BALLESTEROS UND H. WEINSTEIN: *Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relationships in G-protein coupled receptors*. Methods in Neuroscience, 25:366–428, 1995.
- [23] M. CAFFREY: *Membrane protein crystallization*. Journal of Structural Biology, 142(1):108–132, 2003.
- [24] R.W. SCHOENLEIN, L.A. PETEANU, R.A. MATHIES UND C.V. SHANK: *The first step in vision: femto-second isomerization of rhodopsin*. Science, 254:412–415, 1991.
- [25] K.D. RIDGE UND K. PALCZEWSKI: *Visual Rhodopsin Sees the Light: Structure and Mechanism of G Protein Signaling*. Journal of Biological Chemistry, 282:9297–9301, 2007.
- [26] DAVID SALOM, DAVID T. LODOWSKI, RONALD E. STENKAMP, ISOLDE LE TRONG, MARCIN GOLCZAK, BEATA JASTRZEBSKA, TIM HARRIS, JUAN A. BALLESTEROS, AND KRZYSZTOF PALCZEWSKI: *Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 193(44):16123–16128, 2006.
- [27] T. OKADA, M. SUGIHARA, A.N. BONDAR, M. ELSTNER, P. ENTEL UND V. BUSS: *The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure*. Journal of Molecular Biology, 342(2):571–583, 2004.
- [28] H.M. BERMAN, J. WESTBROOK, Z. FENG, G. GILLILAND, T.N. BHAT, H. WEISSIG, I.N. SHINDYALOV UND P.E. BOURNE: *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Research, 28:235–242, 2000.
- [29] D.C. TELLER, T. OKADA, C.A. BEHNKE, K. PALCZEWSKI UND R.E. STENKAMP: *Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs)*. Biochemistry, 40:7761–7772, 2001.
- [30] J. LI, P.C. EDWARDS, M. BURGHAMMER, C. VILLA UND G.X. SCHERTLER: *Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form*. Journal of Molecular Biology, 343:1409–1438, 2004.

- [31] T. OKADA, Y. FUJIYOSHI, M. SILOW, J. NAVARRO, E.M. LANDAU UND Y. SHICHIDA: *Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99:5982–5987, 2002.
- [32] I. VISIERS, J.A. BALLESTEROS UND H. WEINSTEIN: *Three-dimensional representations of G protein-coupled receptor structures and mechanisms*. Methods in Enzymology, 343:329–371, 2002.
- [33] W.L. HUBBELL, C. ALTENBACH, C.M. HUBBELL, H.G. KHORANA: *Rhodopsin structure, dynamics, and activation: A perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking*. Advances in Protein Chemistry, 63:243–290, 2003.
- [34] D.L. FARRENS, C. ALTENBACH, K. YANG, W.L. HUBBELL UND H.G. KHORANA: *Requirement of Rigid-Body Motion of Transmembrane Helices for Light Activation of Rhodopsin*. Science, 274:768–770, 1996.
- [35] V. CHEREZOV, D.M. ROSENBAUM, M.A. HANSON, S.G. RASMUSSEN, F.S. THIAN, T.S. KOBILKA, H.J. CHOI, P. KUHN, W.I. WEIS, B.K. KOBILKA UND R.C. STEVENS: *High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor*. Science, 318 (5854):1218–1265, 2007.
- [36] S.G. RASMUSSEN, H.J. CHOI, D.M. ROSENBAUM, T.S. KOBILKA, F.S. THIAN, P.C. EDWARDS, M. BURGHAMMER, V.R. RATNALA, R. SANISHVILI, R.F. FISCHETTI, G.F. SCHERTLER, W.I. WEIS, B.K. KOBILKA: *Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor*. Nature, 450 (7168):383–387, 2007.
- [37] A. K. SHUKLA, J.P. SUN UND R.J. LEFKOWITZ: *Crystallizing thinking about the β_2 -adrenergic receptor*. Molecular Pharmacology, Elektronische Veröffentlichung vor Drucklegung:mol.108.045849v1, 2008.
- [38] G. KRAUSS: *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1997.
- [39] T. COSTA UND A. HERZ: *Antagonists with negative intrinsic activity at δ opioid receptors coupled to GTP-binding proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86(19):7321–7325, 1989.
- [40] R. SEIFERT UND K. WENZEL-SEIFERT: *Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 366(5):381–416, 2002.
- [41] R.J. LEFKOWITZ, S. COTECCHIA, P. SAMAMA UND T. COSTA: *Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins*. Trends in Pharmacological Sciences, 14:303–307, 1993.
- [42] P. LEFF: *The two-state model of receptor activation*. Trends in Pharmacological Sciences, 16:89–97, 1995.
- [43] J. TALLMAN: *Dimerization of G-Protein-Coupled Receptors: Implications for Drug Design and Signaling*. Neuropsychopharmacology, 23(S1):S1–S2, 2000.
- [44] L.A. DEVI UND L.S. BRADY: *Dimerization of G-Protein Coupled Receptors*. Neuropsychopharmacology, 23(S1):S3–S4, 2000.
- [45] J.C. GOIN UND N.M. NATHANSON: *Quantitative Analysis of Muscarinic Acetylcholine Receptor Homo- and Heterodimerization in Live Cells: Regulation of receptor down-regulation by heterodimerization*. Journal of Biological Chemistry, 281:5416–5425, 2006.

- [46] F.Y. ZENG UND J. WESS: *Molecular Aspects of Muscarinic Receptor Dimerization*. *Neuropsychopharmacology*, 23(S4):S19–S31, 2000.
- [47] R.R. NEUBIG, M. SPEDDING, T. KENAKIN UND A. CHRISTOPOULOS: *International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology*. *Pharmacological Reviews*, 55:597–606, 2003.
- [48] A. CHRISTOPOULOS UND T. KENAKIN: *G Protein-Coupled Receptor Allostereism and Complexing*. *Pharmacological Reviews*, 54(2):323–374, 2002.
- [49] F.J. EHLERT: *Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods*. *Molecular Pharmacology*, 33:187–194, 1988.
- [50] U. HOLZGRABE UND K. MOHR: *Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors*. *Drug Discovery Today*, 3(5):214–222, 1998.
- [51] N.J.M. BIRDSALL UND S. LAZARENO: *Allostereism at muscarinic receptors: ligands and mechanisms*. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 5:523–543, 2005.
- [52] D. STEINHILBER, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ UND H.J. ROTH: *Medizinische Chemie - Targets und Wirkstoffe*. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Erste Auflage, 2005.
- [53] U. HOLZGRABE: *Können Arzneistoffe am Computer maßgeschneidert werden?* *Pharmazie in unserer Zeit*, 25:322–325, 1996.
- [54] T.W. SCHWARTZ, T.M. FRIMURER, B. HOLST, M.M. ROSENKILDE UND C.E. ELLING: *Molecular mechanism of 7TM receptor activation - a global toggle switch model*. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 46:481–519, 2006.
- [55] E.C. HULME, Z.L. LU UND M.S. BEE: *Scanning mutagenesis studies of the M₁ muscarinic acetylcholine receptor*. *Receptors and Channels*, 9:215–228, 2003.
- [56] D. HIGGINS, J. THOMPSON, T. GIBSON, J.D. THOMPSON, D.G. HIGGINS UND T.J. GIBSON: *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucleic Acids Research*, 22:4673–4680, 1994. ClustalW - WWW Service at the European Bioinformatics Institute: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>.
- [57] J. WESS.: *Molecular Biology of Muscarinic Acetylcholine Receptors*. *Critical Reviews in Neurobiology*, 10(1):69–99, 1996.
- [58] THE UNIPROT CONSORTIUM: *The Universal Protein Resource (UniProt)*. *Nucleic Acids Research*, 35:D193–D197, 2007. (Datenbank Ausgabe).
- [59] C.C. FELDER: *Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors*. *The FASEB Journal*, 9:619–625, 1995.
- [60] B.B. FREDHOLM, W.W. FLEMING, P.M. VANHOUTTE UND T. GODFRAIND: *The role of pharmacology in drug discovery*. *Nature Rev. Drug Discov.*, 1:237–248, 2002. IUPHAR - The International Union of Basic and Clinical Pharmacology: <http://www.iuphar-db.org/>.
- [61] J. WESS: *Muscarinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice: Novel Phenotypes and Clinical Implications*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44:423–450, 2004.
- [62] J. WESS, R.M. EGLLEN UND D. GAUTAM: *Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development*. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(9):721, 2007.

- [63] E.C. HULME, N.J.M. BIRDSALL UND N.J. BUCKLEY: *Muscarinic Receptor Subtypes*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 30:633–673, 1990.
- [64] J. WESS, D. GDULA UND M.R. BRANN: *Site-directed mutagenesis of the m3 muscarinic receptor: identification of a series of threonine and tyrosine residues involved in agonist but not antagonist binding*. EMBO Journal, 10:3729–3734, 1991.
- [65] H.-D. HÖLTJE UND L.B. KIER: *Nature of anionic or α -site of cholinesterase*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 64:418–420, 1975.
- [66] N.S. SCRUTTON UND A.R. RAINE: *Cation- π bonding and amino-aromatic interactions in the biomolecular recognition of substituted ammonium ligands*. The Biochemical Journal, 319(Pt 1):1–8, 1996.
- [67] D.A. DOUGHERTY: *Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp*. Science, 271(5246):163–8, 1996.
- [68] U. VOIGTLÄNDER, K. JÖHREN, M. MOHR, A. RAASCH, C. TRÄNKLE, S. BULLER, J. ELLIS, H.-D. HÖLTJE UND K. MOHR: *Allosteric Site on Muscarinic Acetylcholine Receptors: Identification of Two Amino Acids in the Muscarinic M2 Receptor That Account Entirely for the M₂/M₅ Subtype Selectivities of Some Structurally Diverse Allosteric Ligands in N-Methylscopolamine-Occupied Receptors*. Molecular Pharmacology, 64:21–31, 2003.
- [69] H. MATSUI, S. LAZARENO UND N.J. BIRDSALL: *Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis*. Molecular Pharmacology, 47:88–98, 1995.
- [70] A.L. GNAGEY, M. SEIDENBERG, UND J. ELLIS: *Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors*. Molecular Pharmacology, 56:1245–1253, 1999.
- [71] H. AUTERHOFF, J. KNABE, H.-D. HÖLTJE: *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 14. Auflage, 1999.
- [72] F. DÖRJE, J. WESS, G. LAMBRECHT, R. TACKE, E. MUTSCHLER UND M.R. BRANN: *Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 256:727–733, 1991.
- [73] K. IKEDA, S. KOBAYASHI, M. SUZUKI, K. MIYATA, M. TAKEUCHI, T. YAMADA, K. HONDA: *M₃ receptor antagonism by the novel antimuscarinic agent solifenacin in the urinary bladder and salivary gland*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 366:97–103, 2002.
- [74] A.L. CLARK UND F. MITCHELSON: *The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors*. British Journal of Pharmacology, 58:323–331, 1976.
- [75] M. MUTH, W. BENDER, O. SCHARFENSTEIN, U. HOLZGRABE, E. BALATKOVA, C. TRÄNKLE UND K. MOHR: *Systematic Development of High Affinity Bis(ammonio)alkane-type Allosteric Enhancers of Muscarinic Ligand Binding*. Journal of Medicinal Chemistry, 46(6):1031–1040, 2003.
- [76] C. BISSANTZ, P. BERNARD, M. HIBERT UND D. ROGNAN: *Protein-Based Virtual Screening of Chemical Databases.II. Are Homology Models of G-Protein Coupled Receptors Suitable Targets?* PROTEINS: Structure, Function, and Genetics, 50:5–25, 2003.
- [77] B. SCHLEGEL, C. LAGGNER, R. MEIER, T. LANGER, D. SCHNELL, R. SEIFERT, H. STARK, H.-D. HÖLTJE UND W. SIPPL: *Generation of a homology model of the human histamine H₃ receptor for ligand docking and pharmacophore-based screening*. Journal of Computer Aided Molecular Design, 21(8):437–453, 2007.

- [78] T. SCHWEDE, J. KOPP, N. GUEX UND M.C. PEITSCH: *SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server*. Nucleic Acids Research, 31:3381–3385, 2003.
- [79] K. JÖHREN UND H.-D. HÖLTJE: *A model of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor*. Journal of Computer Aided Molecular Design, 16 (11):795–801, 2002.
- [80] A. KUHN: *Molecular Modelling Untersuchungen an der Bindungsstelle allosterischer Modulatoren des Muscarin M₂ Rezeptors*. Doktorarbeit, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, 2002.
- [81] H. KERCKHOFF, UND H.-D. HÖLTJE: *Conformational analysis and receptor modelling of m1 and m2 selective antagonists*. Pharmazie, 49(8):566–573, 1994.
- [82] V.A. AVLANI, K.J. GREGORY, C.J. MORTON, M.W. PARKER, P.M. SEXTON UND A. CHRISTOPOULOS: *Critical Role for the Second Extracellular Loop in the Binding of Both Orthosteric and Allosteric G Protein-coupled Receptor Ligands*. Journal of Biological Chemistry, 282:25677–25686, 2007.
- [83] Z.L. LU, J.W. SALDANHA UND E.C. HULME: *Transmembrane Domains 4 and 7 of the M₁ Muscarinic Acetylcholine Receptor Are Critical for Ligand Binding and the Receptor Activation Switch*. Journal of Biological Chemistry, 276(36):34098–34104, 2001.
- [84] S.J. HAN, F.F. HAMDAN, S.K. KIM, K.A. JACOBSON, L.M. BLOODWORTH, B. LI UND J. WESS: *Identification of an agonist-induced conformational change occurring adjacent to the ligand-binding pocket of the M₃ muscarinic acetylcholine receptor*. Journal of Biological Chemistry, 280(41):34849–34858, 2005.
- [85] A. EVERS, G. HESSLER, H. MATTER UND T. KLABUNDE: *Virtual Screening of Biogenic Amine-Binding G-Protein Coupled Receptors: Comparative Evaluation of Protein- and Ligand-Based Virtual Screening Protocols*. Journal of Medicinal Chemistry, 48:5448–5465, 2005.
- [86] S. MOLLER, M.D.R. CRONING UND R. APWEILER: *Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions*. Bioinformatics, 17(7):646–653, 2001.
- [87] B. ROST, G. YACHDAV UND J. LIU: *The PredictProtein server*. Nucleic Acids Research, 32:W321–W326, 2004. (Web Server Ausgabe).
- [88] L.J. MCGUFFIN, K. BRYSON UND D.T. JONES: *The PSIPRED protein structure prediction server*. Bioinformatics, 16:404–405, 2000.
- [89] H.-D. HÖLTJE, W. SIPPL, D. ROGNAN UND G. FOLKERS: *Molecular Modeling - Basic Principles and Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Zweite Auflage, 2003.
- [90] J.A. CUFF, M.E. CLAMP, A.S. SIDDIQUI, M. FINLAY UND G.J. BARTON: *Jpred: A Consensus Secondary Structure Prediction Server*. Bioinformatics, 14:892–893, 1998.
- [91] ACCELRY'S, SAN DIEGO, CA: *Insight II 2000*.
- [92] U. HOBOHM UND C. SANDER: *Enlarged representative set of protein structures*. Protein Science, 3:522–524, 1994.
- [93] A.A. CANUTESCU, A.A. SHELENKOV UND R.L. DUNBRACK, JR.: *A graph theory algorithm for protein side-chain prediction*. Protein Science, 12:2001–2014, 2003.
- [94] W.R. TAYLOR: *The classification of amino acid conservation*. Journal of theoretical biology, 119(2):205–218, 1986.
- [95] H. LI, A.D. ROBERTSON UND J.H. JENSEN: *Very Fast Empirical Prediction and Interpretation of Protein pKa Values*. Proteins, 61:704–721, 2005.

- [96] E. LINDAHL, B. HESS UND D. VAN DER SPOEL: *Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis*. Journal of Molecular Modelling, 7:306–317, 2001.
- [97] B. SCHLEGEL, W. SIPPL UND H.-D. HÖLTJE: *Molecular dynamics simulations of bovine rhodopsin: influence of protonation states and different membrane-mimicking environments*. Journal of Molecular Modelling, 12:49–64, 2005.
- [98] I. CHANDRASEKHAR, M. KASTENHOLZ, R.D. LINS, C. OOSTENBRINK, L.D. SCHULER, D.P. TIELEMAN UND W.F. VAN GUNSTEREN: *A consistent potential energy parameter set for lipids: dipalmitoylphosphatidylcholine as a benchmark of the GROMOS96 45A3 force field*. European Biophysics Journal, 32:67–77, 2003.
- [99] B. SCHLEGEL: *The Human Histamine H₃-Receptor: A Molecular Modelling Study of a G-Protein Coupled Receptor*. Doktorarbeit, Heinrich-Heine Univeristät, Düsseldorf, 2005.
- [100] TRIPOS, L.P., ST. LOUIS, MISSOURI: *Sybyl 7.2*.
- [101] G. JONES, P. WILLETT UND R.C. GLEN: *Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation*. Journal of Molecular Biology, 245:43–53, 1995.
- [102] P.J. GOODFORD: *A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules*. Journal of Medicinal Chemistry, 28:849–857, 1985.
- [103] WAVEFUNCTION, INC., CA, USA: *Spartan 5.1.3*.
- [104] R.A. LASKOWSKI, M.W. MACARTHUR, D.S. MOSS UND J.M. THORNTON: *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. Journal of Applied Crystallography, 26:283–291, 1993.
- [105] R.A. LASKOWSKI: *SURFNET: A program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions*. Journal of Molecular Graphics, 13:323–330, 1995.
- [106] ATLAS OF PROTEIN SIDE-CHAIN INTERACTIONS: <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/sidechains/>.
- [107] J. SINGH UND J.M. THORNTON: *Atlas of Protein Side-Chain Interactions, Vols. I & II*. IRL press, Oxford, 1992.
- [108] NCBI - PUBMED: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>.
- [109] S. PRILLA, J. SCHROBANG, J. ELLIS, H.-D. HÖLTJE UND K. MOHR: *Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophan M₂422Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity*. Molecular Pharmacology, 70(1):181–193, 2006.
- [110] K. JÖHREN: *Der muskarinerge M₂-Rezeptor, Theoretische Betrachtungen des Bindungsmodus orthosterischer und allosterischer Liganden*. Doktorarbeit, Heinrich-Heine Univeristät, Düsseldorf, 2004.
- [111] K. FAHMY, F. JÄGER, M. BECK, T.A. ZVYAGA, T.P. SAKMAR UND F. SIEBERT: *Protonation states of membrane-embedded carboxylic acid groups in rhodopsin and metarhodopsin II: A Fourier-Transform infrared spectroscopy study of site-directed mutants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(21):10206–10210, 1993.
- [112] E.C. YAN, M.A. KAZMI, Z. GANIM, J.M. HOU, D. PAN, B.S. CHANG, T.P. SAKMAR UND R.A. MATHIES: *Retinal counterion switch in the photoactivation of the G-protein-coupled receptor rhodopsin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(16):9262–9267, 2003.

- [113] M. ISHIGURO: *Conformational analysis of Glu181 and Ser186 in the metarhodopsin I state*. *Chembiochem : a European Journal of Chemical Biology*, 5(9):1204–1209, 2004.
- [114] J.M. BRIGGS, J.D. MADURA, M.E. DAVIS, M.K. GILSON, J. ANTOSIEWICZ, B.A. LUTY, R.C. WADE, B. BAGHERI, A. ILIN, R.C. TAN UND J.A. MCCAMMON: *UHBD (University of Houston Brownian Dynamics)*. *University of Houston*, 5.1 edition.
- [115] D.C. BAS, D.M. ROGERS UND J.H. JENSEN : *Very Fast Prediction and Rationalization of pK_a Values for Protein-Ligand Complexes*. *Proteins*, 2008. eingereicht.
- [116] DEPARTMENT OF BIOLOGICAL SCIENCES, CALGARY/CANADA: <http://moose.bio.ucalgary.ca>.
- [117] F.J. EHLERT, M.T. GRIFFIN UND P.F. GLIDDEN: *The interaction of the enantiomers of aceclidine with subtypes of the muscarinic receptor*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 279:1335–1344, 1996.
- [118] J. ELLIS UND M. SEIDENBERG: *Interactions of alcuronium, TMB-8 and other allosteric ligands with muscarinic acetylcholine receptors: studies with chimeric receptors*. *Molecular Pharmacology*, 58:1451–1460, 2000.
- [119] X.P. HUANG, S. PRILLA, K. MOHR UND J. ELLIS: *Critical Amino Acid Residues of the Common Allosteric Site on the M_2 Muscarinic Acetylcholine Receptor: More Similarities than Differences between the Structurally Divergent Agents Gallamine and Bis(ammonio)alkane-Type Hexamethylene-bis-[dimethyl-(3-phthalimidopropyl)ammonium]dibromide*. *Molecular Pharmacology*, 68:769–778, 2005.
- [120] E. KOSTENIS, U. HOLZGRABE UND K. MOHR: *Allosteric effect on muscarinic M_2 -receptors of derivatives of the alkane-bis-ammonium compound W84. Comparison with bispyridinium-type allosteric modulators*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 29:947–953, 1994.
- [121] R. GILSBACH, M. GROSSMÜLLER, V. ALPTÜZÜN, E. ERCIYAS, C. TRÄNKLE, U. HOLZGRABE UND K. MOHR : *Cooperative Interactions at M_2 Muscarinic Acetylcholine Receptors: Structure/Activity Relationships in Stepwise Shortened Bispyridinium- and Bis(Ammonio)Alkane-Type Allosteric Modulators*. *Neurochemical Research*, 28:667–673, 2003.
- [122] J.O. DAISS, S. DUDA-JOHNER, C. BURSCHKA, U. HOLZGRABE, K. MOHR UND REINHOLD TACKE: *N^+ /Si Replacement as a Tool for Probing the Pharmacophore of Allosteric Modulators of Muscarinic M_2 Receptors: Synthesis, Allosteric Potency, and Positive Cooperativity of Silicon-Based W84 Derivatives*. *Organometallics*, 21(5):803–811, 2002.
- [123] S. BULLER, D.P. ZLOTOS, K. MOHR UND J. ELLIS: *Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: a single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands*. *Molecular Pharmacology*, 61:160–168, 2002.
- [124] A. PEDRETTI, G. VISTOLI, C. MARCONI UND B. TESTA: *Muscarinic receptors: A comparative analysis of structural features and binding modes through homology modelling and molecular docking*. *Chemistry and Biodiversity*, 3(5):481–501, 2006.
- [125] T. KAIMANN, S. METZGER, K. KUHLMANN, B. BRANDT, E. BIRKMANN, H.-D. HÖLTJE UND D. RIESNER: *Molecular Model of an alpha-Helical Prion Protein Dimer and Its Monomeric Subunits as Derived from Chemical Cross-linking and Molecular Modeling Calculations*. *Journal of Molecular Biology*, 376(2):582–596, 2008.
- [126] B. DIESEL, S. KULHANEK-HEINZE, M. HÖLTJE, B. BRANDT, H.-D. HÖLTJE, A.M. VOLLMAR UND A.K. KIEMER: *α -Lipoic Acid as a Directly Binding Activator of the Insulin Receptor: Protection from Hepatocyte Apoptosis*. *Biochemistry*, 46:2146–2155, 2007.

- [127] S. PRILLA: *Muskarinische Acetylcholinrezeptoren: Identifizierung einer Kernregion für allosterisch-orthosterische Rezeptorinteraktionen*. Doktorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2007.
- [128] J. WESS, D. GDULA UND M.R. BRANN: *Structural basis of the subtype selectivity of muscarinic antagonists: a study with chimeric m2/m5 muscarinic receptors*. *Molecular Pharmacology*, 41(2):369–74, 1992.
- [129] R.A. LEPPIK, R.C. MILLER, M. ECK UND J.L. PAQUET: *Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor*. *Molecular Pharmacology*, 45:983–990, 1994.
- [130] M. MUTH, M. SENNWITZ, K. MOHR UND U. HOLZGRABE: *Muscarinic Allosteric Enhancers of Ligand Binding: Pivotal Pharmacophoric Elements in Hexamethonio-Type Agents*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48:2212–2217, 2005.
- [131] W. BENDER, M. STAUDT, C. TRÄNKLE, K. MOHR UND U. HOLZGRABE: *Probing the size of a hydrophobic binding pocket within the allosteric site of muscarinic acetylcholine M₂-receptors*. *Life Sciences*, 66(18):165–1682, 2000.
- [132] R. LI, C. TRÄNKLE, K. MOHR UND U. HOLZGRABE: *Hexamethonium-type allosteric modulators of the muscarinic receptors bearing lateral dibenzazepine moieties*. *Archiv der Pharmazie (Weinheim)*, 334(4):121–124, 2001.
- [133] C. TRÄNKLE, E. MIES-KLOMFASS, M.H. BOTERO CID, U. HOLZGRABE UND K. MOHR: *Identification of a [³H]Ligand for the Common Allosteric Site of Muscarinic Acetylcholine M₂ Receptors*. *Molecular Pharmacology*, 54:139–145, 1998.
- [134] A. RAASCH, O. SCHARFENSTEIN, C. TRÄNKLE, U. HOLZGRABE UND K. MOHR: *Elevation of Ligand Binding to Muscarinic M₂ Acetylcholine Receptors by Bis(ammonio)alkane-Type Allosteric Modulators*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45:3809–3812, 2002.
- [135] D. JÄGER, C. SCHMALENBACH, S. PRILLA, J. SCHROBANG, A. KEBIG, M. SENNWITZ, E. HELLER, C. TRÄNKLE, U. HOLZGRABE, H.-D. HÖLTJE UND K. MOHR: *Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/transmembrane helix 7 junction for G protein-coupled receptor activation*. *Journal of Biological Chemistry*, 382(48):34968–976, 2007.
- [136] J.-P. VILARDAGA, M. BÜNEMANN, C. KRASEL, M. CASTRO UND M.J. LOHSE: *Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells*. *Nature Biotechnology*, 21(7):807–812, 2003.
- [137] J. ELLIS, J. HUYLER UND M.R. BRANN: *Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes*. *Biochemical Pharmacology*, 42(10):1927–1932, 1991.
- [138] J. ELLIS UND M. SEIDENBERG: *Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors*. *Molecular Pharmacology*, 42:638–641, 1992.
- [139] C. TRÄNKLE UND K. MOHR: *Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M2 receptors*. *Molecular Pharmacology*, 51:674–682, 1997.
- [140] C. DALLANOCE, P. CONTI, M. DE AMICI, C. DE MICHELI, E. BAROCELLI, M. CHIAVARINI, V. BALLABENI, S. BERTONI UND M. IMPICCIATORE: *Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7(8):1539–1547, 1999.

- [141] G. HILF, P. GIERSCHIK UND K.H. JAKOBS: *Muscarinic acetylcholine receptor-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to guanine-nucleotide-binding proteins in cardiac membranes*. European Journal of Biochemistry, 186(3):725–731, 1989.
- [142] C. TRÄNKLE, I. ANDRESEN, G. LAMBRECHT UND K. MOHR: *M₂ receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: Possible involvement of the common allosteric site*. Molecular Pharmacology, 53:304–312, 1998.
- [143] T. STEINFELD, M. MAMMEN, J.A.M. SMITH, R.D. WILSON UND J.R. JASPER: *A Novel Multivalent Ligand That Bridges the Allosteric and Orthosteric Binding Sites of the M₂ Muscarinic Receptor*. Molecular Pharmacology, 72:291–302, 2007.
- [144] J. ANTONY: *Bindungstopografie allosterisch/orthosterischer Hybridagonisten an M₂-Acetylcholinrezeptoren*. Doktorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2007.
- [145] J. ANTONY, K. KELLERSHOHN, M. MOHR-ANDRÄ, S. PRILLA, M. MUTH, E. HELLER, T. DISINGRINI, C. DALLANOCE, S. BRETONI, J. SCHROBANG, C. TRÄNKLE, A. CHRISTOPOULOS, H.-D. HÖLTJE, E. BAROCELLI, M. DE AMICI, U. HOLZGRABE UND K. MOHR: *A new strategy in drug discovery: Sub-type selective agonism by bitopic allosteric/orthosteric binding in a G protein-coupled receptor*. in Vorbereitung, 2008.
- [146] S. MADABUSHI, A.K. GROSS, A. PHILIPPI, E.C. MENG, T.G. WENSEL UND O. LICHTARGE: *Evolutionary Trace of G Protein-coupled Receptors Reveals Clusters of Residues That Determine Global and Class-specific Functions*. The Journal of Biological Chemistry, 279(9):8126–8132, 2003.
- [147] J.M. KLCO, C.B. WIEGAND, K. NARZINSKI UND T.J. BARANSKI: *Essential role for the second extracellular loop in C5 α receptor activation*. Nature Structural and Molecular Biology, 12(4):320–326, 2005.
- [148] D. MASSOTTE UND B.L. KIEFFER: *The second extracellular loop: a damper for G protein-coupled receptors?* Nature Structural and Molecular Biology, 12(4):287–288, 2005.
- [149] M. KIROV: *Theoretische Untersuchungen zur Wechselwirkung von orthosteren und allosteren Liganden mit dem M₂-Rezeptor*. Bachelorarbeit, Studiengang Biochemie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, 2007.
- [150] E. N. BAKER UND R. E. HUBBARD: *Hydrogen bonding in globular proteins*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, (44 (2):97–179, 1984.
- [151] K. MOHR, C. TRÄNKLE UND U. HOLZGRABE: *Structure/Activity Relationships of M₂ Muscarinic Allosteric Modulators*. Receptors and Channels, 9:229–240, 2003.
- [152] J.W. CLADER UND Y.WANG: *Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists in the Treatment of Alzheimer's Disease*. Current Pharmaceutical Design, 11:3353–3361, 2005.
- [153] V. DRUBBISCH, J. LAMEH, M. PHILIP, Y.K. SHARMA UND W. SADEE: *Mapping the ligand binding pocket of the human muscarinic cholinergic receptor Hm1: contribution of tyrosine-82*. Pharmaceutical Research, 9(12):1644–1647, 1992.
- [154] J. JAKUBIK, L. BACAKOVA, E.E. EL-FAKAHANY UND S. TUCEK: *Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic receptors*. Molecular Pharmacology, 52:172–179, 1997.
- [155] D.T. JONES: *Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices*. Journal of Molecular Biology, 292:195–202, 1999.

- [156] I. KOVACS, H.I. YAMAMURA, S.L. WAITE, E.V. VARGA UND W.R. ROESKE: *Pharmacological comparison of the cloned human and rat M₂ muscarinic receptor genes expressed in the murine fibroblast (B82) cell line*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 284:500–507, 1998.
- [157] L. MEI, J. LAI, W.R. ROESKE, C.M. FRASER, J.C. VENTER UND H.I. YAMAMURA: *Pharmacological characterization of the M₁ muscarinic receptors expressed in murine fibroblast B82 cells*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 248:661–670, 1989.
- [158] M.M. SIMPSON, J.A. BALLESTEROS, V. CHIAPPA, J. CHEN, M. SUEHIRO, D.S. HARTMAN, T. GODEL, L.A. SNYDER, T.P. SAKMAR UND J.A. JAVITCH: *Dopamine D₄/D₂ receptor selectivity is determined by a divergent aromatic microdomain contained within the second, third, and seventh membrane-spanning segments*. Molecular Pharmacology, 56(6):1116–1126, 1999.
- [159] C.D. STRADER, I.S. SIGAL, R.B. REGISTER, M.R. CANDELORE, E. RANDS UND R.A. DIXON: *Identification of residues required for ligand binding to the β -adrenergic receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84:4384–4388, 1987.
- [160] C.D. STRADER, T.M. FONG, M.R. TOTA, D. UNDERWOOD UND R.A. DIXON: *Structure and function of G protein-coupled receptors*. Annual Review of Biochemistry, 63:101–132, 1994.
- [161] U. VOIGTLÄNDER: *Kooperative Interaktionen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren: Suche nach essentiellen Aminosäuren der allosterischen Bindungsstelle von M₂-Rezeptoren*. Doktorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2003.
- [162] J. WESS: *Molecular mechanisms of muscarinic acetylcholine receptor function*. Springer Verlag, New York, Erste Auflage, 1995.
- [163] M.D. WOOD, K.L. MURKITT, M. HO, J.M. WATSON, F. BROWN, A.J. HUNTER, UND D.N. MIDDLEMISS: *Functional comparison of muscarinic partial agonists at muscarinic receptor subtypes hM₁, hM₂, hM₃, hM₄ and hM₅ using microphysiometry*. British Journal of Pharmacology, 126:1620–1624, 1999.

Anhang A

A.1 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
C1--Sonde	aromatische/vinyl-CH-Sonde
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CT	C-Terminus
cvff	consistent valence force field
DAG	Diacylglycerol
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
e1, e2, e3	erster, zweiter, dritter extrazellulärer Loop
GDP	Guanosindiphosphat
GOLD	genetic optimization for ligand docking
GPCR	G-protein coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
H-Brücke	Wasserstoffbrückenbindung
HS-CoA	Coenzym A
i1, i2, i3	erster, zweiter, dritter intrazellulärer Loop
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K _A	Gleichgewichtsdissoziationskonstante eines Allosterischen Modulators
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante eines Agonisten
M ₂ wt, M ₅ wt	Wildtyprezeptor des humanen muskarinischen M ₂ - bzw. M ₅ -Rezeptors
MDS	Moleküldynamiksimulation
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NM3-Sonde	Trimethylammonium-Kation-Sonde
NMR	nuclear magnetic resonance
NMS	N-Methylscopolamin
NT	N-Terminus
O1-Sonde	aliphatische Hydroxylsonde
O-Sonde	Carbonylsauerstoffsonde
PAM	percent accepted mutations
pEC _{0,5dis}	Negativer dekadischer Logarithmus der Modulator-Konzentration, welche zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³ H]NMS-Dissoziation führt
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxonium-Ionen-Konzentration
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
pK _A	Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten eines allosterischen Modulators
PKA, PKC	Proteinkinase A bzw. C
PLC	Phospholipase C
PSA	Pseudoatom
RCSB-PDB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank
RMSD	root mean square deviation
RMSF	root mean square fluctuation
SAR	structure activity relationships
TM1-TM7	transmembranäre helikale Bereiche eins bis sieben
UHBD	University of Houston Brownian Dynamics

A.2 Einheiten

Å	Ångstrom, 10^{-10}m
K	Kelvin
kcal	Kilokalorie
kJ	Kilojoule
mol	$6,0225 \cdot 10^{23}$ Teilchen
nm	Nanometer, 10^{-9}m
ns	Nanosekunde, 10^{-9}s
ps	Picosekunde, 10^{-12}s

A.3 Hardware

Silicon Graphics Workstations:

- IRIS INDIGO² R10000
- IRIS O2 R12000

Rechencluster:

- 3 x Sun Fire V40z mit je 4 DualCore Prozessoren AMD Opteron Typ 875
- 2 x Transtec 2600L Workstations mit je 2 Intel Xeon 3,06 GHz

Personal Computer:

- Intel Pentium M, Prozessor 1,50 GHz, 598 MHz, 512MB RAM

A.4 Software

Zusätzlich verwendete Software, die nicht im Methodenteil aufgeführt wird:

- MDL Isis Draw 2.5
- Microsoft Foto 2006 Standard Edition Editor
- Microsoft Office 2003: Excel, Powerpoint, Word, Works
- MikTex 2.5
- TeXnicCenter 1 Beta 7.01

A.5 Nomenklatur von Aminosäuren

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

Nomenklatur proteinogener Aminosäuren

A.6 Sequenzanalyse muskarinischer Rezeptoren

Rezeptor-Segment	UniProtKB/SWISS-Prot (Anzahl AS)			TMHMM (Anzahl AS)			⊙ Anzahl AS		
	M ₂	M ₅	OPSD	M ₂	M ₅	OPSD	M ₂	M ₅	OPSD
NT	1-22 (22)	1-29 (29)	1-36 (36)	1-25 (25)	1-30 (30)	1-38 (38)	24	30	37
TM1	23-45 (23)	30-53 (24)	37-63 (27)	26-48 (23)	31-53 (23)	39-61 (23)	23	24	25
i1	46-59 (14)	54-66 (13)	64-73 (10)	49-60 (12)	54-65 (12)	62-73 (12)	13	13	11
TM2	60-80 (21)	67-87 (21)	74-96 (23)	61-83 (23)	66-88 (23)	74-96 (23)	22	22	23
e1	81-97 (17)	88-104 (17)	97-110 (14)	84-97 (13)	89-107 (19)	97-110 (14)	15	18	14
TM3	98-119 (22)	105-126 (22)	111-133 (23)	98-117 (20)	108-130 (23)	111-133 (23)	21	23	23
i2	120-139 (20)	127-146 (20)	134-152 (19)	118-143 (26)	131-150 (20)	134-152 (19)	23	20	19
TM4	140-162 (23)	147-169 (23)	153-173 (21)	144-166 (23)	151-173 (23)	153-175 (23)	23	23	22
e2	163-184 (22)	170-191 (22)	174-202 (29)	167-185 (19)	174-192 (19)	176-201 (26)	21	21	28
TM5	185-207 (23)	192-215 (24)	203-224 (22)	186-208 (23)	193-215 (23)	202-224 (23)	23	24	23
i3	208-388 (181)	215-443 (228)	225-249 (25)	209-388 (180)	216-443 (228)	225-253 (29)	181	228	27
TM6	389-409 (21)	444-464 (21)	250-274 (25)	389-411 (23)	444-466 (23)	254-276 (23)	22	22	24
e3	410-423 (14)	465-478 (14)	275-286 (12)	412-420 (9)	467-476 (9)	277-284 (8)	12	12	10
TM7	424-443 (20)	479-498 (20)	287-308 (22)	421-443 (23)	476-498 (23)	285-308 (24)	22	22	23
CT	444-466 (23)	499-532 (34)	309-348 (40)	444-466 (23)	499-532 (34)	309-348 (40)	23	34	40

Sequenzanalyse des humanen muskarinischen M₂- und M₅-Rezeptors und Vergleich mit Ergebnissen des bovinen Rhodopsin aus [99]: TM1-7, transmembranäre Bereiche; i1-i3, intrazelluläre Loops; e1-e3, extrazelluläre Loops, NT, N-Terminus, extrazellulär; CT, C-Terminus, intrazellulär, die durchschnittliche Anzahl der Aminosäuren pro Segment wurde auf ganze Aminosäuren gerundet

A.7 Sekundärstrukturvorhersagen

Humaner muskarinischer M₂-Rezeptor:

M2-UniProt:	MNNSTNSSNN	SLALTSPYKT	FEVVFIVLVA	GSLSLVTIIG	NILVMVSIKV	NRHLQTVNNY
M2-PSIPRED:	MNNSTNSSNN	SLALTSPYKT	FEVVFIVLVA	GSLSLVTIIG	NILVMVSIKV	NRHLQTVNNY
M2-PHDsec :	MNNSTNSSNN	SLALTSPYKT	FEVVFIVLVA	GSLSLVTIIG	NILVMVSIKV	NRHLQTVNNY
M2-Jpred :	MNNSTNSSNN	SLALTSPYKT	FEVVFIVLVA	GSLSLVTIIG	NILVMVSIKV	NRHLQTVNNY
	10	20	30	40	50	60
M2-UniProt:	FLFSLACADL	IIGVFSMNLY	TLYTVIGYWP	LGPVVDLWL	ALDYVVSNAS	VMNLLIISFD
M2-PSIPRED:	FLFSLACADL	IIGVFSMNLY	TLYTVIGYWP	LGPVVDLWL	ALDYVVSNAS	VMNLLIISFD
M2-PHDsec :	FLFSLACADL	IIGVFSMNLY	TLYTVIGYWP	LGPVVDLWL	ALDYVVSNAS	VMNLLIISFD
M2-Jpred :	FLFSLACADL	IIGVFSMNLY	TLYTVIGYWP	LGPVVDLWL	ALDYVVSNAS	VMNLLIISFD
	70	80	90	100	110	120
M2-UniProt:	RYFCVTKPLT	YPVKRRTKMA	GMMIAAAWVL	SFILWAPAIL	FWQFIVGVRT	VEDGECYIQF
M2-PSIPRED:	RYFCVTKPLT	YPVKRRTKMA	GMMIAAAWVL	SFILWAPAIL	FWQFIVGVRT	VEDGECYIQF
M2-PHDsec :	RYFCVTKPLT	YPVKRRTKMA	GMMIAAAWVL	SFILWAPAIL	FWQFIVGVRT	VEDGECYIQF
M2-Jpred :	RYFCVTKPLT	YPVKRRTKMA	GMMIAAAWVL	SFILWAPAIL	FWQFIVGVRT	VEDGECYIQF
	130	140	150	160	170	180
M2-UniProt:	FSNAAVTFGT	AIAAFYLPVI	IMTVLYWHIS	RASKSRIKGD	KKEPVANQDP	VSPSLVQGRI
M2-PSIPRED:	FSNAAVTFGT	AIAAFYLPVI	IMTVLYWHIS	RASKSRIKGD	KKEPVANQDP	VSPSLVQGRI
M2-PHDsec :	FSNAAVTFGT	AIAAFYLPVI	IMTVLYWHIS	RASKSRIKGD	KKEPVANQDP	VSPSLVQGRI
M2-Jpred :	FSNAAVTFGT	AIAAFYLPVI	IMTVLYWHIS	RASKSRIKGD	KKEPVANQDP	VSPSLVQGRI
	190	200	210	220	230	240
M2-UniProt:	VKPNNNMPS	SDDGLEHNKI	QNGKAPRDPV	TENCVQGEK	ESSNDSTSVS	AVASNMRDDE
M2-PSIPRED:	VKPNNNMPS	SDDGLEHNKI	QNGKAPRDPV	TENCVQGEK	ESSNDSTSVS	AVASNMRDDE
M2-PHDsec :	VKPNNNMPS	SDDGLEHNKI	QNGKAPRDPV	TENCVQGEK	ESSNDSTSVS	AVASNMRDDE
M2-Jpred :	VKPNNNMPS	SDDGLEHNKI	QNGKAPRDPV	TENCVQGEK	ESSNDSTSVS	AVASNMRDDE
	250	260	270	280	290	300
M2-UniProt:	ITQDENTVST	SLGHSKDENS	KQTCIRIGTK	TPKSDSCTPT	NTTVEVVGSS	GQNGDEKQNI
M2-PSIPRED:	ITQDENTVST	SLGHSKDENS	KQTCIRIGTK	TPKSDSCTPT	NTTVEVVGSS	GQNGDEKQNI
M2-PHDsec :	ITQDENTVST	SLGHSKDENS	KQTCIRIGTK	TPKSDSCTPT	NTTVEVVGSS	GQNGDEKQNI
M2-Jpred :	ITQDENTVST	SLGHSKDENS	KQTCIRIGTK	TPKSDSCTPT	NTTVEVVGSS	GQNGDEKQNI
	310	320	330	340	350	360
M2-UniProt:	VARKIVKMTK	QPAKKKPPPS	REKKVTRTIL	AILLAFIITW	APYNVMVLIN	TFCAPCIPNT
M2-PSIPRED:	VARKIVKMTK	QPAKKKPPPS	REKKVTRTIL	AILLAFIITW	APYNVMVLIN	TFCAPCIPNT
M2-PHDsec :	VARKIVKMTK	QPAKKKPPPS	REKKVTRTIL	AILLAFIITW	APYNVMVLIN	TFCAPCIPNT
M2-Jpred :	VARKIVKMTK	QPAKKKPPPS	REKKVTRTIL	AILLAFIITW	APYNVMVLIN	TFCAPCIPNT
	370	380	390	400	410	420
M2-UniProt:	VWTIGYWLCY	INSTINPACY	ALCNATFKKT	FKHLLMCHYK	NIGATR	
M2-PSIPRED:	VWTIGYWLCY	INSTINPACY	ALCNATFKKT	FKHLLMCHYK	NIGATR	
M2-PHDsec :	VWTIGYWLCY	INSTINPACY	ALCNATFKKT	FKHLLMCHYK	NIGATR	
M2-Jpred :	VWTIGYWLCY	INSTINPACY	ALCNATFKKT	FKHLLMCHYK	NIGATR	
	410	420	430	440		

Vergleich der verwendeten Sekundärstrukturvorhersageprogramme für den humanen muskarinischen M₂-Rezeptor, blau: transmembranäre Bereiche, rot: Helices, grün: β -Faltblätter

Humaner muskarinischer M₅-Rezeptor:

M5-UniProt:	MEGDSYHNAT	TVNGTPVNHQ	PLERHRLWEV	ITIAAVTAVV	SLITIVGNVL	VMSFKVNSQ
M5-PSIPRED:	MEGDSYHNAT	TVNGTPVNHQ	PLERHRLWEV	ITIAAVTAVV	SLITIVGNVL	VMSFKVNSQ
M5-PHDsec :	MEGDSYHNAT	TVNGTPVNHQ	PLERHRLWEV	ITIAAVTAVV	SLITIVGNVL	VMSFKVNSQ
M5-Jpred :	MEGDSYHNAT	TVNGTPVNHQ	PLERHRLWEV	ITIAAVTAVV	SLITIVGNVL	VMSFKVNSQ
	10	20	30	40	50	60
M5-UniProt:	LKTVNNYYLL	SLACADLIIG	IFSMNLYTTY	ILMGRWALGS	LACDLWLALD	YVASNASVMN
M5-PSIPRED:	LKT VNN YYLL	SLACADLIIG	IFSMNLYTTY	ILMGRWALGS	LACDLWLALD	YVASNASVMN
M5-PHDsec :	LKTVNNYYLL	SLACADLIIG	IFSMNLYTTY	ILMGRWALGS	LACDLWLALD	YVASNASVMN
M5-Jpred :	LKTVNNYYLL	SLACADLIIG	IFSMNLYTTY	ILMGRWALGS	LACDLWLALD	YVASNASVMN
	70	80	90	100	110	120
M5-UniProt:	LLVISEDRYF	SITRPLTYRA	KRTPKRAGIM	IGLAWLISFI	LWAPAILCWQ	YLVGKRTVPL
M5-PSIPRED:	LLVISEDRYF	SITRPLTYRA	KRTPKRAGIM	IGLAWLISFI	LWAPAILCWQ	YLVGKRTVPL
M5-PHDsec :	LLVISEDRYF	SITRPLTYRA	KRTPKRAGIM	IGLAWLISFI	LWAPAILCWQ	YLVGKRTVPL
M5-Jpred :	LLVISEDRYF	SITRPLTYRA	KRTPKRAGIM	IGLAWLISFI	LWAPAILCWQ	YLVGKRTVPL
	130	140	150	160	170	180
M5-UniProt:	DECQIQFLSE	PTITFGTAIA	AFYIPVSVMT	ILYCRIYRET	EKRTKDLADL	QGSDSVTKAE
M5-PSIPRED:	DECQIQFLSE	PTITFGTAIA	AFYIPVSVMT	ILYCRIYRET	EKRTKDLADL	QGSDSVTKAE
M5-PHDsec :	DECQIQFLSE	PTITFGTAIA	AFYIPVSVMT	ILYCRIYRET	EKRTKDLADL	QGSDSVTKAE
M5-Jpred :	DECQIQFLSE	PTITFGTAIA	AFYIPVSVMT	ILYCRIYRET	EKRTKDLADL	QGSDSVTKAE
	190	200	210	220	230	240
M5-UniProt:	KRKPAHRALF	RSCLRCPRPT	LAQREERNQAS	WSSSRRTST	TGKPSQATGP	SANWAKAEQL
M5-PSIPRED:	KRKPAHRALF	RSCLRCPRPT	LAQREERNQAS	WSSSRRTST	TGKPSQATGP	SANWAKAEQL
M5-PHDsec :	KRKPAHRALF	RSCLRCPRPT	LAQREERNQAS	WSSSRRTST	TGKPSQATGP	SANWAKAEQL
M5-Jpred :	KRKPAHRALF	RSCLRCPRPT	LAQREERNQAS	WSSSRRTST	TGKPSQATGP	SANWAKAEQL
	250	260	270	280	290	300
M5-UniProt:	TTCSSYPSSE	DEDKPATDPV	LQVVYKSQ GK	ESPGEEFSAE	ETEETFVKAE	TEKSDYDTPN
M5-PSIPRED:	TTCSSYPSSE	DEDKPATDPV	LQVVYKSQ GK	ESPGEEFSAE	ETEETFVKAE	TEKSDYDTPN
M5-PHDsec :	TTCSSYPSSE	DEDKPATDPV	LQVVYKSQ GK	ESPGEEFSAE	ETEETFVKAE	TEKSDYDTPN
M5-Jpred :	TTCSSYPSSE	DEDKPATDPV	LQVVYKSQ GK	ESPGEEFSAE	ETEETFVKAE	TEKSDYDTPN
	310	320	330	340	350	360
M5-UniProt:	YLLSPAAHR	PKSQKCVAYK	FRLVVKADGN	QETNNGCHKV	KIMPCFPFVA	KEPSTKGLNP
M5-PSIPRED:	YLLSPAAHR	PKSQKCVAYK	FRLVVKADGN	QETNNGCHKV	KIMPCFPFVA	KEPSTKGLNP
M5-PHDsec :	YLLSPAAHR	PKSQKCVAYK	FRLVVKADGN	QETNNGCHKV	KIMPCFPFVA	KEPSTKGLNP
M5-Jpred :	YLLSPAAHR	PKSQKCVAYK	FRLVVKADGN	QETNNGCHKV	KIMPCFPFVA	KEPSTKGLNP
	370	380	390	400	410	420
M5-UniProt:	NPSHQMTKRK	RVVLVKERKA	AQTL S AILLA	FIITWTPYNI	MVLVSTFCDK	CVPVTLWHLG
M5-PSIPRED:	NPSHQMTKRK	RVVLVKERKA	AQTL S AILLA	FIITWTPYNI	MVLVSTFCDK	CVPVTLWHLG
M5-PHDsec :	NPSHQMTKRK	RVVLVKERKA	AQTL S AILLA	FIITWTPYNI	MVLVSTFCDK	CVPVTLWHLG
M5-Jpred :	NPSHQMTKRK	RVVLVKERKA	AQTL S AILLA	FIITWTPYNI	MVLVSTFCDK	CVPVTLWHLG
	430	440	450	460	470	480
M5-UniProt:	YWLCYVNSTV	NPICYALCNR	TFRKTFKMLL	LCRWKKKKVE	EKLYWQGN SK	LP
M5-PSIPRED:	YWLCYVNSTV	NPICYALCNR	TFRKTFKMLL	LCRWKKKKVE	EKLYWQGN SK	LP
M5-PHDsec :	YWLCYVNSTV	NPICYALCNR	TFRKTFKMLL	LCRWKKKKVE	EKLYWQGN SK	LP
M5-Jpred :	YWLCYVNSTV	NPICYALCNR	TFRKTFKMLL	LCRWKKKKVE	EKLYWQGN SK	LP
	490	500	510	520	530	

Vergleich der verwendeten Sekundärstrukturvorhersageprogramme für den humanen muskarinischen M₅-Rezeptor, Farbgebung s. M₂-Rezeptor

A.8 Moleküldynamik-Skript

```
\#!/bin/sh
#MDS in GROMACS mit zwei Liganden im Rezeptor
#-----
#erstellt von Jasmin Schrobang, 20.12.2005
#Benötigte Files: rezeptor_em.gro, rezeptor.top, mdaequi.mdp,
#Kraftfeldparameter wie .itp-Files etc. entsprechend des rezeptor.top
#Abnehmende Position Restraints auf Mainchain, Sidechain-H und Ligand(en).

#Dieses Skript aendert die Position Restraints im rezeptor.top,
#die Startzeiten und die Dauer der jeweiligen mdruns in .mdp-files.
#Die Trajektorien (.xtc) koennen mit trjcat und die Energien (.edr) mit eneconv
#zu mdgesamt.xtc und mdgesamt.edr zusammengefuehrt werden.
#Für die Auswertung der rmsd-Werte und Energien ist der md_1.tpr zu verwenden.

#Aufbau: Equilibrierung im Kraftfeld ueber 500ps, abnehmende Position Restraints ueber insgesamt
#1000ps, freie Dynamik fuer 6000ps.

#Im rezeptor.top muessen Position Restraints in xyz-Richtung eingefuegt sein, welche
#zwischen dem Protein-Rueckgrat (MainChain) und den Seitenketten (Sidechain-H) unterscheiden.

#Adresse der aktuellen Position Restraints (von Zeile,bis Zeile):
#20600,22175 : Mainchain (in rezeptor.top)
#22176,23775 : Sidechain-H (in rezeptor.top)
#230,$s : NMS (in NMS_fc.itp)
#355,$s : W84 (in W84_fc.itp)

#Aequilibrierung,
#POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 5000 5000 5000/0/500/yes
/usr/local/bin/grompp -f mdaequi.mdp -c rezeptor_em.gro -p rezeptor.top -o mdaequi.tpr -v
/usr/local/bin/mdrun -s mdaequi -o mdaequi -x mdaequi -c mdaequi -e mdaequi -g mdaequi -v

#1) POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 5000 4000 4000/0/100/yes
Aendern der Position Restraints fuer Sidechain-H im rezeptor.top
sed -e '22176,23775s/ 5000/ 4000/g' <rezeptor.top> TEMP1
cp TEMP1 rezeptor.top
#Aendern von nsteps in .mdp
sed -e '14s/250000/50000/g' <mdaequi.mdp> TEMP2
cp TEMP2 md_1.mdp
#Aendern der Position Restraints im NMS_fc.itp
sed -e '230,$s/ 5000/ 4000/g' <NMS_fc.itp> TEMP3
cp TEMP3 NMS_fc.itp
#Aendern der Position Restraints im W84_fc.itp
sed -e '355,$s/ 5000/ 4000/g' <W84_fc.itp> TEMP4
cp TEMP4 W84_fc.itp
/usr/local/bin/grompp -f md_1.mdp -c mdaequi.gro -p rezeptor.top -o md_1.tpr -v
/usr/local/bin/mdrun -s md_1 -o md_1 -x md_1 -c md_1 -e md_1 -g md_1 -v
```

```

#2) POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 4000 2000 2000/100/100/no
#Aendern der Position Restraints im rezeptor.top
sed -e '20600,22175s/ 5000/ 4000/g' <rezeptor.top> TEMP1
sed -e '22176,23775s/ 4000/ 2000/g' <TEMP1> rezeptor.top
#Aendern von t_init und gen_vel in .mdp
sed -e '12s/0/100/g' <md_1.mdp> TEMP2
sed -e '110s/yes/no/g' <TEMP2> md_2.mdp
#Aendern der Position Restraints im NMS_fc.itp
sed -e '230,$s/ 4000/ 2000/g' <NMS_fc.itp> TEMP3
cp TEMP3 NMS_fc.itp
#Aendern der Position Restraints im W84_fc.itp
sed -e '355,$s/ 4000/ 2000/g' <W84_fc.itp> TEMP4
cp TEMP4 W84_fc.itp
/usr/local/bin/grompp -f md_2.mdp -c md_1.gro -p rezeptor.top -o md_2.tpr -v -t md_1.trr -time 100
/usr/local/bin/mdrun -s md_2 -o md_2 -x md_2 -c md_2 -e md_2 -g md_2 -v

```

```

#3) Aendern der Position Restraints im rezeptor.top
#POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 3000 1000 1000/200/100/no
sed -e '20600,22175s/ 4000/ 3000/g' <rezeptor.top> TEMP1
sed -e '22176,23775s/ 2000/ 1000/g' <TEMP1> rezeptor.top
#Aendern von t_init in .mdp
sed -e '12s/100/200/g' <md_2.mdp> TEMP2
cp TEMP2 md_3.mdp
#Aendern der Position Restraints im W84_fc.itp
sed -e '355,$s/ 2000/ 1000/g' <W84_fc.itp> TEMP4
cp TEMP4 W84_fc.itp
/usr/local/bin/grompp -f md_3.mdp -c md_2.gro -p rezeptor.top -o md_3.tpr -v -t md_2.trr -time 200
/usr/local/bin/mdrun -s md_3 -o md_3 -x md_3 -c md_3 -e md_3 -g md_3 -v

```

```

#4) POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 2000 800 800/300/100/no
#Aendern der Position Restraints im rezeptor.top
sed -e '20600,22175s/ 3000/ 2000/g' <rezeptor.top> TEMP1
sed -e '22176,23775s/ 1000/ 800/g' <TEMP1> rezeptor.top
#Aendern von t_init in .mdp
sed -e '12s/200/300/g' <md_3.mdp> TEMP2
cp TEMP2 md_4.mdp
#Aendern der Position Restraints im NMS_fc.itp
sed -e '230,$s/ 1000/ 800/g' <NMS_fc.itp> TEMP3
cp TEMP3 NMS_fc.itp
#Aendern der Position Restraints im W84_fc.itp
sed -e '355,$s/ 1000/ 800/g' <W84_fc.itp> TEMP4
cp TEMP4 W84_fc.itp
/usr/local/bin/grompp -f md_4.mdp -c md_3.gro -p rezeptor.top -o md_4.tpr -v -t md_3.trr -time 300
/usr/local/bin/mdrun -s md_4 -o md_4 -x md_4 -c md_4 -e md_4 -g md_4 -v

```

```

#5) POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 1000 600 600/400/100/no
#Aendern der Position Restraints im rezeptor.top
sed -e '20600,22175s/ 2000/ 1000/g' <rezeptor.top> TEMP1
sed -e '22176,23775s/ 800/ 600/g' <TEMP1> rezeptor.top
#Aendern von t_init in .mdp

```

```

sed -e '12s/300/400/g' <md_4.mdp> TEMP2
cp TEMP2 md_5.mdp
#Aendern der Position Restraints im NMS_fc.itp
sed -e '230,$s/ 800/ 600/g' <NMS_fc.itp> TEMP3
cp TEMP3 NMS_fc.itp
#Aendern der Position Restraints im W84_fc.itp
sed -e '355,$s/ 800/ 600/g' <W84_fc.itp> TEMP4
cp TEMP4 W84_fc.itp
/usr/local/bin/grompp -f md_5.mdp -c md_4.gro -p rezeptor.top -o md_5.tpr -v -t md_4.trr -time 400
/usr/local/bin/mdrun -s md_5 -o md_5 -x md_5 -c md_5 -e md_5 -g md_5 -v

#6) POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 800 400 400/500/100/no
#Aendern der Position Restraints im rezeptor.top
sed -e '20600,22175s/ 1000/ 800/g' <rezeptor.top> TEMP1
sed -e '22176,23775s/ 600/ 400/g' <TEMP1> rezeptor.top
#Aendern von t_init in .mdp
sed -e '12s/400/500/g' <md_5.mdp> TEMP2
cp TEMP2 md_6.mdp
#Aendern der Position Restraints im NMS_fc.itp
sed -e '230,$s/ 600/ 400/g' <NMS_fc.itp> TEMP3
cp TEMP3 NMS_fc.itp
#Aendern der Position Restraints im W84_fc.itp
sed -e '355,$s/ 600/ 400/g' <W84_fc.itp> TEMP4
cp TEMP4 W84_fc.itp
/usr/local/bin/grompp -f md_6.mdp -c md_5.gro -p rezeptor.top -o md_6.tpr -v -t md_5.trr -time 500
/usr/local/bin/mdrun -s md_6 -o md_6 -x md_6 -c md_6 -e md_6 -g md_6 -v

#7) POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 600 200 200/600/100/no
#Aendern der Position Restraints im rezeptor.top
sed -e '20600,22175s/ 800/ 600/g' <rezeptor.top> TEMP1
sed -e '22176,23775s/ 400/ 200/g' <TEMP1> rezeptor.top
#Aendern von t_init in .mdp
sed -e '12s/500/600/g' <md_6.mdp> TEMP2
cp TEMP2 md_7.mdp
#Aendern der Position Restraints im NMS_fc.itp
sed -e '230,$s/ 400/ 200/g' <NMS_fc.itp> TEMP3
cp TEMP3 NMS_fc.itp
#Aendern der Position Restraints im W84_fc.itp
sed -e '355,$s/ 400/ 200/g' <W84_fc.itp> TEMP4
cp TEMP4 W84_fc.itp
/usr/local/bin/grompp -f md_7.mdp -c md_6.gro -p rezeptor.top -o md_7.tpr -v -t md_6.trr -time 600
/usr/local/bin/mdrun -s md_7 -o md_7 -x md_7 -c md_7 -e md_7 -g md_7 -v

#8) POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 400 100 100/700/100/no
#Aendern der Position Restraints im rezeptor.top
sed -e '20600,22175s/ 600/ 400/g' <rezeptor.top> TEMP1
sed -e '22176,23775s/ 200/ 100/g' <TEMP1> rezeptor.top
#Aendern von t_init in .mdp
sed -e '12s/600/700/g' <md_7.mdp> TEMP2
cp TEMP2 md_8.mdp

```

```

#Aendern der Position Restraints im NMS_fc.itp
sed -e '230,$s/ 200/ 100/g' <NMS_fc.itp> TEMP3
cp TEMP3 NMS_fc.itp
#Aendern der Position Restraints im W84_fc.itp
sed -e '355,$s/ 200/ 100/g' <W84_fc.itp> TEMP4
cp TEMP4 W84_fc.itp
/usr/local/bin/grompp -f md_8.mdp -c md_7.gro -p rezeptor.top -o md_8.tpr -v -t md_7.trr -time 700
/usr/local/bin/mdrun -s md_8 -o md_8 -x md_8 -c md_8 -e md_8 -g md_8 -v

#9) POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 200 0 0/800/100/no
#Aendern der Position Restraints im rezeptor.top
sed -e '20600,22175s/ 400/ 200/g' <rezeptor.top> TEMP1
sed -e '22176,23775s/ 100/ 0/g' <TEMP1> rezeptor.top
#Aendern von t_init in .mdp
sed -e '12s/700/800/g' <md_8.mdp> TEMP2
cp TEMP2 md_9.mdp
#Aendern der Position Restraints im NMS_fc.itp
sed -e '230,$s/ 100/ 0/g' <NMS_fc.itp> TEMP3
cp TEMP3 NMS_fc.itp
#Aendern der Position Restraints im W84_fc.itp
sed -e '355,$s/ 100/ 0/g' <W84_fc.itp> TEMP4
cp TEMP4 W84_fc.itp
/usr/local/bin/grompp -f md_9.mdp -c md_8.gro -p rezeptor.top -o md_9.tpr -v -t md_8.trr -time 800
/usr/local/bin/mdrun -s md_9 -o md_9 -x md_9 -c md_9 -e md_9 -g md_9 -v

#10) POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 100 0 0/900/100/no
#Aendern der Position Restraints im rezeptor.top
sed -e '20600,22175s/ 200/ 100/g' <rezeptor.top> TEMP1
cp TEMP1 rezeptor.top
#Aendern von t_init in .mdp
sed -e '12s/800/900/g' <md_9.mdp> TEMP2
cp TEMP2 md_10.mdp
/usr/local/bin/grompp -f md_10.mdp -c md_9.gro -p rezeptor.top -o md_10.tpr -v -t md_9.trr -time 900
/usr/local/bin/mdrun -s md_10 -o md_10 -x md_10 -c md_10 -e md_10 -g md_10 -v

#Freie Dynamik: POSRE Mainchain Sidechain-H Ligand/t_init/nsteps/gen_vel: 0 0 0/1000/6000/no
#Aendern der Position Restraints im rezeptor.top
sed -e '20600,22175s/ 100/ 0/g' <rezeptor.top> TEMP1
cp TEMP1 rezeptor.top
#Aendern von t_init und nsteps in .mdp
sed -e '12s/900/1000/g' <md_10.mdp> TEMP2
sed -e '14s/50000/2500000/g' <TEMP2> mdfrei.mdp
/usr/local/bin/grompp -f mdfrei.mdp -c md_10.gro -p rezeptor.top -o mdfrei.tpr -v -t md_10.trr
-time 1000
/usr/local/bin/mdrun -s mdfrei -o mdfrei -x mdfrei -c mdfrei -e mdfrei -g mdfrei -v

```

A.9 Informationen zu aromatischen Aminosäuren

Informationen stammen aus der GPCR-Datenbank [13] und Referenzen hierin.

Y18/1.27:

- Lokalisation und Konservierung: C-terminaler Bereich des N-Terminus; in humanen biogenen Amin-Rezeptoren zu 80% aliphatische Aminosäuren; in sieben Sequenzen aromatische Aminosäuren; keine Konservierung innerhalb der muskarinischen Rezeptorfamilie: M₂/M₄, Tyr; M₃/M₅, His; M₁, Lys;
- Vorkommen in anderen biogenen Amin-Rezeptoren: α_{2A-C} /5-HT₇-Rezeptor, Tyr; H₄-Rezeptor, Phe;
- GPCR-Datenbank: keine Daten zu Mutationsstudien (Stand April 2008).

Y80/2.61:

- Lokalisation und Konservierung: TM2; überwiegend aliphatische Aminosäuren; acht Sequenzen mit aromatischen Aminosäuren; M₁/M₂/M₄/M₅, Tyr; M₃, Phe;
- Vorkommen in anderen biogenen Amin-Rezeptoren: H₃/H₄, Tyr; D₄-Rezeptor, Phe;
- GPCR-Datenbank: Fünf Mutationen, drei Mutationen aromatischer Aminosäuren: M_{1(Human)}Y82F, D_{4(Human)}F91V, D_{4(Ratte)}F88V; Mutation in M₁-Rezeptor: Affinitätsverlust für M₁-selektives Pirenzepin, Affinitätsgewinn für NMS/Atropin; nur geringe Beeinflussung von Carbachol-Bindung [153].

W89/3.18:

- Lokalisation und Konservierung: e1; zu 100% bei Rezeptoren für biogene Amine konserviert, mögliche generelle Funktion;
- GPCR-Datenbank: keine Daten zu Mutationsstudien (Stand April 2008).

W99/3.28:

- Lokalisation und Konservierung: N-terminaler Bereich von TM3; vor allem aromatische Aminosäuren; Trp zu 71% konserviert; 2 Sequenzen, aliphatische Aminosäuren (D₄: Leu, 5-HT₄: Arg); konserviert innerhalb muskarinischer Rezeptorfamilie;
- GPCR-Datenbank: vier Mutationen: M_{1(Ratte)}W101A (zwei unterschiedliche Untersuchungen), Reduktion der Bindungsaffinität von Acetylcholin und NMS, Signalweiterleitung durch Acetylcholin vermindert; D_{2(Human)}F110L, D_{4(Human)}L111F.

Y104/3.33:

- Lokalisation und Konservierung: TM3; 77% aliphatische Aminosäuren auf; Konservierung innerhalb der muskarinischen Rezeptorfamilie;
- Vorkommen in anderen biogenen Amin-Rezeptoren: H₁/H₃/H₄, Tyr;
- GPCR-Datenbank: vier Mutationen: M_{1(Ratte)}Y106A (zwei unterschiedliche Untersuchungen), M_{1(Ratte)}Y106N, M_{3(Ratte)}Y148F, Reduktion der Bindungsaffinität von Acetylcholin und NMS, Signalweiterleitung durch Acetylcholin vermindert;

Y177/5.29:

- Lokalisation und Konservierung: e2; fünf Sequenzen mit aromatischen Aminosäuren: M₁/M₂, Tyr; M₃/M₄, Phe; M₅, Gln; H₃, Tyr;
- GPCR-Datenbank: M₂(*Human*)Y177F, M₃(*Human*)F222Y, M₄(*Human*)F186Y.

W400/6.48:

- Lokalisation und Konservierung: TM6; zu 100% bei Rezeptoren für biogene Amine konserviert, mögliche generelle Funktion; Pin Point
- GPCR-Datenbank: sieben Mutationen, drei an muskarinischen Rezeptoren: M₁(*Ratte*)W378A, M₂(*Human*)W400A und M₃(*Ratte*)W503F, essentieller Einfluss auf Bindung orthosterischer Liganden; M₅-Rezeptor, funktionell konservierte Aminosäure.

Y403/6.51:

- Lokalisation und Konservierung: TM6; Muskarinische/Histaminerge Rezeptoren, Tyr; andere biogene Amin-Rezeptoren, Phe;
- GPCR-Datenbank: 19 Mutationen für biogene Amine; elf Mutationen an muskarinischen Rezeptoren; funktionell konservierte Aminosäure; Einfluss auf Bindung von Agonisten und Antagonisten bei Mutation zu Ala; Mutation M₃(*Ratte*)Y506/6.51F, verminderte Signalweiterleitung durch Carbachol.

W422/7.35:

- Lokalisation und Konservierung: N-terminaler Bereich von TM7; 60% aliphatische Aminosäuren; muskarinische Rezeptoren, 100%ige Konservierung;
- GPCR-Datenbank: zwei Mutationen; keine Daten zu muskarinischen Rezeptoren (Stand April 2008).

Y426/7.39:

- Lokalisation und Konservierung: TM7; Konservierung nur innerhalb muskarinischer Rezeptorfamilie; α-Rezeptoren/H₃/H₄, Phe;
- GPCR-Datenbank: 14 Mutationen; drei Mutationen zu muskarinischen Rezeptoren, M₁(*Ratte*)Y404A, M₁(*Ratte*)Y404F, M₃(*Ratte*)Y529F, verminderte Acetylcholinbindung.

W427/7.40:

- Lokalisation und Konservierung: TM7; zu 100% bei Rezeptoren für biogene Amine konserviert, mögliche generelle Funktion;
- GPCR-Datenbank: 5-HT_{2A}(*Ratte*)W367A, M₁(*Ratte*)W405A und M₃(*Ratte*)W530F.

Y430/7.43:

- Lokalisation und Konservierung: TM7; 100% aromatische Aminosäuren; D₁/D₅/H₃/H₄, Tyr; restlichen Sequenzen, Trp konserviert;
- GPCR-Datenbank: Sechs Mutationen, vier Mutationen muskarinischer Rezeptoren: M₁(*Ratte*)Y408A, M₁(*Ratte*)Y408F, M₃(*Ratte*)Y533, M₃(*Ratte*)Y533F); Beteiligung an Signalweiterleitung von Acetylcholin.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Hilfe und Unterstützung der Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die sehr gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima danken.

Mein persönlicher Dank gilt Frau Dr. Nadine Sonnenberg für unsere gemeinsame Zeit im Praktikum, die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen und vor allem für ihre gute Freundschaft, die sich im Laufe der Zeit entwickelt hat.

Bei Peter Sippel möchte ich mich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Er war als Systemadministrator bei kleineren und größeren technischen Problemen stets zur Stelle und hat mir für seine Stellvertretung viele hilfreiche Dinge beigebracht.

Frau Dr. Monika Höltje, Birte Schmitz und Gisela Jessen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung. Birte Schmitz danke ich für die sehr schnelle und hilfreiche Korrektur meiner Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Stefanie Prilla für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit. Sie war stets bereit meine zahlreichen Fragen zu ihren experimentellen Daten zu beantworten. Bei Nadine Linsel bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit am Ende meiner Promotionszeit.

Bei Björn Ley möchte ich mich für seine offenen Arme, seine liebevolle Unterstützung und seine Aufbauhilfe bedanken. In der letzten Phase meiner Promotionszeit musstest Du zum Teil große Geduld mit mir aufwenden und dafür danke ich Dir.

Ein besonderer Dank gilt vor allem meinen Eltern Bärbel und Günter Schrobang. Ihr habt mir ein offenes Herz und einen freien Geist mitgegeben und mich immer unterstützt und an mich geglaubt. Ich danke Euch auch dafür, dass Ihr trotz der vielen Fachwörter meine Arbeit schnell und gründlich korrigiert und mir bei der Umsetzung der Korrekturen hilfreich zur Seite gestanden habt.

Lebenslauf

Name Jasmin Corinna Dorothee Schrobang
geboren am 09.12.1978
in Schwelm

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Büttenberg, Ennepetal
1988-1997 Märkisches Gymnasium Schwelm
05/1997 Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

08/1997 - 03/1999 Ausbildung zur Pharmazeutisch-Kaufmännischen Angestellten
St. Georg-Apotheke, Ennepetal
05/1999 Abschlussprüfung

Studium

04/1999 - 09/2003 Studium der Pharmazie an der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
10/2003 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/2003 - 04/2004 Pharmaziepraktikum, Elefanten-Apotheke, Neuss
05/2004 - 10/2004 Pharmaziepraktikum, Institut für Pharmazeutische Chemie,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
02/2005 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
03/2005 Approbation als Apothekerin

Wissenschaftliche Tätigkeit

11/2004 - 04/2008 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am
Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje