

Identifizierung und Charakterisierung neuartiger membranständiger Pyrimidin-Rezeptoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Meryem Köse

aus

Nizip / Türkei

Bonn 2006

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

1. Referent: Prof. Dr. Christa E. Müller
2. Referent: Priv. Doz. Dr. Daniela Gündisch
3. Referent: Prof. Dr. Klaus Mohr
4. Referent: Prof. Dr. Ivar v. Kügelgen

Tag der Promotion: 19. Mai 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2002 bis April 2006 am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn in Poppelsdorf unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für die interessante Themenstellung und ihre stetige Unterstützung. Die vielen wertvollen Anregungen, die sich aus den zahlreichen Diskussionen ergaben, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Priv. Doz. Dr. Daniela Gündisch danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs 677 „Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“.

Gewidmet meinen Eltern
In Liebe und Dankbarkeit
Für ihre Unterstützung

Bu çalışmayı canım annem ve
babama ithaf ediyorum

„Das Schönste und Tiefste, das der Mensch erleben kann, ist das Gefühl des Geheimnisvollen. Es ist das Motiv allen tieferen Strebens in Kunst und Wissenschaft. Wer dies nicht erlebt hat, erscheint mir, wenn nicht wie ein Toter, so doch wie ein Blinder. Zu empfinden, dass hinter dem Erlebbaren ein für unseren Geist Unerreichbares verborgen sei, dessen Schönheit und Erhabenheit uns nur mittelbar und im schwachen Widerschein erreicht, das ist Religiosität, in diesem Sinne bin ich religiös. Es ist mir genug, diese Geheimnisse staunend zu ahnen und zu versuchen, von der erhabenen Struktur des Seienden in Demut ein mattes Abbild geistig zu erfassen.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Verzeichnis der Begriffe und Definitionen	X
1 Einleitung	1
1.1 Genomforschung und Arzneimittel der Zukunft	2
1.2 Der Pyrimidin-Metabolismus	4
1.2.1 Die Pyrimidin- <i>de-novo</i> -Synthese	4
1.2.2 Der Pyrimidin- <i>Salvage</i> -Pathway	10
1.2.3 Der Pyrimidin-Abbauweg	14
1.3 Transporter für Nucleoside und Nucleobasen	17
1.3.1 Nucleosid-Transporter	18
1.3.2 Nucleobasen-Transporter	25
1.4 5-Fluoruracil	30
1.4.1 Metabolismus	30
1.4.2 Wirkmechanismus von 5-Fluoruracil	34
1.4.3 Limitierungen der 5-Fluoruracil-Aktivität	34
1.4.4 Peroral applizierbare Fluorpyrimidine	36
1.4.4.1 Capecitabin	37
1.4.4.2 UFT [®]	38
1.4.4.3 Eniluracil	38
1.4.4.4 S-1	39
1.4.4.5 BOF-A2	40
1.4.4.6 Vor- und Nachteile der oralen Zytostatika	41
1.5 Die Nucleobase Uracil	42
1.6 Ziel der Arbeit	47

2	Charakterisierung einer spezifischen Bindungsstelle für [³H]Uracil	49
2.1	Einleitung	50
2.2	Identifizierung der Uracil-Bindungsstelle	51
2.2.1	Spezifische Bindung von [³ H]Uracil an Ratten-und Kalbs-Gewebe.....	51
2.2.2	Temperaturabhängigkeit der [³ H]Uracil-Bindung.....	53
2.2.3	Proteinlinearität	54
2.2.4	Spezifische [³ H]Uracil-Bindung an Humanhirn-Gewebe	55
2.3	Entwicklung eines Radioligand-Rezeptor-Bindungsassays für [³H]Uracil an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen	56
2.3.1	Einfluss der Puffer-Zusammensetzung	56
2.3.2	Das Lösungsmittel.....	58
2.3.3	Die Membranpräparation	59
2.3.4	Die Radioligandkonzentration.....	60
2.3.5	Kinetik der [³ H]Uracil-Bindung.....	61
2.3.6	Zusammenfassung der Versuchsoptimierung	63
2.4	Sättigungsexperimente	64
2.4.1	K _D -Wert am Kalbshirn-Striatum	65
2.4.2	K _D -Wert am Rattenhirn-Striatum.....	67
2.4.3	K _D -Werte am Humanhirn.....	69
2.4.3.1	Humanes Hirncortex-Gewebe.....	69
2.4.3.2	Humanes Nucleus caudate- und Putamen-Gewebe	70
2.4.3.3	Humanes Thalamus-Gewebe.....	72
2.4.4	K _D -Wert an NG108-15-Zellen	74
2.4.5	Untersuchung des Effektes von Guanosin-5'-triphosphat auf die [³ H]Uracil-Bindung.....	76
2.4.6	Zusammenfassung.....	80
2.5	Kompetitionsexperimente an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen	83
2.5.1	Homologe Kompetitionsexperimente.....	84
2.5.2	Heterologe Kompetitionsexperimente mit Uracil-Derivaten	85
2.5.2.1	Uracil-Derivate mit Substitution in Position 1 bzw. 2.....	86
2.5.2.2	Uracil-Derivate mit Substitution in Position 3 bzw. 4.....	88
2.5.2.3	Uracil-Derivate mit Substitution in Position 5	90
2.5.2.4	Uracil-Derivate mit Substitution in Position 6.....	92
2.5.2.5	Uracil-Derivate mit mehrfacher Substitution.....	94

2.5.2.6	Dihydrouracil.....	96
2.5.3	Heterologe Konkurrenzexperimente mit verschiedenen Substanzen.....	97
2.5.3.1	Nukleobasen	97
2.5.3.2	Uridin und andere Pyrimidin-Nukleoside	98
2.5.3.3	Adenosin und Adenosin-Derivate	100
2.5.3.4	Adenin- und Uracil-Nukleotide	102
2.5.3.5	Xanthine und Xanthin-Analoga	103
2.5.3.6	Barbitursäure und Derivate.....	107
2.5.3.7	Harnstoff-Derivate.....	110
2.5.3.8	Testsubstanzen unterschiedlicher Strukturklassen.....	111
2.5.4	Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	114
2.6	Konkurrenzexperimente an Membranpräparationen von NG108-15-Zellen	118
2.7	Charakterisierung von Uracil-Bindungsstellen in verschiedenen Zelllinien	120
2.8	Funktionelle Untersuchungen	123
2.8.1	Signaltransduktion membranständiger Rezeptoren.....	124
2.8.2	Einfluss von Uracil auf die Forskolin-induzierte cAMP-Akkumulation untersucht an NG108-15-Zellen	129
2.8.2.1	Bestimmung der cAMP-Akkumulation in Membranen von NG108-15-Zellen.....	130
2.8.2.2	Bestimmung der cAMP-Akkumulation in intakten NG108-15-Zellen.....	132
2.8.2.3	Zusammenfassung	132
2.8.3	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien	
2.8.4	Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration in NG108-15-Zellen	136
2.8.5	Zusammenfassung und Diskussion	138
3	Vorversuche zur Identifizierung des Uracil-bindenden Proteins mittels Photoaffinitätsmarkierung	139
3.1	Einleitung	140
3.2	Photoaffinitätsmarkierung	141
3.2.1	Prinzip der Photoaffinitätsmarkierung.....	141
3.2.2	Markierungsstrategie	142
3.2.3	Überprüfung der kovalenten Bindung mit 5-Azidouracil.....	144

3.3	Solubilisierung von Kalbshirn-Striatum-Membranen.....	146
3.3.1	Detergenzien zur Solubilisierung	146
3.3.2	Wahl des geeigneten Detergenzes	149
3.3.3	Ermittlung der optimalen Detergenzkonzentration für die Solubilisierung der Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation als Quelle der Uracil-Bindungsstellen	149
3.3.4	Zusammenfassung	154
3.4	Anreicherung der Uracil-Bindungsstellen mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation	155
4	Studien am postulierten „Uridin-Rezeptor“	159
4.1	Geschichtliche Entwicklung der „Uridin-Forschung“	160
4.2	Aufgabenstellung	162
4.3	Bindungsstudien mit [³ H]Phenacyluridin und [³ H]Uridin	163
4.3.1	Filtrationsassays mit [³ H]Phenacyluridin	165
4.3.2	Zentrifugationsassays	170
4.3.3	Filtrationsassays mit [³ H]Uridin	172
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	174
5	Isolierung und Charakterisierung der Uridin-Cytidin-Kinase..	177
5.1	Einleitung	178
5.1.1	Eigenschaften der Uridin-Cytidin-Kinase	178
5.1.2	Biologische Relevanz	182
5.1.3	Substrate der Uridin-Cytidin-Kinase	182
5.1.4	Inhibitoren der Uridin-Cytidin-Kinase	185
5.2	Aufgabenstellung	187
5.3	Reinigung des Enzyms Uridin-Cytidin-Kinase	188
5.4	Anionenaustausch-Chromatographie	189
5.5	Gelchromatographie	191

5.6	Aktivitätsbestimmung mittels Radioassay	193
5.6.1	Steady-State-Phase	193
5.6.2	Enzymkinetik der Uridin-Cytidin-Kinase	194
5.7	Zusammenfassung	197
6	Zusammenfassung & Ausblick.....	199
7	Experimenteller Teil	205
7.1	Allgemeine Angaben.....	206
7.1.1	Geräte und Material	206
7.1.2	Chemikalien.....	207
7.1.3	Radioliganden.....	210
7.1.4	Zellen und deren Ursprung.....	211
7.1.5	Gewebe	211
7.1.6	Pufferlösungen.....	212
7.2	Zellkultur.....	215
7.2.1	Nährmedien für die Zellkultur.....	216
7.2.2	Auftauen neuer Zellen	218
7.2.3	Kultur von Zellen.....	218
7.2.4	Erstellen von Backups und Einfrieren.....	218
7.2.5	Membranpräparationen von Zellen.....	219
7.2.6	Zellzahlbestimmung	222
7.3	Gewebepräparationen	223
7.3.1	Membranpräparation von Kalbs-Thalamus	223
7.3.2	Membranpräparation von Kalbshirn-Striatum als Quelle für die Uracil-Bindungsstellen	224
7.3.3	Membranpräparation von Rattenhirn-Cortex (I)	225
7.3.4	Membranpräparation von Rattenhirn-Striatum	225
7.3.5	Membranpräparation von Rattenhirn-Cortex (II)	226
7.4	Proteinbestimmung nach Lowry	227
7.5	Radioligand-Bindungsstudien	228
7.5.1	Kompetitionsexperimente mit [³ H]Uracil	228
7.5.2	Sättigungsexperimente mit [³ H]Uracil	232

7.5.2.1	Sättigungsexperimente in Anwesenheit eines stabilen GTP-Analogen.....	234
7.5.3	Kinetische Experimente mit [³ H]Uracil	236
7.5.3.1	Assoziations-Experimente mit [³ H]Uracil.....	236
7.5.3.2	Dissoziations-Experimente mit [³ H]Uracil.....	237
7.5.4	Zentrifugationsassays	239
7.5.4.1	Zentrifugationsassay mit [³ H]Uridin	239
7.5.4.2	Zentrifugationsassay mit [³ H]Phenacyluridin	239
7.5.5	Bestimmung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP).....	240
7.5.5.1	cAMP-Versuche mit NG108-15-Zellmembranpräparationen.....	240
7.5.5.2	cAMP-Versuche mit intakten NG108-15-Zellen	243
7.5.6	GTPγS-Bindungsstudien	245
7.6	Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation.....	249
7.7	SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese	251
7.8	Isolierung und Aufreinigung der Uridin-Cytidin-Kinase.....	254
7.8.1	Isolierung der Uridin-Cytidin-Kinase	255
7.8.2	Ultrafiltration.....	256
7.8.3	Anionenaustausch-Chromatographie	257
7.8.4	Größenausschlußchromatographie	259
7.9	Radioassay zur Aktivitätsbestimmung der Uridin-Cytidin-Kinase	260
7.9.1	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K _m	260
7.9.2	Kinetische Experimente	261
7.9.3	Erniedrigung der spezifischen Aktivität von [³ H]Uridin	261

Literaturverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
AC	Adenylatcyclase
ADA	Adenosindesaminase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B _{max}	Maximale Bindungsstellenzahl
BSA	Bovines Serum-Albumin
CADO	2-Chloradenosin
cAMP	Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
ChB	Chargenbezeichnung
CHAPS	3-[(3-Chloramidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat
CHO	chinesische Hamsterovarien
Ci	Curie (1 Ci = 37 GBq)
CMC	critical micelle concentration
CPM	Counts pro Minute
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extra Cellular Signal Regulated Protein Kinase“, Vertreter der MAPK, welcher an der Weiterleitung mitogener Signale in der Zelle beteiligt ist
ET-1	Endothelin-1
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
h	Stunde, human
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HEK	Human embryonal kidney
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxantin

IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration
IEC	Ion exchange chromatography (Ionenaustauschchromatographie)
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
I.U.	International Units (Internationale Einheiten)
K _D	Dissoziationskonstante
K _I	Inhibitionskonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LSC	Liquid Scintillation Counting (Flüssigkeits-Szintillations-Messung)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEM	Minimum essential Medium
mM, μ M, nM	millimolar, mikromolar, nanomolar
n	nativ
n.b.	nicht bestimmt
NEAA	Non essential amino acids (nicht essentielle Aminosäuren)
NG108-15	Maus-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybrid-Zelllinie
nm	Nanometer
NECA	5'-N-Ethyl-carboxamido-adenosin
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
NMP	Nukleosidmonophosphat
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PEI	Polyethylenimin
Pl ₃ K	Phosphatidylinositol-3-Kinase.
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Proteinkinase
pK _i	Negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante des Inhibitor-Rezeptor-Komplexes bzw. Bindungskonstante
PL-C	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PSB	Pharmaceutical Sciences Bonn
RBL cells	Rat basophilic leukaemia cells (basophile Leukämiezellen der Ratte)
Ro20-1724	4-(3-Butoxy-4-methoxyphenyl)methyl-2-imidazolidon
RG	Reagenzgläser
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro minute)
RT	Raumtemperatur
SAR	Structure Activity Relationship (Struktur-Wirkungs-Beziehung)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natrium Laurylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie, Gelfiltration (<u>S</u> ize <u>e</u> xclusion <u>c</u> hromatography)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SR	Sarkoplasmatisches Reticulum

T ₃	Liothyronin
T ₄	Levothyroxin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units (Enzymeinheiten)
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
WBB	Wasserstoffbrückenbindung
ZNS	Zentrales Nervensystem

Verzeichnis der Begriffe und Definitionen

Adhärente Zellen

Zellen, die auf einem Substrat - meist der Wandung des Kulturgefäßes – festwachsen.

Genom

Gesamtheit der vererbaren Nukleinsäure einer mehr oder weniger autonomen Struktur. Diese autonome Struktur kann ein Virus, eine Zelle, ein Organell oder ein Organismus sein.

in vitro

Test, Haltung, Züchtung in Kulturgefäßen (lat. im Glas)

in vivo

Test, Haltung, Züchtung in/am lebenden Organismus

Passage

Subkultivierung von Zellen in Zellkulturen

Primärzellen

Zellen, die erst kurz zuvor aus dem Gewebe oder Organ isoliert wurden und unter Kulturbedingungen nur eine begrenzte Lebenserwartung besitzen.

Proteom

Die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment.

Rezeptor

Die für bestimmte Reize empfindliche und entsprechend ihrer Funktion und Lokalisation aufgebaute „Empfangseinrichtung“ einer Zelle, eines Organs oder Systems; allgemeiner: Bindungsstelle, „receptive substance“ (nach Langley).

Zellkultur

Kultivierung tierischer oder pflanzlicher Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus

Zelllinie

Zellen aus einer Primärkultur zum Zeitpunkt der ersten erfolgreichen Subkultur. Man unterscheidet endliche Zelllinien (Fähigkeit von Zellen, sich über eine begrenzte Zahl von Subkultivierungen zu vermehren) und kontinuierliche bzw. permanente Zelllinien (Fähigkeit von Zellen, sich unbegrenzt vermehren zu können).

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Genomforschung und Arzneimittel der Zukunft

Die enormen Fortschritte in der genetischen und biochemischen Forschung der letzten Jahrzehnte haben der Menschheit zu einem tief greifenden Verständnis der für die Abläufe des Lebens verantwortlichen molekularen Zusammenhänge verholfen. Mit der Entdeckung des strukturellen Aufbaus der DNA durch Watson und Crick¹ im Jahre 1953 wurde der Grundstein für das heute als **Genomics** bezeichnete Forschungsfeld gelegt. Große Anstrengungen in dieser wissenschaftlichen Disziplin führten zur Aufklärung der kompletten Genomsequenzen zahlreicher Spezies, darunter Bakterien² sowie Pflanzen³, und gipfelten in der Entschlüsselung der Basenabfolge des menschlichen Erbguts^{4,5}.

Das Ende 1990 begonnene und 2003 offiziell beendete **internationale Humane Genomprojekt** hat hervorgebracht, dass das haploide menschliche Genom 2,85 Milliarden Basen umfasst. Es ist in 46 Chromosomen zu 48 bis 240 Millionen Basen organisiert. Interessanterweise ist die Zahl der menschlichen Gene nach Sequenzierung des Genoms mit ca. 26000 weit hinter den ursprünglichen Erwartungen zurückgeblieben⁵. Allerdings ist trotz dieser gering erscheinenden Zahl an Genen die Anzahl der Proteine (Proteom) beim Menschen viel höher. Durch alternatives Spleißen oder posttranslationale Modifikationen können aus ein und derselben DNA-Sequenz und dementsprechend ein und derselben prä-mRNA mehrere verschiedene reife mRNA-Moleküle und durch deren Translation auch mehrere unterschiedliche Proteine gebildet werden. So besteht zwischen der Menge einer mRNA und der dazugehörigen Proteinmenge nur eine schwache Korrelation⁶.

Das **Proteom** ist nach Wilkins et al. die quantitative Darstellung der Proteinzusammensetzung einer Zelle, eines Organs oder eines Organismus unter genau definierten Bedingungen⁷. Während das Genom ein gut definiertes und statisches Gebilde ist, reflektiert das Proteom die dynamische Proteinexpression, die durch eine Vielzahl von Parametern wie Translationsregulation, mRNA-Stabilität sowie Proteinstabilität und -abbau beeinflusst wird. Viele Proteine werden nach der Synthese an cytoplasmatischen Ribosomen co- oder posttranslational modifiziert. Hierbei werden z.B. Zuckerreste oder Lipide im Endoplasmatischen Retikulum angehängt oder bestimmte Aminosäuren des Proteins chemisch verändert. Posttranslationale Prozesse haben einen entscheidenden Einfluß auf die Struktur und Funktion vieler Proteine in höheren Organismen. Phosphorylierung an bestimmten Tyrosin-, Serin- oder Aspartatresten spielt für die Aktivierung vieler Enzyme eine entscheidende Rolle und kann aufgrund der Genstruktur nur bedingt vorausgesagt werden.

Der Umfang des menschlichen Proteoms wird auf über 100000 geschätzt. Bei nahezu 40 % der Proteine ist bis heute die genaue physiologische Funktion noch nicht bekannt. **Abb. 1.1** zeigt die Verteilung der Proteinfunktion.

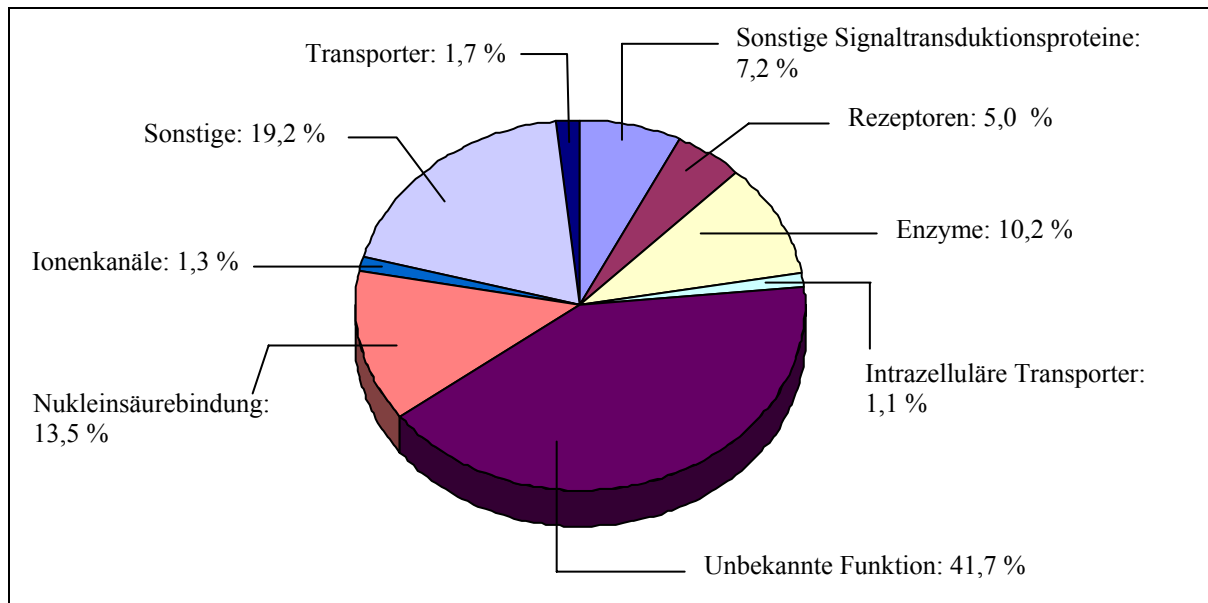


Abb. 1.1: Funktion von Proteinen (modifiziert nach Venter et al.⁵)

Die meisten Funktionen unseres Körpers werden von Proteinen ausgeführt. Da sie auch bei pathophysiologischen Vorgängen eine bedeutende Rolle spielen, hat die Mehrzahl der sich heute auf dem Markt befindlichen Medikamente Proteine als biologische Targets (Zielstrukturen). Nahezu 80 % der heute als Therapeutika (und Diagnostika) verwendeten Substanzen haben Membranproteine als biologische Targets. Über 30 % der sich auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe sind Modulatoren G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR), was diese Rezeptor-Familie zu den erfolgversprechendsten Zielstrukturen in der Arzneimittelentwicklung macht. Die Anzahl an funktionellen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Menschen wird auf ca. 720 geschätzt. Die Hälfte dieser Zahl wird den olfaktorischen Rezeptoren zugesprochen. Von den verbleibenden 360 Rezeptoren wurden bei ca. 210 die natürlichen Liganden identifiziert. Den restlichen 150 konnte bisher kein Ligand zugeordnet werden (sog. „orphan“ oder Waisen-GPCR)⁸. Es werden große Anstrengungen unternommen, um Liganden für die Waisen-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu identifizieren.

1.2 Pyrimidin-Metabolismus

Nukleinsäuren gehören zu den größten Molekülen, welche von der Zelle synthetisiert werden. Ihre Bausteine sind Purin- und Pyrimidinbasen, die glykosidisch mit Ribose, respektive Desoxyribose verknüpft sind (*Nukleoside*). In der Zelle liegen Nukleoside hauptsächlich in ihrer phosphorylierten Form als Mono-, Di-, oder Triphosphate vor (*Nukleotide*). Nukleotide spielen eine zentrale Rolle im zellulären Metabolismus. Neben ihrer **Funktion als Bausteine der Nukleinsäuren** sind sie als **sekundäre zelluläre Botenstoffe** in Signaltransduktionsketten (cAMP, cGMP) bekannt. Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle als **Energieträger** für Phosphorylierungsreaktionen (ATP) und als **Bestandteile von Cofaktoren**, wie NAD und FAD, welche an zahlreichen Redoxreaktionen des Stoffwechsels der Zelle beteiligt sind. Es gibt zwei Arten von Reaktionsfolgen, die der Aufrechterhaltung einer adäquaten intrazellulären Nukleotidkonzentration dienen. Zum einen die **de-novo-Synthese**, die von den metabolischen Vorstufen Aminosäure, Ribosephosphat, CO₂ und NH₃ ausgeht. Zum anderen die Recyclingwege („**salvage pathway**“), welche freie Basen und Nukleoside, die beim Abbau anfallen, wieder in den Prozeß zurückführen. Diese Stoffwechselwege unterliegen einer genauen biochemischen Kontrolle.

1.2.1 Die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese^{9,10}

Die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese versorgt die Zelle mit Pyrimidin-Nukleotiden, welche essentielle Bestandteile der Nukleinsäuren darstellen und als energieliefernde Cosubstrate für eine Vielzahl von Reaktionen wichtig sind. Die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese umfaßt sechs enzymatische Schritte zur Synthese von UMP und ist (mit Ausnahme einiger Parasiten) in nahezu allen untersuchten Spezies vorhanden. Obwohl die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese quasi ubiquitär ist, gibt es zwischen den Arten doch Unterschiede in der Organisation der Enzyme und der dafür kodierenden Gene. Die Zahl der Gene, welche an den sechs enzymatischen Schritten beteiligt sind, nimmt von Prokaryonten zu Eukaryonten ab, jedoch nimmt die Komplexität der Enzyme in gleicher Weise zu. Es bilden sich sog. Cluster-Gene, die für multifunktionelle Enzyme kodieren¹¹. Die sechs Enzymaktivitäten, die für die *de-novo*-Biosynthese von UMP benötigt werden, sind beim Menschen in nur drei Genen verschlüsselt. Eines der Gene produziert ein großes Protein (ca. 200 kD), welches zur Homogenität gereinigt wurde. Dieses Protein enthält drei Enzymaktivitäten: (1) ***Carbamoylphosphat-Synthetase***, (2) ***Aspartat-Transcarbamoylase*** und (3) ***Dihydroorotase*** und ist verantwortlich für die ersten drei Schritte der Pyrimidinbiosynthese (trifunktionelles Enzym, auch als CAD bezeichnet)^{12,13,14,15,16,17}. Der vierte Schritt, die Oxidation von Dihydroorotsäure zu Orotsäure, wird von einem Protein mit nur einer Enzymaktivität, der ***Dihydroorotat-Dehydrogenase***, katalysiert. Die letzten beiden Schritte werden wiederum von einem Protein mit zwei Enzymaktivitäten (***Orotat-Phosphoribosyltransferase*** und ***Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase***) katalysiert (bifunktionelles Enzym).

Die Reaktionsschritte der **Pyrimidin-*de-novo*-Synthese** sind in **Abb. 1.2** aufgeführt und im Text näher erläutert.

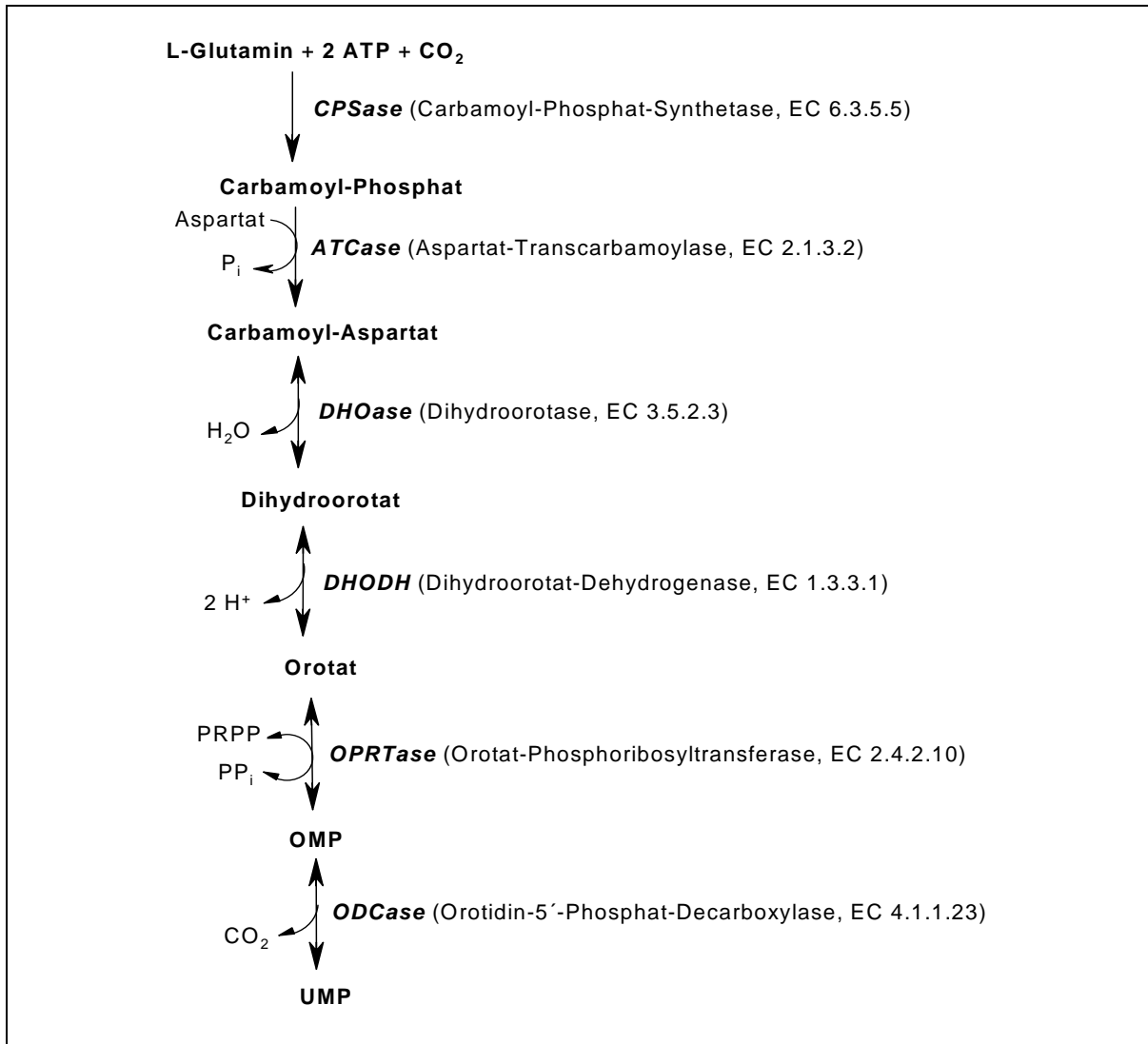


Abb. 1.2: Die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese¹⁸

Anders als bei den Purinen wird bei den Pyrimidinen der heterocyclische Ring unabhängig von der Ribose aufgebaut und erst nach Fertigstellung mit dem Zucker verknüpft. Die Biosynthese des Pyrimidinrings beginnt mit der Bildung von Carbamoylphosphat. Dabei bilden Glutamin und HCO₃⁻ die Ausgangsstoffe, die von der **Carbamoyl-Phosphat-Synthetase** (**CPSase**, EC 6.3.5.5) unter Aufwendung zweier Moleküle ATP zu Carbamoyl-Phosphat, welches ein großes Gruppenübertragungspotential hat, umgesetzt werden. Die Synthese dieses aktivierten Carbamoylgruppendonors ist bei Eukaryoten kompartimentiert. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass zwei verschiedene Enzyme zur Bildung von Carbamoylphosphat existieren. Die zur Synthese der Pyrimidine dienende Carbamoyl-Phosphat-Synthetase (auch Carbamoyl-Phosphat-Synthetase II genannt) kommt im Cytosol aller kernhaltigen Zellen vor. Carbamoyl-Phosphat-Synthetase I hingegen ist in den Mitochondrien von Leberzellen (und in geringem Maße von Darmzellen) lokalisiert und dient

zur Bildung von Carbamoylphosphat für die Harnstoffsynthese, wobei Ammoniak anstatt Glutamin als Stickstoffdonor verwendet wird.

Die Schrittmacherreaktion der Pyrimidinbiosynthese ist die Bildung von N-Carbamoyl-Aspartat aus Aspartat und Carbamoylphosphat. Diese Carbamoylierung wird von der *Aspartat-Transcarbamoylase*^a (*ATCase*, EC 2.1.3.2) katalysiert (**Abb. 1.3**).

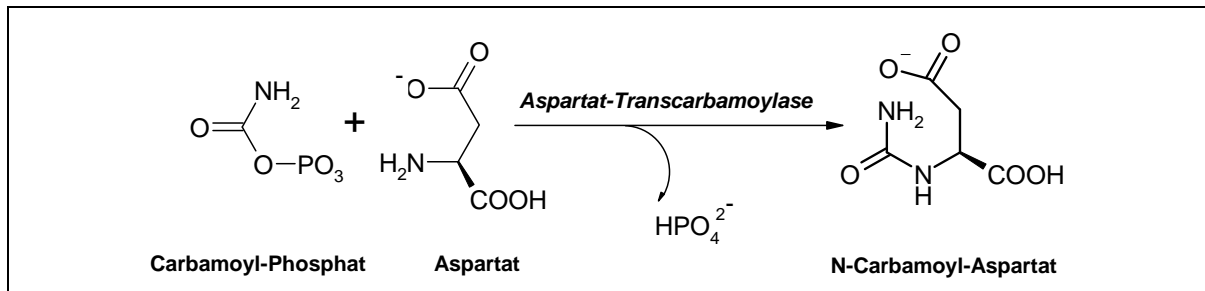


Abb. 1.3: Pyrimidin-*de-novo*-Synthese: Umsetzung von Carbamoyl-Phosphat und Aspartat zu Carbamoyl-Aspartat durch die Aspartat-Transcarbamoylase (ATCase).

Im dritten Schritt (**Abb. 1.4**) katalysiert die *Dihydroorotase* (*DHOase*, EC 3.5.2.3) die intramolekulare Kondensation von Carbamoyl-Aspartat zu Dihydroorotat (DHO), welches im weiteren von der in der mitochondrialen Membran lokalisierten *Dihydroorotat-Dehydrogenase* (*DHODH*, EC 1.3.3.1) zu Orotat oxidiert wird (**Abb. 1.5**).

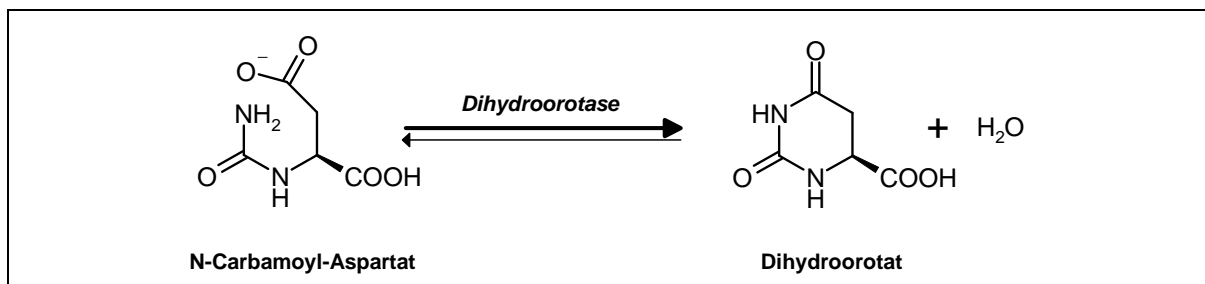


Abb. 1.4: Pyrimidin-*de-novo*-Synthese: Intramolekularer Ringschluß von Carbamoyl-Aspartat zu Dihydroorotat durch Dihydroorotase.

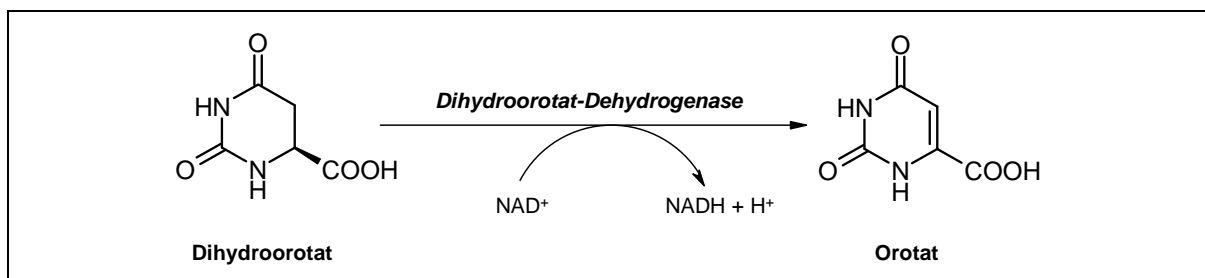


Abb. 1.5: Pyrimidin-*de-novo*-Synthese: Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat durch die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH).

^a Aspartat-Carbamoyltransferase

Unter der katalytischen Wirkung des Enzyms **Orotat-Phosphoribosyltransferase (OPRTase, EC 2.4.2.10)** reagiert das Orotat mit Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) unter Phosphatabspaltung zu Orotidin-5'-phosphat (OMP) (**Abb. 1.6**), welches wiederum von **Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase (ODCase, EC 4.1.1.23)** zu Uridin-5'-phosphat (UMP) decarboxyliert wird (**Abb. 1.7**). Diese beiden Enzyme sind im Cytosol lokalisiert.

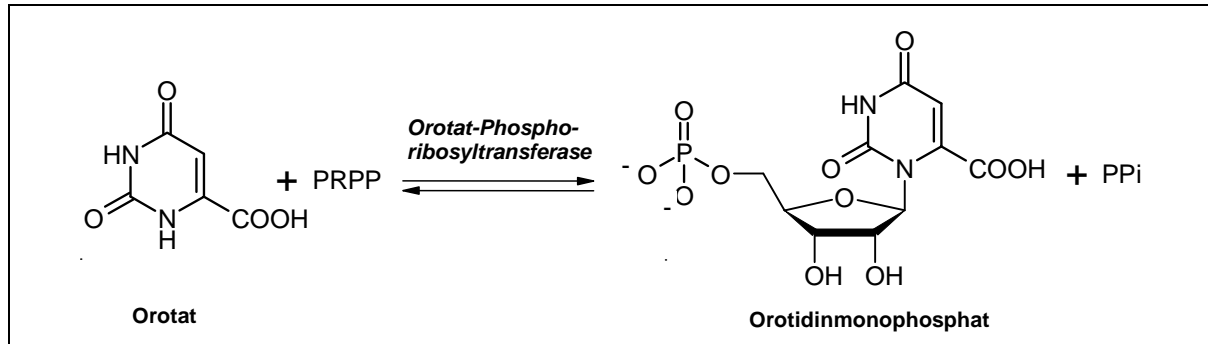


Abb. 1.6: Pyrimidin-*de-novo*-Synthese: Bildung von Orotidinmonophosphat (OMP) durch Orotat-Phosphoribosyltransferase (OPRTase).

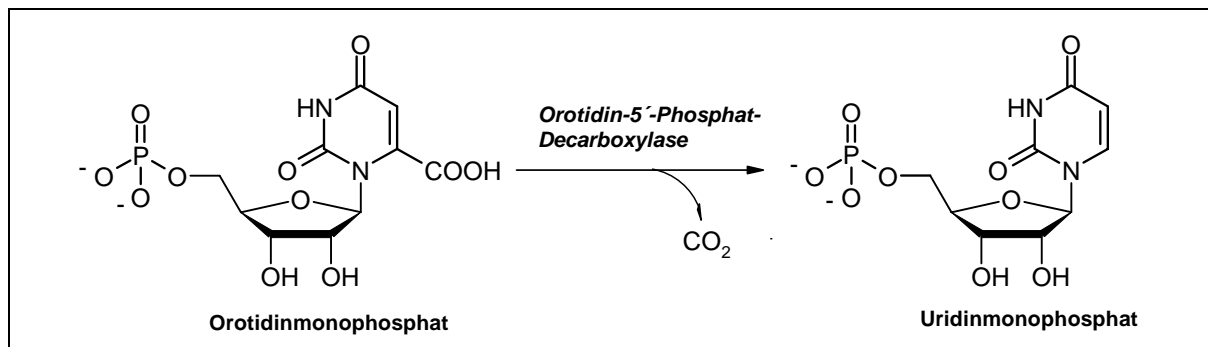


Abb. 1.7: Pyrimidin-*de-novo*-Synthese: Decarboxylierung von Orotidinmonophosphat (OMP) zu Uridinmonophosphat (UMP) durch die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase (ODCase).

UMP dient als Ausgangsprodukt für weitere Pyrimidin-Nukleotide wie UDP, UDP-Glucose, UTP, CTP und deren Derivate. Die Enzyme **Nukleosid-Monophosphat-Kinase (EC 2.7.4.13)** und **Nukleosid-Diphosphat-Kinase (EC 2.7.4.6)** übertragen zur Synthese von UTP unter Verbrauch von ATP nacheinander eine Phosphatgruppe auf UMP bzw. UDP.

UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (*UGPase*, EC 2.7.7.9) katalysiert die Synthese von UDP-Glucose aus UTP durch Nukleotidyl-Gruppentransfer auf α -D-Glucose-1-Phosphat (Abb. 1.8).

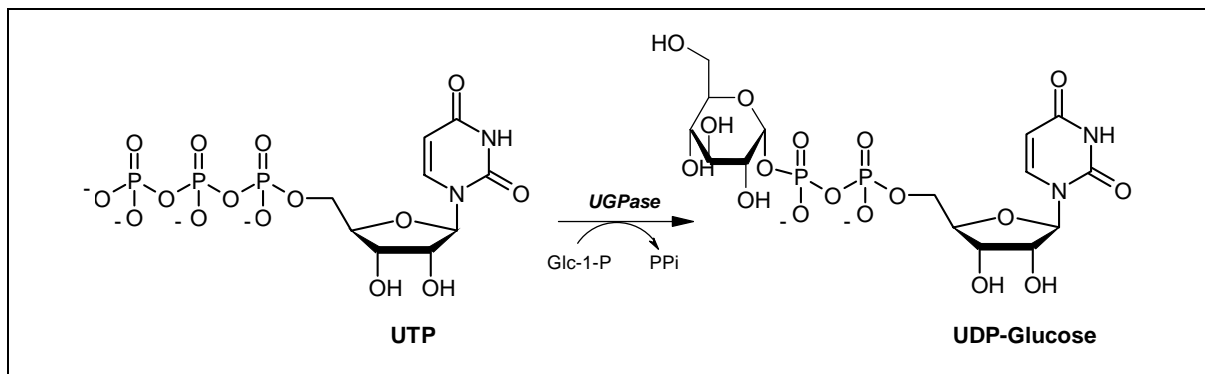


Abb. 1.8: Folgereaktionen der Pyrimidin-*de-novo*-Synthese: Bildung von UDP-Glucose aus UTP und α -D-Glucose-1-Phosphat (Glc-1-P) durch UDP-Glucose-Pyrophosphorylase.

Mit Hilfe der **CTP-Synthase** (*CTPSase*, EC 6.3.4.2) wird aus Uridin-5'-triphosphat (UTP) unter ATP- und NH_3 -Verbrauch Cytidin-5'-triphosphat (CTP) gebildet (Abb. 1.9).

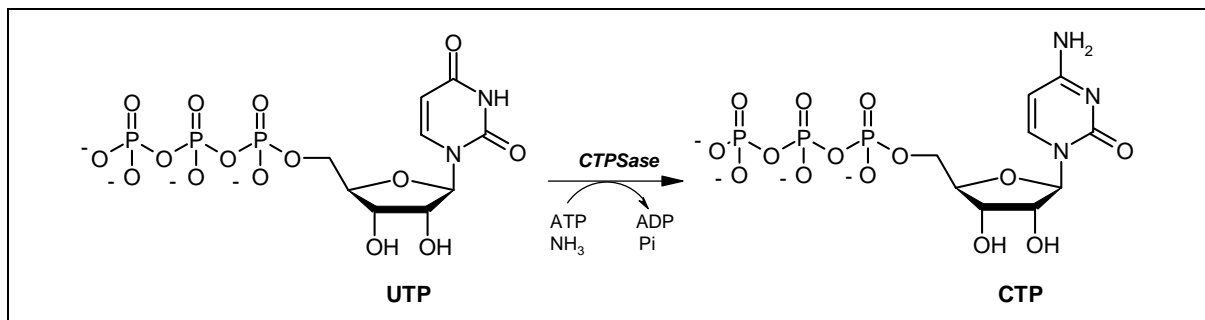


Abb. 1.9: Folgereaktionen der Pyrimidin-*de-novo*-Synthese: Aminierung von UTP zu CTP durch die CTP-Synthase (CTPSase, EC 6.3.4.2).

Die Regulation der Pyrimidinbiosynthese erfolgt hauptsächlich durch die Carbamoylphosphat-Synthetase-Aktivität. Diese wird von **UTP** gehemmt und von **Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP)** aktiviert. Die beiden Liganden verändern die Affinität des Enzyms für ATP und nehmen damit einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Bindung von UTP an das trifunktionelle Enzym CAD führt zu einer Erniedrigung der Affinität und folglich zu einer Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit, während PRPP die Affinität und damit die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht^{19,20}. Neben der allosterischen Regulation durch den Inhibitor UTP und den Aktivator PRPP wird die Carbamoylphosphat-Synthetase-Aktivität auch durch **MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase)**-und **PKA (Protein-Kinase A)**-vermittelte Phosphorylierung kontrolliert. Die MAP-Kinase phosphoryliert das multifunktionelle Protein CAD, dessen Konformation sich dadurch ändert. Dies führt zur Änderung der allosterischen Eigenschaften der Carbamoylphosphat-Synthetase II,

sodass in der phosphorylierten Form die Aktivierbarkeit durch PRPP deutlich erhöht, die Hemmbarkeit durch UTP hingegen deutlich erniedrigt ist. Somit wird durch die MAPK-Phosphorylierung insgesamt die Geschwindigkeit der Pyrimidinbiosynthese beschleunigt. Die PKA-Phosphorylierung erniedrigt die Affinität des Enzyms für beide allosterischen Modulatoren^{21,22,23}.

Desweiteren findet eine Rückkopplung auf der Ebene der Intermediärprodukte statt. Hierbei hemmt **Orotat** sowohl die cytosolische Dihydroorotase als auch die mitochondriale Dihydroorotat-Dehydrogenase. Orotidinmonophosphat-Decarboxylase ist ein weiteres reguliertes Enzym der Pyrimidinbiosynthese. Auf dieses Enzym wirkt UMP inhibierend, jedoch eher im Sinne einer permanenten Dämpfung der UMP-Synthese als im Sinne einer rückgekoppelten Anpassung. Diese Kontrollstelle dient der Aufrechterhaltung des Verhältnisses von Uridin zu Cytidin. Die Regulation der CTP-Bildung aus UTP erfolgt durch allosterische Produkthemmung. Durch Bindung von CTP an ein allosterisches Zentrum der CTP-Synthetase kommt es zur Erhöhung des K_m -Wertes des Enzyms zum Substrat UTP und folglich wird die Synthesegeschwindigkeit erniedrigt. Durch GTP hingegen wird die CTP-Synthetase aktiviert.

Die Pyrimidin *de-novo* Synthese kann durch PALA [N-(Phosphonacetyl)-L-aspartat], einem potentem Inhibitor der Aspartat-Transcarbamoylase,^{24,25} inhibiert werden.

1.2.2 Der Pyrimidin-*Salvage-Pathway*

Salvage- (zu dt. „Bergung“, „Rettung“, „wiedergewonnenes Material“) Stoffwechselwege erfüllen verschiedene physiologische Aufgaben. Sie haben eine wichtige Rolle in der Wiederverwertung von Nukleotiden, Nucleosiden und Nucleobasen. Unter physiologischen Bedingungen beginnt der Pyrimidin-„*Salvage-Pathway*“ eher auf der Stufe der Nucleoside als auf der Stufe der Nucleobasen, während bei den Purin-„*Salvage*“-Stoffwechselwegen die Purinbasen (Adenin, Guanin, Hypoxanthin) wiederverwendet werden.

Moyer et al. untersuchten den Metabolismus von Pyrimidin-Nucleosiden im Plasma von Mäusen. Sie konnten zeigen, dass Uridin und Cytidin sehr rasch aus dem Plasma entfernt werden. Die Halbwertszeit beträgt weniger als 5 Minuten. Uracil, Desoxycytidin, Desoxyuridin und Thymidin werden langsamer ($t_{1/2}$ von 9-13 Minuten) aus dem Plasma entfernt. Während Cytidin und Uridin überwiegend (zu mehr als 50 %) in die jeweiligen Nucleotide umgewandelt werden, wird Uracil fast vollständig abgebaut. Thymidin, Desoxyuridin und Desoxycytidin werden zu 8,9-21 % in *Salvage*-Stoffwechselwegen wiederverwertet²⁶. Desweiteren konnten Moyer et al. zeigen, dass 30-40 % des intravenös applizierten [³H]Uridins in Mäusen in Uracil-Nucleotide umgewandelt wurde, während weniger als 0,3 % des intravenös applizierten [³H]Uracils verwertet wurde²⁷.

Als zentrales Zwischenprodukt der *De-novo*-Synthese kann Uridin-5'-monophosphat (UMP) erneut zum Aufbau von anderen Pyrimidin-Nucleotiden wie Cytidin-5'-monophosphat (CMP), Desoxycytidin-5'-monophosphat (dCMP) und Thymidin-5'-monophosphat (TMP) genutzt werden^{28,29}. Man kann nicht von „dem“ *Salvage-Pathway* im Nucleotidstoffwechsel sprechen. Vielmehr handelt es sich um eine Reihe von Reaktionen, welche Desoxypyrimidinmonophosphate (dPMP) und Pyrimidinmono-phosphate (PMP) wieder in UMP oder CMP umwandeln.

Die Pyrimidin-Ribonucleoside Uridin und Cytidin werden bevorzugt über das Enzym **Uridin-Cytidin-Kinase** (**UCK**, EC 2.7.1.48) (**Abb. 1.10**), einem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym aus dem Pyrimidin-*Salvage*-pathway, aber auch über das unspezifische Enzym **Nucleosid-Phosphotransferase**^{30,31} (EC 2.7.1.77) wiederverwertet.

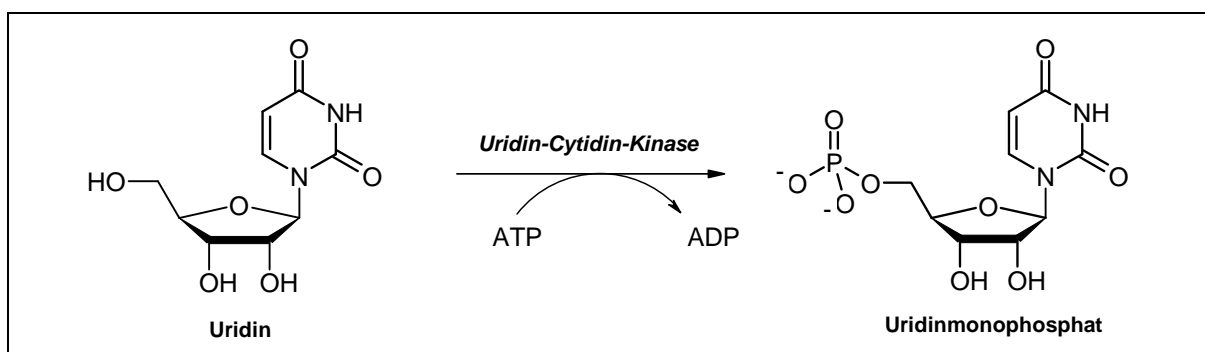


Abb. 1.10: Pyrimidin-*salvage*-pathway: Bildung von UMP aus Uridin durch die Uridin-Cytidin-Kinase.

Uridinmonophosphat und Cytidinmonophosphat werden nachfolgend durch die **Nukleosid-phosphat-Kinase** (ATP:UMP Phosphotransferase, EC 2.7.4.4)^{32,33} bzw. die humane UMP/CMP-Kinase (Cytidylat-Kinase; EC 2.7.4.14³⁴) zu UDP bzw. CDP und durch die **Nukleosid-Diphosphat-Kinase** (EC 2.7.4.6)^{35,36,37} weiter zu UTP und CTP phosphoryliert.

Nach Van Rompay et al.³⁴ wird dTMP durch die **dTMP-Kinase** (Thymidylat-Kinase, Thymidinmonophosphat-Kinase EC 2.7.4.9), der zweiten in Säugetierzellen vorkommenden Nukleosid-Monophosphat-Kinase phosphoryliert.

Uracil kann auf zwei verschiedenen Wegen zu UMP regeneriert werden. Zum einen kann es durch die **Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRTase)**, EC 2.4.2.9) unter Kondensation mit 5'-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat (PRPP) direkt in das korrespondierende Monophosphat UMP umgewandelt werden (**Abb. 1.11**). Zum anderen kann Uracil mit Uridin als Zwischenprodukt über die Uridin-Cytidin-Kinase in UMP umgewandelt werden. Die UPRTase übernimmt hierbei den größten Teil des Umsatzes. Die Bildung von UMP aus Uracil durch die Umwandlung in Uridin mithilfe der **Uridin-Phosphorylase** (EC 2.4.2.3) und nachgeschalteter Phosphorylierung durch die Uridin-Cytidin-Kinase ist dagegen vernachlässigbar gering. Grenson konnte zeigen, dass die Uridin-Cytidin-Kinase-Reaktion in vivo nur eine Nebenreaktion zur Bildung von UMP darstellt, die bei Zugabe von Uridin genutzt wird^{38,39,40}.

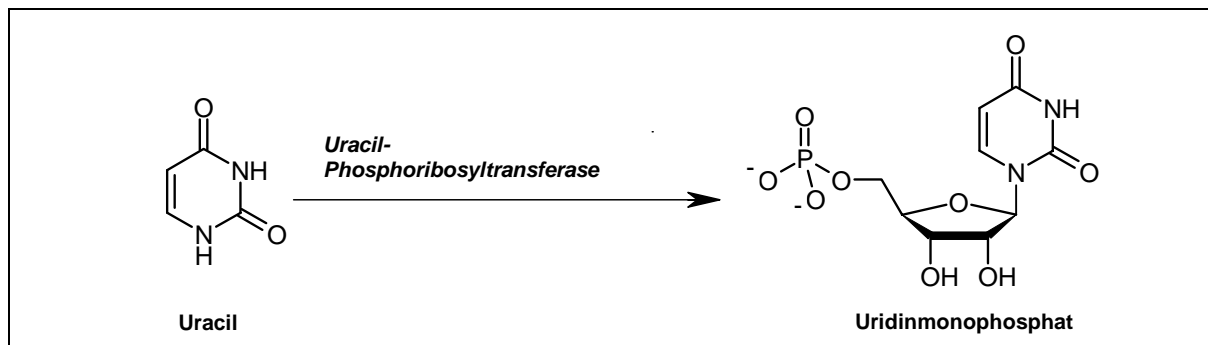


Abb. 1.11: Pyrimidin-salvage-pathway: Bildung von UMP aus Uracil durch die Uracil-Phosphoribosyltransferase.

Die Uridin-Phosphorylase ist ein Enzym, welches Uridin in Uracil umwandeln kann. Bei Verfügbarkeit der Substrate kann das Enzym zwar ebenfalls die Bildung des Nukleotids aus Uracil und Ribose-1-Phosphat katalysieren, jedoch scheint aufgrund der relativ hohen Konzentration an anorganischem Phosphat und der niedrigen Pentose-1-Phosphat-Konzentration in der Zelle die Phosphorylase-Reaktion in der Regel (mit einigen Ausnahmen) nur in die eine Richtung, nämlich des Abbaus von Uridin, zu laufen.

Die Uridin-Phosphorylase ist das wichtigste Enzym in der **Uridin-Homöostase**. Durch die Umwandlung von Uridin zu Uracil und dem nachfolgenden Abbau zu β -Alanin ist Uridin-Phosphorylase für die strikte Kontrolle der Uridin-Konzentration im Plasma und in Geweben verantwortlich. Es sei an dieser erwähnt, dass drei Nukleosid-Phosphorylasen be-

geschrieben worden sind. Die Nukleosid-Phosphorylase (EC 2.4.2.2), die Uridin-Phosphorylase (EC 2.4.2.3) und die Thymidin-Phosphorylase (EC 2.4.2.4). Uridin- und Thymidin-Phosphorylase unterscheiden sich bezüglich ihrer Substrat-Spezifität. Die Uridin-Phosphorylase ist relativ unspezifisch und akzeptiert neben Uridin auch Desoxyuridin, Desoxythymidin, Fluordesoxyuridin und 5'-Desoxy-5-fluoruridin^{41,42,43,44} als Substrate. Die Thymidin-Phosphorylase dagegen akzeptiert bevorzugt Thymidin als Substrat und ist spezifisch für Desoxyribonucleoside. Somit werden von diesem Enzym zwar Desoxyuridin, Fluordesoxyuridin und 5'-Desoxy-5-fluoruridin, aber nicht Uridin akzeptiert^{45,46,47,48,49}.

Cytosin wird durch die **Pyrimidin-Nukleosid-Phosphorylase** (EC 2.4.2.2) zu Cytidin und dieses wiederum durch die **Cytidin-Desaminase** (EC 3.5.4.5)⁵⁰ zu Uridin umgewandelt, welches mittels Uridin-Cytidin-Kinase zu UMP umgesetzt wird (**Abb. 1.12**).

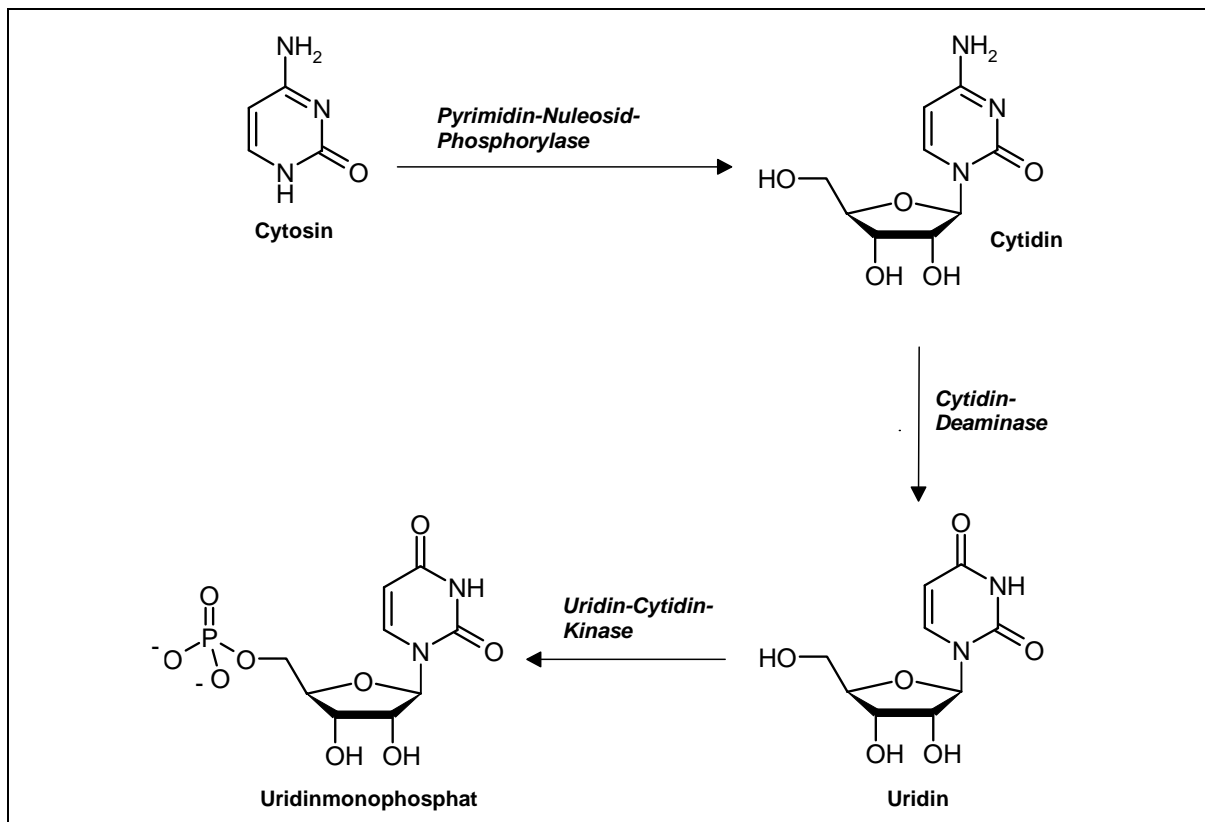


Abb. 1.12: Pyrimidin-salvage-pathway: Bildung von UMP aus Cytosin

Die Desoxyribonucleoside Thymidin und Desoxycytidin (dCytidin) können in ihre korrespondierenden Desoxy-Monophosphate umgesetzt werden. Dabei wird Desoxycytidin durch **Desoxycytidin-Kinase** (EC 2.7.1.74) zu dCMP phosphoryliert⁵¹. Alternativ kann dCytidin auch zu Desoxyuridin desaminiert werden. Das verantwortliche Enzym dafür ist die **Desoxycytidin-Desaminase** (EC 3.5.4.14)⁵².

Mit Desoxyuridin oder Thymidin als Substrat bildet die *Thymidin-Kinase* (EC 2.7.1.21) Thymidinmonophosphat (**Abb. 1.13**). Desoxyuridin, und somit auch Desoxycytidin, kann durch die *Pyrimidin-Desoxyribonukleosid-2'-Hydroxylase* (EC 1.14.11.3) zu Uridin umgesetzt werden^{53,54}. Mit diesem Enzym ist eine Umverteilung von Desoxyribonukleotiden zu Ribonukleotiden möglich.

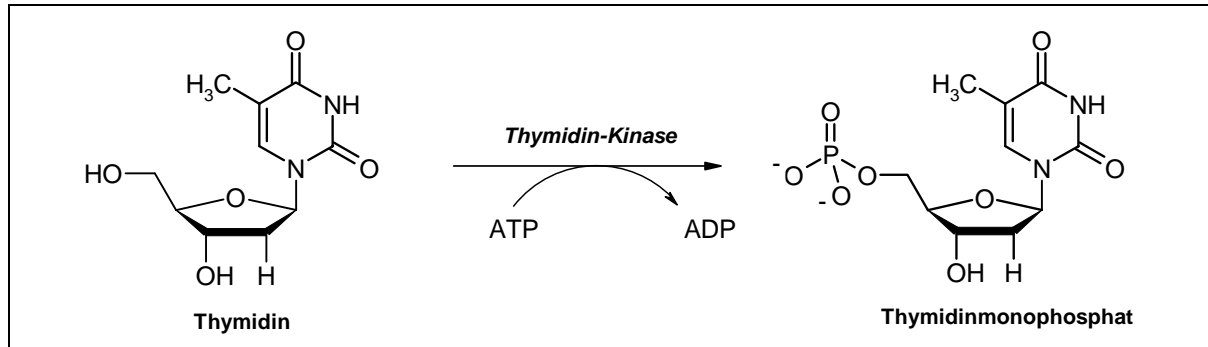


Abb. 1.13: Pyrimidin-*salvage*-pathway: Bildung von dTMP durch Thymidin-Kinase

Canellakis konnte zeigen, dass Uracil in die RNA eingebaut werden kann. Allerdings wird dieser Einbau erst signifikant, wenn die mit dem Pyrimidin-Abbauweg assoziierten Enzyme abgesättigt sind. Es scheint ein inverser Zusammenhang zwischen der Kapazität des Gewebes, RNA zu synthetisieren und seiner Kapazität, Uracil abzubauen, zu geben. Es konnte gezeigt werden, dass normale, sich nicht teilende Gewebe (Leber von Ratten und Mäusen) eine hohe „Katabolismus-Kapazität“ und eine niedrige Kapazität für den Einbau in die RNA haben. Normale, aber sich schnell teilende Gewebe (intestinale Mukosa, sich erneuernde Ratten-Leber) sowie malignes Gewebe (Hepatome, Ehrlich-Ascites-Zellen) zeigten indes eine niedrige „Katabolismus-Kapazität“ für Uracil, während die Einbaurate des Pyrimidins in die RNA sehr hoch war. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass das Wechselspiel zwischen den abbauenden und den aufbauenden Stoffwechselwegen für Uracil einen wichtigen Weg für die Kontrolle der RNA-Bildung darstellt und somit Teil eines homöostatischen Mechanismus sein könnte, welches in Kombination mit anderen Faktoren die Rate der RNA-Synthese reguliert^{55,56,57}.

1.2.3 Der Pyrimidin-Abbauweg

Bei dem Pyrimidin-Abbauweg sind prinzipiell drei Enzyme beteiligt: *Dihydropyrimidin-Dehydrogenase* (*DPD*, EC 1.3.1.2), *Dihydropyrimidinase* (*DHPase*, EC 3.5.2.2) und β -*Ureidopropionase*⁵⁸ (*BUPase*, EC 3.5.1.6).

Uracil oder Thymin sind die Edukte für den Pyrimidinabbau. Diese werden in drei Schritten zu NH_3 , CO_2 und β -Alanin bzw. *R*- β -Aminoisobutyrat abgebaut^{59,60,61,62}. Die Schrittmacherreaktion des Pyrimidin-Abbaus ist die Reduktion von Uracil oder Thymin durch die NADPH-abhängige Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (EC 1.3.1.2)^{63,64} zu 5,6-Dihydrouracil bzw. *R*-5,6-Dihydrothymin. Durch die Dihydropyrimidinase (5,6-Dihydropyridin-Amidohydrolase) wird deren Ringstruktur hydrolytisch geöffnet (**Abb. 1.14**).

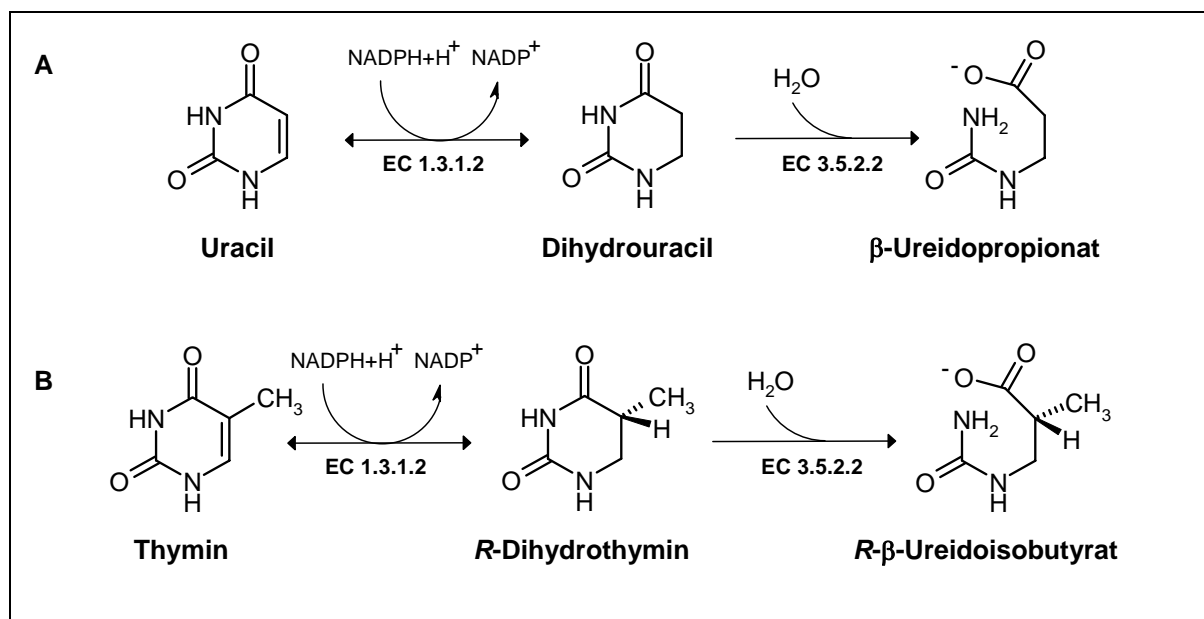


Abb. 1.14: Pyrimidin-Abbau: Pyrimidin-Reduktion zu 5,6-Dihydropyrimidin durch die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (EC 1.3.1.2) und hydrolytische Ringöffnung durch die Dihydropyrimidinase (EC 3.5.2.2).

Alternativ zur NADPH-abhängigen Dihydropyrimidin-Dehydrogenase wurde von Campbell (1957) im Organismus *Clostridium uracilicum* die NADH-abhängige Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (EC 1.3.1.1) beschrieben⁶⁵. Beide Reaktionen sind reversibel und unterscheiden sich lediglich in ihren Cofaktoren NADH und NADPH.

β -Ureidopropionase (N-Carbamoyl- β -Alanin-Amidohydrolase, EC 3.5.1.6) ermöglicht in einem weiteren Schritt unter Abspaltung von NH_3 und CO_2 die irreversible Hydrolyse von β -Ureido-propionat zu β -Alanin (bzw. von *R*- β -Ureidoisobutyrat zu *R*- β -Aminoisobutyrat) (**Abb. 1.15**).

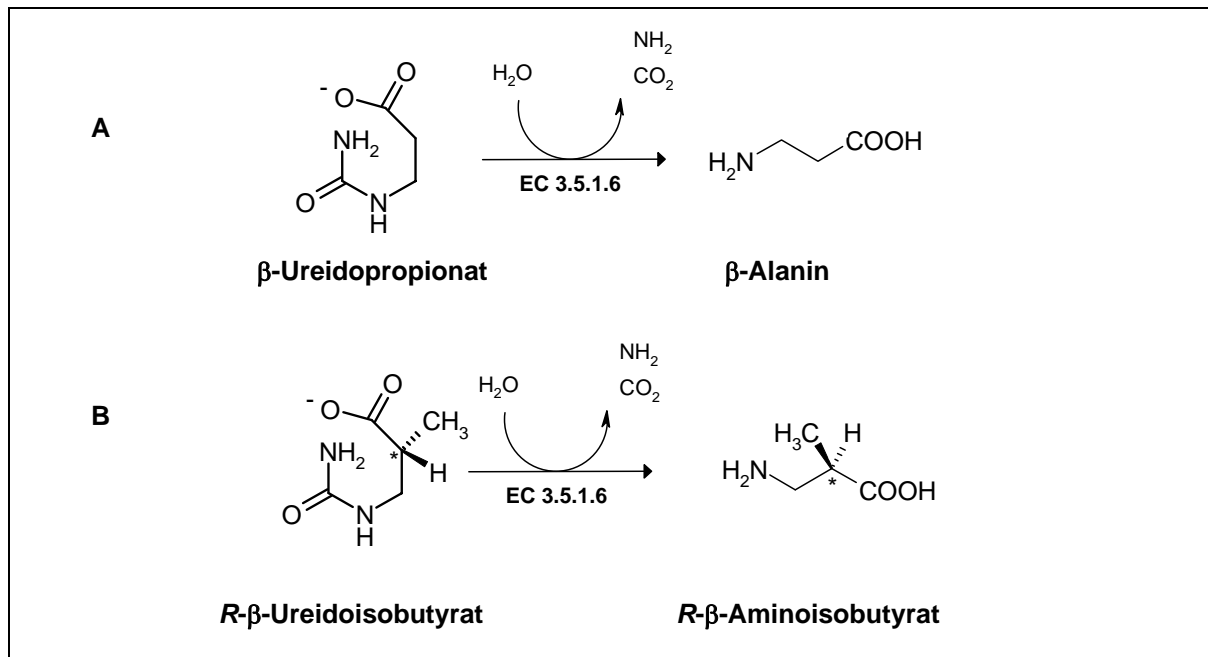


Abb. 5.15: Pyrimidin-Abbau: irreversible Hydrolyse durch β -Ureidopropionase (EC 3.5.1.6).

Nach Fritzson⁶³ kommt der Oxidation von Dihydropyrimidin in vivo keine bedeutende metabolische Funktion zu. Dies wird gestützt durch den hohen K_m -Wert (2 mM) des Enzyms für Dihydropyrimidin und die irreversible β -Ureidopropionase-Reaktion⁶⁶.

Alternativer Abbauweg über Barbitursäure

In den Bakterienstämmen Corynebakterium und Mycobakterium wurde ein weiterer Metabolisierungsweg gefunden, bei dem Uracil nach Bildung aus Cytosin zunächst zur Barbitursäure und danach zu Harnstoff und Malonsäure abgebaut wird (**Abb. 1.16**).

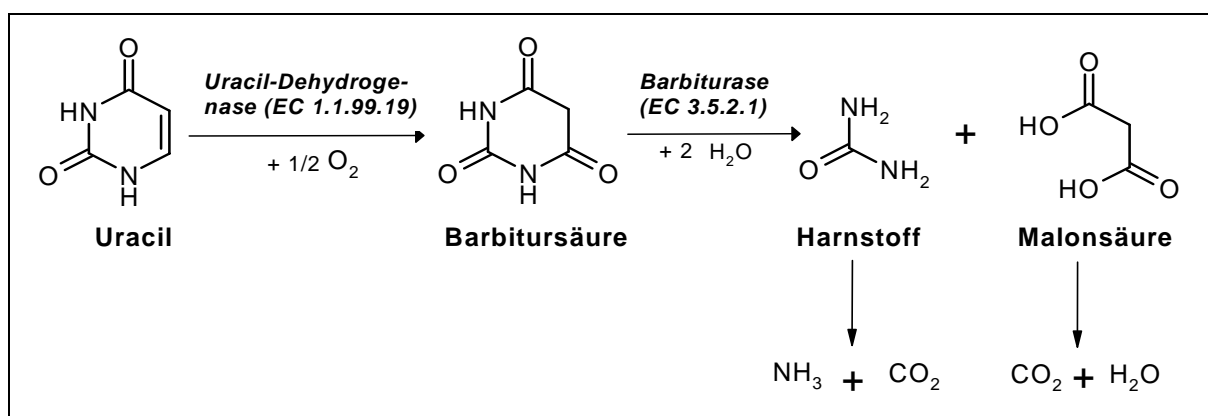


Abb. 1.16: Pyrimidin-Abbau in Bakterien: Abbau von Uracil zu Barbitursäure mittels Uracil-Dehydrogenase und nachfolgend zu Harnstoff und Malonsäure durch die Barbiturase.

Für Thymin wurde ein ähnlicher Abbauweg formuliert, wobei zunächst 5-Methylbarbitursäure und nachfolgend $\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ gebildet werden^{67,68,69}.

Lara konnte diesen Abbauweg auch in dem Bakterienstamm *Nocardia corallina* nachweisen^{70,71}. Caren und Morton injizierten ¹⁵N-markiertes Uracil (markiert an der Ureido-Gruppe) in Menschen. Der größte Anteil des Radionuklids wurde als Harnstoff ausgeschieden^{72,73}. Weiterhin konnten Ruthman, Cantarow und Paschkis an Ratten zeigen, dass bei einer i.v. Applikation hoher Dosen an [2-¹⁴C]Uracil bis zu 10 % des Radionuklids sich in Harnstoff wiederfindet⁷⁴. Bis dato gibt es allerdings keine weiteren Berichte darüber, ob dieser Abbauweg tatsächlich in Säugetierzellen existiert oder nicht.

1.3 Transporter für Nukleoside und Nukleobasen

Allgemein läßt sich der Transport von Substanzen durch Membranen in folgende Mechanismen unterteilen:

- rein passive Diffusion,
- Carrier-vermittelter, passiver Transport,
- aktiver Transport und
- korpuskuläre Absorption (Phagozytose, Pinozytose).

Bei der **passiven Diffusion** wandern die in Wasser und Lipiden löslichen Stoffe von alleine – ohne Energieaufwand und ohne Beteiligung von Proteinen – durch die Membran. Dabei hängt die Diffusionsgeschwindigkeit allein von dem **Konzentrationsunterschied** der zu transportierenden Substanz zwischen Zellinnerem und Zelläußerem und dem **Diffusionskoeffizienten** (Funktion des Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten) dieser Substanz ab. Der Transport verläuft bei der passiven Diffusion immer in Richtung des Konzentrationsgefälles ab und endet mit dem Ausgleich des Gradienten. Die Zelle hat hierbei keinen Einfluss auf die Diffusionsvorgänge durch die Membran und folglich keine Möglichkeit, die diffundierenden Stoffe zu selektieren. Transportiert werden vor allem niedermolekulare und unpolare Substanzen, wohingegen Ionen und geladene bzw. polare Moleküle nur schlecht durch die Membran diffundieren.

Bei dem **Carrier-vermittelten, passiven Transport** erleichtern **Carrierproteine**, sogenannte **Permeasen** (integrale Membranproteine), die passive Diffusion durch die Membran. Die Diffusionsgeschwindigkeit wird dadurch im Vergleich zur reinen passiven Diffusion erheblich erhöht. Für die Permeasen existiert eine maximale Transportgeschwindigkeit, wodurch der Transport sättigbar ist. Das Konzentrationsgefälle stellt auch bei dem Carrier-vermittelten, passiven Transport die treibende Kraft dar, wobei auch hier der Transport immer in Richtung des Konzentrationsgefälles verläuft. Der Transport ist allerdings im Vergleich zur rein passiven Diffusion **substanzspezifisch** und kann durch Inhibitoren der Transportproteine gehemmt werden. Carbonsäuren und Alkohole sind Beispiele für Stoffe, die durch Carrier-vermittelten passiven Transport in die Zelle gelangen.

Der **aktive Transport** ist dadurch gekennzeichnet, dass Substanzen unter Energieverbrauch, meist ATP-Hydrolyse, entgegen einem Konzentrationsgefälle transportiert werden können. Dabei kann die zu transportierende Substanz bis zu zehntausendfach aufkonzentriert werden. Der Transport erfolgt durch ein oder mehrere Proteine und ist substanzspezifisch. Auch hier existiert eine maximale Transportgeschwindigkeit, die durch die Anzahl der Transportproteine in der Zellmembran und ihre katalytischen Konstanten definiert ist. Zucker, Aminosäuren und viele andere, meist polare niedermolekulare Stoffe werden durch aktiven Transport in die Zellen aufgenommen.

Als **korpuskuläre Absorption** (Endozytose, Pinozytose, Phagozytose) bezeichnet man die Aufnahme von zellfremdem Material in die Zelle durch Ausstülpungen und Abschnüren von Teilen der Zellmembran unter Entstehung von Vesikeln. Die **Endozytose** wird nach Art des Partikels unterteilt in **Phagozytose** (Aufnahme von Feststoffpartikeln) und **Pinozytose** (Aufnahme von flüssigen oder gelösten Substanzen). Die Pinozytose ist ein kontinuierlicher Prozess und tritt fast in allen Zelltypen auf (häufig in Darmepithelzellen). Die Vesikelgröße beträgt ca. 50-400 nm. Die Phagozytose tritt nur bei spezialisierten Zellen – Neutrophile, Makrophagen, Amöben, Mikroglia (Gehirnmakrophagen) – und im Gegensatz zur Pinozytose nicht kontinuierlich, sondern nur bei Bedarf auf. Diese Prozesse laufen meist rezeptorvermittelt ab. Für die Aufnahme der meisten Pharmaka spielen sie keine Rolle.

1.3.1 Nukleosid-Transporter

Die meisten **Nukleoside und Nukleosid-Analoga**, einschließlich der Nukleoside mit anti-neoplastischer und/oder antiviraler Aktivität, sind hydrophil und benötigen damit Plasmamembran-Nukleosid-Transporter (NT), um in die Zellen aufgenommen bzw. aus den Zellen freigesetzt zu werden. NT-vermittelter Transport stellt infolgedessen einen bestimmten Faktor für den Metabolismus sowie für die pharmakologische Wirkung von Nukleosid-Analoga dar. In Humanzellen sowie auch in anderen Säugetierzellen und -geweben sind zur Zeit acht Nukleosid-Transport-Systeme bekannt, welche sich in Kationen-Abhängigkeit, Substrat-Selektivität und Inhibitor-Sensitivität voneinander unterscheiden. Die Nukleosid-Transport-Proteine werden auf der Basis der funktionellen und pharmakologischen Charakteristika wie dem Transport-Mechanismus (e = „equilibrative“, Na⁺-unabhängig, c = „concentrative“, Na⁺-abhängig), der Sensitivität gegenüber dem Nitrobenzylmercaptapurin-Ribosid (**Abb. 1.17**) (s = „sensitive“, i = „insensitive“) und der Selektivität gegenüber Substratmolekülen klassifiziert (**Tab. 1.1**).

Die **equilibrativen** (Na⁺-unabhängigen) **Nukleosid-Transporter** (*es* und *ei*) besitzen 11 transmembranäre Domänen. Das Vorkommen dieser Permeasen scheint den Eukaryonten vorbehalten zu sein. Es gibt bis dato keine Anhaltspunkte dafür, dass sie auch in Prokaryonten vorkommen⁷⁵. ENT1 und ENT2 wurden sowohl aus menschlichem als auch aus Ratten-Plazenta isoliert. Der humane Transporter hENT1 wird bereits durch niedrige Konzentrationen (0,1-100 nM) an Dipyridamol und Dilazep (**Abb. 1.17**) inhibiert, während hENT2 eine viel niedrigere Sensitivität aufweist. Im Gegensatz dazu sind die Rattenhomologen rENT1 und rENT2 beide insensitiv gegenüber Dipyridamol und Dilazep, welche auch in mikromolaren Konzentrationen keinen Effekt auf die Transportaktivität zeigen^{76,77,78}.

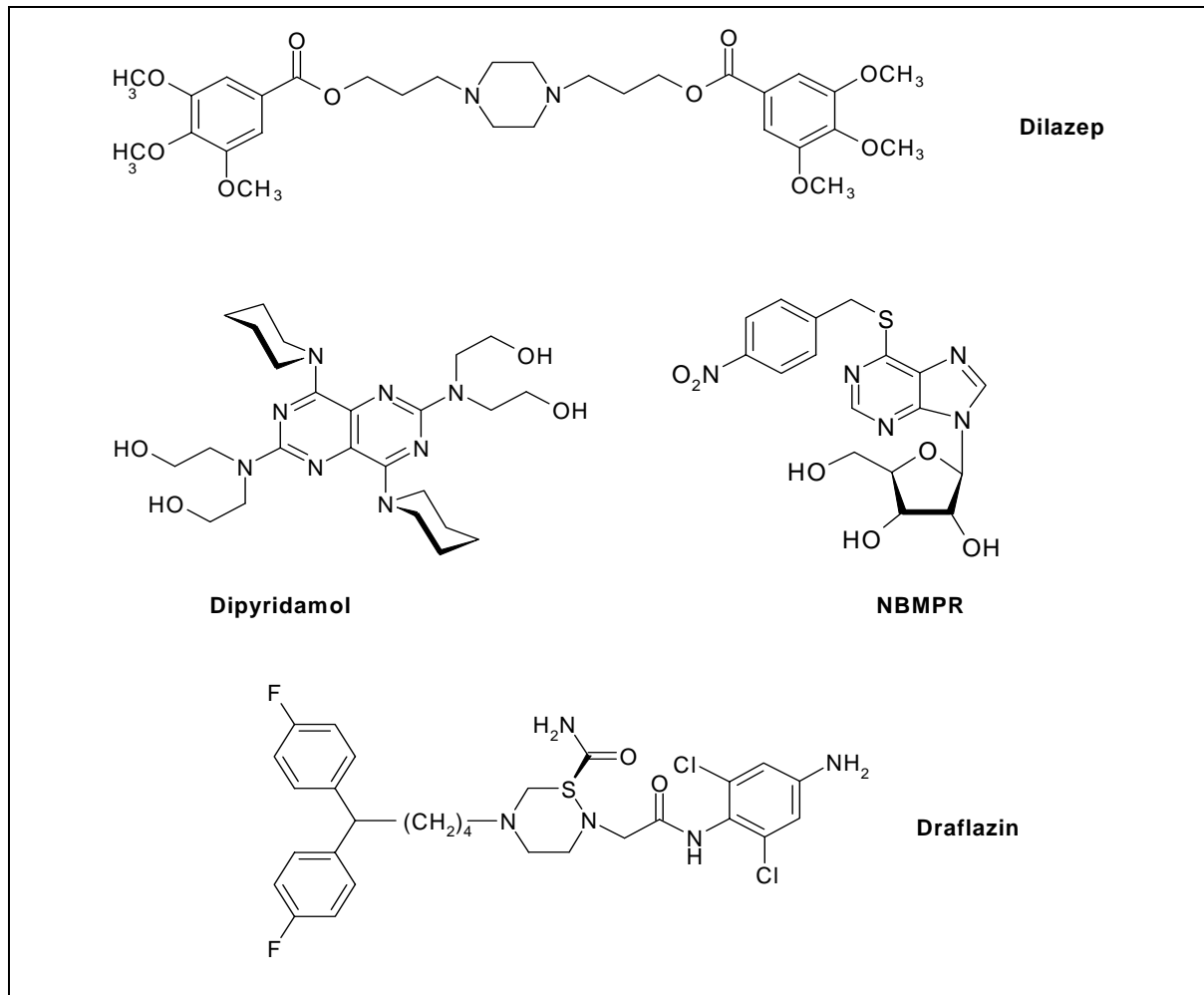


Abb. 1.17: Nucleosid-Transport (ENT)-Inhibitoren Dilazep, Dipyridamol und NBMPR (Nitrobenzylmercaptopyrimidin-Ribosid)

Die **Na⁺-abhängigen Nucleosid-Transporter** transportieren die Nucleoside entgegen einem Konzentrationsgradienten in die Zelle – gekoppelt mit einem entlang des Konzentrationsgradienten ablaufenden Na⁺-Transport⁷⁹. Diese Transporter benutzen den physiologischen Na⁺-Gradienten (~140 mM_{außen} > 5-10 mM_{innen}), erzeugt von der ubiquitär vorkommenden Na⁺/K⁺-ATPase, welche 1957 erstmals von dem dänischen Physiologen Jens Skou beschrieben wurde⁸⁰.

Transporter dieser Familie weisen 13 transmembranäre Domänen auf und können neben den Nucleosiden auch die Nucleobasen Adenin, Guanin, Xanthin, Cytosin, Thymin und Uracil transportieren. Transporter dieser Familie wurden sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten nachgewiesen, allerdings wurden bis zu dem jetzigen Zeitpunkt noch keine Vertreter in Protozoen und Pflanzen gefunden. Der erste eukaryotische Nucleosid-Transporter, dessen Gen kloniert wurde, gehört zu dieser Gruppe⁸¹.

Das **N1 (cif)** System ist selektiv für Purine, wobei Guanosin und Formycin D die üblicherweise verwendeten Substrate sind. Der **N2 (cit)** Transporter ist selektiv für Pyrimidine und Thymin ist das gebräuchliche „Testsubstrat“. Beide Typen wurden bereits von Mensch

und Ratte geklont (hCNT1/rCNT und hSPNT/SPNTT). Der **N3** (*cib*) Transporter hat eine niedrige Substratspezifität und kann sowohl Purine als auch Pyrimidine transportieren. hCNT3 und mCNT3 stellen die korrespondierenden geklonten Proteine in Mensch und Maus dar⁸².

Das vierte System **N4** hat eine ähnliche Substrat-Selektivität wie der N2 Transporter, allerdings können von diesem Transporter zusätzlich auch Adenosin und Guanosin transportiert werden. Der im Vergleich zu den anderen weniger gut charakterisierte **N5** (*cs*) Transporter ist im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Na⁺-abhängigen Transportern Nitrobenzylmercaptipurin-Ribosid-sensitiv und ist selektiv für Adenosin und Formycin B.

Die beiden Na⁺-unabhängigen Systeme *es* und *ei* sind in Säugetierzellen weit verbreitet, während die Na⁺-abhängigen Transporter bisher nur in bestimmten Säugetierzellen – in spezialisierten Epithelien des Darmes⁸³, der Niere⁸⁴, der Leber^{85,86,87,88}, in bestimmten Hirnregionen⁸⁹, Plexus choroideus^{b,90}, Mikroglia⁹¹, in den Splenozyten (Milzzellen)⁹², Makrophagen⁹³ und Leukämiezellen⁹⁴ – identifiziert worden sind⁸¹. Konzentrationsabhängige NT-Transkripte wurden auch im Herz, in der Skelettmuskulatur, in der Plazenta und im Pankreas gefunden.

Die funktionelle Expression der Nukleosid-Transporter ist abhängig vom Zell-Typ. Zusätzlich variieren die NT-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Wachstumsphase⁹⁵, der Zelldifferenzierung^{96,97} sowie neoplastischer Transformation⁹⁸. Epithelien (z.B. Darm und Niere) und einige nicht-polarisierte Zellen (z.B. Leukämiezellen) koexprimieren sowohl die Na⁺-abhängigen („concentrative“) als auch die Na⁺-unabhängigen („equilibrative“) Nukleosid-Transporter, wohingegen andere nicht-polarisierte Zellen (z.B. Erythrozyten) nur Na⁺-unabhängige Nukleosid-Transporter aufweisen⁹⁹.

Die Nukleosid-Transporter und die entsprechenden Affinitätskonstanten sind in **Tab. 1.1**, **Tab. 1.2** und **Tab. 1.3** zusammengestellt.

^b Ein speziell geformtes arteriovenöses Gefäßkonvolut in den Hirnventrikeln, das für die Produktion von Liquor verantwortlich ist.

Tab. 1.1: Nukleosid-Transporter-Familien^{100,101,102}

NT-Prozesse	Na ⁺ -Abhängigkeit	(NBMPR)-Sensitivität	Substrat-Spezifität	Gewebe-Spezifität
<i>es</i>	-	+	Purin -und Pyrimidin Nukleoside	weit verbreitet in Säugetierzellen
<i>ei</i>	-	-	Purin -und Pyrimidin Nukleoside	weit verbreitet in Säugetierzellen
<i>cif</i> (N1)	+	-	Purin-Nukleoside Uridin	Maus Splenozyten, Ratten Enterozyten, Makrophagen, Leber, Leukämiezellen
<i>cit</i> (N2)	+	-	Pyrimidin-Nukleoside, Adenosin	Maus Enterozyten, Ratten/Kaninchen- Niere
<i>cit</i> (N4)	+	-	Pyrimidin-Nukleoside, Adenosin, Guanosin	Humane Nierenzellen
<i>cib</i> (N3)	+	-	Purin -und Pyrimidin Nukleoside	Humane kolorektale, leukämische Zellen, CP (Choroid Plexus), Mikroglia
<i>cs</i> (N5)	+	+	Adenosin-Analoge	Humane Leukämiezellen
<i>csg</i> (N6)	+	+	Guanosin	Akute promyelozyti- sche Leukämiezellen

NBMPR: Nitrobenzylmercaptapurin-Ribosid; **es**: „equilibrative, sensitive to NBMPR“; **ei**: „equilibrative, insensitive to NBMPR“; **cif** (N1): „concentrative, insensitive to NBMPR“, Guanosin und Formycin B sind die geläufigen Substrate; **cit** (N2): „concentrative, insensitive to NBMPR“, Thymidin ist das übliche Testsubstrat; **cib** (N3): „concentrative, insensitive to NBMPR“, breite Substratspezifität; **cs** (N5): „concentrative, sensitive to NBMPR“; **cgs** (N6): „concentrative, sensitive to NBMPR“, akzeptiert Guanosin als Substrat; die korrespondierenden geklonten NT-Proteine in Menschen und Ratten sind: *es* = ENT1; *ei* = ENT2; *cif* (N1) = CNT2/SPNT; *cit* (N2) = CNT1; *cib* = hCNT3 bzw. mCNT3⁸².

Tab. 1.2: Affinitätskonstanten für **ENT-Nukleosid-Transporter** in Säugetieren

Transporter (Spezies)	Substrat	K _m -Werte bzw. K _i -Werte
hENT1 ¹⁰³ (<i>es-Typ</i>) (Homo sapiens) → Hemmung durch NBMPR, Dipyridamol, Dilazep und Draflazin	Adenosin	40 ± 4 μM
	Guanosin	140 ± 10 μM
	Inosin	170 ± 20 μM
	Uridine	260 ± 20 μM
	Thymidin	300 ± 30 μM
	Cytidin	580 ± 110 μM
rENT1 ⁷⁷ (<i>es-Typ</i>) (Rattus norvegicus) → NBMPR-sensitiv, <u>keine</u> Hemmung durch Dipyridamol und Dilazep)	Adenosin	+
	Guanosin	+
	Inosin	+
	Uridine	150 ± 20 μM
	Thymidin	+
	Cytidin	+
	Uracil	k.I. bei 2 mM
hENT2 ^{76,77,103,104} (<i>ei-Typ</i>) (Homo sapiens) → weniger sensitiv gg. Inhibitoren als ENT1	Adenosin	140 ± 20 μM
	Inosin	50 ± 6 μM
	Uridin	250 ± 40 μM
	Thymidin	710 ± 50 μM
	Cytidin	5610 ± 420 μM
	Hypoxanthin	700 ± 100 μM
	Adenin	1100 ± 100 μM
	Thymin	1700 ± 100 μM
	Uracil	2600 ± 400 μM
rENT2 ⁷⁷ (<i>ei-Typ</i>) (Rattus norvegicus) → <u>keine</u> Hemmung durch NBMPR, Dipyridamol und Dilazep)	Uridin	300 ± 40 μM
	Hypoxanthin	1000 ± 100 μM
	Adenin	2500 ± 100 μM
	Thymin	1300 ± 100 μM
	Uracil	1800 ± 200 μM

Abkürzungen: k.I.: keine Inhibition in der angegebenen Konzentration; +: Inhibition des Transports, K_i-Wert nicht bestimmt

Tab. 1.3: Affinitätskonstanten für **CNT-Nukleosid-Transporter** in Säugetieren

CNT-Transporter		
hCNT1 (N2, cit) ¹⁰⁵ → bevorzugter Transport von Pyrimidinen	Uridin	3,1 ± 0,3 μM
	Thymidin	2,6 ± 0,1 μM
hCNT2 (hSPNT1)(N1, cif) → bevorzugter Transport von Purinen	Guanosin	bevorzugtes Substrat ¹⁰⁶
	Adenosin	6 ± 1 μM ¹⁰⁷
	2-Desoxyadenosin	30 ± 7 μM ¹⁰⁷
	Inosin	4,5 ± 1 μM ¹⁰⁷ 13,7 ± 8,1 μM ¹⁰⁸
	Uridin	80 μM ± 10 ¹⁰⁷ 116 ± 7 μM ¹⁰⁸
rCNT2 (rSPNT1)(N1, cif) → bevorzugter Transport von Purinen	Guanosin	bevorzugtes Substrat ¹⁰⁵
	Inosin	28,1 μM ± 7,1 ¹⁰⁸
	Uridin	20,6 μM ± 5,6 ¹⁰⁸
hCNT3 ⁸² (N3, cib) (Homo sapiens)	Uridin	21,6 ± 5,4 μM
	Cytidin	15,4 ± 2,7 μM
	Thymidin	21,2 ± 6,3 μM
	Adenosin	15,1 ± 1,8 μM
	Guanosin	43,0 ± 6,6 μM
	Inosin	52,5 ± 12,6 μM

Bisher wurden mehrere Nukleosid-Transporter Systeme in der **Blut-Hirn-** sowie der **Blut-Liquor-Schranke** identifiziert (**Abb. 1.18**). Kalaria et al. und Thomas et al. konnten anhand von kultivierten Endothelzellen und isolierten Hirnkapillaren zeigen, dass *cit/N2*, *es*- und *ei*-Nukleosid-Transporter in der Blut-Hirn-Schranke exprimiert werden^{109,110}. Mit *in-vitro*-Studien an isoliertem Plexus choroideus (Kaninchen) konnten überdies mehrere NT-Systeme (*es*, *ei*, *N3*) identifiziert werden, welche am Transport von sowohl Ribo- als auch Desoxyribonukleosiden am Plexus choroideus beteiligt sind^{109,111,112}. In *in-vivo*-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass sowohl *N3* als auch *ei* Systeme Nukleoside vom Blut in die Zerebrospinalflüssigkeit transportieren¹¹¹. Durch Einsatz der Methoden RT-PCR, Northern Blot und in-situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass *ENT1*, *ei* und *es* Systeme im Human- und Ratten-Hirn weit verbreitet sind^{113,114}.

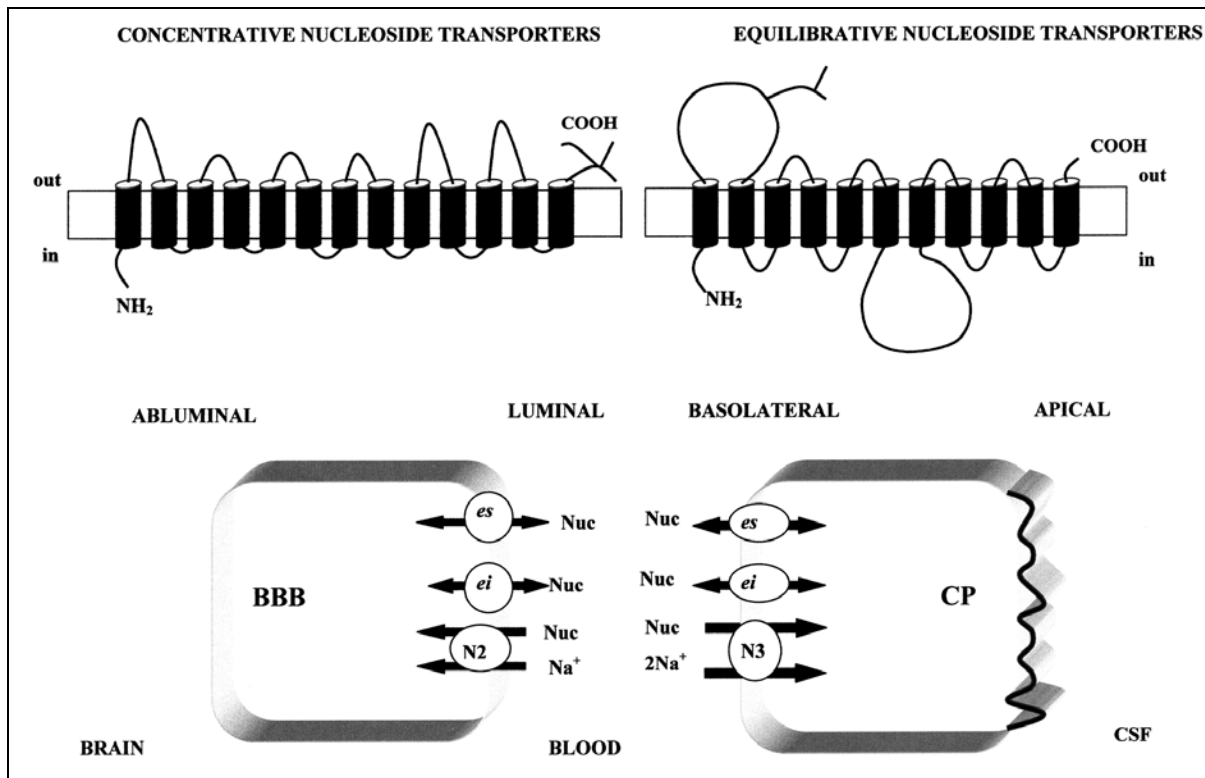


Abb. 1.18: Nucleosid-Transport-Systeme in der Blut-Hirn-Schranke (BBB: „blood-brain-barrier“) und im Plexus choroideus (CP). Obwohl die spezifische Lokalisation der NT-Systeme in der Blut-Hirn- und Blut-CSF-Schranke noch nicht genau bekannt sind, ist die vorhergesagte Verteilung dieser charakterisierten Nucleosid-Transporter aufgeführt. Die Pfeile sollen die Richtung des Transportes verdeutlichen^{100,102}.

1.3.2 Nukleobasen-Transporter

Transporter für **Nukleobasen** kommen in allen eukaryotischen (Pflanzen, Tieren und Menschen) sowie auch in prokaryotischen Zellen (Bakterienzellen) vor. Nukleobasen-Transporter wurden intensiv in Mikroorganismen untersucht. Prozesse in Säugetierzellen sind weniger gut untersucht, obwohl bereits sowohl equilibrative als auch Na^+ -abhängige Nukleobasen-spezifische (**Tab. 1.6**) Transporter in verschiedenen Zelltypen und Geweben beschrieben worden sind. Nukleobasen-Transporter wurden bereits aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen kloniert und werden drei verschiedenen Familien zugeordnet: (a) „Nucleobase-ascorbate transporter family“ (**NAT**), (b) „Plant purine-related transporter family“ (**PUP**), (c) „microbial purine-related transporter family“ (**PRT**). Von diesen drei Familien weist nur eine (NAT) bekannte Orthologe (SVCT1 und SVCT2) in Säugetieren auf. In silico Analysen zeigen, dass keine PRT- oder PUP-ähnliche Sequenzen im Protozoen- oder Säugetier-Genom existieren. In **Tab. 1.4** sind die Nukleobasen-Transporter-Familien zusammengefasst.

Tab. 1.4: Nukleobasen-Transporter-Familien¹¹⁵

	NAT-Familie	PUP-Familie	PRT-Familie
Membranprotein	12-14 α -Helix-transmembranäre Domänen	9-10 α -Helix-transmembranäre Domänen	9-13 α -Helix-transmembranäre Domänen
Vorkommen	Pflanzen, Insekten, Nematoden, Eubakterien, Archaea, Pilze Säugetiere (einschließl. Menschen)	nur Pflanzen	Pilze, Bakterien, Archaea, Pflanzen
Transporter	Purin-Transporter: <ul style="list-style-type: none"> ▪ PbuX (Bacillus) ▪ UapA und UapC (Aspergillus) ▪ Lpe1 (Mais) Uracil-Transporter: <ul style="list-style-type: none"> ▪ UraA (E. coli) ▪ PyrP (B. species) Säugetier-Ascorbat-Transporter: <ul style="list-style-type: none"> ▪ SVCT 1 und SVCT2 	AtUPS (Arabidopsis thaliana) → das einzige Protein aus dieser Familie mit bekannter Funktion	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Uracil-Transporter in <i>S. cerevisiae</i> [FUR4] $K_m = 2,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ für Uracil ▪ Adenin-Guanin-Hypoxanthin-Cytosin (FCY2)-Transporter in <i>S. Cerevisiae</i> ▪ Cytosin-Transporter (CodB) in <i>E. coli</i>

Säugetierzellen besitzen sowohl passive als auch aktive Transportsysteme für Nukleobasen, die in verschiedenen Zell-Typen und Geweben charakterisiert worden sind. Allerdings konnte bis dato noch kein Gen kloniert werden, welches für ein entsprechendes Transporter-Protein kodiert. Der Nukleobasen-Transport in humanen Erythrozyten ist bereits gut er-

forscht. Es handelt sich hierbei um einen hochaffinen Transporter, der spezifisch für Purin-Nukleobasen ist. Nukleoside und Pyrimidin-Nukleobasen haben wenig oder keinen Effekt auf diesen Transporter, während eine Reihe von Guanin-Analoga wie z.B. die acyclischen Nukleoside Aciclovir, Ganciclovir und Carbovir (niedrigaffine) als Substrate akzeptiert werden. Der Erythrozyten-Nukleobasen-Transporter wird durch die Nukleosid-Transport-Inhibitoren NBMPR, Dilazep und Dipyridamol nicht inhibiert. In **Tab. 1.5** sind die Affinitätskonstanten aufgelistet.

Tab. 1.5: Affinitätskonstanten für den **humanen Erythrozyten-Nukleobasen-Transporter**

Substrate	K _m -Werte
Hypoxanthin	180 ± 12 μM ¹¹⁶
Adenin	13 ± 1 μM ¹¹⁶
Guanin	37 ± 2 μM ¹¹⁶
Uracil	5800 ± 700 μM ¹¹⁷
5-Fluoruracil	~ 4000 μM ^{♦117}
Aciclovir	260 ± 20 μM ¹¹⁸
Ganciclovir	890 μM ¹¹⁹
Carbovir	120 ± 10 μM ¹²⁰

♦ K_i-Wert

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass in Säugetierzellen Natrium-unabhängige Nukleobasen-Transporter vom Typ *es* und *ei* existieren. In S49-Maus-Lymphomzellen z.B. konnte ein NBMPR-sensitiver Nukleobasen-Transporter identifiziert werden. Es wurde ein K_m-Wert von 800 μM für Hypoxanthin und 300 μM für Adenin ermittelt¹²¹. CHO-Zellen^c enthalten u.a. einen Nukleobasen-Transporter vom *ei*-Typ, der in der Lage ist, Hypoxanthin (K_m = 2,5 mM ± 0,3 mM) und Uracil (K_m = 10,9 ± 1,6 mM) zu transportieren. Zudem besitzen die equilibrativen Nukleosid-Transporter **hENT2** und **rENT2** (siehe Abschnitt 1.3.1) die Kapazität, neben Nukleosiden auch Nukleobasen zu transportieren¹⁰⁴.

Weiterhin wurden bereits Natrium-abhängige Nukleobasen-Transporter in verschiedenen Geweben beschrieben. Die **Tab. 1.6** gibt einen Überblick über diese Nukleobasen-Transporter und die ermittelten Affinitätskonstanten.

^c Zellen aus dem Eierstock chinesischer Hamster

Tab. 1.6: Affinitätskonstanten für **Natrium-abhängige Nucleobasen-Transporter** in Säugerzellen

Natrium-abhängige Nucleobasen-Transporter in	K_m -bzw. K_i -Werte für die Substrate [μM]						
	Uracil	5-Fluoruracil	Thymin	Cytosin	Adenin	Guanin	Hypoxanthin
Herzmyozyten ¹²²	7,2	-	5,5	-	k.I.	6,4	8,1
Plazenta ¹²³	-	-	-	-	+	+	~ 90
Nierenepithel-Zellen (LLC-PK₁) ¹²⁴	2,9	3,3	3,5	k.I.	k.I.	5,8	0,79
Nieren-Cortex ¹²⁵	30	20	7,6	-	k.I.	1,8	4,4
Choroid Plexus ¹²⁶	64,6	-	+	+	77,9	+	31
Dünndarm ¹²⁷	+	74	+	k.I.	-	-	-
Jejunum ^{128,129}	47 ¹²⁸	25 ¹²⁸	21 ¹²⁸	-	k.I. ¹²⁹	k.I. ¹²⁹	-

Abkürzungen: **k.I.**: keine Inhibition; +: Inhibition vorhanden, aber kein K_i -Wert bestimmt

Die zwei pflanzlichen Transporter **AtUPS1** und **AtUPS2** (*Arabidopsis thaliana*^d) sind Protonen-gekoppelte Transporter für Uracil. Sie sind die ersten identifizierten Proteine in höheren Eukaryonten, die Uracil und Thymin transportieren können. Für Uracil wurde ein K_m -Wert von $5,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$ (AtUPS1) bzw. $6,2 \pm 1,6 \mu\text{M}$ (AtUPS2) ermittelt¹³⁰.

In **Protozoen** spielen Nucleobasen-Transporter eine weitaus wichtigere Rolle als in Säugerzellen, da einige nicht in der Lage sind, Purin- bzw. Pyrimidinbiosynthese durchzuführen. Nucleobasen-Transporter in Protozoen zeichnen sich durch eine im Vergleich zu Säuger-Transportern höhere Affinität für die Substrate aus. In *Trypanosoma brucei brucei*^e sind bis dato vier Nucleobasen-Transporter identifiziert worden: H1, H2 und H3, welche alle natürlich vorkommende Purin-Basen außer Harnsäure transportieren und **TbU1-Uracil-Transporter**, welcher auch durch 5-Fluoruracil inhibiert werden kann¹³¹. Kürzlich

^d *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) ist eine relativ häufige, unscheinbare, niedrige krautige Pflanze aus der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae). Sie ist seit den 1940er Jahren als Modellorganismus in der Genetik etabliert. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* ist komplett sequenziert.

^e **Trypanosomen** (griech. *Bohrkörper*) sind einzellige, begeißelte Protozoen (Flagellaten), die als Parasiten in vielen Warm- und Kaltblütlern vorkommen. Die Art *T. brucei* gehört zum gut untersuchten Typ der so genannten afrikanischen Trypanosomen, die unter anderem in Zentralafrika beim Menschen die Schlafkrankheit hervorrufen und beim Blutsaugen mit dem Speichel der Tsetse-Fliege übertragen werden (*T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense*). Die Unterart *T. brucei brucei* ist nicht humanpathogen, jedoch Verursacher der Nagana, einer in Afrika vorkommenden Tierseuche.

wurde von Papageorgiou et al. ein hochaffiner Uracil-Transporter in *Leishmania major* (**LmU1**) identifiziert, welcher Ähnlichkeiten mit dem TbU1-Uracil-Transporter aufweist¹³². Mit **TbNBT1** (*Trypanosoma brucei brucei*, mit großer Homologie zum TbAT1 Adenosin-Transporter) wurde 2003 der erste hochaffine Protozoen-Nukleobasen-Transporter kloniert. Dieser Transporter wird der „ENT-Gen-Familie“ zugeordnet und zeigt eine hochaffine Transport-Aktivität für Adenin und Hypoxanthin sowie auch für Xanthin, Guanin, Guanosin und Allopurinol¹³³. Desweiteren weist der *Plasmodium-falciparum*^f-Nukleosid-Transporter **PfNT1** im hohen μM -Bereich liegende K_m -Werte für Nukleobasen auf^{134,135,136}.

Die Affinitätskonstanten für die oben genannten Protozoen-Transporter sind in **Tab. 1.7** aufgelistet.

^f **Plasmodium** ist eine Gattung von Parasiten aus der Haemosporiden-Familie Plasmodiidae. Bei der Art *P. falciparum* handelt es sich um den Erreger der tödlichen Malaria tropica.

Tab. 1.7: Affinitätskonstanten für **Nukleobasen-Transporter in Protozoen**

Transporter	Substrat	K_m-Werte
LmU1-Uracil-Transporter ¹³² (Leishmania major)	Uracil	0,32 ± 0,07 μM
	5-Fluoruracil	0,66 ± 0,14 μM
	Uridin	10,9 ± 3,2 μM
	2-Thiouracil	25,5 ± 3,1 μM
	4-Thiouracil	32,1 ± 6,2 μM
	5,6-Dihydrouracil	44,2 ± 9,8 μM
	5-Chloruracil	k. I. bei 200 μM
	Thymin	237 ± 32 μM
	Cytosin	keine Inhibition bei 200 μM
	Isocytosin	keine Inhibition bei 200 μM
	Adenin	keine Inhibition bei 200 μM
	Hypoxanthin	keine Inhibition bei 200 μM
TbU1-Uracil-Transporter ¹³¹ (Trypanosoma brucei brucei)	Uracil	0,46 ± 0,09 μM
	5-Fluoruracil	3,0 ± 0,8 μM
	Uridin	48 ± 0,15 μM
	2-Thiouracil	640 ± 110 μM
	4-Thiouracil	21,5 ± 7,1 μM
	5,6-Dihydrouracil	835 ± 205 μM
	5-Chloruracil	900 ± 140 μM
	Thymin	> 1000 μM
	Cytosin	keine Inhibition bei 1000 μM
	Adenin	keine Inhibition bei 1000 μM
	Hypoxanthin	keine Inhibition bei 1000 μM
TbNBT1 ¹³³ (Trypanosoma brucei brucei)	Adenin	2,1 ± 0,6 μM
	Hypoxanthin	0,66 ± 0,22 μM
	Xanthin	4,3 ± 1,1 μM
	Guanin	1,4 ± 0,3 μM
	Guanosin	5,3 ± 1,5 μM
	Allopurinol	5,4 ± 1,1 μM
	Uracil	68 ± 6,5 μM
	Adenosin	1900 ± 980 μM
	Inosin	47 ± 17 μM
PfENT1 ^{134,135} (Plasmodium falciparum) → keine Hemmung durch NBMPR, Dipyridamol, Dilazep und Draflazin)	Adenosin	13,2 ± 4,3 μM [320 ± 50 μM] ¹³⁵
	Inosin	253 ± 33 μM
	Uridin	3500 ± 1100 μM ¹³⁵
	Thymidin	Inhibition, K _i -Wert n.b.
	Uracil	keine Inhibition
	Adenin	keine Inhibition [320 ± 100 μM] ¹³⁵
	Hypoxanthin	keine Inhibition [410 ± 100 μM] ¹³⁵
	Guanin	keine Inhibition
	Cytosin	keine Inhibition
	Xanthin	keine Inhibition

1.4 5-Fluoruracil

5-Fluoruracil (5-FU) ist ein Beispiel für ein nach rationalem Wirkstoffdesign entwickeltes Zytostatikum. Die Beobachtung, dass radioaktiv-markiertes Uracil [$2\text{-}^{14}\text{C}$ -Uracil] von Ratten-Hepatomen in höherem Maße in die RNA eingebaut wird als von nichtmalignem Gewebe, führte zu der Annahme, dass die enzymatischen Metabolisierungswege für Uracil in malignen und gesunden Zellen sich voneinander unterscheiden müssen¹³⁷. Daraufhin synthetisierten Heidelberg et al. 1957 erstmals 5-Fluoruracil^{138,139}, einen Antimetaboliten, der in den folgenden Jahren von dieser Arbeitsgruppe intensiv untersucht wurde^{138,140,141,142}. Das Molekül wurde entworfen, um die aktiven Zentren der Target-Enzyme zu besetzen und damit den Metabolismus in malignen Zellen zu blockieren. 5-Fluoruracil findet seit dieser Zeit seinen Einsatz in der Behandlung von verschiedenen malignen Erkrankungen wie kolorektales Karzinom, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom und Mamma-karzinom. Für die medikamentöse Behandlung des Kolonkarzinoms stellt das 5-Fluoruracil seit über 40 Jahren das hauptsächlich verwendete Therapieprinzip dar und ist in Kombination mit Folsäure (FS) heute noch immer der Standard in der Behandlung des Kolonkarzinoms¹⁴³.

1.4.1 Metabolismus

Nach der Aufnahme in die Zelle wird 5-Fluoruracil auf zwei miteinander konkurrierenden Stoffwechselwegen metabolisiert: dem anabolen Weg, welcher zu den aktiven Metaboliten führt und dem katabolen Weg, welcher 5-FU inaktiviert und zur Elimination des Arzneistoffes aus dem Organismus führt.

Der Anabolismus von 5-FU ist mit verschiedenen parallel ablaufenden Reaktionsmechanismen (**Abb. 1.22**) recht kompliziert. Zum einen wird 5-FU in zwei Reaktionsschritten unter Beteiligung der Enzyme *Thymidin-Phosphorylase* (TP, EC 2.4.2.4) und *Thymidin-Kinase* (TK, E.C.2.7.1.21) in 5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (5-FdUMP) umgewandelt. Desweiteren kann 5-FU entweder direkt durch *Orotat-Phosphoribosyl-Transferase* (OPRTase, EC 2.4.2.10) oder durch zwei hintereinandergeschaltete Reaktionsschritte unter Beteiligung der beiden Enzyme *Uridin-Phosphorylase* (UP, EC 2.4.2.3) und *Uridin-Cytidin-Kinase* (UCK, EC 2.7.1.48) in 5-Fluoruridinmonophosphat (5-FUMP) umgewandelt werden. Aus 5-FUMP kann im folgenden unter sukzessiver Phosphorylierung 5-Fluoruridin-5'-diphosphat (5-FUDP) und dann 5-Fluoruridin-5'-triphosphat (5-FUTP) gebildet werden, welches anstelle von Uridin-5'-triphosphat (UTP) in die RNA eingebaut werden kann. Aus 5-Fluoruridin-5'-triphosphat (5-FUTP) können überdies 5-Fluor-Nukleotid-Zucker entstehen. Weiterhin kann sowohl 5-Fluoruridin-5'-diphosphat (5-FUDP) als auch 5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (5-FdUMP) zu 5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-diphosphat (5-FdUDP) umgewandelt werden, welches im weiteren zu 5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (5-FdUTP) phosphoryliert wird. 5-FdUTP kann als

Substrat der DNA-Polymerase fungieren und somit in die DNA eingebaut werden. In **Abb. 1.19** sind die Reaktionsschritte des intrazellulären Anabolismus von 5-FU aufgeführt.

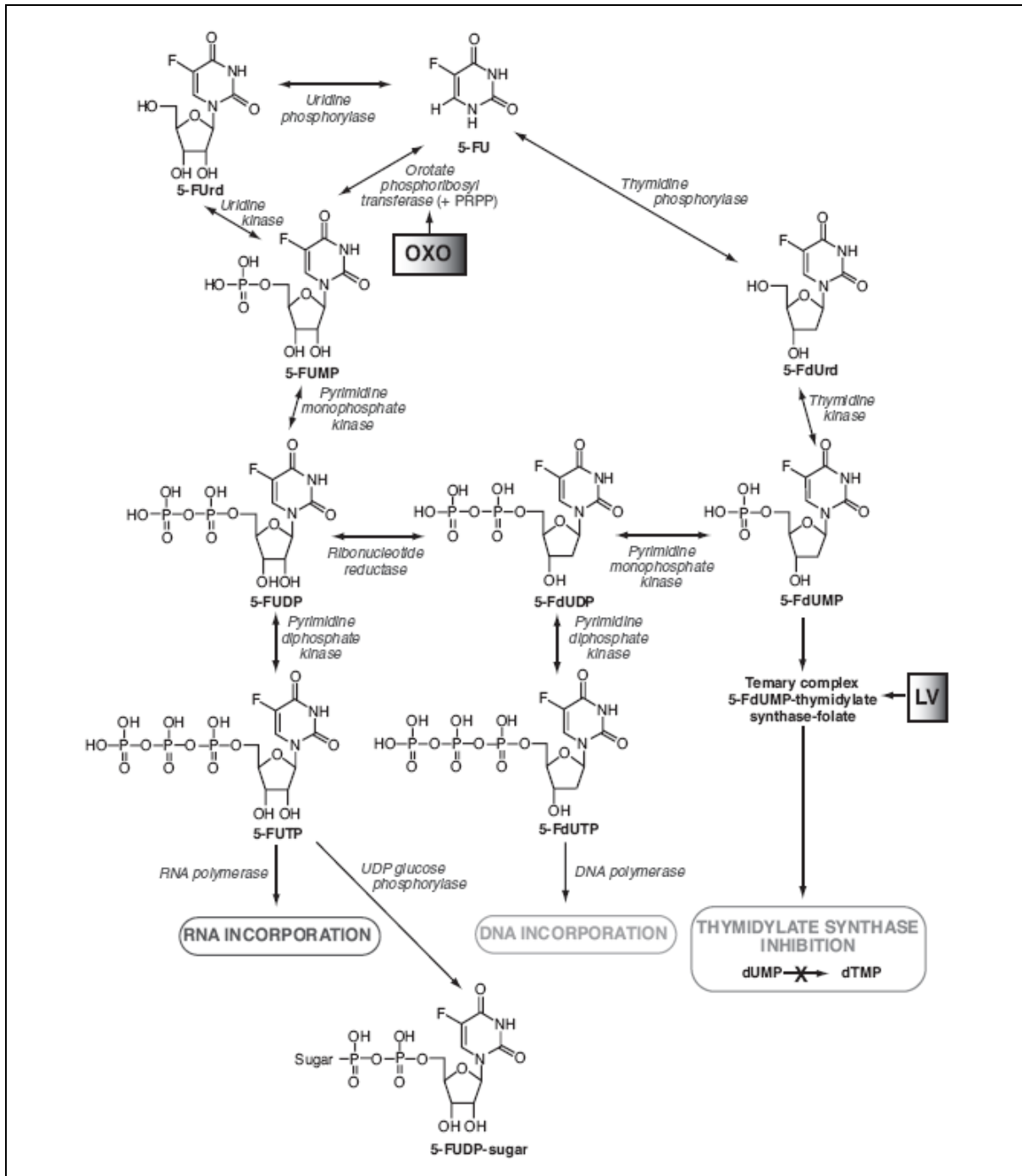


Abb. 1.19: Intrazellulärer Anabolismus von 5-Fluoruracil¹⁴⁴. LV (Leucovorin) und OXO (Kaliumoxonat) sind biochemische Modulatoren von 5-FU. Abkürzungen werden im Text erläutert.

Nach 5-FU-Applikation werden 80 bis 90 % des applizierten 5-Fluoruracils primär inaktiviert. Metabolismus-Studien mit [6-¹⁴C]5-Fluoruracil und [6-³H]5-Fluoruracil haben gezeigt, dass 5-Fluoruracil von Ratten, Mäusen, Katzen und Menschen metabolisch – analog wie bei Uracil – zu **5,6-Dihydro-5-fluorouracil (5-FUH₂)**, **α-Fluor-β-ureidopropionat und α-Fluor-β-alanin (FBAL)** abgebaut wird^{145,146}. Der erste Schritt des Abbaus erfolgt sehr schnell. Durch **Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD, EC 1.3.1.2)**, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym im Katabolismus, wird 5-FU zu 5,6-Dihydro-5-fluorouracil (5-FUH₂) reduziert^{147,148}. Von diesem ersten Schritt hängt entscheidend die Verfügbarkeit von 5-FU für den anabolen Weg ab. Mukherjee et al. konnten darüber hinaus nachweisen, dass neben den oben genannten Metaboliten in geringem Maße auch α-Fluor-β-guanidinpropionat gebildet wird¹⁴⁵.

In weiteren Studien, bei denen hochentwickelte analytische Methoden eingesetzt wurden, konnten weitere Metabolite von 5-FU nachgewiesen werden: das Fluorid-Ion, N-Carboxy-α-fluor-β-alanin (CFBAL), drei Konjugate von FBAL mit Zwitterioncharakter sowie 3-Hydroxypropionat (FHPA) und Fluoracetat (FAC)^{149,150,151,152,153,154}. Eine Übersicht über den 5-FU-Abbauweg ist in **Abb. 1.20** zu finden.

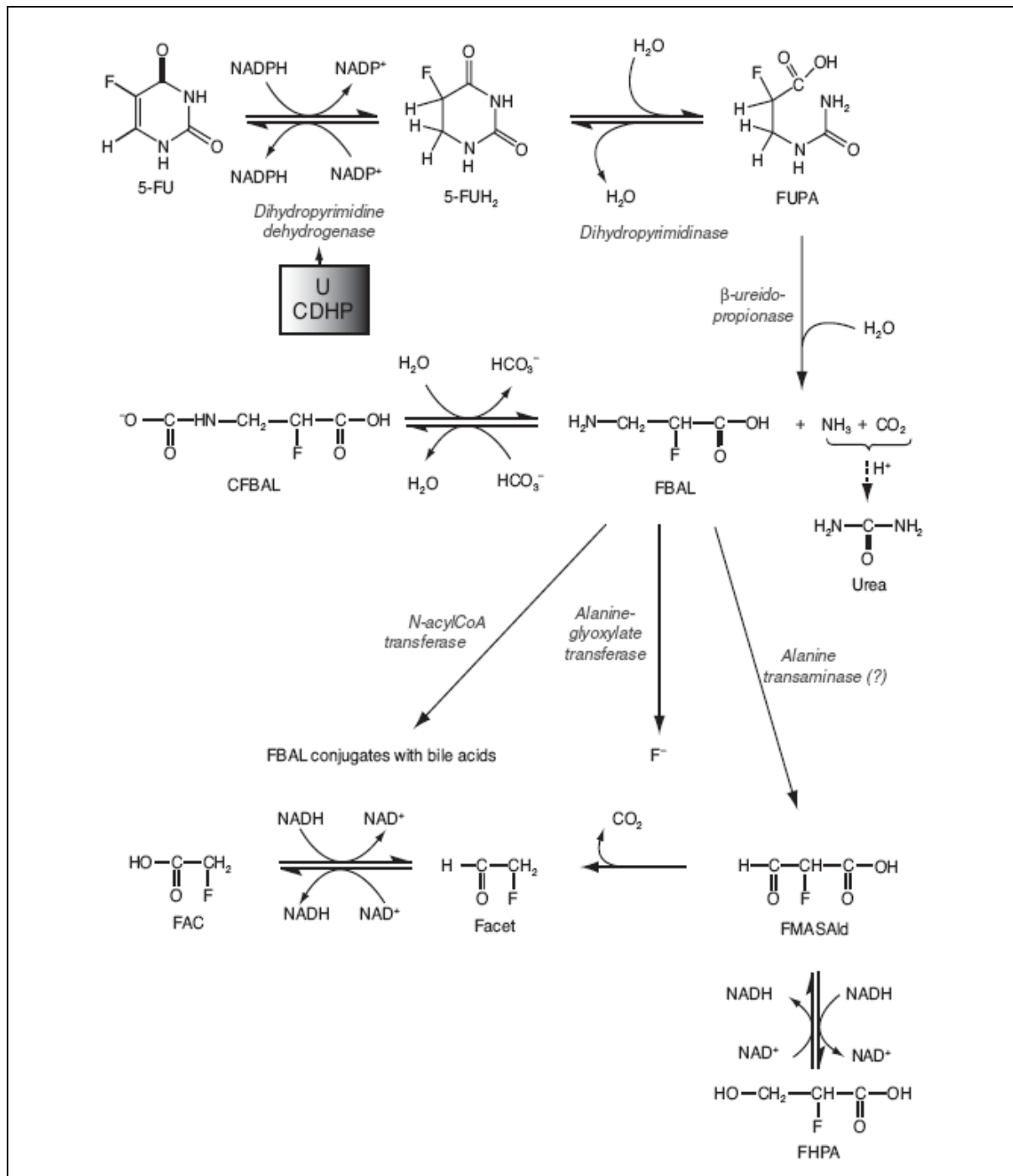


Abb. 1.20: **Katabolismus von 5-Fluoruracil (5-FU)**¹⁴⁴. U (Uracil) und CDHP (5-Chlor-2,4-dihydroxypyridin) sind Inhibitoren der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase.

Abkürzungen: 5-FUH₂: 5,6-Dihydro-5-Fluoruracil; FUPA: α-Fluor-β-ureidopropionsäure; FBAL: α-Fluor-β-alanin; F⁻: Fluorid-Ion; FMASAlD: Fluormalonsäuresemialdehyd; FHPA: 2-Fluor-3-hydroxypropionsäure; Facet: Fluoracetaldehyd; FAC: Fluoracetat.

1.4.2 Wirkmechanismus von 5-Fluoruracil

Die zytotoxische Aktivität von 5-Fluoruracil basiert im wesentlichen auf zwei unterschiedlichen biochemischen Mechanismen. 5-Fluoruracil wird nach der Verabreichung in das zytotoxische 5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (5-FdUMP) umgewandelt (siehe Metabolismus, **Abb. 1.19**). Dieses bindet an die Thymidylat-Synthetase (TS, EC 2.1.1.45), ein Enzym, welches durch Übertragung einer Methylgruppe auf dUMP die Neusynthese von Thymidin für DNA-Reparatur und Synthese katalysiert. Das fluoridierte Nucleotid 5-FdUMP hat eine höhere Affinität zu dem Enzym TS als das natürliche Desoxyuridinmonophosphat. Es hemmt die TS und damit die Bildung von 2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat (dTMP). Dadurch wird die Bereitstellung von 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP) für die DNA-Replikation und -Reparatur gehemmt. Desweiteren wird FUTP als falsche Base anstelle von UTP von der RNA-Polymerase erkannt und in die RNA eingebaut, womit es zu einer Funktions-Störung kommt^{155,156}. Jüngere Studien deuten darauf hin, dass außer den zwei oben beschriebenen Wirkungsmechanismen zwei weitere für die zytotoxische Aktivität von 5-FU verantwortlich sein könnten. Die erste ist der Einbau in die DNA. Der zweite Mechanismus beinhaltet die Veränderung der Membranfunktion von mit 5-FU behandelten Zellen infolge der Bildung von 5-FUDP-Zuckern und deren Einlagerung in die Membranen.

Inwiefern die jeweiligen Mechanismen in menschlichen Tumoren dominieren, ist noch nicht vollständig aufgeklärt und scheint zwischen verschiedenen Tumortypen und mit der Art und Weise der Arzneistoff-Applikation zu variieren. Es wird vermutet, dass bei einer Bolus-Applikation die RNA-vermittelten Prozesse überwiegen, während bei längerdauernden Infusionen mit geringen Dosierungen primär die Inhibition der TS zum Tragen kommt^{157,158,159}.

1.4.3 Limitierungen der 5-Fluoruracil-Aktivität

Die zytotoxische Aktivität von 5-FU ist durch den schnellen Abbau zu 5,6-Dihydro-5-fluoruracil durch das cytosolische Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD, siehe Katabolismus, **Abb. 1.20**) stark limitiert. Da 5-FU nach der Applikation zu ca. 80 % von DPD inaktiviert und zu ca. 15 % renal ausgeschieden wird, erreicht letztlich nur ein sehr geringer Prozentsatz der verabreichten Dosis den Wirkort und steht dem Anabolismus zur Verfügung. Darüber hinaus schwankt die Enzym-Aktivität von DPD sowohl in Tumor- als auch in gesunden Zellen, sowie innerhalb einer Patientengruppe als auch bei einem bestimmten Patienten selbst in Abhängigkeit vom Tageszeitpunkt erheblich^{160,161,162}, sodass die Bioverfügbarkeit von 5-FU, insbesondere bei oraler Verabreichung, unberechenbar ist. Damit ist die DPD der verantwortliche Faktor für die Bioverfügbarkeit von 5-FU. Unterschiedliche pharmakokinetische Daten des 5-FU wie die Halbwertszeit und Clearance sind direkt auf die Enzymaktivität von DPD zurückzuführen. Vermutlich sind auch unter-

schiedliche Tumoransprechraten von 5-FU direkt auf unterschiedliche Verfügbarkeiten der DPD zurückzuführen. So resultiert höchstwahrscheinlich eine Tumoresistenz gegen 5-FU aus erhöhten DPD-Spiegeln im resistenten Tumor^{163,164,165,166,167,168,169,170,171}.

Aufgrund der oben genannten Probleme hat sich die orale Gabe von 5-FU als nicht effektiv sicher erwiesen. Die konventionelle Applikationsart von 5-FU ist eine schnelle Bolusapplikation in Kombination mit Folsäure. Hierbei werden sehr hohe Dosierungen eingesetzt, damit das Substrat im Überschuß vorliegt und die DPD nur einen Teil des 5-FU inaktivieren kann. Eine Metaanalyse konnte jedoch einen hochsignifikanten Vorteil der Dauerinfusion gegenüber einer Bolusapplikation mit 22 vs. 14 % Ansprechraten zeigen¹⁷². Nachteil der Dauerinfusion von 5-FU ist aber unter anderem die Notwendigkeit von portablen Pumpen in Verbindung mit einem sicheren venösen Zugang (z.B. Port-a-Cath).

Um die Aktivität von 5-FU zu erhöhen, können sogenannte Biomodulatoren eingesetzt werden. Ein 5-FU-Modulator kann auf zwei Ebenen agieren: Zum einen kann er durch Eingriff in den anabolen Weg die zytotoxische Aktivität selektiv erhöhen und zum zweiten durch Eingriff in den Katabolismus die Bioverfügbarkeit der aktiven Substanz erhöhen sowie toxische Effekte infolge der Metabolite minimieren. Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche Substanzen, welche den Metabolismus modulieren, getestet. Als sehr effizient hat sich die Kombination von 5-FU mit **Calciumfolinat (Leukovorin®)** erwiesen¹⁷³. In der Zelle wird bei der Umwandlung von dUMP zu dTMP durch die Thymidylat-Synthetase die Methylgruppe in Form von aktivierter Folsäure (Methylen-Tetrahydrofolsäure) bereitgestellt, welche den Ternärkomplex Thymidylat-Synthetase-Methyl-Tetrahydrofolsäure-5-dUMP stabilisiert. Bei Kombination von 5-FU mit Calciumfolinat (**Abb. 1.21**) wird durch Erhöhung des intrazellulären Pools an Coenzym das im Fluss befindliche Gleichgewicht zugunsten des Methyl-Tetrahydrofolsäure-Enzym-5-dFUMP-Komplexes verschoben und führt damit zu einer Wirkverstärkung des Arzneistoffes.

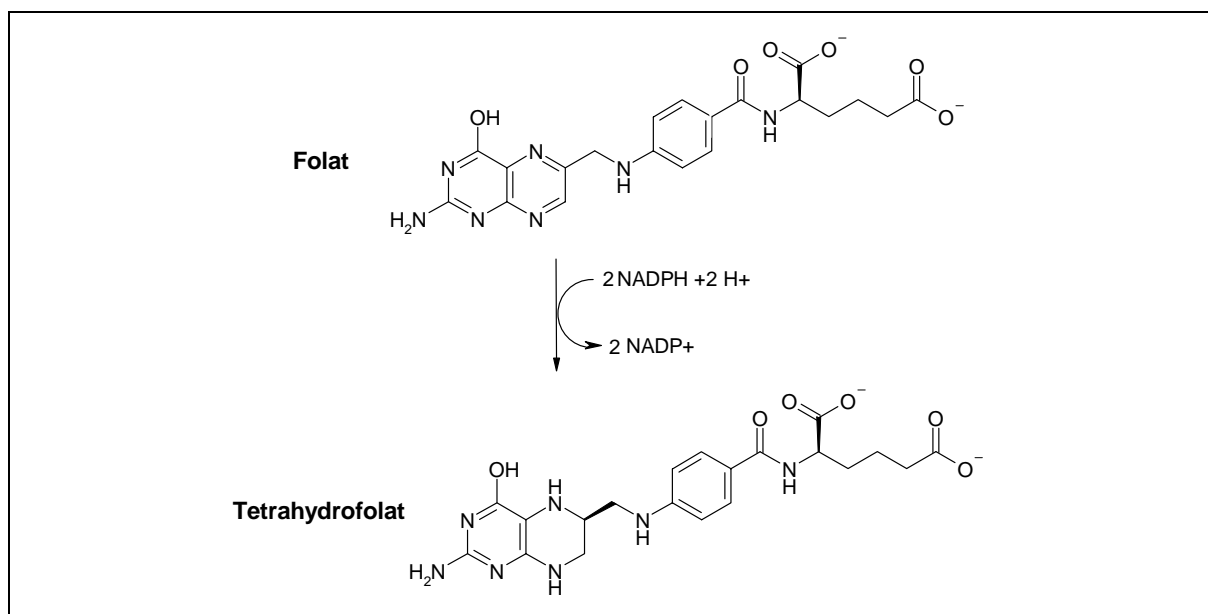


Abb. 1.21: Umwandlung von Folat in das biologisch aktive Tetrahydrofolat

1.4.4 Peroral applizierbare Fluorpyrimidine

Vor dem Hintergrund, dass eine i.v.-Applikation von Zytostatika die Anwesenheit eines Mediziners erfordert und überdies mit Risiken wie venösen Thrombosen oder Infektionen am Ort der Injektion verbunden ist, sind Inhibitoren des 5-FU-Abbaus und **neue orale Formulierungen von 5-FU** besonders interessant. Bereits in den 70er Jahren begann die Erforschung von peroral applizierbaren 5-FU-Prodrugs, die eine kontinuierliche i.v.-Applikation nachahmen und diese möglicherweise ersetzen können. Bei den peroralen Arzneistoffen handelt es sich einerseits um Substanzen, die durch eine Hemmung des Enzyms Dihydropyrimidin-Dehydrogenase den Abbau von 5-FU hemmen, andererseits um Prodrugs, die erst im Tumor und weniger im gesunden Gewebe zur eigentlichen zytotoxischen Wirksubstanz metabolisiert werden und dadurch eine gewisse Tumorselektivität besitzen. Von einer DPD-Hemmung versprechen sich Mediziner eine bessere 5-FU-Bioverfügbarkeit, eine Überwindung der Tumoresistenz und weniger 5-FU-Toxizitäten. Grundprinzip für den Einsatz der DPD-Inhibitoren ist zunächst eine 5-FU-Quelle, und zwar entweder 5-FU direkt oder ein Prodrug, das erst durch Umwandlung in 5-FU aktiviert wird. Die DPD-Hemmung führt zu einem verlangsamten Abbau von 5-FU und erhöhten Plasmaspiegeln, wodurch eine protrahierte Dauerinfusion nachgeahmt wird. Zur Zeit sind bereits zwei orale Formulierungen von 5-FU auf dem Markt (UFT[®], Xeloda[®]) und einige weitere befinden sich z. Zt. noch in der klinischen Erprobung. In **Tab. 1.8** sind die peroral applizierbaren Fluorpyrimidine aufgelistet.

Tab. 1.8: Übersicht über die peroral applizierbaren Fluorpyrimidine

UFT^{®g}	Kombination aus <i>Tegafur</i> [1-(Tetrahydro-2-furyl)-5-FU] und <i>Uracil</i> ; Fa. Bristol-Meyers Squibb, Einführungsdatum: 1. März 2002
Ethinyluracil^G	Eniluracil; von Glaxo Wellcome
S-1^G	Kombination aus <i>Tegafur</i> , <i>Gimestat</i> (5-Chlor-2,4-Dihydroxypyridin) und <i>Kaliumoxonat</i> ; von Taiho und Bristol-Myers Squibb
BOF-A2^G	3-[3-(6-Benzoyloxy-3-cyano-2-pyridyloxycarbonyl)-benzoyl]-1-ethoxymethyl-5-fluoruracil; von Otsuka
Xeloda^{®h}	Capecitabin (N4-Pentyloxycarbonyl-5'-desoxy-5-fluorcytidin); Fa. Hoffmann-La Roche, Zulassung: März 2001)
Furtulon^H	Doxifluridin (5'-Desoxy-5-fluoruridin); zur Behandlung von Dickdarm-, Brust- und Magenkrebs; 1987 auf dem japanischen Markt eingeführt

^g DPD-Hemmstoff

^h kein DPD-Hemmstoff

1.4.4.1 Capecitabin

Capecitabin (N4-Pentylloxycarbonyl-5'-desoxy-5-fluorcytidin) ist ein seit März 2001 im Handel befindliches (Xeloda[®], Fa. Hoffmann-La Roche), oral applizierbares Fluorpyrimidinderivat. Diese Substanz wurde erstmals von den Japanern in den 90ern synthetisiert¹⁷⁴. Capecitabin wird zunächst in der Leber zum 5'-Desoxy-5-fluorcytidin metabolisiert, dann durch eine Desaminase zum Desoxyfluoruridin und letztlich durch das Enzym Thymidin-Phosphorylase (TP, EC 2.4.2.4) zum 5-FU abgebaut (**Abb. 1.22**). In Kolonkarzinomzellen konnte eine erhöhte Aktivität von Thymidin-Phosphorylasen gemessen werden, sodass ein Teil der Aktivierung von Capecitabin zu 5-FU im Tumor selbst erfolgt^{175,176,177,178}.

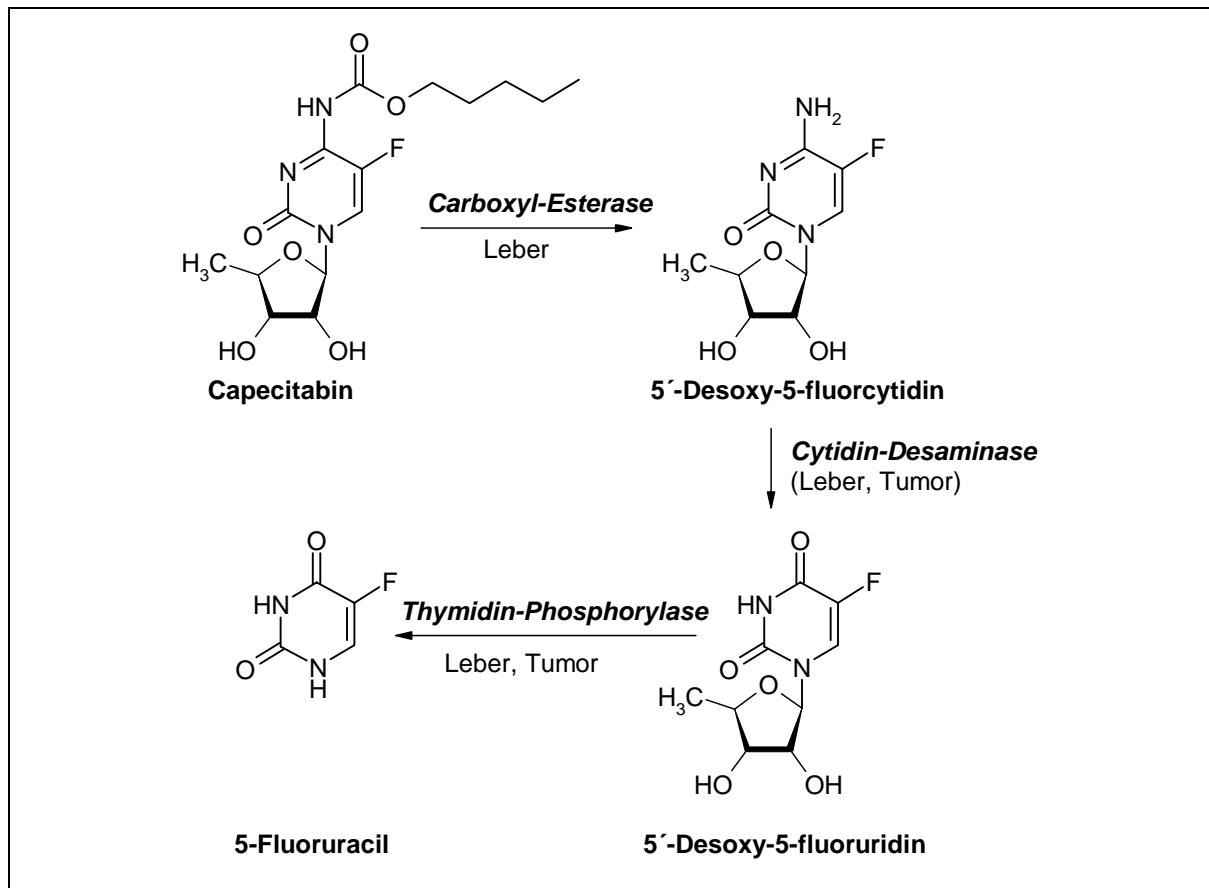


Abb. 1.22: Metabolismus von Capecitabin, modifiziert nach Malet-Martino et al.¹⁴⁴

1.4.4.2 UFT[®]

UFT[®] ist seit März 2002 zur Primärtherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms in Kombination mit Calciumfolinat zugelassen (Fa. Bristol-Meyers Squibb) und ist die molare 4:1 Kombination von **Uracil** und **Tegafur**.

Tegafur [Ftorafur, (1-(Tetrahydro-2-furyl)-5-FU)], erstmals 1966 synthetisiert, ist wie Capecitabin ein oral anwendbares Prodrug von 5-Fluoruracil. Es wird in der Leber durch das Cytochrom-P450-System nach und nach in den aktiven Metaboliten 5-Fluoruracil umgewandelt. **Uracil** hemmt den Abbau von zu 5-FU aktiviertem Tegafur durch die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase. Als Folge der kompetitiven Hemmung der DPD durch Uracil ist die Plasmakonzentration an 5-FU erhöht. Das gleichzeitig verabreichte Calciumfolinat verstärkt die Zytotoxizität von 5-FU über den intrazellulären Metaboliten 5,10-

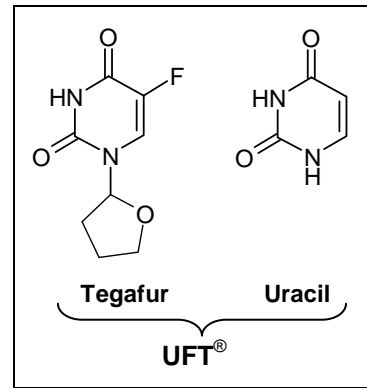


Abb. 1.23: UFT[®]

Methylentetrahydrofolat durch Modulation der Thymidylat-Synthetase. In einer großen multizentrischen, randomisierten Phase-III-Studien mit insgesamt 1196 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom wurden Tegafur/Uracil oral/Calciumfolinat mit Fluoruracil intravenös/Calciumfolinat verglichen. Beide Regime waren hinsichtlich des progressionsfreien Intervalls, der Ansprechrate und des Überlebens gleich wirksam – UFT jedoch signifikant besser verträglich: Stomatitis, Mukositis, Neutropenie und febrile Neutropenie traten seltener auf. Bei den Nebenwirkungen Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen, die dosisabhängig bei beiden Regimen auftraten, konnte kein Unterschied festgestellt werden. Desweiteren trat das Hand-Fuß-Syndrom, ein schmerzhaftes Brennen der Handflächen und der Fußsohlen, unter der oralen Therapie mit UFT sehr viel seltener auf^{179,180,181}.

1.4.4.3 Eniluracil

Eniluracil (Ethynyluracil) ist ein noch in der klinischen Phase befindlicher potenter irreversibler Hemmer der *Dihydropyrimidin-Dehydrogenase* (DPD)^{182,183}. Es wird peroral in Kombination mit 5-FU angewendet. Durch die irreversible Hemmung der DPD im Magen-Darm-Trakt kommt es durch die Kombination mit 5-FU zu einer kontinuierlichen gastrointestinalen 5-FU-Resorption. Die renale Ausscheidung wird darüber hinaus zur überwiegenden Eliminationsroute des 5-FU. In Phase-I-Studien konnte gezeigt werden, dass Eniluracil die Halbwertszeit von 5-Fluoruracil um das 20fache steigert und die Clearance senkt. Die DPD wurde nach Eniluracil-Verabreichung innerhalb von einer Stunde komplett inaktiviert^{184,185,186}. Es wurden bereits mehrere **Phase II-Studien** mit Patienten mit Kolonkarzinom, Mammakar-

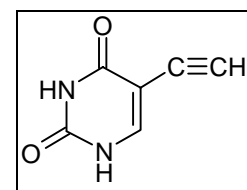


Abb. 1.24 Eniluracil

zinom, Leberkarzinom und Pankreaskarzinom durchgeführt, bei denen eine zytotoxische Aktivität nachgewiesen wurde. In einer multizentrischen Phase-II-Studie mit 60 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom wurde für Eniluracil/5-FU/Calciumfolinat oral zwar eine zytotoxische Aktivität nachgewiesen, die hohe Toxizität limitierte allerdings die klinische Nutzung¹⁸⁷. In einer anderen Phase-II-Studie mit 33 Patienten mit Mammakarzinom wurde gezeigt, dass Eniluracil/5-FU oral eine hohe, mit den konventionell eingesetzten Zytostatika vergleichbare, Aktivität aufzeigt bei besserer Verträglichkeit¹⁸⁸. In einer weiteren multizentrischen Phase-II-Studie wurde gezeigt, dass bei Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom mit Eniluracil/ 5-FU oral hinsichtlich des progressionsfreien Intervalls mit 5-FU/Calciumfolinat i.v. vergleichbare Wirksamkeit erreicht werden konnte¹⁸⁹. In einer multizentrischen, randomisierten **Phase-III-Studie** mit insgesamt 981 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom wurden Eniluracil/5-FU oral und 5-FU/Calciumfolinat intravenös miteinander verglichen. Die Verträglichkeit war zwar in beiden Regimen akzeptabel, das Regime Eniluracil/5-FU oral war allerdings hinsichtlich des Überlebens statistisch nicht äquivalent zu 5-FU/Calciumfolinat intravenös (13,3 vs. 14,5 Monate). Überdies war das Regime Eniluracil/5-FU hinsichtlich des progressionsfreien Intervalls der Kontrollgruppe unterlegen¹⁹⁰. Die Kombination Eniluracil/5-FU oral scheiterte an zwei weiteren Phase-III-Studien. Im Juli 2005 erhielt die Firma Adherex die Lizenzrechte für Eniluracil von der Firma GlaxoSmithKline. Adherex konnte kurze Zeit später zeigen, dass Eniluracil das Enzym *Uridin-Phosphorylase*, welches bei der Aktivierung von 5-FU eine wichtige Rolle spielt, reversibel und dosisabhängig hemmt. Bei einer Gabe von Eniluracil/5-FU oral im Verhältnis 2,5 : 1 betrug die Inhibition etwa 50 Prozent. Bei den vorangegangenen Phase-III-Studien war Eniluracil im Verhältnis von 10 : 1 verwendet worden. Adherex macht dies für das Scheitern dieser Studien verantwortlich und plant, ab 2006 weitere klinische Studien laufen zu lassen. Die Firma rechnet damit, Eniluracil Mitte 2007 zurück in Phase-III-Studien zu bringen.

1.4.4.4 S-1

S-1 (Fa. Bristol-Myers-Squibb, BMS-247616) ist eine Weiterentwicklung von UFT seitens einer japanischen Forschergruppe¹⁹¹. Bei S-1 handelt es sich um eine orale Formulierung der Kombination von **Tegafur**, **Gimestat** (CDHP, 5-Chlor-2,4-Dihydroxypyridin) sowie **Kaliumoxonat** im molaren Verhältnis 1 : 0,4 : 1 (**Abb. 1.25**). Aus Tegafur wird dabei kontinuierlich 5-FU freigesetzt, während CDHP das Enzym DPD hemmt (200mal stärker als Uracil). Kaliumoxonat (OXO) wird zur Verminderung der gastrointestinalen Toxizität (Diarrhoe) eingesetzt. Dies soll durch eine selektive Inhibition der Umwandlung von 5-FU zu 5-Fluoruridin-5'-monophosphat (FUMP) über die Orotat-Phosphoribosyltransferase in der normalen Gastrointestinal-Schleimhaut erreicht werden. Die Inhibition im Tumorgewebe soll dabei minimal sein^{192,193,194}. Es wurden bereits **Phase-I-Studien** in Japan, Europa und USA^{195,196,197,198} und **Phase-II-Studien** in Japan mit Patienten mit Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Magenkarzinom^{199,200,201,202} durchgeführt. S-1 zeigte

eine akzeptable, mit den konventionell eingesetzten Zytostatika vergleichbare Ansprechrate – mit geringerer Inzidenz hochgradiger Toxizitäten.

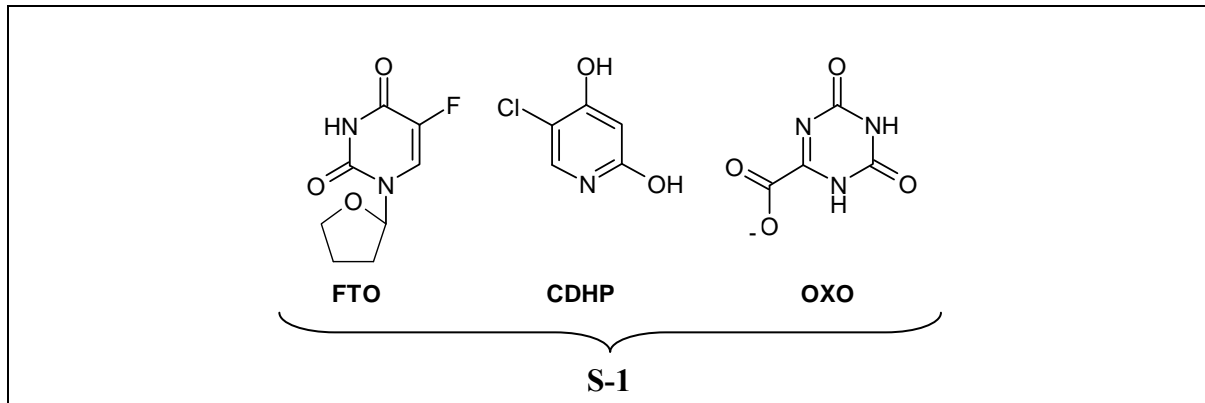


Abb. 1.25: Strukturen von **FTO** (Ftorafur, Tegafur), **CDHP** (5-Chlor-2,4-dihydroxypyridin) und **OXO** (Kaliumoxonat)

1.4.4.5 BOF-A2

Mit **BOF-A2**^{203,204} befindet sich eine weitere Kombination in der Entwicklung. Dabei wird aus dem Prodrug 1-Ethoxymethyl-5-FU (EMFU) kontinuierlich 5-FU freigesetzt. Der Kombinationspartner 3-Cyano-2,6-dihydroxypyrimidin (CNDP)^{205,206} ist Hemmstoff des DPD. Die zytotoxische Aktivität von BOF-A2 konnte bereits in Phase II-Studien am Patienten mit Bronchialkarzinom und Magenkarzinom nachgewiesen werden^{207,208}.

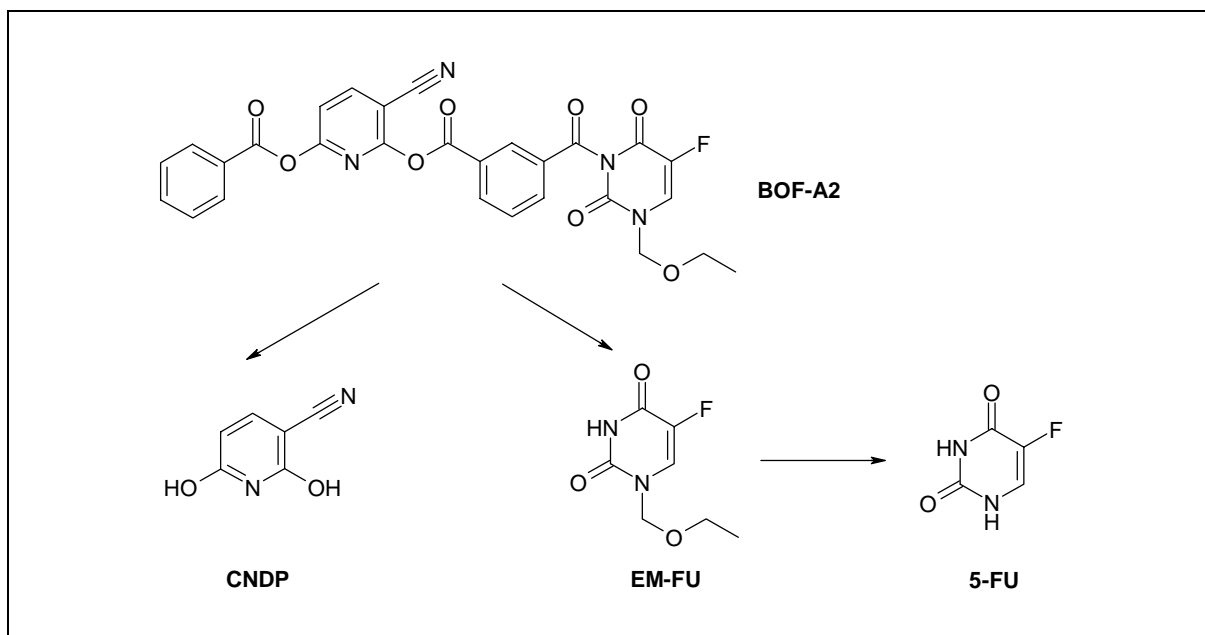


Abb. 1.26: Hydrolyse von **BOF-A2** (3-[3-(6-Benzoyloxy-3-cyano-2-pyridyloxycarbonyl)benzoyl]-1-ethoxymethyl-5-fluoruracil) nach peroraler Applikation, modifiziert nach Fujii²⁰⁹

1.4.4.6 Vor- und Nachteile der oralen Zytostatika

Als potentielle Vorteile der oralen Therapie mit 5-FU-Prodrugs gelten die Bequemlichkeit für den Patienten, größere Schemataflexibilität, weniger Toxizität und damit eine günstigere Begleittherapie. Nachteilig wirkt sich dagegen die unwägbare Patientencompliance aus.

1.5 Die Nukleobase Uracil

Im Jahre 1955 wurde von Wenzel et al. ein Artikel veröffentlicht, in dem für Uracil und drei weitere Oxopyrimidine (Thymin, 6-Methyluracil und Thiouracil) ein ZNS-dämpfender Effekt beschrieben wird²¹⁰. Ausgangspunkt für diese Untersuchung war die Beobachtung, dass bestimmte Uracil-abhängige Bakterien durch Barbitursäure gehemmt werden können. Da die Barbitursäure eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit Uracil aufweist (**Abb. 1.27**) wurde ihr die Rolle eines Antimetaboliten zugeschrieben. Bis dato gab es allerdings keine Berichte über eine pharmakologische Wirkung von Uracil oder auch Thymin als weiterem physiologischem Oxopyrimidin. Die Erkenntnisse, dass Barbitursäure bei Bakterien einen antimetabolischen und bei höheren Organismen einen hypnotischen Effekt ausübt, führten Wenzel et al. zu der Überlegung, ob Uracil dementsprechend ebenfalls bei Tieren oder Menschen ZNS-dämpfende oder hypnotische Eigenschaften besitzen könnte.

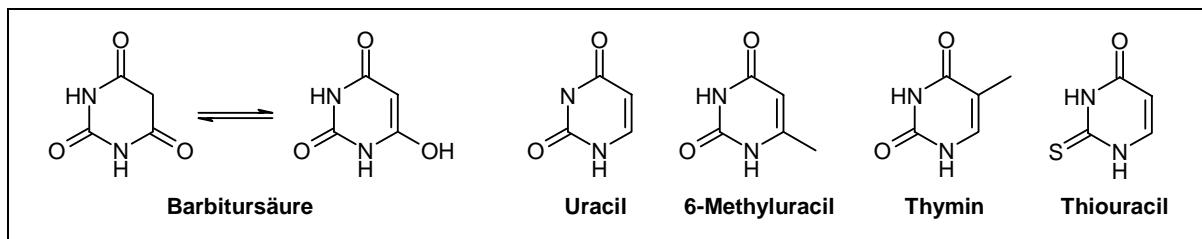


Abb. 1.27: Oxopyrimidine mit ZNS-dämpfenden Eigenschaften

In-vivo-Experimente mit Mäusen zeigten, daß Uracil, 6-Methyluracil, Thiouracil und Thymin zwar allein keinen Effekt hatten, den mit Hexobarbital induzierten Schlaf jedoch deutlich verlängern konnten. Desweiteren zeigten diese Verbindungen eine protektive Wirkung gegenüber Elektroschock-induzierten Anfällen. Dieser antikonvulsive Effekt konnte von Wenzel in weiteren Untersuchungen bestätigt werden. Es wurden siebzehn Uracil-Derivate synthetisiert²¹¹ und in Testungen an Mäusen auf ihre antikonvulsive Wirkung hin untersucht. Die meisten Uracil-Derivate zeigten eine protektive Wirkung gegenüber Elektroschock- und Metrazol¹-induzierten Anfällen. Allerdings konnte keine eindeutige Struktur-Wirkungs-Beziehung festgestellt werden²¹².

In den folgenden Jahren wurden die für Uracil gefundenen pharmakologischen Wirkungen (Schlaf-verlängernder Effekt und antikonvulsiver Effekt) auch für das Uridin, dem Nucleosid von Uracil, beschrieben^{213,214}.

¹Metrazol (Pentamethylentetrazol) wirkt als Antagonist der GABA-Rezeptoren an den inhibitorischen Interneuronen im Hippokampus und blockiert so die natürliche Hemmung, was wiederum zu einer exzessiven Erregung im Hippokampus und schließlich zur Ausbildung epileptischer Krämpfe führt. Es wird allgemein als Tiermodell der Epilepsie für Untersuchungen antiepileptischer Verbindungen verwendet.

Krooth et al. konnten 1978 in Motilitätsprüfungen an Mäusen zeigen, dass Thymin, Uracil, 6-Azauracil, Barbital und Phenobarbital in niedrigen Dosen die Spontanaktivität erhöhen, während sie in höheren Dosen eine Senkung derselben bewirken. Thymin, welches wirksamer war als Uracil, hatte ca. 10 % der Barbital-Wirkung – sowohl bei der stimulierenden als auch bei der dämpfenden Wirkung. Für die ZNS-dämpfende Wirkung ergab sich die folgende Reihenfolge: Barbital = Phenobarbital >> 6-Azauracil > Thymin \geq Uracil. In denselben Versuchen zeigten Cytosin, Barbitursäure, 2-Thiobarbitursäure, 2,4-Dihydroxypyridine sowie die Pyrimidin-Katabolite (Dihydrouracil, 3-Ureidopropionat, β -Alanin) keinen Effekt auf die Spontanaktivität. Die Ergebnisse dieser Studien führten zu der Annahme, dass die Wirkung der Barbiturate durch Simulierung der Uracil oder Thymin-Struktur an bisher unbekanntem Rezeptoren verursacht werden könnte²¹⁵.

1987 fanden japanische Forscher heraus, dass 1,3-Diallyluracil, 1,3-Diallylthymin und 1,3-Diallyl-6-methyluracil (**Abb. 1.28**) einen potenzierenden Effekt auf den Pentobarbital-induzierten Schlaf sowie auf die Diazepam-induzierte motorische Inkoordination haben²¹⁶.

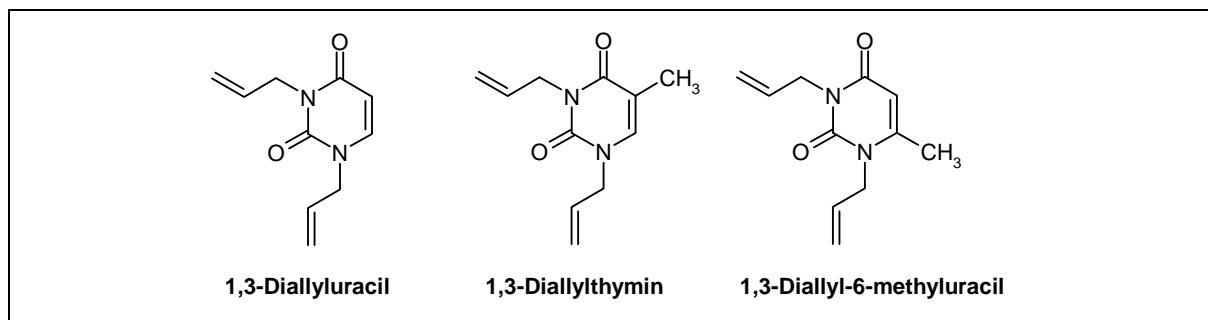


Abb. 1.28: Uracil-Derivate mit ZNS-dämpfender Wirkung

Zwei Jahre später wurde von der selben Arbeitsgruppe beschrieben, dass 1,3-Diallyluracil und 1,3-Diallylthymin einen Einfluss auf die Enzymaktivität der Ethylmorphin-N-De-methylase sowie der Cytochrom-P450-Enzyme in den hepatischen Mikrosomen der Testmäuse haben, sodass diese Verbindungen Einfluss auf die Metabolisierung von Pentobarbital haben und damit deren Wirkung potenzieren können. Allerdings führte 1,3-Diallyluracil im Gegensatz zu 1,3-Diallylthymin auch bei einer intrazerebroventrikulären Applikationsform zu einer signifikanten Verlängerung des Pentobarbital-induzierten Schlafes. Dies deutet darauf hin, dass für die Wirkung von 1,3-Diallyluracil neben der Inhibition der Pentobarbital-Metabolisierung auch ein ZNS-dämpfender Effekt verantwortlich ist. Im Falle von 1,3-Diallylthymin scheint für die Wirkung ausschließlich der Einfluss auf die Metabolisierung eine Rolle zu spielen²¹⁷.

In den folgenden Jahren synthetisierten Tateoka et al. 15 Uracil-Derivate, welche an 1- und/oder an 3-Position mit einer Benzyl-, Methoxymethyl-, *n*-Propyl-, oder Allyl-Gruppe substituiert waren. Diese wurden an Mäusen auf ihre pharmakologische Wirkung – hypnotische Wirkung und Verlängerung der Pentobarbital-induzierten Schlafes – hin untersucht. 1-Allyl-3-benzyluracil und 1-Propyl-3-benzyluracil waren bezüglich der hypnotischen Aktivität wirksamer als Barbital. Aus den Ergebnissen kristallisierte sich heraus, dass für eine

sedativ-hypnotische Wirkung der Uracil-Derivate eine Benzyl-Gruppe an der N3-Position des Uracil-Ringes essentiell ist. Unter den untersuchten Uracil-Derivaten erwies sich **1-Allyl-3-benzyluracil** (Abb. 1.29) als die Verbindung mit der höchsten ZNS-dämpfenden Wirkung²¹⁸.

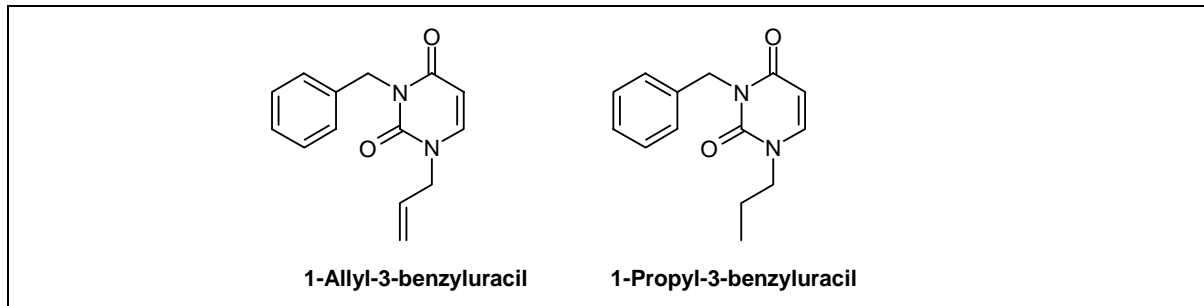


Abb. 1.29: Oxopyrimidine mit ZNS-dämpfenden Eigenschaften

In den Jahren 1991/92 forschte auch eine andere Arbeitsgruppe aus Japan auf dem Gebiet. Imaizumi et al. synthetisierten zahlreiche 1-Amino-5-substituierte Uracil-Derivate und untersuchten diese auf ihre ZNS-dämpfende Wirkung hin. Die 1-Amino-5-Halogen-Uracil-Derivate zeigten in *in-vivo*-Experimenten mit Ratten und Mäusen eine anxiolytische Wirkung²¹⁹. Einige Verbindungen wurden bereits zu Anfang der 90er in Japan patentiert. Im März 1994 wurde die Verbindung **1-Amino-5-bromuracil** (ABU, Abb. 1.30) als eine neue anxiolytisch wirksame Substanz beschrieben²²⁰. In Testungen mit Mäusen und Ratten zeigte diese Substanz sowohl anxiolytische Eigenschaften als auch eine Aufhebung des Körperstellreflexes^j (sog. „Righting-Reflex“). Im Vergleich zu Diazepam konnte für diese Substanz aber nur eine sehr geringe Wirkung bei der Potentierung der Arzneimittel-induzierten Anästhesie bzw. Muskelrelaxation festgestellt werden. Zudem zeigte 1-Amino-5-bromuracil keine Affinität zu dem Benzodiazepin-Rezeptor. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass ABU ein anderes pharmakologisches Profil besitzt als Diazepam. Weitere Untersuchungen bestätigten diese Annahme²²¹. Im selben Jahr wurde auch der Einfluss von ABU auf die Metabolisierung der Monoamin-Neurotransmitter Noradrenalin, Dopamin und Serotonin im Rattenhirn untersucht. Unter stressfreien Bedingungen zeigte ABU keinen Effekt auf die Metabolisierung der Monoamin-Neurotransmitter, während Diazepam das Verhältnis 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethylenglycol (MHPG)/Noradrenalin (NA) erhöhte.

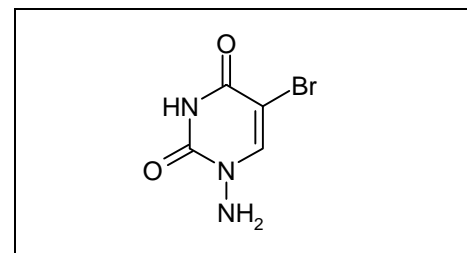


Abb. 1.30: 1-Amino-5-bromuracil

^j Beim Körperstellreflex werden die Tiere auf den Rücken gedreht und beobachtet, ob sie sich innerhalb von 60 Sekunden wieder auf den Bauch drehen. Diese Korrekturdrehung ist eine natürliche Reaktion und bedeutet bei ihrem Ausbleiben, dass die Tiere sich in einem anästhesierten Zustand befinden.

Nach Stress durch Immobilisierung^k kam es zu einer Erhöhung des Verhältnisses MHPG/NA in bestimmten Hirnregionen der Versuchstiere (Ratten), während das Verhältnis Homovanillinsäure (HVA) + 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC)/Dopamin (DA) sowie das Verhältnis 5-Hydroxyindolethylsäure (5-HIAA)/Serotonin (5-HT) unverändert blieben. Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit ABU oder Diazepam konnte die durch Immobilisierung induzierte Aktivierung der noradrenergen Neurone unterdrücken. Im Vergleich dazu führte Elektroschock-Stress zu einer Erhöhung der MHPG/NA und auch HVA/+DOPAC/ DA-Verhältnisse. Auch hier konnten Diazepam und ABU die Aktivierung der noradrenergen und der dopaminergen kortikalen Neurone verhindern²²². Kurze Zeit später konnte in weiteren *in-vivo*-Studien gezeigt werden, dass ein Teil der zentralen Wirkung von 1-Amino-5-bromuracil mit dem zentralen Benzodiazepin-GABA_A-Chloridkanal-Rezeptorenkomplex in Zusammenhang steht. In *in-vivo*-Studien an Mäusen wurde für 1-Amino-5-bromuracil eine protektive Wirkung gegenüber Picrotoxin^l-induzierten Krampfanfällen ermittelt. Zudem führte die Verbindung zu einer leichten Verbesserung bei Tert-Butylbicyclophosphorothionat (TBPS)^m-induzierten Anfällen, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Bicucullinⁿ-induzierten Anfälle. Diazepam war unter den gleichen Bedingungen in der Lage, sowohl Picrotoxin-als auch Bicucullin-induzierte Anfälle zu antagonisieren, während Pentobarbital eine protektive Wirkung gegenüber die Picrotoxin- und TBPS-induzierten Anfälle aufwies. Desweiteren wurde die von 1-Amino-5-bromuracil induzierte anästhetische Wirkung von Diazepam, Pentobarbital und Muscimol^o potentiert. Picrotoxin konnte diese Wirkung antagonisieren, während Bicucullin nicht dazu in der Lage war. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass die 1-Amino-5-bromuracil-Wirkung zum Teil über den GABA_A-Rezeptor vermittelt wird. In Bindungsstudien konnte das Uracil-Derivat jedoch weder die [³H]Muscimol-noch die [³⁵S]TBPS- oder die [³H]Dehydroepiandrosteronsulfat^p-Bindung an Rattenhirn-Synaptosomen-Membranpräparation inhibieren²²³. Die 1-Amino-5-Halogenuracile wurden 1993 von Sakata et al. patentiert^q.

1998 wurden von Draminski et al. verschiedene 3-Allyl- und 1-Allyl-5,6-substituierte-2-thiouracil-Derivate untersucht. Den Verbindungen konnten unterschiedliche pharmakologische Effekte zugeschrieben werden. Während einige Verbindungen eine sedativ-hypnotische Wirkung zeigten, konnte man bei anderen einen krampfauslösenden Effekt beobachten. Als einziges der untersuchten 24 Thiouracil-Derivate wies **1-Allyl-5,6-dimethyl-2-thiouracil** eine Verkürzung des Pentobarbital-induzierten Schlafes auf. Die Verbindung **3-Allyl-5-methyl-2-thiouracil (Abb. 1.31)** zeigte die höchste hypnotische Aktivität²²⁴.

^k Die Immobilisierung der Tiere ist ein häufig verwendetes Stressmodell. Dabei werden die Versuchstiere in unterschiedlichen Vorrichtungen (Plexiglas, Drahtgitter) zwangsweise fixiert.

^l negativer Modulator am GABA_A-Rezeptor

^m negativer Modulator am GABA_A-Rezeptor

ⁿ Antagonist des GABA_A-Rezeptors

^o Agonist des GABA_A-Rezeptors

^p Modulator am GABA_A-Rezeptor

^q United States Patent 5,252,576; Appl. No.: 640413; 1-amino-5-halogenouracils, process for their preparation, and central nervous system depressants containing same as active ingredient.

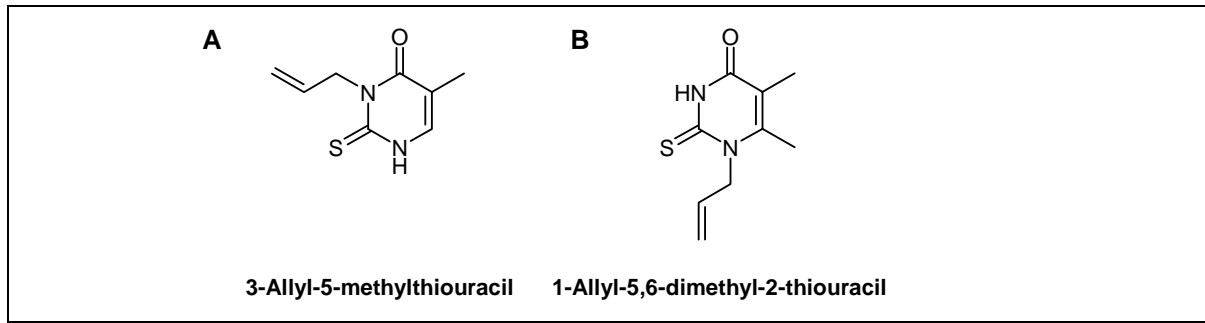


Abb. 1.31: Thiouracil-Derivate mit sedativ-hypnotischem Effekt (**A**) und antagonistischem Effekt gegenüber Pentobarbital (**B**).

6-Propyl-2-thiouracil (PTU, Abb. 1.32) wird zur Therapie einer Hyperthyreose sowie zur Vorbereitung zur Operation oder Radioiod-Therapie einer hyperthyreoten Schilddrüse eingesetzt. Die Wirkung dieses Thyreostatikums wird über eine Hemmung der Peroxidase vermittelt. Dadurch wird die Oxidation des aufgenommenen Iodids zu Iod, die Iodierung der Tyrosinreste des Thyreoglobulins und die Phenolkupplung zu Diphenyletherstruktur verhindert. Folglich wird die Bildung der beiden Hormone Levothyroxin (L-Thyroxin, T₄, L-3,5,3',5'-Tetraiodthyronin) und Liothyronin (T₃, L-3,5,3'-Triiodthyronin) gehemmt^{155,225}.

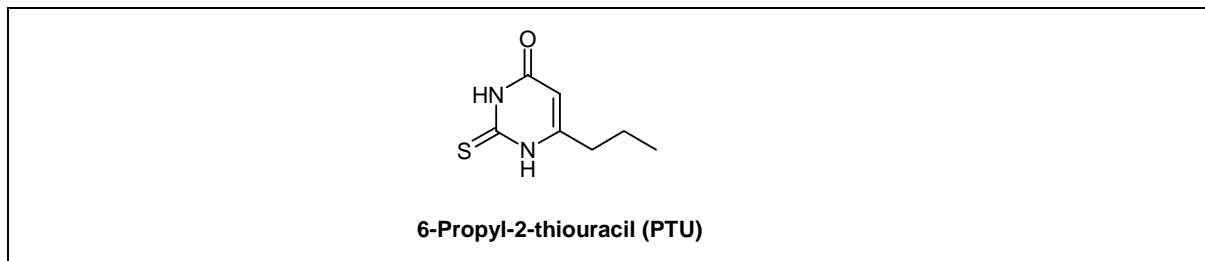


Abb. 1.32: 6-Propyl-2-thiouracil (Thyreostatikum)

1.6 Ziel der Arbeit

Die Nukleobase Uracil und das Nukleosid Uridin spielen nicht nur innerhalb des Zellkerns als Bestandteile des Erbguts eine wichtige Rolle, sondern scheinen darüberhinaus physiologische Bedeutungen zu haben. Sowohl für Uridin als auch für Uracil sind verschiedene pharmakologische Wirkungen bekannt, während der jeweilige Wirkmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Im Falle von Uridin wird vermutet, dass die Wirkungen über einen (eventuell G-Protein-gekoppelten) Rezeptor ausgelöst werden. Im Falle von Uracil dagegen existieren derweil keine Erklärungsansätze für die pharmakologischen Effekte, allerdings lassen verschiedene Studien aus der Literatur auch hier die Vermutung zu, dass spezifische Uracil-Rezeptoren existieren könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit soll aufgeklärt werden, ob neben den Adenosin-Rezeptoren auch für das Nukleosid Uridin spezifische Bindungsstellen existieren und ob überdies auch für die Nukleobase Uracil spezifische Bindungsstellen nachweisbar sind. Zunächst soll mit Hilfe von Radioligand-Bindungsstudien an verschiedenen Membranpräparationen die Existenz entsprechender Bindungsstellen überprüft werden. Im Falle der Identifizierung einer spezifischen Bindung für [^3H]Uracil bzw. [^3H]Uridin sollen die Bindungsstellen in weiteren Studien näher charakterisiert werden. Funktionelle Untersuchungen sollen überdies neue Erkenntnisse darüber bringen, ob die Bindungsstellen eventuell an ein G-Protein gekoppelt sind und es sich folglich bei der Uridin- bzw. Uracil-Bindungsstelle um einen G-Protein gekoppelten-Rezeptor handeln könnte.

Daneben soll in einem weiteren Teil-Projekt das Enzym Uridin-Cytidin-Kinase aus Kalbs-Thymus isoliert und aufgereinigt werden. Nach der Aufreinigung soll das Enzym bezüglich der Enzymaktivität untersucht und charakterisiert werden. Die Uridin-Cytidin-Kinase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Pyrimidin-*Salvage*-Stoffwechselweg und katalysiert die Umsetzung von Uridin und Cytidin zu den entsprechenden Monophosphaten. Die Uridin-Cytidin-Kinase stellt eine wichtige Zielstruktur zur Entwicklung von Prodrugs für die Antitumor- und Virustatika-Therapie dar, sodass die Testung von Uridin-Derivaten zur Identifizierung von neuen Inhibitoren und Substraten von großem Interesse ist. Aus diesem Grund soll das Enzym aus nativem Gewebe aufgereinigt und für zukünftige Experimente zur Verfügung gestellt werden. Desweiteren ist das Enzym zur quantitativen „Entfernung“ von Uridin z.B. aus Membranpräparationen von besonderem Interesse, da dieses physiologische Nukleosid Radioligand-Bindungsstudien sowie funktionelle Assays zur Charakterisierung von Pyrimidin-Rezeptoren stören kann.

Kapitel 2

Charakterisierung einer spezifischen Bindungsstelle für [³H]Uracil

2.1 Einleitung

Viele *in-vivo*-Studien in der Vergangenheit schreiben der Nukleobase Uracil bzw. verschiedenen Uracil-Derivaten pharmakologische Wirkungen (u.a. eine ZNS-dämpfende Wirkung) zu (Abschnitt. 1.5), für die es bis dato keine eindeutigen Erklärungsansätze gibt. Vermutungen, dass die Wirkungen von Uracil mit dem GABA_A-Rezeptor in Zusammenhang stehen, konnten nicht eindeutig bestätigt werden. Die derzeitige Datenlage deutet darauf hin, dass Uracil seine Wirkungen über einen bis dato unbekanntem Wirkungsmechanismus (evtl. über einen neuen Rezeptor) vermitteln könnte. Bereits im Jahre 1977 wurde von Krooth et al. eine Rezeptor-Bindungsstelle für Uracil postuliert. Durch Bindung an diese Bindungsstelle übt Uracil dieser Theorie nach seine hypnotische Aktivität aus. Dihydrouracil, dem Kataboliten von Uracil, wird die Rolle eines Antagonisten an diesem besagten Rezeptor zugesprochen. Die Autoren untermauern diese Theorie sowohl mit eigenen Untersuchungen als auch mit Studien aus der Literatur²²⁶. Allerdings gibt es bis heute keine eindeutigen Beweise dafür, dass ein „Uracil-Rezeptor“ existiert.

Das 2003 offiziell beendete internationale Humane Genomprojekt hat u.a. hervorgebracht, dass insgesamt ca. 720 funktionelle G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) im Menschen existieren, von denen zur Zeit ca. 150 zu den sogenannten „orphan“ GPCR zählen. Für diese GPCR's ist der natürliche Ligand bis dato nicht bekannt⁸. Kürzlich wurde durch einen „reversen pharmakologischen Ansatz“ von Bender et al. entdeckt, dass die Nukleobase Adenin der endogene Ligand eines solchen Ratten-„Orphan-„Rezeptors darstellt²²⁷. Bei diesem neuentdeckten Adenin-Rezeptor handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, welcher durch ein inhibitorisches G_i-Protein die Adenylatcyclase inhibiert. In unserem Arbeitskreis konnte die Existenz des Adenin-Rezeptors in nativem Gewebe auf Proteinebene nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurden Hinweise gefunden, dass auch in humanem Gewebe Adenin-Rezeptoren existieren²²⁸.

Ausgehend von der bestehenden Datenlage bezüglich Uracil erscheint es naheliegend, dass tatsächlich spezifische Bindungsstellen für Uracil existieren. Die Erkenntnis, dass es für die Nukleobase Adenin einen G-Protein-gekoppelter Rezeptor gibt, läßt zudem die Überlegung zu, ob nicht auch Uracil seine biologische Aktivität über einen GPCR vermittelt. Diese Überlegungen stellten den Ausgangspunkt für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen dar.

2.2 Identifizierung der Uracil-Bindungsstelle

2.2.1 Spezifische Bindung von [³H]Uracil an Ratten- und Kalbs-Gewebe

Bei einem ersten Experiment, bei dem [³H]Uracil mit Membranpräparationen von Rattenhirn-Striatum- und -Cortex-Gewebe inkubiert wurde, konnte eine, wenn auch geringe, spezifische Bindung für [³H]Uracil identifiziert werden. Wie in **Abb. 2.1** ersichtlich, erhöht sich die spezifische Bindung mit zunehmender Radioligand-Konzentration.

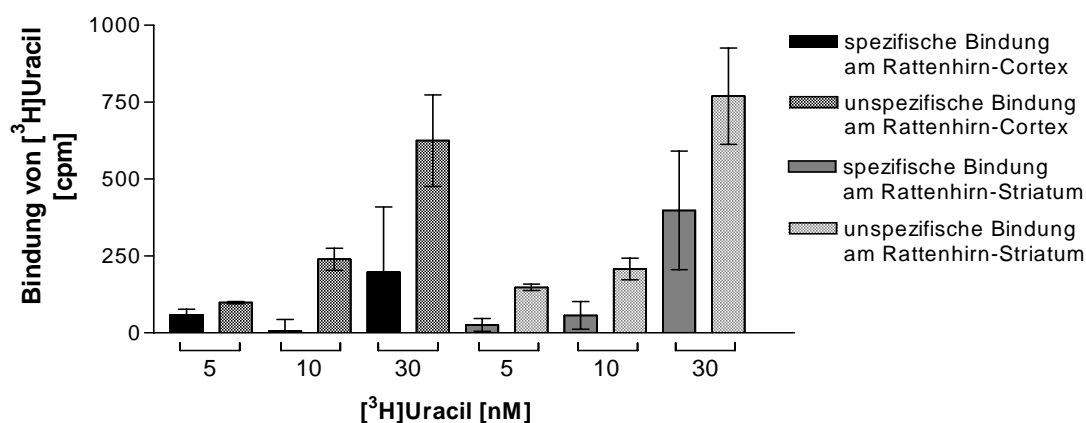


Abb. 2.1: Spezifische Bindung von [³H]Uracil an Rattenhirn-Striatum (200 µg) und Rattenhirn-Cortex (200 µg) bei einer Inkubationszeit von **60 Minuten** und einer Inkubationstemperatur von **5°C**. Dargestellt ist ein Einzelexperiment (Vorversuch) in Dreifachbestimmung.

Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde ein zweites, ähnliches Experiment durchgeführt, bei dem Kalbshirn-Striatum, Rattenhirn-Striatum sowie Rattenhirn-Cortex mit 5 nM [³H]Uracil 60 Minuten bei 5°C inkubiert wurden. In **Abb. 2.2** sind die Ergebnisse des zweiten Versuches dargestellt.

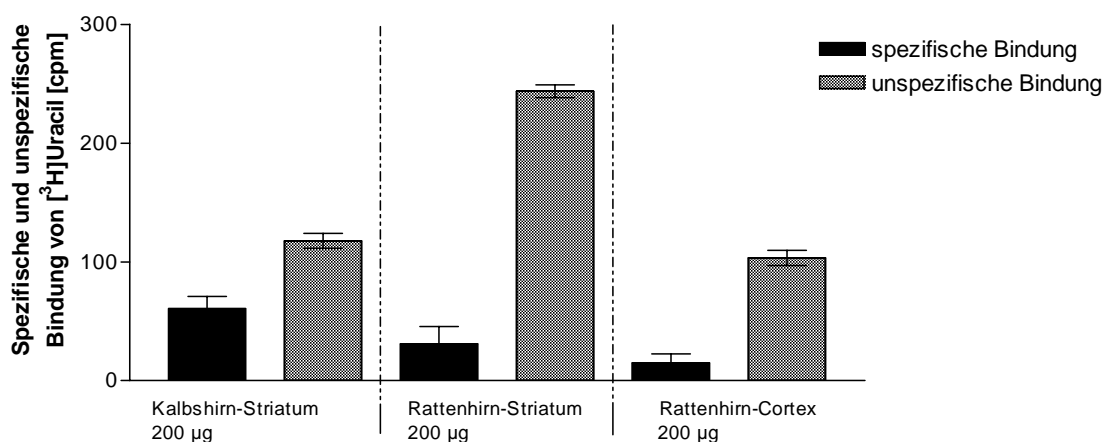


Abb. 2.2: Spezifische und unspezifische Bindung von [³H]Uracil an **Rattenhirn-Striatum**, **Rattenhirn-Cortex** und **Kalbshirn-Striatum** bei einer Radioligandkonzentration von 5 nM, einer Inkubationszeit von 60 Minuten und einer Inkubationstemperatur von 5°C. Dargestellt ist ein Einzelexperiment (Vorversuch) in Dreifachbestimmung.

Auch bei diesem Vorversuch konnte eine geringe spezifische Bindung für den Radioliganden beobachtet werden. Kalbshirn-Striatum zeigte die höchste spezifische Bindung gefolgt von Rattenhirn-Striatum und Rattenhirn-Cortex. In **Tab. 2.1** sind die Bindungsdaten der beiden Experimente zusammenfassend dargestellt.

Tab. 2.1: Spezifische Bindung von [³H]Uracil an Membranpräparationen verschiedener Hirngewebe bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten und einer Inkubationstemperatur von 5°C.

	Spezifische Bindung von [³ H]Uracil	
	[cpm]	[%]
Rattenhirn-Cortex-Membranpräparation (200 µg)		
5 nM RL	37 ± 22 [n=2]	25 ± 12 [n=2]
10 nM RL	76	31
30 nM RL	454	55
Rattenhirn-Striatum-Membranpräparation (200 µg)		
5 nM RL	29 ± 3 [n=2]	14 ± 2 [n=2]
10 nM RL	57	22
30 nM RL	398	34
Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation (200 µg)		
5 nM RL	61	34

Die beiden Experimente zeigten zwar für alle untersuchten Gewebe eine spezifische Bindung, allerdings betrug diese nur 14-55 %, was insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass eine sehr hohe Radioligand- und Proteinkonzentration eingesetzt wurde, sehr niedrig und schlecht auswertbar ist. Beim Vergleich der Bindungsdaten erkennt man, dass die absoluten Counts für die spezifische Bindung mit Zunahme der Radioligandkonzentration zunehmen. Bei dem Rattenhirn-Cortex-Gewebe führt die Erhöhung der Radioligandkonzentration (5-30 nM) zu einer Zunahme der spezifischen Bindung von 37 auf 454 cpm. Bei dem Rattenhirn-Striatum zeigt sich ein ähnliches Ergebnis (29–398 cpm). Es fällt auf, dass die prozentuale spezifische Bindung durch eine Erhöhung der Radioligandkonzentration gesteigert wird.

► Diese Vorversuche ergeben erste Hinweise darauf, dass in den untersuchten Geweben tatsächlich spezifische Bindungsstellen für Uracil existieren. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Inkubationsdauer zu kurz war, da die prozentuale spezifische Bindung mit zunehmender Radioligand-Konzentration ansteigt, was mit einer schnelleren Kinetik bei höheren Radioligand-Konzentration erklärt werden könnte.

2.2.2 Temperaturabhängigkeit der [³H]Uracil-Bindung

Aufgrund der ersten Hinweise auf die Existenz einer spezifischen Bindung von [³H]Uracil wurde die Überlegung angestellt, ob man die spezifische Bindung durch Erhöhung der Inkubationstemperatur steigern und das Verhältnis von Gesamtbindung zu unspezifischer Bindung verbessern könnte, denn die Kinetik der Bindung ist temperaturabhängig. Hierzu wurde in einem Bindungsexperiment bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten und einer Radioligand-Konzentration von 5 nM die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur bestimmt. Verglichen wurde die spezifische Bindung bei einer Inkubationstemperatur von 5°C (im Eisbad) und 25°C (im Wasserbad). In **Abb. 2.3** und **Tab. 2.2** sind die Ergebnisse dieses Experiments dargestellt.

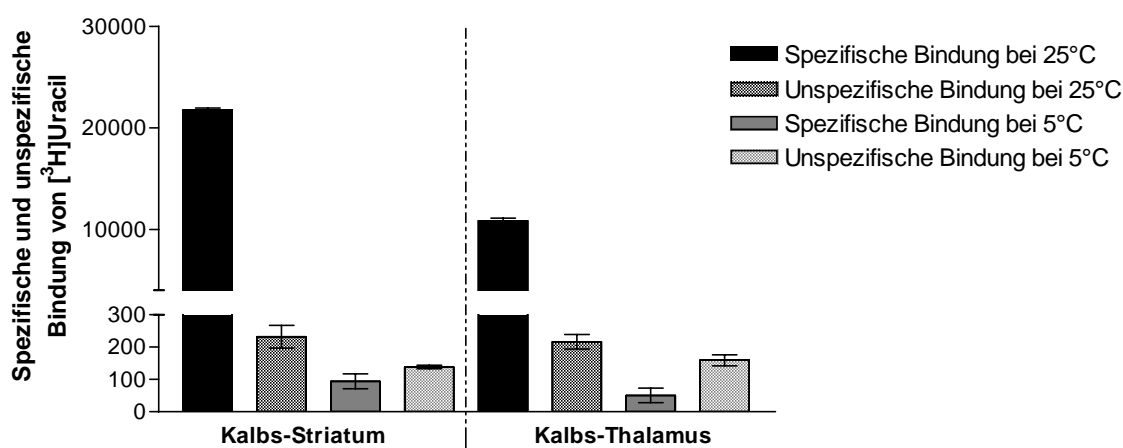


Abb. 2.3: **Temperaturabhängigkeit** der spezifischen und unspezifischen Bindung von [³H]Uracil [5 nM] an Kalbshirn-Striatum- (100 µg) und Kalbshirn-Thalamus-Membranpräparation (100 µg). Die Inkubationszeit betrug jeweils 60 Minuten. Dargestellt ist ein Einzelexperiment in Dreifachbestimmung.

Tab. 2.2: Spezifische Bindung von [³H]Uracil an Kalbshirn-Membranpräparationen bei einer Inkubationsdauer von 60 Minuten und unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

	Spezifische Bindung von [³ H]Uracil (cpm)			
	bei 5°C		bei 25°C	
	[cpm]	[%]	[cpm]	[%]
Kalbs-Striatum-Membranpräparation (100 µg)	94	41	21776	99
Kalbs-Thalamus-Membranpräparation (100 µg)	51	24	10858	98

Aus **Abb. 2.3** wird deutlich, dass die spezifische Bindung von [³H]Uracil in sehr starkem Maße von der Inkubationstemperatur beeinflusst wird. Die spezifische [³H]Uracil-Bindung sowohl an Kalbshirn-Striatum- als auch an Kalbshirn-Thalamus-Gewebe läßt sich durch Erhöhung der Inkubationstemperatur von 5°C auf 25°C ungefähr 200fach steigern. Der prozentuale Anteil der spezifischen Bindung steigt von 41 % auf 99 % bei Kalbs-Striatum- bzw. von 24 % auf 98 % bei Kalbs-Thalamus-Gewebe. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Gleichgewicht im Bindungsassay bei 5°C nach 60 Minuten noch nicht eingestellt ist. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine langsame Kinetik hin. Die nachfolgend durchgeführten Kinetikexperimente bestätigen diese Vermutung (siehe dazu Kap. 2.3.5).

2.2.3 Proteinlinearität

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Proteinkonzentration und spezifischer Bindung wurden sowohl Rattenhirn-Striatum- als auch -Cortex-Membranpräparationen in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0-100 µg) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 mit 5 nM [³H]Uracil bei 37°C für 5 Stunden inkubiert und zur Auswertung die Gesamtbindung sowie die unpezifische Bindung bestimmt. In **Abb. 2.4** ist die spezifische [³H]Uracil Bindung gegen die Proteinkonzentration aufgetragen.

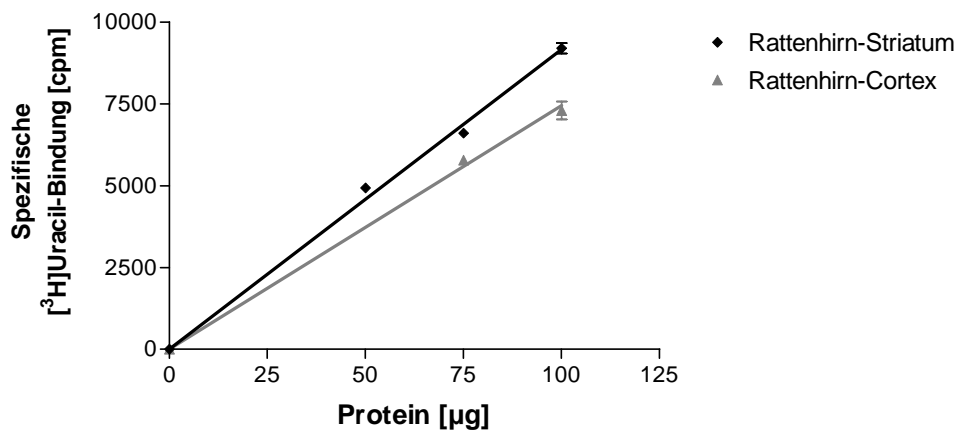


Abb. 2.4: Abhängigkeit der spezifischen [³H]Uracil-Bindung von der Proteinkonzentration

Wie **Abb. 2.4** zeigt, nimmt die spezifische [³H]Uracil-Bindung mit steigender Proteinkonzentration (0-100 µg) sowohl bei Rattenhirn-Striatum- als auch bei Rattenhirn-Cortex-Membranpräparationen linear zu. Daneben wird das zuvor bereits beobachtete Ergebnis bestätigt, dass die Membranpräparation von Rattenhirn-Striatum-Gewebe im Vergleich eine höhere spezifische Bindung zeigt als die Rattenhirn-Cortex-Membranpräparation.

2.2.4 Spezifische [³H]Uracil-Bindung an Humanhirn-Gewebe

Nachdem im Ratten- und Kalbs-Gewebe eine spezifische Bindung für Uracil gefunden worden war, sollte untersucht werden, ob die Uracil-Bindungsstellen auch im humanen Hirngewebe existieren. Das hierfür verwendete humane Hirncortex- und Nucleus caudate- und Putamen-Gewebe stammte von einem 79 Jahre alten Mann, der an Herzinfarkt gestorben war. In einem Bindungsexperiment wurden Membranpräparationen der beiden Gewebe mit dem Radioliganden [³H]Uracil bei einer Inkubationstemperatur von 37°C (im Wasserbad) und einer Inkubationsdauer von 5 Stunden inkubiert. Hierbei wurden die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung bestimmt und die spezifische Bindung aus der Differenz berechnet.

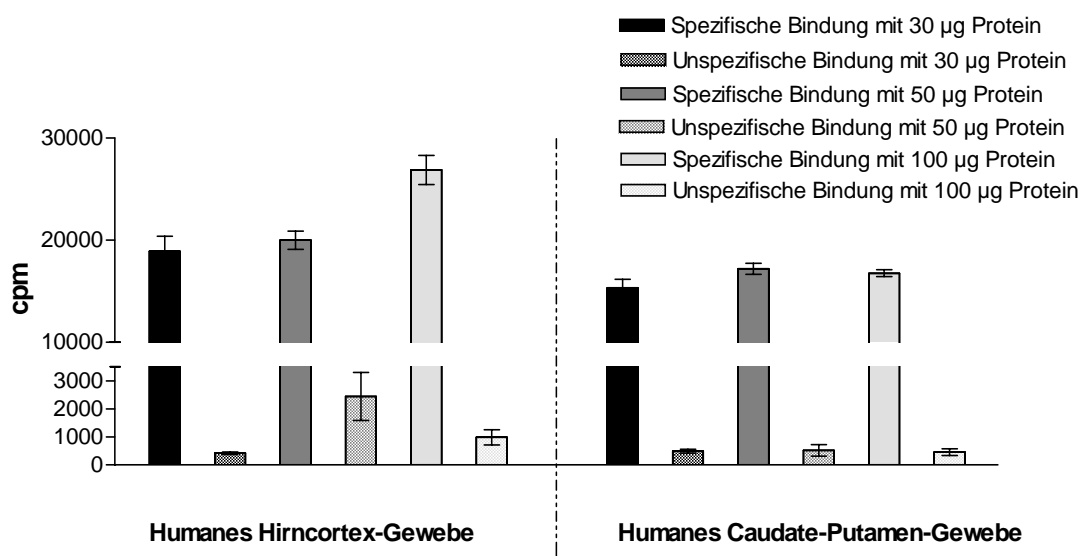


Abb. 2.5: Spezifische Bindungsstellen von [³H]Uracil in humanen Hirn-Gewebe-Membranpräparationen. Der Versuch wurde bei einer Radioligandkonzentration von 5 nM, einer Inkubationszeit von 5 h und einer Inkubationstemperatur von 37°C durchgeführt. Dargestellt ist ein Einzelexperiment in Dreifachbestimmung.

Wie **Abb. 2.5** veranschaulicht, konnte in humanem Gewebe eindeutig eine spezifische Bindung für [³H]Uracil festgestellt werden. Sowohl in humanem Cortex- als auch in humanem Caudate-Putamen-(Striatum-)-Gewebe sind die cpm-Werte für die spezifische Bindung sehr hoch, während die unspezifische Bindung vergleichsweise niedrig ist. Dies deutet auf eine hohe Expressionsrate der Bindungsstellen im Humangewebe hin. Mit steigender Proteinkonzentration nehmen die absoluten spezifischen Counts nahezu linear zu, während die prozentuale spezifische Bindung zwischen 89 und 98 % liegt und sich damit nur geringfügig verändert. Um einen K_D -Wert für [³H]Uracil im humanen Hirn-Cortex und -Striatum-Gewebe ermitteln zu können, wurden an Membranpräparationen dieser Gewebe Sättigungsexperimente durchgeführt, die im Kapitel 2.4.3 diskutiert werden.

2.3 Entwicklung eines Radioligand-Rezeptor-Bindungsassays für [³H]Uracil an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen

Zur Charakterisierung der zuvor identifizierten Bindungsstellen für Uracil sollte mit [³H]Uracil ein Standardassay etabliert werden. Hierzu wurden verschiedene Parameter wie Inkubationsdauer und -temperatur, Puffer, Radioligandkonzentration sowie Proteinmenge näher untersucht.

2.3.1 Einfluss der Puffer-Zusammensetzung

Zur Untersuchung des Einflusses des Inkubationspuffers wurden Bindungsexperimente bei einer Inkubationstemperatur von 37°C und einer Inkubationsdauer von 5 Stunden durchgeführt, bei denen verschiedene Puffer sowie Ionen-Zusätze eingesetzt wurden:

- 10 mM Tris-Puffer, pH 7,4
- 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
- 100 mM Tris-Puffer, pH 7,4
- 150 mM Tris-Puffer, pH 7,4
- 200 mM Tris-Puffer, pH 7,4
- 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 + 10 mM MgCl₂
- 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 + 100 mM NaCl

Zur Auswertung wurde die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung bestimmt und die spezifische Bindung aus der Differenz der beiden Werte berechnet. Die Ergebnisse sind in **Abb. 2.6** dargestellt.

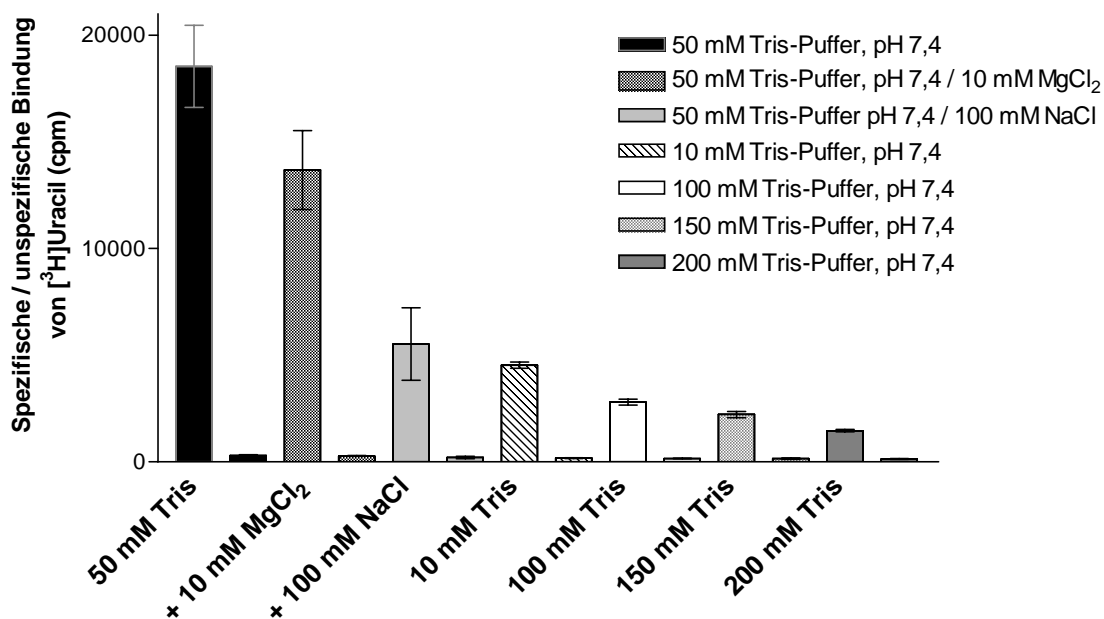


Abb. 2.6: **Abhängigkeit der [³H]Uracil-Bindung** an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation (50 µg Protein) **von der Puffer-Zusammensetzung**. Die Experimente wurden bei einer Radioligandkonzentration von 5 nM, einer Inkubationszeit von 5 h und einer Inkubationstemperatur von 37°C durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Magnesium-Ionen haben in einer Konzentration von 10 mM nur einen geringen Einfluss auf die spezifische Bindung von [³H]Uracil an Kalbs-Striatum, während bei einer **NaCl**-Konzentration von 100 mM die Bindung auf 30 % der ursprünglichen spezifischen Bindung absinkt. Die **Ionenstärke** zeigt auf die spezifische Bindung des Radioliganden einen starken Effekt. Die Gesamtbindung nimmt mit zunehmender Ionenstärke deutlich ab, während die unspezifische Bindung sich nicht merklich ändert. Bei Änderung der Konzentration des Inkubationspuffers (Tris-Puffer, pH 7,4, **Abb. 2.7**) von 50 mM auf 200 mM beträgt die spezifische Bindung nur noch 8 % des ursprünglichen Wertes (**Tab. 2.3**).

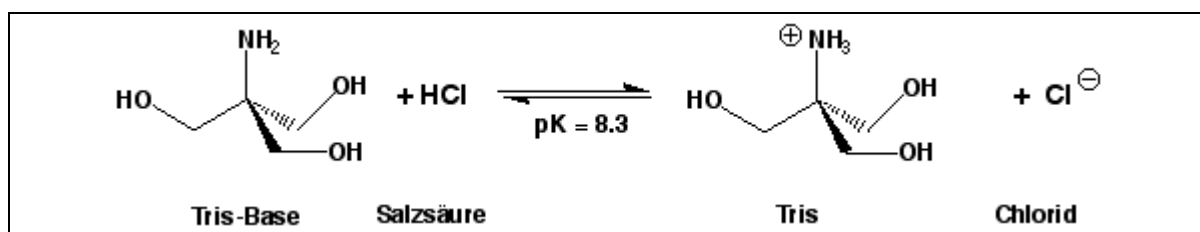


Abb. 2.7: Tris-Puffer

Tab. 2.3: Einfluss der Puffer-Zusammensetzung auf die spezifische Bindung von [³H]Uracil

Inkubationspuffer	Spezifische Bindung [cpm] ± SEM [n=3]	Spezifische Bindung [%] bezogen 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 mM Tris-Puffer, pH 7,4	18542 ± 1926	100 %
50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 10 mM MgCl ₂	13678 ± 1850	74 %
50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 100 mM NaCl	5518 ± 1698	30 %
10 mM Tris-Puffer, pH 7,4	4532 ± 141	24 %
100 mM Tris-Puffer, pH 7,4	2804 ± 141	15 %
150 mM Tris-Puffer, pH 7,4	2216 ± 139	12 %
200 mM Tris-Puffer, pH 7,4	1459 ± 57	8 %

► Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 ohne weitere Ionenzusätze die höchste spezifische [³H]Uracil-Bindung ermittelt werden konnte und sich dieser Puffer somit als am besten geeignet erwies. Alle weiteren Versuche wurden, wenn nichts anderes angegeben, mit dieser Puffer-Zusammensetzung durchgeführt.

2.3.2 Das Lösungsmittel

Da sich nicht alle Substanzen, die in einem Standardassay getestet werden sollen, in wäßrigem Milieu lösen, muß ein organisches Lösungsmittel zugesetzt werden. In der Regel nimmt man bei Bindungsstudien Dimethylsulfoxid (DMSO), weil es gute Lösungseigenschaften besitzt. Es ist allerdings bekannt, dass sich DMSO in hohen Konzentration schädlich auf Proteine auswirken kann. Um den Effekt des Lösungsmittels möglichst gering zu halten, wurde bei den Assays eine **DMSO-Konzentration von 1 %** verwendet. Es konnte aber gezeigt werden, dass auch eine Konzentration von 2,5 % die [³H]Uracil-Bindung nicht beeinflusst.

2.3.3 Die Membranpräparation

Die Ergebnisse der Vorversuche mit verschiedenen Geweben (**Abb. 2.8**, siehe auch Kap. 2.2.1) zeigten für das Kalbshirn-Striatum-Gewebe die höchsten absoluten Counts für die spezifische Bindung. Bezogen auf die spezifische Bindung an die Kalbs-Striatum-Membranpräparation (= 100%) zeigt die Rattenhirn-Striatum-Membranpräparation eine spezifische Bindung von 57 % und bei Rattenhirn-Cortex-Membranpräparation beträgt dieser Wert sogar nur 45 %. Diese Ergebnisse führten zu der Entscheidung, bei den Standardassays Kalbs-Striatum-Gewebe zu verwenden. Zudem sind Kalbs-Hirne sehr viel einfacher, schneller und kostengünstiger zu erwerben (Schlachthof Köln) als die Rattenhirne, was einen wirtschaftlich bedeutenden Vorteil darstellt. Bei optimierten Inkubationsbedingungen (5 Stunden bei 37°C), welche aus den Kinetikexperimenten ermittelt wurden, ergeben sich bei Einsatz von 50 µg Protein pro Reaktionsansatz relativ hohe Counts für die spezifische Bindung bei einem optimalen Verhältnis von Gesamtbindung zur unspezifischen Bindung (ca. 28000 : 230 cpm, **Abb. 2.9**). Folglich ist die mit 100 µM Uracil bestimmte unspezifische Bindung sehr gering (unter 2 %), sodass eine Vorbehandlung des Filters mit Polyethylenimin (PEI), welches durch Neutralisierung der sauren Silanolat-Gruppen des Glasfasermaterials die unspezifische Bindung senken kann²²⁹, nicht notwendig ist. Die Filter werden vor dem Absaugen lediglich mit eiskaltem Waschlösungspuffer (50 mM Tris-Puffer, pH 7,4) befeuchtet. Damit ergibt sich ein sehr breites Auswertungsfenster. Die optimierte P2-Membranpräparation des Gewebes (Experimenteller Teil, Kap. 7.3.2) liefert sehr gut reproduzierbare Daten. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich eine **Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation** mit einer Proteinkonzentration von **50 µg pro Reaktionsansatz** als Quelle für die Uracil-Bindungsstellen für den Standardassay als am besten geeignet erwies.

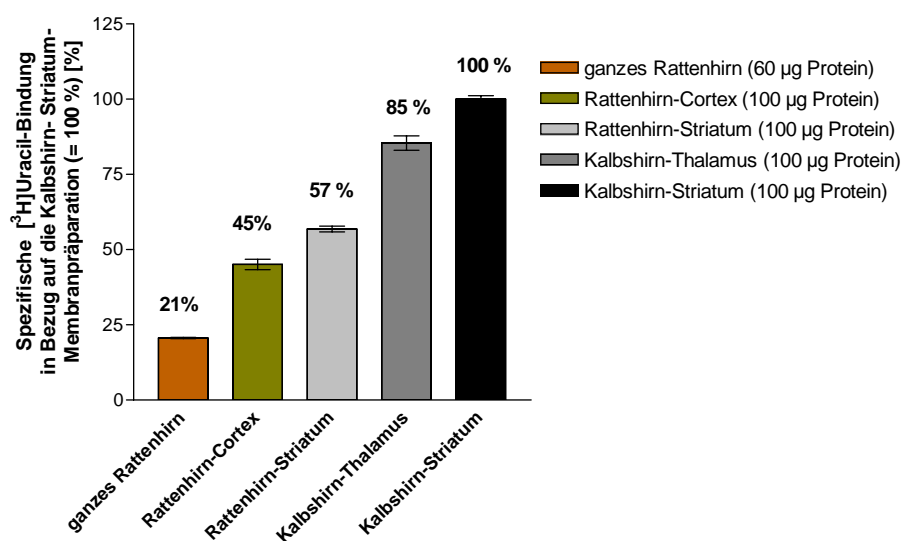


Abb. 2.8: Spezifische [³H]Uracil-Bindung an verschiedene Membranpräparationen in Bezug auf die Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation (=100 %). Das Experiment wurde bei einer Radioligandkonzentration von 5 nM, einer Inkubationszeit von 5 h und einer Inkubationstemperatur von 37°C durchgeführt. Dargestellt ist ein Einzelexperiment in Dreifachbestimmung.

2.3.4 Die Radioligandkonzentration

In Konkurrenzexperimenten werden in der Regel Radioligandkonzentrationen zwischen $1/10 K_D$ und $10 K_D$ eingesetzt. Da ein K_D -Wert der [³H]Uracil-Bindung an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen von $5,0 \pm 0,9$ nM ($n=4$) und ein B_{max} -Wert von $24,3 \pm 1,5$ pmol/mg ($n=4$) bestimmt wurde (Kap. 2.4.1), könnte man theoretisch eine Radioligandkonzentration von 0,5–50 nM einsetzen. In **Abb. 2.9** sind sie Counts für die spezifische und die unspezifische [³H]Uracil-Bindung an eine Kalbs-Striatum-Membranpräparation in Abhängigkeit der eingesetzten Radioligandkonzentration dargestellt.

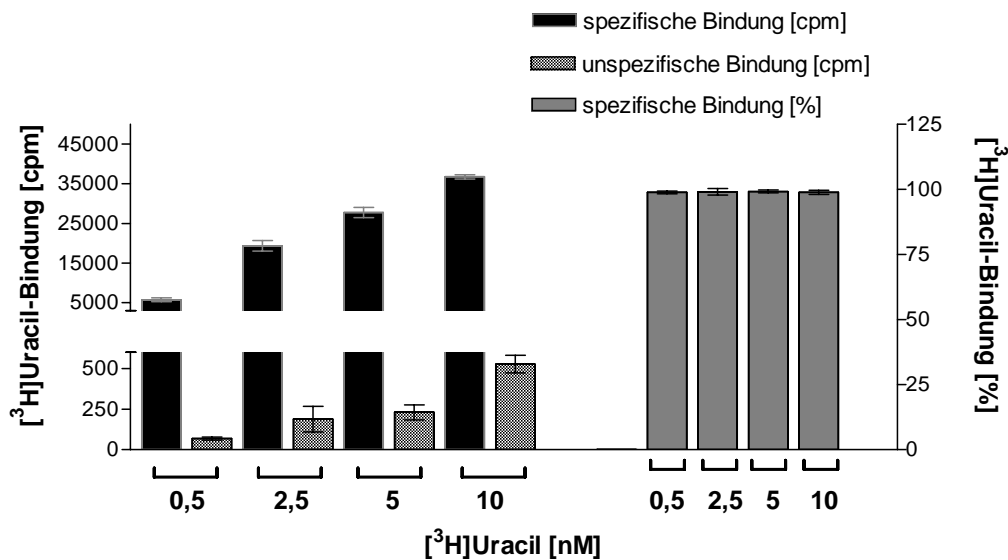


Abb. 2.9: Einfluss der Radioligandkonzentration (0,5–10 nM) auf die spezifische und unspezifische [³H]Uracil-Bindung an eine Kalbs-Striatum-Membranpräparation (50 µg pro Reaktionsansatz) unter Standardbedingungen (Inkubationszeit: 5 h; Inkubationstemperatur: 37°C). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler [$n=3$].

Wie **Abb. 2.9** zeigt, nehmen die cpm-Werte für die spezifische Bindung bei steigender Radioligandkonzentration nahezu linear zu, wobei die prozentuale spezifische Bindung mit ca. 99 % konstant bleibt. Mit einer spezifischen Bindung von 5000 cpm erscheint schon eine niedrige Konzentration von 0,5 nM für die Genauigkeit von Radioligand-Bindungsstudien als ausreichend, allerdings ist in diesem Fall die sehr langsame Kinetik der [³H]Uracil-Bindung der limitierende Faktor. Wie in Kap. 2.3.5 erläutert wird, stellt sich das Gleichgewicht unter Verwendung einer Radioligandkonzentration von 5 nM erst nach ca. 4 Stunden bei 37°C ein. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist in der Regel mit abnehmender Radioligandkonzentration langsamer, sodass die Inkubationszeit sich bei Einsatz einer niedrigeren Konzentration noch mehr verlängern würde. Eine zu lange Inkubationszeit ist nicht nur aus Praktikabilitätsgründen von Nachteil, sondern ist auch bezüglich der Stabilität der Bindungsstellen – insbesondere im Hinblick auf die Inkubationstemperatur von 37°C – nicht empfehlenswert. Somit hat sich eine **Radioligand-Konzentration von 5 nM** für ein Standardassay als optimal erwiesen.

2.3.5 Kinetik der [³H]Uracil-Bindung

Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion zwischen der Bindungsstelle und dem Liganden zu studieren, wurde die Kinetik der [³H]Uracil-Bindung an Kalbshirn-Striatum-Membranen untersucht. In **Abb. 2.10** ist die Assoziationskurve und in **Abb. 2.11** die Dissoziationskurve dargestellt.

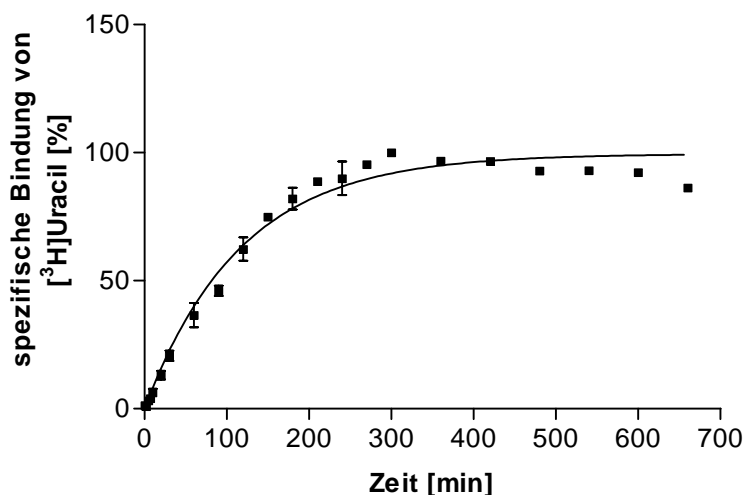


Abb. 2.10: Assoziation der [³H]Uracil-Bindung an Kalbs-Striatum-Membranpräparationen bei 37°C mit einer Radioligandkonzentration von 5 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

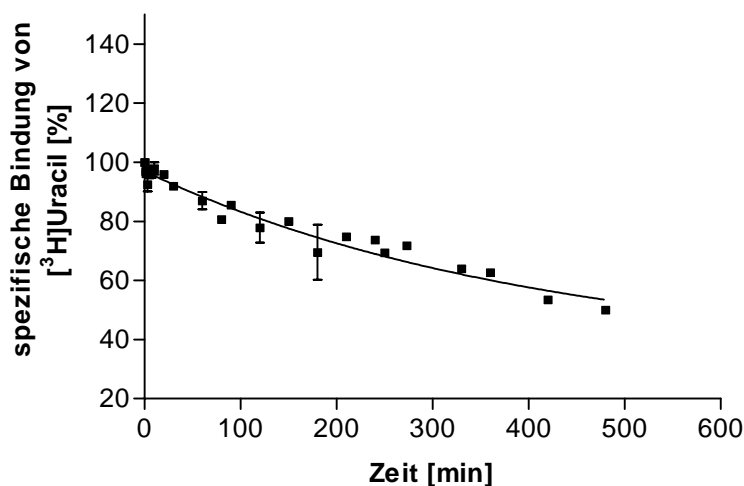


Abb. 2.11: Dissoziation der [³H]Uracil-Bindung an Kalbs-Striatum-Membranpräparationen bei 37°C mit einer Radioligandkonzentration von 5 nM. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Bindungsgleichgewicht erst nach rund 240 Minuten erreicht ist und dass die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes im Gleichgewicht von

Minute 240 bis 540 stabil bleibt. Erst danach nimmt die Bindung in geringem Maße ab. Aus den Assoziations- und Dissoziationskurven kann eine scheinbare Assoziationskonstante K_{ob} von $0,008555 \text{ min}^{-1}$ sowie eine Dissoziationskonstante K_{off} von $0,002441 \text{ min}^{-1}$ ermittelt werden. Aus der Beziehung $K_{ob} = K_{on} \cdot c(L^*) + K_{off}$ läßt sich die Assoziationskonstante K_{on} zu $1,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ berechnen. Zusätzlich kann mit diesen Daten der K_D -Wert der Bindungsstelle bestimmt werden, da für eine einfache Bindungsreaktion die Beziehung $K_D = K_{off} / K_{on}$ gilt. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (kinetischer K_D -Wert) errechnet sich so zu $2,0 \text{ nM}$. Dieser Wert unterscheidet sich von dem Ergebnis der Kompetitions- und Sättigungsexperimente ($K_D = 5,0 \text{ nM}$) um den Faktor 2,5. Diese Diskrepanz kann damit begründet werden, dass die Dissoziation in dem untersuchten Zeitraum (8 Stunden) kein Plateau erreicht und damit keinen verlässlichen – für die Berechnung notwendigen – k_{off} -Wert liefert.

Es handelt sich hierbei um eine sehr langsame Kinetik. Die Dissoziationskurve von [³H]Uracil fällt nach der Zugabe des Kaltliganden Uracil innerhalb von acht Stunden von hundert auf nur fünfzig Prozent ab. Die Bindung an die [³H]Uracil-Bindungsstellen scheint reversibel zu sein, die Dissoziation verläuft allerdings sehr langsam. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass nach der Bindung des Liganden eine Konformationsänderung des bindenden Proteins stattfindet, sodass der Ligand nicht mehr so leicht abdissoziieren kann.

► Zusammenfassend ist festzuhalten, dass für spätere Gleichgewichtsexperimente (z.B. Konkurrenzexperimente) eine Inkubationszeit von **5 Stunden** (bei 37°C) gewählt werden kann, um eine vollständige Gleichgewichtseinstellung zu erreichen und eine maximal hohe Gesamtbindung zu erzielen. Da aus den Kinetikexperimenten kein verlässlicher K_D -Wert ermittelt werden kann, werden dazu Sättigungsexperimente (Kap. 2.4) herangezogen.

2.3.6 Zusammenfassung der Versuchsoptimierung

Die durchgeführten Experimente zur Optimierung des Versuchsaufbaus von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien zur Charakterisierung der [³H]Uracil-Bindung führten zu folgenden Parametern:

- Radioligand: [³H]Uracil, 5 nM
- Protein: Kalbs-Striatum-Membranpräparation, 50 µg/Röhrchen
- Inkubationspuffer: 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
- Substanz für die Bestimmung der unspezifische Bindung: Uracil, 100 µM
- Lösungsmittel: DMSO, 1 % Endkonzentration im Assay
- Inkubationstemperatur: 37°C (im Wasserbad)
- Inkubationsdauer: 5 Stunden
- Filtration über GF/B-Glasfaserfilter (Befeuchtung der Filter mit Tris-Puffer vor dem Absaugen)

- **Pipettierschema:** 10 µL DMSO oder Uracil 100 µM in DMSO
oder Testsubstanz in DMSO
+ 790 µL Inkubationspuffer
+ 100 µL Radioligand-Lösung
+ 100 µL Protein

1000 µL Gesamtvolumen

2.4 Sättigungsexperimente

Zur weiteren Charakterisierung der zuvor identifizierten Bindungsstelle für [³H]Uracil wurden Sättigungsexperimente durchgeführt. Hierbei wurde die Affinität von [³H]Uracil für die Bindungsstellen sowie die Anzahl aller vorhandenen Bindungsstellen (B_{\max}) in verschiedenen Hirn-Geweben unterschiedlicher Spezies (*Mensch, Ratte, Kalb*) bestimmt. Zur Auswertung der Sättigungsexperimente wurden die K_D - und die B_{\max} -Werte für jedes der Experimente (in der Regel $n=3$) aus der nichtlinearen Regression der Sättigungskurven ermittelt und anschließend wurde der Mittelwert aus den Einzel-Experimenten berechnet. Die Rosenthal-Analyse, bei der die spezifische Bindung (Abszisse) gegen die spezifische Bindung geteilt durch die freie Radioligandkonzentration (Ordinate) aufgetragen wird, diente nur der Visualisierung der Daten. Es ist zwar auch möglich, den K_D - und den B_{\max} -Wert aus dem Rosenthal-Plot zu ermitteln, wobei der Absolutwert des Kehrwertes der Steigung der transformierten Regressionsgeraden den K_D -Wert und der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abzisse den Wert für B_{\max} angibt, allerdings werden bei der linearen Auftragung die Standardfehler so „verzerrt“, dass die aus den Geraden zu ermittelnden Werte oft nicht den tatsächlichen Werten entsprechen. Aus diesem Grunde eignet sich die graphische Darstellung des Rosenthal-Plots nur bedingt für die Datenanalyse. Früher, bevor es gute „Curve fitting“-Programme gab, hat man durchaus K_D und B_{\max} über Linearisierungsverfahren (z.B. Rosenthal-Plot) ermittelt. Heutzutage dienen sie zum einen zur Visualisierung und zum anderen geben sie einen Hinweis darauf, ob es sich um eine Bindung an einer einzigen Bindungsstelle oder an mehreren Bindungsstellen handelt. Eine Gerade weist auf eine einzige Bindungsstelle hin, während eine Kurve auf das Vorliegen mehrerer Bindungsstellen hindeutet^{230,231}.

2.4.1 K_D-Wert am Kalbshirn-Striatum

In den Sättigungsbindungsstudien an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen, in denen [³H]Uracil in verschiedenen Konzentrationen von 0,016-75 nM eingesetzt wurde, ergab sich im Sättigungsgleichgewicht für vier Experimente eine Dissoziationskonstante (K_D) von $5,00 \pm 0,88$ nM und eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 55378 ± 4212 cpm. Unter Einbeziehung der spezifischen Aktivität des Radioliganden von 38 Ci/mmol, der eingesetzten Proteinmenge von 0,05 mg und der Zähleffizienz des Flüssigkeits-Szintillations-Counters wurde aus dem experimentell bestimmten B_{max}-Wert von 55378 ± 4212 cpm die Anzahl der Bindungsstellen zu $24,3 \pm 1,5$ pmol/mg Protein berechnet. In **Abb. 2.12** sind die Sättigungskurven dargestellt.

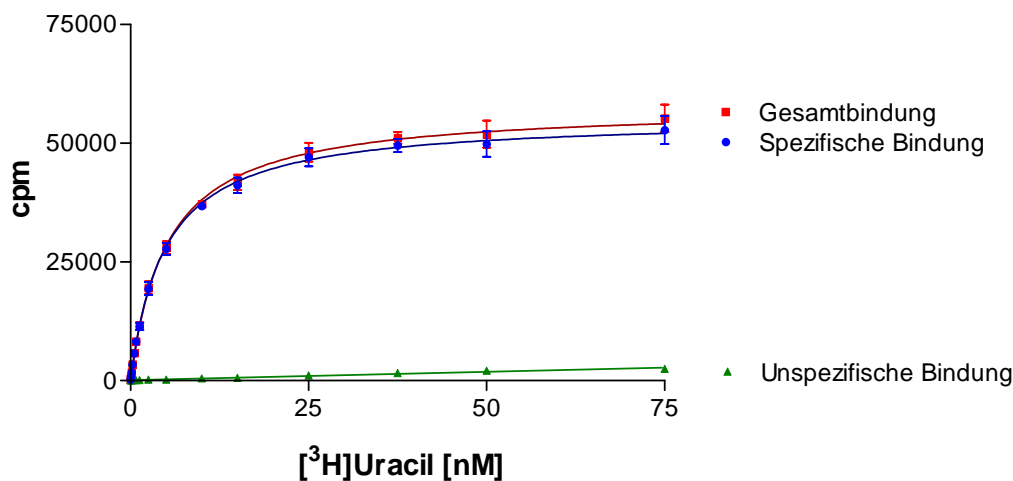


Abb. 2.12: Sättigungsexperiment von [³H]Uracil an *Kalbs-Striatum*. Die Datenpunkte von vier unabhängigen Experimenten, die in Triplets durchgeführt wurden, sind mit Standardfehler dargestellt. Als Ergebnis wurde ein K_D-Wert von $5,00 \pm 0,88$ nM und ein B_{max}-Wert von $24,3 \pm 1,5$ pmol/mg Protein ermittelt.

[³H]Uracil zeigte eine hohe – im niedrigen nanomolaren Bereich liegende – Affinität für die identifizierten Bindungsstellen im Kalbshirn-Striatum. Weiterhin wurde mit 24,3 pM ein sehr hoher B_{max}-Wert ermittelt, woraus hervorgeht, dass in der untersuchten Membranpräparation eine erstaunlich hohe Anzahl an Bindungsstellen vorhanden ist. Durch die hohe Affinität, die hohe Dichte an Bindungsstellen und die sehr niedrige unspezifische Bindung von unter 2 % der Gesamtbinding zeigt [³H]Uracil sehr gute Bindungseigenschaften.

Die graphische Darstellung des entsprechenden Rosenthal-Plots ergibt, wie in **Abb. 2.13** gezeigt, eine Gerade, was auf eine einzige Bindungsstelle (mit nicht-kooperativer Bindung) für [³H]Uracil an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen hinweist.

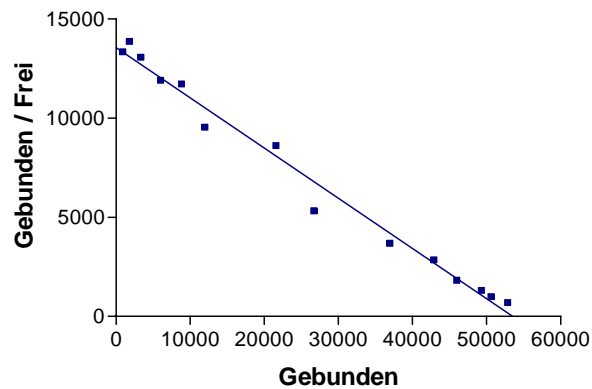


Abb. 2.13: Darstellung des **Sättigungsexperimentes von [³H]Uracil an einer Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation nach Rosenthal**. Gebunden/Frei ist der Quotient aus der spezifische Bindung und der freien Radioligandkonzentration.

2.4.2 K_D-Wert am Rattenhirn-Striatum

In den Sättigungsbindungsstudien an Ratten-Striatum-Membranpräparationen, in denen [³H]Uracil in verschiedenen Konzentrationen von 0,016-75 nM eingesetzt wurde, zeigen die Kurven einen biphasigen Verlauf. Die Kurven-Anpassung für zwei Bindungsstellen war statistisch signifikant besser als für eine einzige Bindungsstelle ($p = 0,0239$, ungepaarter t-Test). Im Sättigungsgleichgewicht für zwei Experimente konnte eine Dissoziationskonstante 1 (K_{D1}) von $0,61 \pm 0,08 \text{ nM}$ und eine Dissoziationskonstante 2 (K_{D2}) von $48,6 \pm 10,7 \text{ nM}$ ermittelt werden. Weiterhin ergab sich eine maximale Bindungskapazität 1 ($B_{\max 1}$) von $5600 \pm 910 \text{ cpm}$ und ein $B_{\max 2}$ -Wert von 50500 ± 15900 . Unter Einbeziehung der spezifischen Aktivität des Radioliganden von 38 Ci/mmol, der eingesetzten Proteinmenge von 0,05 mg und der Zähleffizienz des Flüssigkeits-Szintillations-Counters wurde aus den experimentell bestimmten B_{\max} -Werten die Anzahl der Bindungsstellen zu $2,43 \pm 0,41 \text{ pmol/mg}$ Protein ($B_{\max 1}$) bzw. zu $21,9 \pm 7,0 \text{ pmol/mg}$ Protein ($B_{\max 2}$) berechnet (Abb. 2.14).

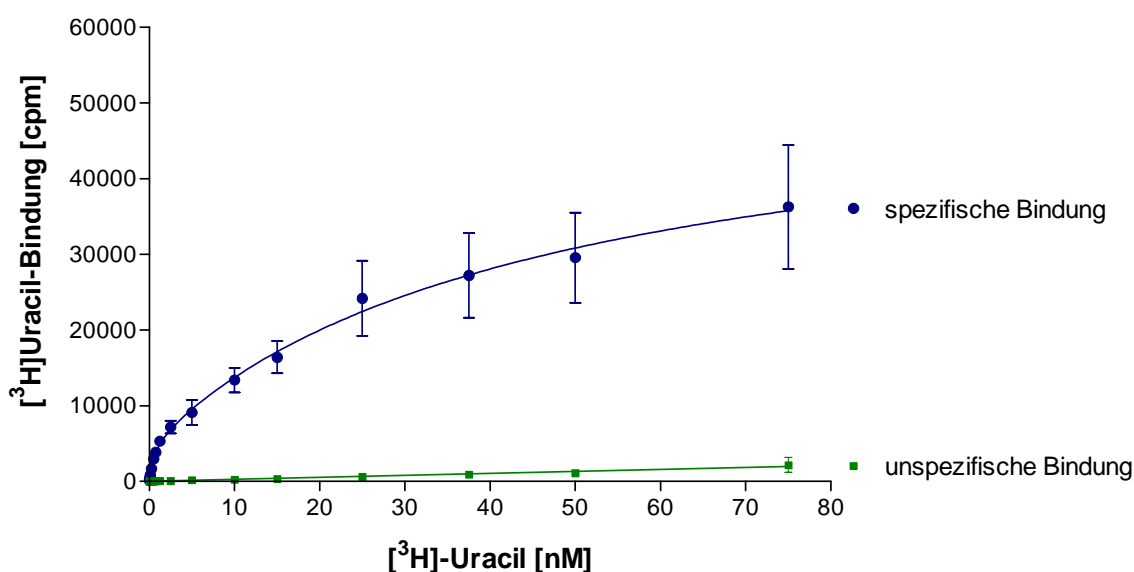


Abb. 2.14: Sättigungsexperiment von [³H]Uracil an *Rattenhirn-Striatum*.

Die Datenpunkte von zwei unabhängigen Experimenten, die in Triplets durchgeführt wurden, werden mit Standardfehler dargestellt. Als Ergebnis wurde ein K_{D1} -Wert von $0,61 \pm 0,08 \text{ nM}$, ein K_{D2} -Wert von $48,6 \pm 10,7 \text{ nM}$, ein $B_{\max 1}$ -Wert von $2,43 \pm 0,41 \text{ pmol/mg}$ Protein und ein $B_{\max 2}$ -Wert von $21,9 \pm 7,0 \text{ pmol/mg}$ Protein ermittelt.

Die graphische Darstellung des entsprechenden Rosenthal-Plots ergibt, wie **Abb. 2.15** zeigt, zwei Geraden. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei um mehr als eine einzige Bindungsstelle für [³H]Uracil an Rattenhirn-Striatum-Membranpräparationen handelt.

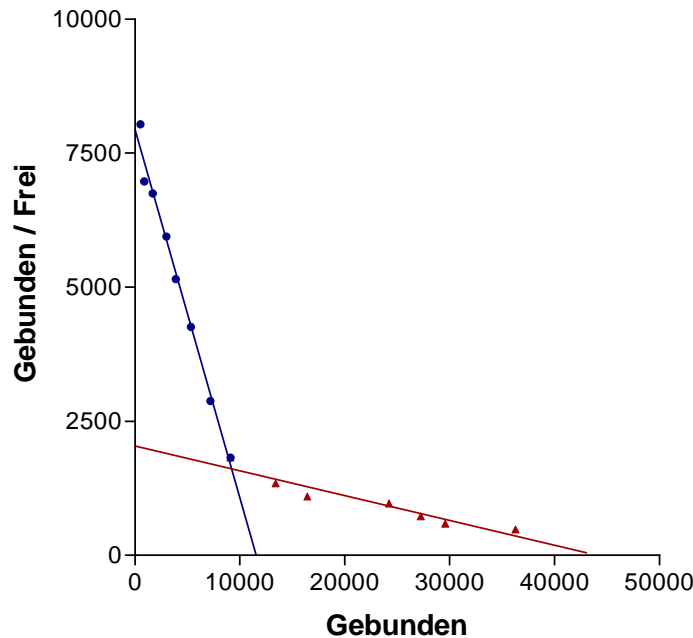


Abb. 2.15: Darstellung des **Sättigungsexperimentes von [³H]Uracil an einer Rattenhirn-Striatum-Membranpräparation nach Rosenthal**. Gebunden/Frei ist der Quotient aus der spezifische Bindung und der freien Radioligandkonzentration.

Im Gegensatz zu Kalbs-Striatum-Membranpräparationen zeigen Sättigungsexperimente an Ratten-Striatum-Membranpräparationen, dass [³H]Uracil vermutlich an zwei verschiedene Bindungsstellen mit einem K_D1 -Wert von $0,61 \pm 0,08$ nM und einem K_D2 -Wert von $48,6 \pm 10,7$ nM bindet. Die erste Bindungsstelle, an die [³H]Uracil mit hoher Affinität bindet, hat einen vergleichsweise niedrigen B_{max} -Wert ($2,43 \pm 0,41$ pmol/mg Protein), wohingegen die zweite, niedrigaffine Bindungsstelle einen *9fach* größeren B_{max} -Wert von $21,9 \pm 7,0$ pmol/mg Protein aufweist.

Weiterhin fällt auf, dass zwischen den beiden durchgeführten Versuchen relativ hohe Abweichungen zu verzeichnen sind, obwohl die Triplets innerhalb eines Versuches recht nah beieinander liegende Werte liefern. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass zwei unterschiedliche Ratten-Striatum-Membranpräparationen verwendet wurden. Die maximale Anzahl der Bindungsstellen scheint in verschiedenen Membranpräparationen zu variieren.

2.4.3 K_D-Werte am Humanhirn

In Sättigungsexperimenten wurden die B_{max}-Werte und K_D-Werte von [³H]Uracil an Humanhirn bestimmt. Hierzu wurden Membranen aus unterschiedlichen Hirnarealen – isoliert und präpariert aus humanem Post-mortem-Gehirn – verwendet. Untersucht wurden Nucleus caudate und Putamen-Gewebe, Cortex-Gewebe sowie Thalamus-Gewebe.

2.4.3.1 Humanes Hirncortex-Gewebe

Das humane Hirncortex-Gewebe stammt von einem 79 Jahre alten Mann, der an Herz-Kreislauf-Versagen gestorben war. In den Sättigungsbindungsstudien an Humanhirn-Cortex-Membranpräparation, in denen [³H]Uracil in verschiedenen Konzentrationen von 0,016-75 nM verwendet wurde, ergab sich im Sättigungsgleichgewicht für drei Experimente eine Dissoziationskonstante (K_D) von $4,49 \pm 1,07$ nM und eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 35160 ± 1997 cpm. Unter Einbeziehung der spezifischen Aktivität des Radioliganden von 38 Ci/mmol, der eingesetzten Proteinmenge von 0,05 mg und der Zähleffizienz des Flüssigkeits-Szintillations-Counters wurde aus dem experimentell bestimmten B_{max}-Wert von 35160 ± 1997 cpm die Anzahl der Bindungsstellen zu $21,8 \pm 1,2$ pmol/mg Protein berechnet. Die erhaltenen Bindungskurven sind in **Abb. 2.16** dargestellt.

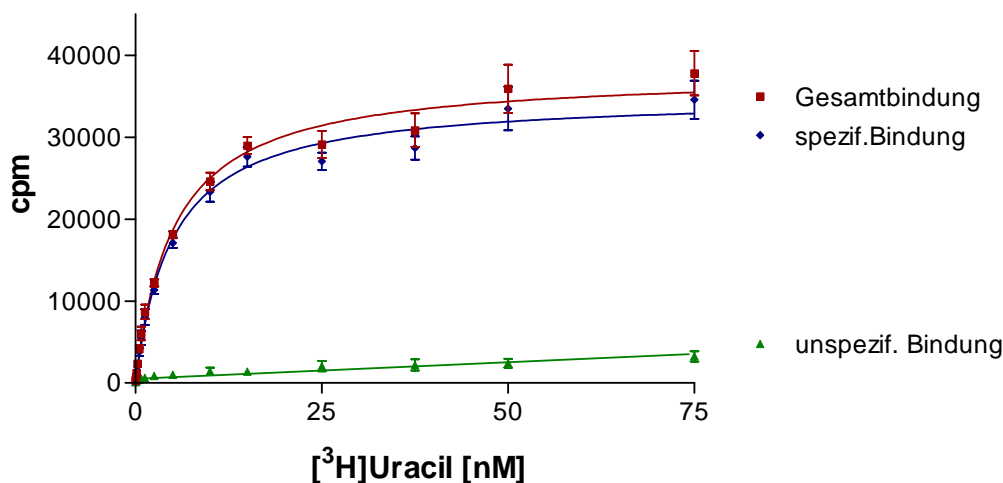


Abb. 2.16: Sättigungsexperiment von [³H]Uracil an *humanem Hirncortex-Gewebe*. Die Datenpunkte von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplets durchgeführt wurden, werden mit Standardfehler dargestellt. Als Ergebnis wurde ein K_D-Wert von $4,49 \pm 1,07$ nM und ein B_{max}-Wert von $21,8 \pm 1,2$ pmol/mg pmol/mg Protein ermittelt.

Der ermittelte K_D-Wert für humanes Cortex-Gewebe stimmt mit 4,5 nM sehr gut mit dem zuvor für Kalbs-Striatum ermittelten K_D-Wert von 5,0 nM überein. Der B_{max}-Wert ist ein

wenig niedriger als der für Kalbshirn-Striatum bestimmte Wert, aber mit 21,8 pmol/mg in einem ähnlich hohen Bereich. Die unspezifische Bindung ist mit 5 % im Vergleich zum Kalbs-Striatum höher. **Abb. 2.17** zeigt die entsprechende Darstellung des Sättigungsexperimentes nach Rosenthal, welche eine Gerade ergibt.

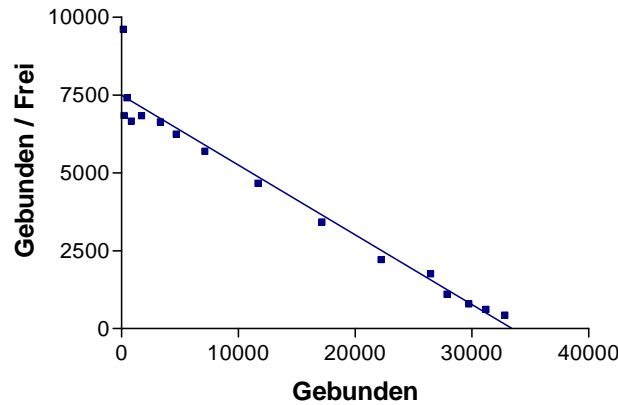


Abb. 2.17: Darstellung des **Sättigungsexperimentes von [³H]Uracil mit *humanem Hirncortex-Gewebe nach Rosenthal***. Gebunden/Frei ist der Quotient aus der spezifische Bindung und der freien Radioligandkonzentration.

2.4.3.2 Humanes Nucleus caudate- und Putamen-Gewebe

Das humane Nucleus caudate- und Putamen-Gewebe stammt von einem 79 Jahre alten Mann, der an Herzinfarkt gestorben war. In den Sättigungsbindungsstudien an humanem Nucleus caudate- und Putamen-Membranenpräparationen, in denen [³H]Uracil in verschiedenen Konzentrationen von 0,016-50 nM verwendet wurde, ergab sich im Sättigungsgleichgewicht für drei Experimente eine Dissoziationskonstante (K_D) von $5,07 \pm 0,37$ nM und eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 32689 ± 2502 cpm. Unter Einbeziehung der spezifischen Aktivität des Radioliganden von 38 Ci/mmol, der eingesetzten Proteinmenge von 0,05 mg und der Zähleffizienz des Flüssigkeits-Szintillations-Counters wurde aus dem experimentell bestimmten B_{max} -Wert von 32689 ± 2502 cpm die Anzahl der Bindungsstellen zu $21,7 \pm 1,7$ pmol/mg Protein berechnet. In **Abb. 2.18** sind die Ergebnisse der Sättigungsexperimente dargestellt.

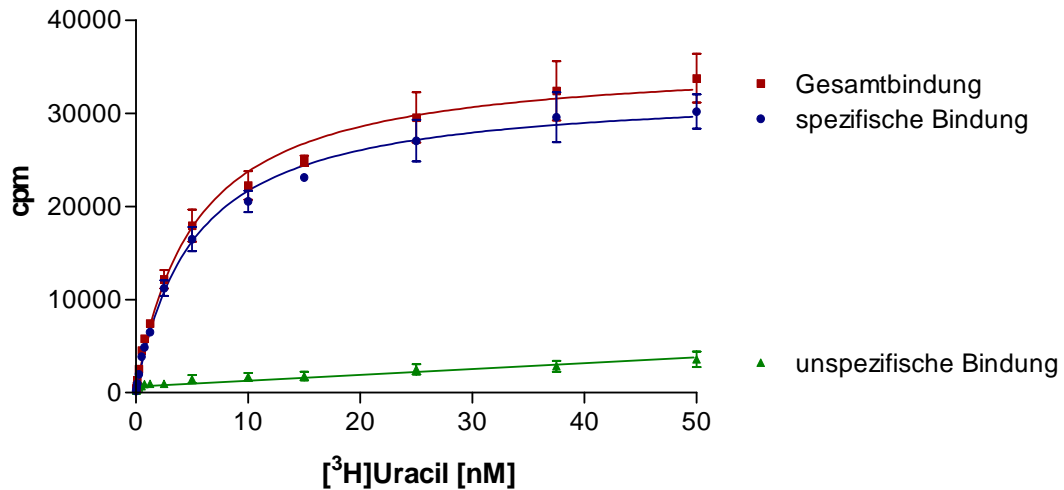


Abb. 2.18: Sättigungsexperiment von [³H]Uracil an humanem *Nucleus caudate- und Putamen-Gewebe*. Die Datenpunkte von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplets durchgeführt wurden, werden mit Standardfehler dargestellt. Als Ergebnis wurde ein K_D -Wert von $5,07 \pm 0,37$ nM und ein B_{max} -Wert von $21,7 \pm 1,7$ pmol/mg Protein ermittelt.

Die Darstellung des Sättigungsexperimentes nach Rosenthal ergab eine Gerade, welche auf eine einzige Bindungsstelle mit nicht-kooperativer Bindung hindeutet (**Abb. 2.19**).

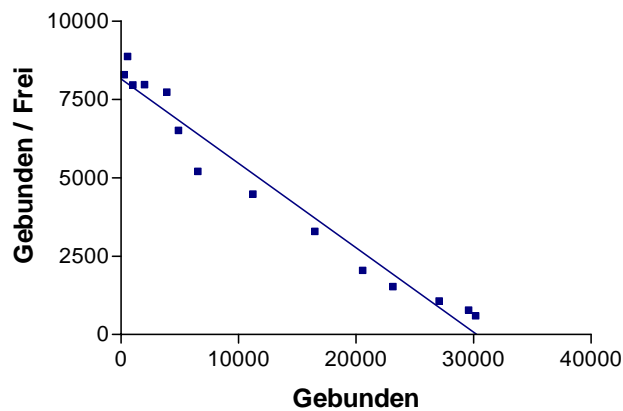


Abb. 2.19: Darstellung des Sättigungsexperimentes von [³H]Uracil mit *humanem Nucleus caudate- und Putamen-Gewebe* nach Rosenthal. Gebunden/Frei ist der Quotient aus der spezifische Bindung und der freien Radioligandkonzentration.

2.4.3.3 Humanes Thalamus-Gewebe

Das humane Thalamus-Gewebe stammt von einem 72 Jahre alten Mann, der an Nierenversagen gestorben war. In den Sättigungsbindungsstudien an Humanhirn-Thalamus-Membranenpräparationen, in denen [³H]Uracil in verschiedenen Konzentrationen von 0,016-50 nM verwendet wurde (**Abb. 2.20**), ergab sich im Sättigungsgleichgewicht für drei Experimente eine Dissoziationskonstante (K_D) von $2,19 \pm 0,24$ nM und eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 25998 ± 340 cpm. Unter Einbeziehung der spezifischen Aktivität des Radioliganden von 38 Ci/mmol, der eingesetzten Proteinmenge von 0,05 mg und der Zähleffizienz des Flüssigkeits-Szintillations-Counters wurde aus dem experimentell bestimmten B_{max} -Wert von 25998 ± 340 cpm die Anzahl der Bindungsstellen zu $17,0 \pm 0,3$ pmol/mg Protein berechnet.

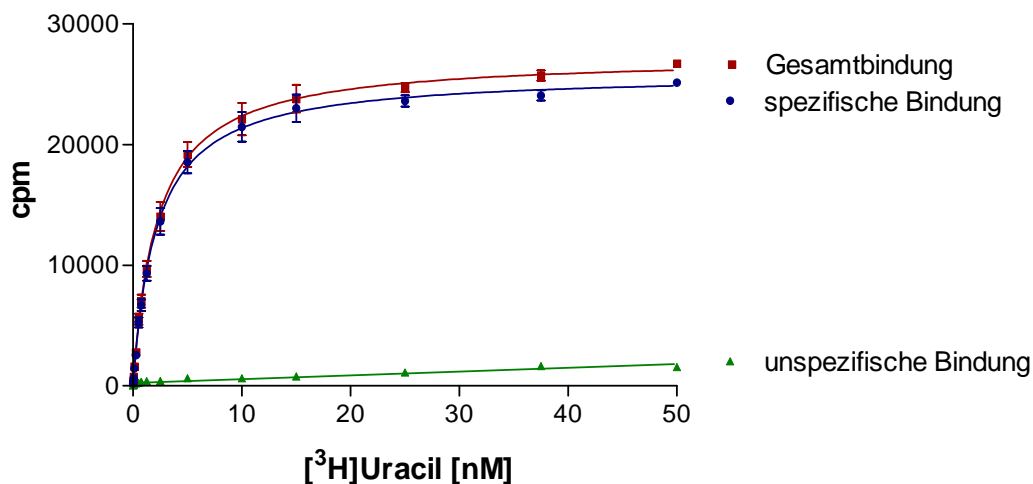


Abb. 2.20: Sättigungsexperiment von [³H]Uracil an *humanem Thalamus-Gewebe*. Die Datenpunkte von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplets durchgeführt wurden, werden mit Standardfehler dargestellt. Als Ergebnis wurde ein K_D -Wert von $2,19 \pm 0,24$ nM und ein B_{max} -Wert von $17,0 \pm 0,3$ pmol/mg Protein ermittelt.

[³H]Uracil hat für die Bindungsstellen in humanem Thalamus eine höhere Affinität als für die anderen untersuchten Gewebe. Der K_D -Wert an humanem Thalamus-Gewebe ist mit 2,2 nM statistisch signifikant niedriger als der ermittelte Wert für Kalbshirn-Striatum ($p = 0,0385$) sowie für Humanhirn-Striatum ($p = 0,029$). Gleichzeitig zeigt sich eine im Vergleich niedrigere Anzahl an Bindungsstellen im untersuchten Gewebe.

Bei der graphischen Darstellung der Sättigungsexperimente an Humanhirn-Thalamus-Membranenpräparationen nach Rosenthal ergibt sich, wie **Abb. 2.21** zeigt, eine Gerade, welche – wie auch bei den anderen untersuchten Hirngeweben – auf das Vorliegen einer einzigen Bindungsstelle mit nicht-kooperativer Bindung hindeutet.

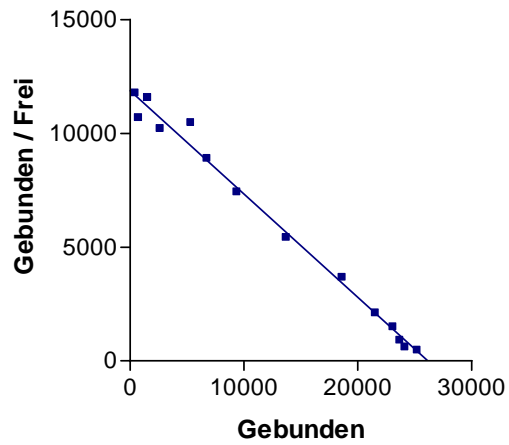


Abb. 2.21: Darstellung des **Sättigungsexperiment** mit *humanem Thalamus-Gewebe* nach **Rosenthal**. Gebunden/Frei ist der Quotient aus der spezifische Bindung und der freien Radioligandkonzentration.

2.4.4 K_D -Wert an NG108-15-Zellen

Neben den Sättigungsexperimenten an Human- und Ratten-Gewebe-Membranpräparationen, sollten auch Sättigungsexperimente an Membranpräparationen von NG108-15-Zellen – einer Maus-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Zelllinie – durchgeführt werden. In Vorversuchen konnte im Vorfeld schon gezeigt werden, dass auch die NG108-15-Zellen eine relativ hohe spezifische [³H]Uracil-Bindung zeigen. Es drängte sich die Frage auf, ob es sich bei diesen Bindungsstellen um die gleichen Bindungsstellen handelt wie die zuvor in nativen Geweben bereits identifizierten. Um diesen Sachverhalt durch Konkurrenzexperimente näher untersuchen zu können, war es von großem Interesse, in Sättigungsexperimenten die Dissoziationskonstante K_D zu ermitteln.

In den Sättigungsbindungsstudien an NG108-15-Zellmembranpräparationen, in denen [³H]Uracil in verschiedenen Konzentrationen von 0,016-75 nM verwendet wurde, ergab sich im Sättigungsgleichgewicht für zwei Experimente eine Dissoziationskonstante (K_D) von $5,47 \pm 0,29$ nM und eine maximale Bindungskapazität (B_{max}) von 15910 ± 140 cpm (Abb. 2.22). Unter Einbeziehung der spezifischen Aktivität des Radioliganden von 38 Ci/mmol, der eingesetzten Proteinmenge von 0,05 mg und der Zähleffizienz des Flüssigkeits-Szintillations-Counters wurde aus dem experimentell bestimmten B_{max} -Wert von 15910 ± 140 cpm die Anzahl der Bindungsstellen zu $6,3 \pm 0,05$ pmol/mg Protein berechnet.

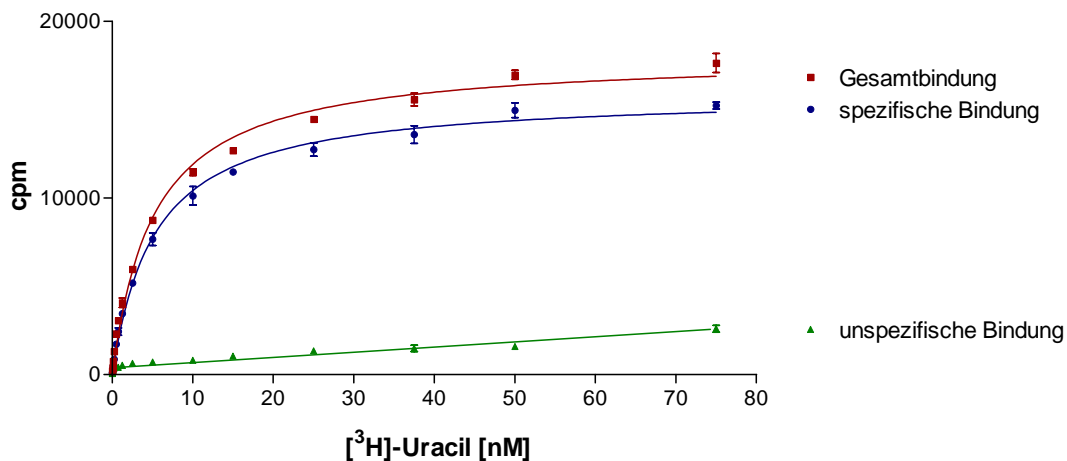


Abb. 2.22: Sättigungsexperiment von [³H]Uracil an NG108-15 Zellen. Die Datenpunkte von zwei unabhängigen Experimenten, die in Triplets durchgeführt wurden, werden mit Standardfehler dargestellt. Als Ergebnis wurde ein K_D -Wert von $5,47 \pm 0,29$ nM und ein B_{max} -Wert von $6,3 \pm 0,05$ pmol/mg Protein ermittelt.

Abb. 2.23 zeigt die entsprechende graphische Darstellung nach Rosenthal, welche eine Gerade ergibt. Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass es sich auch hierbei um eine Bindung an eine einzige Bindungsstelle nicht-kooperativer Bindung (bzw. an mehrere Bindungsstellen mit sehr ähnlicher Affinität) handelt.

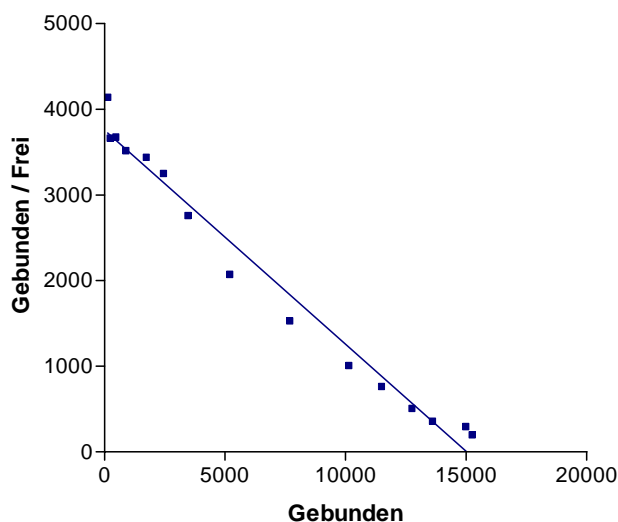


Abb. 2.23: Darstellung des **Sättigungsexperimentes** von [³H]Uracil mit **NG108-15-Zell-Membranpräparation nach Rosenthal**. Gebunden/Frei ist der Quotient aus der spezifische Bindung und der freien Radioligandkonzentration.

Im Vergleich zu Ratten-Striatum-Membranpräparationen zeigen die Sättigungskurven an NG108-15-Zellen-(Maus-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Zelllinie)-Membranpräparationen einen monophasischen Verlauf. Der für die NG-Zellen ermittelte K_D -Wert von 5,47 nM ist statistisch signifikant größer als der für Ratten-Striatum bestimmte K_{D1} -Wert ($K_D = 0,61$ nM) und statistisch signifikant niedriger als der K_{D2} -Wert (48,6 nM). Der B_{max} -Wert liegt mit $6,3 \pm 0,05$ pmol/mg Protein ungefähr zwischen den beiden für Ratten-Striatum-Membranpräparationen ermittelten B_{max} -Werten (2,43 bzw. 21,9 pmol/mg Protein). Es deutet sich an, dass die in Ratten-Striatum-Membranpräparationen identifizierten niedrigaffinen Bindungsstellen nur oder zumindest nur in größerer Anzahl in der Spezies Ratte existieren. Durch den Maus-Neuroblastom-Anteil in den NG-Zellen scheint die Anzahl der niedrigaffinen Bindungsstellen zu niedrig zu sein als dass sie in den Sättigungsexperimenten detektiert werden können. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um diesen Sachverhalt genauer aufzuklären.

Die K_D -Werte der anderen untersuchten Gewebe (Kalbs-Striatum und Humanhirn) stimmen mit dem für die NG108-15-Zellen ermittelten K_D -Wert sehr gut überein. Anders verhält es sich bezüglich des B_{max} -Wertes. Mit $6,3 \pm 0,05$ pmol/mg Protein ist der B_{max} -Wert bei den NG-Zellen signifikant niedriger als beim Kalbs-Striatum und bei den untersuchten Human-Geweben ($p < 0,0059$).

2.4.5 Untersuchung des Effektes von Guanosin-5'-triphosphat auf die [³H]Uracil-Bindung

Nachdem in Sättigungsexperimenten an Kalbshirn- und Humanhirn-Membranpräparationen eine sättigbare [³H]Uracil-Bindung gezeigt werden konnte, sollte in weiteren Studien untersucht werden, ob Guanosin-5'-triphosphat (GTP) einen Einfluss auf die Bindung von [³H]Uracil hat. Hierzu wurden Sättigungsexperimente an Kalbs-Striatum-Membranpräparationen in An- und Abwesenheit von GTP bzw. dem stabilen Analogon 5'-Guanylimidodiphosphat (Gpp(NH)p, **Abb. 2.24**) durchgeführt

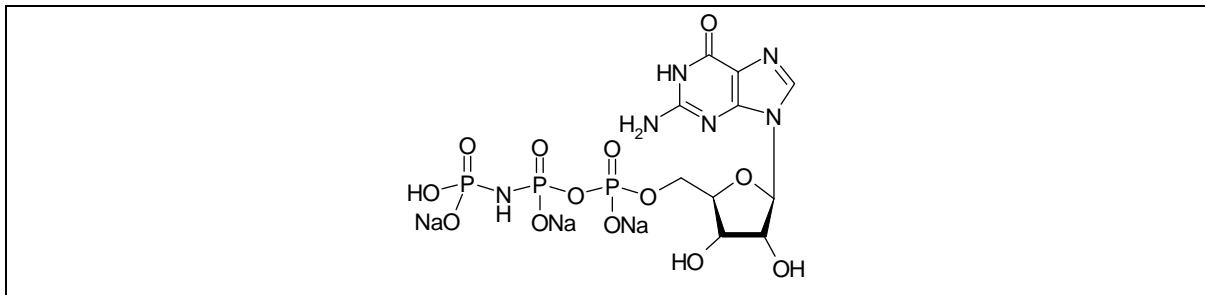


Abb. 2.24: Struktur von 5'-Guanylimidodiphosphat (Gpp(NH)p)

Die für [³H]Uracil an Kalbs-Striatum-Membranen erhaltenen Sättigungskurven in Ab- und Anwesenheit von GTP – aufgenommen in einem Konzentrationsbereich von 0,016-75 nM – sind in **Abb. 2.25** dargestellt.

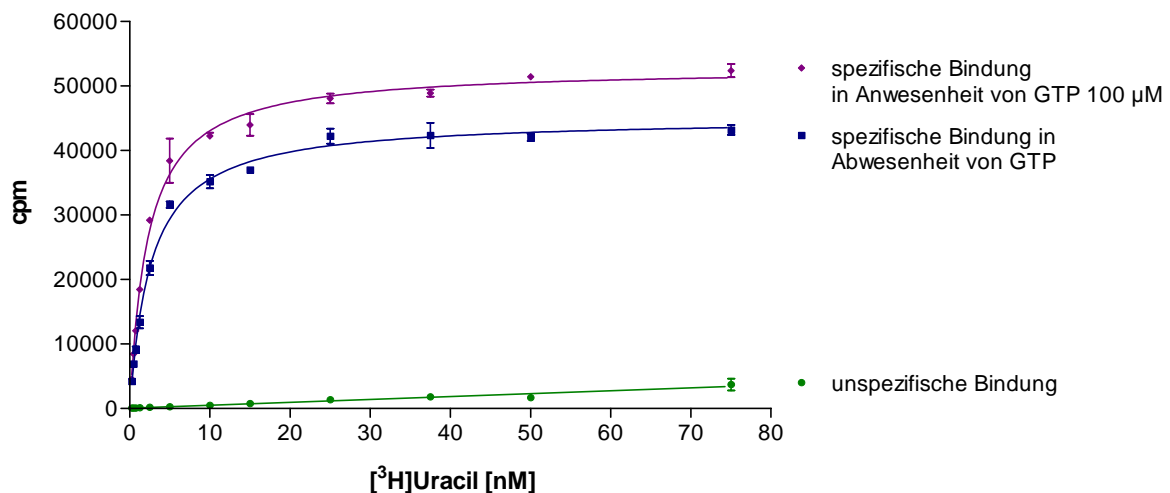


Abb. 2.25: Sättigungskurven von [³H]Uracil an Kalbs-Striatum in Abwesenheit [■] und in Anwesenheit von GTP (100 µM) [◆]. Als Ergebnis wurde in Abwesenheit von GTP ein K_D -Wert von 2,67 nM und ein B_{max} -Wert von 19,6 pmol/mg Protein und in Anwesenheit von GTP (100 µM) ein K_D -Wert von 2,27 nM und ein B_{max} -Wert von 23,0 pmol/mg Protein ermittelt. Dargestellt ist ein Einzelexperiment in Dreifachbestimmung.

In **Abb. 2.26** ist die entsprechende graphische Darstellung nach Rosenthal abgebildet. Die Geraden geben einen Hinweis darauf, dass es sich sowohl in An- als auch in Abwesenheit von GTP um eine Bindung an eine einzige Bindungsstelle handelt.

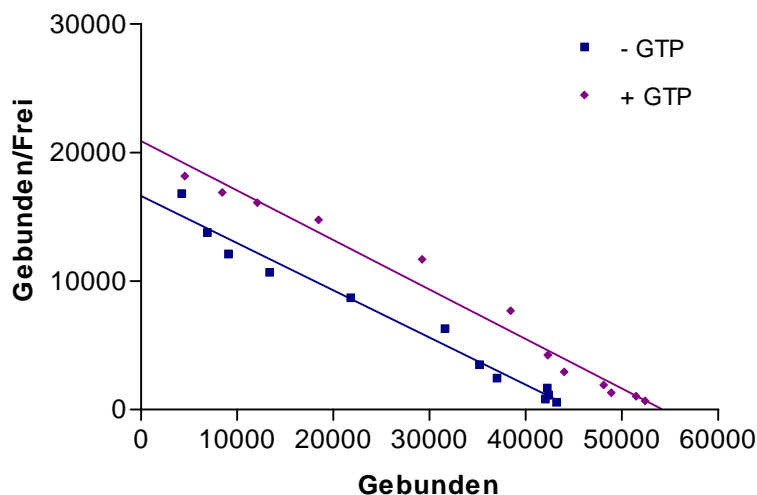


Abb. 2.26: Darstellung der Sättigungsexperimente in Abwesenheit [■] und in Anwesenheit von Gpp(NH)p (100 μM) [◆] nach **Rosenthal**. Gebunden/Frei ist der Quotient aus der spezifische Bindung und der freien Radioligandkonzentration.

Um auszuschließen, dass das GTP während der 5stündigen Inkubationszeit hydrolysiert wird, wurden weitere Sättigungskurven in Ab- und Anwesenheit von 5'-Guanylimidodiphosphat (Gpp(NH)p) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Sättigungsexperimente sind in **Abb. 2.27** dargestellt.

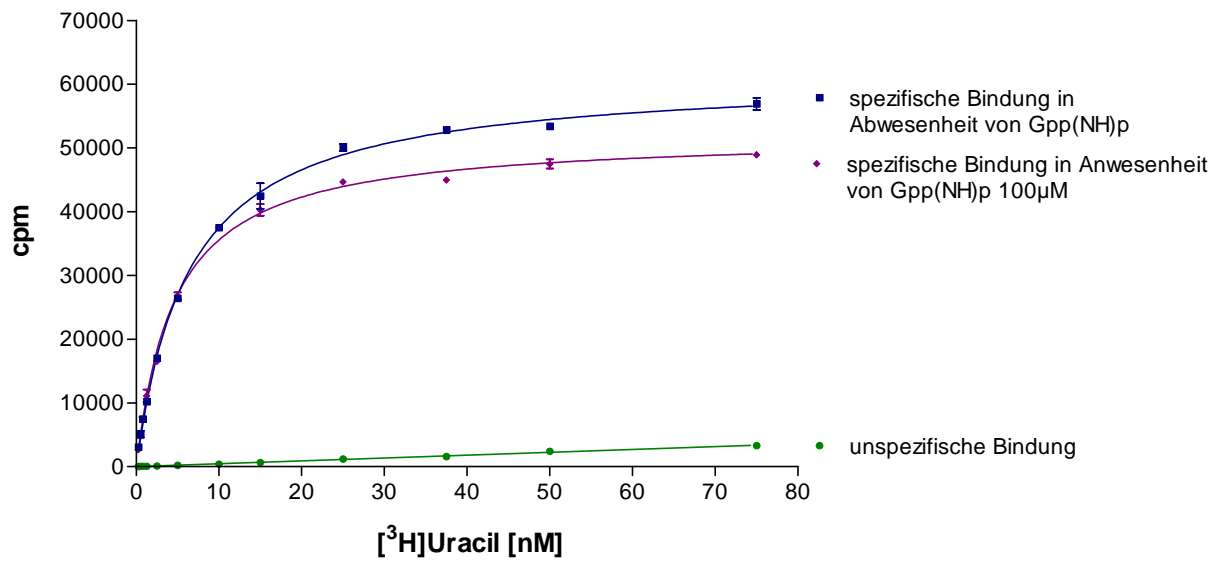


Abb. 2.27: Sättigungskurven von [³H]Uracil an Kalbs-Striatum in Abwesenheit [■] und in Anwesenheit von Gpp(NH)p (100 µM) [◆]. Die Datenpunkte von je zwei unabhängigen Experimenten, die in Triplets durchgeführt wurden, werden mit Standardfehler dargestellt. Als Ergebnis wurde in Abwesenheit von Gpp(NH)p ein K_D -Wert von $6,4 \pm 0,34$ nM und ein B_{max} -Wert von $26,6 \pm 0,4$ pmol/mg Protein und in Anwesenheit von Gpp(NH)p (100 µM) ein K_D -Wert von $4,7 \pm 0,32$ nM und ein B_{max} -Wert von $22,6 \pm 0,3$ pmol/mg Protein ermittelt.

Abb. 2.28 zeigt die graphische Darstellung der Sättigungsexperimente in An- und Abwesenheit von Gpp(NH)p nach Rosenthal.

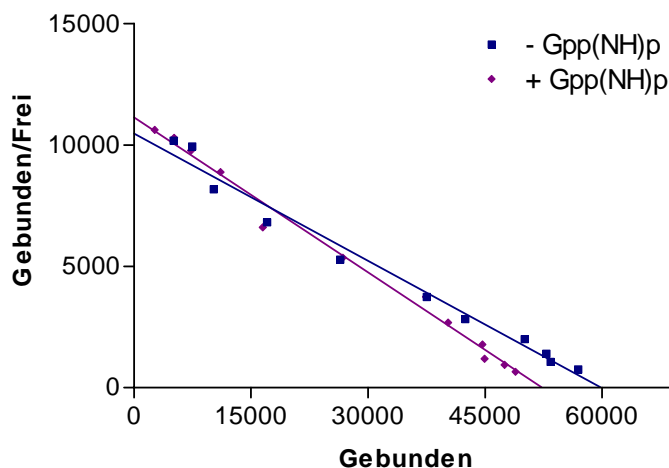


Abb. 2.28: Darstellung der **Sättigungsexperimente in Abwesenheit [■] und in Anwesenheit von Gpp(NH)p (100 µM) [◆] nach Rosenthal**. Gebunden/Frei ist der Quotient aus der spezifische Bindung und der freien Radioligandkonzentration.

Der Rosenthal-Plot ergibt jeweils eine Gerade und deutet darauf hin, dass – wie erwartet – auch in Anwesenheit von Gpp(NH)p der Radioligand an eine einzige Bindungsstelle bindet.

In **Tab. 2.4** sind die Ergebnisse aller Experimente zusammengestellt.

Tab. 2.4: Affinität von [³H]Uracil zu Uracil-Bindungsstellen in Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen in An- und Abwesenheit von GTP bzw. Gpp(NH)p

	K_D [nM] ± SEM	B_{max} [pmol/mg] ± SEM
Kontrolle [n=2]	6,38 ± 0,34	26,6 ± 0,4
Gpp(NH)p (100 μM) [n=2]	4,66 ± 0,32	22,6 ± 0,3
Kontrolle [n=1]	2,67	19,6
GTP (100 μM) [n=1]	2,27	23,0
Kontrolle [n=3]	5,15 ± 1,25	24,3 ± 2,4
GTP (100 μM)/ Gpp(NH)p (100 μM) [n=3]	3,86 ± 0,82	22,7 ± 0,2
p-Wert	p = 0,4389 → kein statistisch signifikanter Unterschied	p = 0,5445 → kein statistisch signifikanter Unterschied

In Anwesenheit von GTP bzw. des stabilen Analogens Gpp(NH)p ist der K_D-Wert zwar im Vergleich zur Kontrolle geringfügig niedriger, der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (**Tab. 2.4**). Auch der B_{max}-Wert wird durch die Anwesenheit des Guanosinnucleotids nicht wesentlich beeinflusst.

► Zusammenfassend ist festzuhalten, dass weder GTP noch Gpp(NH)p einen Effekt auf die Bindung von [³H]Uracil an seinen Bindungspartner in Kalbs-Striatum-Membranen haben.

2.4.5 Zusammenfassung

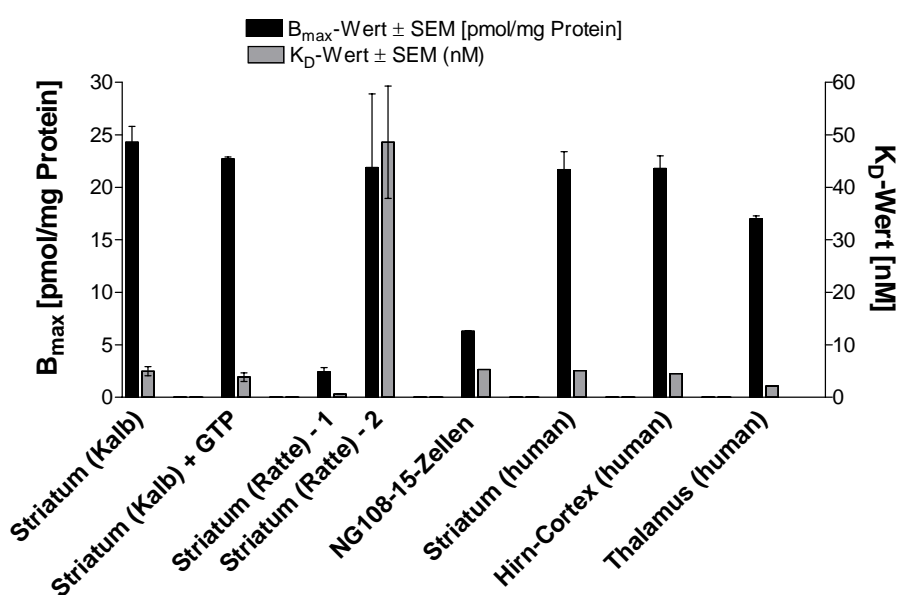
In Kalbs-Striatum-Membranpräparationen wird von dem Radioliganden [³H]Uracil eine einzige hochaffine ($K_D = 5,00$ nM) Bindungsstelle (bzw. mehrere Bindungsstellen mit sehr ähnlicher Affinität) detektiert. Der B_{max} -Wert ist mit 24,3 pmol/mg Protein sehr hoch. Die Sättigungsexperimente an humanen Hirn-Geweben ergeben ähnliche Ergebnisse. Sowohl an Humanhirn-Striatum- als auch -Cortex- und -Thalamus-Membranpräparationen bindet [³H]Uracil mit hoher Affinität mit einem K_D -Wert von 5,07 bzw. 4,49 und 2,19 nM an eine einzige Bindungsstelle. Die B_{max} -Werte liegen im Bereich von 17,0-21,8 pmol/mg Protein und stimmen damit ebenfalls sehr gut mit dem für Kalbs-Striatum ermittelten Wert überein. Im Gegensatz dazu weisen Sättigungsexperimente an Ratten-Striatum-Membranpräparationen zwei verschiedene Bindungsstellen für [³H]Uracil auf. Die K_D -Werte liegen beide im nanomolaren Bereich, wobei der eine mit 0,61 nM niedriger und der zweite mit 48,6 nM größer ist als die für die anderen untersuchten Gewebe ermittelten K_D -Werte. Die Unterschiede sind statistisch signifikant ($p \leq 0,0153$ bzw. $p \leq 0,0124$, ungepaarter t-Test). Neben dem Ratten-Striatum-Gewebe wurden auch NG108-15-Zellen untersucht, bei denen es sich um eine Maus-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybrid-Zelllinie handelt. Die entsprechenden Sättigungskurven zeigen den typischen Verlauf einer monophasischen Bindung. In den NG-Zellen scheint der Radioligand nur eine einzige hochaffine Bindungsstelle ($K_D = 5,47$ nM) zu detektieren. Die Anzahl der Uracil-Bindungsstellen ist in NG-Zellen geringer (6,3 pmol/mg Protein). Die Sättigungsexperimente in An- und Abwesenheit von GTP bzw. Gpp(NH)p ergeben, dass GTP keinen Einfluß auf die [³H]Uracil-Bindung an Kalbs-Striatum-Geweben hat.

In **Tab. 2.5** sind die ermittelten K_D - und B_{max} -Werte zusammengefasst und in **Abb.2.29** vergleichend dargestellt.

Tab. 2.5: Vergleich der K_D -Werte und B_{max} -Werte aus Sättigungsexperimenten mit [³H]Uracil an verschiedenen Membranpräparationen [n=2-4]

Gewebe	$K_D \pm SEM$ [nM] [n=3]	$B_{max} \pm SEM$ [cpm] [n=3]	$B_{max} \pm SEM$ [pmol/mg Protein] [n=3]
Kalbs-Striatum	5,00 ± 0,88[⊛]	55400 ± 4212[⊛]	24,3 ± 1,5[⊛]
Kalbs-Striatum ▪ + GTP 100 μM (bzw. Gpp(NH)p 100 μM)	3,86 ± 0,82	52400 ± 415	22,7 ± 0,2
Ratten-Striatum	$K_D1:$ 0,61 ± 0,08 nM[♦] $K_D2:$ 48,6 ± 10,7 nM[♦]	$B_{max}1:$ 5600 ± 910[♦] $B_{max}2:$ 50500 ± 15900[♦]	$B_{max}1:$ 2,43 ± 0,41[♦] $B_{max}2:$ 21,9 ± 7,0
NG108-15-Zellen	5,47 ± 0,29 nM	15910 ± 140[♦]	6,3 ± 0,05[♦]
Human-Striatum	5,07 ± 0,37	32689 ± 2502	21,7 ± 1,7
Human-Cortex	4,49 ± 1,07	35160 ± 1997	21,8 ± 1,2
Human-Thalamus	2,19 ± 0,24	25998 ± 340	17,0 ± 0,3

[⊛]n = 4; [♦]n = 2;

**Abb. 2.29:** K_D -Werte und B_{max} -Werte aus Sättigungsexperimenten mit [³H]Uracil an verschiedenen Membranpräparationen [n=2-4]

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Uracil-Bindungsstellen in allen untersuchten Hirn-Geweben in sehr hoher Dichte vorhanden sind. Die B_{\max} -Werte reichen von 2,43 (Ratten-Striatum, $B_{\max 1}$ -Wert) bis 24,3 (Kalbshirn-Striatum) pmol/mg Protein. Die K_D -Werte liegen – mit Ausnahme des $K_D 2$ -Wertes für die Ratten-Striatum-Membranpräparation – alle im unteren nanomolaren Bereich und zeigen damit eine hohe Affinität des Radioliganden [³H]Uracil für die untersuchten Gewebe. Die breite und hohe Expression der Uracil-Bindungsstellen sowohl in Hirn-Geweben von Nagetieren (Ratte) als auch in humanen Hirn-Geweben läßt eine wichtige physiologische Rolle dieser Bindungsstellen vermuten.

An dieser Stelle drängt sich die Frage auf, ob auch außerhalb des Gehirns Uracil-Bindungsstellen existieren. Hierzu wurden Experimente mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Kap. 2.7 diskutiert.

2.5 **Kompetitionsexperimente an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen**

Zur weiteren Charakterisierung der Uracil-Bindungsstelle wurden Kompetitionsexperimente mit [³H]Uracil in einer Endkonzentration von 5 nM an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war in erster Linie, die Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzuklären. Hierzu wurde eine Vielzahl von weitgehend monosubstituierten Uracil-Derivaten getestet, um herausfinden zu können, welche Partialstrukturen von Uracil für die Bindung notwendig sind und welche ausgetauscht werden können. Die Uracil-Derivate konnten zum Teil kommerziell erworben werden und zum Teil wurden sie im Arbeitskreis von Frau Prof. C. E. Müller synthetisiert.

Ein weiterer Schwerpunkt lag darin, so weit wie möglich auszuschließen, dass es sich bei der identifizierten Bindungsstelle um eine bereits bekannte Zielstruktur handelt. Hierzu wurde eine Reihe von Substanzen verschiedener Strukturklassen – darunter Verbindungen, die nachweislich hochaffine Liganden an bekannten Rezeptoren sind – auf die Affinität zur Uracil-Bindungsstelle hin untersucht.

Bei allen Kompetitionsexperimenten wurde in der Weise vorgegangen, dass zunächst Screening-Versuche mit allen Testsubstanzen durchgeführt wurden. In diesen Experimenten wurde jeweils die Gesamtbindung, die unspezifische und die spezifische [³H]Uracil-Bindung in Gegenwart von in der Regel 10 µM bzw. 100 µM Testsubstanz sowie in dessen Abwesenheit bestimmt. Auf diese Weise konnten diejenigen Testsubstanzen selektiert werden, welche eine Verdrängung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung bewirkten. Mit diesen Verbindungen wurden anschließend [³H]Uracil-Kompetitionsexperimente unter Einsatz verschiedener Konzentrationen durchgeführt, um Kurven zu erhalten und anhand der K_i-Werte die Affinität der Substanzen zu bestimmen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM von *n* Experimenten in Dreifachbestimmung dargestellt. Der Standardfehler SEM (standard error of the mean) lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$\text{SEM} = \text{SD}/\sqrt{n}$$

wobei *n* die Anzahl der Experimente und SD die Standardabweichung ist.

2.5.1 Homologe Konkurrenzexperimente

Zur Bestätigung des in den Sättigungsexperimenten bestimmten K_D -Wertes sowie zur Ermittlung des Hill-Koeffizienten n_H (Maß für die Kurvensteilheit) wurden sog. 'Homologe Bindungsstudien' durchgeführt. In diesen Konkurrenzexperimenten wurde der K_i -Wert von Uracil am Kalbs-Striatum mit [³H]Uracil als Radioligand bestimmt (Abb. 2.30). Es ergab sich ein K_i -Wert-Wert von **5,06 nM** \pm 0,18, welcher mit dem in den Sättigungsexperimenten ermittelten K_D -Wert von **5,00 nM** \pm 0,88 exakt übereinstimmt. Der Wert des Hill-Koeffizienten (n_H) für eine Hemmung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung lag bei **1,0** \pm 0,04, sodass eine *positive Kooperativität* ($n_H > 1$, d.h. die Bindung eines Moleküls erleichtert die Bindung weiterer Moleküle) und eine *negative Kooperativität* ($n_H < 1$, d.h. die Bindung eines Moleküls erschwert die Bindung weiterer Moleküle) ausgeschlossen werden kann²³².

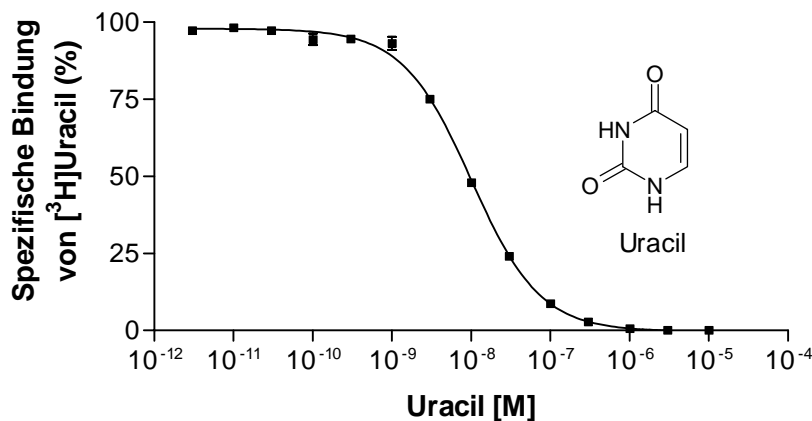


Abb. 2.30: *Homologe Konkurrenz* zwischen dem Radioliganden [³H]Uracil und dem nicht radioaktiven Uracil an Kalbs-Striatum. Als Ergebnis wurde ein K_i -Wert von **5,06 nM** \pm 0,18 ($n=3$) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist der SEM durch das Symbol überdeckt).

Die Daten aus den homologen Konkurrenzexperimenten weisen darauf hin, dass [³H]Uracil mit hoher Affinität ($K_D = 5,0$ nM) an nur eine Klasse von Bindungsstellen bindet (denkbar sind prinzipiell auch zwei (oder mehrere) verschiedene Bindungsstellen mit nur geringem Affinitätsunterschied für Uracil).

2.5.2 Heterologe Konkurrenzexperimente mit Uracil-Derivaten

Zur weiteren Charakterisierung der [³H]Uracil-Bindungsstelle an Kalbshirn-Striatum-Membranen wurde in heterologen Konkurrenzexperimenten (n=3) die Bindung von [³H]Uracil in An- und Abwesenheit von verschiedenen Uracil-Derivaten bestimmt. Bei den untersuchten Uracil-Derivaten wurde die in **Abb. 2.31** dargestellte Zählweise angewendet.

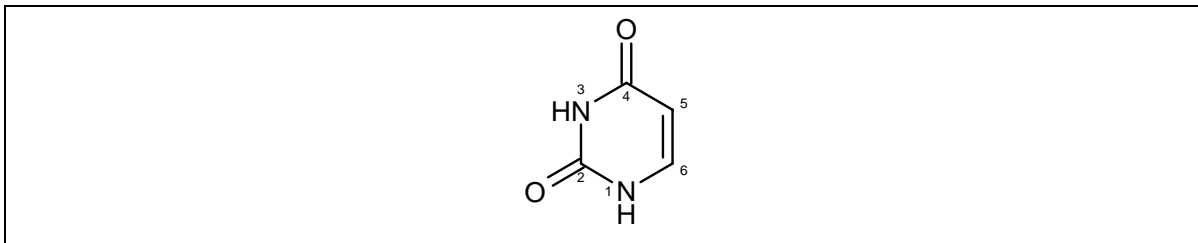


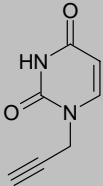
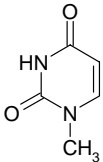
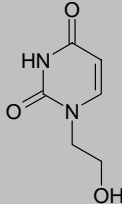
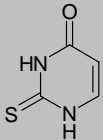
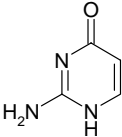
Abb. 2.31: Zählweise von Uracil

Die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente werden im folgenden geordnet nach der Substitutions-Position dargestellt.

2.5.2.1 Uracil-Derivate mit Substitution in Position 1 bzw. 2

Insgesamt wurden fünf an Position 1 oder 2 monosubstituierte Uracil-Derivate untersucht. In **Tab. 2.6** sind die Affinitäten dieser Substanzen aufgelistet.

Tab. 2.6: Affinitäten der an **Position 1 bzw. 2 monosubstituierten Uracil-Derivate** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

Nr.	Verbindung	Struktur	K _i [nM] ± SEM oder Inhibition [%] ± SEM bei 10 μM ^a [n=3]
Substitution an Position 1			
1	1-Propargyluracil		100 nM ± 0,9
2	1-Methyluracil		> 10.000 (23 % ± 2)
3	1-(2-Hydroxyethyl)uracil		≥ 10.000 (53 % ± 2)
Substitution an Position 2			
4	2-Thiouracil		2541 ± 171
5	Isocytosin		> 100.000 (15 % ± 5, 100 μM)

^a falls nichts anderes angegeben ist

Am N1 werden polare Gruppen besser toleriert als unpolare, wobei das Wasserstoffatom bisher am besten toleriert wird. Die Substitution des Wasserstoffatoms am N1 durch eine Methyl-Gruppe (Verbindung **2**) führt zu einer inaktiven Verbindung. Auch die Einführung einer Hydroxethyl-Gruppe (Verbindung **3**) führt zu einem Affinitätsverlust. Interessanterweise ist 1-Propargyluracil (**1**) mit einem K_i -Wert von 100 nM eine relativ affine Substanz. Die Kompetitionskurve ist in **Abb. 2.32** dargestellt. Die Ethin-Gruppe scheint einen positiven Effekt auf die Bindung zu haben. Aufgrund der geringen Anzahl der zu Verfügung stehenden Substanzen mit einer Monosubstitution an Position 1 ist es nicht möglich, eine eindeutige Aussage über die Struktur-Wirkungs-Beziehung zu machen. Es erscheint sinnvoll, weitere Derivate zu untersuchen, um diesen Sachverhalt aufklären zu können. In Position 2 verhält es sich ähnlich. Auch hier ist die Anzahl der getesteten Substanzen sehr limitiert. Das 2-Thiouracil (**4**), bei dem das Sauerstoff-Atom durch ein Schwefel-Atom ersetzt ist, zeigt mit einem K_i -Wert von 2541 nM eine 500fach niedrigere Affinität als Uracil (**Abb. 2.32**). Der Austausch der Oxo-Gruppe durch eine Aminogruppe in Position 2 (**5**) wird nicht toleriert und führt zu einem gänzlichen Affinitätsverlust. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass bei Isocytosin ein anderes Tautomer vorliegt, wobei das Stickstoff an Position nicht protoniert vorliegt. Möglicherweise ist dieses N3-H für die Bindung wichtig, sodass das Fehlen zu einem Affinitätsverlust führt. Interessant für zukünftige Experimente sind Derivate mit Alkoxy-Gruppen in Position 2 sowie polare Substituenten (Halogen-Substitution) in Position 1.

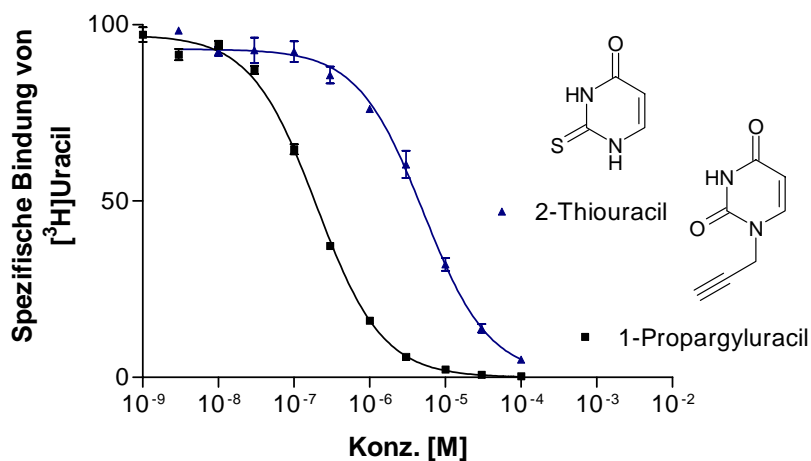
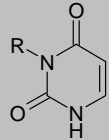

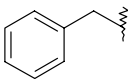
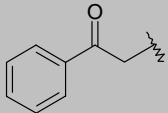
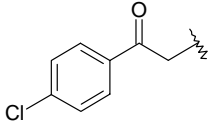
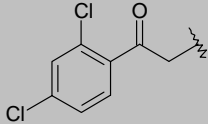
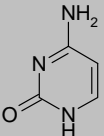


Abb. 2.32: Hemmung der [³H]Uracil-Bindung an Kalbshirn-Striatum-Membranen durch **1-Propargyluracil** und **2-Thiouracil**. Als Ergebnis wurde für 2-Thiouracil ein K_i -Wert von **2541 nM ± 171** (n=3) und für 1-Propargyluracil ein K_i -Wert von **100 nM ± 0,9** (n=3) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist SEM durch das Symbol überdeckt).

2.5.2.2 Uracil-Derivate mit Substitution in Position 3 bzw. 4

Eine Methyl-Substitution an Position 3 (Verbindung **6**) bewirkt bereits einen 200fach höheren K_i -Wert im Vergleich zum unsubstituiertem Uracil. Größere Substituenten wie die Benzyl- und Phenacyl-Gruppe (**7-10**) werden nicht toleriert. Der Austausch der Oxo-Gruppe in Position 4 durch eine Amino-Funktion (Cytosin, **11**) führt zu einem gänzlichen Aktivitätsverlust. Neben der fehlenden, eventuell für die Bindung wichtigen, Oxo-Gruppe, liegt auch bei Cytosin – ähnlich wie bei Isocytosin – ein Tautomer vor, bei dem das Stickstoff an Position 3 nicht protoniert ist. Somit wird die Vermutung, dass eventuell das N3-H für die Bindung notwendig ist, bestätigt. Die Ergebnisse der Testungen der Uracil-Derivate mit Substitution an Position 3 bzw. 4 sind in **Tab. 2.7** zusammengefasst. Die Kompetitonskurve von 3-Methyluracil ist in **Abb. 2.33** dargestellt.

Tab. 2.7: Affinitäten der an **Position 3 bzw. 4 monosubstituierten Uracil-Derivate** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

			
Nr.	Verbindung	R	K_i [nM] \pm SEM oder Inhibition [%] \pm SEM bei 10 μ M [n=3]
6	3-Methyluracil		1068 \pm 72
7	3-Benzyluracil		> 10.000 (36 % \pm 3)
8	3-Phenacyluracil		> 10.000 (12 % \pm 5)
9	3-(4'-Chlor)phenacyluracil		> 10.000 (13 % \pm 1)
10	3-(2',4'-Dichlor)phenacyluracil		> 10.000 (13 % \pm 2)
Substitution an Postion 4			
11	Cytosin		\geq 10.000 (45 % \pm 5)

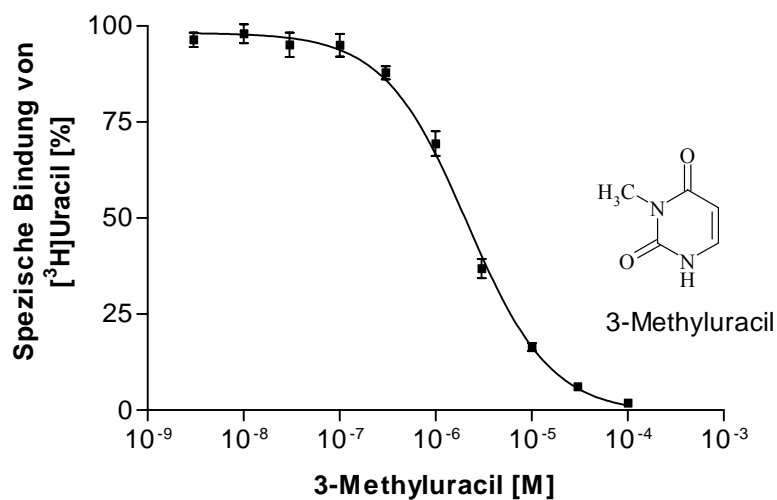


Abb. 2.33: Hemmung der [³H]Uracil-Bindung an Kalbs-Striatum-Membranen durch **3-Methyluracil**. Als Ergebnis wurde ein K_i -Wert von **1068 nM** \pm 72 (n=3) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist SEM durch das Symbol überdeckt).

2.5.2.3 Uracil-Derivate mit Substitution in Position 5

In Position 5 wird nach bisheriger Erkenntnis am meisten toleriert. Das 5-Fluoruracil (**12**) weist einen K_i -Wert von 8,12 nM auf und besitzt nach Uracil die höchste Affinität zu der Uracil-Bindungsstelle. Allgemein nimmt die Affinität mit zunehmender Atomgröße des Substituenten in der Reihenfolge $F > Cl > Br > I$ ab, wobei 5-Ioduracil bereits einen um 70fach höheren K_i -Wert zeigt (**Abb. 2.34**). Die Bindung von 5 nM [³H]Uracil an Kalbs-Striatum wird von den untersuchten 5-Halogensubstituierten Derivaten monophasisch verdrängt. Die Werte für den Hill Koeffizient (n_H) der einzelnen Experimente für eine Hemmung der spezifischen Bindung [³H]Uracil-Bindung liegen zwischen 0,8 und 1.

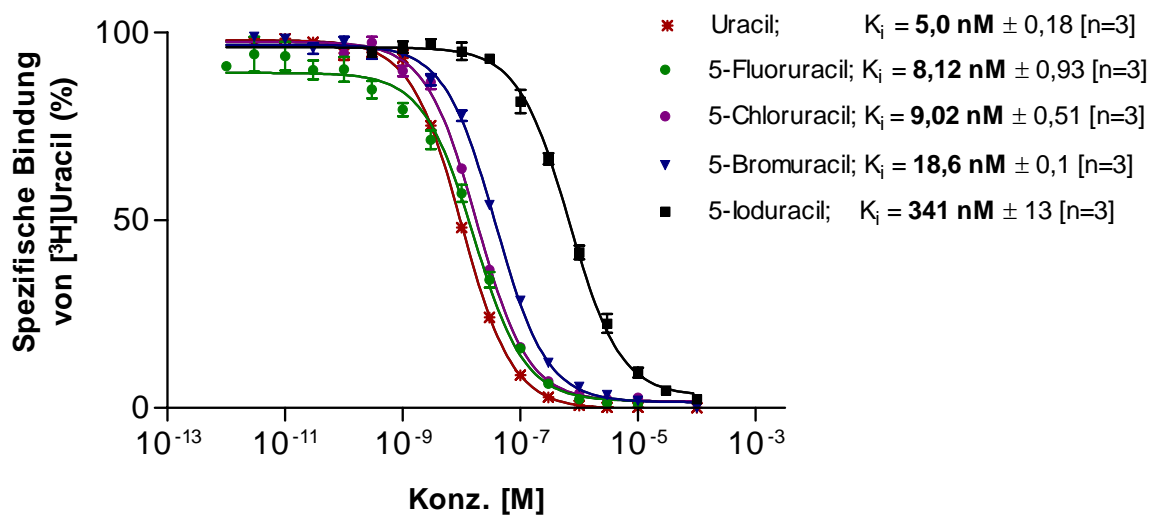
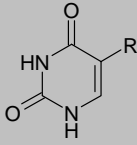

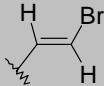
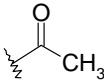
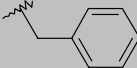


Abb. 2.34: Hemmung der [³H]Uracil-Bindung an Kalbshirn-Striatum-Membranen durch **Halogensubstituierte Derivate**. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist SEM durch das Symbol überdeckt).

In **Tab. 2.8** sind die Affinitäten aller untersuchten Uracil-Derivate, welche an Position 5 monosubstituiert sind, aufgelistet.

Tab. 2.8: Affinitäten der an **Position 5 monosubstituierten Uracil-Derivate** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

Nr.	Verbindung		K_i [nM] ± SEM oder Inhibition [%] ± SEM bei 10 μM [n=3]
		R	
12	5-Fluoruracil	—F	8,12 ± 0,93
13	5-Chloruracil	—Cl	9,02 ± 0,51
14	5-Bromuracil	—Br	18,6 ± 0,1
15	5-Ioduracil	—I	341 ± 13
16	5-(Trifluormethyl)uracil	—CF ₃	304 ± 33
17	5-Brommethyluracil		470 ± 74
18	(E)-5-(2-Bromviny)uracil		≥ 10.000 (44 % ± 2)
19	5-Hydroxymethyluracil	—CH ₂ OH	419 ± 85
20	5-(2'-Hydroxyethyl)uracil	—C ₂ H ₄ OH	> 10.000 (25 % ± 18)
21	5-Acetyluracil		≥ 10.000 (44 % ± 3)
22	5-Aminouracil	—NH ₂	220 ± 66
23	5-Cyanouracil	—C≡N	882 ± 37
24	5-Azidouracil	—N ⁻ =N ⁺ ≡N	1272 ± 222
25	5-Nitrouracil	—NO ₂	3884 ± 182
26	5-Methyluracil (Thymin)	—CH ₃	10,4 ± 0,3
27	5-Ethyluracil	—C ₂ H ₅	1463 ± 71
28	5-Propyluracil	—n-C ₃ H ₇	> 10.000 (22 % ± 3)
29	5-Pentyluracil	—n-C ₅ H ₁₁	> 10.000 (20 % ± 5)
30	5-Hexyluracil	—n-C ₆ H ₁₃	> 10.000 (35 % ± 1)
31	5-Dodecyluracil	—n-C ₁₂ H ₂₅	> 10.000 (15 % ± 3)
32	5-Benzyluracil		504 ± 67

Die Substitution des Wasserstoffatoms in Position 5 durch eine Methyl-Gruppe (Thymin, **26**) wird gut akzeptiert. Die Substanz hat eine hohe Affinität zu der Bindungsstelle. Die Verlängerung der Kette um eine Methylen-Gruppe (**27**) führt zu einer Affinitätserniedrigung um den Faktor 300 im Vergleich zum Uracil. Noch längere Ketten (Verbindungen **28-31**) bewirken einen gänzlichen Aktivitätsverlust. Vergleicht man 5-(Trifluoromethyl)uracil (**16**) mit Thymin (**26**), so fällt auf, dass die erste Verbindung mit einem K_i -Wert von 304 nM etwa *30fach* weniger affin ist als das 5-Methyl-Derivat (10,4 nM). Polare Verbindungen scheinen in der Regel eine im Vergleich niedrigere Affinität zu besitzen als unpolare Substituenten. Interessanterweise wird der relativ große Benzyl-Rest (Verbindung **32**) gut toleriert ($K_i = 504$ nM). Es bietet sich an, in Zukunft weitere aromatische Verbindungen zu untersuchen. 5-Acetyluracil (**21**) besitzt für die Uracil-Bindungsstelle in einer Konzentration von 10 μ M keine Bindungsneigung. Ein Protonen-Akzeptor scheint in dieser Position von Nachteil zu sein.

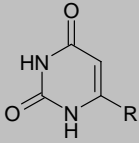
Eine Nitro-Gruppe (**25**) führt zu einer Affinität im mikromolaren Bereich. Die Einführung einer polaren Cyano-Gruppe resultiert in einer Verbindung (**23**) mit einem K_i -Wert von 882 nM. 5-Azidouracil (**24**), welches für die Isolierung und Sequenzierung der Uracil-Bindungsstellen von großer Bedeutung ist (siehe Kap. 3), hat einen vergleichsweise hohen, im mikromolaren Bereich liegenden, K_i -Wert von $1,3 \mu\text{M} \pm 0,2$ ($n=3$). Als weitere Testsubstanzen sind u.a. Derivate mit polaren Substituenten (z.B. Carboxyl-Gruppe) von Interesse.

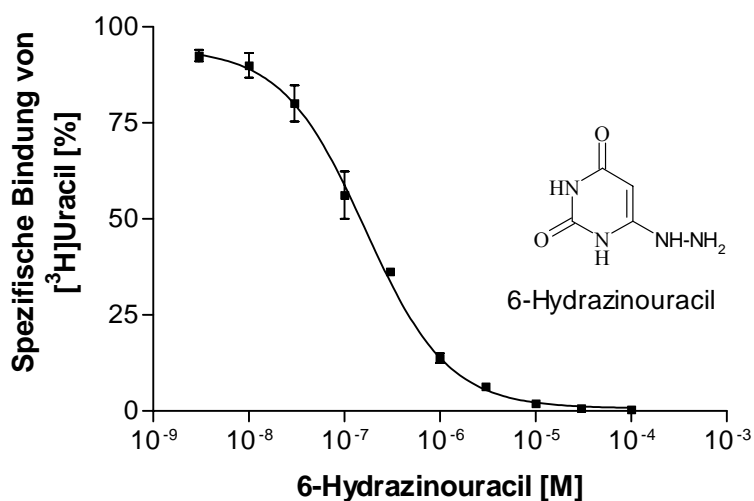
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass an Position 5 – insbesondere kleine – Substituenten relativ gut akzeptiert werden. Zwar zeigt keine der Derivate eine höhere Affinität als das unsubstituierte Uracil, jedoch kommt 5-Fluoruracil dem K_i -Wert von Uracil schon sehr nahe ($8,12 \text{ nM} \pm 0,93$ [$n=3$] vs. $5,0 \text{ nM} \pm 0,18$ [$n=3$]).

2.5.2.4 Uracil-Derivate mit Substitution in Position 6

In Position 6 werden Substituenten sehr schlecht toleriert. Schon die Substitution eines Chlor-Atoms (6-Chloruracil, **34**) führt zu einem gänzlichen Aktivitätsverlust. Ebenso zeigt auch 6-Methyluracil (**35**) keine Affinität mehr zu der Bindungsstelle. Orotsäure (**38**), ein Substrat der Orotat-Phosphoribosyltransferase (Pyrimidin-*de-novo*-Synthese, Kap. 1.2.1), unterscheidet sich von Uracil durch eine Carboxyl-Gruppe in Position 6. Dies führt zu einer inaktiven Verbindung. Durch die Substitution einer Amino-Gruppe (Verbindung **36**) und auch einer Azido-Gruppe (Verbindung **37**) geht die Affinität zur Uracil-Bindungsstelle völlig verloren. Interessanterweise zeigt jedoch 6-Hydrazinouracil (**33**) mit einem K_i -Wert von $80,1 \text{ nM} \pm 9,7$ – als einzige unter den bisher untersuchten Verbindungen mit einer Substitution an Position 6 – relativ gute Bindungseigenschaften (**Abb. 2.35**). In **Tab. 2.9** sind die Ergebnisse aufgelistet.

Tab. 2.9: Affinitäten der an **Position 6 monosubstituierten Uracil-Derivate** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

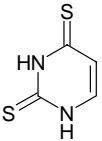
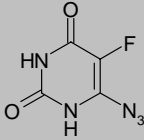
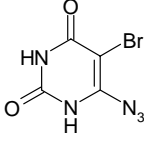
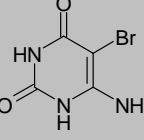
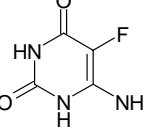
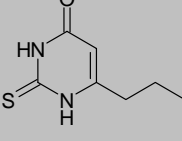
Nr.	Verbindung	R	K _i [nM] ± SEM oder
			Inhibition [%] ± SEM bei 10 μM ^a [n=3]
33	6-Hydrazinouracil		80,1 ± 9,7
34	6-Chloruracil	-Cl	> 10.000 (4 % ± 2)
35	6-Methyluracil	-CH ₃	> 10.000 (31 % ± 2)
36	6-Aminouracil	-NH ₂	> 10.000 (25 % ± 1)
37	6-Azidouracil	-N ⁻ N ⁺ ≡N	> 10.000 (21 % ± 1)
38	Orotsäure	-COOH	> 100.000 (40 % ± 2, 100μM)

^a falls nichts anderes angegeben ist**Abb. 2.35:** Hemmung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen durch **6-Hydrazinouracil** (K_i-Wert = **80,1 nM ± 9,7**). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist SEM durch das Symbol überdeckt).

2.5.2.5 Uracil-Derivate mit mehrfacher Substitution

Neben den monosubstituierten Uracil-Derivaten wurde auch eine Reihe von mehrfachsubstituierten Derivaten getestet. 6-Propyl-2-thiouracil (**44**), eine als Thyreostatikum auf dem Markt befindliche Substanz, zeigt an der Uracil-Bindungsstelle keine Bindungsneigung. Eine 6-Azido-5-Halogen-Substitution (**40, 41**) ebenso wie eine 6-Amino-5-Halogen-Substitution (**42, 43**) führen zu inaktiven Verbindungen. In **Tab. 2.10** sind die Affinitäten der untersuchten Uracil-Derivate mit mehrfacher Substitution aufgelistet.

Tab. 2.10: Affinitäten verschiedener **mehrfach substituierter Uracil-Derivate** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

Nr.	Verbindung	Struktur	K_i [nM] \pm SEM oder (Inhibition [%] \pm SEM bei 10 μ M) [n=3]
39	Dithiouracil		2011 \pm 146
40	6-Azido-5-fluoruracil		> 10.000 (1 % \pm 1)
41	6-Azido-5-bromuracil		>>10.000 (3 % \pm 2)
42	6-Amino-5-bromuracil		> 10.000 (38 % \pm 8)
43	6-Amino-5-fluoruracil		> 10.000 (5 % \pm 1)
44	6-Propyl-2-thiouracil		> 10.000 (6 % \pm 1)

Durch Austausch der beiden Sauerstoffatome des Uracils durch Schwefelatome nimmt die Affinität in starkem Maße ab. Mit einem K_i -Wert-Wert von $2011 \text{ nM} \pm 146$ (**Abb. 2.36**) ist Dithiouracil 400fach schwächer affin als Uracil. Der Wert des Hill-Koeffizienten (n_H) für eine Hemmung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung liegt bei $1,1 \pm 0,04$, was auf eine einzige Bindungsstelle mit nicht-kooperativer Bindung hindeutet.

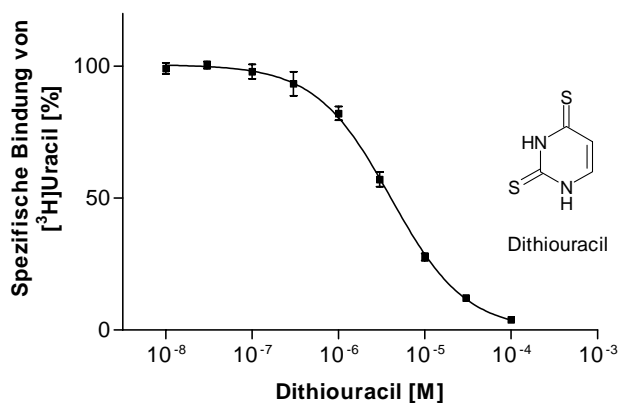


Abb. 2.36: Hemmung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung an Membranpräparationen des Kalbshirn-Striatums durch **Dithiouracil** ($K_i = 2011 \text{ nM} \pm 146$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist SEM durch das Symbol überdeckt).

2.5.2.6 Dihydrouracil

Die Reduktion von Uracil zu 5,6-Dihydrouracil mittels der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (EC 1.3.1.2) ist die Schrittmacherreaktion des Pyrimidin-Abbaus (Kap. 1.2.3). Von daher ist es sehr interessant, die Affinität dieser Substanz zu der Uracil-Bindungsstelle zu untersuchen. 5,6-Dihydrouracil ist ein Uracil-Derivat, bei dem die 5,6-Doppelbindung hydriert ist. Die Konkurrenzexperimente ergaben einen K_i -Wert-Wert von $125 \text{ nM} \pm 19$ (Abb. 2.37).

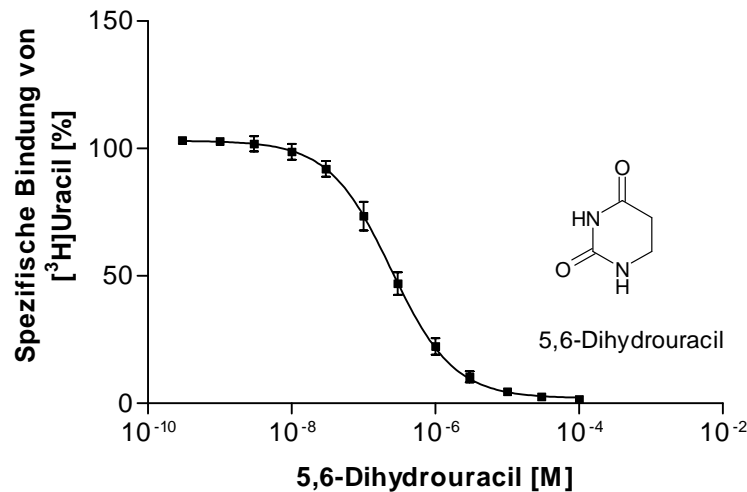


Abb. 2.37: Hemmung der [³H]Uracil-Bindung an Kalbshirn-Striatum-Membranen durch **Dihydrouracil**. Als Ergebnis wurde ein K_i -Wert von $125 \text{ nM} \pm 19$ ($n=3$) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist SEM durch das Symbol überdeckt).

Durch Hydrierung der Doppelbindung sinkt die Affinität um das *25fache*. Die Elektronendichte in diesem Bereich bzw. die Planarität des Uracil-Ringes scheint für die Bindung eine große Rolle zu spielen. Der Wert des Hill-Koeffizienten (n_H) für eine Hemmung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung lag bei $1,0 \pm 0,01$, sodass auch hier von einer einzigen Bindungsstelle mit nicht-kooperativer Bindung ausgegangen werden kann.

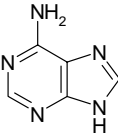
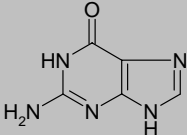
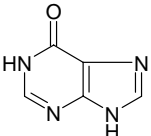
2.5.3 Heterologe Konkurrenzexperimente mit verschiedenen Substanzen

Neben den Uracil-Derivaten sollten auch weitere – zum Teil mit Uracil strukturverwandte – Substanzen getestet werden. Die Ergebnisse werden geordnet nach Strukturklassen in den folgenden Tabellen dargestellt und diskutiert.

2.5.3.1 Nukleobasen

Die getesteten Nukleobasen mit einem Purin-Grundgerüst (**45**, **46**, **47**) zeigen keine Bindungsaffinität zur Uracil-Bindungsstelle (**Tab. 2.11**). Adenin (**45**) zeigt bei einer Konzentration von 100 μM keine Inhibition ($0\% \pm 1$) der Radioligandbindung. Zusätzlich wurde Uracil in unabhängigen Experimenten am Adenin-Rezeptor²²⁸ getestet. In diesen Bindungsstudien konnte für Uracil keine signifikante Inhibition festgestellt werden ($0 \pm 2\%$, $n=3$). Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Uracil-Bindungsstelle nicht um den kürzlich entdeckten Adenin-Rezeptor handelt.

Tab. 2.11: Affinitäten verschiedener **Nukleobasen** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen ($n=3$).

Nr.	Verbindung	Struktur	K_i [nM] \pm SEM oder Inhibition [%] \pm SEM bei 10 μM^a [$n=3$]
45	Adenin		$\gg 100.000$ ($0\% \pm 1$, 100 μM)
46	Guanin		$\gg 10.000$ ($7\% \pm 0,1$)
47	Hypoxanthin		$\gg 10.000$ ($6\% \pm 4$)

^a falls nichts anderes angegeben ist

2.5.3.2 Uridin und andere Pyrimidin-Nukleoside

Uridin – das Nukleosid aus Uracil und D-Ribose – gehört zu den essentiellen Bausteinen von lebenden Organismen. Die Beteiligung am Aufbau der RNA in Form des Triphosphats UTP zählt zu seinen vordergründigsten Aufgaben. Uridin wurde zusammen mit seinem Monophosphat UMP 1919 von Levene entdeckt und 1934 zum ersten mal synthetisiert^{233,234}. Neben dem RNA-Aufbau werden diesem Nukleosid und seinen Derivaten eine Vielzahl von pharmakologischen Wirkungen zugeschrieben. Uridin zeigt einen schlaffördernden Effekt, eine antikonvulsive Wirkung, erhöht die Spermien-Motilität und den Blutdruck und vermindert die spontane Aktivität. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit Uracil war es interessant, das Nukleosid am Standardassay zu untersuchen und zu überprüfen, inwieweit der Zuckerrest einen Einfluß auf die Affinität zu den Uracil-Bindungsstellen hat. Die Ergebnisse sind in **Abb. 2.38** dargestellt.

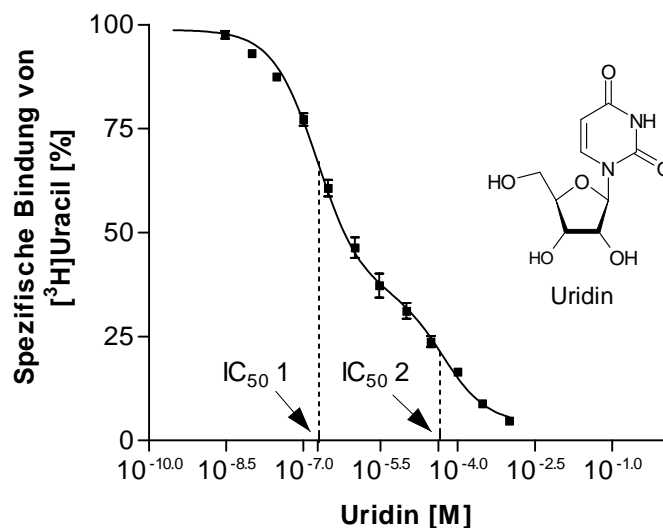
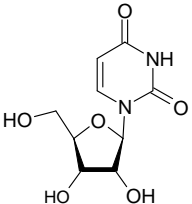
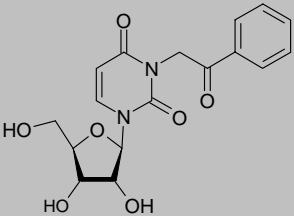
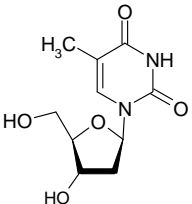
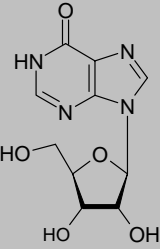


Abb. 2.38: Hemmung der [³H]Uracil-Bindung an Kalbshirn-Striatum-Membranen durch **Uridin**. Als Ergebnis wurde für die 1. Bindungsstelle ein K_i -Wert von $92,4 \text{ nM} \pm 10,7$ (SEM) [n=3] und für die 2. Bindungsstelle ein K_i -Wert von $21,4 \text{ } \mu\text{M} \pm 4,4$ (SEM) [n=3] ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist SEM durch das Symbol überdeckt).

Wie **Abb. 2.38** veranschaulicht, zeigt Uridin (**48**) in den drei unabhängigen voneinander bestimmten Experimenten eine statistisch signifikante biphasische Verdrängung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung. Der Wert des Hill-Koeffizienten (n_H) für eine Hemmung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung liegt bei $0,4 \pm 0,08$, welches ebenfalls auf eine biphasische Bindungskurve und damit auf zwei Bindungsstellen hindeutet. Für die eine Bindungsstelle wurde ein K_i -Wert von $92,4 \text{ nM} \pm 10,7$ (n=3) und für die zweite Bindungsstelle ein K_i -Wert von $21,4 \text{ } \mu\text{M} \pm 4,4$ (n=3) ermittelt. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Uridin während der fünfständigen Inkubationszeit partiell zu Uracil abgebaut wird, welches den Radioliganden von der Bindungsstelle verdrängt. Im Gegensatz zu Uridin zeigt das synthetisch hergestellte Uridin-Derivat Phenacyluridin (**49**) keine Bindungsneigung.

Dies ist auch nicht überraschend, da es wahrscheinlich ist, dass das Enzym bzw. die Enzyme, welche an dem Abbau von Uridin beteiligt sind, das synthetische Phenacyluridin nicht als Substrat akzeptieren. Weiterhin konnte in Konkurrenzexperimenten bereits gezeigt werden, dass Phenacyluracil selbst keine Affinität zu der Uracil-Bindungsstelle besitzt, sodass auch ein enzymatischer Abbau von Phenacyluridin zu keiner Bindung führen würde. Interessanterweise liegt die Inhibition der Radioligandbindung durch Thyminidin (**50**) bei einer Konzentration von 10 μM bei nur 28 %, obwohl Thymin (**26**) einen K_i -Wert von $10,4 \pm 0,3$ aufweist. Thyminidin scheint im Vergleich zu Uridin nicht von einem enzymatischen Abbau betroffen zu sein. Inosin (**51**), das Ribo-Nukleosid des Hypoxanthins, ist ebenso inaktiv an der Uracil-Bindungsstelle, was jedoch aufgrund des Purin-Grundgerüsts nicht weiter überrascht. Die Affinitäten der Nukleoside sind in **Tab. 2.12** zusammengefasst.

Tab. 2.12: Affinitäten von **Uridin** und **anderen Nukleosiden** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

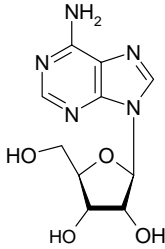
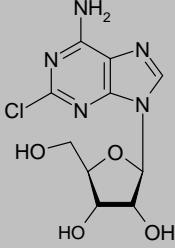
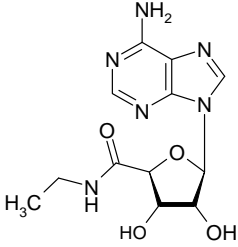
Nr.	Verbindung	Struktur	K_i [nM] \pm SEM oder (Inhibition [%] \pm SEM bei 100 μM^a) [n=3]
48	Uridin		[1] $K_i = 92,4 \text{ nM} \pm 10,7$ [2] $K_i = 21,4 \mu\text{M} \pm 4,4$
49	Phenacyluridin		> 10.000 (14 % \pm 3, 10 μM)
50	Thyminidin		> 10.000 (28 % \pm 4, 10 μM)
51	Inosin		> 100.000 (0 % \pm 4)

^a falls nichts anderes angegeben ist

2.5.3.3 Adenosin und Adenosin-Derivate

Adenosin ist der physiologische Ligand der G-Protein-gekoppelten Adenosin-Rezeptoren, den sogenannten P1-Rezeptoren. Nach Fredholm et al. werden sie in die vier Subtypen A₁, A_{2A}, A_{2B}, und A₃ unterteilt²³⁵. NECA [5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosin] ist ein unspezifischer Agonist an allen vier Adenosinrezeptor-Subtypen²³⁶. Die K_i-Werte für die A₁- und A_{2A}-Rezeptoren (sog. „high affinity receptors“) liegen zwischen 6,3 und 20 nM^{237,238,239}, während für die A_{2B}- und A₃-Rezeptoren (sog. „low affinity receptors“) K_i-Werte zwischen 6,2 und 330 nM^{240,241} bestimmt wurden. Darüberhinaus werden neben den Adenosin-Rezeptoren auch andere Bindungsstellen für [³H]NECA diskutiert^{242,243}. Um zeigen zu können, dass es sich bei der Uracil-Bindungsstelle nicht um den Adenosin-Rezeptor und auch nicht um eine der anderen Bindungsstellen handelt, ist es von Interesse, sowohl Adenosin als auch die Derivate auf die Affinität zur Uracil-Bindungsstelle hin zu untersuchen. Die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente sind in **Tab. 2.13** aufgelistet.

Tab. 2.13: Affinitäten von **Adenosin** und verschiedenen **Adenosin-Derivaten** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbs-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

Nr.	Verbindung	Struktur	K _i [nM] ± SEM oder (Inhibition [%] ± SEM bei 10 μM ^a) [n=3]
52	Adenosin		> 100.000 (16 % ± 7, 100 μM)
53	2-Chloradenosin		>> 10.000 (0 % ± 8)
54	5'-N-Ethylcarbox- amidoadenosin (NECA)		> 10.000 (12 % ± 4)

^a falls nichts anderes angegeben ist

Wie aus **Tab 2.13** ersichtlich, binden weder Adenosin (**52**) noch die beiden Derivate 2-Chloradenosin (**53**) und NECA (**54**) an die Uracil-Bindungsstelle in Kalbs-Striatum-Membranpräparationen. Die Inhibition der Radioligandbindung ist mit 0 bis 16 % bei 10 bzw. 100 μM vernachlässigbar. Desweiteren wurde Uracil in unabhängigen Experimenten an den Adenosin-Rezeptoren getestet. Die Inhibition am A_1 -Adenosin-Rezeptor betrug bei einer Konzentration von 100 μM nur $51 \pm 3 \%$ ^r. Am A_{2A} ^s- und A_{2B} ^t-Adenosin-Rezeptor wies Uracil keine signifikante Inhibition ($< 1 \%$) auf. Es scheint damit klar, dass es sich bei der Uracil-Bindungsstelle nicht um die zuvor diskutierten Bindungsstellen handelt.

^r eingesetzter Radioligand: [³H]CCPA

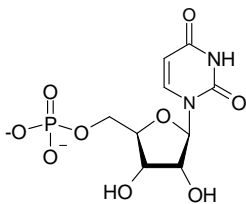
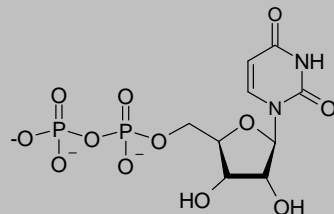
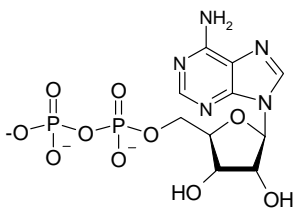
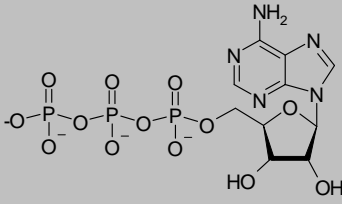
^s eingesetzter Radioligand: [³H]MSX-2

^t eingesetzter Radioligand: [³H]PSB-298

2.5.3.4 Adenin- und Uracil-Nukleotide

Adenin- und Uracilnukleotide, wie **ADP**, **ATP** und **UDP** sind physiologische Agonisten an purinergen und pyrimidineren P2-Rezeptoren (Nukleotid-Rezeptoren). Durch Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren bzw. Rezeptor-Subtypen führen sie zu einer Vielzahl von physiologischen Wirkungen. Die P2X-Rezeptoren, bei denen es sich um Ligand-gesteuerte Ionenkanäle handelt, werden ausschließlich durch ATP stimuliert, während die P2Y-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) neben ATP auch durch ADP, UTP und UDP aktiviert werden können²³⁷. Um auszuschließen, dass es sich bei der identifizierten Bindungsstelle für Uracil um einen P2-Rezeptor handelt, wurden verschiedene Nukleotide getestet. Die Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien in Form der Inhibition des Radioliganden [³H]Uracil bei 100 μM sind in **Tab. 2.14** aufgelistet.

Tab. 2.14: Affinitäten verschiedener **Nukleotide** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

Nr.	Verbindung	Struktur	K _i [nM] ± SEM oder (Inhibition [%] ± SEM bei 100 μM ^a) [n=3]
55	UMP		> 100.000 (68 % ± 4, 500 μM)
56	UDP		> 500.000 (41 % ± 3, 500 μM)
57	ADP		> 100.000 (66 % ± 1, 500 μM)
58	ATP		> 100.000 (71 % ± 5, 500 μM)

^a falls nichts anderes angegeben ist

Die untersuchten Nukleotide zeigen keine nennenswerten Affinitäten zur Uracil-Bindungsstelle. Die Nukleotide UMP (**55**), UDP (**56**), ADP (**57**) und ATP (**58**) zeigen lediglich in sehr hohen Konzentrationen von 500 µM eine Inhibition von 41 bis 71 %. Aufgrund der Ergebnisse scheint es höchst unwahrscheinlich, dass es sich bei der mit [³H]Uracil markierten Bindungsstellen um P2-Rezeptoren handelt.

2.5.3.5 Xanthine und Xanthin-Analoga

Die Xanthine waren die ersten bekannten Adenosin-Rezeptor-Antagonisten²⁴⁴. Coffein, ein 3-Methylxanthin, entfaltet seinen anregenden Effekt über eine antagonistische Wirkung am Adenosin-Rezeptor. Xanthin unterscheidet sich von Uracil durch das Vorhandensein eines zusätzlichen Imidazolringes. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Xanthine ist die Bindungsneigung dieser Verbindungen an der Uracil-Bindungsstelle sehr interessant. Bei den Xanthinen muss eine im Vergleich mit den Uracil-Derivaten unterschiedliche Zählweise berücksichtigt werden (**Abb. 2.39**).

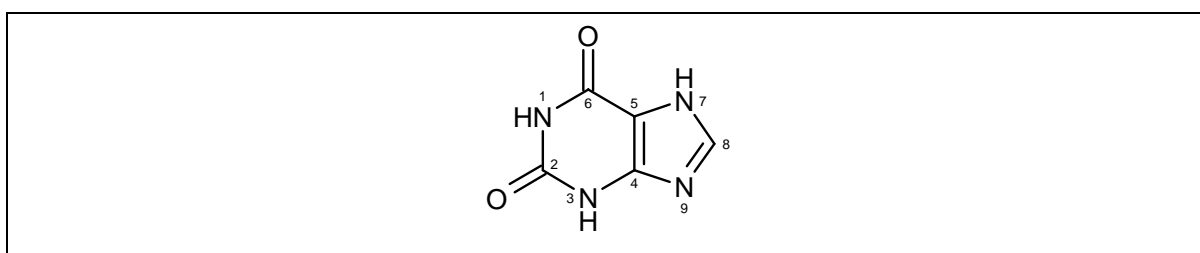
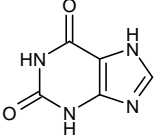
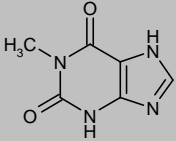
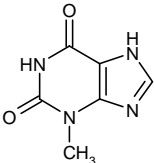
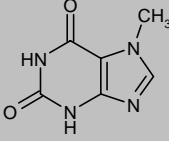
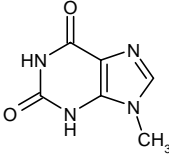
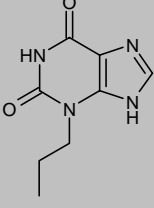
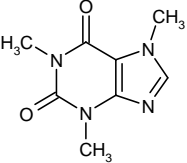
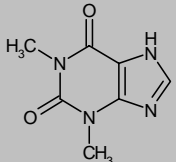


Abb. 2.39: Zählweise von Xanthin

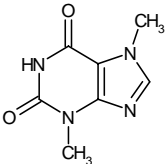
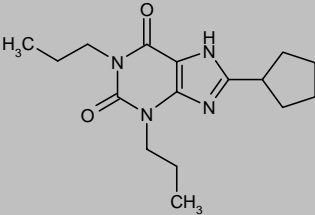
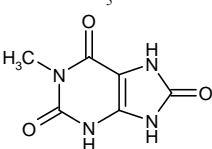
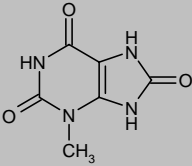
Die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente mit Xanthin und den Xanthin-Analoga sind in **Tab. 2.15** zusammengefasst.

Tab. 2.15: Affinitäten von **Xanthin** und **Xanthin-Analoga** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbs-hirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

Nr.	Verbindung	Struktur	K _i [nM] ± SEM oder (Inhibition [%] ± SEM bei 100 μM ^a) [n=3]
59	Xanthin		23600 ± 2400
60	1-Methylxanthin		> 100.000 (14 % ± 4)
61	3-Methylxanthin		41300 ± 6900
62	7-Methylxanthin		> 100.000 (27 % ± 5)
63	9-Methylxanthin		> 100.000 (12 % ± 4)
64	Enprofyllin (3-Propylxanthin)		58200 ± 7600
65	Coffein		>> 500.000 (4 % ± 7, 500 μM)
66	Theophyllin		> 100.000 (62 % ± 0,4, 500 μM)

^a falls nichts anderes angegeben ist

Fortsetzung der Tab. 2.16:

Nr.	Verbindung	Struktur	K _i [nM] ± SEM oder (Inhibition [%] ± SEM bei 100 μM ^a) [n=3]
67	Theobromin		> 100.000 (29 % ± 2)
68	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX)		>> 10.000 (8 % ± 6, 10 μM)
69	1-Methylharnsäure		>> 100.000 (9 % ± 3, 100 μM)
70	3-Methylharnsäure		>> 100.000 (7 % ± 6, 100 μM)

^a falls nichts anderes angegeben ist

Xanthin (**59**) besitzt eine 4700fach geringere Bindungsaffinität ($K_i = 23,6 \mu\text{M} \pm 2,4$) zur Uracil-Bindungsstelle als Uracil. Eine Methylsubstitution in Position 3 (Verbindung **61**) verringert die Affinität nochmal um nahezu die Hälfte. Bei einer Verlängerung der Alkylkette, wie bei 3-Propylxanthin (**64**) geschehen, verschlechtern sich die Bindungseigenschaften weiter und es ergibt sich ein K_i -Wert von $58,3 \mu\text{M}$ (**Abb. 2.40**). Im Gegensatz dazu weisen die Derivate mit einer Methyl-Substitution in den Positionen 1 (Verbindung **60**), 7 (Verbindung **62**) und 9 (Verbindung **63**) bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ keine signifikante Bindung an die Uracil-Bindungsstelle auf. Die Radioligandbindung wird von diesen Verbindungen bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ nur zu 12 bis 27 % inhibiert. Die Methylxanthine Coffein (**65**), Theophyllin (**66**) und Theobromin (**67**) zeigen ebenfalls keine Affinität zur Uracil-Bindungsstelle in Kalbs-Striatum-Membranpräparationen. DPCPX, ein 1,3,8-trisubstituiertes Xanthin-Derivat (**68**), ist ein hochaffiner selektiver Antagonist am A₁-Adenosin-Rezeptor²⁴⁵. Zur Uracil-Bindungsstelle besteht keine nennenswerte Affinität. Bei den beiden Harnsäure-Derivaten 1-Methylharnsäure (**69**) und ebenso 3-Methylharnsäure (**70**), welche sich von 3-Methylxanthin durch eine Oxo-Gruppe in Position 8 un-

terscheidet, ist bei einer Konzentration von 100 μM keine Inhibition der [³H]Uracil-Bindung zu verzeichnen.

► Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass das Xanthin-Grundgerüst von der Uracil-Bindungsstelle nur sehr schlecht toleriert wird. Während Xanthin selbst noch eine, wenn auch sehr geringe, Affinität zeigt, sind alle untersuchten Derivate – mit Ausnahme der 3-Methyl-monosubstituierten Verbindungen – inaktiv.

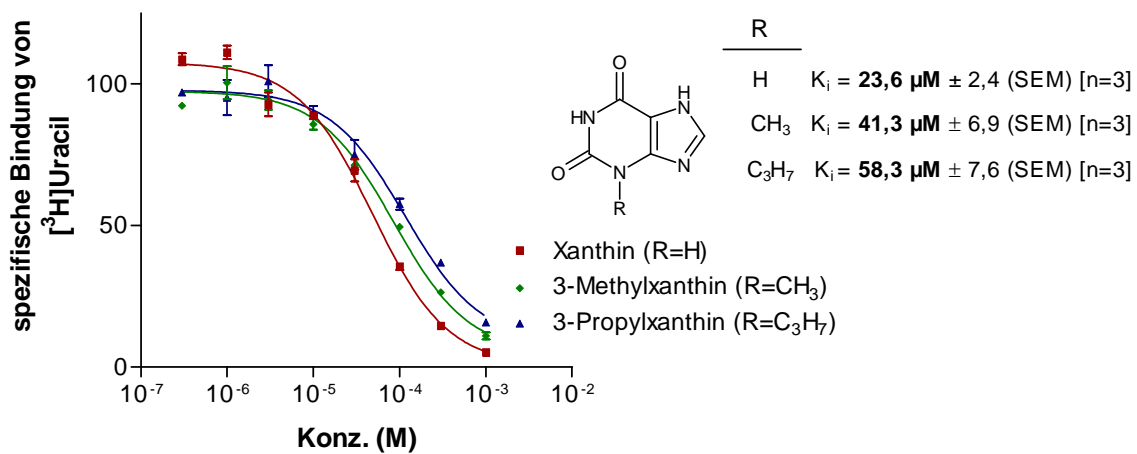


Abb. 2.40: Hemmung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung an Membranpräparationen des Kalbshirn-Striatum durch *Xanthin*, *3-Methylxanthin* und *3-Propylxanthin*. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist SEM durch das Symbol überdeckt).

2.5.3.6 Barbitursäure und Derivate

Die Muttersubstanz für Barbiturate, die Barbitursäure, wurde 1867 erstmals synthetisiert. Barbital wurde 1903 hergestellt und war das erste klinisch eingesetzte Barbiturat. Die Wirkung von Barbituraten wird über den GABA_A-Rezeptor vermittelt. Der bedeutendste inhibitorische Neurotransmitter, γ -Aminobuttersäure (GABA), stellt einen der am weitesten verbreiteten Transmitter im Säugetiergehirn dar. Seine Wirkungen werden durch die GABA-Rezeptoren vermittelt, welche allgemein in drei Gruppen eingeteilt werden: (1) GABA_A-Rezeptoren (für Chloridionen permeable, überwiegend postsynaptisch lokalisierte ionotrope Rezeptoren), (2) GABA_B-Rezeptoren (metabotrope Rezeptoren, deren Signaltransduktionsweg über „second messenger“-Kaskaden vermittelt wird) und (3) GABA_C-Rezeptoren (ionotrope Rezeptoren)²⁴⁶. Der GABA_A-Rezeptor ist ein Heterooligomer mit einer Cl⁻-permeablen Porenregion. Er besitzt auch modulatorische Bindungsstellen für Neurosteroide, Benzodiazepine und Barbiturate (Abb. 2.41), welche über allosterische Interaktionen eine höhere Affinität der GABA zu deren Bindungsstelle bewirken. Dadurch wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des Chloridkanals erhöht und es kommt zu einer Hyperpolarisation und damit zu einer verminderten Erregbarkeit der Zelle²⁴⁷.

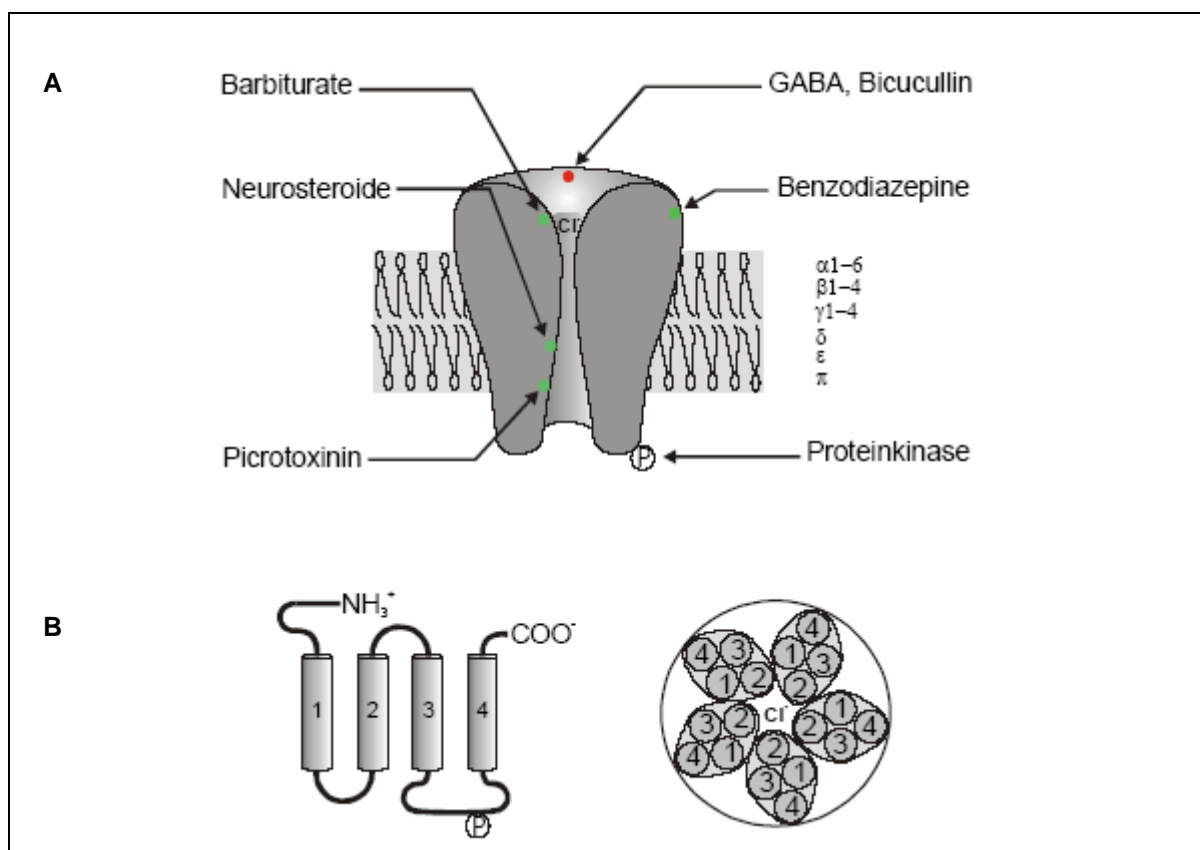


Abb. 2.41: Aufbau synaptischer GABA_A-Rezeptoren.

A: Der GABA_A-Rezeptor besitzt neben den extrazellulären Bindungsstellen auch eine intrazelluläre Phosphorylierungsstelle (P). Bicucullinmethochlorid inhibiert GABA_A-Rezeptor vermittelte Antworten kompetitiv, während Picrotoxinin nicht kompetitiv blockiert. **B:** Eine Untereinheit besitzt vier transmembranäre Domänen. Fünf Untereinheiten bilden ein Penta-Heterooligomer^{247,248}.

Die bekanntesten GABA_A-Antagonisten sind Bicucullin und Pikrotoxinin (**Abb. 2.42**).

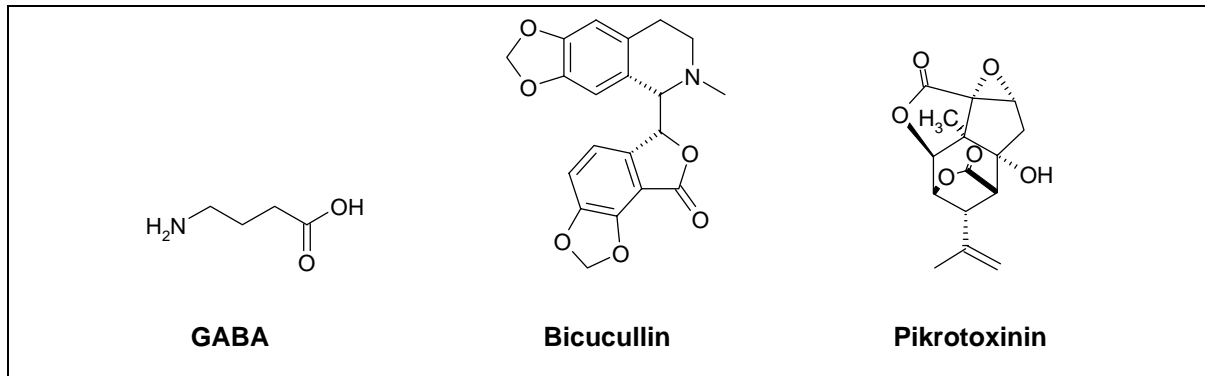


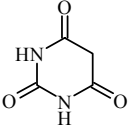
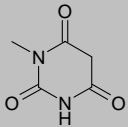
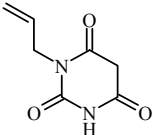
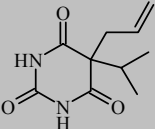
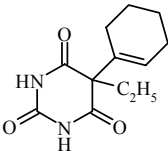
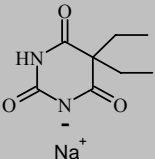
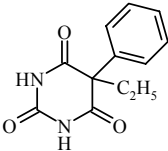
Abb. 2.42: Struktur von GABA (γ -Aminobuttersäure) und den GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin und Picrotoxinin

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Barbitursäure mit Uracil war es naheliegend, die Barbitursäure und verschiedene Barbiturate hinsichtlich der Affinität zur Uracil-Bindungsstelle zu testen, um ausschliessen zu können, dass es sich bei der identifizierten Bindungsstelle um die Barbiturat-Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor handelt. Die Ergebnisse sind in **Tab. 2.16** aufgelistet.

Alle untersuchten Barbiturate (Verbindungen **74-77**) ebenso wie die Barbitursäure (**71**) selbst zeigen bei einer Konzentration von 100 μ M zur Uracil-Bindungsstelle keine Affinität. Desweiteren sind auch 1-Methylbarbitursäure (**72**) und 1-Allylbarbitursäure (**73**) inaktiv. Die Inhibitionen der getesteten Verbindungen liegen unter 12 %. Die Barbitursäure unterscheidet sich von Uracil durch das Fehlen der Doppelbindung sowie der Oxo-Gruppe in Position 6 des Pyrimidin-Ringes. Wie in Kap. 2.5.2.4 bereits diskutiert, werden Substituenten in Position 6 sehr schlecht toleriert. Dies läßt sich am Beispiel der Barbiturate bestätigen.

► Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass aufgrund der fehlenden Bindungsneigung der Barbiturate davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei der identifizierten Uracil-Bindungsstelle nicht um die Barbiturat-Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor handelt. Bereits der hohe B_{max}-Wert hatte dieser Theorie widersprochen, da GABA_A-Rezeptoren eine im Vergleich wesentlich geringere Rezeptordichte aufweisen.

Tab. 2.16: Affinitäten von **Barbitursäure** und verschiedenen **Derivaten** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

Nr.	Verbindung	Struktur	K _i [nM] ± SEM oder Inhibition [%] ± SEM bei 100 μM ^a [n=3]
71	Barbitursäure		>> 100.000 (3 % ± 4)
72	1-Methylbarbitursäure		> 100.000 (10 % ± 3)
73	1-Allylbarbitursäure		> 10.000 (11 % ± 1, 10 μM)
74	Aprobarbital		>> 100.000 (0 % ± 3)
75	Cyclobarbital-Ca		>> 100.000 (0 % ± 2)
76	Barbital-Na		>> 100.000 (2 % ± 1)
77	Phenobarbital		>> 100.000 (1 % ± 2)

^a falls nichts anderes angegeben ist

2.5.3.7 Harnstoff-Derivate

Die Harnstoff-Derivate wurden von Frau Manuela Meusel aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Gütschow, Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn, im Rahmen ihrer Dissertation synthetisiert. In Tiermodellen wiesen diese Verbindungen eine gute antikonvulsive Wirksamkeit auf²⁴⁹. Da diese Harnstoff-Derivate über eine Partialstruktur von Uracil verfügen (**Abb. 2.43**), war es interessant, die Affinitäten dieser Verbindungen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Tab 2.17** aufgelistet.

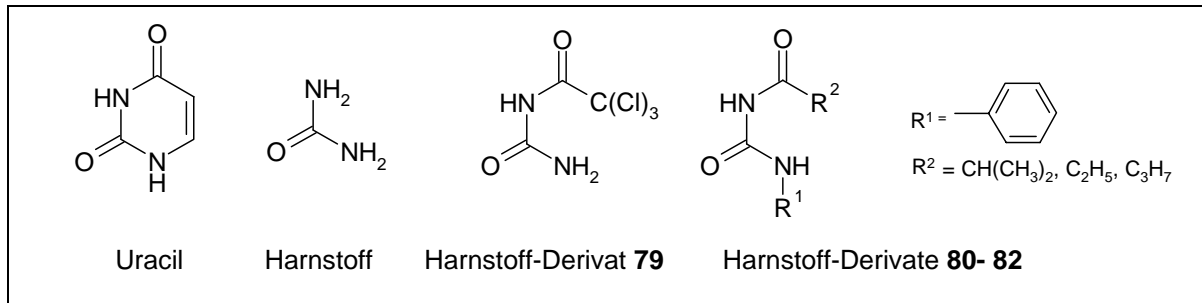


Abb. 2.43: Vergleich der Strukturformeln von Uracil, Harnstoff und den Harnstoff-Derivaten **79, 80, 81, 82**

Tab. 2.17: Affinitäten verschiedener **Harnstoff-Derivate** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbs-hirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

Nr.	Verbindung	Struktur	K_i [nM] \pm SEM oder Inhibition [%] \pm SEM bei 100 μ M [n=3]
78	Harnstoff		>> 1000.000 (2 % \pm 2)
79	Gü 1015 (Meu 95)		>> 100.000 (0 % \pm 2)
80	Gü 1046 (Meu 118)		>> 100.000 (1 % \pm 2)
81	Gü 1053 (Meu 98)		>> 100.000 (0 % \pm 4)
82	Gü 1054 (Meu 99)		>> 100.000 (1 % \pm 1)

Harnstoff (**78**) zeigt in einer sehr hohen Konzentration von 1 mM keine Affinität zur Uracil-Bindungsstelle (Inhibition bei 1 mM = 2 %). Auch die vier getesteten Harnstoff-Derivate (**79-82**) vermögen in einer hohen Konzentration von 100 µM die [³H]Uracil-Bindung nicht zu inhibieren (Inhibition bei 100 µM ≤ 1 %). Das Harnstoff-Derivat Gü 1015 (**79**) weist unter den untersuchten Derivaten die größte strukturelle Ähnlichkeit mit Uracil auf (**Abb. 2.43**), wird aber trotzdem von der Uracil-Bindungsstelle nicht toleriert. Ein geschlossenes Ringsystem scheint für die Bindung essentiell zu sein. Die drei Verbindungen Gü 1046, Gü 1053 und Gü 1054 (**80, 81, 82**) tragen nach der Zählweise von Uracil an dem N1 einen voluminösen Rest, sodass hier die fehlende Affinität nicht so sehr verwundert, da auch bei Uracil-Derivaten Substituenten am N1 sehr schlecht toleriert werden.

2.5.3.8 Testsubstanzen unterschiedlicher Strukturklassen

In weiteren Konkurrenzexperimenten wurde eine Reihe von Verbindungen unterschiedlicher Strukturklassen untersucht.

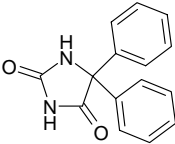
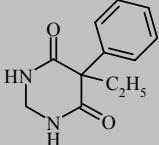
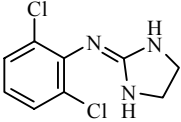
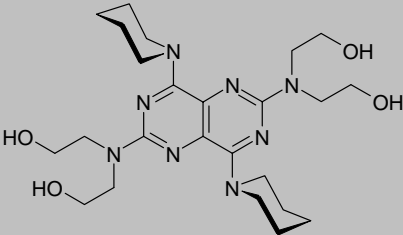

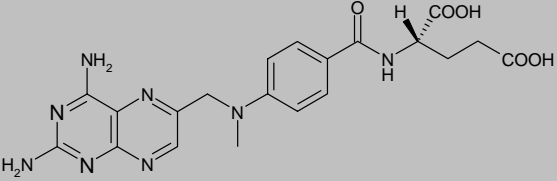
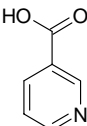
Phenytoin (83), ein 5,5-Diphenylhydantoin, entfaltet seine Wirkung über eine Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen und wird therapeutisch zur Epilepsie-Behandlung eingesetzt. Zur Uracil-Bindungsstelle zeigt Phenytoin in einer Konzentration von 10 µM keine nennenswerte Affinität. **Primidon (84)**, ein Hexahydropyrimidin-dion, wird im Körper zu Phenobarbital und Phenylethylmalonsäurediamid (PEMA) metabolisiert. Diese aktiven Metaboliten, aber auch Primidon selbst, besitzen eine antikonvulsive Wirkung, welche durch eine Bindung am GAGA_A-Rezeptor (Barbiturat-Bindungsstelle) vermittelt wird. In einer Konzentration von 10 µM zeigt Primidon keine signifikante Inhibition der [³H]Uracil-Bindung. Wie schon bei den Barbituraten diskutiert wurde, scheint die identifizierte Uracil-Bindungsstelle definitiv von der Barbiturat-Bindungsstelle am GAGA_A-Rezeptor verschieden zu sein. **Clonidin (85)**, ein Imidazolidin-Derivat, ist ein Antisymphotonikum (zentraler α₂-Rezeptor-Agonist) und führt über eine Verminderung der Noradrenalin-Ausschüttung zu einer Blutdrucksenkung. Daneben wird ein Agonismus an nicht näher charakterisierte zentrale „Imidazolin“-Rezeptoren diskutiert^{250,251,252}. Das Imidazolidin-Derivat besitzt keine Affinität zur Bindungsstelle von Uracil. Die Radioligandbindung wird in einer hohen Konzentration von 100 µM nur zu 1 % inhibiert. **Dipyridamol (86)**, ein basisch substituiertes Pyrimido-pyrimidin-Derivat, ist ein Adenosin-re-uptake-Hemmer und verursacht über die Erhöhung der Adenosin-Konzentration im Blut eine Vasodilation. Weiterhin hat die Verbindung eine unspezifische hemmende Wirkung auf die Phosphodiesterase, wodurch es zu einer schwachen Thrombozytenaggregationshemmung kommt^{155,253}. Zur Uracil-Bindungsstelle besitzt Dipyridamol keine Bindungsaffinität. In den entsprechenden Experimenten lag die Inhibition der Radioligandbindung bei 9 % (10 µM), sodass man hier von einer inaktiven Substanz sprechen kann. **β-Alanin (87)**, ein weiterer Testsubstanz, ist das Endprodukt bei der Katabolisierung von Uracil (Kap. 1.2.3). Vor kurzem wurde für β-Alanin eine spezifische

Bindungsstelle beschrieben. Nach Shinohara et al. ist diese Verbindung der physiologische Ligand eines „orphan“-G-Protein-gekoppelten Rezeptors (TGR7), welcher hauptsächlich in den Ganglien des Rückenmarks exprimiert wird. In den Studien konnte die Forschergruppe einen durch β -Alanin verursachten Calciumionen-Einstrom in TGR7-exprimierenden CHO-Zellen (Zellen aus dem Eierstock chinesischer Hamster) nachweisen. Es wurden EC_{50} -Werte von 15 μ M für den Human-, 14 μ M für den Ratten- und 44 μ M für den Maus-TGR7 bestimmt²⁵⁴. Dieser Uracil-Katabolit sollte in Konkurrenzexperimenten untersucht werden, um einen Zusammenhang zwischen diesem neuentdeckten Rezeptor für β -Alanin und der Uracil-Bindungsstelle auszuschliessen. β -Alanin wurde in Konzentrationen von 10, 100 und 500 μ M getestet. Bei allen Konzentrationen wird [³H]Uracil nur zu ca. 7-9 % inhibiert, sodass man daraus folgern kann, dass die Uracil-Bindungsstelle mit dem β -Alanin-Rezeptor nicht identisch ist.

Methotrexat (88), ein Folsäure-Analogon, hemmt die Dihydrofolat-Reduktase und blockiert damit die Biosynthese von DNA-Bausteinen. In hohen Dosen wird diese Substanz als Zytostatikum, in niedriger Dosierung als sogenanntes DMARD (Disease-modifying Antirheumatic Drug) bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Aufgrund der Molekülgröße und der geringen strukturellen Ähnlichkeit mit Uracil weist diese Verbindung erwartungsgemäß keine Bindungsneigung zur Uracil-Bindungsstelle auf. Desweiteren wurde **Nicotinsäure (89)** getestet. Diese Substanz wird zur Senkung des Triglyceridspiegels eingesetzt. Die Bindung an mehrere, strukturell verwandte, $G_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren soll für die Wirkung verantwortlich sein^{255,256}. Den Ergebnissen der Konkurrenzexperimente zufolge ist auch Nicotinsäure an der Uracil-Bindungsstelle inaktiv (Inhibition = 0,4 % bei 10 μ M).

Die ermittelten Affinitäten der oben diskutierten Verbindungen sind in **Tab. 2.18** aufgelistet.

Tab. 2.18: Affinitäten **verschiedener Verbindungen** zur Uracil-Bindungsstelle am Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

Nr.	Verbindung	Struktur	K _i [nM] ± SEM oder Inhibition [%] ± SEM bei 10 μM ^a [n=3]
83	Phenytoin		> 10.000 (11 % ± 3)
84	Primidon		>> 10.000 (1 % ± 1)
85	Clonidin		>> 100.000 (1 % ± 1, 100 μM)
86	Dipyridamol		>> 10.000 (9 % ± 6)
87	β-Alanin		>> 500.000 (9 % ± 3, 500 μM)
88	Methotrexat		>> 100.000 (8 % ± 4, 100 μM)
89	Nicotinsäure		>> 10.000 (0 % ± 5)

^a falls nichts anderes angegeben ist

2.5.4 Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehungen

Zur Herleitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen wurde in Konkurrenzexperimenten eine Vielzahl von monosubstituierten sowie mehrfach substituierten Uracil-Derivaten getestet. Außerdem wurden ausgewählte Verbindungen verschiedener Strukturklassen bezüglich ihrer Affinität zur Uracil-Bindungsstelle untersucht. Die Konkurrenzexperimente mit den monosubstituierten Uracil-Derivaten haben ergeben, dass eine Substitution in den Positionen 1, 2, 3, 4 und 6 mit einigen Ausnahmen relativ schlecht toleriert wird. Uracil-Derivate mit insbesondere kleinen Substituenten in Position 5 hingegen verfügen über vergleichsweise gute Bindungsaffinitäten. Alle bis dato getesteten Uracil-Derivate weisen einen höheren K_i -Wert auf als Uracil selbst. 5-Fluoruracil (**12**), das potenteste Derivat, bindet mit einem K_i -Wert von 8,12 nM um den Faktor 1,6 schwächer als Uracil. Mit zunehmender Atomgröße des Substituenten nimmt die Affinität der Halogensubstituierten Derivate ab ($F > Cl > Br \gg I$). 5-Ioduracil (**15**) weist nur noch einen K_i -Wert von 341 nM auf und ist damit *70fach* schwächer affin als das unsubstituierte Uracil. Allgemein werden in dieser Position kleine Substituenten besser toleriert als große. Interessanterweise wird 5-Benzyluracil (**32**) trotz des recht großen Benzyl-Restes vergleichsweise gut toleriert ($K_i = 504$ nM). Hier bietet sich an, in zukünftigen Forschungsvorhaben weitere aromatisch substituierte Derivate zu testen.

Eine Methylsubstitution führt, je nach Substitutionsposition zu sehr unterschiedlichen K_i -Werten. Während 5-Methyluracil (**26**) mit einem K_i -Wert von 10,4 nM eine sehr affine Verbindung aufweist, geht die Methyl-Substitution in Position 3 (Verbindung **6**) mit einem starken Affinitätsverlust einher ($K_i = 1,1$ μ M). Eine Methyl-Gruppe in den Positionen 1 (Verbindung **2**) und 6 (Verbindung **35**) führt zu einem gänzlichen Bindungsverlust. Eine Verlängerung der Alkylkette wird allerdings auch in Position 5 nicht toleriert. Schon eine Ethyl-Gruppe (Verbindung **27**) vermindert die Affinität im Vergleich zur Methyl-Gruppe um den Faktor 146. Längere Alkylketten (5-Propyl- (**28**), 5-Pentyl- (**29**), 5-Hexyl- (**30**)uracil) zeigen in einer Konzentration von 10 μ M keine signifikante Hemmung der [³H]Uracil-Bindung. In Position 1 werden Substituenten sehr schlecht toleriert. Schon eine Methylgruppe führt, wie oben bereits erwähnt, zu einer inaktiven Verbindung **2**. Eine Ausnahme bildet die Verbindung 1-Propargyluracil (**1**), welche vergleichsweise gute Bindungseigenschaften (100 nM) besitzt. Für zukünftige Untersuchungen bietet es sich an, polare Substituenten (Halogene) an N1-Position zu testen. Ähnlich verhält es sich in Position 6. Schon kleine Substituenten wie eine Methyl-Gruppe bzw. ein Chloratom bewirken einen gänzlichen Affinitätsverlust. Überraschenderweise zeigt 6-Hydrazinouracil (**33**) eine relativ hohe Bindungsaffinität ($K_i = 80,1$ nM), während 6-Aminouracil (**36**) und 6-Azidouracil (**37**) nur eine ca. 25 %ige Inhibition der Radioligandbindung aufweisen (bei 100 μ M) und damit inaktiv sind. Hier werden weitere Derivate untersucht werden müssen, um einen tieferen Einblick in die Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten. Die Position 3 ist wie die beiden zuvor diskutierten Positionen 1 und 6 für eine Modifikation wenig geeignet. Eine Methylsubstitution verringert die Affinität in erheblichem Maße, größere Substituenten (Benzyl- (**7**), Phenacyl- (**8**)-Gruppe) werden überhaupt nicht toleriert. Es sollten in Zukunft weitere Derivate mit polaren Substituenten getestet werden.

Die beiden Oxo-Gruppen in den Positionen 2 und 4 scheinen für die Bindungsaffinität eine bedeutende Rolle zu spielen. Derivate mit einer fehlenden Oxo-Gruppe weisen eine stark verminderte Affinität auf bzw. sind gänzlich inaktiv. Hierbei ist anzumerken, dass bei einer Substitution des Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom bei bestehender Doppelbindung (Thio-Gruppe) die Verbindungen zwar eine schwache, aber noch im niedrigen mikromolaren Bereich liegende Affinität besitzen (2-Thiouracil (**4**), Dithiouracil (**39**)). Die Substitution der Oxo-Gruppe durch eine Amino-Gruppe hingegen führt an beiden Positionen zu einem gänzlichen Affinitätsverlust (Cytosin (**11**), Isocytosin (**5**)). An diesen Positionen scheint das Vorhandensein eines Protonen-Akzeptors für die Bindung essentiell zu sein. Desweiteren ist möglicherweise das N3-H für die Bindung wichtig. Sowohl bei Cytosin als auch bei Isocytosin liegt ein anderes Tautomer vor, wobei das Proton am N3 fehlt. Beide Verbindungen sind inaktiv. Die beiden Derivate 2-Thiouracil und Dithiouracil dagegen, die an den Positionen 2 und/oder 4 substituiert sind, jedoch noch das N3-H besitzen, weisen, wie bereits erwähnt, noch eine gewisse Affinität auf. Für weitere Studien wären u.a. Alkoxy-Verbindungen interessant.

In **Abb. 2.44** sind die ermittelten Struktur-Wirkungsbeziehungen zusammenfassend dargestellt.

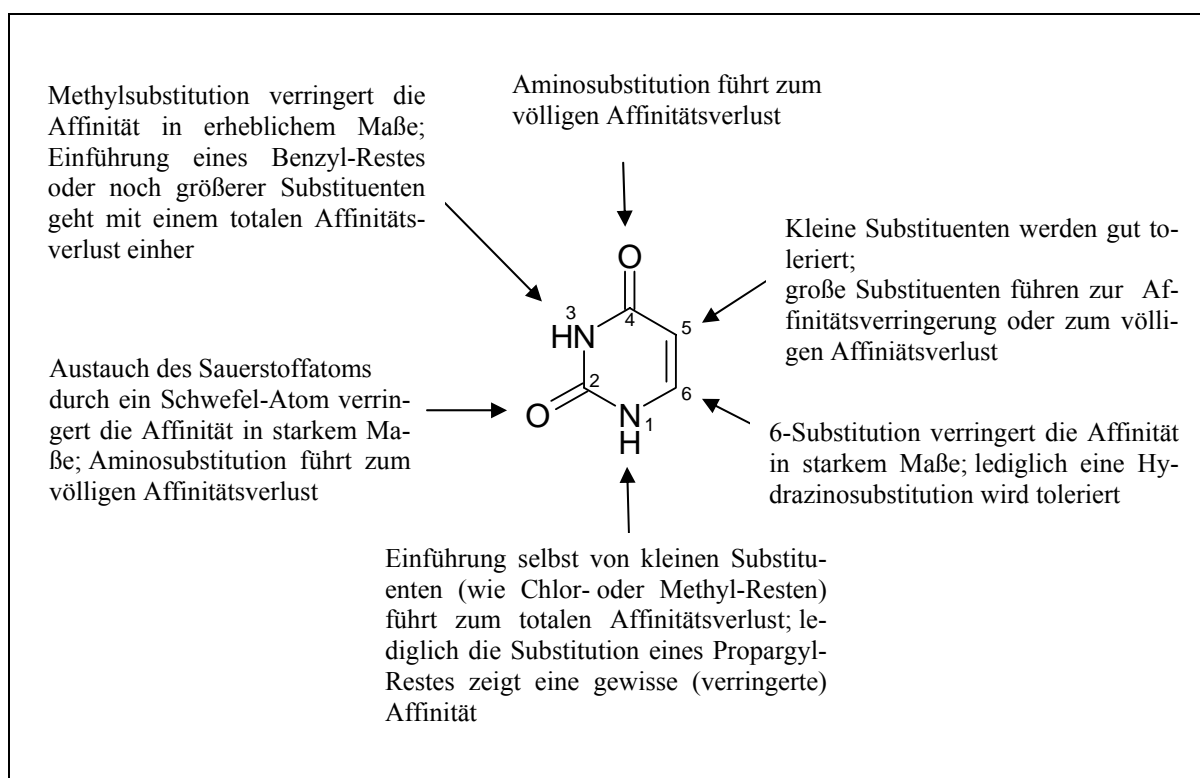


Abb. 2.44: Struktur-Wirkungsbeziehungen der Uracil-Derivate am Kalbs-Striatum

Bei der Testung von Verbindungen unterschiedlicher Strukturklassen haben sich – mit wenigen Ausnahmen – alle Testsubstanzen als inaktiv erwiesen. Konzentrationen von in der Regel 10 bzw. 100 μ M (oder höher) dieser Verbindungen führten zu keiner signifikanten

Inhibition der Radioligandbindung. Auch Testsubstanzen mit hoher struktureller Ähnlichkeit mit Uracil, aber fehlendem geschlossenem Ringsystem (Harnstoff-Derivat, **79**) zeigen keine Bindungsneigung zur Uracil-Bindungsstelle.

Uridin (**48**), das Nukeosid von Uracil, weist in den Competitionsexperimenten eine signifikant biphasische Verdrängung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung mit den beiden K_i -Werten $92,4 \text{ nM} \pm 10,7$ ($n=3$) und $21,4 \text{ } \mu\text{M} \pm 4,4$ ($n=3$) auf. Dies ist vermutlich teilweise auf einen partiellen Abbau von Uridin zu Uracil zurückzuführen. In unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Uridin durch in der Membranpräparation befindliche Enzyme (Uridin-Phosphorylase und/oder unspezifische Phosphorylasen) zu Uracil gespalten wird. An dieser Stelle muß erwähnt werden, dass die japanische Arbeitsgruppe Kimura et al.²⁵⁷ sowie die ungarische Arbeitsgruppe Kovacs et al.²⁵⁸ spezifische Bindungsstellen für Uridin nachgewiesen und einen Uridin-Rezeptor postuliert haben. In Anbetracht der Tatsache, dass hochaffine Uracil-Bindungsstellen existieren und dass Uridin durch Enzyme in der Membranpräparation zu Uracil gespalten werden kann, taucht unvermeidlich die Frage auf, ob es sich bei der von diesen beiden Arbeitsgruppen nachgewiesenen Uridin-Bindungsstelle nicht möglicherweise um die hier beschriebene Uracil-Bindungsstelle handelt. Auf diese Fragestellung wird in Kapitel 4 näher eingegangen und u.a. Bindungsstudien mit [³H]Uridin diskutiert.

Xanthin (**59**) und die beiden Derivate 3-Methylxanthin (**61**) und 3-Propylxanthin (**64**) binden in mikromolaren Konzentrationen an die Uracil-Bindungsstelle ($K_i = 24, 41$ bzw. $58 \text{ } \mu\text{M}$). Xanthin unterscheidet sich von Uracil durch den zusätzlichen Imidazolring, wodurch die Affinität um den Faktor 4800 vermindert wird. Auch hier zeigt sich wieder die extrem geringe Modifikationstoleranz der Uracil-Bindungsstelle. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Uracil-Bindungsstelle nur geringe strukturelle Modifikationen zuläßt. Größere Moleküle, welche einen zusätzlichen Imidazol-Ringsystem an der Uracil-Struktur enthalten, weisen nur noch geringfügige Affinitäten im hohen mikromolaren Bereich auf. Ebenso sind auch „zu kleine“ Moleküle mit einer Partialstruktur von Uracil völlig inaktiv. Desweiteren hat die Substitution von sogar sehr kleinen Molekülen am Uracil-Ring zum Teil gravierende Auswirkungen auf die Affinität. Lediglich die Position 5 scheint für eine Substitution geeignet zu sein, wobei kleine Substituenten niedrige – im unteren nanomolaren Bereich liegende – K_i -Werte liefern.

Es wurden bereits erste 3D-QSAR-Studien^u von Herrn Heiko Meyer aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. C. E. Müller durchgeführt (Molecular-Modelling-Paket SYBYL 6.7 259). Die Korrelation der berechneten Werte mit den experimentell bestimmten Werten liefert ein zufriedenstellendes Ergebnis, das in **Abb. 2.45** dargestellt ist. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Werten. Ausgehend von den Ergebnissen der Bin-

^u QSAR-Methoden (Engl.: Quantitative Structure-Activity Relationship) versuchen die chemische Struktur strukturell verwandter Agonisten oder Antagonisten einer biologischen Zielstruktur (Enzym, Rezeptor) mit deren biologischer Aktivität durch ein mathematisches Modell zu verknüpfen.

dungsstudien und mithilfe der Voraussagen der QSAR-Studien können in Zukunft gezielter Verbindungen ausgesucht bzw. neu synthetisiert und getestet werden, um durch noch genauere Struktur-Wirkungsbeziehungen zu neuen affinen Liganden zu gelangen.

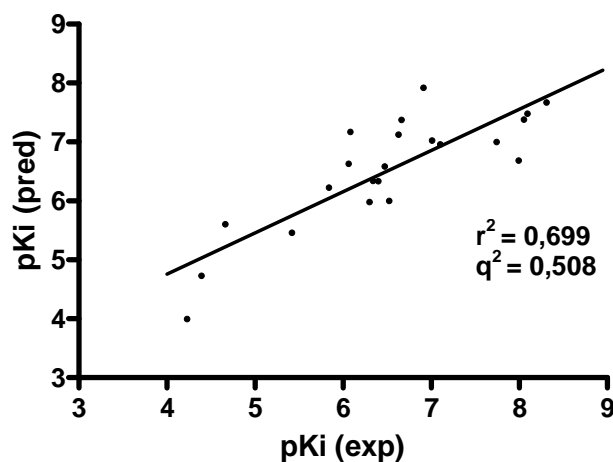


Abb. 2.45: Linearer Zusammenhang der Affinität experimentell in Radioligand-Bindungsstudien bestimmter pK_i-Werte und der im QSAR-Modell berechneten Werte für Uracil-Derivate, r²: Korrelationskoeffizient, q²: Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zufallskorrelation vorliegt (für q² > 0,3 unwahrscheinlich)

2.6 Konkurrenzexperimente an Membranpräparationen von NG108-15-Zellen

Zur Charakterisierung der in den Membranpräparationen der NG108-15-Zellen identifizierten Bindungsstellen für [³H]Uracil wurden Konkurrenzexperimente mit Membranpräparationen durchgeführt. Untersucht wurden ausgewählte Uracil-Derivate, wobei in einem Standardassay die K_i -Werte der Derivate bestimmt (**Abb. 2.46**) und anschließend mit den zuvor in Kalbs-Striatum ermittelten K_i -Werten verglichen wurden.

Damit sollte überprüft werden, ob die erhaltenen K_i -Werte an Membranpräparationen aus NG108-15-Zellen mit den zuvor am Kalbs-Striatum bestimmten K_i -Werten korrespondieren.

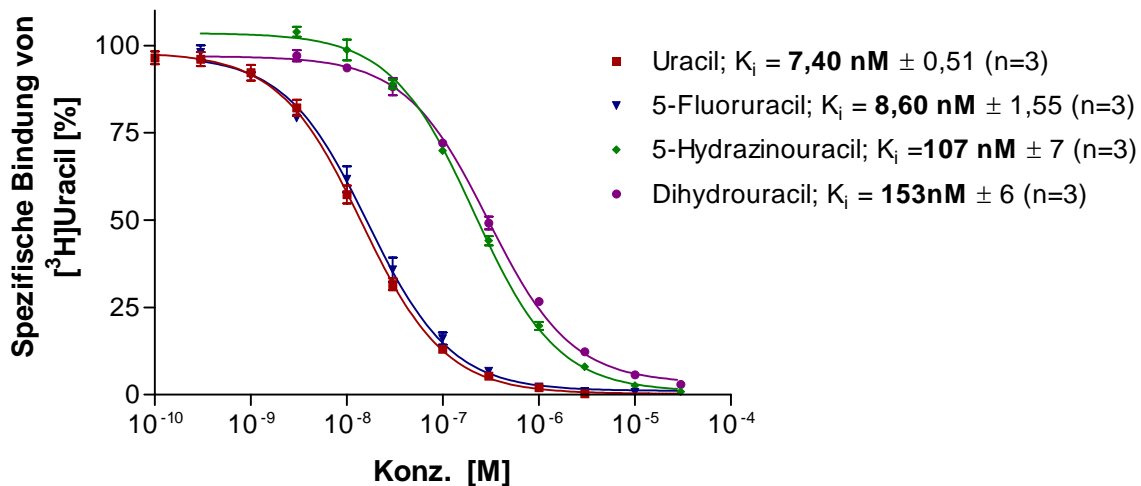


Abb. 2.46: Hemmung der [³H]Uracil-Bindung an **NG108-15-Zellmembranen** durch Uracil und Uracil-Derivate. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist der SEM-Wert durch das Symbol überdeckt).

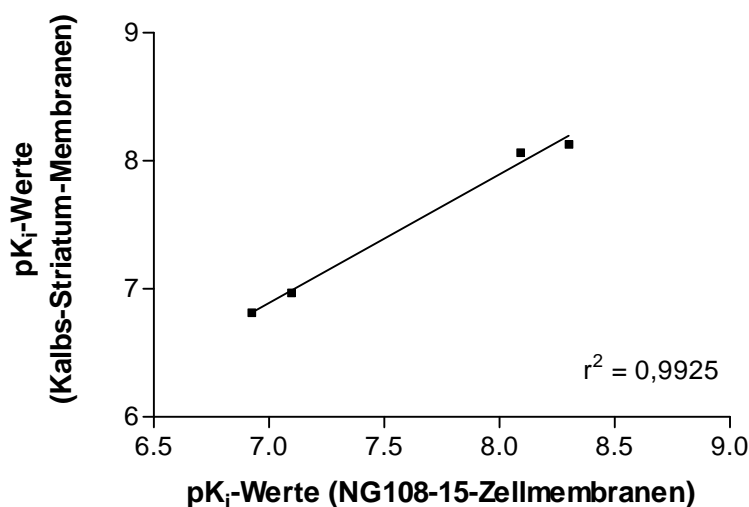
Die Affinität der untersuchten Derivate steigt sowohl bei Kalbs-Striatum als auch bei NG108-15-Zellen in der Reihe 3-Phenacyluracil < 5-Acetyluracil << 5,6-Dihydrouracil < 6-Hydrazinouracil << 5-Fluorouracil < Uracil an. Die K_i -Werte an den beiden Geweben für die Uracil-Derivate unterscheiden sich nur geringfügig. Die Werte sind in **Tab. 2.19** aufgelistet.

Die Werte für den Hill-Koeffizienten (n_H) der Inhibitionskurven lagen zwischen 0,9 und 1,0. Dies deutet auf eine einzige Bindungsstelle hin.

Tab. 2.19: Gegenüberstellung der Affinitäten einiger Uracil-Derivate an Kalbshirn-Striatum- bzw. NG108-15-Zell-Membranpräparationen

Verbindung	$K_i \pm \text{SEM}$ [nM] oder Inhibition [%] \pm SEM bei 10 μM [n=3] an Kalbs-Striatum	K_i [nM] \pm SEM oder Inhibition [%] \pm SEM bei 10 μM [n=3] an NG108-15-Zellen
Uracil	5,06 nM \pm 0,18	7,40 \pm 0,51
5-Fluoruracil	8,12 \pm 0,93	8,60 \pm 1,55
6-Hydrazinouracil	80,1 \pm 9,7	107 \pm 7
5,6-Dihydrouracil	119 \pm 19	153 \pm 6
5-Acetyluracil	> 10.000 (44 % \pm 3)	> 10.000 (24 % \pm 3)
3-Phenacyluracil	> 10.000 (12 % \pm 5)	> 10.000 (4 % \pm 3)

In **Abb. 2.47** sind die pK_i -Werte (negativer dekadischer Logarithmus der K_i -Werte) gegeneinander aufgetragen.

**Abb. 2.47:** Korrelation der pK_i -Werte

Wie **Abb. 2.47** zeigt, besteht zwischen den aus den Affinitäten an Kalbs-Striatum-Membranpräparationen ermittelten pK_i -Werten und den aus den Affinitäten an NG108-15-Zellmembranpräparationen bestimmten pK_i -Werten ein linearer Zusammenhang.

► Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Uracil und die untersuchten Uracil-Derivate nahezu identische Bindungsaffinitäten an Kalbs-Striatum-Membranpräparationen und an Membranpräparationen von NG108-15-Zellen (Ratte-Maus-Hybrid) zeigen. Bei den untersuchten Bindungsstellen in Kalbs-Striatum und NG108-15-Zellen handelt es sich damit mit hoher Wahrscheinlichkeit um die gleichen oder sehr ähnliche Bindungsstellen.

2.8 Charakterisierung von Uracil-Bindungsstellen in verschiedenen Zelllinien

Zur Untersuchung der spezifischen Bindung von [³H]Uracil in verschiedenen Zelllinien wurden Membranpräparationen eingesetzt, welche im Standardassay in einer Proteinkonzentration von 100 µg Protein mit 5 nM [³H]Uracil im Inkubationspuffer (50 mM Tris-Puffer, pH 7,4) 5 h lang bei 37°C inkubiert wurden. Es wurden Gleichgewichtsexperimente durchgeführt, in denen die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung bestimmt wurden. Für die Experimente wurden folgende Zelllinien verwendet:

- **Zellen aus dem Eierstock chinesischer Hamster** (CHO-Zellen, „Chinese Hamster Ovary“-Zellen)
 1. **CHO-K1-Zellen:** native CHO-Zellen
 2. **CHO-hA₁-Zellen:** CHO-Zellen, welche mit dem humanen A₁-Adenosin-Rezeptor transfiziert wurden
 3. **CHO-hA_{2B}-Zellen:** CHO-Zellen, welche mit dem humanen A_{2B}-Adenosin-Rezeptor transfiziert wurden
 4. **CHO-hA₃-Zellen:** CHO-Zellen, welche mit dem humanen A₃-Adenosin-Rezeptor transfiziert wurden

- **menschliche embryonale Nierenzellen** (HEK-Zellen, „Human Embrionic Kidney“-Zellen)
 5. **HEK293-Zellen:** native HEK-Zellen
 6. **HEK-hA₁-Zellen:** HEK-Zellen, welche mit dem humanen A₁-Adenosin-Rezeptor transfiziert wurden

- **Humane T-Leukämiezellen (entartete T-Lymphozyten)**
 7. **Jurkat T-Zellen (Freiburg):** erhalten vom AK Irmgard Merfort aus Freiburg
 8. **Jurkat T-Zellen (Bonn):** erhalten vom AK Karl Schilling, Anatomisches Institut, Universität Bonn

- **Sonstige Zellen**
 9. **1321N1-Astrozytom-Zellen:** humane Astrozytom-Zellen
 10. **NG108-15-Zellen:** Maus-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybrid-Zelllinie
 11. **McA-RH7777-Zellen:** Ratten-Hepatozytomzellen
 12. **C6-Gliom-Zellen:** Ratten-Gliomzellen

Die Ergebnisse sind in **Abb. 2.48** zusammenfassend dargestellt.

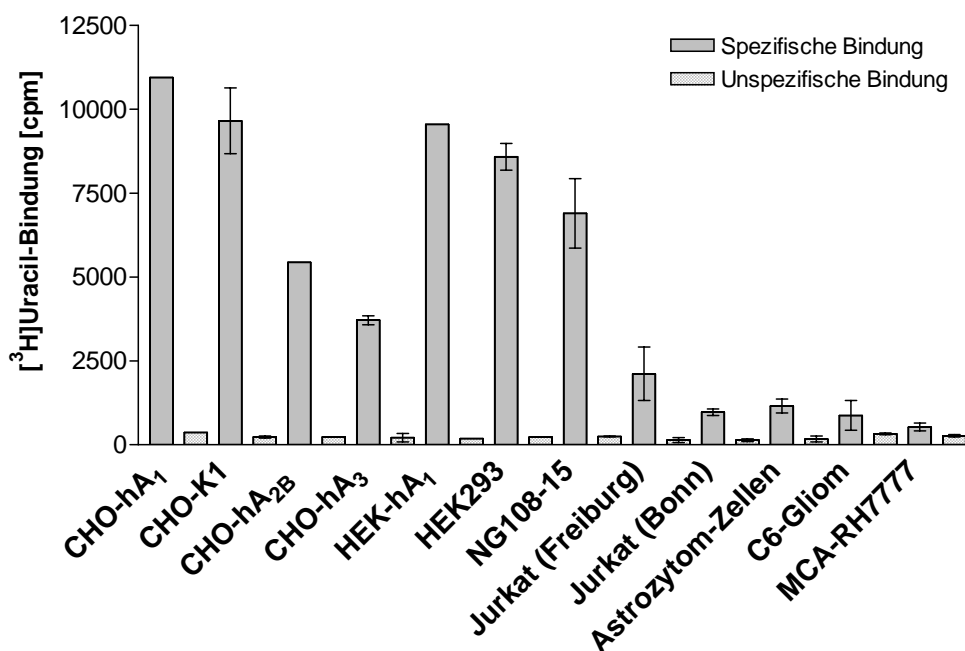


Abb. 2.48: Bindung von [³H]Uracil an Membranpräparationen verschiedener Zelllinien. Die Versuche wurde unter Standardbedingungen (bei einer Radioligandkonzentration von 5 nM, einer Inkubationszeit von 5 h und einer Inkubationstemperatur von 37°C) durchgeführt. Es wurde jeweils eine Proteinmenge von 100 µg pro Reaktionsansatz eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Bei den untersuchten Zelllinien konnte überall eine spezifische Bindung festgestellt werden. Die **CHO-Zellen** – sowohl die mit humanem A₁-Adenosin-Rezeptor transfizierten als auch die nativen – weisen eine hohe spezifische Bindung auf. Da die cpm-Werte für beide Zelllinien ungefähr vergleichbar sind, kann geschlossen werden, dass die hohe spezifische Bindung nicht von den in den transfizierten CHO-Zellen exprimierten A₁-Adenosin-Rezeptoren herrührt, sondern auf eine spezifische Bindungsstelle für Uracil hindeutet. Interessanterweise zeigen die mit humanen A_{2B}-Adenosin-Rezeptoren oder mit humanem A₃-Adenosin-Rezeptoren transfizierten CHO-Zellen eine um etwa die Hälfte niedrigere spezifische Bindung. Der Grund hierfür könnte allerdings auch in der unterschiedlichen Präparation der Zellmembranen liegen. Die **HEK-Zellen** zeigen eine ähnlich hohe spezifische Bindung wie die nativen CHO-Zellen, wobei die cpm-Werte der HEK-hA₁-Zellen sich nicht signifikant von den Werten der nativen HEK293-Zellen unterscheiden. Die **Jurkat T-Zellen**, bei denen es sich um humane T-Leukämiezellen handelt, zeigen je nach Herkunft unterschiedliche cpm-Werte, wobei sie im Vergleich zu den oben diskutierten humanen Zelllinien – mit Ausnahme der CHO-hA_{2B}- und CHO-hA₃-Zellen signifikant weniger Uracil-Bindungsstellen enthalten. Während die spezifische Bindung bei den Jurkat-T-Zellen aus Freiburg 2115 ± 796 cpm beträgt, weisen die Zellen aus Bonn (AK Schilling) nur einen Wert von 972 ± 99 cpm auf. Auch die humanen **1321N1-Astrozytom-Zellen**

zeigen eine relativ niedrige spezifische [³H]Uracil-Bindung (1156 ± 206 cpm) auf. Die **C6-Gliom-Zellen** und die Hepazytomzellen, **McA-RH7777-Zellen**, welche beide aus der Ratte stammen – zeigen im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien eine sehr niedrige spezifische Bindung. Die **NG108-15 Zellen**, eine Maus-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybrid-Zelllinie – dagegen weisen eine sehr hohe, mit den CHO-Zellen vergleichbare, spezifische Bindung auf. Die hohe [³H]Uracil-Bindung ist bei den NG108-15-Zellen vermutlich auf den Maus-Neuroblastom-Anteil zurückzuführen. Die unspezifische Bindung ist bei allen Zelllinien relativ gering und bewegt sich im Bereich von 150 bis 300 cpm. Die genauen cpm-Werte für die unspezifische Bindung können aus der **Tab.2.20** entnommen werden.

Tab. 2.20: Bindung von [³H]Uracil an Membranpräparationen verschiedener Zelllinien

Zelllinie	Spezifische Bindung [cpm] ± SEM [n=2] ^a	Unspezifische Bindung [cpm] ± SEM [n=2] ^a	Spezifische Bindung [%]
CHO-K1-Zellen (Hamster)	9658 ± 981	233 ± 30	98
CHO-hA₁-Zellen (Hamster)	10946 [n=1]	368 [n=1]	97
CHO-hA_{2B}-Zellen (Hamster)	5439 [n=1]	234 [n=1]	95
CHO-hA₃-Zellen (Hamster)	3711 ± 132	214 ± 126	95
HEK293-Zellen (human)	8588 ± 396	233 ± 3	97
HEK-hA₁-Zellen (human)	9548 [n=1]	185 [n=1]	98
Jurkat T-Zellen (Freiburg) (human)	2115 ± 796	141 ± 74	94
Jurkat T-Zellen (Bonn) (human)	972 ± 99	140 ± 42	87
1321N1-Astrozytom-Zellen (human)	1156 ± 206	172 ± 88	87
NG108-15-Zellen (Maus x Ratte)	6896 ± 1035	249 ± 11	97
C6-Gliom-Zellen (Ratte)	876 ± 440	328 ± 27	73
McA-RH7777-Zellen (Ratte)	527 ± 118	268 ± 39	66

^a falls nichts anderes angegeben ist

► Das Uracil-bindende Protein ist nicht nur im Gehirn, sondern auch in peripheren Geweben exprimiert (Ovariale Zellen, Nierenzellen, weniger in Leberzellen). Die Bindungsstelle konnte in Zellen verschiedener Spezies nachgewiesen werden: Mensch, Ratte, Maus, Hamster. Gliom- und Astrozytom-Zellen enthalten deutlich weniger Uracil-Bindungsstellen als neuronale Zellen. Die hohe Dichte in NG108-15-Zellen stammt vermutlich hauptsächlich vom Maus-Neuroblastom-Anteil.

2.8 Funktionelle Untersuchungen

Nachdem die Uracil-Bindungsstelle mithilfe von Kompetitions- und Sättigungsexperimenten charakterisiert und die Existenz der Bindungsstelle in einer Vielzahl von Zelllinien verschiedener Spezies nachgewiesen wurde, sollten funktionelle Experimente folgen. Das Ziel bestand darin, zu untersuchen, ob das Uracil-bindende Protein evtl. eine funktionelle Kopplung an intrazelluläre Botenstoffwege aufweist. Bis dato ist von der Uracil-Bindungsstelle nur bekannt, dass es sich um ein Membranprotein handelt, welches in sehr hoher Dichte in vielen verschiedenen Geweben und Zelllinien vorkommt und Uracil mit hoher Affinität bindet. Nach bisheriger Erkenntnis besteht u.a. die Möglichkeit, dass es sich bei der identifizierten hochaffinen Bindungsstelle um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor handelt, über den die in der Literatur beschriebenen Effekte für Uracil (Kap. 2.1) ausgelöst werden. Um eine Beteiligung an einem Signaltransduktionsmechanismus aufzudecken oder aber auch auszuschließen, wurden verschiedene funktionelle Assays – [³H]cAMP-Akkumulationsassays, [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien und Calcium-Assays – durchgeführt. Die Ergebnisse werden in den Abschnitten 2.8.2 bis 2.8.4 diskutiert.

2.8.1 Signaltransduktion membranständiger Rezeptoren

Membranständige Rezeptoren haben die Funktion, die Signale von Botenstoffen in das Zellinnere weiterzuleiten. Hierzu binden die an der extrazellulären Seite befindlichen Ligand-Bindungsdomänen die Botenstoffe mit hoher Affinität und Selektivität und geben durch Interaktion mit anderen Makromolekülen auf der intrazellulären Seite der Membran das Signal weiter. Die membranständigen Rezeptoren lassen sich in folgende Rezeptorklassen unterteilen:

- **einfach-membrangängige Rezeptoren** (Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität und Rezeptoren mit Serin/Threoninkinase-Aktivität; Beispiele: Insulinrezeptoren, LDL-Rezeptoren und Zytokin-Rezeptoren)
- **Ligand-gesteuerte Ionenkanäle** (ionotrope Rezeptoren; Beispiele: nicotinische Acetylcholin-Rezeptoren und die GABA_A-Rezeptoren)
- **G-Protein-gekoppelte Rezeptoren** (GPCR's, metabotrope Rezeptoren; Beispiele: Adenosin-, Serotonin-, Adrenalin-, Dopamin-, Opioid- und Histamin-Rezeptoren)

Bei den **einfach-membrangängigen Rezeptoren** mit Tyrosinkinase Aktivität (Rezeptor-Tyrosinkinasen) erfolgt nach Bindung des Liganden eine Autophosphorylierung an der Phosphorylierungsdomäne, d.h. an Tyrosinresten des Rezeptors selbst oder eine Phosphorylierung an Tyrosinresten Rezeptor-assoziiierter Proteine, durch die das Signal wiederum an Effektoren weitergeleitet wird. Bei den **Ligand-gesteuerten Ionenkanälen** handelt es sich oft um Rezeptorproteine mit mehreren transmembranären Untereinheiten, wobei eine Pore vorhanden ist, durch welche die Ionen in das Zellinnere transportiert werden können. Die Öffnungswahrscheinlichkeit der Ionenkanäle wird hier durch die Bindung des jeweiligen Liganden beeinflusst, sodass die Signaltransduktion bei den Ligand-gesteuerten Ionenkanälen durch Änderung der Ionenkonzentration in der Zelle erfolgt.

Die **G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)** stellen die größte Gruppe dar. Sie bestehen aus sieben lipophilen, α -helikalen transmembranären Proteindomänen, welche durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Desweiteren besitzen sie einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus. Bei Bindung des Liganden an die im Extrazellulärraum befindliche Ligandbindungsstelle kommt es zur Aktivierung Rezeptor-assoziiierter G-Proteine, welche über die dritte intrazelluläre Schleife an den Rezeptor gekoppelt sind und sekundäre Effekte auslösen. Die G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$, wobei die beiden hydrophoben Untereinheiten $G\beta$ und $G\gamma$ für die Verankerung des G-Protein-Komplexes in der Membran verantwortlich sind. Die α -Untereinheit dagegen enthält die Bindungsstelle für Guanosindi- (GDP) bzw. -triphosphat (GTP). Im inaktiven Zustand ist der $\beta\gamma$ -Komplex mit der GDP-gebundenen α -Untereinheit assoziiert. Dieses Heterotrimer stabilisiert als GDI's („guanine nucleotide dissociation inhibitors“) die GDP-gebundene Form. Bei Bindung des Liganden agiert das GPCR als ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF, „guanine nucleotide exchange factor“), wodurch es zu einem Austausch von GDP gegen GTP kommt. Dies induziert eine Konformationsänderung der α -Untereinheit, sodass die α -Untereinheit

einerseits vom Rezeptor und andererseits vom $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert. Die GTP-gebundene α -Untereinheit sowie der $\beta\gamma$ -Komplex sind nun in der Lage, Wechselwirkungen mit Effektorproteinen einzugehen. Die α -Untereinheit ist eine allosterisch regulierte GTPase, die durch GTPase aktivierende Proteine (GAP's, „GTPase activating proteins“) aktiviert wird. Sie katalysiert die Hydrolyse des gebundenen GTPs zu GDP. Das aus der Hydrolyse von GTP entstehende GDP bleibt an der α -Untereinheit gebunden, die nun mit dem $\beta\gamma$ -Komplex zum Heterotrimer reassoziert. Dies stellt den entscheidenden Inaktivierungsmechanismus dar. Der Rezeptor, welcher zum Zeitpunkt der Dissoziation des G-Protein-Komplexes seine hohe Affinität für Agonisten verloren hat und in einen niedrigaffinen Zustand für Agonisten übergegangen ist, kann nun wieder einen neuen Zyklus eingehen. In **Abb. 2.49** ist der G-Protein-Zyklus dargestellt.

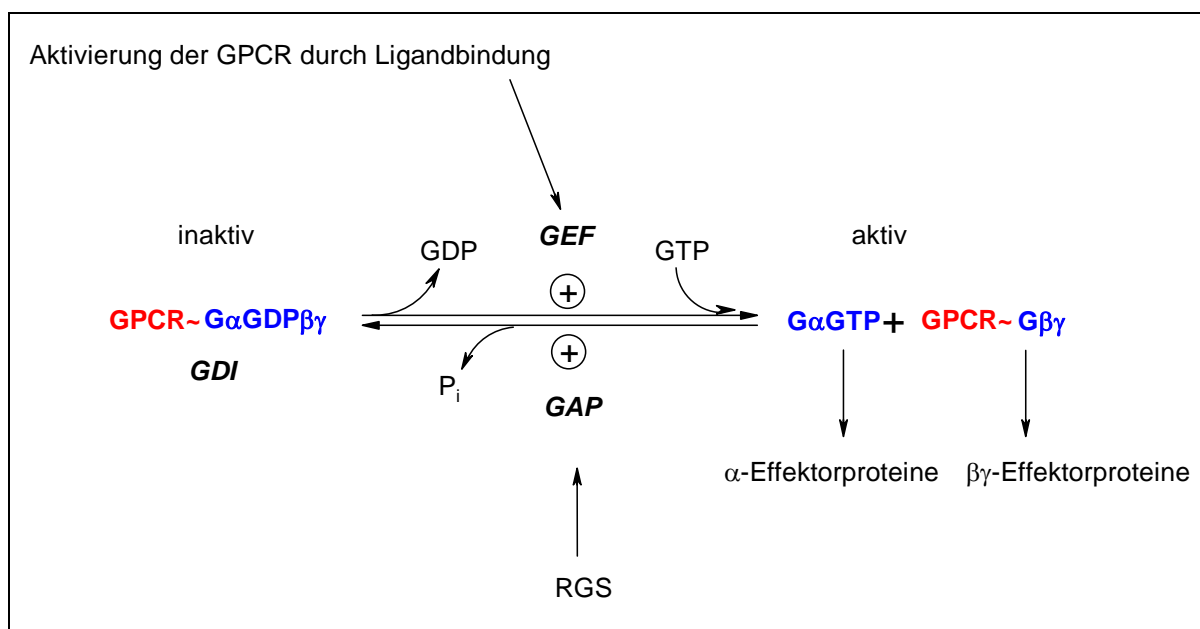


Abb. 2.49: **G-Protein-Zyklus**, modifiziert nach McCudden et.al.²⁶⁰
GEF: Guaninnukleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor)
GAP: GTPase aktivierende Proteine (GTPase activating proteins); **GDI:** Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (guanine nucleotide dissociation inhibitors);
RGS: Regulatorprotein („Regulator of G-protein Signalling“); **P_i:** anorganisches Phosphat

Je nach Art der α -Untereinheit werden unterschiedliche Second-messenger-Systeme aktiviert (u.a. Adenylatcyclase-Kaskade, Phosphoinositol-Kaskade). Zusätzlich vermittelt die $\beta\gamma$ -Untereinheit (unabhängig von der α -Untereinheit) die direkte Aktivierung von Ionenkanälen. Die heterotrimeren G-Proteine weisen eine vielfältige Kombinationsmöglichkeit auf, da im humanen Genom 16 G α -Gene (23 humane G α -Proteine), 5 G β -Gene und 12 G γ -Gene existieren. Die G α -Proteine werden basierend auf Sequenzhomologie in vier Hauptgruppen eingeteilt:

- (1) G $\alpha_{(i1 / i2 / i3 / o / t\text{-rod} / t\text{-cone} / gust / z)}$, (2) G $\alpha_{(q / 11 / 14 / 16)}$ (3) G $\alpha_{(s / olf)}$, (4) G $\alpha_{(12 / 13)}$ ^{261,260}.

Die wichtigsten G α -Protein-Familien und ihre Effektorsysteme sind in **Tab. 2.21** zusammengefasst.

Tab. 2.21: G-Protein-Familien und ihre Effektorsysteme (Auswahl), modifiziert nach Steinhilber et al.¹⁵⁵

G-Protein-Familie	Intrazelluläre Signale	Effektoren	Beispiele
G _s	Adenylatcyclase \uparrow cAMP \uparrow	Proteinkinase A \uparrow L-Ca ²⁺ -Kanal \uparrow ERK1, 2 \uparrow p38 \downarrow	β -Rezeptoren H ₂ -Rezeptor D ₁ , D ₅ -Rezeptoren Adenosin-A _{2A} -Rezeptor 5-HT _{4,5,6,7} -Rezeptor
G _i /G _o	Adenylatcyclase \downarrow → cAMP \downarrow	Proteinkinase A \downarrow K ⁺ -Kanäle \downarrow Ca ²⁺ -Kanäle \downarrow	α_2 -Rezeptor Opioid-Rezeptoren M ₂ , M ₄ -Rezeptor GABA _B -Rezeptoren 5-HT ₁ -Rezeptor Adenosin-A ₁ -Rezeptor
G _q	Phospholipase C \uparrow → IP ₃ + DAG \uparrow	Ca ²⁺ \uparrow Proteinkinase C \uparrow PI ₃ K- β \uparrow Proteinkinase B \uparrow Phospholipase D \uparrow	α_1 -Rezeptor H ₁ -Rezeptor M ₁ , M ₃ , M ₅ -Rezeptoren AT ₁ -Rezeptor B ₁ , B ₂ -Rezeptoren

Abkürzungen: α -Rezeptor: α -adrenerge-Rezeptor β -Rezeptoren: β -adrenerge Rezeptoren **B-Rezeptoren:** Bradykinin-Rezeptoren; **D-Rezeptor:** Dopamin-Rezeptor; **H-Rezeptor:** Histamin-Rezeptor; **M-Rezeptor:** Muskarin-Rezeptor; **5-HT-Rezeptor:** Serotonin-Rezeptor; **AT-Rezeptor:** Angiotensin-Rezeptor; **cAMP:** zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat; **IP₃:** Inositol-1,4,5-triphosphat; **DAG:** Diacylglycerol; **ERK:** „Extra Cellular Signal Regulated Protein Kinase“, ERK1 und ERK2 sind Vertreter der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), **PI₃K:** Phosphatidylinositol-3-Kinase; **p38:** Proteinkinase aus der Familie der MAPK.

Bei der **Adenylatcyclase-Kaskade** katalysiert das Enzym Adenylatcyclase – erstmalig beschrieben von Sutherland und Rall^{262,263} – die Bildung von zyklischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP, **Abb. 2.50**). Dieser sekundäre Botenstoff stimuliert einerseits die Proteinkinase A (PK-A), wodurch es zur Phosphorylierung bestimmter Substratproteine kommt und andererseits können durch cAMP über verschiedene Proteinkinasen MAP-Kinasen^v wie ERK1 und ERK2 aktiviert werden. Die ERK spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellteilung und Proliferation, außerdem tragen sie zu Lernprozessen des Nervensystems bei^{264,265}. Die p38 – eine Proteinkinase aus der Familie der MAPK, welche eine zentrale Rolle in Entzündungsgeschehen und Immunantwort spielt, wird dagegen durch cAMP gehemmt, sodass es dadurch zu einem entzündungshemmenden Effekt kommt²⁶⁵. Desweiteren kann cAMP über die Proteinkinase A Ca²⁺-Kanäle vom

^v MAP-Kinasen = Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

L-Typ stimulieren. Die Adenylatcyclase wird von dem stimulierenden G_s- und dem inhibitorischen G_i-Protein reguliert.

Bei der **Phosphoinositol-Kaskade** wird durch die Katalyse von Phospholipase C aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) die beiden sekundären Botenstoffe Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) (**Abb.2.50**) gebildet. **DAG** aktiviert über einen allosterischen Effekt die Proteinkinase C (PK-C), die eine zentrale regulatorische Rolle in vielen zellulären Prozessen (u.a. Proliferation, Differenzierung, Kontrolle von Genexpression, Apoptose und Modulation von Ionenkanälen) spielt^{266,267}. **IP₃** führt zu einer Ca²⁺-Ausschüttung aus intrazellulären Speichern, wodurch es zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur kommt. Die Aktivierung der Phospholipase C erfolgt durch das G_q-Protein.

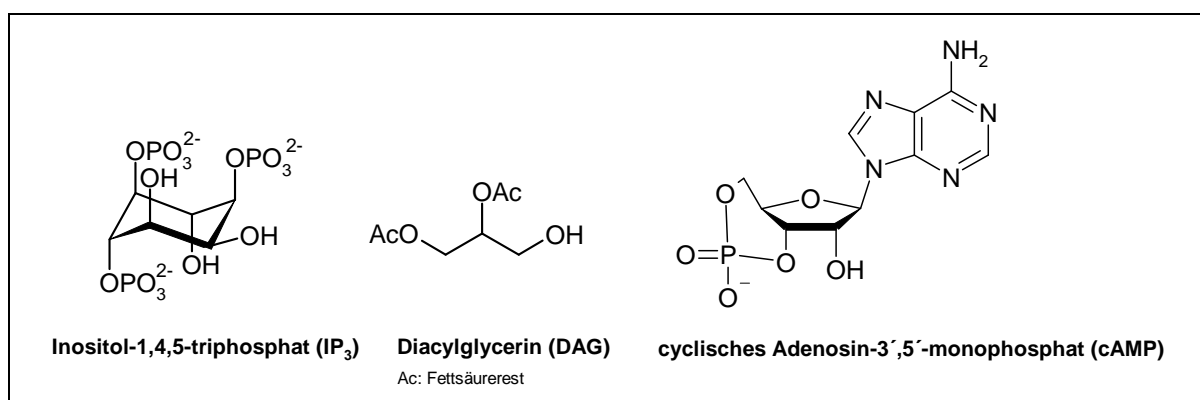


Abb. 2.50: Die sekundären Botenstoffe (second messengers), IP₃ und DAG entstehen durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C; cAMP wird aus ATP durch die Adenylatcyclase gebildet und kann durch die Phosphodiesterase zu AMP (inaktiv) abgebaut werden.

Neben den drei beschriebenen Verbindungen DAG, IP₃ und cAMP ist auch das cyclische Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) ein wichtiger sekundärer Botenstoff²⁶⁸.

Die oben beschriebenen Signaltransduktionswege bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind in **Abb. 2.51** dargestellt.

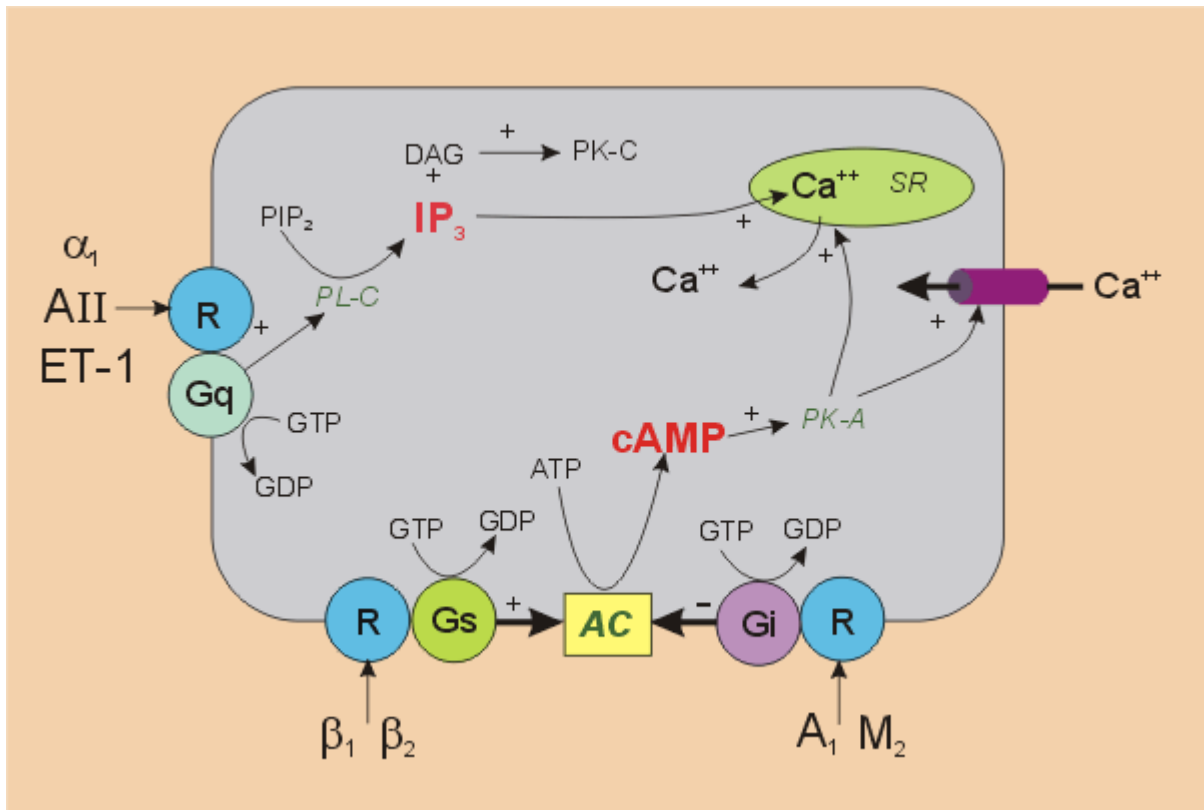


Abb. 2.51: Signaltransduktion bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren
R: Rezeptor; **G_s** und **G_i**: stimulatorische und inhibitorische G-Proteine; **AC:** Adenylatcyclase; **PIP₂**, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; **IP₃**: Inositol-1,4,5-triphosphat; **DAG:** Diacylglycerol; **PK:** Proteinkinase; **PL-C:** Phospholipase C; **SR:** Sarkoplasmatisches Reticulum; **α** und **β:** Adrenozeptor-Agonisten; **M₂**: muskarinischer Rezeptor-Agonist; **A₁**: Adenosin-Rezeptor-Agonist; **AII:** Angiotensin-Rezeptor-Agonist; **ET-1:** Endothelin-1²⁶⁹.

2.8.2 Einfluss von Uracil auf die Forskolin-induzierte cAMP-Akkumulation untersucht an NG108-15-Zellen

Ziel dieser Experimente war es, zu untersuchen, ob Uracil einen Effekt auf die Adenylatcyclase (AC) ausübt. Die Untersuchungen wurden sowohl an Membranen aus NG108-15-Zellen als auch an intakten NG108-15-Zellen durchgeführt. Verwendet wurde ein Testsystem zur Bestimmung der cAMP-Akkumulation (³H]cAMP-Kit von Amersham Biosciences). Wie bereits erwähnt, ist das Enzym Adenylatcyclase verantwortlich für die Bildung von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), welches als sekundärer Botenstoff u.a. die Proteinkinase A aktiviert und so biologische Effekte auslöst. Bei den funktionellen Untersuchungen wird ausgenutzt, dass bei Bindung eines Agonisten an einen G_i-Protein-gekoppelten Rezeptor die Adenylatcyclase gehemmt und bei Bindung an einen stimulatorischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (G_s-Protein-gekoppelten Rezeptor) das Enzym stimuliert wird, sodass es im ersteren Fall zu einer Abnahme und im letzteren zu einer Zunahme der cAMP-Konzentration kommt. Die cAMP-Akkumulation kann mithilfe eines Radioaktiv-Assays bestimmt werden. Zur Messung der AC-Inhibition werden die funktionellen Untersuchungen häufig in Anwesenheit von Forskolin durchgeführt. Forskolin ist ein aus den Wurzeln der indischen Pflanze *Coleus forskohlii* isoliertes Labdan-Diterpen (**Abb. 2.52**), welches eine direkte Wechselwirkung mit der Adenylatcyclase eingeht, diese aktiviert und damit die cAMP-Menge erhöht. Die Stimulierung der Adenylatcyclase durch Forskolin ist notwendig, da ansonsten die cAMP-Menge in der Probe zu gering ist, um einen inhibitorischen Effekt auf die Adenylatcyclase messen zu können. Die in Anwesenheit verschiedener Testsubstanz-Konzentrationen bestimmte cAMP-Menge wird auf die Kontrolle – Forskolin-induzierte maximale cAMP-Menge in Abwesenheit der Testsubstanz – bezogen. Die so ermittelte relative Menge an cAMP in Prozent wird gegen die Ligandkonzentration aufgetragen, um einen EC₅₀-Wert zu erhalten.

Entsprechend kann die Kopplung eines Rezeptors an ein G_s-Protein nachgewiesen werden, indem man eine Zunahme der cAMP-Menge mit steigender Testsubstanz-Konzentration bezogen auf die Negativkontrolle – cAMP-Menge in Abwesenheit von Testsubstanz – ermittelt. Diese Untersuchungen werden in Abwesenheit von Forskolin durchgeführt.

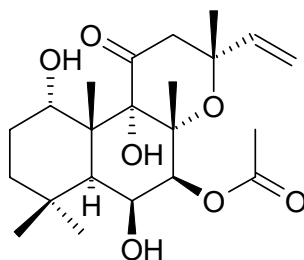


Abb. 2.52: Forskolin

2.8.2.1 Bestimmung der cAMP-Akkumulation in Membranen von NG108-15-Zellen

Zur Bestimmung der cAMP-Akkumulation wurden frisch hergestellte Membranpräparationen von NG108-15-Zellen unter Zusatz von 1 mM ATP sowie 30 μ M Rolipram, einem selektiven cAMP-spezifischen Phosphodiesterase-(PDE4)-Inhibitor²⁷⁰ verwendet (Experimenteller Teil, Kap. 7.5.5). Es wurden sowohl Untersuchungen in Ab- als auch in Anwesenheit von Forskolin durchgeführt.

In **Abb. 2.53** ist die Beeinflussung der cAMP-Bildung durch Uracil ohne eine vorherige Forskolin-Stimulation dargestellt.

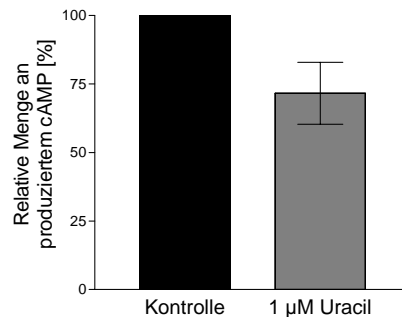


Abb. 2.53: Beeinflussung der cAMP-Akkumulation durch Uracil in Abwesenheit von Forskolin an Membranpräparationen aus NG108-15-Zellen (20 min. Inkubation bei 37°C). Die Kontrolle ohne Zusatz von Uracil wird gleich 100 % gesetzt. Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler des Mittelwertes (SEM), n=3.

Wie aus **Abb. 2.53** ersichtlich, führt Uracil in einer Konzentration von 1 μ M zu einer geringfügigen, nicht statistisch signifikanten, Hemmung der cAMP-Bildung (100 % vs. 72 \pm 11 %, n=3). Eine Stimulierung der Adenylatcyclase (G_s -gekoppeltes Protein) kann damit ausgeschlossen werden. Die gezeigte Tendenz zur Hemmung wurde in weiteren Versuchen, die in Anwesenheit von Forskolin durchgeführt wurden, untersucht. Die Stimulierung der Adenylatcyclase durch Forskolin führte zu einer Zunahme der cAMP Menge von ca. 4 pmol (Basalwert, Kontrolle ohne Forskolin-Zusatz) auf ca. 20 pmol (Maximalwert) pro Reaktionsansatz. Uracil wurde in diesen Experimenten in Konzentrationen von 0,0003 bis 10 μ M eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Abb. 2.54** dargestellt.

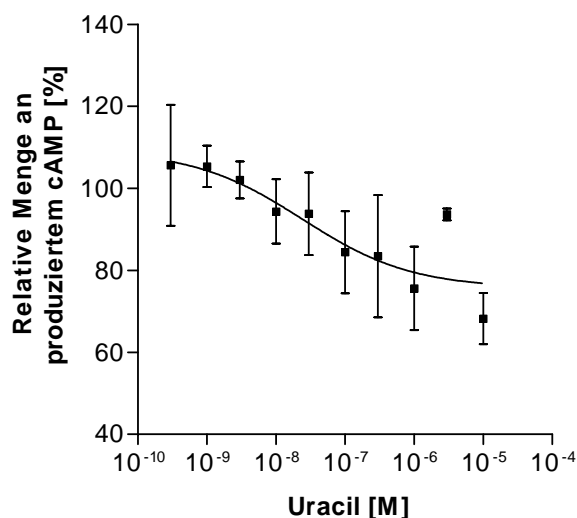


Abb. 2.54: Konzentrationsabhängige Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation durch Uracil, untersucht an Membranpräparationen aus NG 108-15-Zellen (20 min. Inkubation bei 37°C). Die absoluten Mengen an gebildetem cAMP in Abwesenheit von Uracil (Kontrollen) lagen zwischen 18 bis 25 pmol. Als Ergebnis wurde ein EC₅₀-Wert von 24,2 nM ermittelt (n=3).

Die funktionellen Untersuchungen mit Uracil in Anwesenheit von Forskolin zeigen ebenfalls eine Tendenz zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation in Membranen von NG108-15-Zellen. Uracil scheint die vorher durch den Zusatz von Forskolin maximal stimulierte Adenylatcyclase mit einem EC₅₀-Wert von 24,2 nM (95 % Konfidenzintervall 0,13 nM-4,56 µM) zu hemmen. Allerdings ist dieses Ergebnis mit Vorsicht zu betrachten, da zum einen die maximale Inhibition der cAMP-Akkumulation mit nur ca. 30 % bei einer Konzentration von 10 µM sehr gering und zum anderen die Abweichungen sehr groß sind. In zwei weiteren Experimenten, in denen die Inkubationszeit variiert wurde, konnte kein Effekt von Uracil auf die Adenylatcyclase festgestellt werden. Die durch Forskolin-induzierte cAMP-Menge blieb unverändert. Allerdings waren diese Versuche aufgrund einer zu hohen bzw. zu niedrigen Menge an gebildetem cAMP nicht vernünftig auswertbar. Bei einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C betrug die Forskolin-induzierte cAMP-Menge in Abwesenheit von Uracil (Maximalwert) nur 9,7 pmol. Eine Inkubationszeit von 30 Minuten dagegen führte zu einer sehr hohen cAMP-Menge von 84 pmol, welche nicht mehr im kalibrierten Konzentrationsbereich (1-16 pmol) lag, sodass auch für diesen Versuch eine Auswertung nicht möglich war.

2.8.2.2 Bestimmung der cAMP-Akkumulation in intakten NG108-15 Zellen

Neben den Experimenten an Membranpräparationen von NG108-15-Zellen wurde der Einfluß von Uracil auf die Forskolin-stimulierte cAMP-Bildung auch in intakten Zellen untersucht. Abweichend zu den Experimenten mit NG108-15-Membranpräparationen wurde hier der physiologische Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, pH 7,4 unter Zusatz von Adenosindesaminase (ADA) sowie der beiden Phosphodiesterase-Inhibitoren 4-(3-Butoxy-4-methoxyphenyl)methyl-2-imidazolidon (Ro20-1724) und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) verwendet.

In den insgesamt fünf Versuchen an intakten NG108-15-Zellen (Inkubationszeit: 10 bzw. 15 Minuten bei 37°C) konnte keine eindeutige Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP-Bildung nachgewiesen werden. Zwar war in einzelnen Experimenten eine gewisse Hemmung zu beobachten, die Ergebnisse waren jedoch nicht reproduzierbar. Eine mögliche Begründung könnte sein, dass intakte Zellen Uracil schnell abbauen bzw. zellulär aufnehmen, sodass die Verbindung extrazellulär für die Inhibition der Adenylatcyclase nicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Es wurden bereits verschiedene Nucleobasen-Transporter in Säugetierzellen beschrieben (siehe Kap. 1.3).

2.8.2.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Versuche an Membranen besser funktionieren als an intakten Zellen. Bei den Experimenten an intakten NG108-15-Zellen ist eine reproduzierbare Messung sehr schwierig, da vermutlich enzymatische Abbau- und zelluläre Aufnahme-Mechanismen eine Rolle spielen. Die (auswertbaren) Versuche an Membranpräparationen von NG108-15-Zellen deuten auf eine Hemmung hin, jedoch ist die Schwankungsbreite der Messwerte zwischen den einzelnen Versuchen relativ groß. Aufgrund dessen kann zu diesem Zeitpunkt nicht mit Sicherheit angenommen werden, dass Uracil einen Effekt auf die Adenylatcyclase ausübt. Weitere Versuche mit den NG108-15-Zellen – evtl. zusätzlich mit einer anderen Zelllinie – sind nötig, um den Sachverhalt eindeutig zu klären.

2.8.3 [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien

Die [³⁵S]GTPγS-Radioligand-Bindungsstudien stellen neben der Messung der cAMP-Akkumulation eine weitere Methode dar, um die Funktionalität eines Liganden in einem Rezeptorsystem zu untersuchen. Hierbei wird die Affinität des hydrolysestabilen, radioaktiv markierten GTP-Thio-Analogen Guanosin-5'-[γ-³⁵S]triphosphat ([³⁵S]GTPγS, **Abb. 2.55**) zur α-Untereinheit des G-Proteins untersucht.

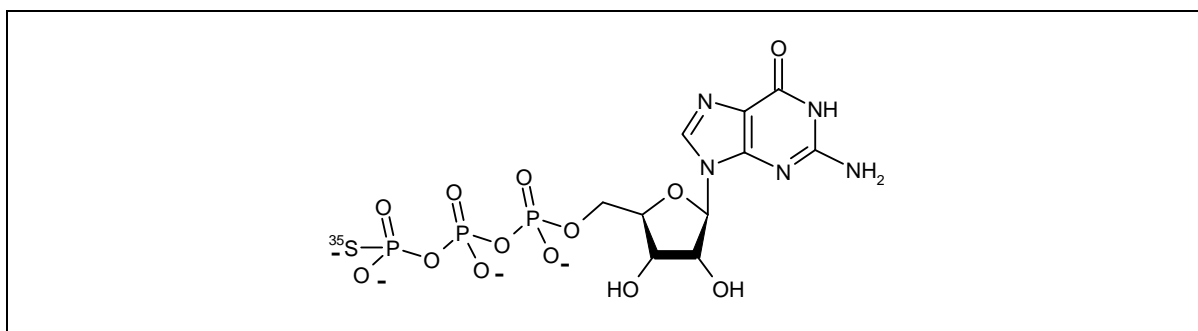


Abb. 2.55: Struktur von [³⁵S]GTPγS

Wie im Abschnitt 2.8.1 bereits beschrieben, ist im inaktiven Zustand an dem G-Protein-αβγ-Komplex GDP gebunden. Die Bindung eines Agonisten an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor führt zu einem Austausch von GDP gegen GTP, sodass das radioaktiv markierte GTPγS an die α-Untereinheit binden kann. Um das Konformations-Gleichgewicht hin zur inaktiven Form zu verschieben, wird bei den Bindungsstudien dem Inkubationspuffer 10 μM GDP und 100 mM Natriumchlorid zugesetzt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wird der Kaltligand GTPγS (10 μM) verwendet, welcher den Radioliganden [³⁵S]GTPγS von der Bindungsstelle am G-Protein verdrängt. Dieser cpm-Wert wird von der mit DMSO bestimmten Gesamtbindung abgezogen und der so ermittelte Wert gleich 100 % gesetzt (= Basalwert).

Ziel dieser Studien war es, zu untersuchen, ob das Uracil-bindende Protein durch Guanin-nukleotide allosterisch moduliert wird. Hierzu wurden Membranpräparationen von Zellen aus dem Eierstock chinesischer Hamster – transfiziert mit humanen Adenosin-A₁-Rezeptoren – verwendet. In unabhängigen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Uracil-Bindungsstellen in dieser Zelllinie in hoher Dichte exprimiert werden (Kap. 2.7). Als Vergleichssubstanz kam N⁶-Cyclopentyladenosin (CPA), ein Vollagonist am Adenosin-A₁-Rezeptor²⁷¹ (G_i/G_o-gekoppelt) zum Einsatz. Uracil wurde in Konzentrationen von 0,01 bis 10 μM eingesetzt.

In **Abb. 2.56** sind die Ergebnisse der Untersuchung von Uracil im Vergleich zu dem Adenosin-A₁-Rezeptoragonisten N⁶-Cyclopentyladenosin (CPA) dargestellt.

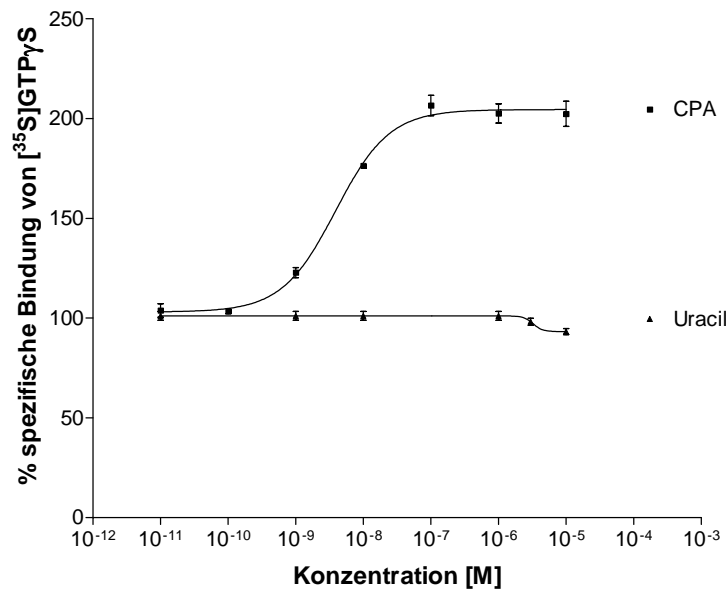


Abb. 2.56: [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudie an Membranpräparationen von Zellen aus dem Eierstock chinesischer Hamster – transfiziert mit humanen Adenosin-A₁-Rezeptoren (CHO-hA₁-Zellen, 5 μg Protein). Als eine Vergleichssubstanz wurde N⁶-Cyclopentyladenosin (CPA, Vollagonist an Adenosin-A₁-Rezeptoren) untersucht. Dargestellt sind die normalisierten Daten (CPA wurde gleich 100 % gesetzt). Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist SEM durch das Symbol überdeckt).

Tab. 2.22 Einfluß von Uracil auf die [³⁵S]GTPγS Bindung

	maximaler Effekt der spezifischen [³⁵ S]GTPγS Bindung relativ zum Basalwert (= 100 %) % ± SEM [n=3]
CPA	202 ± 6
Uracil	93 ± 2

► Die Ergebnisse der [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien zeigen, dass Uracil zu keiner Stimulierung der [³⁵S]GTPγS-Bindung in der verwendeten Zelllinie führt. Die Bindung ist über den gesamten Konzentrationsbereich (0,01 nM-10 μM) nahezu konstant. In den meisten Säugetierzellen werden G_i-Proteine in höherem Maße exprimiert und besitzen zudem einen signifikant höheren Grad an basalem Guaninnukleotid-Austausch als die anderen G-Proteine. Aufgrunddessen kann eine Stimulierung des G_i-Proteins durch die Bindung eines Agonisten an seinen GPCR in der Regel problemlos detektiert werden, während die Stimulierung des G_q/G₁₁ oder G_s-Proteins oft nur zu einer geringfügig und nicht-signifikant höheren Nukleotid-Bindung bezogen auf den Basalwert führt, sodass eine Messung der Stimu-

lierung dieser G-Proteine mit Standard-[³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien nur schwer oder gar nicht möglich ist. Neben der absoluten Konzentration an Rezeptoren und G-Proteinen spielt auch die Rezeptor-G-Protein-Stöchiometrie eine wichtige Rolle^{272,273}. Da die cAMP-Experimente (Abschnitt 2.8.2) darauf hindeuten, dass die Uracil-Bindungsstelle an ein G_i-Protein gekoppelt sein könnte, sollte der Theorie nach ein Anstieg der Guaninnukleotid-Bindung zu beobachten sein. An dieser Stelle muß allerdings erwähnt werden, dass auch Adenin, der endogene Ligand eines G_i-gekoppelten Rezeptors, unter ähnlichen Versuchsbedingungen in Konzentrationen von 0,01 nM-500 μM zu keiner Stimulierung der [³⁵S]GTPγS-Bindung führte²²⁸. Möglicherweise ist im Falle von Uracil und Adenin die G-Protein-Expression im Vergleich zur Dichte der Bindungsstellen zu gering, um einen Anstieg der [³⁵S]GTPγS-Bindung messen zu können.

Folglich schließen diese Experimente eine G-Protein-Kopplung der Uracil-Bindungsstelle nicht zwangsläufig aus, sondern zeigen vielmehr die Notwendigkeit auf, die Versuchsbedingungen weiter zu optimieren, um möglichst auch bei einer geringen Expression des betreffenden G-Proteins eine Stimulierung nachweisen zu können.

2.8.4 Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration in NG108-15-Zellen

Die Aktivierung von Membranrezeptoren kann zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führen. Mittels calciumsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe kann die intrazelluläre Calciumkonzentration an adhärenenten oder suspendierten Zellen bestimmt werden. Fluoreszierende Substanzen können bei Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge Energie aufnehmen und diese innerhalb von 10^{-9} s als Licht einer anderen, längeren Wellenlänge wieder abgeben. Das emittierte Fluoreszenzspektrum ist charakteristisch für eine Verbindung und kann zu deren Qualifizierung und Quantifizierung herangezogen werden.

Fura-2 ist einer der vielen Fluoreszenzfarbstoffe, der mit hoher Affinität ($K_D = 224$ nM) Calcium komplexieren können und dessen Fluoreszenzspektrum sich hierbei ändert. Dieser Fluoreszenz-Farbstoff wurde bei den Testungen in Form seines Acetoxymethylester (Fura-2, AM, **Abb. 2.57**) eingesetzt. Die lipophile, ungeladene Esterform diffundiert passiv durch die Membranen in die Zellen und wird dort durch ubiquitär vorkommende, unspezifische Esterasen gespalten. Die geladene (Ca^{2+} -bindende) Säureform reichert sich im Plasma an, da sie nicht mehr membrangängig ist. Allerdings kann der Farbstoff durch aktive Transportmechanismen der Zellen wieder heraustransportiert werden. Nach Chelatbildung mit Ca^{2+} -Ionen innerhalb der Zelle ändert sich das Fluoreszenzspektrum, sodass ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration detektiert werden kann^{274,275,276}.

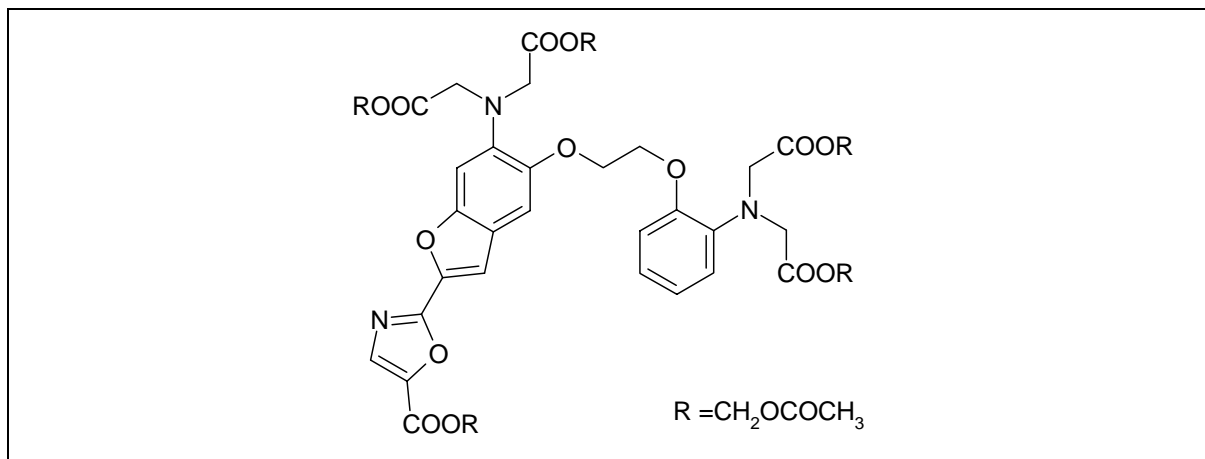


Abb. 2.57: Strukturformel des Fluoreszenzindikators **Fura-2, AM**

Bei den Experimenten wurde bei einer Wellenlänge von 320 nm gearbeitet. Als Positivkontrolle wurde Uridin-5'-triphosphat (UTP), der physiologische Agonist am G-Proteingekoppelten P2Y₂-Rezeptor, verwendet. Durch Bindung des Agonisten an den Rezeptor wird eine Reaktionskaskade ausgelöst, bei der die Phospholipase C aktiviert wird. Es kommt zur Bildung der beiden sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), welches wiederum die Freisetzung von Calciumionen aus den cytosolischen Speichern bewirkt. Diese Mobilisierung des Calciums wird in den

durchgeführten Versuchen durch Fluoreszenzmessungen mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2 bestimmt. Als Negativkontrolle wurde Krebs-Hepes-Puffer eingesetzt. Die Experimente wurden mit NG-108-15-Zellen (Maus-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybrid-Zelllinie) durchgeführt, in denen die Uracil-Bindungsstellen in hoher Dichte exprimiert werden ($B_{\max} = 6,3 \text{ pmol/mg Protein}$). Das Ergebnis eines typischen Experiments, in dem Uracil in Konzentrationen von 0,3-100 μM getestet wurde, ist in **Abb. 2.58** dargestellt.

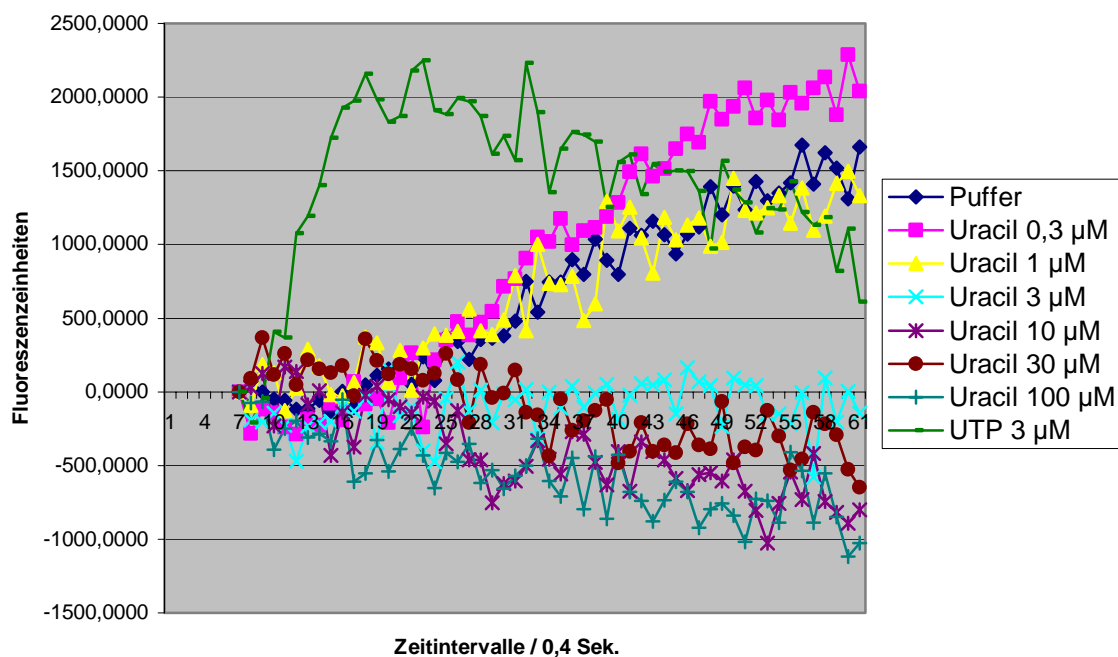


Abb. 2.58: Darstellung des durch Injektion (Injektionszeitpunkt jeder Messung nach 5,6 sec.) verschiedener Lösungen auf NG108-15-Zellen ausgelösten Fluoreszenzanstiegs (Die Zellen waren mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzindikator Fura-2 beladen). Es wurden Lösungen des Uracils in aufsteigender Konzentration injiziert (angegebene Konzentrationswerte sind Endkonzentrationen). Als Negativkontrolle wurde Puffer (Krebs-Hepes-Puffer) injiziert. Als Positivkontrolle wurde der physiologische P2Y₂-Rezeptor-Agonist UTP in einer Konzentration von 3 μM getestet.

► Die Ergebnisse zeigen, dass Uracil in Konzentrationen von 0,3-100 μM verglichen mit Krebs-Hepes-Puffer als Negativ- sowie UTP (3 μM) als Positivkontrolle keinen signifikanten Fluoreszenzanstieg zeigt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die intrazelluläre Calciumkonzentration durch den Zusatz von Uracil in den untersuchten Zellen (NG108-15) nicht beeinflusst wird, zumindest handelt es sich wohl nicht um einen Gq-gekoppelten Rezeptor, da ansonsten ein schneller Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration hätte beobachtet werden müssen, wie es bei UTP der Fall war.

2.8.5 Zusammenfassung und Diskussion

Die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der cAMP-Akkumulation deuten darauf hin, dass Uracil zu einer Inhibierung der Adenylatcyclase in NG108-15-Zellmembranpräparationen führt ($EC_{50} = 24,2$ nM). Diese Beobachtung konnte allerdings in intakten NG108-15-Zellen nicht bestätigt werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass in intakten Zellen im Vergleich zu den Membranpräparationen enzymatische Abbau- und zelluläre Aufnahme-Mechanismen eine (bedeutendere) Rolle spielen, sodass dadurch eine reproduzierbare Messung erschwert oder sogar unmöglich ist. In [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien konnte keine Modulierung eines G-Proteins durch Uracil nachgewiesen werden. Uracil zeigte auch in einer hohen Konzentration von 10 μ M keinen Effekt auf die [³⁵S]GTP γ S-Bindung. Allerdings ist dieser Assay sehr stark abhängig von den Versuchsbedingungen, die möglicherweise noch optimiert werden müßten. In Calcium-Assays führte Uracil in Konzentrationen von 0,03-100 μ M zu keinem Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration in NG108-15-Zellen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die funktionellen Untersuchungen keinen eindeutigen Beweis dafür liefern, dass es sich bei der hochaffinen Uracil-Bindungsstelle um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor handelt. Die Ergebnisse der cAMP-Versuche zeigen zwar eine Tendenz zur Inhibierung der Adenylatcyclase, was auf eine G_i/G_o-Kopplung hindeutet, jedoch ist die bestehende Datenlage nicht ausreichend, um diese Vermutung zu untermauern. Weitere Experimente müssen folgen, um eindeutige Aussagen machen zu können. Auch sind die bisher gut untersuchten GPCRs in der Regel in geringerer Dichte exprimiert als die hier beschriebene Uracil-Bindungsstelle.

Kapitel 3

Vorversuche zur Identifizierung des Uracil-bindenden Proteins mittels Photoaffinitätsmarkierung

3.1 Einleitung

Mittels Radioligand-Bindungsstudien konnte für Uracil eine spezifische hochaffine Bindungsstelle mit einer sehr hohen Dichte in nahezu allen untersuchten Geweben und Zelllinien identifiziert werden. Das Membranprotein, an das sich Uracil sowie einige Uracil-Derivate mit hoher Affinität binden, ist bis dato unbekannt. Zur Identifizierung des Proteins erscheint die Methode der Photoaffinitätsmarkierung mit anschließender SDS-PAGE, Autoradiographie und (MALDI-TOF)-Massenspektroskopie als am besten geeignet. Mithilfe dieser Techniken sollte es möglich sein, die Proteinsequenz zu identifizieren, um auf diesem Wege zu der entsprechenden Gensequenz zu gelangen.

Da das Genom des Rindes noch nicht vollständig sequenziert ist, erscheint es ungünstig, die Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation als Quelle für die Uracil-Bindungsstellen für die Photoaffinitätsmarkierung zu verwenden. Gut geeignet sollte dagegen die Rattenhirn-Striatum-Membranpräparation sein, welche zwar im Vergleich zur Kalbs-Striatum-Membranpräparation eine niedrigere, aber immer noch ausreichend hohe Dichte an Uracil-Bindungsstellen ($B_{\max} = 19,3 \pm 5,3$ pmol/mg Protein) aufweist. Das Rattengenom ist nach dem des Menschen und dem der Maus die dritte DNA-Sequenz eines Säugtieres, die entschlüsselt wurde. Sie besteht aus ungefähr 25000 Genen, von denen 90 % auch beim Menschen und der Maus vorkommen²⁷⁷.

Um eine möglichst hohe Ausbeute an markiertem Protein zu erhalten kombiniert mit einer sehr niedrigen oder im Idealfall gar keiner unspezifischen kovalenten Bindung, ist es sinnvoll, eine grobe „Vorrreinigung“ bzw. Anreicherung der Uracil-Bindungsstellen vorzunehmen.

Als Vorbereitung für die Photoaffinitätsmarkierung wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt, um wichtige Punkte im vorab zu klären. Zum Teil wurden für die Vorversuche Kalbshirn-Striatum- anstatt Rattenhirn-Striatum-Membranpräparationen verwendet, da die Kalbshirne einfacher und kostengünstiger zu erwerben sind und es für die meisten Vorversuche keine wichtige Rolle spielt, aus welcher Spezies die Bindungsstellen stammen.

3.2 Photoaffinitätsmarkierung

3.2.1 Prinzip der Photoaffinitätsmarkierung

Zur Identifizierung und Untersuchung von Rezeptoren und anderen Targetproteinen sind Photoaffinitätsmarkierungen, insbesondere in Kombination mit Radioaktivmarkierung der Liganden, in der aktuellen Forschung von hohem Stellenwert^{278,279,280,281}. Der entsprechend derivatisierte spezifische Ligand wird mit der Proteinsuspension, welche die entsprechenden Bindungsstellen enthält, unter optimierten Bedingungen inkubiert. Nach Einstellung des Gleichgewichts wird der Ligand durch Bestrahlung mit UV-Licht zum Eingehen einer kovalenten Bindung mit benachbarten Aminosäuren angeregt, wodurch es zu einer Fixierung des ansonsten labilen Gleichgewichts zwischen dem Liganden und dem Protein kommt. Durch anschließende denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Autoradiographie kann das markierte Protein detektiert werden. Von diesem Protein kann mittels der (MALDI-TOF)-Massenspektroskopie die Proteinsequenz identifiziert werden, welche letztendlich zur Ermittlung der Gensequenz des Proteins führt.

Die spezifische Markierung von Membranproteinen gestaltet sich aufgrund der Vielzahl von in der Membran befindlichen Proteinen und Lipiden in der Regel schwieriger als Photoaffinitätsmarkierungen von aufgereinigten, gelösten Proteinen. Trotzdem ist diese Technik ein sehr vielversprechendes Verfahren, womit gezielt Membranproteine identifiziert und untersucht werden können.

Die in Photoaffinitätsmarkierungen eingesetzten Liganden besitzen lichtempfindliche funktionelle Gruppen wie z.B. eine Diazo- oder Azido-Funktion. Nach Anregung mit UV-Licht (250-300 nm) kommt es zur Stickstoff-Abspaltung, sodass Nitrene²⁸² und Carbene²⁸³ entstehen (**Abb. 3.1**). Diese Intermediate sind sehr reaktiv und gehen kovalente Bindungen mit nucleophilen NH-, SH- und OH-Gruppen der umliegenden Aminosäuren ein. Desweiteren kommt es zu Additionsreaktionen mit Doppelbindungen an aromatische Systemen. Phenyl(trifluormethyl)diazirin ist ein Beispiel für ein wichtiges Photoaffinitätsreagenz. Nach Bestrahlung entsteht ein äußerst reaktives Carben, das *in situ* durch Insertion in benachbarte Hydroxyl-, Amino- oder auch C-H-Bindungen reagiert²⁸⁴ (**Abb. 3.1**).

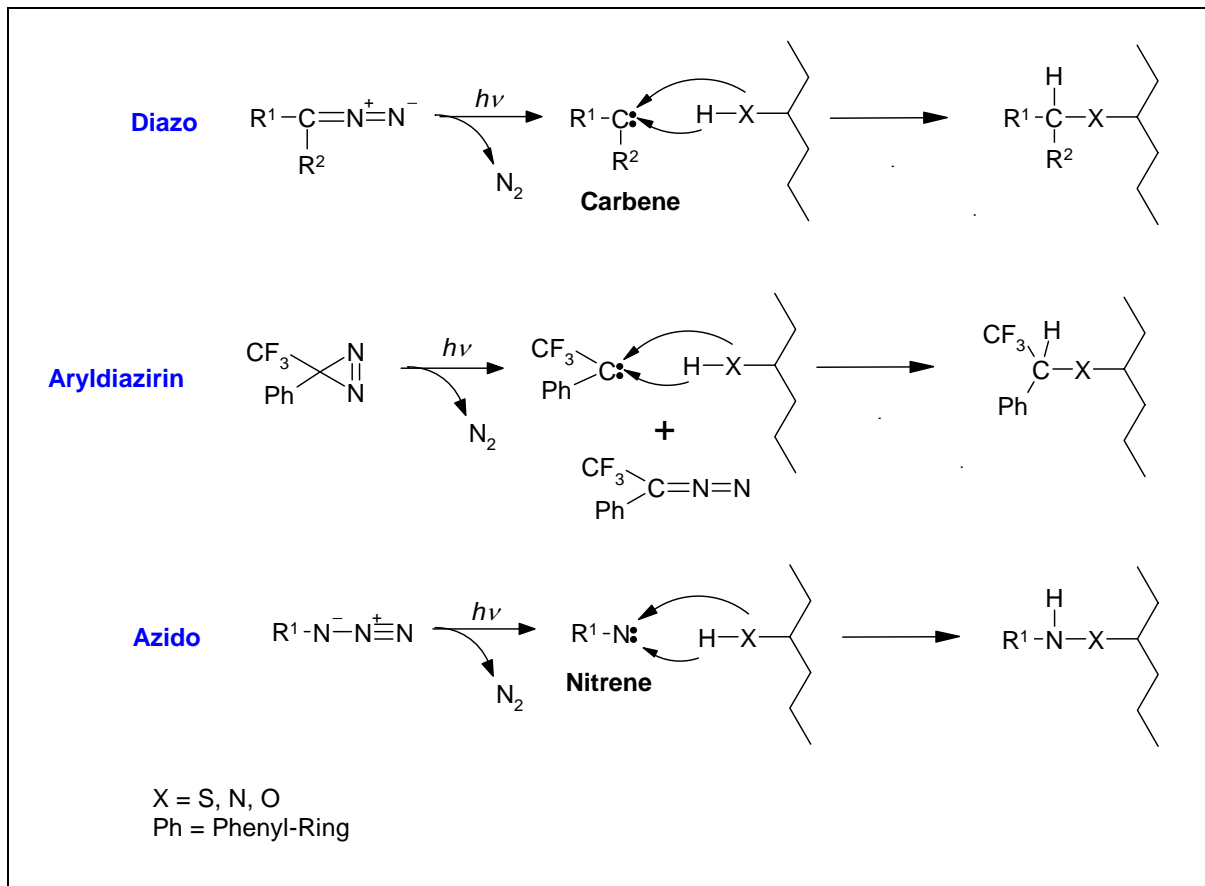


Abb. 3.1: Ausgewählte, für Photoaffinitätsmarkierungen von Membranproteinen geeignete photolabile Gruppen. Durch Bestrahlung entstehen Carbene und Nitrene, welche kovalente Bindungen mit nucleophilen OH-, NH- und SH-Gruppen eingehen können.

3.2.2 Markierungsstrategie

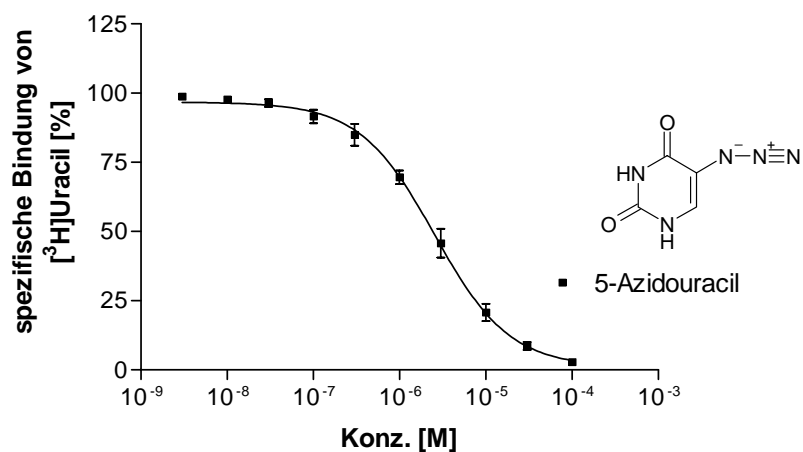
Zur Photoaffinitätsmarkierung von Uracil soll eine Azido-Gruppe als photolabile Gruppe zum Einsatz kommen. Da nach bisheriger Erkenntnis eine Substitution in Position 5 am besten toleriert wird, liegt die Vermutung nahe, dass 5-Azidouracil die beste Affinität aufweisen wird. Da jedoch in Position 6 eine Hydrazino-Gruppe ebenfalls eine recht hohe Affinität ($K_i = 80 \text{ nM}$) besitzt, werden auch 6-Azido-Derivate in Erwägung gezogen. Um zeigen zu können, dass das Photoaffinitätsreagenz spezifisch an die Bindungsstelle bindet, muß anhand von Konkurrenzexperimenten gezeigt werden, dass der photolabile Ligand den Radioliganden kompetitiv hemmt. Daneben spielt natürlich auch die Affinität des Liganden für Photoaffinitätsmarkierungen eine bedeutende Rolle. Je höher die Affinität des Liganden, desto leichter und wahrscheinlicher ist es, ausschließlich das gesuchte Protein zu markieren. In **Tab. 3.1** sind die Affinitäten von verschiedenen 5- bzw. 6-Azido-Derivaten^w zur Uracil-Bindungsstelle aufgelistet.

^w synthetisiert von Herrn Dr. Huu Phuoc Le aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. C. E. Müller, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn

Tab. 3.1: Vergleich der Affinitäten von **Azido-Derivaten** zur Uracil-Bindungsstelle an Kalbs-hirn-Striatum-Membranpräparationen (n=3).

Verbindung	R ⁵	R ⁶	K _i [nM] ± SEM oder
			Inhibition [%] der Radioligand-Bindung ± SEM bei 10 μM [n=3]
5-Azidouracil	N ₃	H	1270 ± 220
6-Azidouracil	H	N ₃	> 10.000 (21 % ± 1)
6-Azido-5-bromuracil	Br	N ₃	>> 10.000 (3 % ± 2)
6-Azido-5-fluoruracil	F	N ₃	>> 10.000 (1 % ± 1)

Wie bereits vermutet, weist von den getesteten Azido-Derivaten nur 5-Azidouracil eine im niedrigen mikromolaren Bereich liegende Affinität ($K_i = 1,3 \mu\text{M}$) zur Uracil-Bindungsstelle auf. Die anderen zeigen in einer Konzentration von 10 μM keine signifikante Verdrängung der Radioligandbindung. Die Hemmkurve von 5-Azidouracil ist in **Abb. 3.2** dargestellt.

**Abb. 3.2:** Hemmung der [³H]Uracil-Bindung an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen durch **5-Azidouracil**. Als Ergebnis wurde ein K_i -Wert von **1,27 μM ± 0,22** (n=3) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (für einige Punkte ist SEM durch das Symbol überdeckt).

Aufgrund dieser Ergebnisse wird [^3H]5-Azidouracil als mögliches Photoaffinitätsreagenz ermittelt, welches synthetisiert und zur Markierung des gesuchten Proteins verwendet werden soll. Allerdings ist die direkte Tritiumierung von 5-Azidouracil bzw. 5-Azido-6-Chloruracil nicht möglich, da bei der Hydrierung die Azido-Gruppe ebenfalls reduziert wird. Aus diesem Grund muß von einem triierten Molekül ausgehend die benötigte Verbindung [^3H]5-Azidouracil in einer Radioaktivsynthese hergestellt werden (**Abb. 3.3**).

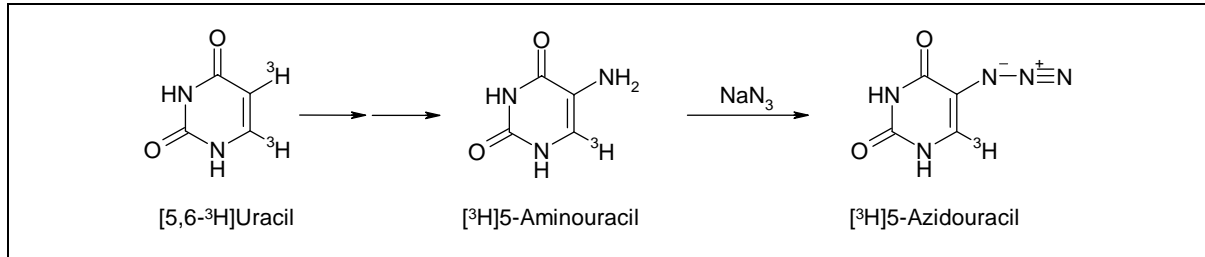


Abb. 3.3: Geplanter Radioligand [^3H]5-Azidouracil

Abb. 3.4 zeigt die Photoaffinitätsreaktion mit dem geplanten Photoaffinitätsreagenz [^3H]5-Azidouracil.

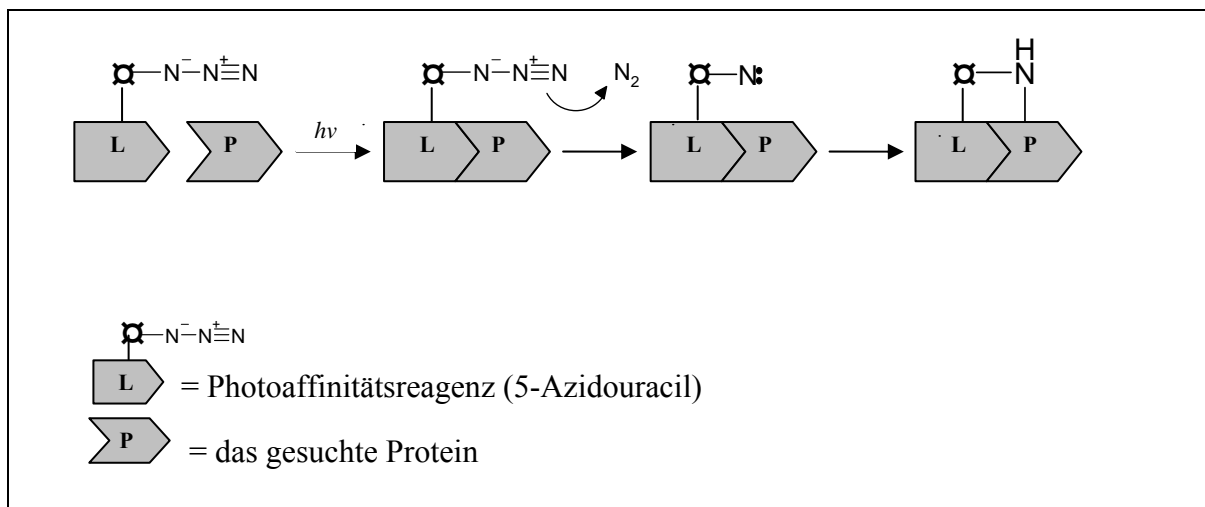


Abb. 3.4: Darstellung der geplanten Photoaffinitätsreaktion mit 5-Azidouracil

3.2.3 Überprüfung der kovalenten Bindung mit 5-Azidouracil

Um zu untersuchen, ob und zu welchem Grad das Photoaffinitätsreagenz eine kovalente Bindung mit dem Protein eingeht, wird das Protein mit 5-Azidouracil ($100 \mu\text{M}$) bzw. mit Uracil ($100 \mu\text{M}$) als Kontrolle 5 h bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wird der Ansatz 2 Minuten lang bestrahlt (254 nm , $50/60 \text{ Hz}$, 14 VA , 8 W) und danach dreimal bei 48000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Hierdurch soll der nicht kovalent gebundene Ligand herausgewaschen werden. Die Pellets werden in Tris-Puffer aufgenommen

und bis zur Weiterbehandlung bei -80°C eingefroren. Die Ergebnisse der Standardassays nach der Vorbehandlung sind in **Abb. 3.5** dargestellt.

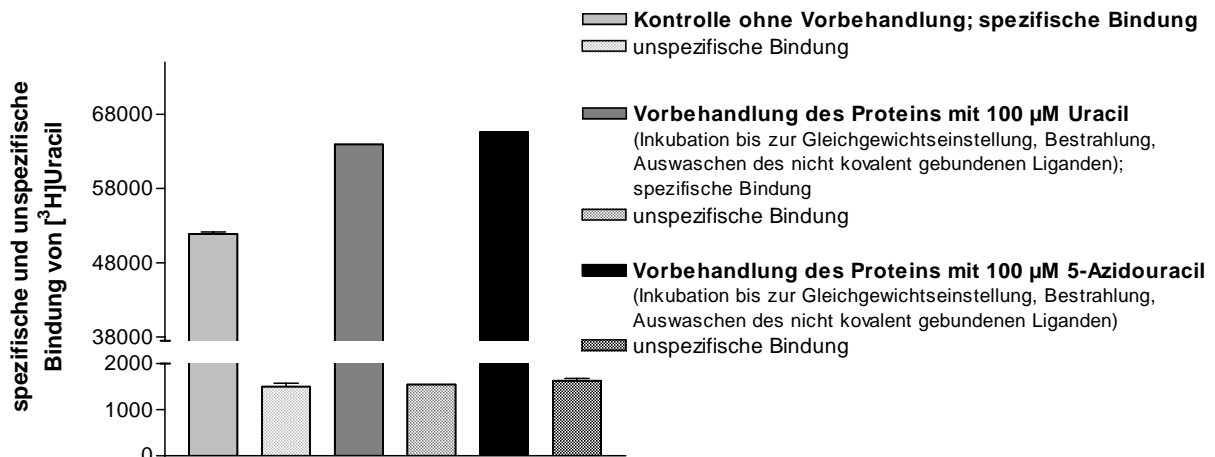


Abb. 3.5: Spezifische und unspezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{Uracil}$ an Rattenhirn-Striatum-Membranpräparationen ohne und mit Vorbehandlung (siehe Legende). Der Assay wurde mit Ausnahme der Proteinmenge ($100\ \mu\text{g}$) unter Standardbedingungen durchgeführt. Dargestellt ist ein Vorversuch in Zweifachbestimmung.

Wie aus **Abb. 3.5** ersichtlich, ist die spezifische $[^3\text{H}]\text{Uracil}$ -Bindung sowohl nach Vorbehandlung mit Uracil als auch mit 5-Azidouracil nahezu identisch. Dies zeigt, dass das photolabile 5-Azidouracil durch die Vorbehandlung nicht wie erwartet kovalente Bindungen mit nucleophilen Gruppen der Aminosäuren eingegangen ist und die Uracil-Bindungsstellen blockiert hat. Die Bestrahlungsdauer und -Intensität hat offensichtlich nicht ausgereicht, um die Bildung eines reaktiven Nitrens aus dem Azido-Derivat anzuregen. In Zukunft sollte dieser Vorversuch mit einer höheren Bestrahlungsintensität durchgeführt werden. Interessanterweise ist die spezifische Bindung ohne Vorbehandlung niedriger als die Bindung nach einer Vorbehandlung. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die zusätzlichen Waschschrte eventuell noch in der Membranpräparation vorhandenes Uracil entfernt wird, sodass es zu einer höheren spezifischen Bindung von $[^3\text{H}]\text{Uracil}$ kommt. Sicher ist, dass die dreimalige Zentrifugation ($48000\ \text{g}$, 4°C , $10\ \text{min.}$) gut geeignet ist, nach der Photoaffinitätsreaktion den nicht kovalent gebundenen Liganden aus der Proteinsuspension zu entfernen. Da man bei der Photoaffinitätsmarkierung nur das gesuchte, durch die kovalente Bindung radioaktiv markierte, Protein detektieren möchte, ist es sehr wichtig, nach der Bestrahlung den störenden ungebundenen Liganden weitestgehend aus dem Ansatz zu entfernen.

3.3 Solubilisierung von Kalbshirn-Striatum-Membranen

Membranproteine sind aufgrund ihrer Hydrophobizität unlöslich in wässrigen Medien und müssen mit Hilfe von Detergenzien in eine lösliche Umgebung überführt werden. Die Aufreinigung eines Membranproteins beginnt daher unvermeidlich mit der Solubilisierung. Hierbei sind sowohl die Auswahl des richtigen Detergenzes als auch die richtigen Solubilisierungsbedingungen für eine effektive Solubilisierung von großer Bedeutung.

Ziel der Untersuchungen war es, ein geeignetes Detergenz zu finden, welches die Membran mitsamt der Uracil-Bindungsstellen-enthaltenen Membranproteine solubilisiert, ohne dabei im Idealfall die spezifische Bindung von [³H]Uracil zu beeinträchtigen. Die Methode, membrangebundene Proteine über ein Detergenz zu solubilisieren, ist weitverbreitet. Die Detergenzien CHAPS, Lubrol-PX, Natriumdesoxycholat, *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid, Triton X-100 und Zwittergent 3-12 finden für die Solubilisierung nativer Membranproteine häufig Verwendung²⁸⁵.

3.3.1 Detergenzien zur Solubilisierung

Die Detergenzien werden aufgrund ihrer Struktur allgemein in vier Klassen eingeteilt:

1. ionische Detergenzien,
2. Gallensäuresalze,
3. nichtionische Detergenzien,
4. zwitterionische Detergenzien.

Die **ionischen Detergenzien** besitzen eine hydrophile Kopfgruppe mit einer Ladung, welche kationisch oder auch anionisch sein kann und eine hydrophobe Kohlenwasserstoffkette bzw. ein Steroidgrundgerüst. Die ionischen Detergenzien (z.B. SDS), die sphärische Mizellen bilden, sind bei der Solubilisierung von Membranproteinen zwar sehr effektiv, führen allerdings nahezu immer zu einer Denaturierung des Proteins. Einige Proteine lassen sich durch Überführen in eine andere Detergenzlösung wieder renaturieren^{286,287}. Die **Gallensäuresalze** sind ionische Detergenzien, die im Gegensatz zu SDS ein starres Steroidgrundgerüst besitzen. Folglich haben sie polare und unpolare Bereiche anstatt einer eindeutig definierten Kopfgruppe. Sie bilden kleine nierenförmige Aggregate. Es handelt sich hierbei um milde Detergenzien, die im Vergleich zu den linearkettigen Detergenzien mit der selben Kopfgruppe weniger denaturierend sind²⁸⁸.

Die **nichtionischen Detergenzien** enthalten ungeladene hydrophile Kopfgruppen aus Polyoxyethylen- oder glykosidischen Gruppen. Sie sind milde und relativ wenig denaturierende Detergenzien, wobei sie Lipid-Lipid-Wechselwirkungen und Lipid-Protein-Wechselwirkungen eher stören als Protein-Protein-Wechselwirkungen. Viele Membranproteine können mit nichtionischen Detergenzien solubilisiert werden, ohne die strukturellen Eigen-

schaften der Proteine zu beeinflussen. Kurzkettige (C_7 - C_{10}) nichtionische Detergenzien wie z.B. n-Octyl- β -glukopyranosid wirken im Vergleich zu den entsprechenden langkettigen (C_{12} - C_{14}) Detergenzien stärker denaturierend²⁸⁹. Die **zwitterionischen Detergenzien** vereinen die Eigenschaften von ionischen und nichtionischen Detergenzien und sind in der Regel denaturierender als die nichtionischen Detergenzien. Sie finden Anwendung bei Struktur-Analysen von Membranproteinen. In **Abb. 3.7** sind einige häufig verwendete Detergenzien dargestellt.

Inzwischen gibt es auch „alternative“ Detergenzien, die im Vergleich zu den traditionellen Detergenzien weniger destabilisierend wirken sollen:

Tripod-Amphiphile enthalten ein tetrasubstituiertes Kohlenstoffatom, welches drei hydrophobe Reste und eine polare Kopfgruppe besitzt. Der polare Teil enthält ein Amid oder ein Amidoxid. Sie wurden bereits erfolgreich zur Solubilisierung von Bakteriorhodopsin und Kalbs-Rhodopsin verwendet, wobei die Proteine als Monomere in einer dem nativen Zustand ähnlichen Form erhalten werden konnten^{290,291}.

Amphipole sind makromolekulare Detergenzien, die aus einer aliphatischen Kette mit hydrophilen, geladenen Seitenketten bestehen. Das Molekulargewicht der bisher synthetisierten Amphipole liegt bei 70 bzw. 280 kDa. Nach Tribet et. al. bilden die Amphipole mit dem Protein einen stabilen Amphipol/Protein-Komplex. Die optimale Stöchiometrie, d.h. die Anzahl der Moleküle Amphipol pro Molekül Protein variiert je nach untersuchtem Protein. Es konnte bereits in vielen Fällen (u.a. Bakteriorhodopsin, Cytochrom b6f-Komplex^x und Ca^{2+} -ATPase) gezeigt werden, dass die Amphipole wasserunlösliche Membranproteine in Lösung halten können, wobei die meisten untersuchten Proteine ihre Aktivität behielten^{292,293,294}.

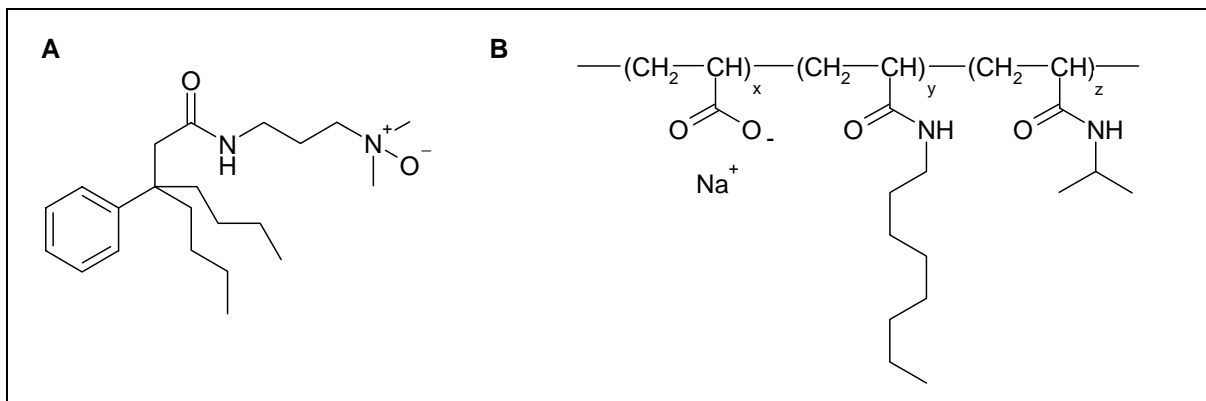


Abb. 3.6: Alternative Detergenzien
A: Beispiel für ein **Tripod-Amphiphil**, **B:** Struktur der **Amphipole**

^x Cytochrom b6f-Komplex (Plastoquinol-Plastocyanin-Reduktase, EC 1.10.99.1) ist ein Enzym, welches in Photosynthese-Mechanismen involviert ist.

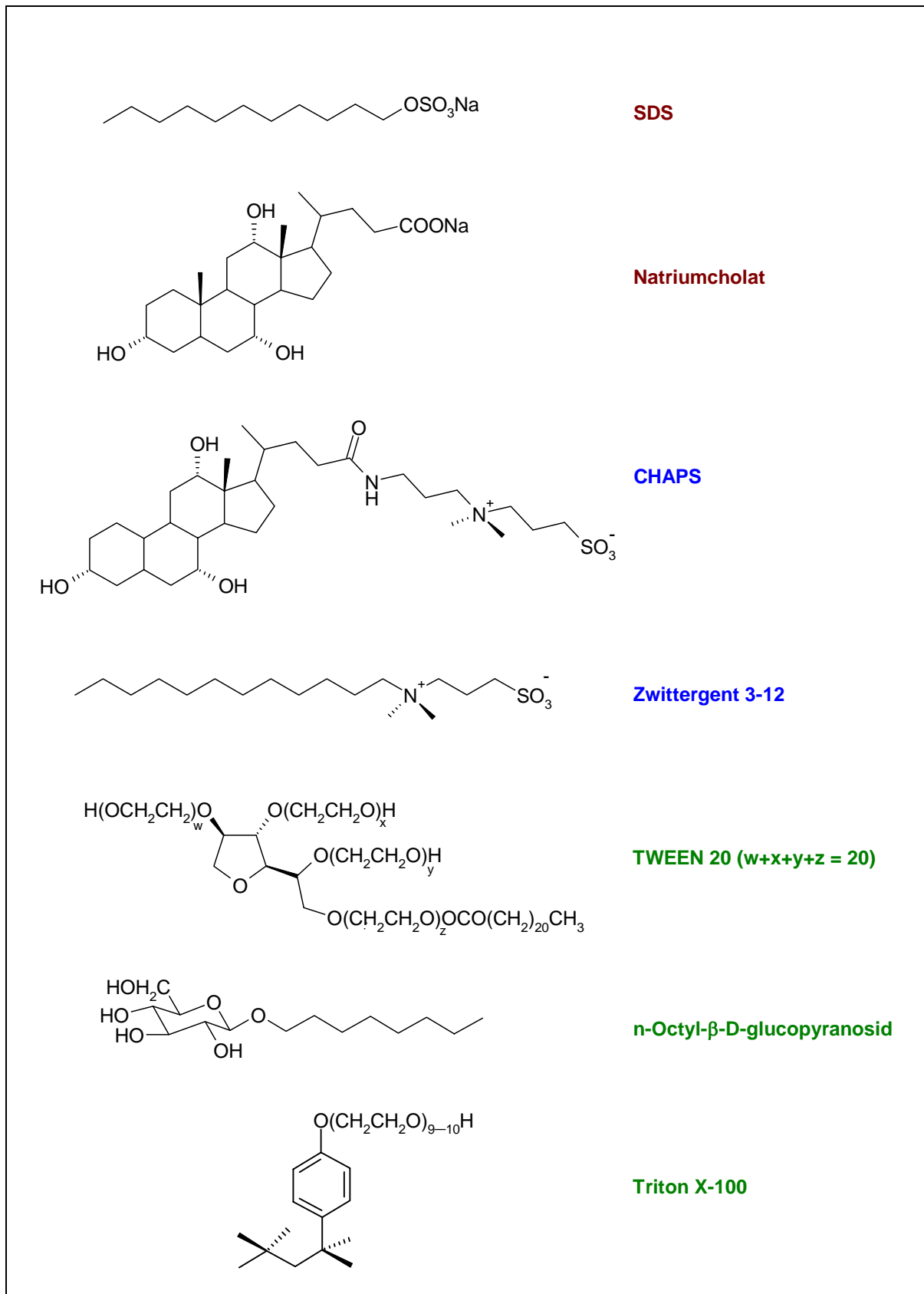


Abb. 3.7: Strukturen ausgewählter ionischer (rot), zwitterionischer (blau) und nichtionischer (grün) Detergenzien, die für die Solubilisierung von Membranproteinen geeignet sind.

3.3.2 Wahl des geeigneten Detergenzes

Für die Solubilisierung wurde das nichtionische Detergenz **n-Dodecyl- β -maltosid** verwendet. Diese schonende amphiphile Substanz lagert sich zwischen den Proteinkomplex und die Lipide der Membran und bildet homogene Protein-Detergenz-Mizellen, ohne einzelne Proteinuntereinheiten abzulösen. In Studien an Rhodopsin und Opsin mit verschiedenen nichtionischen und zwitterionischen Detergenzien war n-Dodecyl- β -maltosid bezüglich der Solubilität und der Erhaltung der thermischen Stabilität von Rhodopsin und Opsin den anderen untersuchten Detergenzien überlegen^{295,296}. Daneben fand dieses Detergenz zur erfolgreichen Solubilisierung zahlreicher anderer Membranproteine Verwendung^{297,298,299,300}.

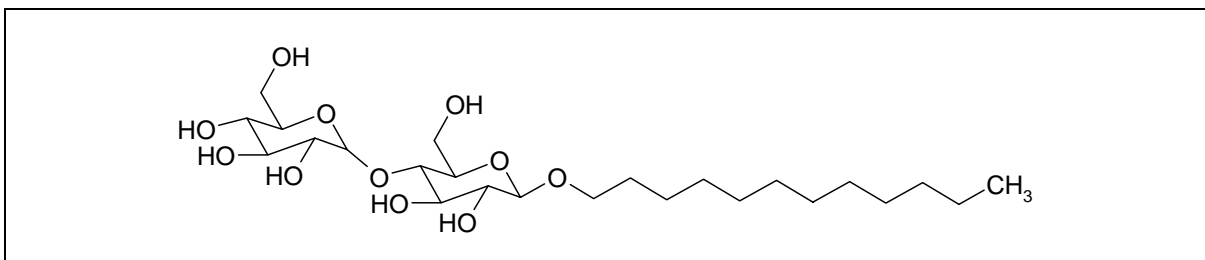


Abb. 3.8: **n-Dodecyl- β -D-maltosid**
($C_{24}H_{46}O_{11}$; Mr = 510,6 g/mol; CMC = 0,16 mM, Aggregationszahl: 98)

3.3.3 Ermittlung der optimalen Detergenzkonzentration für die Solubilisierung der Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation als Quelle der Uracil-Bindungsstellen

Um eine möglichst effektive Solubilisierung zu erzielen, wurde die für die Solubilisierung der Kalbshirn-Membranpräparation optimale n-Dodecyl- β -D-maltosid-Konzentration bestimmt. Die theoretische CMC^y, ab der sich die n-Dodecyl- β -D-maltosid-Moleküle zu mizellaren Strukturen zusammenfügen, beträgt für n-Dodecyl- β -D-maltosid etwa $160 \mu\text{M}$ ³⁰¹ (0,08 % [w/v]). Da unterhalb dieser Konzentration keine Solubilisierung zu erwarten ist, wird ein Konzentrationsbereich von 245 bis $4900 \mu\text{M}$ (0,125 – 2,5 %) gewählt.

Die Wahl der richtigen Puffer-Zusammensetzung spielt bei der Solubilisierung eine wichtige Rolle. Der Solubilisierungspuffer ist nicht nur für die Erhaltung eines stabilen pH-Wertes verantwortlich, sondern hat überdies sowohl auf den Solubilisierungsvorgang als auch auf die Stabilität der solubilisierten Proteine einen bedeutenden Einfluss. Da Membranproteine neben der hydrophoben auch ionische Wechselwirkungen eingehen, wird in Solubilisierungspuffern in der Regel 150 mM **Natriumchlorid** verwendet. Dieser Zusatz verringert die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und geladenen Lipiden.

^y CMC = kritische Mizellbildungskonzentration (critical micelle concentration)

Es ist aus der Literatur bekannt, dass Polyole auf Membranproteine in Lösung eine stabilisierende Wirkung haben, obwohl es bis dato keine eindeutige Erklärung für dieses Phänomen gibt. Eingesetzt werden für gewöhnlich Konzentrationen von 5 – 50% (v/v) an **Glycerol**. Hierbei ist zu beachten, dass die Viskosität und die Dichte des Mediums durch die Glycerol-Zugabe in erheblichem Maße beeinflusst wird. Weiterhin wird die Verwendung von Protease-Inhibitoren im Solubilisierungspuffer empfohlen, um die Protein-Präparation vor Proteolyse zu schützen. Eine Kombination von **EDTA** und **EGTA** wird häufig eingesetzt, um die freie Calciumionen- und (evtl. vorhandene) Schwermetallionen-Konzentration durch Komplexbildung zu reduzieren. Zur spezifischen Hemmung der Serin-Proteasen eignet sich die Verbindung **Phenylmethansulfonylfluorid**. Weiterhin finden in der Regel auch **Leupeptin** und **Pepstatin A** – ebenfalls effektive Protease-Inhibitoren – Anwendung im Solubilisierungspuffer^{302,303}.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte wird ein **Solubilisierungspuffer** mit folgender Zusammensetzung verwendet:

50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, Glycerol 10 %, EDTA 1 mM^z, EGTA 1 mM^{aa}, PMSF 0,1 mM^{bb}, Leupeptin 10 µM^{cc}, Pepstatin A 1 µM^{dd}.

2 mL einer Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation (3,0 mg/mL Protein in einem 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4) werden eine Stunde bei 48000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 2 mL Solubilisierungspuffer (50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 % Glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 mM PMSF, 10 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin A) aufgenommen. Parallel dazu wird eine Detergenz-Stammlösung zu 5 % (w/v) bzw. 9,785 mM in Solubilisierungspuffer hergestellt. Durch Verdünnung dieser Lösung werden drei weitere *n*-Dodecyl-β-D-maltosid-Lösungen zu 1 % (1,957 mM), 0,5 % (980 µM) und 0,25 % (490 µM) erhalten. Die Solubilisierung wird durch das Zugabe von je 500 µL Detergenz-Lösung zu jeweils 500 µL Membranpräparation gestartet, sodass in den Ansätzen Detergenz-Konzentrationen von 0,125 % bis 2,5 % vorliegen, und anschließend wird eine Stunde lang bei ca. 4°C (auf Eis) inkubiert. Die Solubilisate werden für eine Stunde bei 48000 g und 4°C zentrifugiert und die Überstände von den Pellets getrennt. Von diesen mit **n-Dodecyl-β-maltosid** gewonnenen Membransolubilisaten (0,125 – 2,5 %) werden jeweils die Proteinkonzentrationen bestimmt und anschließend werden sie in Radioligand-Bindungsstudien auf die spezifische Bindung von [³H]Uracil hin untersucht. Die Bindungsstudien werden unter optimierten Bedingungen (Kap. 2.3) durchgeführt, wobei abweichend zum Standardassay eine Proteinkonzentration von 100 µg Protein pro Reaktionsansatz eingesetzt wird. Zur Auswertung wird die Gesamtbindung und

^z Ethylendiamintetraessigsäure

^{aa} Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

^{bb} Phenylmethansulfonylfluorid (Trypsin- und Chymotrypsin-Inhibitor; eff. Konz.: 0,1– 1 mM)

^{cc} reversibler kompetitiver Inhibitor von Serin- und Thiol-Proteasen (Plasmin, Trypsin, Papain, Cathepsin B); eff.Konz.: 10 – 100 µM)

^{dd} Inhibitor von Proteasen (Pepsin, Renin, Cathepsin D, mikrob. Aspartatprot.); eff. Konz.: 1 µM

die unspezifische Bindung mit 100 μM Uracil bestimmt. In **Abb. 3.9** sind die Ergebnisse der Bindungsstudien mit den Solubilisaten (245-4900 μM β -DDM) dargestellt.

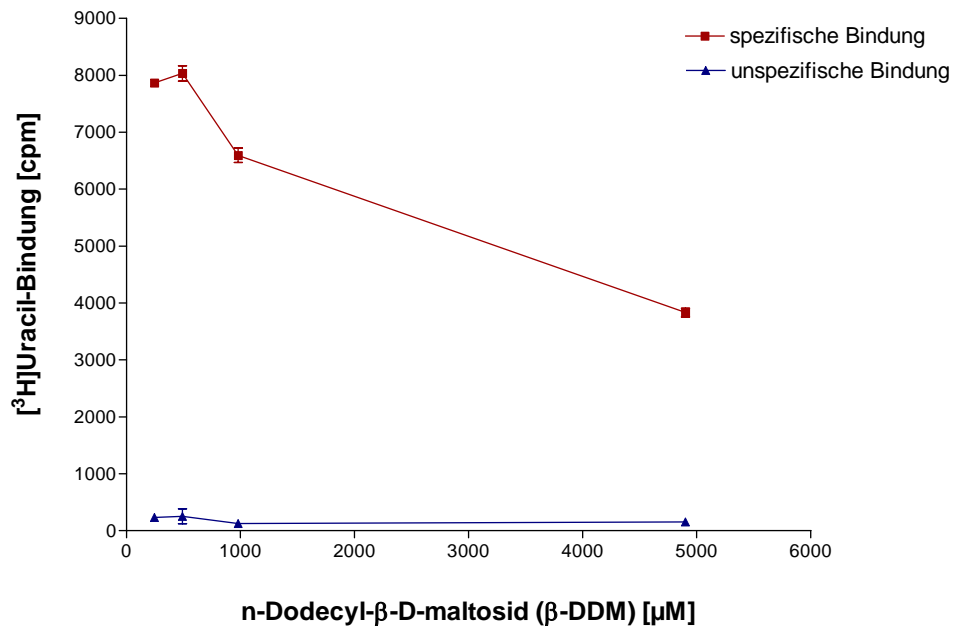


Abb. 3.9: Ermittlung der optimalen *n*-Dodecyl- β -D-maltosid-(β -DDM)-Konzentration. Die optimale Konzentration liegt bei 490 μM (0,25 %). Über das Optimum hinaus nimmt die spezifische Bindung von [^3H]Uracil wieder ab. Dargestellt sind die spezifische und die unspezifische der verschiedenen Solubilisate (100 μg pro Reaktionsansatz). Die [^3H]Uracil-Bindung wurde unter Standardbedingungen (Radio-ligandkonzentration: 5 nM, Inkubationszeit von 5 Stunden, Inkubationstemperatur: 37°C) bestimmt. Gezeigt ist ein Einzelexperiment in Doppelbestimmung.

Abb. 3.10 zeigt die entsprechenden Proteinmengen der Solubilisate.

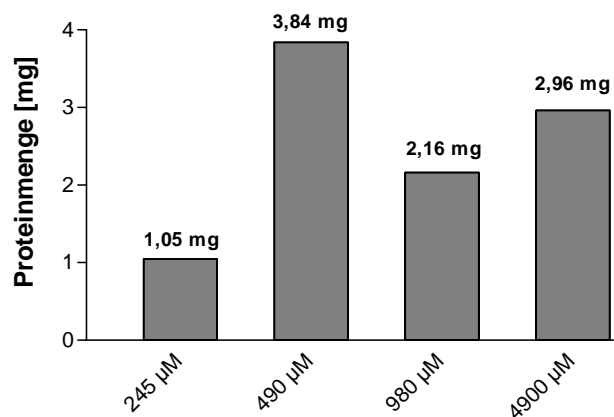


Abb. 3.10: Gesamtproteinmengen der Solubilisate

Aus **Abb. 3.9** ist ersichtlich, dass eine optimale Solubilisierung durch eine *n*-Dodecyl- β -D-maltosid-Konzentration von 490 μ M (0,25 %), welche dem dreifachen Wert seiner kritischen Mizellarkonzentration (CMC) entspricht, erreicht werden kann. Bei Erhöhung der Konzentration des Detergenzes nimmt die spezifische Bindung wieder ab, wobei bei der höchsten Konzentration von 2,5 % (4,9 mM) der Wert für die spezifische Bindung auf die Hälfte des maximal möglichen Wertes absinkt. Bei einer niedrigen Detergenz-Konzentration von 245 μ M ist zwar die spezifische [3 H]Uracil-Bindung vergleichsweise hoch, d.h. die Bindungsstelle wird durch das Detergenz nicht beeinflusst, jedoch ist auch die Gesamtproteinmenge in dem Solubilisat im Vergleich zu den anderen Konzentrationen sehr niedrig (**Abb. 3.10**). In dem Solubilisat mit einer Detergenz-Konzentration von 490 μ M ist die höchste Proteinmenge zu finden ist. Da bei dieser Konzentration auch gleichzeitig die höchste spezifische Bindung pro 100 μ g Protein nachgewiesen werden konnte, kann geschlossen werden, dass eine Konzentration von 490 μ M an *n*-Dodecyl- β -D-maltosid am besten geeignet ist, das Uracil-bindende Protein zu solubilisieren, ohne die spezifische Bindung von [3 H]Uracil an die Uracil-Bindungsstellen signifikant zu beeinträchtigen.

In den nach der Solubilisierung mit *n*-Dodecyl- β -D-maltosid erhaltenen Pellets konnte ebenfalls eine, im Vergleich zu den Solubilisaten sogar höhere, spezifische [3 H]Uracil-Bindung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass keine vollständige Solubilisierung stattgefunden hat. In **Abb. 3.11** sind die Werte der spezifischen Bindung für die mit *n*-Dodecyl- β -D-maltosid behandelten Kalbshirn-Striatum-Membranen (Solubilisat und Pellet) einerseits und für „unbehandelte“ Kalbshirn-Striatum-Membrane andererseits vergleichend dargestellt.

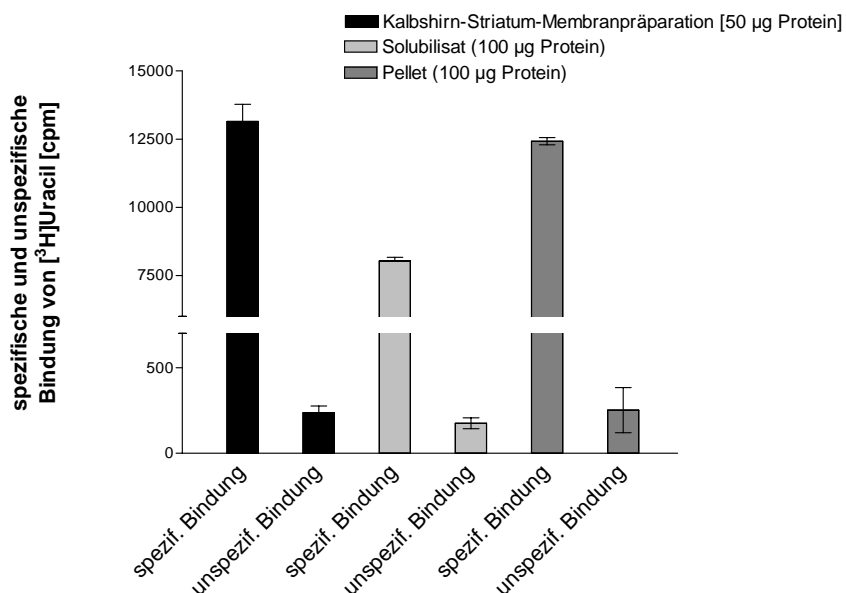


Abb. 3.11: Vergleich der Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation (50 μ g Protein) mit dem Solubilisat (0,25 % β -DDM; 100 μ g Protein) und dem nach der Solubilisierung erhaltenen Pellet (100 μ g Protein) bezüglich der spezifischen Bindung von [3 H]Uracil unter Standardbedingungen. Dargestellt ist ein Einzelexperiment in Doppelbestimmung.

Wie **Abb. 3.11** verdeutlicht, ist die spezifische Bindung sowohl beim Solubilisat als auch bei dem Pellet deutlich niedriger als bei der unbehandelten Membranpräparation. Während das Solubilisat bei einer Proteinmenge von 100 µg nur eine spezifische Bindung von ca. 8000 cpm (Pellet: 12000 cpm) zeigt, weist die unbehandelte Membranpräparation schon bei der halben Proteinmenge (50 µg) einen höheren Wert von 13000 cpm auf. Dieser hohe Verlust liegt im Falle der Solubilisate vermutlich (zumindest teilweise) darin begründet, dass die solubilisierten Proteine durch die verwendeten Filter nicht vollständig aufgehalten werden konnten. Dies erklärt auch, warum die spezifische Bindung bei den Pellets höher ist als bei den Solubilisaten. In zukünftigen Experimenten müssen die Filter mit Polyethylenimin (PEI) vorbehandelt werden²²⁹. Ein weiterer Grund für die niedrige spezifische Bindung könnte sein, dass das Uracil-bindende Protein teilweise durch das Detergenz denaturiert wird und den Liganden [³H]Uracil nicht mehr bindet. Ein weiteres Problem ist der Solubilisierungspuffer, welcher unter anderem 150 mM Natriumchlorid enthält. Wie bereits in früheren Experimenten festgestellt wurde (Kap. 2.3.1), hat die Ionenstärke einen starken Einfluss auf die [³H]Uracil-Bindung. Vergleicht man die spezifische Bindung von [³H]Uracil in Abhängigkeit mit dem verwendeten Inkubationspuffer, so stellt sich heraus, dass bei Verwendung des Solubilisierungspuffers die resultierende spezifische Bindung verhältnismäßig niedrig ist. Sie beträgt nur ca. 5 % der spezifischen Bindung mit Tris-Puffer als Inkubationspuffer (13200 vs. 712 cpm, **Abb. 3.11**).

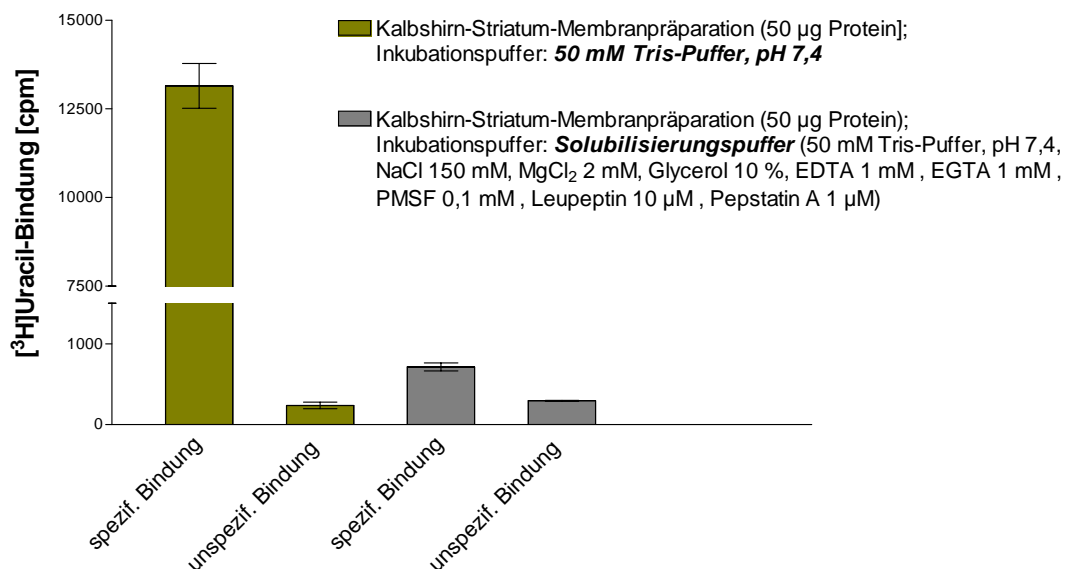


Abb. 3.11: **Abhängigkeit der [³H]Uracil-Bindung an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparation (50 µg Protein) vom Inkubationspuffer.** Das Experiment wurde bei einer Radioligandkonzentration von 5 nM, einer Inkubationszeit von 5 Stunden und einer Inkubationstemperatur von 37°C durchgeführt. Verglichen wurde der Standardpuffer (50 mM Tris-Puffer, pH 7,4) mit dem Solubilisierungspuffer (50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, Glycerol 10 %, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 0,1 mM, Leupeptin 10 µM, Pepstatin A 1 µM).

Da in den durchgeführten Bindungsstudien nur das Solubilisat bzw. die Proteinsuspension des Pellets das Solubilisierungspuffer enthielt, während als Inkubationspuffer Tris-Puffer verwendet wurde, betrug die Natriumchlorid-Endkonzentration im Assay nur ca. 15 mM. In früheren Experimenten konnte zwar nachgewiesen werden, dass eine Konzentration von 1 mM keinen Effekt auf die spezifische Bindung zeigt, es stehen allerdings keine Daten bezüglich einer Konzentration von 15 mM zu Verfügung. Es ist nicht auszuschliessen, dass die Uracil-Bindung auch in dieser Konzentration vermindert wird. In zukünftigen Versuchen sollte untersucht werden, ob durch Weglassen des Natriumchlorid-Zusatzes im Solubilisierungspuffer die spezifische Bindung des Solubilisates erhöht werden kann.

3.3.4 Zusammenfassung

Als Ergebnis dieser Untersuchungen kann festgehalten werden, dass das Uracil-bindende Membranprotein mit dem nichtionischen Detergenz *n*-Dodecyl- β -D-maltosid solubilisiert werden kann, ohne die Fähigkeit zur spezifischen [^3H]Uracil-Bindung zu verlieren. Unter den vier untersuchten Detergenz-Konzentrationen (245, 490, 980 und 4900 μM) erwies sich vorerst eine Konzentration von 490 μM als optimal, während bei höheren Konzentrationen eine Abnahme der spezifischen Bindung zu beobachten ist. Bei dieser Detergenzkonzentration ist sowohl die solubilierte Proteinmenge als auch die spezifische [^3H]Uracil-Bindung pro 100 μg Protein am höchsten.

Im Vergleich zur unbehandelten Membranpräparation ist die spezifische Bindung des Solubilisats jedoch stark vermindert. Mit den vorliegenden Vorversuchen kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob dies an einer Denaturierung des Proteins liegt oder ob es sich um methodische Probleme handelt. Dies muß in zukünftigen Untersuchungen weiter untersucht und aufgeklärt werden.

3.4 Anreicherung der Uracil-bindenden Proteine mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation

Durch die Ultrazentrifugation eines Stoffgemisches auf einem Sucrosegradienten lassen sich einzelne Moleküle anhand ihrer Dichte und ihrer spezifischen Sedimentationsgeschwindigkeit voneinander trennen. Moleküle mit hoher Dichte werden dabei durch die Gravitationskraft weiter transportiert, als Moleküle mit niedrigerer Dichte. Die Technik der Dichtegradientenzentrifugation fand erstmals große Beachtung durch das Experiment von Meselson, Stahl und Vinograd, denen es damit gelang, die semikonservative Replikation der DNA zu beweisen³⁰⁴.

Die P2-Ratten-Striatum-Membranpräparation wird auf einen 3-stufigen Sucrosegradienten aufgetragen, der aus 1 mL 41 %iger und aus je 1,5 mL 34 %iger und 29 %iger Sucroslösung besteht. Um die verschiedenen Zellbestandteile aufzutrennen, wird der Gradient zwei Stunden bei 100000 g in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Von den Fraktionen werden je 60 μL mit 30 μL Probenpuffer gemischt und nach 5minütigem Denaturieren bei 95°C werden je 15 μL auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Weiterhin werden von den Fraktionen die Proteinkonzentrationen bestimmt und anschließend in einem Standardassay auf die spezifische [³H]Uracil-Bindung hin untersucht.

Die Synaptosomen-Fraktion ist nach der Zentrifugation als eine milchig trübe Bande zwischen 1,0 und 1.2 M Sucroslösung zu erkennen. Die anderen beiden Phasen waren nicht so klar erkennbar, sodass sie nicht eindeutig von der überstehenden Flüssigkeit abgetrennt werden konnten.

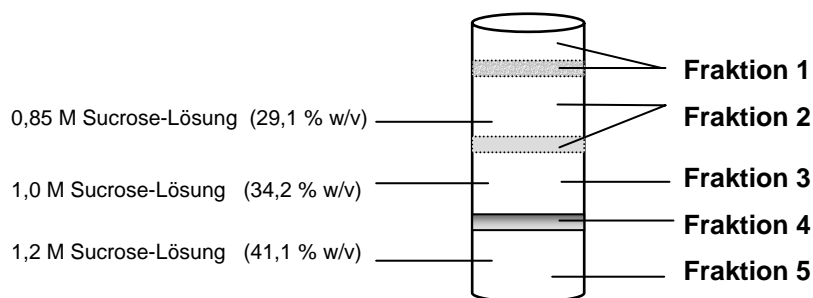


Abb. 3.12: Diskontinuierlicher Sucroседichtegradient nach der Ultrazentrifugation

Die Ergebnisse der Bindungsstudien mit den Fraktionen des Sucrosegradienten sind in **Abb. 3.13** dargestellt.

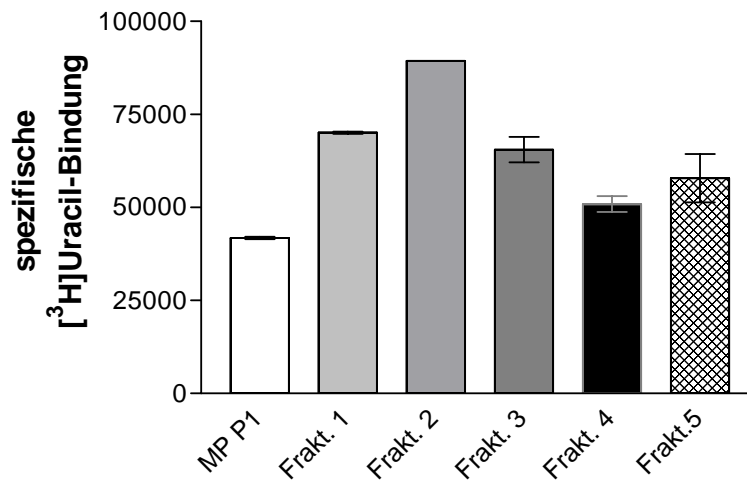


Abb. 3.13: Spezifische $[^3\text{H}]\text{Uracil}$ -Bindung (5 nM) der Fraktionen des Sucrosegradienten aus Rattenhirn-Striatum (30 μg Protein pro Ansatz). Der Assay wurde 5 bei 37°C inkubiert. MP P1 = Rattenhirn-Striatum-Membranpräparation, bei der das P1-Pellet nicht abgetrennt wurde. [n=2]

Wie aus **Abb. 3.13** ersichtlich, konnten in allen Fraktionen spezifische Bindungsstellen für $[^3\text{H}]\text{Uracil}$ festgestellt werden. Folglich fand keine Anreicherung des Uracil-bindenden Proteins in einer der Fraktionen statt. Möglicherweise war die Zentrifugationsdauer (2 h) zu kurz. Es empfiehlt sich daher, in zukünftigen Versuchen den Sucrosegradienten länger zu zentrifugieren. Auffallend ist, dass die spezifische Bindung an Rattenhirn-Striatum-P1-Membranpräparationen vergleichsweise niedrig ist, was darauf zurückzuführen ist, dass diese Membranpräparation nicht vom P1-Pellet (Zellkerne, Erythrozyten und Zelltrümmer) befreit ist. Die SDS-PAGE der Sucrosegradientenfraktionen zeigt erwartungsgemäß ein vielfältiges Bandenmuster und keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Fraktionen, außer dass mit zunehmender Sucrose-Konzentration die Konzentration an höhermolekularen Proteinen zu- und an niedermolekularen Proteinen abnimmt (**Abb. 3.14**).

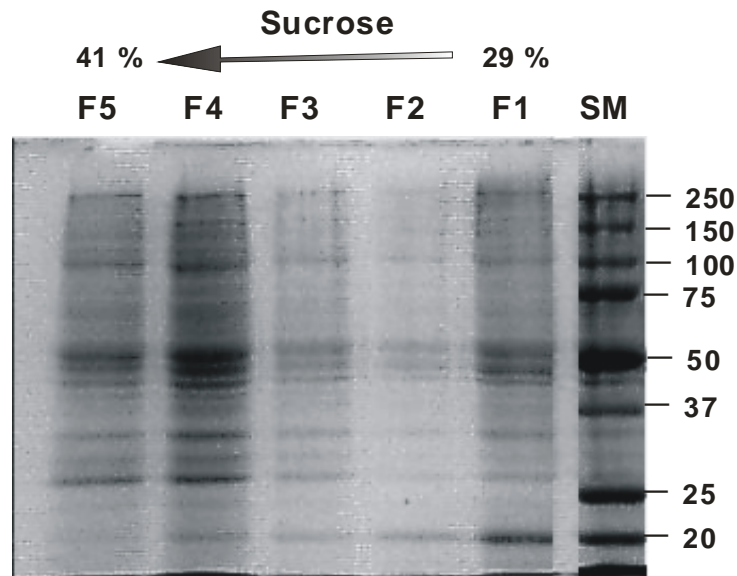


Abb. 3.14: 10 % SDS-PAGE der Sucrosegradientenfractionen mit einer Rattenhirn-Striatum-Membranpräparation. Nach 2:1-Verdünnung mit Probenpuffer/ β -Mercaptoethanol wurden je 15 μ L pro Tasche aufgetragen. Nach der Entwicklung wurde das Elektropherogramm mit Coomassie-Bau gefärbt und mit dem Geldokumentations-System bearbeitet. F: Fraktion, SM: Standard-Marker.

Die Ergebnisse dieser Studien verdeutlichen, dass der verwendete Sucrosedichtegradient nicht zu einer weiteren Anreicherung der Bindungsstellen geführt hat. Zwar hat die Proteinbestimmung gezeigt, dass in der Fraktion 4 – zwischen 1,0 und 1,2 M Sucroselösung –, in der die Synaptosomen angereichert werden sollten, die höchste Gesamtproteinmenge zu finden ist, das Screening mit dem Standardassay unter Verwendung von 5 nM [3 H]Uracil und von 30 μ g Protein pro Ansatz belegt jedoch, dass auch die anderen Fraktionen die Bindungsstellen enthalten. Die Entfernung des P1-Pellets bewirkt nachweislich eine Anreicherung der Bindungsstellen. Die spezifische Bindung pro mg Protein in der P1-Membranpräparation ist im Vergleich zu allen Fraktionen des Sucrosedichtegradienten signifikant niedriger (**Abb. 3.13**). Eine weitere Bearbeitung der Membranpräparation mit dem hier verwendeten Sucrosegradienten bringt jedoch hinsichtlich der Anreicherung der Bindungsstellen keinen Vorteil.

Kapitel 4

Studien am postulierten „Uridin-Rezeptor“

4.1 Geschichtliche Entwicklung der „Uridin-Forschung“

Die Nukleosid-Rezeptoren (P1-Rezeptoren) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die sich in die Subtypen A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ unterteilen und Adenosin als physiologischen Liganden haben. Die Gruppe der P2-Rezeptoren (Nucleotid-Rezeptoren) ist wesentlich umfangreicher. Die P2-Rezeptoren werden in zwei Unterfamilien (P2X- und P2Y-Rezeptoren) unterteilt, wobei es sich bei den P2X-Rezeptoren (P2X₁₋₇) um Ligand-gesteuerte Ionenkanäle mit ATP als physiologischem Liganden handelt, während die P2Y-Rezeptoren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind, welche von Purin- oder Pyrimidin-Nukleotiden aktiviert werden können.

In den letzten Jahren haben sich die Vermutungen erhärtet, dass neben den Adenosin-Rezeptoren auch spezifische Bindungsstellen für Uridin existieren. Schon 1973 wurde dem Uridin von dem Forscher C. L. Roberts ein antikonvulsiver Effekt bei Metrazol- und Penicillin-induzierten epileptischen Anfällen zugeschrieben²¹³. 1983 fanden die Forscher der Arbeitsgruppe Komoda et al. heraus, dass Uridin einer der aktiven Komponenten der schlaffördernden Substanzen im Hirnstamm von Mäusen ist³⁰⁵. Zwei Jahre später wurde der Verbindung N3-Benzyluridin eine hypnotische Wirkung zugesprochen. Nach den Ergebnissen der Forscher Yamamoto et al.³⁰⁶ ist **N3-Benzyluridin** im Gegensatz zu Uridin nicht nur schlaffördernd, sondern hat auch selbst hypnotische Wirkung. 1987 wurden die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Uridin-Derivaten im Hinblick auf ihre hypnotische Wirkung untersucht. Dabei kamen die Forscher zu dem Ergebnis, dass die Substitution des Wasserstoffatoms am N3-Position des Uridins mit einer Benzyl-analogen Gruppe die hypnotische Wirkung der Substanz erhöht, während eine Änderung der Zuckerkomponente des Uridins eine Abnahme der Wirkung zur Folge hat³⁰⁷. Daraufhin wurden zahlreiche Uridin-Derivate) synthetisiert und untersucht. Dabei stieß die Arbeitsgruppe Yamamoto et al. auf eine sehr potente Substanz – **N3-Phenacyluridin** (Abb. 4.1, C).

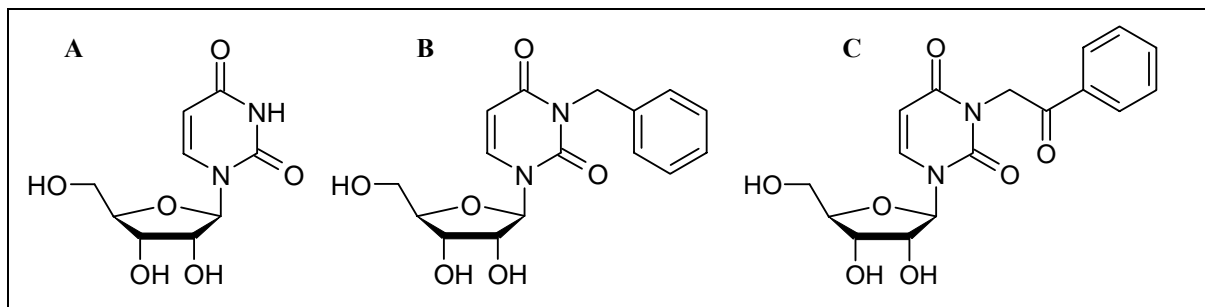


Abb. 4.1: Struktur von Uridin (A), N3-Benzyluridin (B) und N3-Phenacyluridin (C)

N3-Phenacyluridin stellte sich als die Substanz mit der stärksten ZNS-depressiven Wirkung unter den ca. 200 untersuchten Verbindungen heraus. Bei gleicher Dosierung löste N3-Phenacyluridin einen 20fach längeren Schlaf aus als N3-Benzyluridin. Die Pentobarbital-induzierte Schlafdauer war doppelt so lang, bei Diazepam als Schlaf-induzierender

Substanz wurde sie um den Faktor 20 verlängert³⁰⁸. In Radioligand-Bindungsstudien mit [³H]Uridin ermittelten Kimura et al. für N3-Phenacyluridin einen K_i -Wert von 3,30 nM. Die Ergebnisse deuteten auf die Existenz einer Uridin-Bindungsstelle in dem Gewebe hin³⁰⁹.

Im Jahre 1996 wurde festgestellt, dass N3-Phenacyluridin mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor interagiert, wobei eine sehr niedrige Bindungsaffinität mit einem IC₅₀-Wert von 129 μM ermittelt wurde³¹⁰. Um eine Wirkung über andere Rezeptoren auszuschließen, wurde außerdem die Wirkung auf Adenosin- und Serotonin-Rezeptoren überprüft. N3-Phenacyluridin zeigte hier nur eine sehr geringe bzw. keine Bindungsaffinität. Im Jahre 2000 untersuchte die selbe Arbeitsgruppe die Metabolisierung von N3-Phenacyluridin. Folgende Substanzen wurden als Metaboliten identifiziert: **N3-α-Hydroxy-β-phenethyluridin** (Racemat) und in geringem Maße **N3-Phenacyluracil**. Bei näheren Untersuchungen stellte sich heraus, dass das S-Enantiomer von N3-α-Hydroxy-β-phenethyluridin (**Abb. 4.2**) der Hauptmetabolit ist. N3-α-Hydroxy-β-phenethyluridin wurde von den Forschern als Racemat synthetisiert und durch Racemattrennung in die beiden Enantiomere getrennt. Bei pharmakologischen Untersuchungen zeigte nur das S-Enantiomer (N3-(S)-(+)-α-Hydroxy-β-phenethyluridin) hypnotische Wirkung, wobei die anderen Metaboliten wirkungslos waren^{257,311}.

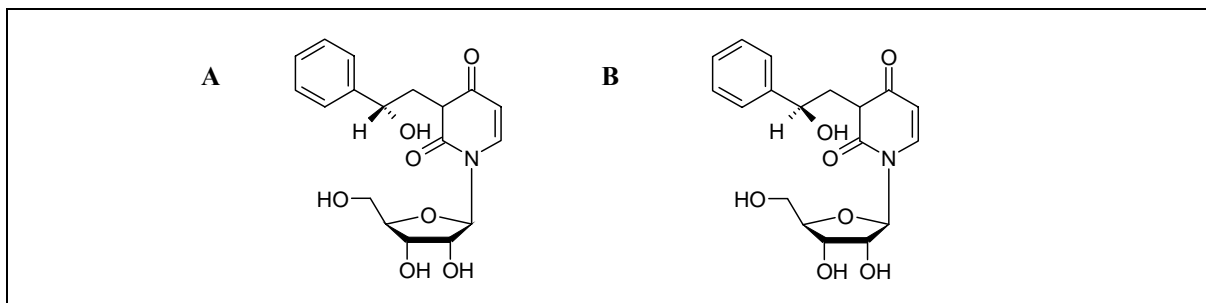


Abb. 4.2: Struktur von N3-(R)-(-)-α-Hydroxy-β-phenethyluridin (**A**) und N3-(S)-(+)-α-Hydroxy-β-phenethyluridin (**B**)

Kimura et al. synthetisierten den Radioliganden [³H]N3-Phenacyluridin und führten Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien durch. Bei diesen Untersuchungen wurde eine konzentrationsabhängige Bindung des Radioliganden an synaptische Membranen (Rinder-Thalamus) beobachtet. Für das N3-(S)-(+)-α-Hydroxy-β-phenethyluridin wurde ein K_i -Wert von 10,2 nM ermittelt, während das R-Enantiomer nur eine sehr geringe Affinität von 1,91 μM zeigte²⁵⁷. Diese hohe Stereospezifität hinsichtlich der Bindung an die Bindungsstelle sowie in Bezug auf die Wirkung legte die Vermutung nahe, dass Uridin seine Wirkungen (Erhöhung der Spermien-Motilität, Erhöhung des Blutdrucks durch Vasoconstriktion, Verminderung der spontanen Aktivität, Schlaf-fördernder Effekt und anti-convulsive Wirkung) über einen Rezeptor entfaltet. Deshalb postulierte die Arbeitsgruppe Kimura et al. die Existenz eines solchen Uridin-Rezeptors. Den Ergebnissen der Forscher zufolge ergibt sich die folgende Rangfolge für das Auftreten von „Uridin-Rezeptoren“: Striatum > Thalamus > Hirnrinde > Kleinhirn > Mittelhirn > Medulla Oblongata.

Es wird vermutet, dass Uridin beim Nucleinsäure-Katabolismus freigesetzt wird, die Bindungsstellen in bestimmten Hirnregionen erreicht und auf diesem Wege bei der Regulierung des natürlichen Schlafes mitwirkt. Das vom Rezeptor dissoziierte Uridin wird dann möglicherweise bei der Synthese von Nucleinsäuren (Anabolismus) wieder verwendet³¹².

Die ungarische Arbeitsgruppe Kovacs et al. publizierte 2003 einen Artikel, in der ebenfalls von einer spezifischen Bindungsstelle für Uridin berichtet wird. Für [³H]Uridin wurde an Ratten-Cortex-Membranpräparationen ein K_D -Wert 71 nM und ein B_{max} -Wert von 1,37 pmol/mg Protein ermittelt. In den Studien konnte gezeigt werden, dass Uridin (0,3 μ M) die intrazelluläre Calcium-Konzentration in Ratten-zerebrokortikal-Homogenaten erhöht. Zudem wurde in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien eine Erhöhung der [³⁵S]GTP γ S-Bindung durch Uridin (10 μ M) festgestellt. Die Ergebnisse werteten die Autoren als einen Nachweis, dass im Rattenhirn spezifische Bindungsstellen für Uridin existieren, welche G-Proteine gekoppelt sind²⁵⁸.

4.2 Aufgabenstellung

Wie in der Einleitung (Abschnitt. 4.1) bereits beschrieben, wurde von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen ein Membran-Rezeptor postuliert, an dem das Nucleosid Uridin der physiologische Ligand sein soll. Kimura et al.²⁵⁷ führten sowohl Bindungsstudien mit [³H]Uridin als auch mit [³H]Phenacyluridin durch. Sie sind bis dato die einzige Arbeitsgruppe, die der Verbindung N3-Phenacyluridin eine hohe Affinität zu der Uridin-Bindungsstelle zugeschrieben und Studien mit [³H]N3-Phenacyluridin durchgeführt haben (1995). Die zweite Arbeitsgruppe Kovacs et al. beschreiben in ihrer Veröffentlichung (2003) nur Studien mit [³H]Uridin²⁵⁸.

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob neben den Adenosin-Rezeptoren auch für das Nucleosid Uridin spezifische Bindungsstellen existieren und inwieweit sie mit der von uns identifizierten Uracil-Bindungsstelle in Zusammenhang stehen.

4.3 Bindungsstudien mit [³H]N3-Phenacyluridin und [³H]Uridin

Bei den bisherigen Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen hatte sich N3-Phenacyluridin als der wirksamste Agonist erwiesen (siehe Kapitel 4.1). Deshalb war es naheliegend, N3-Phenacyluridin radioaktiv zu markieren, um einen Radioligand-Bindungsassay zur Testung von anderen Verbindungen aufbauen zu können.

Die Verbindung N3-Phenacyluridin wurde von Herrn Dr. Till Schumacher aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Christa E. Müller im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisiert³¹³. Die radioaktive Markierung wurde als Auftragssynthese von Nycomed Amersham (Buckinghamshire, England) durchgeführt (**Abb. 4.2**).

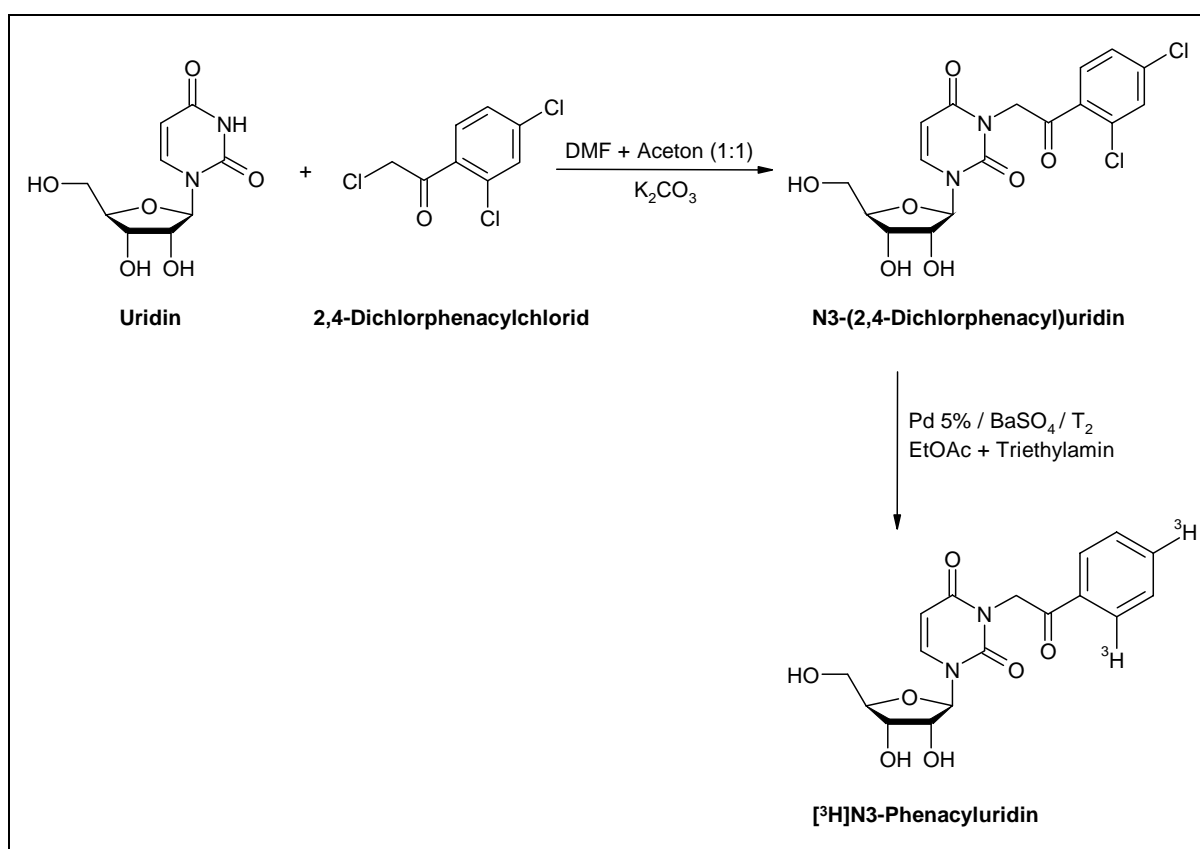


Abb. 4.2: Synthese und Tritiierung von N3-Phenacyluridin

In **Tab. 4.1** sind die Versuchsparemeter der bisher publizierten Bindungsstudien aufgelistet.

Tab. 4.1: Aufstellung der Versuchsparameter der in der Literatur beschriebenen Bindungsstudien mit [³H]Uridin bzw. [³H]Phenacyluridin

	Versuchsbedingungen der japanischen Arbeitsgruppe		Versuchsbedingungen der ungarischen Arbeitsgruppe
	Kimura et al (1995) ³⁰⁹	Kimura et al. (2001) ²⁵⁷	Kovacs et al. (2003) ²⁵⁸
Protein	Rinder-Thalamus-Membranpräparation ³¹⁴	Rinder-Thalamus-Membranpräparation ³¹⁴	Rattenhirn-Cortex-Membranpräparation (~1 mg / Ansatz)
Radioligand	[³ H]Uridin 20 nM	[³ H]N ³ -Phenacyluridin 1 nM	[³ H]Uridin 10 nM
Trennung v. gebundenem und freiem Radioligand	Zentrifugation (15000 g für 5 min.)	Zentrifugation (15000 g für 5 min.)	Zentrifugation (18865 g für 3 min.)
unspezifische Bindung	Uridin 100 µM	N3-Phenacyluridin 100 µM	Uridin 100 µM
Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM HEPES, pH 7,5, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 10 mM Glucose
Zusätze	Dipyridamol 100 µM, EDTA 1 mM	Dipyridamol 100 µM, EDTA 1 mM	10 % SDS
Inkubationsdauer -und -Temperatur	5 min. bei 4°C	5 min. bei 4°C	60 min. bei 5°C
K_i-Werte[♦]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ N3-Phenacyluridin: 3,30 nM ▪ N3-Phenacylthymidin: 811 nM ▪ N3-Phenacyldeoxyuridin: 325 nM ▪ N3-Phenacyl-6-aza-uridin: > 6600 nM ▪ N3-Phenacylarabino-furanosyluracil: 360 nM 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ N3-Phenacyluridin: 0,65 nM ▪ N3-α-Hydroxy-β-phenethyluridin (Racemat): 397 nM ▪ N3-(R)-(-)-α-Hydroxy-β-phenethyluridin (Racemat): 1900 nM ▪ N3-(S)-(+)-α-Hydroxy-β-phenethyluridin (Racemat): 10,2 nM 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Uridin: IC₅₀=76 nM ▪ 5-Fluoruridin: IC₅₀=194 nM ▪ 5-Bromuridin: IC₅₀=330 nM ▪ Adenosin: IC₅₀=350 nM

♦ wenn nicht anderes angegeben ist
RL = Radioligand

4.3.1 Filtrationsassays mit [³H]N3-Phenacyluridin

Die Filtrationsassays mit [³H]N3-Phenacyluridin wurden in einem Reaktionsansatz von 1 mL Gesamtvolumen mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 als Inkubationspuffer durchgeführt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde Phenacyluridin in einer Konzentration von 100 µM – gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) – eingesetzt, wobei die DMSO-Konzentration im Assay 2,5 % betrug. Die Bindungsassays wurden teils mit dem Harvester (Brandell M24) und teils mit dem Millipore-Filtertopf (12 Filtereinheiten) filtriert. Zur Auswertung wurden die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung bestimmt und die spezifische Bindung aus der Differenz berechnet.

In einem ersten Vorversuch wurde [³H]Phenacyluridin in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug in Anlehnung an die Versuchsbedingungen von Kimura et al. 5 Minuten bei 5°C (Eiswasser). Der Assay wurde in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 in An- und Abwesenheit von Zusätzen (Dipyridamol 100 µM, EDTA 1 mM, Adenosindesaminase) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.3** dargestellt.

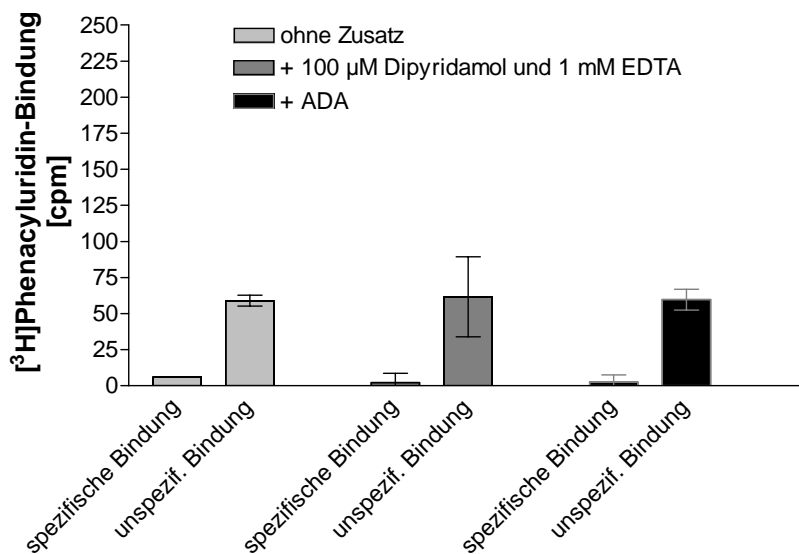


Abb. 4.3: Ergebnisse des Vorversuches mit 1 nM [³H]Phenacyluridin an Rattenhirn-Striatum-Membranpräparationen (140 µg). Der Assay wurde 5 min. bei 5°C (Eiswasser) inkubiert und mit dem Harvester (GF/B-Filter) filtriert. ADA: Adenosindesaminase. Dargestellt ist ein Vorversuch in Dreifachbestimmung.

Wie **Abb. 4.3** zeigt, konnte in diesem ersten Vorversuch keine signifikante spezifische Bindung festgestellt werden. Die unspezifische Bindung ist mit ca. 50 cpm sehr niedrig, wobei die Zusätze keinen Einfluss auf die Bindung haben. Als nächstes wurden verschiedene native Gewebe (Rattenhirn-Striatum-Membranpräparationen, Rattenhirn-Cortex-Membranpräparationen und Membranpräparationen von dem gesamten Rattenhirn) untersucht (**Abb. 4.4**).

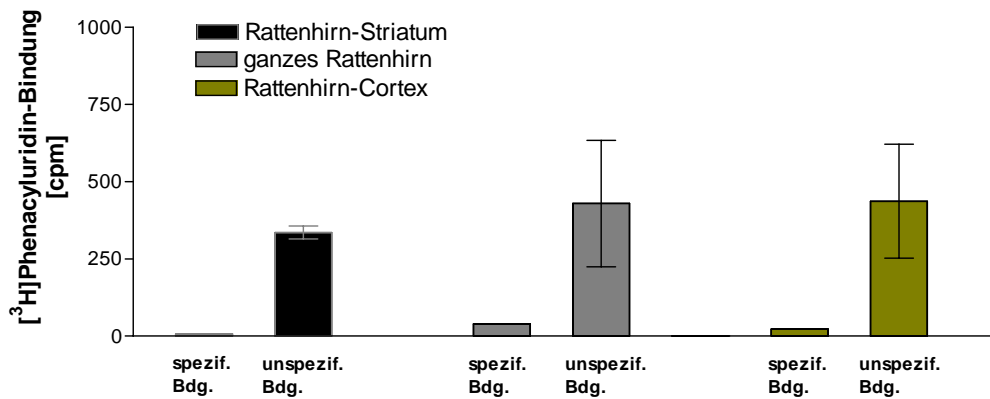


Abb. 4.4: Ergebnisse des Vorversuches mit **1 nM [3H]Phenacyluridin** an verschiedenen Rattenghirn-Geweben (**je 140 µg Protein**) unter Zusatz von 100 µM Dipyridamol, und 1 mM EDTA. Es wurde **5 min. bei 5°C** (Eiswasser) inkubiert und mit dem Milipore-Filtertopf (GF/B-Rundfilter) filtriert. Dargestellt ist ein Vorversuch in Doppelbestimmung.

Auch in diesem Experiment zeigte sich bei einer Radioligandkonzentration von 1 nM bei keinem der untersuchten Rattenghirn-Membranpräparationen eine signifikante spezifische Bindung. Die unspezifische Bindung fiel im Vergleich zu dem ersten Versuch höher (ca. 300 cpm) aus. Dies kann damit begründet werden, dass bei diesem Experiment zur Trennung des gebundenen vom freien Radioliganden anstelle des Harvesters der Absaugtopf verwendet wurde. Diese Methode eignet sich gut für kleine Ansätze (Vorversuche), da jeder Ansatz einzeln filtriert und damit eine unnötige Filter-Verschwendung vermieden werden kann, hat allerdings die Nachteile, dass die unspezifische Bindung im Vergleich zum Harvester höher ist und dass sich innerhalb eines Versuches größere Abweichungen ergeben.

In einer weiteren Bindungsstudie wurden die Inkubationsbedingungen dahingehend geändert, dass 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

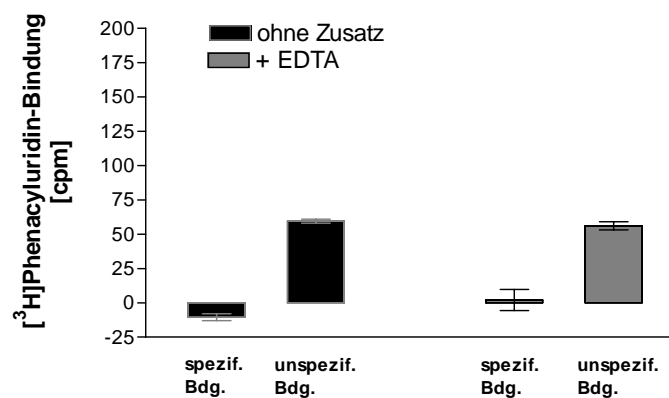


Abb. 4.5: Ergebnisse des Vorversuches mit **1 nM [3H]Phenacyluridin** an Rattenghirn-Striatum-Membranpräparationen (**70 µg Protein**). Der Assay wurde **1 Stunde bei Raumtemperatur** inkubiert und mit dem Harvester (GF/B-Filter) filtriert. Dargestellt ist ein Vorversuch in Doppelbestimmung.

Aus **Abb. 4.5** wird ersichtlich, dass die Erhöhung der Inkubationszeit und der -temperatur hinsichtlich der spezifischen Bindung zu keinem Erfolg geführt hat. Die unspezifische Bindung (~ 50 cpm) entspricht in etwa der Gesamtbindung, sodass keine spezifische Bindung festgestellt werden kann.

Da in allen drei Vorversuchen mit 1 nM [³H]Phenacyluridin keine spezifische Bindungsstelle detektiert werden konnte, war es naheliegend, die Radioligandkonzentration zu erhöhen. In **Abb. 4.6** sind die Ergebnisse der Experimente mit 5 nM [³H]Phenacyluridin bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen gezeigt.

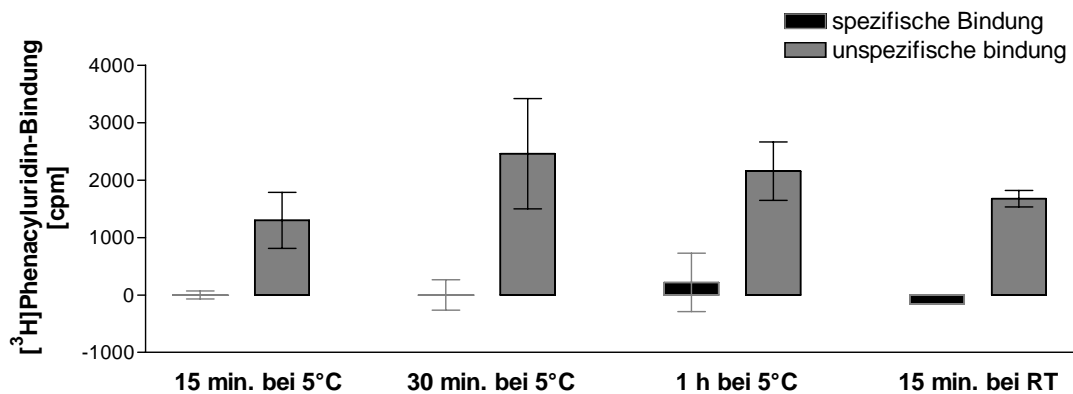


Abb. 4.6: Ergebnisse des Vorversuches mit 5 nM [³H]Phenacyluridin an Rattenhirn-Striatum-Membranpräparationen (140 µg Protein) unter Zusatz von 100 µM Dipyridamol, 1 mM EDTA und 3 µl ADA pro 1 mL Proteinsuspension. Die Ansätze wurden mit dem Millipore-Filtertopf (GF/B-Rundfilter) filtriert. Dargestellt ist ein Vorversuch in Doppelbestimmung.

Wie **Abb. 4.6** verdeutlicht, zeigt sich auch bei einer 5fach höheren Radioligand-Konzentration keine spezifische Bindung für [³H]Phenacyluridin. Die Gesamtbindung ist zwar erwartungsgemäß höher (ca. 2000 cpm), entspricht aber genau der unspezifischen Bindung.

Zwei weitere Experimente, in denen eine hohe Proteinmenge (200 bzw. 800 µg) eingesetzt und vergleichsweise lange (1 Stunde bzw. 2 Stunden bei Raumtemperatur) inkubiert wurde, ergaben ähnliche Resultate (**Abb. 4.7** und **Abb. 4.8**).

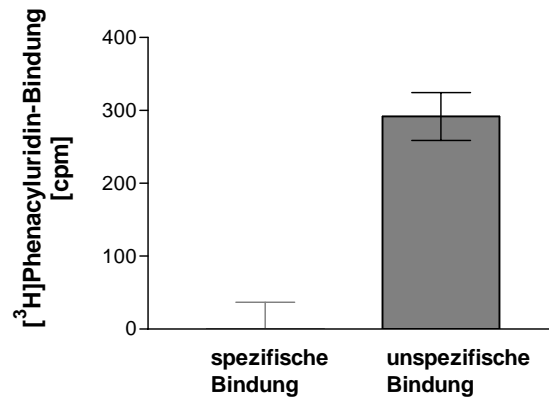


Abb. 4.7: Ergebnisse des Vorversuches mit **5 nM [³H]Phenacyluridin** an Rattenhirn-Striatum-Membranpräparation (**200 µg Protein**). Es wurde **2 Stunden bei Raumtemperatur** inkubiert und mit dem Harvester (GF/B-Filter) filtriert. Dargestellt ist ein Vorversuch in Sechsfachbestimmung.

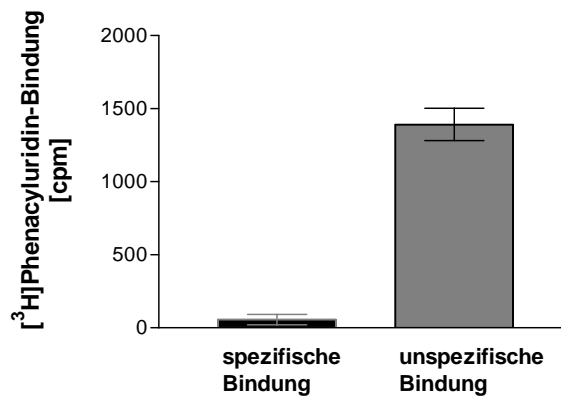


Abb. 4.8: Ergebnisse des Vorversuches mit **5 nM [³H]Phenacyluridin** an Rattenhirn-Striatum-Membranpräparation (**800 µg Protein**). Es wurde **1 Stunde bei Raumtemperatur** inkubiert und mit dem Harvester (GF/B-Filter) filtriert. Dargestellt ist ein Vorversuch in Dreifachbestimmung.

Da die bisherigen Bindungsstudien mit [³H]Phenacyluridin im Gegensatz zu der japanischen Arbeitsgruppe nur mit Rattenhirn-Membranpräparationen durchgeführt wurden, wurde in Erwägung gezogen, eine Membranpräparation aus Kalbs-Thalamus in Anlehnung an den Artikel von Zukin et al.³¹⁴ (Experimenteller Teil, Kap. 7.3.1) herzustellen, um die Assaybedingungen von Kimura et al. genau einhalten zu können. **Abb. 4.9** zeigt die Ergebnisse dieses Experimentes.

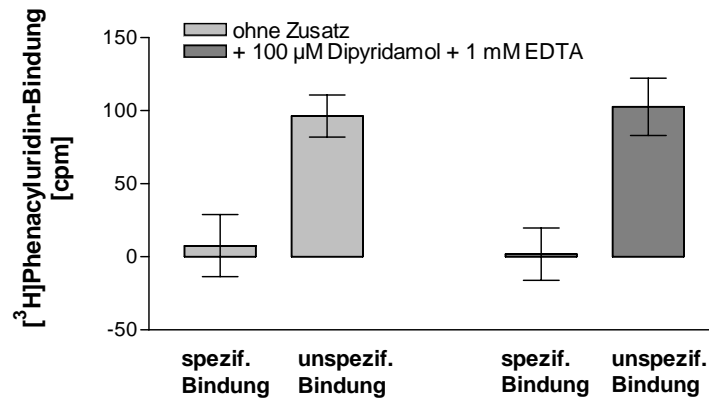


Abb. 4.9: Ergebnisse der Bindungsstudien mit **5 nM** [³H]Phenacyluridin an Rattenhirn-Thalamus-Membranpräparation (**50 µg**). Es wurde **5 min. bei 5°C** (Eiswasser) inkubiert und mit dem Harvester (GF/C-Filter) filtriert.

In der Kalbshirn-Thalamus-Membranpräparation konnten keine spezifischen Bindungsstellen für [³H]Phenacyluridin identifiziert werden. Die unspezifische Bindung, welche mit der Gesamtbindung gleichzusetzen war, betrug sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Dipyridamol und EDTA ca. 100 cpm.

Da die Vorversuche 5 nM keine ausreichend hohe Gesamtbindung lieferte, wurde ein Vorversuch an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (Experimenteller Teil, Kap. 7.3.2) durchgeführt, bei dem u.a. eine Radioligandkonzentration von 15 nM eingesetzt wurde. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.11** dargestellt.

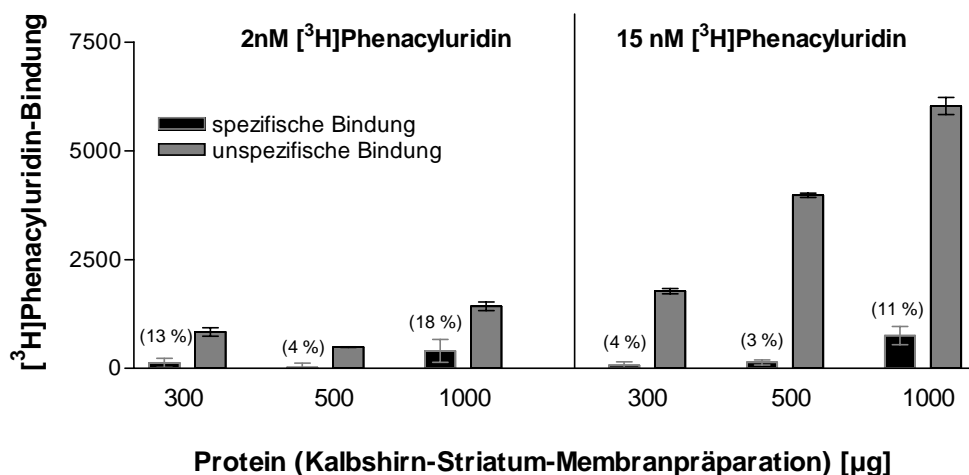


Abb. 4.11: Ergebnisse der Bindungsstudien mit **2 nM** bzw. **15 nM** [³H]Phenacyluridin an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (**300, 500 bzw. 1000 µg** Protein) bei einer Inkubationszeit von 60 min. bei 5°C (Eiswasser). In Klammern ist die spezifische Bindung in Prozent angegeben.

Wie aus **Abb. 4.11** ersichtlich wird, zeigte sich auch bei diesem Versuch keine eindeutige spezifische Bindung. Zwar ergab sich bei einer sehr hohen Proteinkonzentration von

1000 μg (15 nM [^3H]Phenacyluridin) eine geringfügige spezifische Bindung von 11 %, die jedoch statistisch nicht signifikant ist.

4.3.2 Zentrifugationsassays

Da in den bisher in der Literatur beschriebenen Radioligandbindungsstudien an "Uridin-Rezeptoren" nicht mit der von uns angewandten Filtrations-Technik, sondern mit dem Zentrifugationsverfahren zur Abtrennung von gebundenen und ungebundenem Radioliganden gearbeitet worden war, wurden in Anlehnung an die Literatur ebenfalls Zentrifugationsassays mit [^3H]Phenacyluridin durchgeführt. Es wurden Membranpräparationen von Kalbshirn-Striatum-Gewebe (Experimenteller Teil, Kap. 7.3.2) sowie von Rattenhirn-Cortex (Experimenteller Teil, Kap. 7.3.3) eingesetzt. In **Abb. 4.8** sind die Ergebnisse dargestellt.

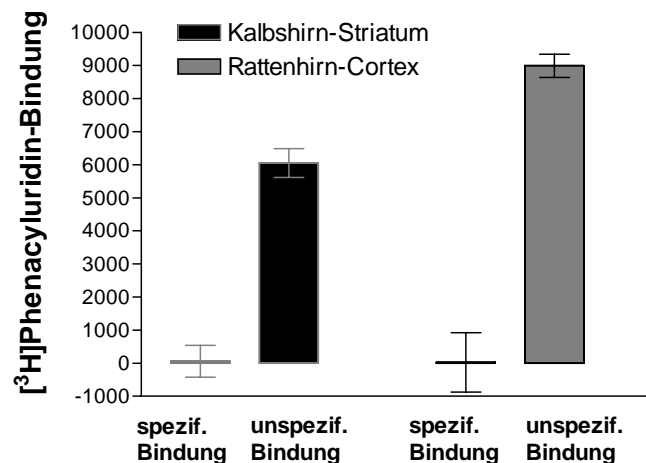


Abb. 4.8: Zentrifugationsassays mit 5 nM [^3H]Phenacyluridin an Rattenhirn-Cortex bzw. Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen (je 800 μg). Inkubationsbedingungen: 1 Stunde bei 5°C (Eiswasser) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, [n=2].

Bei den Zentrifugationsassays mit 5 nM [^3H]Phenacyluridin konnte weder an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen noch an Rattenhirn-Cortex-Membranpräparationen eine signifikante spezifische Bindung festgestellt werden. Die unspezifische Bindung ist bei beiden Membranpräparationen sehr hoch, wobei das Rattenhirn-Cortex-Gewebe einen höheren cpm-Wert aufweist als das Kalbshirn-Striatum-Gewebe (6000 vs. 9000 cpm).

Desweiteren wurden in möglichst detailgetreuer Anlehnung an den Artikel von Kovacs et al.²⁵⁸ Zentrifugations-Assays mit [³H]Uridin an Rattenhirn-Cortex-Membranpräparationen (Experimenteller Teil, Kap. 7.3.5) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.9** abgebildet.

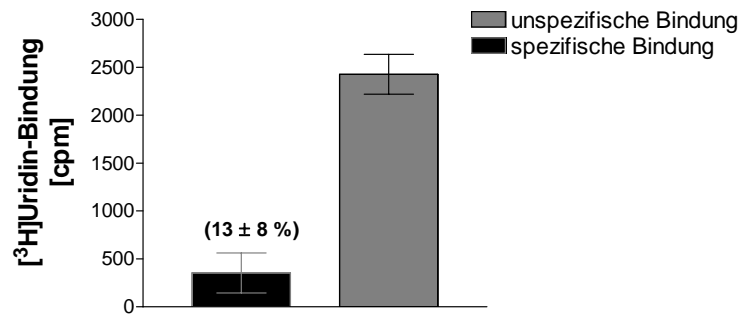


Abb. 4.9: Zentrifugationsassays mit [³H]Uridin (10 nM) an Rattenhirn-Cortex-Membranpräparationen (950 µg) in Anlehnung an Kovacs et al.²⁵⁸. Inkubationsbedingungen: 1 Stunde bei 5°C (Eiswasser) in 20 mM HEPES, pH 7,5, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glucose. In Klammern ist die spezifische Bindung in Prozent angegeben. [n=2].

Die Zentrifugationsassays mit [³H]Uridin zeigen eine geringe spezifische Bindung von 13 % für [³H]Uridin, die allerdings aufgrund der hohen Abweichungen statistisch nicht signifikant ist.

4.3.3 Filtrationsassays mit [³H]Uridin

Da die Zentrifugationsassays mit [³H]Uridin eine, wenn auch geringfügige, spezifische Bindung zeigten, war es naheliegend, auch Filtrationsassays mit [³H]Uridin durchzuführen. Diese Experimente wurden freundlicherweise von Frau Svenja Lacher aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. C. E. Müller durchgeführt.

Mit [³H]Uridin als Radioligand konnte in einer Konzentration von 50 nM eine eindeutige spezifische Bindung ermittelt werden. In homologen Konkurrenzexperimenten ergab sich für Uridin ein IC₅₀-Wert von 307 nM (Abb. 4.7).

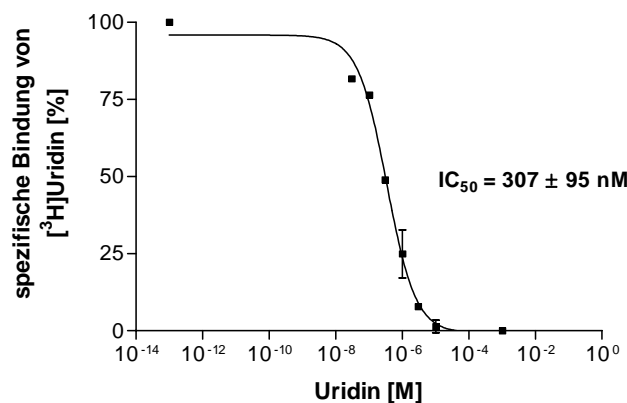


Abb. 4.7: Hemmung der [³H]Uridin-Bindung (50 nM) an Rattenhirn-Striatum-Membranen (100 µg) durch Uridin. Inkubationsbedingungen: 1,5 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 10 mM MgCl₂. Als Ergebnis wurde ein IC₅₀-Wert von 307 nM ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Die Bindung von N3-Phenacyluridin versus [³H]Uridin zeigt einen monophasischen Kurvenverlauf mit einem IC₅₀-Wert von 196 µM (Abb. 4.8).

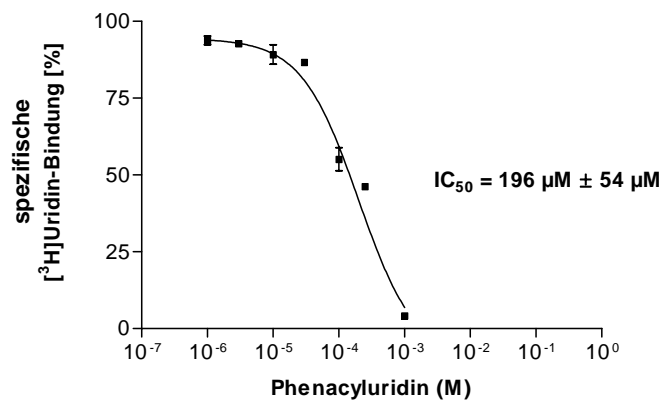


Abb. 4.8: Hemmung der [³H]Uridin-Bindung (50 nM) an Rattenhirn-Striatum-Membranen (100 µg) durch Phenacyluridin. Inkubationsbedingungen: 1,5 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 10 mM MgCl₂. Als Ergebnis wurde ein IC₅₀-Wert von 196 µM ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Interessanterweise zeigt Uracil einen biphasischen Kurvenverlauf (**Abb. 4.9**). Der Wert des Hill-Koeffizienten (nH) für eine Hemmung der spezifischen [³H]Uridin-Bindung liegt bei 0,45.

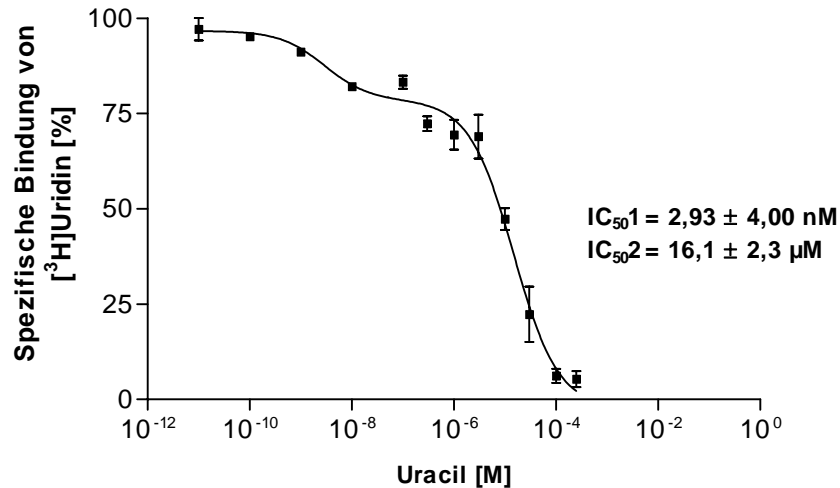


Abb. 4.9: Hemmung der [³H]Uridin-Bindung (50 nM) an Rattenhirn-Striatum-Membranen (100 µg) durch Uracil. Inkubationsbedingungen: 1,5 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 10 mM MgCl₂. Als Ergebnis wurde ein IC₅₀₁-Wert von 2,93 nM und ein IC₅₀₂-Wert von 16,1 µM ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Die biphasische Kurve von Uracil ist ein Hinweis darauf, dass [³H]Uridin (in der eingesetzten Konzentration von 50 nM) an zwei Bindungsstellen bindet. Möglicherweise wird [³H]Uridin während der Inkubationszeit (1,5 Stunden bei Raumtemperatur) enzymatisch zumindest teilweise zu [³H]Uracil abgebaut, welcher an die Uracil-Bindungsstelle bindet. Die Bindung an die Uracil-Bindungsstelle wird von kaltem Uracil mit einem sehr niedrigen IC₅₀-Wert von 3 nM von der Bindungsstelle verdrängt. Dieser Wert ist mit dem für [³H]Uracil an Ratten-Striatum-Membranpräparationen ermittelten K_{D1}-Wert (0,65 nM) in guter Übereinstimmung. Dagegen wird der Radioligand durch kaltes Uracil von der zweiten Bindungsstelle mit einem IC₅₀-Wert von 16 µM verdrängt. Ein weiterer Punkt, welcher auf eine Spaltung von [³H]Uridin hindeutet, ist der, dass kaltes Uridin in Konkurrenzexperimenten versus [³H]Uracil ebenfalls einen statistisch signifikanten biphasischen Kurvenverlauf zeigt, wobei sich ein IC₅₀₁-Wert von 92 nM und ein IC₅₀₂-Wert von 21 µM ergibt (Kapitel 2.3). Aus diesem Ergebnis kann zudem geschlossen werden, dass auch Uridin selbst – mit einer niedrigen, im mikromolaren Bereich liegenden, Affinität – an die Uracil-Bindungsstelle bindet.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden sowohl Filtrations- als auch Zentrifugationsassays mit [^3H]Phenacyluridin (1-15 nM) an Membranpräparationen von Rattenhirn-Cortex und -Striatum sowie Kalbshirn-Thalamus und -Striatum durchgeführt, wobei Proteinmengen von 50-1000 μg eingesetzt wurden. Desweiteren wurde in den Vorversuchen die Inkubationsdauer und -temperatur variiert (5, 15, 30, 60 min. bei 5°C und 15, 60, 120 min. bei Raumtemperatur). In diesen Versuchen konnte keine statistisch signifikante spezifische Bindung [^3H]Phenacyluridin festgestellt werden.

In Filtrationsassays mit [^3H]Uridin dagegen konnten spezifische Bindungsstellen nachgewiesen werden. In ersten Konkurrenzexperimenten mit [^3H]Uridin in einer Konzentration von 50 nM konnte der Radioligand durch Phenacyluridin nur in sehr hohen Konzentrationen mit einem IC_{50} -Wert von 196 μM von der Bindungsstelle verdrängt werden. Dieses Ergebnis erklärt, warum mit [^3H]Phenacyluridin in Konzentrationen von 1-15 nM keine spezifische Bindung detektiert werden konnte. Das Ergebnis der japanischen Arbeitsgruppe Kimura et al., wonach Phenacyluridin einen K_i -Wert von 0,65 nM besitzt, kann damit nicht bestätigt werden.

Zu diesem Zeitpunkt ist noch nicht vollständig geklärt, ob die von [^3H]Uridin markierte Bindungsstelle dem in der Literatur postulierten „Uridin-Rezeptor“ entspricht oder ob es sich hierbei um das von uns identifizierte Uracil-bindende Protein (Kapitel 2) handelt. Gegen die zweite Vermutung spricht, dass Uridin in den Konkurrenzexperimenten mit [^3H]Uridin eine höhere Bindungsaffinität zeigt als Uracil. Die Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass [^3H]Uridin in der eingesetzten Konzentration von 50 nM zwei verschiedene Bindungsstellen – sowohl die Uracil-Bindungsstelle als auch die Uridin-Bindungsstelle – markiert. Diese Vermutung wird desweiteren dadurch bestätigt, dass Uracil in Konkurrenzexperimenten versus [^3H]Uridin einen biphasischen Kurvenverlauf zeigt, wobei der erste IC_{50} -Wert von 3 nM vermuten läßt, dass es sich hierbei um die Uracil-Bindungsstelle handelt.

Die mangelnde metabolische Stabilität von [^3H]Uridin während der Inkubation scheint ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Möglicherweise wird das [^3H]Uridin während der Inkubationszeit (zumindest teilweise) enzymatisch durch eine Phosphorylase zu [^3H]Uracil abgebaut, welches wiederum an die Uracil-Bindungsstelle bindet. Einen Hinweis darauf geben die Konkurrenzexperimente mit [^3H]Uracil an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen, in denen Uridin einen biphasischen Kurvenverlauf aufweist. Aufgrund der niedrigen Radioligandkonzentration von 5 nM kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass [^3H]Uracil an weitere niedriger affine Bindungsstellen bindet. Zudem konnte in unabhängigen Sättigungsexperimenten in Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen eine homogene Population von hochaffinen Bindungsstellen für Uracil nachgewiesen werden. Somit deutet die biphasische Verdrängung durch Uridin auf eine enzymatische Spaltung zu Uracil hin. Es laufen bereits LC/MS-Untersuchungen zur Klärung der enzymatischen Spaltung von Uridin.

► Zusammenfassend ist festzuhalten, dass vermutlich neben der Uracil-Bindungsstelle auch spezifische Bindungsstellen für Uridin existieren. Es scheint auch erwiesen, dass die beiden Verbindungen jeweils an der anderen Bindungsstelle mit einer viel niedrigeren Affinität binden. Die Ergebnisse der japanischen Arbeitsgruppe Kimura et al. bezüglich der Affinität von Phenacyluridin zur Uridin-Bindungsstelle können nicht bestätigt werden. Sowohl Vorversuche mit [³H]Phenacyluridin als auch Bindungsstudien mit [³H]Uridin belegen eindeutig, dass das Phenacyl-Derivat keine im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich liegende Affinität zur Uridin-Bindungsstelle besitzt. Die Ursache für diese Diskrepanz ist bis dato unklar.

Weitere Experimente, u.a. die Untersuchung der enzymatischen Spaltung von Uridin, müssen in Zukunft folgen, um die vielen noch offenen Fragen zu beantworten.

Kapitel 5

Isolierung und Charakterisierung der Uridin-Cytidin-Kinase

5.1 Einleitung

Zellen und Zellmembranpräparationen enthalten Uridin bzw. Uracil, welches durch Zentrifugation möglicherweise nur teilweise entfernt werden kann. Diese physiologischen Pyrimidin-Derivate können Radioligand-Bindungsstudien und funktionelle Assays zur Charakterisierung von Pyrimidin-Rezeptoren möglicherweise stören. Zur quantitativen, biochemischen „Entfernung“ von Uridin sollte sich das Enzym Uridin-Cytidin-Kinase eignen.

5.1.1 Eigenschaften der Uridin-Cytidin-Kinase

Die *Uridin-Cytidin-Kinase* (*EC 2.7.1.48*) – erstmalig 1957 von Canellakis beschrieben³¹⁵ – gehört zur Enzymklasse der Phosphotransferasen. Sie ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in dem Pyrimidin-*Salvage*-Stoffwechselweg und katalysiert in Anwesenheit von ATP und Magnesium-Ionen die Umsetzung von Uridin und Cytidin zu den entsprechenden Monophosphaten (**Abb. 5.1**). ATP ist der effektivste Phosphat-Donor, wobei dUTP, dGTP und dATP ebenfalls gute Phosphat-Donoren darstellen. ITP, GTP, dCTP, dTTP hingegen sind weniger effektiv.

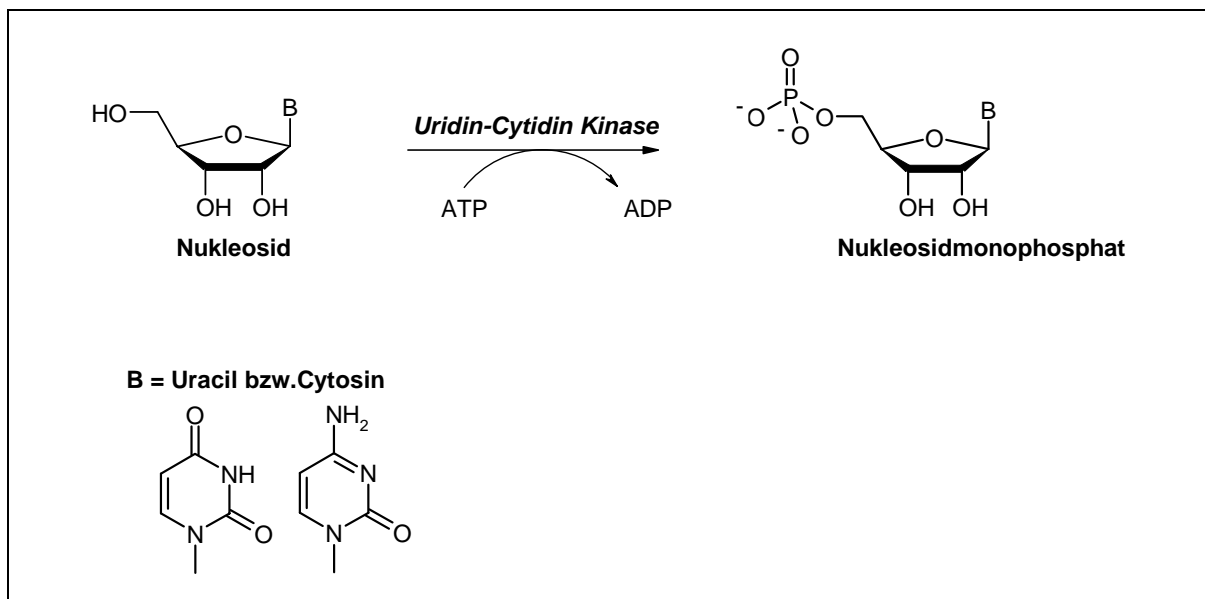


Abb. 5.1: Bildung von UMP bzw. CMP durch Uridin-Cytidin-Kinase

Die Nucleosidmonophosphate werden nachfolgend durch die Nucleosidmonophosphat-Kinase und die Nucleosid-Diphosphat-Kinase weiter zu den Nucleosidtriphosphaten phosphoryliert (**Abb. 5.2**).

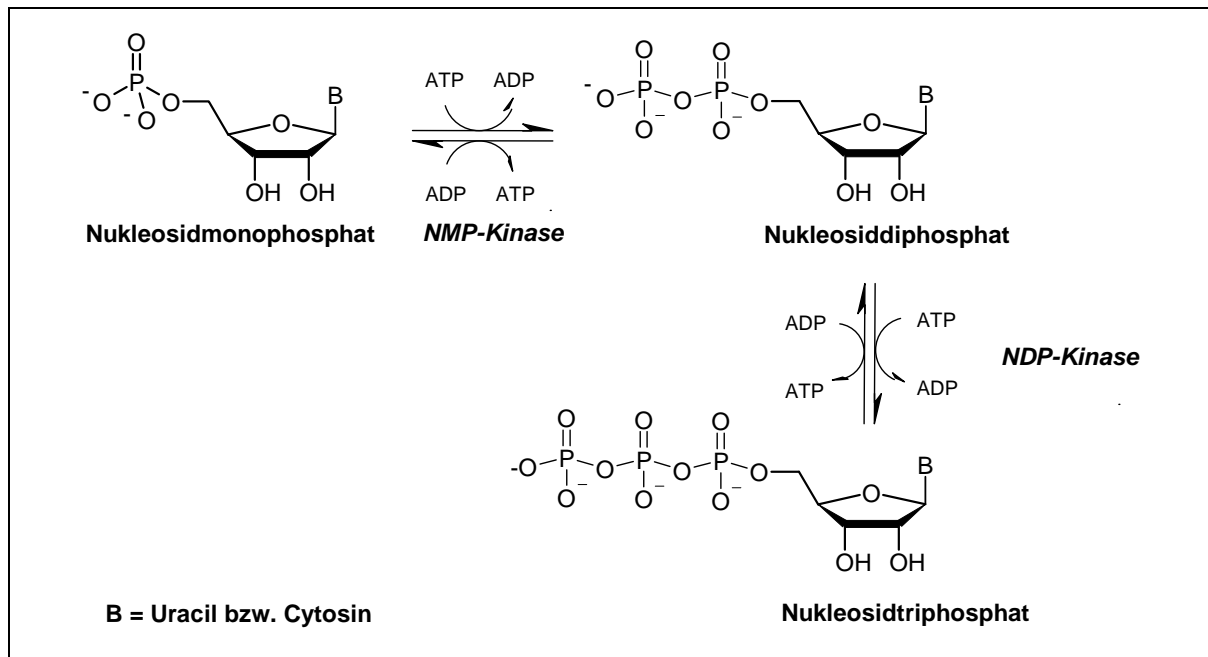


Abb. 5.2: Enzymatische Phosphorylierungskaskade vom Nucleosidmonophosphat zum Nucleosidtriphosphat

Die **UCK-Familie** besteht aus den zwei Mitgliedern **UCK1** und **UCK2**, welche beide in vielen Tumoren exprimiert werden. Die cDNA der humanen UCK1 und UCK2 konnte 2001 kloniert werden^{316,317}. Das UCK1-Gen kodiert für ein Protein aus 277 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 31 kDa. Das UCK2-Gen kodiert für ein Protein aus 261 Aminosäuren (29 kDa). Obwohl UCK1 und UCK2 ca. 70 % Sequenzhomologie aufweisen, ist die genaue physiologische Rolle von UCK1 noch unklar, während die UCK2 für die meisten Phosphorylierungen von Uridin und Cytidin in Zellen verantwortlich gemacht wird. Interessanterweise haben die Studien von Rompay et al. ergeben, dass die mRNA der UCK2 unter den untersuchten Geweben (Leber, Niere, Herz, Skelettmuskulatur, Gehirn, Plazenta, Milz und Darm) nur in der Plazenta exprimiert wird. Im Gegensatz dazu konnte für die mRNA der UCK1 eine ubiquitäre Expression festgestellt werden. Bei der in älteren Studien untersuchten UCK, nachgewiesen unter anderem in Ratten-Leber¹, Kalbs-Thymus³¹⁸, Ehrlich-Ascites-Tumor³¹⁹, Novikoff-Ascites-Ratten-Tumor³²⁰ und einer humanen lymphoblastischen Leukämie-Zelllinie³²¹, scheint es nach heutigem Stand in erster Linie um die UCK1 zu handeln³¹⁷. Die ermittelte Enzymaktivität war in Geweben, die einer raschen Zellerneuerung unterliegen (Thymus, Milz, Darm und vor allem in neoplastischen Zellen), sehr viel höher als in anderen Geweben³²².

Suzuki et al. gelang es 2003, die humane UCK2 zu kristallisieren. Sowohl die freie UCK2 als auch UCK2-Komplexe mit diversen Liganden wurden in sechs Kristallformen kristallisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Ligand-freie Form eine **Tetramer-Einheit** bildet und die anderen Kristalle (UCK2-Komplexe) zwei UCK2-Moleküle pro Assymetrie-Einheit enthalten^{323,324} (**Abb. 5.3**). Parallel dazu konnten auch Appleby et. al. die UCK2 kristallisieren und eine Kristallstruktur ermitteln, die mit der zuvor von Suzuki et al. veröffentlichten Struktur nahezu identisch ist³²⁵.

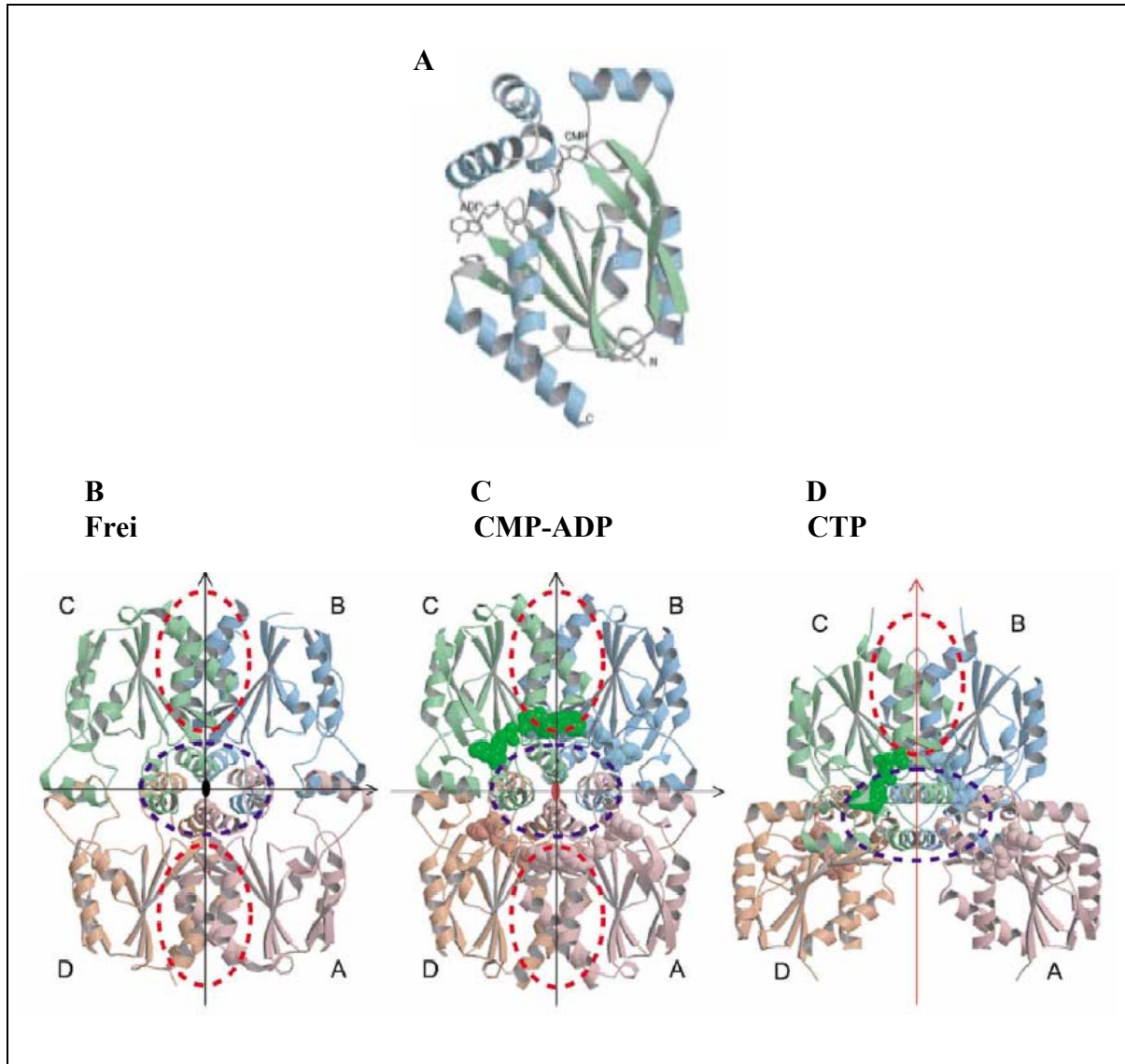


Abb. 5.3: Kristallstruktur der humanen UCK2³²⁴
(A) Kristallstruktur des humanen **UCK2-Monomers** (in Komplex mit CMP und ADP). Faltblatt-Strukturen (grün) sind als Pfeile und Helices (blau) als Spiralen dargestellt.
(B) Kristallstruktur des **Ligand-freien UCK2-Tetramers**.
(C) Kristallstruktur des **CMP-ADP-gebundenen UCK2-Tetramers**.
(D) Kristallstruktur des **CTP-gebundenen UCK2-Tetramers**.

Nach Suzuki et al. kann UCK als Mitglied der **Nukleosidmonophosphat-(NMP)-Kinase-Familie** (Abb. 5.4) klassifiziert werden, da sie eine Sequenzhomologie zu verschiedenen Kinasen der NMP-Kinase-Familie aufweist. Das UCK-Monomer besitzt ebenso wie die NMP-Kinasen eine klassische α,β -Mononukleotid-Bindungstasche³²⁴. Die NMP-Kinase-Familie kann funktionell in die beiden Gruppen „Nukleinsäure-Kinasen“ und „Nicht-Nukleinsäure-Kinasen“ unterteilt werden. In die zweite Gruppe fallen die sogenannten „OH-Kinasen“ wie die Schikimat-Kinase (EC 2.7.1.71), die Glukuronat-Kinase (EC 2.7.1.43) und die Phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19), welche Hydroxylgruppen von Nicht-Nukleinsäure-Substraten phosphorylieren. Die „Nukleinsäure-Kinasen“ können weiter in NMP-Kinasen und Nukleosid-Kinasen unterteilt werden. Nukleosidmonophosphat-Kinasen (NmpK) katalysieren den reversiblen Transfer einer Phosphatgruppe von einem Donor-Nukleotid (i.d.R. ATP) auf ein Akzeptor-Nukleosidmonophosphat (NMP), wobei ADP und ein Nukleosiddiphosphat (NDP) gebildet werden. Während die Spezifität gegenüber dem Phosphatdonor gering ist, ist die Spezifität gegenüber dem Akzeptor-NMP sehr hoch, sodass die NMP-Kinasen in *Adenylatkinase* (AmpK, EC 2.7.4.3), *Thymidylatkinase* (TmpK, EC 2.7.4.9), *Guanylat-Kinase* (GmpK, EC 2.7.4.8) und *Uridylat/Cytidylat-Kinase* (UMP/CMP-Kinase, UmpK, EC 2.7.4.14) unterteilt werden^{326,327,328}. UCK unterscheidet sich in zwei Punkten von den anderen Kinasen aus der NMP-Kinasen-Familie. Sie besitzt eine hohe Spezifität für den Zucker-Rest der Substrate. Während die meisten NMP-Kinasen und Desoxyribonukleosid-Kinasen nicht streng zwischen der Ribose und der 2'-Desoxyribose unterscheiden, phosphoryliert UCK nur Pyrimidin-Ribonukleoside und nie 2'-Desoxyribonukleoside. Der zweite Unterschied ist der, dass UCK als Homotetramer vorkommt und – vergleichbar mit der Desoxyribonukleosid-Kinase – einer sogenannten „Feedback-Regulierung“ unterliegt. NMP-Kinasen hingegen fungieren immer als Monomer und unterliegen keiner „Feedback-Regulierung“. Die *Adenosin-Kinase* (AK, EC 2.7.1.20), welche als Monomer vorkommt (Molekulargewicht: 38-56 kDa) zeigt weder Sequenz- noch topologische Homologie zur UCK.

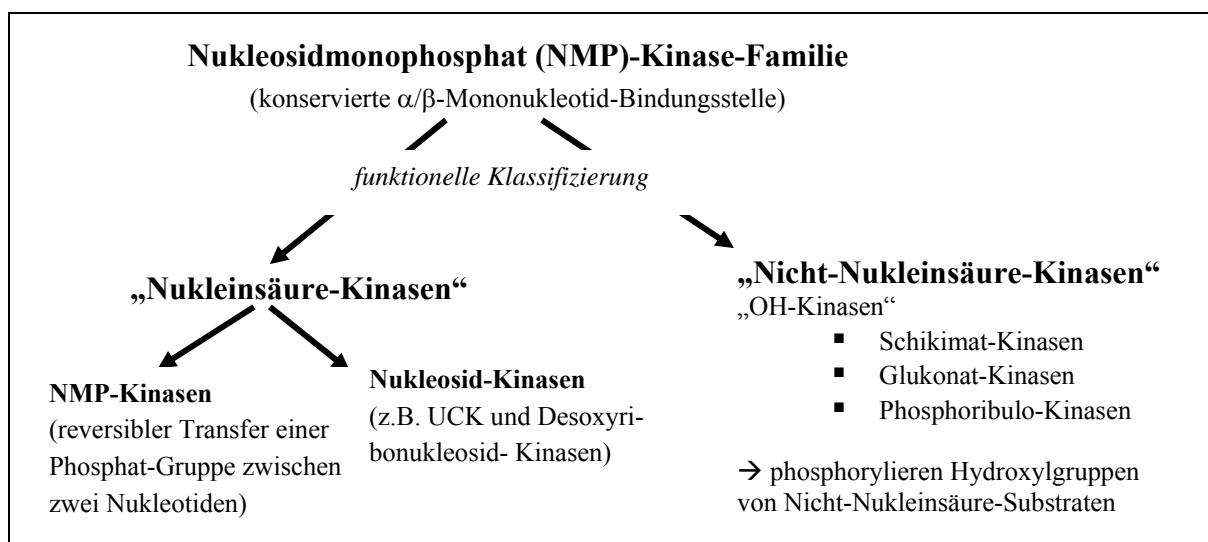


Abb. 5.4: Nukleosidmonophosphat- (NMP)-Kinase-Familie³²⁴

Die **Regulierung der UCK2** erfolgt durch UTP und CTP. Diese Nukleotide binden als sog. „Bisubstrat-Analoga“ sowohl an die Phosphat-Donor- als auch an die Akzeptor-Bindungsstelle und führen zu einer kompetitiven Hemmung des Enzyms („Feedback-Regulierung“). Frühere Vermutungen, dass die Bindung von CTP und UTP als „Feedback-Inhibitoren“ zu einer Dissoziation des Tetramers in Monomere führt^{329,330,331,332} und dass ATP das Tetramer stabilisiert, konnten kürzlich von Suzuki et al. widerlegt werden. Es wurde gezeigt, dass UCK2 in Lösung als Tetramer vorliegt, unabhängig davon, ob CTP gebunden ist oder nicht, wobei jedoch die Tetramer-Struktur der CTP- und UTP-gebundenen UCK2 „deformiert“ ist³²⁴.

5.1.2 Biologische Relevanz

Die Uridin-Cytidin-Kinase^{ee} spielt für die Entwicklung von neuen Arzneimitteln aus zweierlei Gründen eine wichtige Rolle. Zum einen wird durch die UCK die intrazelluläre Umwandlung vieler Pyrimidin-Nukleosid-Analoga zu zytotoxischen oder antiviral wirkenden Nukleotiden katalysiert, womit eine Aktivierung von Prodrugs stattfindet. Da Nukleotide nicht so leicht die Zellmembran passieren können, ist eine direkte Verabreichung ineffektiv. Zum zweiten spielt dieses Enzym, wie bereits erwähnt, eine Schlüsselrolle in dem Pyrimidin-Salvage-Stoffwechselweg. In Tumorzellen ist die Enzymaktivität signifikant erhöht, sodass eine Inhibierung des Enzyms eine wichtige Rolle in der Krebstherapie spielen könnte. Die UCK kann eine zentrale Rolle bei der Bereitstellung von Pyrimidin-Nukleotiden spielen, insbesondere wenn die Pyrimidin-*de-novo*-Biosynthese durch Zytostatika gehemmt ist. Inhibitoren des Enzyms wären aus diesem Grund insbesondere in Kombination mit Inhibitoren der Pyrimidin-Biosynthese von großem Interesse.

Somit stellt die Uridin-Cytidin-Kinase eine wichtige Zielstruktur zur Entwicklung von Prodrugs für die Antitumor- und Virustatika-Therapie dar, wobei sowohl Substrate als auch Inhibitoren dieses Enzyms von Bedeutung sind.

5.1.3 Substrate der Uridin-Cytidin-Kinase

Die UCK katalysiert die Phosphorylierung von diversen interessanten zytotoxischen Ribonukleosid-Analogen wie z.B. 5-Fluoruridin^{317,333} und 1-(2,3-Dihydroxy-4-hydroxymethyl-4-cyclopenten-1-yl)cytosin^{334,335,336} (**Abb. 5.5**), welche für ihre pharmakologische Aktivität eine Phosphorylierung benötigen. Sind diese Nukleotide einmal phosphoryliert, interferieren sie mit wichtigen zellulären Prozessen wie der DNA oder RNA-Synthese oder sie inhibieren Enzyme, welche in die Nukleotid-Synthese involviert sind. Es konnte gezeigt werden, dass die zytotoxische Aktivität der beiden vielversprechenden multifunktionellen Nukleosid-Antimetaboliten *1-(3'-Ethinyl-β-D-ribosefuranosyl)cytosin* (*E-Cyd, TAS 106*) und *1-(3'-Ethinyl-β-D-ribosefuranosyl)uridin* (*EUrd*) (**Abb. 5.5**)

^{ee} wenn nichts anderes angegeben ist, sind beide Enzyme (UCK1 und UCK2) gemeint

vorwiegend von der ersten Phosphorylierung durch die Uridin-Cytidin-Kinase abhängt. Diese beiden Nukleosid-Antimetaboliten sind potente Inhibitoren der DNA-Polymerase und zeigen in Xenocraft-Modellen sehr gute Antitumoraktivität gegen verschiedene solide Tumoren. In TAS 106- und EUrD-resistenten Zellen konnte eine Herunterregulierung der UCK festgestellt werden. Es wird angenommen, dass die intrazelluläre Phosphorylierung bei der Resistenzentwicklung von Krebszellen gegenüber TAS-106 oder EUrD beteiligt ist. In neueren Studien wurde gezeigt, dass UCK2 und nicht UCK1 in humanen Krebs-Zellen exprimiert wird und dass die Expression von UCK2 mit der Sensitivität der humanen Krebszellen gegenüber TAS-106 korreliert^{337,338,339, 340,341}.

Desweiteren sind auch die folgenden Verbindungen Substrate der Uridin-Cytidin-Kinase): 5-Fluorcytidin, 6-Azauridin (antiviraler Effekt), 3-Desazauridin (zytostatisch wirksam), 5-Hydroxyuridin (inhibiert bakterielles und virales Wachstum, zytostatisch wirksam), 5-Azacytidin (zytostatisch wirksam), 6-Azacytidin (zytostatisch wirksam), 4-Thiouridin, 2-Thiocytidin und N⁴-Acetylcytidin^{317,342,343,344}. Die Substrate sind in **Abb. 5.5** abgebildet. Die UCK hat eine hohe Spezifität für die **2'-Hydroxy-Gruppe des Pyrimidin-Ribonukleosides**, sodass 2'-Desoxyribonukleoside nicht als Substrate der Uridin-Cytidin-Kinase akzeptiert werden. Desweiteren sind auch Purinribonukleoside keine Substrate der UCK³¹⁷.

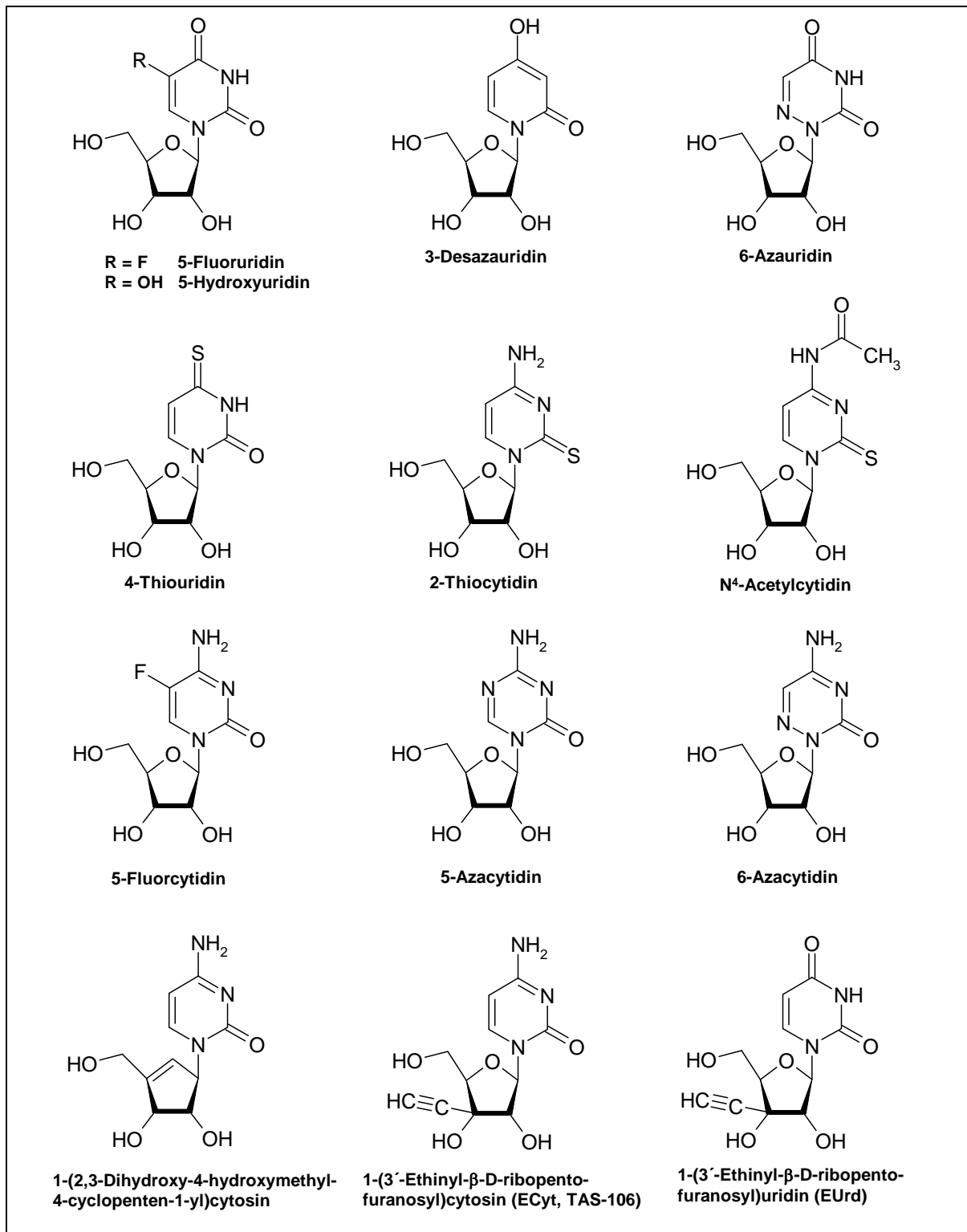


Abb. 5.5: Substrate der Uridin-Cytidin-Kinase

5.1.4 Inhibitoren der Uridin-Cytidin-Kinase

Neben den bereits erwähnten „Feedback-Inhibitoren“ UTP und CTP wurden die Verbindungen 5-Azacytidin-5'-triphosphat (5-Aza-CTP)³⁴⁵, 5'-Azido-5'-desoxycytidin, 5'-Azido-5'-desoxyuridin, 5'-Amino-5'-desoxy-6-azauridin, 5'-O-Nitrouridin und 5'-O-Nitro-5'-fluoruridin als Inhibitoren der UCK identifiziert^{346,347}. Weiterhin erwiesen sich einige carbocyclische Derivate (1-(2,3-Dihydroxy-4-hydroxymethyl-4-cyclopenten-1-yl)cytosin bzw. -uracil-Analoga) als effektive kompetitive Inhibitoren der UCK und des Uridin-Salvage-Stoffwechselweges³⁴⁸. In **Abb. 5.6** sind die Strukturen der Inhibitoren dargestellt.

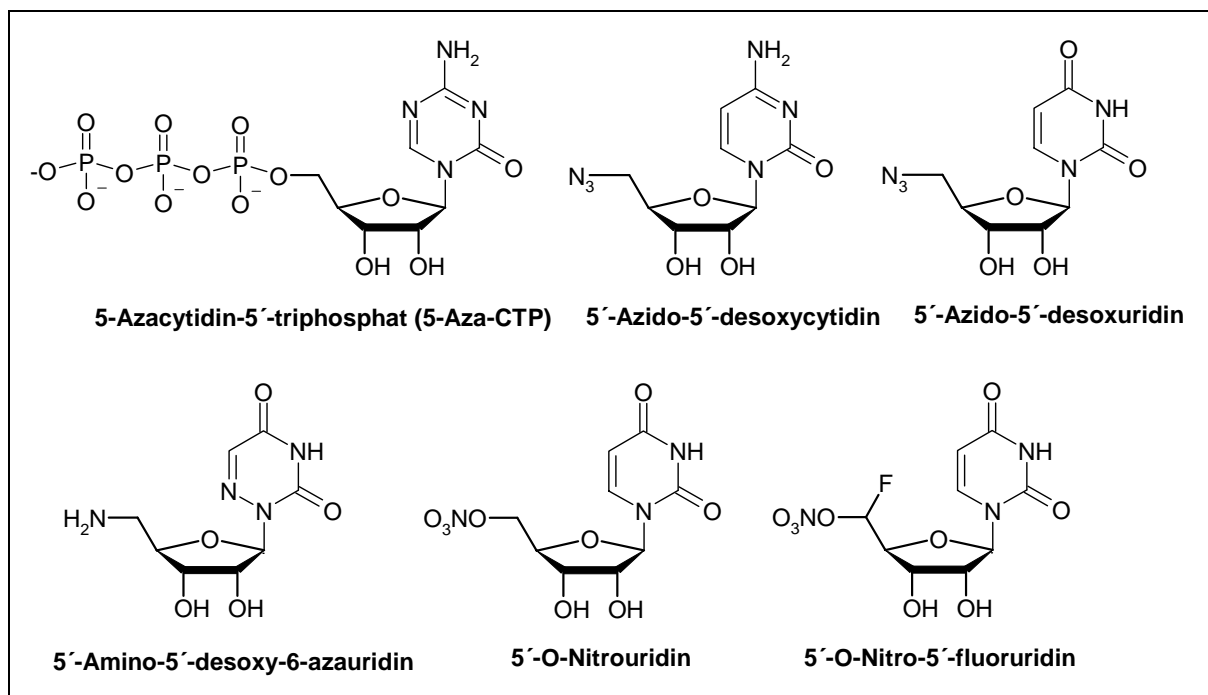


Abb. 5.6: Inhibitoren der Uridin-Cytidin-Kinase

Für die UCK-Inhibitoren wurden folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen ermittelt: Eine Substitution an der 5'-Position der Ribose, insbesondere wenn der Substituent groß ist, erniedrigt die Effizienz der Inhibitoren der Uridin-Cytidin-Kinase. Eine Substitution an der 5-Position des Pyrimidin-Ringes führt zu niedrigeren Affinitäten der Inhibitoren. Die Substitution von Halogenen an die 2'-oder 3'-Position von Uridin führt ebenfalls zu niedrigeren Affinitäten für die Uridin-Cytidin-Kinase. In **Abb. 5.7** sind die Struktur-Wirkungsbeziehungen zusammenfassend dargestellt.

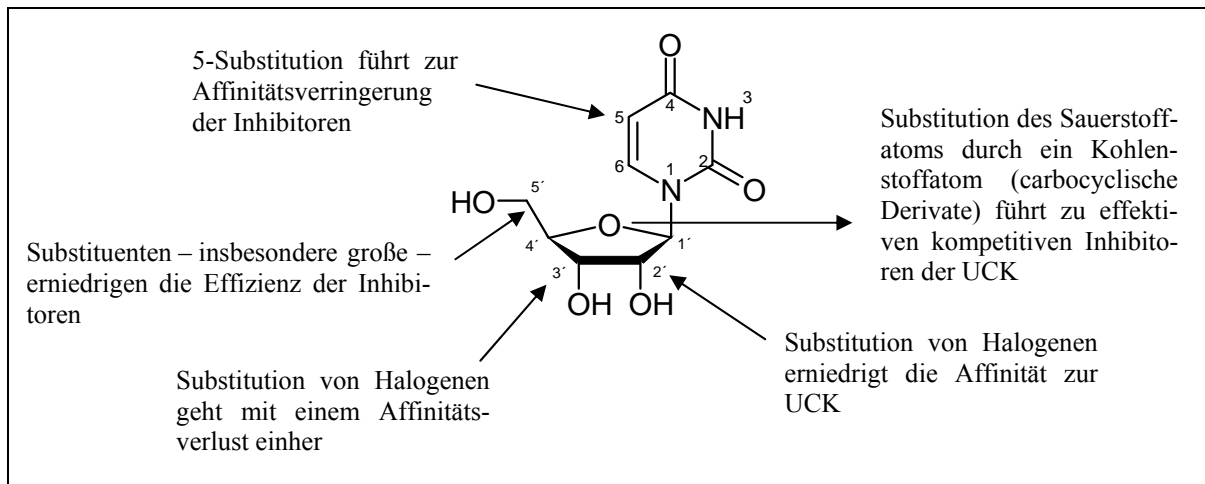


Abb. 5.7: Struktur-Wirkungsbeziehungen der Inhibitoren der Uridin-Cytidin-Kinase

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Inhibition der Uridin-Cytidin-Kinase an dem gefäßerweiternden Effekt von Minoxidil (**Abb. 5.8**) in der Ratte beteiligt ist³⁴⁹. Macdonald et al. konnten mit Hilfe von *in-vivo*-Experimenten zeigen, dass der aktive Metabolit von Minoxidil die Uridin-Cytidin-Kinase in Ratten-Leber inhibiert. Daneben konnte festgestellt werden, dass es bei Hochdruck-Patienten nach Behandlung mit Minoxidil zu einer Erhöhung der Uridin-Plasma-Konzentration kommt. Die Inhibition der Uridin-Cytidin-Kinase führt zu einer Hemmung der UMP- und folglich zu einer Blockade der Uracil-Nukleotid-Bildung. Da den Uracil-Nukleotiden eine vasokonstriktive Wirkung zugeschrieben wird, führt die Inhibition der UCK durch Minoxidil nach Ansicht der Autoren zu einer Vasodilatation.

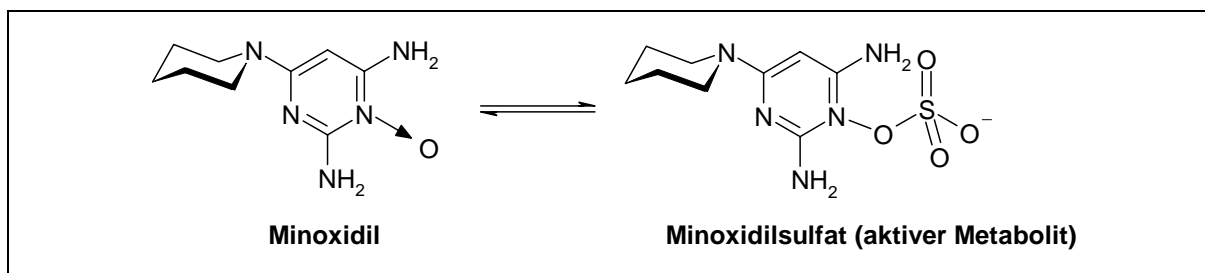


Abb. 5.8: Minoxidil und Bioaktivierung¹⁵⁵

Daneben konnten Najarian und Traut zeigen, dass die Dihydropyridin-Derivate (Calciumantagonisten) Nifedipin und Nimodipin kompetitiv mit vergleichsweise niedrigen K_i -Werten von 28 μM bzw. 20 μM die Uridin-Cytidin-Kinase hemmen³⁵⁰.

5.2 Aufgabenstellung

Ziel dieses Teilprojektes war es, das Enzym Uridin-Cytidin-Kinase aus Kalbs-Thymus zu isolieren und mit Hilfe chromatographischer Methoden aufzureinigen. Nach der Aufreinigung sollte das Enzym bezüglich der Enzymaktivität untersucht und charakterisiert werden. Dazu sollte ein neuer Radioassay etabliert werden, welcher zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m sowie des V_{max} -Wertes herangezogen werden kann. Das Enzym sollte als Zielstruktur zur Identifizierung von neuen Substraten und Inhibitoren dienen. Im Zuge der Uridin-Forschung waren von Herrn Dr. Till Schumacher aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. C. E. Müller bereits verschiedene Uridin-Derivate synthetisiert worden, welche in zukünftigen Testungen an der Uridin-Cytidin-Kinase untersucht werden sollten. Darüber hinaus würde das Enzym es erlauben, physiologisches Uridin z.B. aus Membranpräparationen enzymatisch zu „entfernen“, um eventuelle Störungen durch das physiologische Nukleosid zu verhindern.

5.3 Reinigung des Enzyms Uridin-Cytidin-Kinase

Die Enzymisolierung wurde in Anlehnung an den Artikel von Lee et. al.³¹⁸ durchgeführt, wobei bei der Aufreinigung mit Hilfe der Säulenchromatographie die Vorgehensweise modifiziert wurde. Die Proteinbestimmung des isolierten Enzyms erfolgte nach der Methode von Lowry^{351,352}. Nach der Isolierung wurde zur Entsalzung sowie zur Aufkonzentrierung der Probe die Methode der Ultrafiltration angewandt. Für die Aufreinigung der isolierten Uridin-Cytidin-Kinase kam die Säulenchromatographie (FPLC) zum Einsatz, wobei die folgende, zwei Schritte beinhaltende, Aufreinigungsstrategie entwickelt wurde: Trennung mit Ionenaustauschchromatographie als erster Reinigungsschritt und anschließende Trennung der Probe durch Gelchromatographie (Größenausschlußchromatographie) als zweiter Schritt. Zur Analyse der Proteine in der Enzymlösung sowie zur Überprüfung der Effektivität der einzelnen Verfahren (Ionenaustauschchromatographie, Gelchromatographie) wurde als Validierungsschritt die Gelelektrophorese – diskontinuierliche Zonenelektrophorese in ihrer Variante der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli³⁵³ herangezogen.

Als Ausgangsmaterial wurden ca. 700 g (Nassgewicht) Kalbs-Thymus (Schlachthof, Köln) eingesetzt. Nach der Ultrafiltration wurde das Volumen auf 10 mL eingestellt und die Enzymlösung auf die Ionenaustauscher-Säule gebracht.

Die detaillierten Ergebnisse für die einzelnen Schritte sind im Anschluss an diesen Abschnitt dargestellt. Der Verlauf der Reinigung ist in folgender Übersicht zusammengefasst:

Tab. 5.1: Aufreinigungsschritte zur Isolierung der Uridin-Cytidin-Kinase

Reinigungsschritt
1. Isolierung der UCK aus Kalbs-Thymus
2. Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration
3. Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose
4. Aktivitätsbestimmung und Vereinigen der aktiven Fraktionen
5. Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration
6. Gelchromatographie mit Superose 12 HR 10/30-Säule
7. Aktivitätsbestimmung und Vereinigen der aktiven Fraktionen
8. Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration

5.4 Anionenaustausch-Chromatographie

Die Ionenaustausch-Chromatographie basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Ionen entgegengesetzter Ladung, von denen eine Ionenart kovalent an eine Matrix gebunden vorliegt. Bei einer Anionenaustauschchromatographie besteht die Trägermatrix aus positiv geladenen Gruppen (z.B. Diethylaminoethyl-Resten, DEAE). Diese Gruppen liegen über einen weiten pH-Bereich protoniert und damit positiv geladen vor. Das negativ geladene Gegenion ist häufig Chlorid. Unter Austausch dieses Gegenions kann ein negativ geladenes Molekül an die Matrix gebunden werden. Die Trennung von Proteinen erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladungen, die durch unterschiedliche Anteile von Aminosäuren mit positiv (Lysin, Arginin, Histidin) und negativ geladenen Seitenketten (Asparaginsäure, Glutaminsäure) bedingt sind.

In der Theorie gibt es zwei generelle Methoden zur Elution der Proteine. Diese sind

- (a) Änderung des pH-Wertes, was zur Ladungsänderung des Proteins und im Idealfall zur Schwächung der Bindung führt, und
- (b) eine Steigerung der Ionenstärke, wodurch die Konkurrenz um Bindungsplätze erhöht und damit elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und Säulenmaterial geschwächt werden. Bei dem untenstehenden Experiment wurde die zweite Methode (b) angewandt.

DEAE-Cellulose-Chromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde ein *GradiFrac™ System* der Firma Amersham Pharmacia Biotech (später Amersham Biosciences) verwendet.

Gelmaterial: DEAE-Cellulose

Säule: XK26/16-Säule, selbst gepackt

Puffer A: 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5, 20 mM 2-Mercaptoethanol, 20 % Glycerol

Puffer B: 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5, 20 mM 2-Mercaptoethanol,
20 % Glycerol, 1,0 M KCl

Auf die zuvor mit Puffer A äquilibrierte Säule wurde die mit der Ultrafiltration auf 10 mL aufkonzentrierte Enzymlösung aufgetragen und mit einer Flußrate von 0,5 mL/min mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl eluiert. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 4 ml gesammelt. Die **Abb. 5.9** zeigt den Verlauf der Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen nach der Chromatographie über DEAE-Cellulose.

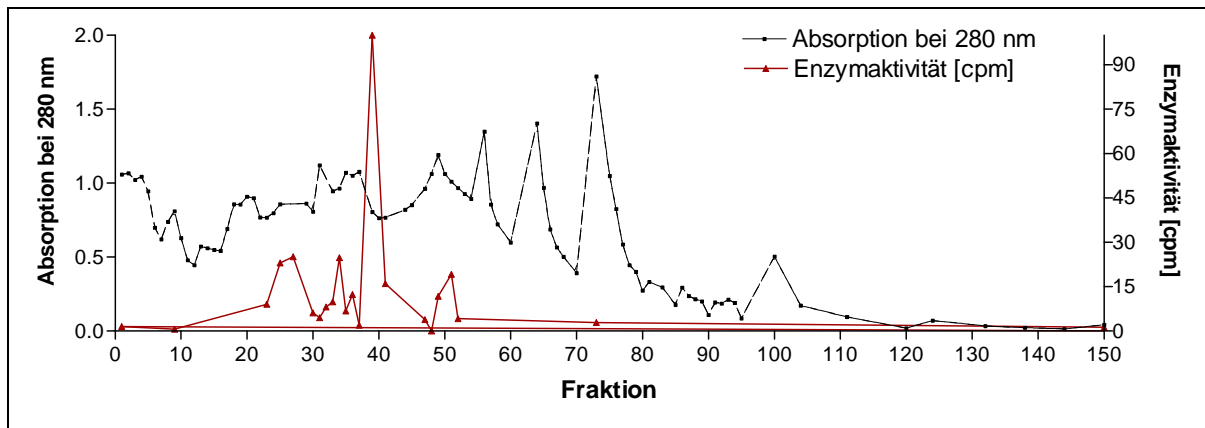


Abb. 5.9: Anionenaustauschchromatographie über *DEAE-Cellulose*. Dargestellt sind der Verlauf der Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen und die Absorption der Fraktionen bei 280 nm.

Es konnten fünf Peaks mit einer Enzymaktivität isoliert werden. Die Maxima dieser Peaks lagen bei einer Konzentration von etwa 130 mM, 170 mM, 180 mM, 210 mM und 270 mM KCl im Elutionspuffer (**Abb. 5.10**).

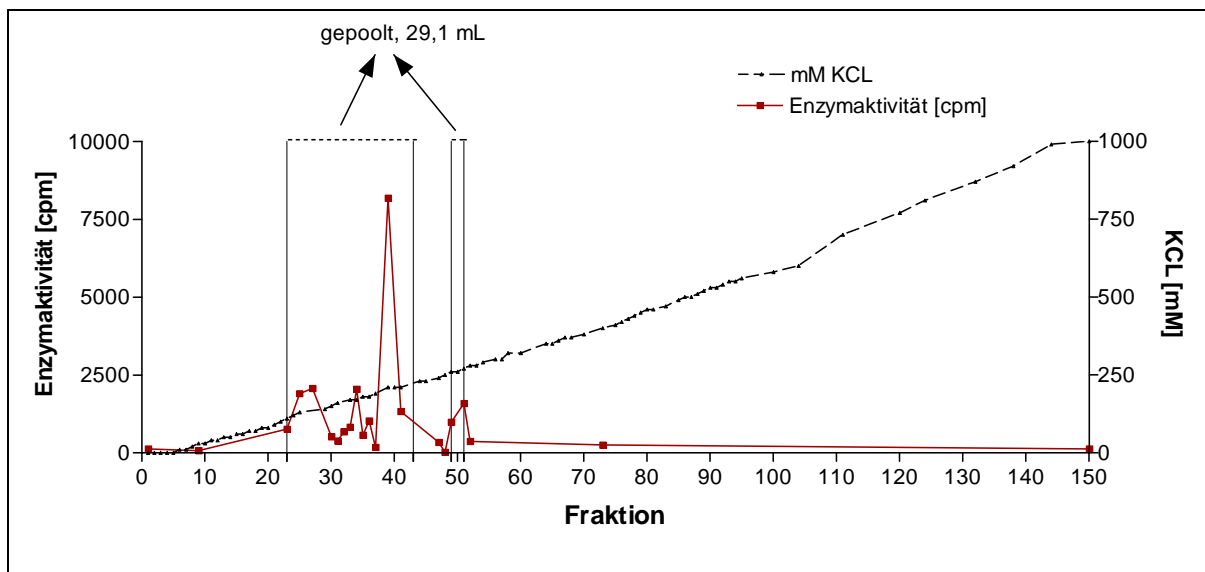


Abb. 5.10: Verlauf der Enzymaktivität bei Elution über eine *DEAE-Cellulose*-Säule mit einem Gradienten von 0-1M KCl bei 4°C. Äquilibrierungspuffer: 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5, 20 mM 2-Mercaptoethanol and 20 % Glycerol.

Die Fraktionen mit Enzymaktivität aus der Reinigung mit *DEAE-Cellulose* wurden vereint (29,1 mL) und durch Ultrafiltration mit einer *Ultracel-10*-Membran (*Amicon®Ultra*, *Millipore*) auf etwa 2,5 mL aufkonzentriert. Ein Aliquot wurde für die Proteinbestimmung aufbewahrt. Der Rest wurde mithilfe der Gelchromatographie weiter aufgereinigt.

5.5 Gelchromatographie

Die Gelchromatographie ist ein chromatographisches Verfahren, welches eine Trennung gelöster Substanzen nach ihrer Molekülgröße ermöglicht. Als stationäre Phase dient hierbei ein poröses Material, welches in eine Glassäule gefüllt wird. Dabei handelt es sich um kleine Perlen aus hydrophilen Polysacchariden (Dextran, Agarose) oder Polyacrylamid, deren Kettenstruktur zu einem dreidimensionalen Netzwerk verflochten ist. Das verwendete Material (Trägermaterial) und sein Vernetzungsgrad definiert die Porengröße der stationären Phase (Gelmatrix). Durch die Porengröße wiederum wird bestimmt, ob ein Molekül einer bestimmten Größe in das Gel diffundieren kann. Molekülen, die zu groß sind, um in die Poren eindiffundieren zu können, steht nur das Volumen zwischen den Gelpartikeln zur Verfügung, sie werden praktisch ausgeschlossen. Sie werden von der mobilen Phase (Pufferstrom) schnellmöglich durch die Säule transportiert. Kleine Moleküle können in die Gelporen eindringen, wodurch ihre Wanderungsgeschwindigkeit in der Säule vermindert wird. Dabei gilt: *Je kleiner ein Molekül ist, desto geringer ist seine Wanderungsgeschwindigkeit in der Säule.* Die Auftrennung erfolgt damit nach Molekülgröße.

Die mittels der Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigte und mittels Ultrafiltration aufkonzentrierte Enzymlösung (siehe Abschnitt 5.4) wurde auf eine Superose 12 HR 10/30-Säule (Amersham Biosciences) gegeben, welche vorher mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5, 20 mM 2-Mercaptoethanol, 20 % Glycerol equilibriert wurde und bei einer Flußrate von 30 mL pro Stunde eluiert. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 7,5 mL gesammelt. In **Abb. 5.11, A** ist der Verlauf der Enzymaktivität bei Elution einer Superose 12 HR-Säule dargestellt.

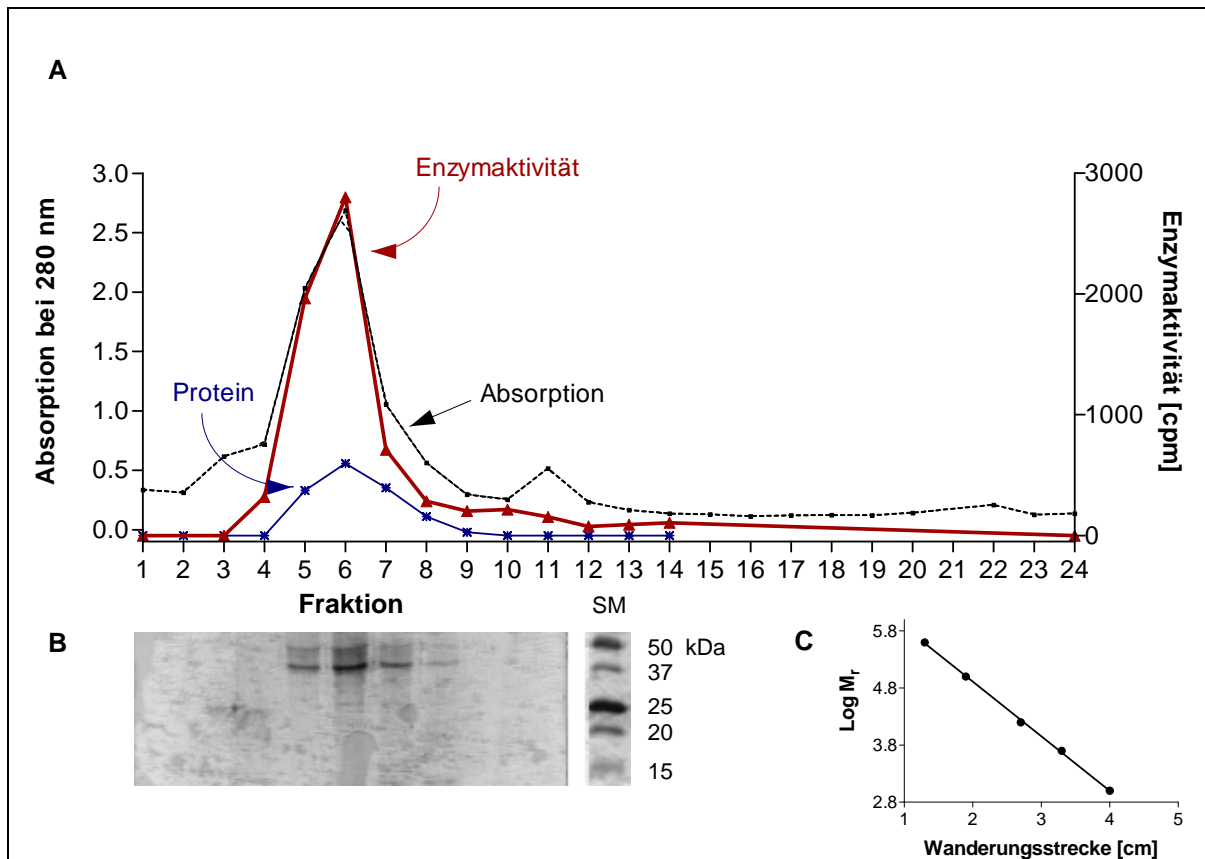


Abb. 5.11: **A:** Gelchromatographie über Superose 12 HR. Dargestellt sind der Verlauf der Gesamtproteinkonzentration, Absorption und Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen.
B: 12 % SDS-Gel mit Fraktionen nach Reinigung an Superose 12 HR. Nach 1:2-Verdünnung mit dem Probenpuffer wurden je 10 μL pro Tasche aufgetragen, SM: Standard-Marker.
C: Eichgerade für die 12%-ige SDS-PAGE (Mobilität versus Molekulargewicht)

Der Enzym-Peak erscheint relativ früh (Fraktion 5-7). Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Enzym in Lösung als ein Homotetramer (siehe Abschnitt 5.1) vorliegt und damit ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa aufweist. Da die verwendete Säule einen Molekulargewichtsbereich von 1 bis 300 Kilodalton besitzt, wird das Tetramer recht schnell aus der Säule eluiert. Auf dem SDS-PAGE-Gel (**Abb. 5.11, B**) sind jeweils zwei Banden zu erkennen, deren Intensität mit der gefundenen Enzymaktivität sehr gut korreliert. Da zwischen dem Rf-Wert und dem Logarithmus des Molekulargewichtes ein linearer Zusammenhang besteht, kann mit Hilfe der Eichgeraden (**Abb. 5.11, C**) das unbekannte Molekulargewicht der beiden Banden bestimmt werden. Aus der Eichgeraden lässt sich für die Proteinbanden ein Molekulargewicht von 37 bzw. 44 kDa ermitteln. Unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE wird das Tetramer zerstört, sodass auf dem Gel die Monomere zu erkennen sind. Die Banden können den beiden Mitgliedern der UCK-Familie, UCK1 (44 kDa) und UCK2 (37 kDa) zugeordnet werden. Rompay et al. ermittelten für die humane UCK1 ein Molekulargewicht von 31 kDa und für die humane UCK2 ein Molekulargewicht von 29 kDa³¹⁷. Damit stimmen die Molekulargewichte der aus Kalbs-Thymus isolierten Enzyme UCK1 und UCK2 relativ gut mit den für die humanen

Enzyme ermittelten Werten überein. Rompay et al. konnten unter den untersuchten Human-Geweben (Skelettmuskulatur, Herz, Niere, Leber, Milz, Gehirn, Darm) nur im Plazenta eine Expression der UCK2 feststellen, während für UCK1 ein ubiquitäres Expressionsmuster nachgewiesen wurde³¹⁷. Interessanterweise scheinen in Kalbs-Thymus beide Enzyme der UCK-Familie exprimiert zu werden. Zudem ist Proteinbande von UCK2 vergleichsweise stärker ausgeprägt als die von UCK1, was auf eine höhere Expression der UCK2 hindeutet.

Die Fraktionen 5-7 wurden vereint (9 mL) und mit einer Amicon-Filtereinheit auf 3,5 mL aufkonzentriert. Für diese aufgereinigte Enzymlösung wurde eine Proteinkonzentration von 8,0 mg/mL ermittelt.

5.6 Aktivitätsbestimmung mittels Radioassay

Zum Nachweis der Enzymaktivität wurde ein neuer, sensitiver, für die Uridin-Cytidin-Kinase noch nicht beschriebener Radioaktiv-Assay etabliert, welcher im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Methoden viel einfacher in der Handhabung ist und literaturkonforme Ergebnisse liefert.

Bei diesem Assay wird als Substrat radioaktiv markiertes Uridin ($[^3\text{H}]\text{Uridin}$) eingesetzt und das entstandene $[^3\text{H}]\text{UMP}$ mit Lanthanchlorid (LaCl_3) gefällt. Bei dieser Fällungsreaktion wird nur das Nukleotid ($[^3\text{H}]\text{UMP}$) präzipitiert, wobei das tritiierte Nukleosid in Lösung bleibt. Anschließend wird das Präzipitat durch Abfiltrieren mit dem Harvester von dem Nukleosid getrennt und im Counter vermessen. Mithilfe der so erhaltenen Messwerte kann der Umsatz an UMP in fmol pro Zeit pro mg Protein errechnet werden. Dieser neu etablierte Assay konnte zur Enzymcharakterisierung herangezogen werden.

5.6.1 Steady-State-Phase

Zur Bestimmung der Steady-State-Phase der Uridin-Cytidin-Kinase wurde der Assay bei 37°C, konstantem pH-Wert von 7,5 [50 mM Tris-Puffer, 10 μM $[^3\text{H}]\text{Uridin}$ (spezifische Aktivität = 300 mCi/mmol), 2 mM ATP, 2,5 mM MgCl_2 , 10 mM Mercaptoethanol] und *variablen Inkubationszeiten* durchgeführt. Es wurden je 10 μL Uridin-Cytidin-Kinase (80 μg Protein) eingesetzt. Mit Kinetikstudien konnte gezeigt werden, dass die Steady-State Phase zwischen 0 und 60 Minuten liegt (**Abb. 5.12**).

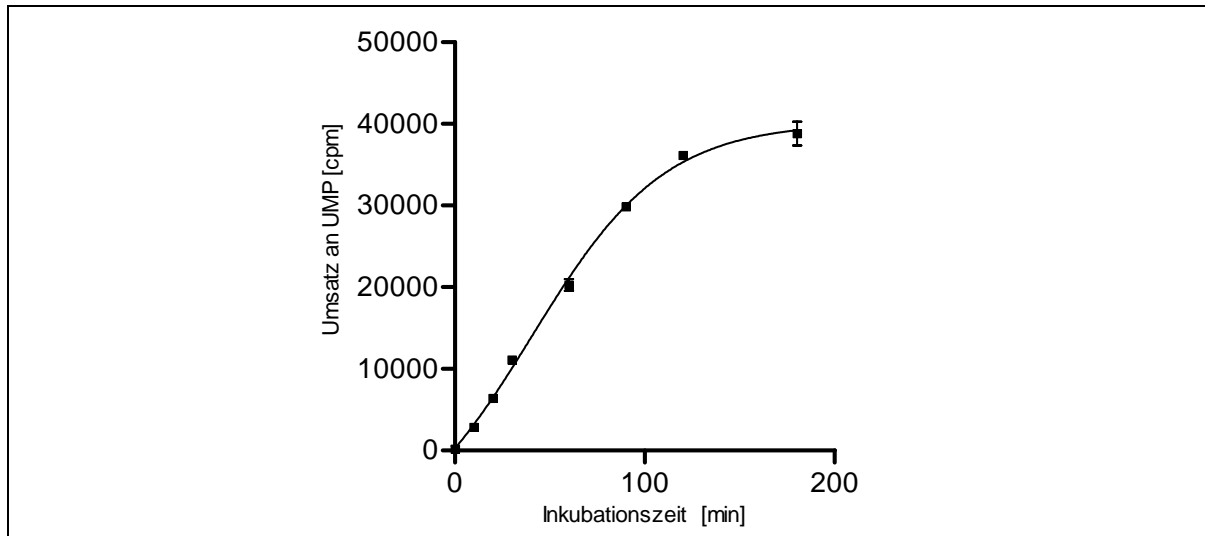


Abb. 5.12: Linearität der Produktumsetzung mit der Zeit. Die Steady-State Phase liegt zwischen 0 und 60 Minuten.

5.6.2 Enzymkinetik der Uridin-Cytidin-Kinase

Zur Bestimmung der Kinetik für die Uridin-Cytidin-Kinase wurde der Assay bei 37°C, konstantem pH-Wert von 7,5 (50 mM Tris-Puffer, 2 mM ATP, 2,5 mM MgCl₂, 10 mM Mercaptoethanol), konstanter Enzymmenge (20 µg Protein) und *variablen Substratkonzentrationen* (0-100 µM [³H]Uridin [spezifische Aktivität = 300 mCi/mmol]) durchgeführt.

Nach Michaelis & Menten (1913)³⁵⁴ ist die Geschwindigkeit v einer Reaktion definiert durch **Gleichung 5.1**.

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

v	= Reaktionsgeschwindigkeit
V_{\max}	= Maximale Geschwindigkeit
S	= Substratkonzentration
K_m	= Substratkonzentration, bei der v die Hälfte des Maximalwertes V erreicht

Gl. 5.1: Michaelis-Menten-Gleichung⁴¹

Dieses vereinfachte Modell erklärt die charakteristische hyperbolische Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration und liefert Größen, mit der die Wirksamkeit des Enzyms quantitativ charakterisiert werden kann. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m einer Reaktion bezeichnet die Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit v die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit V_{\max} annimmt. Eine hohe Affinität des Enzyms zum Substrat führt zu einem niedrigen K_m -Wert und umgekehrt. Die doppelt reziproke Form der Gleichung 5.1 (**Gl. 5.2**) beschreibt die lineare Funktion in **Abb. 5.13, B**. In der

grafischen Darstellung des Lineweaver-Burk-Diagramms erfolgt die Auftragung der reziproken Umsatzgeschwindigkeit $1/v$ gegen die reziproke Substratkonzentration $1/[S]$. Dabei entsteht eine Gerade mit der Steigung K_M/V_{\max} , die die Abszisse bei $1/K_M$ (Maximalgeschwindigkeit V_{\max}) schneidet.

$$\begin{aligned} \frac{1}{v} &= \frac{[S] + k_m}{V_{\max} \cdot [S]} \\ &= \frac{k_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} \cdot [S]} = \frac{k_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \end{aligned}$$

Gl. 5.2: Doppelt reziproke Regression nach *Lineweaver-Burk*³⁵⁵

In **Abb. 5.13, A** ist die Michaelis-Menten-Kinetik mit [³H]Uridin als Substrat dargestellt.

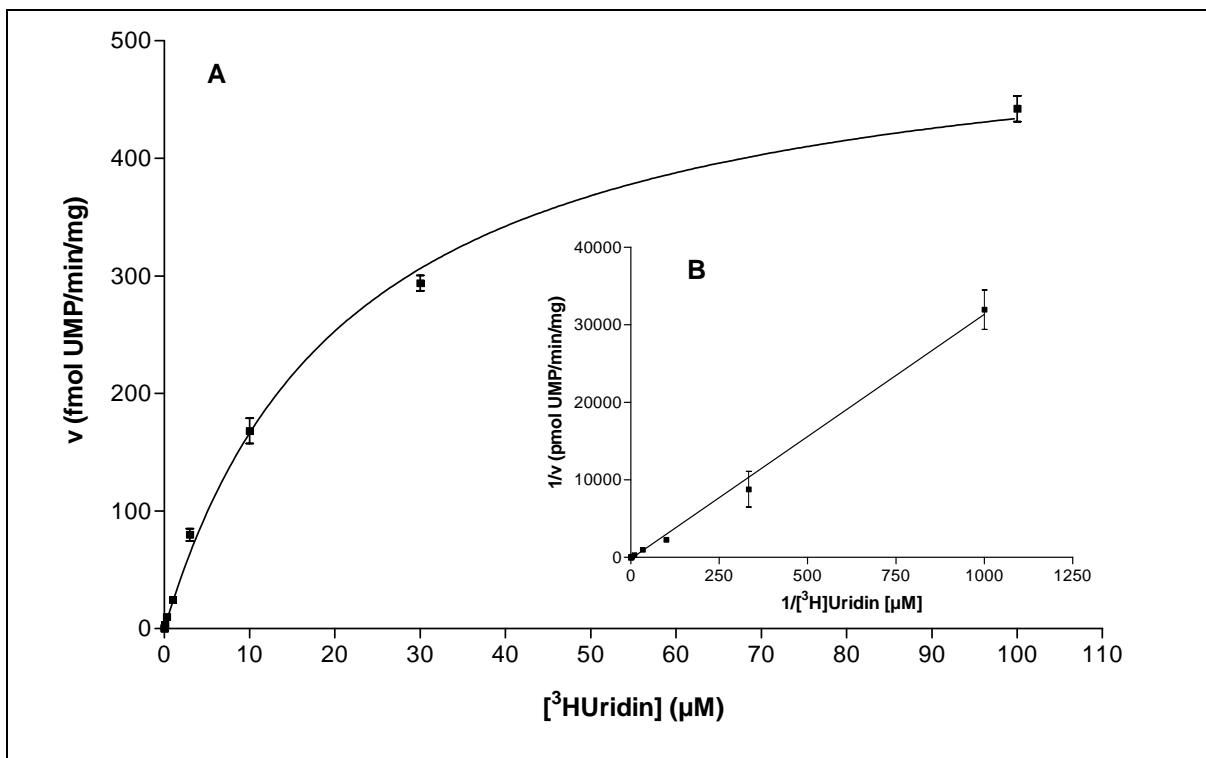


Abb. 5.13: Bestimmung der **Enzymkinetik** der Uridin-Cytidin-Kinase mittels Radioassay bei konstantem 37°C und pH 7,5.

A: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit v als Funktion der Substratkonzentration. Die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit entspricht der **Michaelis-Konstanten**. Als Ergebnis wurde ein K_m -Wert von 21,8 μM und ein V_{\max} -Wert von 529 fmol/min/mg Protein ermittelt.

B: **Lineweaver-Burk-Diagramm**, Doppeltreziproke Darstellung der Enzymkinetik

Für die aus Kalbs-Thymus aufgereinigte Uridin-Cytidin-Kinase konnte eine Michaelis-Menten-Konstante von **21,8 μM** und ein V_{max} -Wert von **529 fmol/min/mg** Protein ermittelt werden.

Die in der Literatur beschriebenen K_m -Werte für die Uridin-Cytidin-Kinase (mit Uridin als Substrat) schwanken zwischen 40 μM und 11,5 mM^{317, 321, 331, 356, 357, 358, 359}. In **Tab. 5.2** sind die K_m -Werte aus der Literatur zusammengefasst.

Tab. 5.2: K_m -Werte für Uridin zur Uridin-Cytidin-Kinase³⁶⁰

K_m -Wert [μM]	Organismus	Kommentar	Literaturstelle
50	Mensch	pH 7,6, 37°C, rekombinante UCK2	Van Rompay et al. ³¹⁷
140	Mensch	-	Drake et al. ³²¹
268	Mensch	pH 7,6, 37°C, rekombinante UCK1	Van Rompay et al. ³¹⁷
500	Mensch	pH 7,6, 37°C, Ovarialkarzinom	Shen et al. ³⁵⁸
11500	Mensch	pH 7,6, 37°C, normale Ovarien	Shen et al. ³⁵⁸
50	Kalb	Thymus, pH 7,5, 37°C	Lee et al. ³¹⁸
40	Maus	pH 8,0, 22°C	Payne et al. ³³¹
48	Maus	pH 7,4, 37°C	Sköld ³⁵⁹
150	Maus	pH 7,5, 25°C	Anderson ³⁶¹ , Liacouras et al. ³⁵⁹
230	Maus	-	Ahmed et al. ³⁶²
2100	Maus	pH 7,5, 25°C, Cosubstrat Cytidin	Liacouras et al. ³⁵⁹
52	Ratte	37°C, adulte Leber	Fulchignoni-Lataud ³⁶³
270	Ratte	37°C	Orengo et al. ³⁵⁷
400	Ratte	37°C, foetale Leber	Fulchignoni-Lataud ³⁶³
800	Ratte	pH 7,6, 37°C, normale Leber	Shen et al. ³⁵⁸
5000	Ratte	pH 7,6, 37°C, Hepatoma -Zellen	Shen et al. ³⁵⁸
210	Bacillus st.♦	-	Orengo et al. ³⁵⁷
210	Bacillus st.♦	pH 7,5, 10°C	Orengo et al. ³⁶⁴
640	Bacillus st.♦	-	Orengo et al. ³⁵⁷
640	Bacillus st.♦	pH 7,5, 37°C	Orengo et al. ³⁶⁴
1600	Bacillus st.♦	-	Orengo et al. ³⁵⁷
1600	Bacillus st.♦	pH 7,5, 60°C	Orengo et al. ³⁶⁴
350	E. coli	pH 7,8, 37°C	Valentin-Hansen ³⁶⁵

♦ *Bacillus stearothermophilus* gehört zu einer Gattung stäbchenförmiger, in Mehrzahl beweglicher Bakterien mit derzeit 48 Arten (\rightarrow Bazillen (*Bacillus*, lateinisch für "Stäbchen"). Dieser ausgesprochen thermophile Organismus hat ein Wachstumsoptimum bei 50 - 65°C.

Wie die **Tab. 5.2** zeigt, schwanken die publizierten K_m -Werte auch innerhalb eines Organismus erheblich. Diese hohe Diskrepanz scheint aus heutiger Sicht – nachdem von Van Rompay et al. die Existenz von zwei Mitgliedern der humanen UCK-Familie nachgewiesen wurde – in der unterschiedlichen (teilweise Gewebe-spezifischen) Expression der beiden Enzyme UCK1 und UCK2 begründet zu sein. Bei der Isolierung des Enzyms aus nati-

vem Gewebe wurde vermutlich zum größten Teil eine Mischung aus den beiden Enzymen erhalten, sodass je nach Gewebe und „Mischverhältnis“ die K_m -Werte variierten.

Die in dieser Arbeit ermittelte Michaelis-Konstante von 21 μM stimmt mit dem Wert, den Lee et al. für die ebenfalls aus Kalbs-Thymus isolierte Uridin-Cytidin-Kinase erhielten (50 μM), relativ gut überein. Im Vergleich zu den von Van Rompay et al. ermittelten K_m -Werten von 268 μM für die rekombinante humane Uridin-Cytidin-Kinase 1 und 50 μM für die rekombinante humane Uridin-Cytidin-Kinase 2, entspricht die ermittelte Michaelis-Konstante offensichtlich dem Wert der UCK2. Dies bestätigt die Ergebnisse der SDS-PAGE, wonach in der Enzymlösung die UCK2 eine höhere Konzentration aufweist.

5.7 Zusammenfassung

Das Enzym Uridin-Cytidin-Kinase wurde aus Kalbs-Thymus isoliert und mittels der Ionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Cellulose) und der Gelchromatographie (Superose 12 HR) aufgereinigt. Zur Charakterisierung des Enzyms wurde ein neuer Radioassay etabliert und zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante herangezogen. Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Methoden ist dieser neu etablierte Radioassay viel einfacher in der Handhabung und liefert literaturkonforme Ergebnisse.

Das aus Kalbs-Thymus-Gewebe isolierte Enzym bestand aus einer Mischung von Uridin-Cytidin-Kinase 1 und Uridin-Cytidin-Kinase 2. Mittels der SDS-PAGE konnte für UCK1 ein Molekulargewicht von ~ 44 kDa und für UCK2 ein Molekulargewicht von ~ 37 kDa ermittelt werden. Diese Werte sind mit denen der humanen Enzyme (29 bzw. 31 kDa) in guter Übereinstimmung. Die elektrophoretischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass die UCK2 in der Enzymlösung konzentrationsmäßig überwiegt. Als Ergebnis der Kinetik-Studien wurde ein K_m -Wert von 22 μM ermittelt, welcher relativ gut mit dem von Lee et al. ermittelten Wert (50 μM , aus Kalbs-Thymus) übereinstimmt.

► Als Ergebnis ist festzuhalten, dass in Kalbs-Thymus beide Enzyme der UCK-Familie – UCK1 (~ 44 kDa) und UCK2 (~ 37 kDa) – exprimiert werden, wobei die UCK2 den Ergebnissen der SDS-PAGE und der Enzymkinetik zufolge eine höhere Expression aufweist als die UCK1.

Die erfolgreich aus Kalbs-Thymus-Gewebe isolierte Uridin-Cytidin-Kinase kann damit für zukünftige Testungen verwendet werden und als wichtige Zielstruktur zur Identifizierung von neuen Inhibitoren und Substraten dienen. Desweiteren kann das Enzym zur quantitativen, biochemischen „Entfernung“ von physiologischem Uridin aus Membranpräparationen verwendet werden, um eventuelle Störungen von pharmakologischen Studien (Radioligand-Bindungsstudien, funktionelle Assays) zu verhindern.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

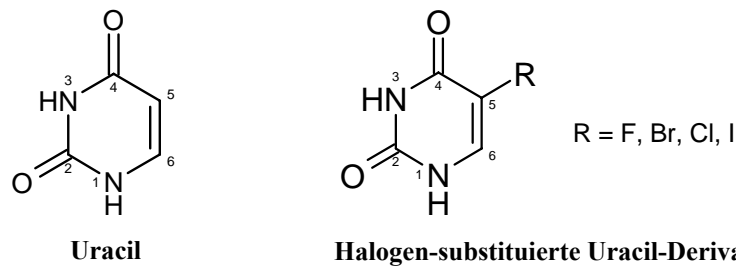
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Teil-Projekte bearbeitet, wobei es um die Fragestellung ging, ob neben den bekannten Adenosin- und Adenin-Rezeptoren auch Uridin- und Uracil-Rezeptoren existieren. In der Literatur werden für die Pyrimidine Uridin und Uracil verschiedene pharmakologische Wirkungen (u.a. ZNS-depressive Wirkung) beschrieben, wobei der jeweilige Wirkmechanismus bis dato weitgehend ungeklärt ist. Für Uridin wurde bereits von der Arbeitsgruppe Kimura et al. ein Uridin-Rezeptor postuliert, während für Uracil in der Literatur noch keine Untersuchungen darüber existieren.

Die drei Teil-Projekte führten im Wesentlichen zu der Erkenntnis, dass sowohl für die Nukleobase Uracil als auch für das Nukleosid Uridin spezifische hochaffine membranständige Bindungsstellen existieren. Die Charakterisierung der hiermit erstmals beschriebenen Uracil-Bindungsstelle bildete dabei den Schwerpunkt der Arbeit. Im folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der Projekte zusammenfassend dargestellt.

Im ersten Teil-Projekt wurde die Nukleobase Uracil näher untersucht. In Radioligand-Bindungsstudien mit [³H]Uracil wurden in verschiedenen Membranpräparationen spezifische Bindungsstellen identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Uracil-bindende Proteine sowohl in nativen Kalbshirn-Geweben (Striatum, Thalamus) als auch in nativen Geweben der Ratte (Striatum, Cortex) und des Menschen (Striatum, Cortex, Thalamus) in hoher Dichte exprimiert werden.

► **Sättigungsexperimente** an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen ergaben für [³H]Uracil eine einzige hochaffine Bindungsstelle mit einem K_D -Wert von 5,00 nM und einem sehr hohen B_{max} -Wert von 24,3 pmol/mg Protein. Sättigungsexperimente an Humanhirn-Membranpräparationen ergaben ähnliche Resultate. Die K_D -Werte betragen 5,07 nM für das Humanhirn-Striatum-, 4,49 nM für das -Cortex- und 2,19 nM für das -Thalamus-Gewebe. Die B_{max} -Werte lagen zwischen 17,0 bis 21,8 pmol/mg Protein und waren damit ähnlich hoch wie bei dem Kalbshirn-Striatum-Gewebe. Im Gegensatz zu Kalbshirn- und Humanhirn-Membranpräparationen konnten in Rattenhirn-Striatum-Membranpräparationen zwei verschiedene Bindungsstellen für [³H]Uracil detektiert werden, wobei die erste einen K_D -Wert von 0,61 nM ($B_{max} = 2,43$ pmol/mg Protein) und die zweite einen K_D -Wert von 48,6 nM ($B_{max} = 21,9$ pmol/mg Protein) aufwies. Desweiteren konnte die Existenz eines Uracil-bindenden Proteins in verschiedenen humanen Zelllinien (HEK293-Zellen, Jurkat T-Zellen und 1321N1-Astrozytom-Zellen) sowie in Zelllinien von Nagetieren (NG108-15-Zellen, C6-Gliom-Zellen, CHO-Zellen und McA-RH7777-Zellen) nachgewiesen werden. Diesen Ergebnissen zufolge existieren die Uracil-Bindungsstellen nicht nur im Gehirn, sondern auch in peripheren Geweben (Ovariale Zellen, Nierenzellen, geringere Expression in Leberzellen). Sättigungsexperimente an Membranpräparationen von NG108-15-Zellen (Maus-Neuroblastom x Ratten-Gliomzellen-Hybrid-Zellen) ergaben einen K_D -Wert von 5,47 nM und einen B_{max} -Wert von 6,3 pmol/mg Protein.

- In **Kinetikexperimenten** an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen konnte nachgewiesen werden, dass die [³H]Uracil-Bindung reversibel ist, wobei eine sehr langsame Assoziation ($t_{1/2} = 72$ Minuten; 5 nM, 37°C) und eine noch langsamere Dissoziation beobachtet werden konnte.
- Natriumionen (100 mM) führten zu einer starken Abnahme der spezifischen Bindung, während GTP keinen Effekt auf die [³H]Uracil-Bindung ausübte.
- Nach Etablierung eines Bindungsassays mit [³H]Uracil als Radioligand wurden in **Kompetitionsexperimenten** an Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen anhand von 45 größtenteils monosubstituierten Uracil-Derivaten und 44 weiteren, zumeist strukturell verwandten, Verbindungen die Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht.



5-Fluoruracil (**12**), stellte sich als das potenteste Derivat mit einem K_i -Wert von 8,12 nM heraus. Mit zunehmender Atomgröße des Substituenten konnte eine Abnahme der Affinität der Halogen-substituierten Derivate beobachtet werden: 5-Fluoruracil (**12**), 8,12 nM > 5-Chloruracil (**13**), 9,02 nM > 5-Bromuracil (**14**), 18,6 >> 5-Ioduracil (**15**), 341 nM. Uridin (**48**) zeigte unter den untersuchten Verbindungen als einzige eine biphasische Verdrängung der spezifischen [³H]Uracil-Bindung mit den beiden K_i -Werten 92,4 nM und 21,4 μ M, was vermutlich auf einen partiellen Abbau von Uridin zu Uracil zurückzuführen ist. Die Uracil-Bindungsstelle läßt – insbesondere an den Positionen 1, 2, 3, 4 und 6 – nur geringe strukturelle Modifikationen des Uracil-Grundgerüsts zu. Lediglich die Position 5 scheint für eine Substitution geeignet zu sein. Gößere Substituenten führen allerdings auch hier zu einer drastischen Affinitätsabnahme oder sogar zu einem gänzlichen Affinitätsverlust.

- Einige ausgewählte Uracil-Derivate wurden in **Kompetitionsexperimenten an NG108-15-Zellmembranpräparationen** untersucht. Hierbei ergaben sich im Vergleich zu Kalbshirn-Striatum-Membranpräparationen nahezu identische Bindungsaffinitäten, sodass es sich bei den untersuchten Bindungsstellen in Kalbs-Striatum und in NG108-15-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit um die gleichen Bindungsstellen handelt.

- Zur **Untersuchung der Funktionalität** wurden Experimente zur Bestimmung der cAMP-Akkumulation, [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien, sowie Experimente zur Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse der cAMP-Versuche deuten darauf hin, dass Uracil zu einer Inhibierung der Adenylatcyclase in NG108-15-Zellmembranpräparationen führt ($EC_{50} = 24,2$ nM), dass die Uracil-Bindungsstelle also eventuell mit einem G_i -Protein gekoppelt sein könnte. In [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien konnte allerdings keine Modulierung des G-Proteins beobachtet werden. Uracil führte in den Calcium-Assays zu keinem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration.

► Zukünftig gilt es, die Sequenz des Uracil-bindenden Proteins aufzuklären. Dies könnte durch Photoaffinitätsmarkierung in Membranpräparationen von Rattenhirn-Striatum erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste Vorversuche dazu durchgeführt. 5-Azidouracil konnte als mögliches Photoaffinitätsreagenz ermittelt werden, welches in tritierter Form bei der Photoaffinitätsmarkierung eingesetzt werden könnte. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass das Uracil-bindende Protein nach Solubilisierung mit dem nichtionischen Detergenz n-Dodecyl- β -maltosid noch in der Lage ist, Uracil mit hoher Affinität zu binden.

In einem weiteren Teil-Projekt wurde untersucht, ob die von der Arbeitsgruppe Kimura et al. postulierten Uridin-Rezeptoren tatsächlich existieren. Hierzu wurden Bindungsstudien mit [3 H]Phenacyluridin und [3 H]Uridin durchgeführt. Dabei konnte für [3 H]Uridin eine spezifische Bindung nachgewiesen werden, Bindungsstudien mit [3 H]Phenacyluridin (1-15 nM) dagegen führten zu keiner spezifischen Bindung. In Konkurrenzexperimenten mit [3 H]Uridin zeigte Phenacyluridin eine sehr geringe Bindungsaffinität ($IC_{50} = 200 \mu\text{M}$). Damit konnte die von Kimura et al. beschriebene hohe Bindungsaffinität (K_i -Wert: 3,30 nM) für Phenacyluridin nicht bestätigt werden. Unseren Ergebnissen zufolge hat das Phenacyl-Derivat eindeutig keine im nanomolaren Bereich liegende Affinität zur Uridin-Bindungsstelle. Wir konnten auch sonst keine Bindungsstellen für [3 H]Phenacyluridin in Hirngeweben der Ratte und des Kalbes detektieren. Uracil zeigt in Konkurrenzexperimenten versus [3 H]Uridin einen statistisch signifikanten biphasischen Kurvenverlauf ($IC_{501} = 2,93 \text{ nM}$, $IC_{502} = 16,1 \mu\text{M}$), welcher einen Hinweis darauf gibt, dass [3 H]Uridin (in der eingesetzten Konzentration von 50 nM) an zwei verschiedene Bindungsstellen binden könnte. Der niedrige IC_{501} -Wert läßt die Vermutung zu, dass es sich bei dieser Bindungsstelle um die Uracil-Bindungsstelle handelt, die aufgrund einer partiellen enzymatischen Spaltung von [3 H]Uridin zu [3 H]Uracil detektiert wird. Die bisher ermittelten Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass neben den Uracil-Bindungsstellen zusätzlich **spezifische Bindungsstellen für Uridin existieren, wobei Phenacyluridin entgegen den Ergebnissen von Kimura et al. zu diesen Bindungsstellen nur eine sehr geringe Bindungsaffinität aufweist**. Zur weiteren Charakterisierung der Uridin-Bindungsstellen ist es erforderlich, durch Einsatz von Enzym-Inhibitoren die vermutete partielle enzymatische Spaltung von Uridin während der Inkubationszeit zu unterbinden.

Ein drittes Teil-Projekt befasste sich mit dem Enzym Uridin-Cytidin-Kinase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym im Pyrimidin-*Salvage*-Stoffwechselweg. Dieses Enzym wurde aus Kalbs-Thymus isoliert und mittels säulenchromatographischer Verfahren aufgereinigt. Zur Charakterisierung des Enzyms wurde ein neuer Radioassay etabliert und zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante herangezogen. Bei diesem Assay wird als Substrat radioaktiv markiertes Uridin ([3 H]Uridin) eingesetzt und das entstandene [3 H]UMP mit Lanthanchlorid (LaCl_3) gefällt. Bei dieser Fällungsreaktion wird nur das Nukleotid ([3 H]UMP) präzipitiert, wobei das tritiierte Nukleosid in Lösung bleibt. Dieser Radioaktiv-Assay ist im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Methoden viel

einfacher in der Handhabung und liefert literaturkonforme Ergebnisse. Bei den Kinetik-Studien mit diesem neu etablierten Assay wurde ein K_m -Wert von 22 μM ermittelt, welcher relativ gut mit dem von Lee et al. ermittelten Wert (50 μM , aus Kalbs-Thymus) übereinstimmt. Das isolierte Enzym bestand aus einer Mischung von Uridin-Cytidin-Kinase 1 und Uridin-Cytidin-Kinase 2, denen mit Hilfe der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von ~ 44 kDa (UCK1) bzw. ~ 37 kDa (UCK2) zugeschrieben werden konnte. Diese Werte sind mit denen der humanen Enzyme (29 bzw. 31 kDa) in guter Übereinstimmung. Die Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass in Kalbs-Thymus beide Enzyme der UCK-Familie – UCK1 und UCK2 – exprimiert werden, wobei die UCK2 den Ergebnissen der SDS-PAGE und der Enzymkinetik zufolge eine höhere Expression aufweist als die UCK1. Die aufgereinigte Uridin-Cytidin-Kinase kann als wichtige und interessante Zielstruktur in zukünftigen Experimenten zur Identifizierung von neuen Inhibitoren und Substraten verwendet werden. Darüber hinaus eignet sich die Uridin-Cytidin-Kinase zur quantitativen, biochemischen „Entfernung“ von Uridin. Dieses Pyrimidin-Derivat ist in Membranpräparationen enthalten und wird durch Zentrifugation möglicherweise nur teilweise entfernt. Da physiologisches Uridin pharmakologische Studien (Radioligand-Bindungsstudien, funktionelle Assays) stören kann, ist der Einsatz dieses Enzyms in Kombination mit enzymatisch stabilen Uridin-Analogen als Liganden von großer Bedeutung.

Kapitel 7

Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Angaben

7.1.1 Geräte und Material

Analysenwaage	Modell CP225D, Sartorius
Autoklav	Systec 3850 ELV, Tuttnauer
Brutschrank	IG650, Jouan
	CO ₂ -Inkubator HERACell® 240, Kendro Laboratory Products GmbH
Elektrophorese	Mini PROTEAN 3 Electrophoresis System PROTEAN II xi System
Falcon-Gefäße	Greiner (15 mL und 50 mL, steril)
Filtereinheiten	Centricon® YM-30 Centrifugal Filter, MILLIPORE, Cat 4208 Amicon® Ultra Centrifugal Devices, MILLIPORE
GradiFrac™ System	Amersham Pharmacia Biotech
Gefrierschränke	-80°C: Model U725-86 EU, New Brunswick Scientific, -20°C: Bosch
Gelfiltrations-Säule	Superose 12 HR 10/30, Amersham Biosciences
Glasfaserfilter	GF/B, GF/C, Brandell, Gaithersburg, MD, USA GF 52, Glasfaserzuschnitte, Schleicher & Schuell
Harvester	Brandell M24, M48, Gaithersburg, MD, USA
Homogenisator	IKA Labortechnik RW 16 Basic
LS- Counter	TRICARB® 2100 TR, 2900 TR, Canberra Packard/Perkin-Elmer
LSC-Cocktail	Ultima-Gold™, Canberra-Packard
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss
Pipetten	Eppendorf Research und Eppendorf Multipette Plus
pH Meter	WTW mit pH Elektrode SenTix 41WTW pH 197
Photometer	DU® 530, Life Science UV/VIS Spectrophotometer, Beckman
Schüttelwasserbad	GFL Typ 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sicherheitswerkbank	Safe flow 1.2, Klasse II, Nunc, Wiesbaden
Software	GraphPad Prism, Version 3.0, San Diego, Kalifornien, USA Microsoft Excel, Version Office 2000 Isis Draw 2.4 CorelDRAW Graphics Suite
Thermomixer	Comfort, Eppendorf
Ultraschallbad	RK100H, Bandelin Sonorex
Ultraturrax	IKA Labortechnik T25 basic
UV-Lampe	CAMAG, UV-Lampe mit zwei Wellenlängen 254/366 nm, je 8 W, 12 VDC/VAC, 50/60 Hz, 14 VA, Cat. Nr.: 022.9120
UV-Spektrometer	Varian, Cary 50 BIO, UV-Visible Spektrophotometer
Vortex	MS 2 Minishaker, IKA Labortechnik
Zählkammer	Neubauer-Improved, REF 0640030, Marienfeld, Bright Line

Zellkulturflaschen	steril (25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ²), Greiner Bio-One
Zentrifugen	Allegra™ 21R, Rotoren F2402 und S4180, Beckman Avanti™ J-20 XP, Rotor JS 4.3 und JA-20, Beckman Biofuge primoR, Heraeus
Zentrifugenröhrchen	Ultra-Clear® Tubes, ½ x 2 in. (13 x 51 mm), Rec. No. 344057, Beckman (für die Ultrazentrifuge)

6.1.2 Chemikalien

Käuflich erworbene Chemikalien (*in alphabetischer Reihenfolge*)

Adenin	SIGMA, A 8626
Adenosin	SIGMA-ALDRICH, A 9251
Adenosin-5'-diphosphat	SIGMA, A 2754
Adenosin-5'-monophosphat	SIGMA, A 1752
Adenosin-5'-triphosphat	SIGMA, A 7699
β-Alanin	SIGMA, A 9920
5-Aminouracil	SIGMA-ALDRICH, 855286
Ammoniumsulfat	Grüssing, 10156
5-Bromuracil	Fluka, 18660
(E)-5-(2-Bromovinyl)uracil	SIGMA-ALDRICH, 457442
Calciumchlorid-Dihydrat	SIGMA, C 3306
2-Chloradenosin	SIGMA, C 5134
Coffein	Merck, K15934984
5-Cyanouracil	Lancaster, 8490
Dihydrouracil	SIGMA, D 7628
Dimethylsulfoxid	ACROS, 295520010
Dipyridamol	SIGMA, D 9766
DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin)	SIGMA C 101
Ethanol	Riedel-de Haen, 32205
Ethylendiamintetraessigsäure	Grüssing, 20271 (100 mM)
5-Fluoruracil	Fluka, 47576
D-Glucose (wasserfrei)	SIGMA, G 7021
Guanosin-5'-triphosphat (GTP)	SIGMA, G 8877
N-(Hydroxyethyl)piperazin-N'- (ethansulfonsäure) (HEPES)	SIGMA, H 0891
Inosin	SIGMA, I 1024
5-Ioduracil	SIGMA-ALDRICH, 857858
Isocytosin	SIGMA, I 2127
Isopropanol	Riedel-de Haen, 34863
Lanthanchlorid	SIGMA, L 4131
Kaliumchlorid	SIGMA, P 9541

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, 4873
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka, 60355
Magnesiumsulfat	SIGMA, M 2643
Methanol	Fluka, 65543
Methotrexat	Pfizer, K242
1-Methylharnsäure	Fluka, 67076
1-Methyluracil	SIGMA-ALDRICH, 293768
1-Methylxanthin	Fluka, 69720
3-Methylxanthin	Fluka, 69722
7-Methylxanthin	Fluka, 69723
9-Methylxanthin	Fluka, 69725
Natriumchlorid	SIGMA, S 7653
Natriumhydrogencarbonat	SIGMA, S 5761
Natriumhydroxid	Fluka, 71689
NECA (5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin)	SIGMA, E 2387
Orotsäure	SIGMA-ALDRICH, O 2750
Pepstatin A	AppliChem, A 22050010
Primidon	Tocris, 0830
Protaminsulfat	SIGMA, P 4020
Protein Assay Kit	SIGMA, P 5656
Rolipram	SIGMA, R 6520
Salzsäure 37 %	Merck, 3142504
Theobromin	Fluka, 88304
Theophyllin	Synopharm, 221870-0003
Thymin (5-Methyluracil)	SIGMA, T 0376
Thymidin	SIGMA, T 9250
5-(Trifluormethyl)uracil	Aldrich, 223271
Uracil	Fluka, 94220
Uridin	SIGMA, U 6381
Uridin-5'-diphosphat (UDP)	SIGMA, U 4125
Uridin-5'-monophosphat (UMP)	SIGMA, U 6375
Uridin-5'-triphosphat (UTP)	SIGMA, U 6625
Xanthin	SIGMA, X 7375
cyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP)	Fluka, 01895

Chemikalien und Materialien für die SDS-PAGE (in alphabetischer Reihenfolge)

Acrylamid	Acros, 164859000
Ammoniumperoxodisulfat	Acros, 401165000
Bromphenolblau	Acros, 4031401000
(Coomassie) Brilliant-Blau	Acros, 191490250
Glycerol	Acros, 158920010
Glycin	Riedel de Haen, 33226
Mercaptoethanol	SIGMA, M 6250
Methylenbisacrylamid	Acros, 164790250
Precision Plus Protein™, Standard Dual Color	BioRad, 61-0374
SDS (Natrium-dodecylsulfat)	Acros, 419531000
5-Sulfosalicylsäure (2-Hydroxy-5-sulfobenzoessäure)	Acros, 424511000
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Acros, 420580500
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Acros, 424575000

Im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. C. E. Müller synthetisierte Substanzen

Alle Substanzen wurden gewöhnlich als Stammlösungen in einer Konzentration von 10 mmol/ L angesetzt. Als Lösungsmittel wurde in der Regel Dimethylsulfoxid verwendet.

von Dr. Phuoc Lee synthetisierte Substanzen:

6-Amino-5-fluoruracil [HPLL091]
5-Amino-6-chloruracil [HPLL093]
6-Amino-5-chloruracil [HPLL094]
5-Azidouracil
6-Azidouracil [HPLL096]
6-Azido-5-fluoruracil [HPLL088]
6-Azido-5-bromuracil [HPLL089]
6-Amino-5-bromuracil [HPLL090]
6-Azido-5-chloruracil [HPLL095]
5-Azido-6-chloruracil [HPLL098]
5-Ioduracil
6-Chloruracil [HPLL092]
6-Aminouracil

von Thomas Borrmann synthetisierte Substanzen

3-Phenacyluracil
3-(4'-Chlor)phenacyluracil
3-(2',4'-Dichlor)phenacyluracil

von verschiedenen Doktoranden im AK Müller synthetisierte Substanzen

- 5-Acetyluracil
- 1-Allylbarbitursäure
- 6-Amino-5-ethyl-2-thiouracil
- 3-Benzyluracil
- 5-Benzyluracil
- 5-Brommethyluracil
- Dithiouracil
- 5-Dodecyluracil
- 5-Ethyluracil
- 5-Hexyluracil
- 6-Hydrazinouracil
- 1-(2-Hydroxyethyl)uracil
- 5-(2-Hydroxyethyl)uracil
- 3-Methylbarbitursäure
- 3-Methyluracil
- 6-Methyluracil
- 5-Nitrouracil
- 5-Pentyluracil
- N3-Phenacyluridin
- 1-Propargyluracil
- 6-Propyl-2-thiouracil
- 5-Propyluracil
- 2-Thiouracil

7.1.3 Radioliganden

[5,6-³H]Uracil (wässrige Lösung mit 2 % Ethanol sterilisiert): SA = 38 Ci/mmol / 41 Ci/mmol, TRK 408, Amersham Biosciences

[5,6-³H]Uridin (wässrige Lösung, sterilisiert): SA = 39 Ci/mmol, TRK 412
Amersham Biosciences

[³H]Phenacyluridin (in Ethanol): SA = 43 Ci/mmol, Code TRQ 10231

Die radioaktive Markierung wurde als Auftragssynthese aus der im eigenen Arbeitskreis von Dr. Till Schumacher synthetisierten Vorstufe durchgeführt von Nycomed Amersham, Buckinghamshire, England über Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH.

7.1.4 Zellen und deren Ursprung

1321NI-Astrozytom-Zellen (human)	Professor Ivar von Kügelgen, Pharmakologisches Institut, Reuterstrasse 1, Universität Bonn, ursprünglich von der Europäischen Zellbank in Salisbury, UK
C6-Gliom-Zellen (Ratte)	Professor Ivar von Kügelgen, Pharmakologisches Institut, Reuterstrasse 1, Universität Bonn
CHO-K1-Zellen (Hamster)	„ <u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary“-K1-Zellen (Zellen aus dem Eierstock chinesischer Hamster); Europäische Zellbank, European Collection of Cell Cultures, UK, ECACC No: 85051005, Passage 4
CHO-hA₁-Zellen (Hamster)	Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg
CHO-hA₂-Zellen (Hamster)	Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg
HEK293-Zellen (human)	„ <u>H</u> uman <u>E</u> mbrionic <u>K</u> idney“293-Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen); Europäische Zellbank, European Collection of Cell Cultures, UK, ECACC No: 85120602
Jurkat T-Zellen (human)	Humane T-Leukämiezellen; Arbeitskreis Professor Karl Schilling, Anatomisches Institut, Universität Bonn
McA-RH7777-Zellen (Ratte)	Hepazytomzellen; Professor Ivar von Kügelgen, Pharmakologisches Institut, Reuterstrasse 1, Universität Bonn
NG108-15-Zellen (Maus x Ratte)	Maus Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybrid-Zelllinie; Privatdozent Dr. Brüss, Pharmakologisches Institut, Reuterstrasse 1, Universität Bonn

7.1.5 Gewebe

Rattenhirne	Pel Freez, Rogers, Arkansas, USA
Kalbshirne	Schlachthof Fa. Sterbing in Köln
Humanhirn	Universitätsklinikum Bonn, Klinik und Poliklinik für Neurologie

7.1.6 Pufferlösungen

Tab. 7.1: Herstellung der Pufferlösungen

Puffer	Substanzen	M_r [g/mol]	Molarität	Einwaage für 1 L
TRIS-Puffer 50 mM, pH 7,4	TRIZMA [®] -Base	121	50 mM	6,05 g
	→ ad 1,0 L Aqua dest.; mit Salzsäure (37 %) auf pH 7,4 einstellen			
HEPES-Puffer 10 mM, pH 7,4	HEPES	238,3	10 mM	2,38
	NaCl	58,44	80 mM	4,67
	KCl	74,55	36 mM	0,27
	MgCl ₂ x6 H ₂ O	203,30	0,53 mM	0,11
	CaCl ₂ x2 H ₂ O	147,0	1,2 mM	0,18
→ ad 1,0 L Aqua dest. → pH-Wert mit gesättigter NaOH-Lösung auf pH 7,4 einstellen				
2 mM Acetat-Puffer	Ammoniumacetat	77,08	2 mM	0,1542 g
	→ ad 1,0 L Aqua dest.; auf pH 7,4 einstellen			
5-fach konzentrierter Krebs-HEPES-Puffer (KHP)	NaCl	58,44	593 mM	33,7 g
	KCl	74,55	23,5 mM	1,75 g
	KH ₂ PO ₄	136,1	6 mM	0,8 g
	NaHCO ₃	84	21 mM	1,75 g
	D-Glucose, wasserfr.	180,2	58,5 mM	10,5 g
	HEPES, freie Säure	238,3	50 mM	11,9 g
	→ der pH-Wert wird mit 1N Natronlauge auf 7,4 eingestellt → für 1fach-Puffer: 100 mL 5fach-Puffer + 1,2 mL einer 1 M Magnesiumsulfat-Stammlösung ^{ff} (Endkonzentration: 1,2 mM) + 1,3 mL einer 1 M Calciumchlorid Stammlösung ^{gg} (Endkonzentration: 1,3 mM); ad 500 mL Aqua dest.			
Sucrose-Lösung 0,32 M	Sucrose	342,3	0,32 M	109,5 g
→ ad 1,0 L Aqua dest.; auf pH 7,4 einstellen				

^{ff} Stammlösung 1 M Magnesiumsulfat (2,465 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat in 10 mL Wasser gelöst)

^{gg} Stammlösung 1 M Calciumchlorid (1,47 g Calciumchlorid-Dihydrat in 10 mL Wasser gelöst)

Tab. 7.2: Herstellung der Pufferlösungen (II)

Puffer	Substanzen	Mr [g/mol]	Molarität	Einwaage für 1 L
Puffer für die Membranpräparation von Kalbs-Striatum, pH 7,4	TRIZMA [®] -Base	121	25 mM	3,025 g
	Sucrose	342,3	0,32 mM	109,5 g
	EDTA	372,2	1 mM	0,3722 g
	PMSF	174,2	0,1 mM	0,0174 g
	Leupeptin*	426,6	10 µM	0,0043 g
	Pepstatin A*	685,9	1 µM	0,686 mg
~~~~~				
ad 1,0 L Aqua dest.; auf pH 7,4 einstellen * frisch hinzufügen				
<b>10fach-PBS-Puffer</b> ( <i>phosphate buffered saline</i> )	NaCl	58,44	1,4 M	80 g
	KCl	74,55	27 mM	2 g
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	178	81 mM	14,4 g
	KH ₂ PO ₄	136,1	15 mM	2,4 g
~~~~~				
→ ad 1,0 L Aqua dest.; pH-Einstellung auf 7,4 mit konz. HCl → für 1fach Puffer: 100 mL 10-fach Puffer auf 1000 mL mit Aqua dest. auffüllen				
Puffer für die Gelchromatographie	TRIZMA [®] -Base	121	50 mM	6,05 g
	β-Mercaptoethanol	78,13	20 mM	390,7 mg = 350 µL
	Glycerol		20 %	200 mL
~~~~~				
→ ad 1,0 L Aqua dest.; auf pH 7,4 einstellen, 15 Minuten in Ultraschallbad stellen, 3 h Stickstoff eingeleitet (Sprudelstein)				
<b>Puffer für den Enzmyassay</b> (zur Aktivitätsbe- stimmung der UCK)	TRIZMA [®] -Base	121	50 mM	6,05 g
	β-Mercaptoethanol	78,13	10 mM	781,3 mg = 700 µL
	MgCl ₂ wasserfrei	95,21	2,5 mM	238 mg
	ATP	551,1	2 mM	1,1022 g
~~~~~				
→ ad 1,0 L Aqua dest.; auf pH 7,4 einstellen				

Tab. 7.3: Herstellung der Pufferlösungen (III)

Puffer	Substanzen	Mr [g/mol]	Konzentration im Puffer	Einwaa- ge für 100 mL
Puffer für die So- lubilisierung pH 7,4	TRIZMA [®] -Base	121	50 mM	605 mg
	NaCl	58,5	150 mM	877,5 mg
	MgCl ₂ , wasserfrei	95,21	2 mM	19,04 mg
	Glycerol		10 % (v/v)	10 mL
	EDTA	372,2	1 mM	37,2 mg
	EGTA	380,4	1 mM	38,0 mg
	PMSF	174,2	0,1 mM	1,7 mg
	Leupeptin*	426,6	10 µg/mL	1 mg
	Pepstatin*	685,9	5 µg/mL	0,5 mg
→ ad 100 mL Aqua dest.; auf pH 7,4 einstellen				
* frisch hinzufügen				
Inkubationspuffer für die [³⁵ S]GTPγS- Studien, pH 7,4	TRIZMA [®] -Base	121	50 mM	605 mg
	NaCl	58,5	100 mM	585 mg
	EDTA	372,2	1 mM	37,2 mg
	MgCl ₂ x6 H ₂ O	203,30	5 mM	102 mg
	Dithiothreitol (DTT)	154,25	1 mM	154 mg
	GDP***	443,20	10 µM	s.u.
	BSA**	~ 66 kDa	0,5 % (w/v)	s.u.
→ ad 100 mL Aqua dest.; auf pH 7,4 einstellen				
→ vor jedem Assay dem Puffer <u>frisch</u> zugeben:				
*** 0,1 mL einer 1 mM GDP-Stock-Lösung pro 10 mL Inkuba- tionspuffer				
** 0,05 g BSA-Pulver pro 10 mL				
Waschpuffer für die [³⁵ S]GTPγS- Studien, pH 7,4	TRIZMA [®] -Base	121	50 mM	605 mg
	MgCl ₂ x6 H ₂ O	203,30	5 mM	102 mg
→ ad 100 mL Aqua dest.; auf pH 7,4 einstellen				

7.2 Zellkultur

Alle Zellen werden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Je nach Kulturgröße werden unterschiedliche Kulturflaschen (25 cm², 75 cm², 175 cm²) verwendet. Die verwendeten Nährmedien sind in **Tab. 7.4** aufgelistet.

Tab. 7.4: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Zellart	Kulturmedium	Zusätze
C6-Gliom-Zellen	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 % fötales Kälberserum • 100 Units / mL Penicillin • 100 µg / mL Streptomycin • 1 % GlutaMax (2 mM Glutamin)
CHO-K1-Zellen	Nutrient Mixture F-12 HAM	<ul style="list-style-type: none"> • 10 % fötales Kälberserum • 100 Units / mL Penicillin • 100 µg / mL Streptomycin • 1 % GlutaMax (2 mM Glutamin)
HEK-293-Zellen	MEM (Minimum essential Medium eagle)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 % fötales Kälberserum • 100 Units / mL Penicillin • 100 µg / mL Streptomycin • 1 % GlutaMax (2 mM Glutamin) • 1 % NEAA
McA-RH7777-Zellen	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 % fötales Kälberserum • 100 Units / mL Penicillin • 100 µg / mL Streptomycin • 1% GlutaMax (2 mM Glutamin)
NG108-15-Zellen	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 % fötales Kälberserum • 100 Units / mL Penicillin • 100 µg / mL Streptomycin • 1 % HAT-Supplement (Endkonz. der Bestandteile: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hypoxanthin 100 µM ▪ Aminopterin 0,4 µM ▪ Thymidin 16 µM)

7.2.1 Nährmedien für die Zellkultur

Den Medien für die Zellkultur ist allen gemeinsam, dass sie aus einem isotonischen, gepufferten Grundnährmedium mit anorganischen Salzen, energieliefernden Nährstoffen, Aminosäuren und Vitaminen bestehen. Bei Medien für adhärierende Kulturen ist ein hoher Anteil an Calcium- und Magnesiumionen wichtig, da diese mit den Adhäsionsproteinen auf der Zelloberfläche in Wechselwirkung treten und so die Anheftung der Zellen erst ermöglichen.

Eingesetzte Medien

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium, BioWhittaker™ Cambrex BE-12 604F
- Nutrient Mixture F-12 HAM, BioWhittaker™ Cambrex BE-12 615
- Minimum essential Medium eagle (MEM), BioWhittaker™ Cambrex BE-12 125F

Zusätze:

HAT-Supplement (50x), Gibco 21060-017

Das HAT-Supplement enthält **Aminopterin**, **Hypoxanthin** und **Thymidin** und wird für die Selektion von Hybridomzellen verwendet³⁶⁶. Aminopterin, ein Folsäure-Antagonist, inhibiert die *de-novo* Nukleosid-Biosynthese. Bei den Hybridomzellen kann in diesem Fall die DNA-Synthese unter Verwendung von Hypoxanthin und Thymidin mittels des Enzyms „Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase“ (*salvage pathway*) erfolgen, während HAT-sensitive Zellen einen Enzymdefekt besitzen und im HAT-Medium nicht wachsen können.

NEAA (*non essential amino acids solution*), (100x) LIQUID, Gibco 11140-050

Nicht essentielle Aminosäuren werden dem Medium zugesetzt, um die fehlende Kapazität zur Synthese einzelner Aminosäuren auszugleichen.

Fetal Bovine Serum, heat inactivated, SIGMA F 0804

Fötales Rinderserum (FBS; Synonyme: FCS, FKS) wird aus dem Blut von Rinderföten zwischen dem 3. und 7. Trächtigkeitsmonat gewonnen und ist ein sehr wichtiges Supplement in Zellkultursystemen. Es enthält die verschiedenen **wachstumsfördernden Substanzen** wie Hormone, Polypeptide, Lipide und Spurenelemente.

GlutaMAX™-I Supplement, 200 mM (100x) Gibco 35050-038

L-Glutamin ist ein essentieller Nährstoff für die Energiegewinnung und die Nucleinsäure-Synthese in Zellkulturen. Allerdings zerfällt das L-Glutamin, abhängig von Temperatur und pH-Wert, im Medium spontan (nichtenzymatisch) zu Pyrrolidon-Carbonsäure und Ammoniak³⁶⁷, welches eine toxische Wirkung auf die Zellen hat und u.a. die Proteinproduktion beeinflusst. GlutaMAX enthält ein stabiles Glutamin-haltiges Dipeptid (*L-Alanyl-L-Glutamin*), welches durch die Zellen durch enzymatische Spaltung der Peptidbindung

wieder in L-Glutamin umgewandelt wird. Durch den Einsatz dieses Dipeptids wird die Bildung von toxischem Ammoniak minimiert und die Medium-Stabilität erhöht.

Penicillin-Streptomycin Mixture, SIGMA P-0781, BioWhittaker™ Cambrex DE-17-602 E (*10000 units Penicillin/mL, 10000 µg Streptomycin/mL*)

Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %), Gibco 25300-054

Trypsin, SIGMA T 4549

Trypsin gehört zu den sog. Endopeptidasen, die Eiweißmoleküle an bestimmten Stellen in der Mitte der Eiweißkette spalten. Trypsin ist spezifisch für die Spaltung von Peptidbindungen neben den Aminosäureresten Lysin und Arginin.

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) bindet die zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , welche zellbindende Membranproteine stabilisieren.

Trypsin wird in Verbindung mit EDTA in der Zellkultur zur Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche verwendet.

Trypanblau-Lösung (0,4 %), SIGMA T 8154

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Er wird benutzt, um die Vitalität von Zellen zu prüfen (s. Abschnitt 7.2.5)

7.2.2 Auftauen neuer Zellen

Das Auftauen von Zellen für die weitere Kultivierung wird möglichst schnell durchgeführt. Die aufgetaute Zellsuspension (1 mL) wird in eine kleine – vorher mit dem jeweiligen Medium befüllte und im Brutschrank vorinkubierte – Zellkulturflasche (25 cm²) gegeben. Anschließend werden die Zellen etwa 5 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert, bis sie sich an die Plastikoberfläche der Kulturflasche anheften (bei adhären Zellen). Das alte Nährmedium wird abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen werden wie im Abschnitt 7.2.2 beschrieben weiter gezüchtet.

7.2.3 Kultur von Zellen

Die Zellen werden nach dem Auftauen (s.o) bei 80 bis 90 %iger Konfluenz in eine große Flasche umgesetzt. Hierbei wird folgendermaßen vorgegangen: Zuerst wird das alte Medium aus der Flasche vorsichtig abpipettiert und die Zellen werden mit etwa 10 mL PBS-Puffer gewaschen. Zur Ablösung der (adhären Zellen) wird ca. 4 mL Trypsin/EDTA-Lösung in die Flasche gegeben und 2-3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch leichtes Schwenken und Klopfen gegen den Flaschenboden abgelöst und im benötigten Volumen an Medium (je nach Splittverhältnis) aufgenommen. Diese Zellsuspension wird auf neue, bereits mit Medium befüllte Flaschen verteilt. Die Flaschen werden anschließend im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, bis sie zu ca. 80 % konfluent bewachsen sind und erneut gesplittet werden können. Die Passage der Kulturen erfolgt nach dem Ablösen je nach Dichte und Zellart in 1:2- bis 1:20-Verdünnungen. Zwischen dem Splitten wird das Medium gewechselt, wenn das Medium verbraucht ist – erkennbar an der Farbe des Mediums – oder zu viele tote Zellen vorhanden sind. Die Mediummenge in Flaschen einer Fläche von 75 cm² beträgt etwa 15 mL, bei einer Fläche von 175 cm² etwa 25 bis 30 mL.

Abweichend zu den anderen Zelllinien wird bei den NG108-15 Zellen zur Ablösung der Zellen kein Trypsin benutzt. Die Zellen können mit Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren und evtl. leichtes Klopfen gegen den Boden der Flasche abgelöst werden.

7.2.4 Erstellen von Backups zum Einfrieren

Zum Einfrieren werden die Zellen zunächst vom Medium befreit und mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen entweder mit Trypsin/EDTA oder mit Medium (bei den NG108-15-Zellen) von der Flasche abgelöst, mit Medium versetzt und in ein Falcon-Gefäß überführt. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet wird im jeweils benötigten Volumen an Einfriermedium – Medium mit Zusatz von 10 % DMSO (2 mL pro Zellkulturflasche) – resuspendiert und in Kryovials gefüllt. DMSO wird in der Zellkultur zum Ein-

frieren von Zellen verwendet, um die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses zu verhindern und damit der Zerstörung der Zellen entgegenzuwirken. Da DMSO allerdings stark giftig ist, sollte das eingesetzte Einfriermedium vorgekühlt sein. Die Zellen werden nicht direkt in flüssigen Stickstoff transferriert, sondern langsam eingefroren. Dazu werden die Kryovials zunächst gut verpackt (für langsames Kühlen) bei -80°C gelagert und erst einen Tag später in den Stickstofftank überführt.

7.2.5 Membranpräparationen von Zellen

NG108-15-Zellen

120 konfluent bewachsene Gewebekulturflaschen werden zunächst vom Medium befreit. Die Zellen werden mit je 2 mL PBS-Puffer pro Platte gewaschen und bei -80°C eingefroren. Danach werden die Dishes im Kühlschrank kurz aufgetaut. Unter Eiskühlung wird jede Platte mit 1-2 mL 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 versetzt, die Zellen mit einem Gummischaber von den Platten abgelöst und in Tris-Puffer gesammelt. Die Platten werden mit wenig Tris-Puffer nachgespült. Die gesammelte Zellsuspension wird 10 Minuten bei 1.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand S1 wird vorsichtig abpipettiert. Das P1-Pellet wird in Tris-Puffer resuspendiert, homogenisiert, in Kryovials (je 1 mL) abgefüllt und bei -80°C aufbewahrt. Der Überstand S1 wird 30 Minuten bei 48.380 g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird von dem Überstand getrennt und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Der gewaschene Bodensatz wird in 18 mL Tris-Puffer aufgenommen und nach dem Homogenisieren in Kryovials zu je 1 mL abgefüllt. Die Membranpräparationen werden bis zur Benutzung bei -80°C aufbewahrt. Die Membranpräparationen der anderen Zelllinien werden mit geringfügigen Abweichungen analog zu dem oben für die NG108-15-Zellen beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Versuchsbedingungen für die anderen Zelllinien sind in der untenstehenden **Tab. 7.5** aufgelistet.

Tab. 7.5: Membranpräparationen verschiedener Zelllinien

Zelllinie	Membranpräparation
NG108-15-Zellen	120 Dishes, Passage 30 Puffer: 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 1) 10 min. bei 1.000 g 2) 2 x 30 min. bei 48.380 g Ausbeute: 18 mL P2-MP: 2,236 mg/mL (P1-Pellet: 3,892 mg/mL)
C6-Gliom-Zellen	180 Dishes, Passage 11 Puffer: 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 1) 10 min. bei 1.000 g 2) 1 h bei 48.000 g Ausbeute: 20 mL P2-MP: 1,569 mg/mL (56 mL P1-Pellet: 5,087 mg/mL)
CHO-K1-Zellen	163 Dishes, Passage 4 Puffer: 50 mM Tris, pH 7,4 1) 10 min. bei 1.000 g 2) 45 min. bei 48.000 g Ausbeute: 16 mL P2-MP: 1,262 mg/mL (20 mL P1-Pellet: 3,562 mg/mL)
HEK293-Zellen	180 Dishes, Passage 5 Puffer: 5 mM Tris, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, pH 7,4 1) 10 min. bei 1.000 g 2) 1 h bei 48.380 g Ausbeute: 28 mL P2-MP: 1,815 mg/mL (15 mL P1-Pellet : 2,266 mg/mL)
McA-RH7777-Zellen	192 Dishes, Passage 14 Puffer: 50 mM Tris, pH 7,4 1) 10 min. bei 1.000 g 2) 1,5 h bei 48.380 g Ausbeute: 28 mL P2-MP: 1,755 mg/mL (23 mL P1-Pellet: 4,530 mg/mL)

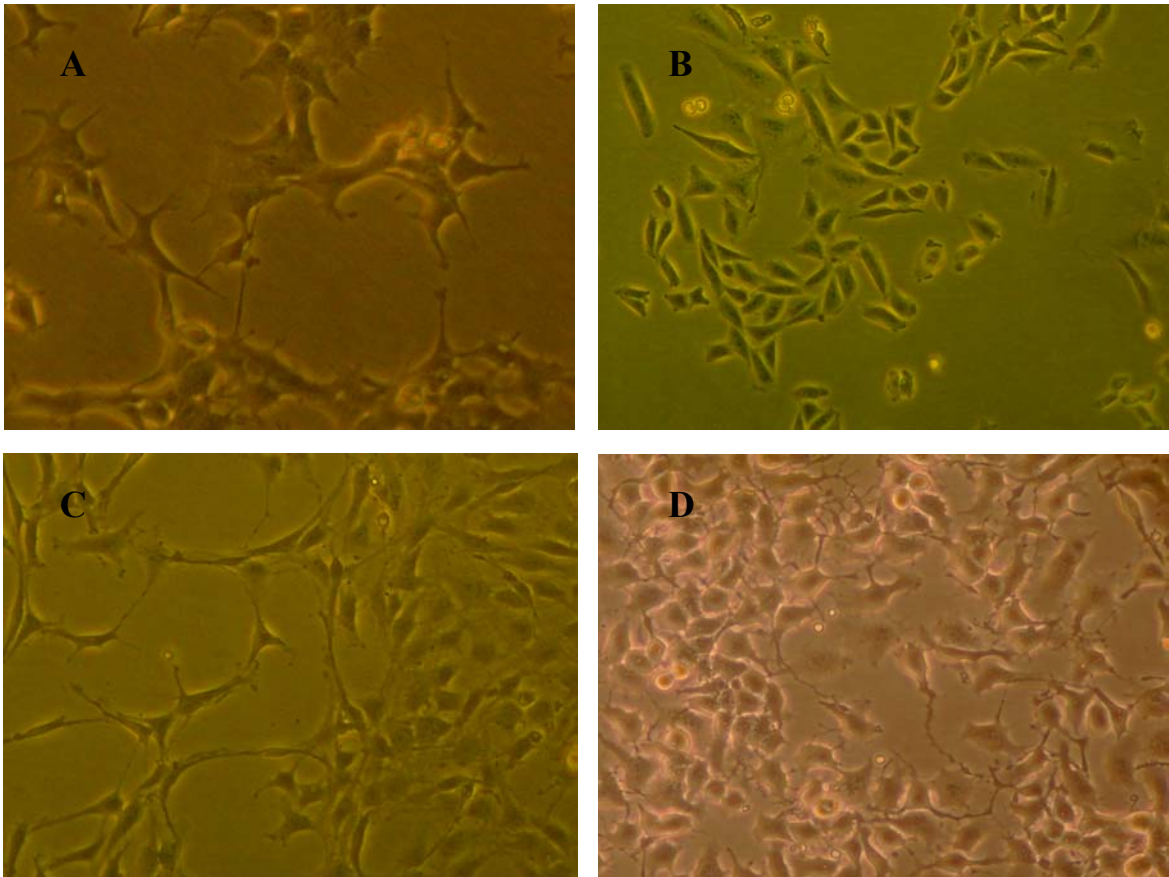


Abb. 7.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von **HEK293-Zellen** (A) mit den für sie typischen Zellausläufern, **CHO-K1-Zellen** (B) mit der für sie typischen länglichen Form, **C6-Gliom-Zellen** (C) und **NG108-15-Zellen** mit den neuritenähnlichen Fortsätzen (D). Die Abbildungen entstanden in 40-facher Vergrößerung (fotografiert mit einer Digitalkamera)

7.2.6 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wird mit einem *Neubauer-Hämazytometer* durchgeführt³⁶⁸. Zur Unterscheidung vitaler von geschädigten Zellen werden sie mit einer 0,4 %igen *Trypanblau-Lösung* angefärbt. Da bei toten Zellen die Zellwände nicht mehr intakt sind, kann der Farbstoff in das Innere der Zelle eindringen und Proteine blau anfärben. Die Zellwand der lebenden Zellen ist dagegen für den Farbstoff weitgehend undurchlässig. Zunächst werden 20 µL der (evtl. verdünnten) Zellsuspension in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und mit 20 µL der 0,4 %igen Trypanblau-Lösung versetzt. Die Probe wird 5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die beiden Stege der Zählkammer werden mit wenig Wasser angefeuchtet und das Deckglas mit leichtem Druck parallel zur Oberfläche an die Kammer gedrückt. Auf den Mittelsteg werden zwischen Deckglas und Kammer ca. 10 µL der gut suspendierten Zell-Trypanblau-Suspension gegeben, bis das Volumen unter dem Deckglas gerade gefüllt ist. Durch die Kapillarwirkung wird die Lösung zwischen den beiden Glasflächen in die Kammer gezogen. Danach erfolgt unter dem Mikroskop das Auszählen der vier seitlichen Großquadrate, die aus 16 Kleinquadraten bestehen. Bei optimaler Verdünnung sollten in jedem Großquadrat nicht mehr als 40 Zellen sein. Der erhaltene Wert wird gemittelt (entsprechend der Zellzahl pro Großquadrat) und mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. So erhält man die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension. Es werden nur die lebenden Zellen ausgezählt, die sich hell gegen den blauen Hintergrund abheben. Tote Zellen, deren Cytoplasma mit Trypanblau angereichert sind, werden ignoriert. Dies ergibt die Konzentration lebender Zellen pro mL Medium.

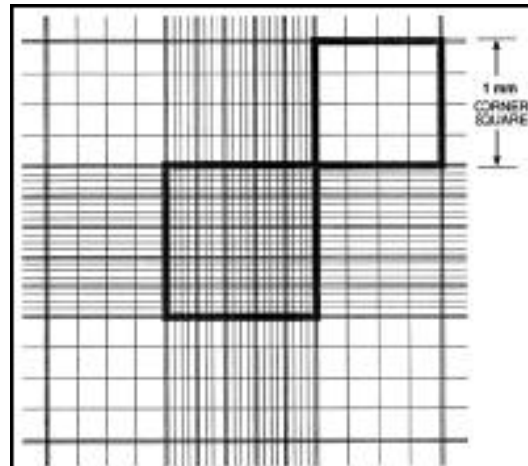


Abb. 7.2: Neubauer Haemazytometer
Dimensionen pro Quadrat. Volumen pro Quadrat = $0,1 \text{ mm}^3$ ($10^{-4} \text{ cm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$)³

Bestimmung der Zellzahl:

Zellzahl pro mL Probensuspension = Zahl der Zellen pro Großquadrat • Verdünnungsfaktor • 10^4

Berechnung der Vitalitätsrate:

Lebende Zellen [%] = $[\text{ungefärbte Zellen} / (\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen})] \cdot 100$

7.3 Gewebepräparationen

In der vorliegenden Arbeit wurden Rattenhirne der Fa. Pel Freez (Rogers, Arkansas, USA) und Kalbs-Hirne vom Schlachthof Fa. Sterbing (früher Fa. Genscher), Köln, zur Präparation von Uracil-Bindungsstellen-haltigen Membransuspensionen verwendet. Das Material wurde bis zur Präparation bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle Präparationsschritte wurden bei einer Temperatur von $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf Eis durchgeführt. Die Rattenhirne bzw. Kalbshirne wurden nach den folgenden Protokollen präpariert:

7.3.1 Membranpräparation von Kalbs-Thalamus

In einem Artikel von Zukin et al.³¹⁴ wird die Herstellung einer Membranpräparation aus Rattenhirnen (Male Sprague-Dawley rats) beschrieben. Abweichend davon werden bei der nachfolgend beschriebenen Membranpräparation Kalbs-Hirne verwendet, aus denen der Thalamus herauspräpariert und weiter aufgearbeitet wird. Die frischen Kalbs-Hirne werden mit Sucrose-Lösung gewaschen, mit einem Skalpell-Schnitt jeweils in die zwei Hemisphären geteilt und im Kühlschrank bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Zu Beginn der Präparation werden die tiefgefrorenen Kalbs-Hirne langsam auf Eis aufgetaut und auf einer eisgekühlten Glasplatte präpariert. Der Thalamus wird vorsichtig mit einem Skalpell herausgeschnitten und in $0,32\text{ M}$ Sucrose-Lösung gegeben.

Abb. 7.3³⁶⁹ zeigt, wo genau sich der Thalamus im Gehirn befindet. Für die Membranpräparation wird der herauspräparierte Thalamus in eiskalter $0,32\text{ M}$ Sucrose-Lösung homogenisiert. Hierzu wird das Gewebe zuerst mit dem Ultra-Turrax (Stufe 5) zer-

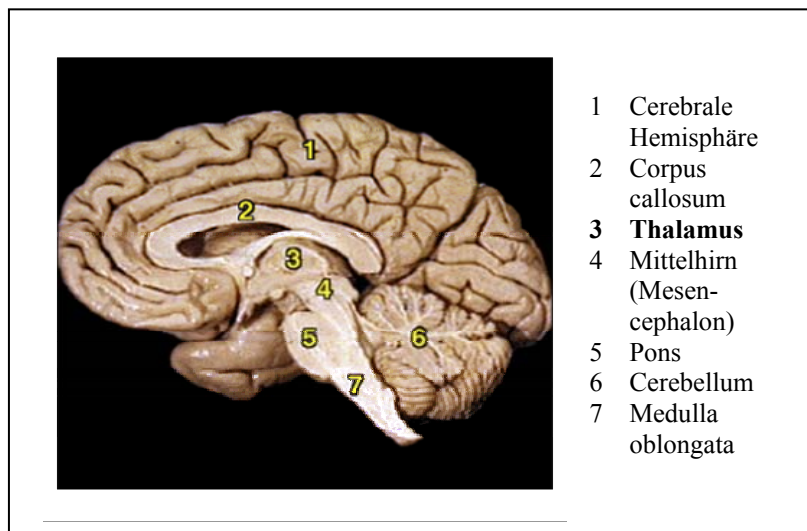


Abb. 7.3: Hirn, Sagittal-Schnitt³⁶⁹

kleinert und dann homogenisiert (Stufe 6, 3 Sekunden). Danach wird 10 Minuten bei 1.000 g zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und der Überstand 20 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Das sich absetzende Pellet wird in reinem Wasser resuspendiert und mit dem Ultra-Turrax 30 Sekunden dispergiert. Diese Suspension wird erneut 20 Minuten bei 8.000 g zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wird der Überstand abdekantiert und das Pellet mit der noch verbliebenen flüssigen Phase vorsichtig gewaschen. Die vereinigte flüssige Fraktion wird dann 20 Minuten bei 48.000 g zentrifugiert. Das Pellet wird in reinem Wasser resuspendiert und wiederum 20 Minuten bei 48.000 g zentrifugiert. Das nach diesem Zentrifugationsschritt entstehende Pellet wird 18 Stunden bei

-20°C gelagert. Das eingefrorene Pellet wird dann in Wasser resuspendiert und 20 Minuten bei 25°C inkubiert. Danach folgt ein 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 48.000 g. Schließlich wird das Pellet in Tris-Puffer resuspendiert und zur Aufbewahrung in den -80er Gefrierschrank gestellt.

7.3.2 Membranpräparation von Kalbshirn-Striatum als Quelle für die Uracil-Bindungsstellen

Die auf Trockeneis transportierten Kalbshirne werden langsam auf einer eisgekühlten Glasplatte aufgetaut. Die Hirne werden frontal von vorne nach hinten in leicht schräger Schnittführung geschnitten.

Das Striatum, bestehend aus *Nucleus caudatus* und *Putamen*, wird herauspräpariert und in 25 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 0,32 M Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µM Pepstatin A, 10 µM Leupeptin gesammelt. Nach der Bestimmung des Nassgewichtes wird das Gewebe in 10 Volumenteilen Puffer (bezogen auf das Ausgangsgewicht des Gewebes) gegeben. Das Gewebe wird mit dem Ultra-Turrax 3 Sekunden auf Stufe 12 zerkleinert und danach mit dem Glas-

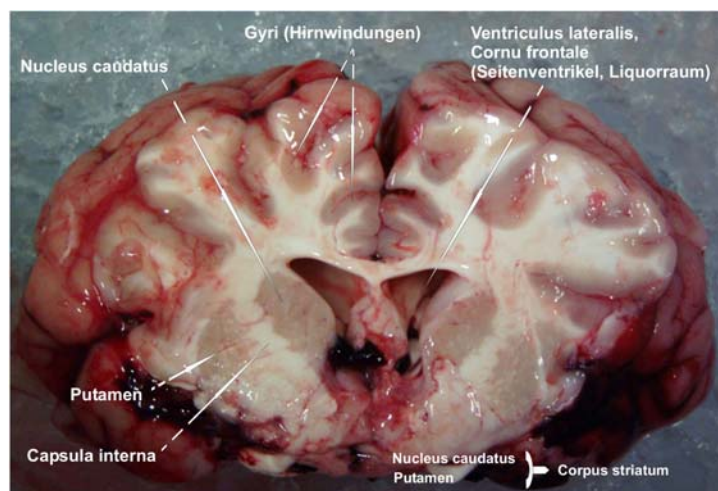


Abb. 7.4: Blick auf die Präparation eines Kalbs-Gehirns; Frontalschnitt auf Höhe des hinteren Anteil der Vorderhörner der Seitenventrikel (Hirn vom Schlachthof Fa. Sterbing; fotografiert mit einer Digitalkamera)

Teflon-Homogenisator (Stufe 6, 10 Sekunden) homogenisiert. Die Suspension wird bei 4°C 1.000 g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Dieser erste Zentrifugationsschritt dient zur Abtrennung des sogenannten P1-Pellets (Zellkerne, Zelltrümmer und Erythrozyten). Der Überstand S1 wird vorsichtig – ohne das Pellet aufzuwirbeln – abpipettiert und aufbewahrt. Das Pellet P1 wird mit Puffer versetzt, resuspendiert und erneut 10 Minuten bei 1.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird wieder vorsichtig abpipettiert und mit dem vorherigen Überstand vereint und weiterverarbeitet. Das P1-Pellet wird verworfen. Der vereinigte Überstand S1 wird 20 Minuten bei 37.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand S2 wird abdekantiert und verworfen. Das P2-Pellet wird in zwei Volumenteilen Puffer resuspendiert, homogenisiert (Stufe 6, 10 Sekunden) und ein zweites mal 15 Minuten bei 37.000 g und 4°C zentrifugiert. Das gewaschene P2-Pellet wird in drei Volumenteilen Tris-Puffer 50 mM, pH 7,4 homogenisiert (Stufe 6, 10 Sekunden) und 15 Minuten bei 37.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in Tris-Puffer, pH 7,4 (1 mL Puffer pro 100 mg Nassgewicht) resuspendiert, erneut homogenisiert (Stufe 6, 10 Sekunden), in Kryovials aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren. Die nach diesem Protokoll hergestellte Membranpräparation weist eine Proteinkonzentration von ca. 3 mg/mL auf.

7.3.3 Membranpräparation von Rattenhirn-Cortex³⁷⁰ (I)

Für die Membranpräparation von Rattenhirn-Cortex werden tiefgefrorene Rattenhirne auf einer eisgekühlten Glasplatte aufgetaut. Mit einem Skalpell werden die Hirnrinde – die äußeren 2-3 mm des Rattenhirns – abgeschabt und in eine eisgekühlte 0,32 M Sucrose-Lösung (iso-osmotischer Puffer) gegeben. Das gesammelte Gewebe wird zur Bestimmung des Nassgewichtes gewogen und anschließend mit dem Glas-Teflon-Homogenisator etwa 10 Sekunden unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wird zur Abtrennung des P1-Pellets, welches grobe Zelltrümmer enthält, 5 Minuten bei 1.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand S1 wird vorsichtig abpipettiert und erneut zentrifugiert (60 Minuten, 37.000 g, 4°C). Der Überstand S2 wird durch Abdekantieren von dem Pellet getrennt und verworfen. Das P2-Pellet wird in eiskaltem, reinem Wasser aufgenommen, homogenisiert und 60 Minuten bei 37.000 g und 4°C zentrifugiert. Das entstehende Pellet wird in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 homogenisiert und zur Aufreinigung erneut unter denselben Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet in wenig 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 (2 mL Tris-Puffer pro g Nassgewicht) aufgenommen und die Proteinsuspension nach der Homogenisierung in Kryovials abgefüllt. Diese können dann bei -80°C über mehrere Monate aufbewahrt werden.

7.3.4 Membranpräparation von Rattenhirn-Striatum³⁷¹

Nach der Entfernung des Cortex (s. Abschnitt 7.3.3) wird im vorderen Drittel der linken und rechten Großhirnhälfte das Gewebe soweit entfernt, bis das Striatum-Gewebe, welches eine dunklere, gestreifte Struktur besitzt, zu erkennen ist. Dieses Gewebe wird herauspräpariert und in kaltem 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 gesammelt. Anschließend werden die Gewebe-Stücke mit dem Ultra-Turrax auf Stufe 6 etwa 3 Sekunden zerkleinert und mit dem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wird 15 Minuten bei 37.000 g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und verworfen. Das Pellet wird in eiskaltem 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 aufgenommen und erneut 15 Minuten bei 37.000 g und 4°C zentrifugiert. Zum Schluß wird das erhaltene Pellet, nach Bestimmung des Nassgewichtes, in wenig 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 (1,5 mL Tris-Puffer pro g Nassgewicht) resuspendiert, homogenisiert und in Kryovials aliquotiert. Die Aliquots werden bis zur Benutzung bei -80°C gelagert.

7.3.5 Membranpräparation von Rattenhirn-Cortex²⁵⁸ (II)

Puffer A: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glucose, 20 mM HEPES, pH 7,5

Puffer B: 5 mM Tris, pH 7,4 (eingestellt mit HCl bei 4°C)

Die eingefrorenen Rattenhirne (2 Pakete Ratten-Hirne à 25 Stück) werden auf Eis aufgetaut. Der Cortex wird herauspräpariert (Nassgewicht: 25,406 g) und in 250 mL 0,32 M Sucrose-Puffer gegeben. Der Cortex wird mit dem Ultra-Turrax (Stufe 1) zerkleinert und danach mit dem Glas-Teflon-Homogenisator (Stufe 6) homogenisiert. Die Suspension wird 10 Minuten bei 1.500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig (ohne das Pellet aufzuwirbeln) abpipettiert und aufbewahrt. Das Pellet (enthält Zellkerne, Gefäße) wird mit 100 mL 0,32 M Sucrose-Puffer versetzt, resuspendiert und erneut 10 Minuten bei 1.500 g zentrifugiert. Der Überstand wird wieder vorsichtig abpipettiert und mit dem vorherigen Überstand vereint und weiterverarbeitet. Das Pellet wird verworfen. Der vereinte Überstand wird 20 Minuten bei 9.500 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 mL Puffer resuspendiert und 60 Stunden bei –80°C aufbewahrt. (*Stufe 1*)

20 mL der eingefrorenen Suspension wird auf Eis aufgetaut und in 300 mL eiskaltem reinem Wasser homogenisiert. Das Homogenat wird für 2 Stunden auf Eis gelegt und danach 20 Minuten bei 8.000 g und 4°C zentrifugiert. Die lose am Pellet hängende „Schicht“ wird in 50 mL reinem Wasser aufgenommen und 20 Minuten bei 40.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 60 mL eiskaltem 5 mM Tris-Puffer homogenisiert und das Homogenat erneut 20 Minuten bei 40.000 g und 4°C zentrifugiert. Diese Waschprozedur wird zweimal wiederholt. Das resultierende Pellet wird in 20 mL eiskaltem 5 mM Tris-Puffer homogenisiert und (mindestens) 16 h bei –80°C gelagert.

Einen Tag vor Durchführung der Bindungsstudien werden 10 mL der Membranpräparation 20 Minuten bei 40.000 g zentrifugiert. Das Pellet wird in ca. 40 mL Puffer B (5 mM Tris, pH 7,4) resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 mL Puffer A homogenisiert und in Kryovials aliquotiert. Die Proteinkonzentration beträgt bei diesem Verfahren 0,745 mg/mL.

Parallel dazu werden 10 mL der *Stufe 1* (s.o.) 20 Minuten bei 40.000 g zentrifugiert. Das Pellet wird in ca. 40 mL Puffer B (5 mM Tris, pH 7,4) resuspendiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 mL Puffer A homogenisiert und aliquotiert. Die Proteinkonzentration beträgt bei dieser Membranpräparation 1,296 mg/mL.

7.4 Proteinbestimmung nach Lowry

Theoretische Grundlagen

Die Proteinbestimmung nach Lowry^{351,372} ist ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Konzentration löslicher sowie unlöslicher Proteine. Die Methode beruht darauf, dass die Proteine zunächst mit den Cu^{2+} -Ionen aus dem Kupfertartrat-Reagenz zu einem blauen Komplex reagieren. In einem nachfolgenden Reaktionsschritt wird durch den Protein-Kupfer-Komplex das Molybdän von der Wertigkeitsstufe VI zur Wertigkeitsstufe IV reduziert. Es entstehen Mischoxide zwischen jeweils VI und IV-wertigem Molybdän (Molybdänblaureaktion). Bei der Reduktion erfährt das Folin-Reagenz einen Farbumschlag von gelb nach blau. Diese resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt. Dazu wird für mehrere Proben bekannter Proteinkonzentration die Absorption des bei der Reaktion mit dem Folin-Reagenz entstehenden blauen Farbstoffs ermittelt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wird die gemessene Absorption als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt und der molare Extinktionskoeffizient aus dem Anstieg der resultierenden Geraden ermittelt. Unter Verwendung dieses Extinktionskoeffizienten kann anschließend für eine beliebige Proteinprobe wiederum unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration bestimmt werden. Diese Proteinbestimmungsmethode kann durch Tris, Ammoniumsulfat, EDTA, Saccharose, Citrat und Phenole gestört werden. Liegen solche Substanzen in der Proteinlösung vor, müssen die Proteine vorher mit Trichloressigsäure ausgefällt und in einem wässrigen Lösungsmittel resolubilisiert werden.

Durchführung

Die Proteinbestimmung erfolgt mit dem „Protein Assay Kit“ von Sigma Diagnostics®. Zunächst wird eine Verdünnungsreihe des Proteinstandards Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt, sodass man Proteinkonzentrationen von 50 – 400 μg erhält. Parallel dazu werden Verdünnungen von dem zu untersuchenden Protein hergestellt. Hierbei muß darauf geachtet werden, dass die Verdünnungen so ausgewählt werden, dass die jeweils zu erwartende Proteinkonzentration und damit die Absorption innerhalb des Auswertungsfensters der Kalibriergeraden liegt. Da das Lambert-Beersche Gesetz nur in hinreichend verdünnten Lösungen gilt, darf die Extinktion der Proben nicht größer als 0,8 betragen. Je 500 μL der hergestellten Proteinstandards sowie der Proben werden vorgelegt und mit je 500 μL Lowry-Reagenz versetzt. Die Suspensionen werden gut durchmischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lowry-Reagenz enthält Natriumdodecylsulfat und sorgt dafür, dass die Proteine solubilisiert werden. Nach der Inkubationszeit werden pro Reagenzglas unter schnellem Mischen 250 μL Folin-Phenolreagenz hinzupipettiert und 30 Minuten wiederum bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Proben in Einmal-Küvetten gefüllt und im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 500 nm (Lowry low) gegen den Nullwert gemessen. Die Messung sollte in einem Zeitraum von maximal 30 Minuten erfolgen.

7.5 Radioligand-Bindungsstudien

7.5.1 *Kompetitionsexperimente mit [³H]Uracil*

Die meisten Rezeptorliganden sind nicht als Radioliganden verfügbar. Daher ist es nicht möglich, deren Affinitäten zum Rezeptor direkt zu messen. Die Affinität der potentiellen Inhibitoren kann jedoch indirekt gemessen werden, in dem man die Fähigkeit der Liganden untersucht, mit dem Radioliganden um die Bindungsstelle zu konkurrieren und somit die Bindung des Radioliganden an den Rezeptor zu verhindern. In einem Kompetitionsexperiment werden verschiedene Konzentrationen des Kaltliganden eingesetzt, welche mit einer konstanten Radioligand-Konzentration um die Bindungsstelle konkurrieren. Die Kompetitionsexperimente werden mit einem Tris-Puffer (50 mM, pH 7,4) in einem Volumen von 1,0 mL in Polyethylen-Röhrchen durchgeführt. Es wird eine Verdünnungsreihe von 10 Konzentrationen der Testsubstanzen in DMSO hergestellt, wobei ein Konzentrationsbereich von drei bis vier Zehnerpotenzen – mit einer gleichmäßigen Streuung um den erwarteten K_i -Wert – abgedeckt werden sollte.

Der Reaktionsansatz beträgt 1000 μ L und setzt sich folgendermaßen zusammen:

10 μ L	Uracil in DMSO (<i>unspezifische Bindung</i>) bzw. DMSO (<i>Gesamtbindung</i>) bzw. Testsubstanz in DMSO
790 μ L	Tris (50 mM, pH 7,4)
100 μ L	[³ H]Uracil [5 nM]
100 μ L	Kalbs-Striatum (50 μ g Protein/Vial)

Zunächst werden je 10 μ L der Testsubstanz in entsprechender Konzentration sowie DMSO zur Bestimmung der Gesamtbindung und Uracil (100 μ M Endkonzentration) zur Bestimmung der unspezifischen Bindung in PE-Reagenzgläser vorgelegt. Es werden immer Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als nächstes werden 790 μ L auf RT temperierter Inkubationspuffer – 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 – sowie 100 μ L von der zuvor hergestellten Radioligand-Lösung hinzupipettiert. Zum Schluß werden 100 μ L der Proteinsuspension, 50 μ g Protein enthaltend, zugegeben und nach gutem Durchmischen 5 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird der Bindungsassay mit einem Zellharvester über einen zuvor mit kaltem Tris-Puffer befeuchteten GF/B-Glasfaserfilter filtriert und dreimal mit je 1 mL eiskaltem Tris-Puffer nachgespült. Die Filter werden nach dem Ausstanzen in 4 mL Szintillationsvials überführt und mit je 2,5 mL Ultima-Gold-Szintillations-Cocktail versetzt. Nach einer Präinkubation von 9 h wird die Radioaktivität durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt.

Die Kompetitionsexperimente werden mit dem Programm PRISM[®] ausgewertet. Die Daten werden mittels nichtlinearer Regression analysiert. Die Verdrängungskurven haben in der halblogarithmischen Darstellung einen sigmoidalen Kurvenverlauf (**Abb. 7.5**).

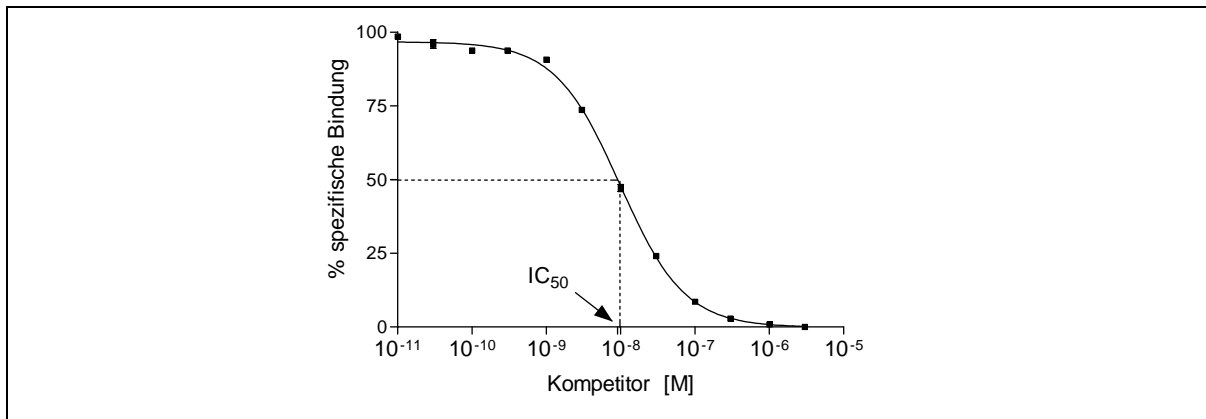


Abb. 7.5: Ein typisches Konkurrenzexperiment

Mit steigender Konzentration des Kaltliganden nimmt die Bindung des Radioliganden an den Rezeptor ab (**Abb. 7.5**). Der Bindungsparameter IC_{50} , den man aus diesem Experiment erhält, gibt die Konzentration an Kaltligand an, welche eine 50 %ige Hemmung der spezifischen Bindung des Radioliganden an den Rezeptor bewirkt. Die Dissoziationskonstante für den Kaltliganden wird als K_i -Wert bezeichnet. Dieser wird aus dem IC_{50} -Wert mithilfe der **Cheng-Prusoff-Gleichung**³⁷³ (**Gl. 7.1**) berechnet.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L}{K_D}}$$

L = Konzentration des Radioliganden
 K_D = Dissoziationskonstante des Radioliganden

Gl. 7.2: Berechnung des K_i -Wertes nach Cheng-Prusoff

Jedes Konkurrenzexperiment wird – unabhängig voneinander – mindestens dreimal durchgeführt und die K_i -Werte als Mittelwerte \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) von n Experimenten in Dreifachbestimmung dargestellt.

HERSTELLUNG DER RADIOLIGAND-LÖSUNG

Zur Herstellung der Radioligand-Lösung wird die berechnete Menge an Puffer (V_{Puffer}) vorgelegt und mit der berechneten Radioligand-Menge V_{RL} [μL] versetzt.

Berechnung der Radioligand-Menge:

$$V_{\text{RL}} [\mu\text{L}] = \frac{n_{\text{vials}} \cdot \text{RL-Konz. [nM]} \cdot V_{\text{ges}} [\text{mL}] \cdot \text{spezif. Aktivität des RL [Ci/mmol]} \cdot 1000}{c_{\text{RL}} [\mu\text{Ci}/\mu\text{L}]}$$

- n_{vials} = Anzahl der vials im Assay
 RL-Konz. = Radioligand-Konzentration im Assay [nM]
 V_{ges} = Gesamtvolumen des Assays pro vial [mL]
 c_{RL} = Radioaktivkonzentration [$\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$]

Berechnung der Menge des Puffers:

$$V_{\text{Puffer}} = [\text{Pipettiervolumen an fertiger RL-Lösung pro vial } [\mu\text{L}] \cdot n_{\text{vials}}] - V_{\text{RL}} [\mu\text{L}]$$

HERSTELLUNG DER PROTEINSUSPENSION

Zur Herstellung der Proteinsuspension wird die berechnete Menge an Puffer (V_{Puffer}) vorgelegt und mit der berechneten Menge an Membranpräparation V_{MP} [μL] versetzt.

Berechnung der Proteinmenge:

$$V_{\text{MP}} [\mu\text{L}] = n_{\text{vials}} \cdot c_{\text{Protein im Assay}} [\mu\text{g}] / c_{\text{MP}} [\mu\text{g}/\text{mL}]$$

- V_{MP} = benötigtes Volumen an Membranpräparation
 n_{vials} = Anzahl der vials im Assay
 $c_{\text{Protein im Assay}}$ = erwünschte Proteinkonzentration im Assay pro vial [μg]
 c_{MP} = Proteinkonzentration der eingesetzten Membranpräparation [$\mu\text{g}/\text{mL}$]

Berechnung der Menge des Puffers:

$$V_{\text{Puffer}} = [\text{Pipettiervolumen an fertiger Proteinsuspension pro vial } [\mu\text{L}] \cdot n_{\text{vials}}] - V_{\text{MP}} [\mu\text{L}]$$

Tab. 7.6: Aufstellung der Assay-Bedingungen für den Standardassay

Parameter	Substanz	Endkonzentration	Volumen
Testsubstanz	Inhibitor	1 % DMSO	10 µL bzw.
Gesamtbindung	DMSO	1 %	10 µL bzw.
Unspezifische Bindung	Uracil	100 µM (1 % DMSO)	10 µL
Inkubationspuffer	Tris, pH 7,4	50 mM	790 µL
Radioligand	[³ H]Uracil (K _D = 5,0 nM)	5 nM	100 µL
Protein	Kalbs-Striatum- Membranpräparation (P2-Fraktion)	50 µg	100 µL
Gesamtvolumen			1000 µL
Inkubationszeit	5 Stunden		
Inkubationstemperatur	37°C im Schüttelwasserbad		
Filter	GF/B-Glasfaserfilter		

Tab. 7.7: Verdünnungsreihe der Testsubstanzen

Verdünnungen	Herstellung	Endkonzentration im Assay
10 mM Stock-Lsg.	-	100 µM
V 1	150 µL Stock-Lsg + 350 µL DMSO	30 µM
V 2	150 µL V 1 + 300 µL DMSO	10 µM
V 3	150 µL V 2 + 350 µL DMSO	3 µM
V 4	150 µL V 3 + 300 µL DMSO	1 µM
V 5	150 µL V 4 + 350 µL DMSO	0,3 µM
V 6	150 µL V 5 + 300 µL DMSO	0,1 µM
V 7	150 µL V 6 + 350 µL DMSO	0,03 µM
V 8	150 µL V 7 + 300 µL DMSO	0,01 µM
V 9	150 µL V 8 + 350 µL DMSO	0,003 µM

7.5.2 Sättigungsexperimente mit [³H]Uracil

Sättigungsexperimente werden durchgeführt, um die *Affinität* des jeweiligen Radioliganden für einen Rezeptor und die *Rezeptordichte* in einer bestimmten Gewebepräparation zu ermitteln. Für die Sättigungsexperimente wird die Membranpräparation (50 µg Kalbs-Striatum) in Anwesenheit von 0,016-75 nM [³H]Uracil in einem Gesamtvolumen von 1 mL fünf Stunden bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung werden 100 µM Uracil eingesetzt. Jede Messung erfolgt in Dreifachbestimmung. Der Reaktionsansatz beträgt 1000 µL und setzt sich folgendermaßen zusammen:

10 µL	Uracil in DMSO (<i>unspezif. Bindung</i>) bzw. DMSO (<i>Gesamtbindung</i>)
790 µL	Tris (50 mM, pH 7,4)
100 µL	[³ H]Uracil [0,016-75 nM]
100 µL	Kalbs-Striatum (50 µg Protein/Vial)

Zunächst wird eine Radioligand-Verdünnungsreihe von 16 Konzentrationen in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 hergestellt (siehe Tabelle 7.5). 10 µL einer 10 mM Uracil-Lösung (in DMSO gelöst) – zur Bestimmung der unspezifischen Bindung – bzw. 10 µL DMSO – zur Bestimmung der Gesamtbindung – werden in PE-Reagenzgläsern vorgelegt. Nach Zugabe von 790 µL Inkubationspuffer werden je 100 µL der zuvor hergestellten Radioligand-Konzentrationen hinzupipettiert. Als letztes werden 100 µL der Proteinsuspension hinzugegeben und nach gutem Durchmischen 5 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird der Bindungsassay mit einem Zellharvester über einen zuvor mit kaltem Tris-Puffer befeuchteten GF/B-Glasfaserfilter filtriert und dreimal mit je 1 mL eiskaltem Tris-Puffer nachgespült. Die Filter werden nach dem Ausstanzen in 4 mL Szintillationsvials überführt und mit je 2,5 mL Ultima-Gold-Szintillations-Cocktail versetzt. Nach einer Präinkubation von 9 h werden die Proben je 1 Minute im LSC-Counter gezählt.

Das Sättigungsexperiment wird mit dem Programm PRISM[®] ausgewertet. Durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung wird die spezifische Bindung ermittelt, welche in einem Diagramm gegen die eingesetzte Radioligand-Konzentration aufgetragen wird. Durch nichtlineare Regression der spezifischen Bindung für eine Bindungsstelle wird der B_{\max} -Wert – maximale Anzahl der Rezeptor-Bindungsstellen – und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D berechnet (**Abb. 7.6 A**). Der K_D -Wert ist die Konzentration, bei der 50 % der Rezeptoren von dem Radioliganden besetzt sind. Wird die Konzentration des Radioliganden weiter erhöht, so wird ein Punkt erreicht, bei der die Bindung des Radioliganden nicht weiter ansteigt. Dieser Wert entspricht dem B_{\max} -Wert und ist ein Maß für die Rezeptordichte in der jeweiligen Gewebepräparation.

Der erhaltene B_{\max} -Wert, angegeben in cpm (Counts pro Minute), wird mit Hilfe der untenstehenden Gleichung (Gl. 7.2) unter Einbeziehung der *spezifischen Aktivität* des Radioliganden, der eingesetzten *Proteinkonzentration*, der *Counter-Effizienz* sowie des *Umrechnungsfaktors von cpm in Bq* in die Rezeptordichte in ***fmol/mg Protein*** umgerechnet.

$$B_{\max} [\text{fmol/mg Protein}] = \frac{B_{\max} [\text{cpm}] \cdot 100}{\text{Effizienz} \cdot 2,2 \cdot \text{spezif. Aktivität} [\text{Ci/mmol}] \cdot \text{Protein} [\text{mg}]}$$

Gl. 7.2: Umrechnung des B_{\max} [cpm] in B_{\max} [fmol/mg Protein]

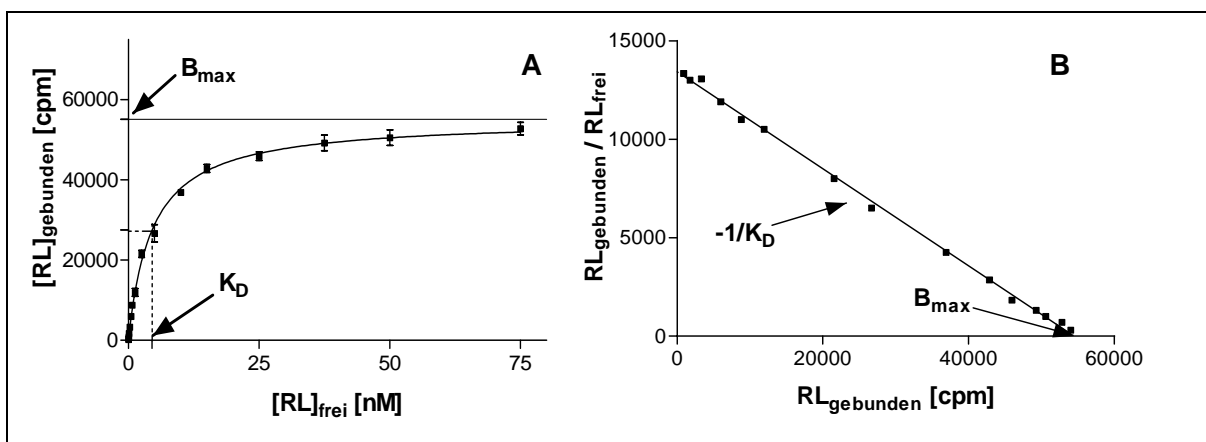


Abb. 7.6: Sättigungsexperiment. **A** Sättigungskurve, **B** Rosenthal-Plot

Ein alternativer Weg, um Daten des Sättigungsexperimentes zu visualisieren, ist die Auftragung der gebundenen Radioligandmenge (RL_{gebunden}) gegen $RL_{\text{gebunden}} / RL_{\text{frei}}$ **nach Rosenthal**³⁷⁴ (Abb. 7.6 B). Hierbei werden die Daten so transformiert, dass sie durch lineare Regression ausgewertet werden können. Bindet der Radioligand nur an eine Bindungsstelle, erhält man eine Gerade. Die Steigung der Geraden entspricht $-1/K_D$ und der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse gibt den B_{\max} -Wert wieder. Die Darstellung nach Rosenthal eignet sich weniger für die Datenanalyse, als vielmehr zur Verdeutlichung der Änderungen des K_D -Wertes und des B_{\max} -Wertes bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Weiterhin weist ein nichtlinearer Rosenthal-Plot auf die mögliche Existenz von zwei (oder mehr) Bindungsstellen hin.

Tab. 7.8: Verdünnungsreihe des Radioliganden [³H]Uracil (ausgehend von 3 mL Stocklösung und berechnet für jeweils eine Dreifachbestimmung pro Messpunkt)

Verdünnungen	Konzentration [nM]	Konzentration im Assay [nM]	Herstellung der Verdünnungen
V 1	750	75	85,5 µL [³ H]Uracil + 2914,5 µL Tris
V 2	500	50	aus 2000 µL V 1 + 1000 µL Tris
V 3	375	37,5	aus 2250 µL V 2 + 750 µL Tris
V 4	250	25	aus 2000 µL V 3 + 1000 µL Tris
V 5	150	15	aus 1800 µL V 4 + 1200 µL Tris
V 6	100	10	aus 2000 µL V 5 + 1000 µL Tris
V 7	50	5	aus 1500 µL V 6 + 1500 µL Tris
V 8	25	2,5	aus 1500 µL V 7 + 1500 µL Tris
V 9	12,5	1,25	aus 1500 µL V 8 + 1500 µL Tris
V 10	7,5	0,75	aus 1800 µL V 9 + 1200 µL Tris
V 11	5	0,25	aus 2000 µL V10 + 1000 µL Tris
V 12	2,5	0,125	aus 1500 µL V11 + 1500 µL Tris
V 13	1,25	0,0125	aus 1500 µL V12 + 1500 µL Tris
V 14	0,625	0,0625	aus 1500 µL V13 + 1500 µL Tris
V 15	0,3125	0,03125	aus 1500 µL V14 + 1500 µL Tris
V 16	0,15625	0,015625	aus 1500 µL V15 + 1500 µL Tris

7.5.2.1 Sättigungsexperimente in Anwesenheit eines stabilen GTP-Analogen

Zur Durchführung von Sättigungsexperimenten in Anwesenheit eines stabilen GTP-Analogen (Gpp(NH)p) wird zunächst, wie bereits im Abschnitt 7.5.2 beschrieben, eine Radioligand-Verdünnungsreihe mit 16 verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Der Reaktionsansatz beträgt 100 µL und setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 10 µL Uracil in DMSO (*unspezif. Bindung*) bzw. DMSO (*Gesamtbindung*)
- 790 µL Tris (50 mM, pH 7.4)
- 100 µL [³H]Uracil [0,016-75 nM]
- 100 µL Kalbs-Striatum (50 µg Protein/Vial) bzw.
Kalbs-Striatum (50 µg Protein/Vial) mit **Gpp(NH)p (100 µM Endkonz.)**

Es werden jeweils in Dreifachbestimmungen 10 µL DMSO (1 % im Assay) für die Gesamtbindung sowie 10 µL Uracil (100 µM Endkonzentration in DMSO) zur Bestimmung der unspezifischen Bindung in Polyethylen-Röhrchen vorgelegt. Danach folgt die Zugabe von 790 µL Tris-Puffer (50 mM, pH 7,4) und 100 µL [³H]Uracil in der jeweiligen Konzentration. Neben der Herstellung der üblichen, 50 µg Protein pro Vial enthaltenden, Proteinsuspension (siehe Abschnitt 7.5.1) wird eine weitere Proteinsuspension hergestellt, welche Gpp(NH)p enthält. Dazu wird das Protein mit Guanylylimidodiphosphat (Gpp(NH)p) 20

Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad vorinkubiert und danach im Eisbad auf 4°C abgekühlt. Je 100 µL der Proteinsuspensionen werden in die PE-Reagenzgläser hinzupipetiert, so dass die Gesamt- und die unspezifische Bindung jeweils in Triplets zu jeder Radio-ligand-Konzentration parallel einmal mit Gpp(NH)p (100 µM Endkonzentration im Assay) und einmal ohne Gpp(NH)p bestimmt wird. Untenstehend ist das Pipettierschema beispielhaft für ein 48er rack dargestellt:

RG 37-48: Uracil 100 µM

37/38/39	40/41/42	43/44/45	46/47/48
RL-Verd. 7	RL-Verd. 8	RL-Verd. 7	RL-Verd. 8
[-----mit Gpp(NH)p-----]			

RG 25-36: DMSO

25/26/27	28/29/30	31/33/33	34/35/36
RL-Verd. 5	RL-Verd. 6	RL-Verd. 5	RL-Verd. 6
[-----mit Gpp(NH)p-----]			

RG 13-24: Uracil 100 µM

13/14/15	16/17/18	19/20/21	22/23/24
RL-Verd. 3	RL-Verd. 4	RL-Verd. 3	RL-Verd. 4
[-----mit Gpp(NH)p-----]			

RG 1-12: DMSO

1/2/3	4/5/6	7/8/9	10/11/12
RL-Verd. 1	RL-Verd. 2	RL-Verd. 1	RL-Verd. 1
[-----mit Gpp(NH)p-----]			

Der Bindungsassay wird 5 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit einem Zellharvester unter Verwendung eines GF/B-Glasfaserfilters filtriert. Die Filter werden dreimal mit je ein mL eiskaltem Tris-Puffer, pH 7,4 nachgespült, nach dem Ausstanzen in Szintillationsvials überführt und mit 2,5 mL Ultima-Gold-Szintillations-Cocktail versetzt. Die Proben werden 9 h präinkubiert und die Radioaktivität je eine Minute im LSC-Counter bestimmt. Die GTP-Shift-Experimente werden mit dem Programm PRISM[®] analog wie die bereits im Abschnitt 7.5.2 beschriebenen Sättigungsexperimente analysiert.

7.5.3 Kinetische Experimente mit [³H]Uracil

Kinetische Experimente, **Assoziations-** und **Dissoziationsexperimente** umfassend, werden durchgeführt, um die Geschwindigkeit einer Rezeptor-Ligand-Interaktion zu charakterisieren. Mit Assoziationsexperimenten wird die zeitabhängige Bindung des Radioliganden an den jeweiligen Rezeptor analysiert. Dissoziationsexperimente hingegen geben Aufschluss über den zeitabhängigen Zerfall der Rezeptor-Ligand-Komplexe. Aus den kinetischen Parametern k_{on} und k_{off} kann der kinetische K_D -Wert berechnet werden, welcher mit dem K_D -Wert aus den Sättigungsexperimenten übereinstimmen sollte^{375,376,377}.

7.5.3.1 Assoziations-Experimente mit [³H]Uracil

Zur Bestimmung des kinetischen Parameters k_{on} sowie der minimal erforderlichen Inkubationsdauer bis zur Gleichgewichtseinstellung in einer Bindungsstudie mit [³H]Uracil wird ein Assoziationsexperiment durchgeführt. Die Kalbs-Striatum-Membranen werden mit 5 nM [³H]Uracil über 23 verschiedene Zeitspannen (0,5-660 Minuten) bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die unspezifische Bindung wird in Gegenwart von 100 µM Uracil bestimmt. Der Reaktionsansatz beträgt 1000 µL und setzt sich folgendermaßen zusammen:

10 µL	DMSO
790 µL	Tris (50 mM, pH 7.4)
100 µL	Kalbs-Striatum (50 µg Protein/Vial)
100 µL	[³ H]Uracil in DMSO (<i>zeitversetzte Zugabe</i>)

Zunächst werden 10 µL DMSO – zur Bestimmung der Gesamtbindung – in PE-Reagenzgläser vorgelegt und dann 790 µL Inkubationspuffer (50 mM Tris-Puffer, pH 7,4) und 100 µL der Proteinsuspension pro Reagenzglas hinzugegeben. Als letztes wird die Radioligand-Lösung (100 µL pro Vial) zeitversetzt, exakt nach 0,5 / 1 / 2 / 5 / 7 / 10 / 20 / 30 / 60 / 90 / 120 / 150 / 180 / 210 / 240 / 270 / 300 / 360 / 420 / 480 / 540 / 600 und 660 Minuten, in inverser Reihenfolge (also mit 660 Minuten beginnend) hinzupipettiert und das Gemisch bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Bei der Bestimmung der unspezifischen Bindung mit 100 µM Uracil erfolgt die Zugabe des Radioliganden bei 660 Minuten, also zu Beginn des Experimentes. Es werden jeweils für jeden Messzeitpunkt Dreifachbestimmungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wird der Bindungsassay mit einem Zellharvester über GF/B-Glasfaserfilter filtriert. Die Filter werden dreimal mit je 1 mL eiskaltem Tris-Puffer gewaschen und nach dem Ausstanzen in 4 mL Szintillationsvials überführt und mit je 2,5 mL Ultima-Gold-Szintillations-Cocktail versetzt. Nach einer Präinkubation von 9 h wird die Radioaktivität durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt.

Die erhaltenen Daten werden mit Hilfe der Software PRISM[®] (One phase exponential association) analysiert. Die spezifische Bindung wird durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung ermittelt. Der kinetischer Parameter k_{ob} und die Halb-

wertszeit $t_{1/2}$ (**Abb. 7.7**) werden durch nichtlineare Regression der spezifischen Bindung für eine einphasige exponentielle Assoziation berechnet.

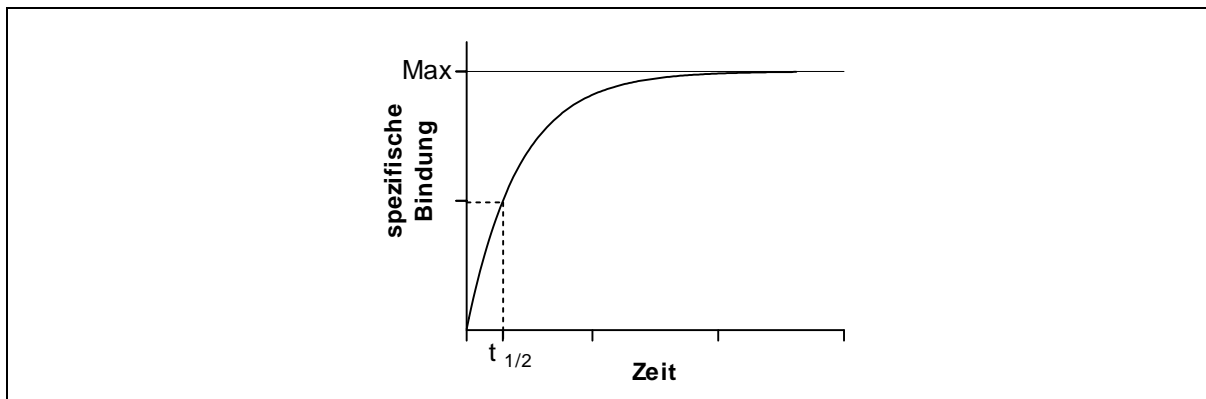


Abb. 7.7: Assoziationsexperiment

7.5.3.2 Dissoziations-Experimente mit [³H]Uracil

Zur Bestimmung des kinetischen Parameters k_{off} wird ein Dissoziationsexperiment durchgeführt. Der Reaktionsansatz beträgt 1000 μ L und setzt sich folgendemmaßen zusammen:

790 μ L	Tris (50 mM, pH 7.4)
100 μ L	Kalbs-Striatum (50 μ g Protein/Vial)
100 μ L	[³ H]Uracil (5 nM)
10 μ L	Uracil (100 μ M Endkonzentration in DMSO), (<i>zeitversetzte Zugabe</i>)

Zunächst wird das Protein, 50 μ g Kalbs-Striatum pro Vial enthaltend, mit [³H]Uracil (5 nM) in Inkubationspuffer 5 h bei 37°C im Schüttelwasserbad – bis zur Einstellung des Gleichgewichtes – vorinkubiert. Zur Bestimmung der Gesamtbindung wird in drei PE-Reagenzgläsern zusätzlich DMSO (Endkonzentration 1 %) vorgelegt und wie oben vorinkubiert. Anschließend wird der Kaltligand Uracil in einer Endkonzentration von 100 μ M zeitversetzt nach exakt 0,5 / 1 / 1,5 / 2 / 3 / 5 / 7 / 10 / 20 / 30 / 60 / 90 / 120 / 150 / 180 / 210 / 240 / 250 / 270 / 330 / 360 / 420 / 480 Minuten in inverser Reihenfolge (d.h. mit 480 Minuten beginnend) dazugegeben. Beim Zeitpunkt $t = 0$ wird der Assay über einen zuvor mit kaltem Tris-Puffer befeuchteten Glasfaserfilter GF/B filtriert und dreimal mit je 1 mL eiskaltem Tris-Puffer nachgewaschen. Die Filter werden ausgestanzt, in Szintillationsvials überführt und mit je 2,5 mL Szintillations-Cocktail (UltimaGoldTM) versetzt. Nach einer Präinkubation von 9 h werden die Vials je 1 Minute im LSC-Counter gezählt. Die Dissoziationsexperimente werden mit Hilfe der Software PRISM[®] (One phase exponential decay) analysiert. Bei nur einer Bindungsstelle verläuft die Dissoziationskurve exponentiell (**Abb. 7.8**). Der kinetischer Parameter k_{off} wurde durch nichtlineare Regression der Gesamtbindung für eine einphasige exponentielle Dissoziation berechnet.

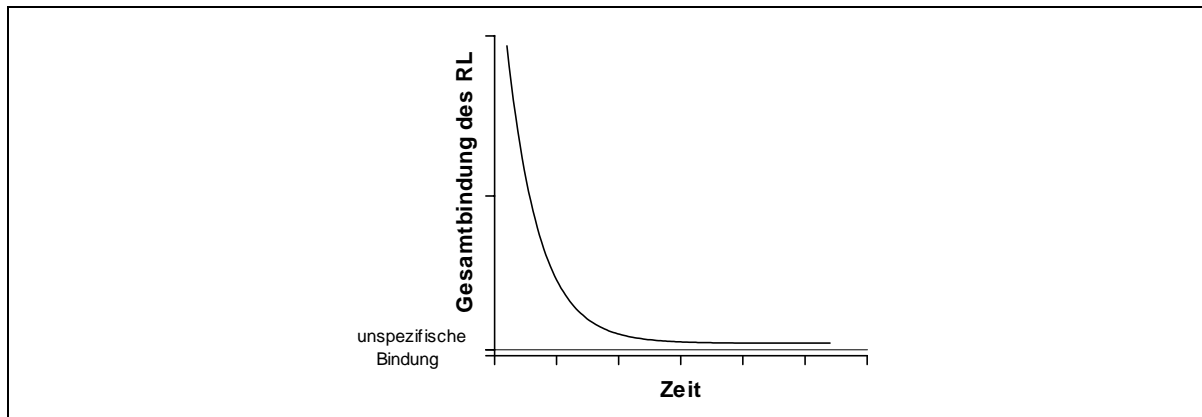


Abb. 7.8: Dissoziationsexperiment

Unter Einbeziehung der experimentell – aus der nichtlinearen Regressionsanalyse – ermittelten Konstante k_{ob} , der aus dem Dissoziationsexperiment ermittelten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{off} und der eingesetzten Radioligand-Konzentration c_{RL} kann die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} nach der untenstehenden Gleichung berechnet werden³⁷⁸:

$$k_{on} \text{ (M}^{-1}\text{min}^{-1}\text{)} = [k_{ob} \text{ (min}^{-1}\text{)} - k_{off} \text{ (min}^{-1}\text{)}] / c_{RL} \text{ (M)}$$

Gl. 7.3: Berechnung der Assoziationskonstante k_{on}

Schließlich kann aus den beiden zuvor ermittelten Konstanten k_{off} und k_{on} der *kinetische K_D -Wert* nach Gleichung 7.4 berechnet werden:

$$K_D \text{ (M)} = k_{off} \text{ (min}^{-1}\text{)} / k_{on} \text{ (M}^{-1}\text{min}^{-1}\text{)}$$

Gl. 7.4: Berechnung des kinetischen K_D -Wertes

7.5.4 Zentrifugationsassays

7.5.4.1 Zentrifugationsassay mit [³H]Uridin

Die Zentrifugationsassays mit [³H]Uridin werden in Anlehnung an Kovacs et al. (2003)²⁵⁸ durchgeführt. Der Reaktionsansatz beträgt 1700 µL und setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 17 µL DMSO bzw. Uridin (100 µM Endkonzentration in DMSO)
- 233 µL Inkubationspuffer (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glucose, 20 mM HEPES, pH 7,5)
- 100 µL [³H]Uridin [Endkonz.: 10 nM]
- 1350 µL Proteinsuspension aus Ratten-Cortex (1000 µg Protein/Vial)

Die in 'safe-lock' Eppendorfgefäße pipettierten Ansätze werden 60 Minuten auf Eis (4°C) inkubiert und anschließend 3 Minuten bei 18.900 g zentrifugiert, um den gebundenen und freien Radioliganden voneinander zu trennen. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet zweimal mit ca. 500 µL eiskaltem Puffer (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glucose, 20 mM HEPES, pH 7,5) gewaschen. Das Pellet wird in 50 µL Puffer A, 100 µM Uridin enthaltend, resuspendiert. Die Suspensionen werden in Szintillationsvials überführt und mit 1500 µL SolvableTM solubilisiert. Die Proben werden mit 10 mL Szintillationscocktail (Ultima GoldTM) versetzt und nach einer Präinkubation von 9 h im LSC-Counter vermessen.

7.5.4.2 Zentrifugationsassay mit [³H]Phenacyluridin

Der Reaktionsansatz (1000 µL) setzt sich wie folgt zusammen:

- 25 µL DMSO bzw. Phenacyluridin (100 µM Endkonzentration in DMSO)
- 608 µL Inkubationspuffer (50 mM Tris, pH 7,4)
- 100 µL [³H]Phenacyluridin [Endkonz.: 5 nM]
- 267 µL Proteinsuspension aus Ratten-Striatum bzw. Ratten-Cortex (800 µg Protein/Vial)

Abweichend zu der oben beschriebenen Vorgehensweise werden die Ansätze nach der Inkubation 5 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgetrennt und das Pellet zunächst mit 1000 µL 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und ein weiteres Mal mit 500 µL Tris-Puffer gewaschen. Das Pellet wird in 50 µL Puffer, 100 µM Uridin enthaltend, resuspendiert und die Suspension in 50 µL 10 %iger SDS-Lösung solubilisiert. Die Proben werden in 4 mL Szintillationsvials mit 2,5 mL Ultima-Gold-Szintillations-Cocktail versetzt und die Radioaktivität im LSC-Counter bestimmt.

7.5.5 Bestimmung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP)

Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgt mit einem kommerziell erhältlichen [³H]cAMP-Kit von Amersham Biosciences (TRK432 Cyclic AMP [³H]assay Biotrak system). Die Wirkung von Uracil auf die cAMP-Akkumulation wird in Gegenwart und in Abwesenheit von Forskolin, welches die katalytische Einheit der Adenylatcyclase stimuliert³⁷⁹, untersucht.

7.5.5.1 cAMP-Versuche mit NG108-15-Zellmembranpräparationen

Verwendete Puffer:

- **Puffer I**
Tris-Puffer 50 mM, pH 7,4, 4 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 5 μM GTP, 30 μM Rolipram
- **Puffer II mit Forskolin**
Tris-Puffer 50 mM, pH 7,4, 4 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 5 μM GTP, 30 μM Rolipram, 10 mM ATP, 100 μM Forskolin, 25 % DMSO
- **Puffer II ohne Forskolin**
Tris-Puffer 50 mM, pH 7,4, 4 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 5 μM GTP, 30 μM Rolipram, 10 mM ATP, 25 % DMSO
- **Puffer III**
Tris-Puffer 50 mM, pH 7,4, 4 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 5 μM GTP, 30 μM Rolipram, 10 mM ATP, 100 μM Forskolin

Tab. 7.9: Verdünnungsreihe der Testsubstanzen für den cAMP-Versuch

Verdünnung	Herstellung der Verdünnungen	Endkonz. im Assay
1 mM Stock	---	100 μM
V 1	30 μL 1mM Stock + 90 μL Puffer III	25 μM (25 % DMSO)
V 2	40 μL + 60 μL Puffer II	10 μM
V 3	30 μL + 70 μL Puffer II	3 μM
V 4	30 μL + 60 μL Puffer II	1 μM
V 5	30 μL + 70 μL Puffer II	0,3 μM = 300 nM
V 6	30 μL + 60 μL Puffer II	0,1 μM = 100 nM
V 7	30 μL + 70 μL Puffer II	0,03 μM = 30 nM
V 8	30 μL + 60 μL Puffer II	0,01 μM = 10 nM
V 9	30 μL + 70 μL Puffer II	0,003 μM = 3nM
V 10	30 μL + 60 μL Puffer II	0,001 μM = 1 nM
V 11	30 μL + 70 μL Puffer II	0,0003 μM = 0,3 nM

Vorbereitung des Zellmaterials:

60 Dishes – 80 % konfluent bewachsen mit NG108-15-Zellen – werden vom Medium befreit, mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 versetzt und mit dem Zellschaber abgelöst. Die Zellsuspension wird homogenisiert und 10 Minuten bei 1.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert, das Pellet verworfen und der Überstand 20 Minuten bei 35.000 g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird erneut 20 Minuten unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Schließlich wird das Pellet in 3 mL Puffer I aufgenommen und mit dem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert. Je 10 µL Testsubstanz werden in der jeweiligen Konzentration, verdünnt in Puffer II, vorgelegt und mit 90 µL der hergestellten Membransuspension versetzt. Die Inkubationsansätze werden 20 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen werden zum einen 10 µL Puffer II *mit Forskolin* und zum anderen 10 µL Puffer II *ohne Forskolin* ebenfalls mit 90 µL der Membransuspension inkubiert. In dieser Inkubationszeit soll die cAMP-Stimulierung durch Forskolin und bei Agonisten G_i-gekoppelter Rezeptoren eine Inhibierung der Adenylatcyclase durch die Testsubstanz stattfinden. Die Reaktion wird durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 98 °C für 2 min. abgestoppt, wodurch eine Koagulation des Proteins erreicht wird. Der Ansatz wird 15 Minuten bei 5.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Protein wird abgetrennt und der Überstand dem Assay unterzogen.

Herstellung der Reagenzien³⁸⁰:

- Die **Tris-EDTA-Puffermischung** wird in 25,0 mL reinem Wasser gelöst. Man erhält einen TRIS-EDTA-Puffer der Konzentration 0,05 M Tris mit 4 mM EDTA, pH 7,5.
- Das **cAMP-bindende Protein** wird in 15,0 mL reinem Wasser suspendiert.
- Der nicht radioaktiv markierte **cAMP-Standard** wird in 5,0 mL reinem Wasser gelöst.
- Der gefriergetrocknete RL [**8-³H**]cAMP wird in 10,0 mL reinem Wasser gelöst.
- Das **Kohleadsorbens** wird in 20,0 mL eiskaltem reinem Wasser suspendiert und in einem Eiswasserbad unter Rühren gekühlt.

Durchführung der Bindungsstudie:

Die Versuche werden in Eppendorfreaktionsgefäßen bei 0°C im Eiswasserbad durchgeführt. Der Reaktionsansatz beträgt 200 µL und setzt sich folgendermaßen zusammen:

50 µL	Testsubstanz / TRIS-EDTA-Puffer / Standard
100 µL	[³ H]cAMP-Lösung
50 µL	Bindeprotein

Zur Durchführung des Assays werden je 50 µL der aus der Aufarbeitung des Zellmaterials stammenden Proben in Eppendorfreaktionsgefäße, die in einem Eiswasserbad gestanden haben, pipettiert. Anschließend werden je 50 µL radioaktiv markiertes [³H]cAMP hinzugegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µL eines für cAMP spezifischen Bindungsproteins gestartet. Nach gutem Durchmischen werden die Reaktionsansätze 2 h lang auf einem Eisbad bei 2-8°C (Kühlschrank) inkubiert. Die bekannten cAMP-Proben der Standardkurve (1, 2, 4, 8, 16 pmol cAMP/Vial) sowie die TRIS-EDTA-Puffermischung als Kontrolle werden genauso behandelt. Nach der Inkubation werden 100 µL gekühltes

Trennreagenz („charcoal“-Suspension, Kohlesuspension) zum Inkubationsansatz gegeben und durchmischt, sodass das freie cAMP adsorbiert und damit von dem gebundenen getrennt werden kann. Die Eppendorfreaktionsgefäße werden in der vorgekühlten Tischzentrifuge zwei Minuten bei 2°C und 12.000 g zentrifugiert. Von dem Überstand werden vorsichtig, ohne das Pellet zu berühren, je 200 µL abpipettiert und in 20 mL-Szintillationsvials überführt. Die Proben werden mit 10 mL Ultima Gold-Szintillations-Cocktail versetzt, gut durchmischt und im LSC-Counter vermessen.

Tab. 7.10: Pipettierschema (cAMP-Assay)

Vial	Puffer	Standard	Proben	[³ H]cAMP	Bindeprotein	
1/2	150 µL	---	---	50 µL	---	Kontrolle I
3/4	50 µL	---	---	50 µL	100 µL	Kontrolle II
5/6	---	50 µL	---	50 µL	100 µL	1 pmol standard
7/8	---	50 µL	---	50 µL	100 µL	2 pmol standard
9/10	---	50 µL	---	50 µL	100 µL	4 pmol standard
11/12	---	50 µL	---	50 µL	100 µL	8 pmol standard
13/14	---	50 µL	---	50 µL	100 µL	16 pmol standard
15/16 etc.	---	---	50 µL	50 µL	100 µL	Proben

7.5.5.2 cAMP-Versuche mit intakten NG108-15-Zellen

Verwendete Puffer

- **Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, pH 7,4**
130 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 4,0 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄,
1,8 mM CaCl₂·2H₂O, 11,5 mM Glucose, 10 mM HEPES,
0,1 % BSA (frisch zusetzen!)
- **Vorinkubationspuffer:**
Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, pH 7,4, ADA 1 U/ml, Ro20-1724 (4-(3-Butoxy-4-methoxyphenyl)methyl-2-imidazolidon) 100 µM;
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine) 100 µM
- **Puffer II mit Forskolin:**
Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, pH 7,4, 100 µM Forskolin, 25 % DMSO
- **Puffer II ohne Forskolin (als Nullwert):**
Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, pH 7,4, 25 % DMSO
- **Puffer III:** Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, pH 7,4, 100 µM Forskolin

Vorbereitung des Zellmaterials

Eine mit NG 108-15 Zellen 80 % konfluent bewachsene große Zellkultur-Flasche wird vom Medium befreit und die Zellen werden mit 38,5 mL Medium abgelöst. 9,6 mL dieser Zellsuspension werden in ein Falcon-Gefäß überführt und mit 28,9 ml Medium versetzt, sodass dadurch eine 1:8-Verdünnung der Zellsuspension erreicht wird.

In eine 48well-Mikrotiterplatte werden 200 µL Medium pro well pipettiert. Von der hergestellten Zellsuspension werden je 100 µL pro well dazugegeben und die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert bis die Mikrotiterplatte mit den NG108-15 voll bewachsen ist. Das alte Medium wird abpipettiert und die Zellen zweimal mit je 200 µL Krebs-Ringer-Hepes-Puffer gewaschen. Als nächstes werden pro well 180 µL Vorinkubationspuffer hinzupipettiert und die Zellen 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend werden je 20 µL der Testsubstanz in der jeweiligen Konzentration hinzupipettiert und erneut 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Daneben werden als Kontrollen je 20 µL Puffer II jeweils mit und ohne Forskolin mit den Zellen inkubiert. Durch Abpipettieren des Puffers wird die Reaktion gestoppt. Um die Zellen zu lysieren, werden pro well 200 µL 0,1 N HCl hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt die Neutralisation mit 20 µL 1 M NaOH-Lösung. Nach der Zugabe von 220 µL Tris-EDTA-Lsg. (im cAMP-Fertigkit enthalten) werden je 50 µL vom dem Zelllysat im Assay eingesetzt.

Die Herstellung der Reagenzien sowie die Durchführung der Bindungsstudien erfolgt analog wie im vorherigen Abschnitt 7.5.7.1 bereits beschrieben.

Die Auswertung der Experimente erfolgt mit den Programmen EXCEL[®] und PRISM[®]. Die erhaltenen Werte der Radioaktivität (cpm) für den Nullwert (50 µL [³H]cAMP + 150 µL Tris-EDTA-Puffer, Vial 1/2, siehe **Tab. 7.10**) werden gemittelt und von dem Mittelwert der Gesamtbindung an das Bindeprotein (50 µL [³H]cAMP + 50 µL Tris-EDTA-Puffer + 100 µL Bindeprotein; Vial 3/4) subtrahiert. Der so erhaltene **C₀-Wert** ist der Wert der Radioaktivität (cpm) des [³H]cAMP-Protein-Komplexes in Abwesenheit von nicht-markiertem cAMP. Aus den cpm-Werten der Standards (Vial 5-14) und der Proben werden ebenfalls die Mittelwerte gebildet. Nach Subtraktion des C₀-Wertes werden die jeweiligen **C_X-Werte** erhalten, welche die Bindung des Radioliganden an das Bindeprotein in Anwesenheit von nicht-markiertem cAMP darstellen.

Die C_X-Werte der Standards werden durch den C₀-Wert geteilt und der Quotient C₀ / C_X gegen den cAMP-Wert aufgetragen, sodass mit den bekannten Mengen an nicht-markiertem cAMP eine Standardkurve (**Abb. 7.9**) erstellt werden kann. Der Konzentrationsbereich der Eichkurve liegt zwischen 1-16 pmol cAMP. Mithilfe der Standardkurve bzw. der Geradengleichung der Regressionsgeraden kann der cAMP-Gehalt der Proben errechnet werden.

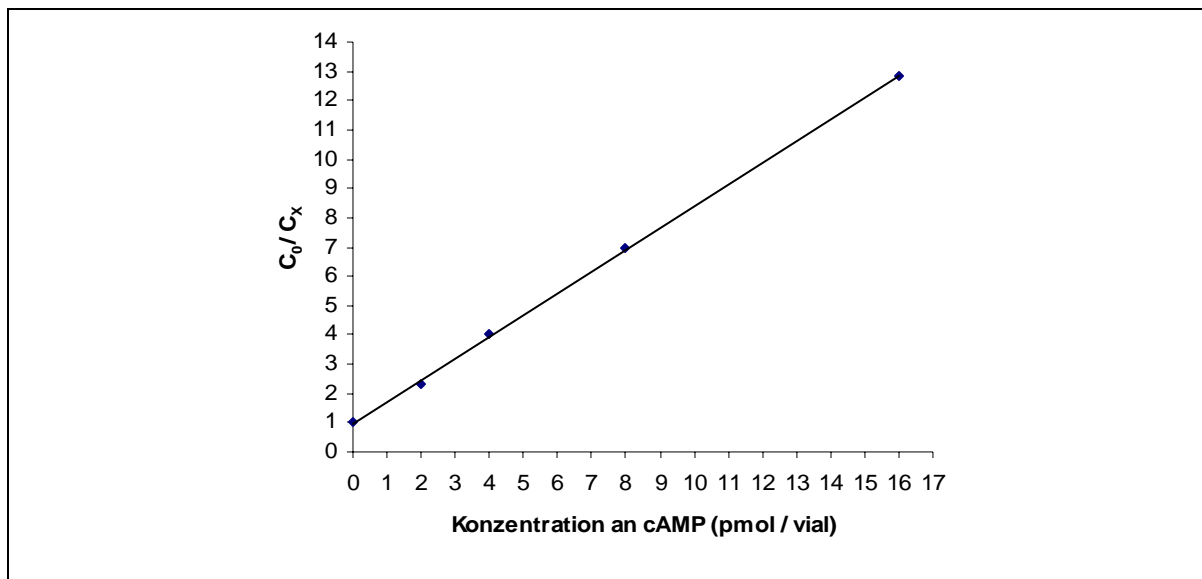


Abb. 7.9: Typische cAMP-Standardkurve

Die maximal produzierte cAMP-Menge – ermittelt mit der Positivkontrolle (Puffer II mit Forskolin ohne Testsubstanz) – wird gleich 100 % gesetzt und die errechneten cAMP-Mengen der Proben werden damit verglichen. Die Inhibition der Forskolin-stimulierten Adenylatcyclase durch die Testsubstanzen wird dann in einem Diagramm dargestellt, wobei die „Relative Menge der produzierten cAMP-Menge [%]“ gegen die Testsubstanz-Konzentration aufgetragen wird.

7.5.6 GTP γ S-Bindungsstudien

Die [35 S]GTP γ S-Radioligand-Bindungsstudien dienen zur Untersuchung der Funktionalität eines Liganden an einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Hierbei wird die Affinität des hydrolysestabilen, radioaktiv markierten GTP-Analogen Guanosin-5'-[γ - 35 S]triphosphat ([35 S]GTP γ S) zur G α -Untereinheit des G-Proteins ermittelt.

Inkubationspuffer: 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM DDT, 10 μ M GDP, 0,5 % BSA

Der **Reaktionsansatz beträgt 200 μ L** und setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 10 μ L GTP γ S 10 μ M Endkonzentration im Assay (in DMSO 20 %/Tris-Puffer 80 %) bzw.
DMSO 20 %/Tris-Puffer 80 % bzw.
Testsubstanz (in DMSO 20 %/Tris-Puffer 80 %)
- 150 μ L Inkubationspuffer
- 20 μ L [35 S]GTP γ S (Endkonzentration: 0,5 nM in Inkubationspuffer)
- 20 μ L hCHO-A₁-Zellmembranpräparation (5 μ g/vial in Inkubationspuffer)

Zunächst werden je 10 μ L der Testsubstanz in entsprechender Konzentration sowie 20 %ige DMSO-Lösung zur Bestimmung der Gesamtbindung und GTP γ S (10 μ M Endkonzentration) zur Bestimmung der unspezifischen Bindung in Polyethylen-Reagenzgläser vorgelegt. Es werden immer Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als nächstes werden 150 μ L Inkubationspuffer (s.o.) sowie 20 μ L der zuvor hergestellten Radioligand-Lösung hinzupipettiert. Zum Schluß werden 20 μ L der Proteinsuspension, 5 μ g Protein enthaltend, zugegeben und nach gutem Durchmischen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Ansätze mit einem Zellharvester über einen GF/B-Glasfaserfilter filtriert und dreimal mit je 1 mL Waschlösung (50 mM Tris-Puffer, 5 mM MgCl₂) nachgespült. Die Filter werden nach dem Ausstanzen in 4 mL Szintillationsvials überführt und mit je 2,5 mL Ultima-Gold-Szintillations-Cocktail versetzt. Nach einer Präinkubation von 9 h wird die Radioaktivität durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt.

Tab. 7.12: Verdünnungsreihe der Testsubstanzen für GTP γ S-Bindungsstudien (1:20-Verdünnung)

Verdünnung	Herstellung der Verdünnungen	Endkonz. im Assay
10 mM Stock	-	
V 1	10 μ L 10 mM Stock + 40 μ L Tris-Puffer	100 μ M
V 2	10 μ L + 90 μ L DMSO 20 %	10 μ M
V 3	10 μ L + 90 μ L DMSO 20 %	1 μ M
V 4	10 μ L + 90 μ L DMSO 20 %	100 nM
V 5	10 μ L + 90 μ L DMSO 20 %	10 nM
V 6	10 μ L + 90 μ L DMSO 20 %	1 nM
V 7	10 μ L + 90 μ L DMSO 20 %	0,1 nM
V 8	10 μ L + 90 μ L DMSO 20 %	0,01 nM

Herstellung der Radioligand-Lösung

Vor Beginn der Experimente wird eine 1:1000 Verdünnung des Radioliganden [35 S]GTP γ S in 10 mM Tricin/1 mM Dithiothreitol (DTT) hergestellt, die in Aliquots zu 0,5 mL und 1,0 mL bei -25 °C gelagert wird.

Da Schwefel-35 eine kurze Halbwertszeit von 87,4 Tagen hat, muß vor jedem Assay die zu diesem Zeitpunkt noch vorhandene spezifische Aktivität sowie die Radioaktivkonzentration berechnet werden. Ausgangspunkt für die Berechnungen sind die vom Hersteller angegebenen Werte für die spezifische Bindung und die Radioaktivkonzentration zu einem Kalibrierdatum. Ausgehend von diesen Werten können die aktuellen Werte berechnet werden. Zunächst wird der Unterschied [in Tagen] zwischen dem „Kalibrierdatum“ und dem Datum, an dem der Assay durchgeführt wird, berechnet und der Zahlenwert 0,9921 mit diesem Wert potenziert:

$$\text{Assaydatum} - \text{Kalibrierdatum: } d \text{ (Tage)} = X$$

$$D_F = 0,9921^X$$

Durch Multiplikation des D_F -Wertes mit der Radioaktivkonzentration zum Zeitpunkt der Kalibrierung (A_r) wird die **Radioaktivkonzentration** zum Zeitpunkt t (A_t) berechnet:

$$A_t = A_r [\text{mCi/mL}] \cdot D_F = Y \text{ mCi/mL}$$

Durch die zu Anfang durchgeführte 1:1000-Verdünnung (s.o.) beträgt die tatsächliche Radioaktivkonzentration an dem „Assaydatum“:

$$\frac{Y}{1000} \text{ mCi/mL}$$

Die zum Zeitpunkt t vorhandene **spezifische Aktivität** (SA_t) wird ebenfalls unter Zuhilfenahme des D_F -Wertes und der spezifischen Aktivität zum Zeitpunkt der Kalibrierung (SA_r) berechnet:

$$SA_t = \frac{D_F}{1 / SA_r [\text{Ci/mmol}] - (1-D_F) / 1498} = \mathbf{Z} \text{ Ci/mmol}$$

Zur Herstellung einer **Radioligand-Lösung der Endkonzentration 0,5 nM im Assay** wird das erforderliche Volumen (V_{RL}) folgendermaßen berechnet:

$$V_{RL} = \frac{\text{Anzahl der Vials} \cdot 0,5 \text{ nmol/L} \cdot SA_t [\text{Ci/mmol}] \cdot \text{Gesamtvolumen pro Vial [mL]}}{\text{Radioligandkonzentration zum Assaydatum } A_t [\text{mCi/mL}]}$$

$$= \mathbf{K} \frac{\text{nmol} \cdot \text{Ci} \cdot \text{mL} \cdot \text{mL}}{\text{L} \cdot \text{mmol} \cdot \text{mCi}}$$

$$= \mathbf{K} \frac{\text{nmol} \cdot 1000 \text{ mCi} \cdot \text{mL} \cdot \text{mL}}{1000 \text{ mL} \cdot 1000000 \text{ nmol} \cdot \text{mCi}}$$

$$= \mathbf{K} 10^{-6} \text{ mL}$$

$$= \mathbf{K} \mu\text{L}$$

Es müssen insgesamt $\mathbf{K} \mu\text{L}$ [^{35}S]GTP γ S-Aliquot eingesetzt werden. Da $20 \mu\text{L}$ Radioligandlösung pro Vial verwendet werden, berechnet sich das Gesamtvolumen der Radioligandlösung zu: $20 \mu\text{L} \cdot \text{Anzahl der Vials} = \mathbf{L} \mu\text{L}$. Dementsprechend beträgt das Volumen an Inkubationspuffer: $\mathbf{L} \mu\text{L} - \mathbf{K} \mu\text{L} = \mathbf{M} \mu\text{L}$.

Herstellung der Proteinsuspension

Zur Herstellung der Proteinsuspension wird die berechnete Menge an Inkubationspuffer vorgelegt und mit dem berechneten Volumen an Membranpräparation versetzt. Da in dem Assay 5 μg Protein pro Vial eingesetzt werden sollen und das Pipettiervolumen pro Vial 20 μL beträgt, berechnet sich das benötigte Volumen an Membranpräparation (V_{MP}) zu:

$$V_{\text{MP}} [\mu\text{L}] = n_{\text{vials}} \cdot 5 \mu\text{g Protein} / c_{\text{MP}} [\mu\text{g}/\mu\text{L}]$$

und das benötigte Volumen an Inkubationspuffer (V_{Puffer}) zu:

$$V_{\text{Puffer}} = (20 \mu\text{L} \cdot n_{\text{vials}}) - V_{\text{MP}} [\mu\text{L}] ,$$

wobei n_{vials} = Anzahl der Vials und c_{MP} = Proteinkonzentration der eingesetzten Membranpräparation [$\mu\text{g}/\text{mL}$] ist.

Auswertung der GTP γ S-Experimente

Die Experimente werden mit den Programmen Excel[®] und PRISM[®] ausgewertet. Als erstes wird von dem Mittelwert der in Gegenwart von DMSO ermittelten Gesamtbindung der Mittelwert der in Gegenwart von GTP γ S ermittelten unspezifischen Bindung subtrahiert. Der Zahlenwert (cpm) dieser Differenz wird gleich 100 % und die unspezifische Bindung gleich 0 % gesetzt. Die in Gegenwart der Testsubstanz ermittelte spezifische Bindung, welche sich ebenfalls aus der Differenz von Gesamtbindung minus unspezifischer Bindung errechnet, wird auf diesen Basalwert (100 %) bezogen und gegen die Testsubstanz-Konzentration [M] aufgetragen.

7.6 Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation

Durch die Ultrazentrifugation eines Stoffgemisches auf einem Sucrosegradienten lassen sich einzelne Moleküle anhand ihrer Dichte und ihrer spezifischen Sedimentationsgeschwindigkeit voneinander trennen. Moleküle mit hoher Dichte werden dabei durch die Gravitationskraft weiter transportiert, als Moleküle mit niedrigerer Dichte. Die Technik der Dichtegradientenzentrifugation fand erstmals große Beachtung durch das Experiment von Meselson, Stahl und Vinograd, denen es gelang, die semikonservative Replikation der DNA zu beweisen³⁰⁴.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung der Uracil-Bindungsstellen aus Ratten-striatum-Gewebe angewendet. Alle Versuche wurden bei 0-4°C durchgeführt.

Mit einer Pasteur-Pipette werden in 5 ml-Ultrazentrifugationsröhrchen ein aus drei Konzentrationen bestehender Sucrosegradient aufgebaut. Zuunterst befinden sich 1,0 mL der 1,2 M Sucrose-Lösung (41,1 % w/v), auf die vorsichtig 1,5 mL der 1,0 M Sucrose-Lösung (34,2 % w/v) pipettiert werden. Abschließend folgen 1,5 mL einer 0,85 M Sucrose-Lösung (29,1 % w/v) w/v). Auf den fertigen Sucrosegradienten werden 800 µL einer Rattenhirn-Striatum-Membranfraktion aufgetragen. Es werden insgesamt zwei Röhrchen nach diesem Schichtungsschema präpariert. In **Abb. 7.10** ist das Schichtungsschema dargestellt.

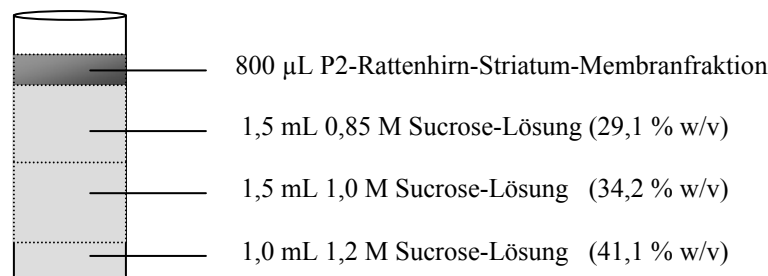


Abb. 7.10: Schichtungsschema des diskontinuierlichen Sucrosedichtegradienten zur Anreicherung des Uracil-bindenden Proteins aus Rattenhirn-Striatum-Membranpräparationen.

Sofort nach dem Aufbau des Gradienten erfolgt eine 100000 g-Ultrazentrifugation in einem Ausschwing-Rotor für 120 Minuten. Die verschiedenen Schichten werden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abpipettiert und die jeweils gleichen Schichten aus den beiden Röhrchen vereinigt. Es werden jeweils 30 mL 50 mM Tris-Puffer zu den Fraktionen hinzupipettiert und bei 12000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wird verworfen und der Zentrifugationsrückstand in 30 mL 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 resuspendiert und bei 48000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets in je 1 mL 50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Der gesamte Versuchsablauf ist in **Abb. 7.11** schematisch dargestellt.

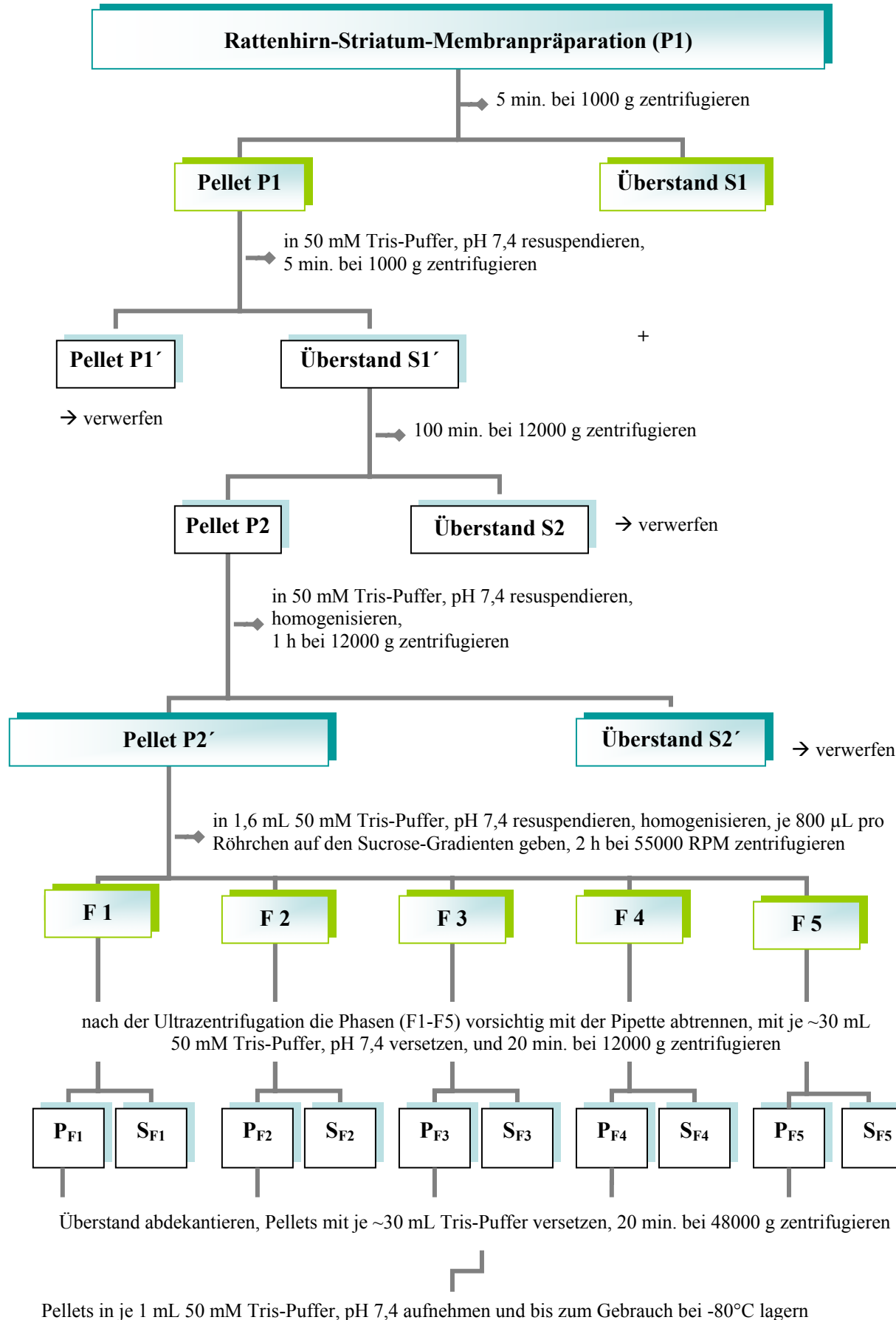


Abb. 7.11: Schema zur **Durchführung des Sucrose-Dichtegradienten**

7.7 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung der Proteine nach der Methode von Laemmli (1970) auf Polyacrylamidgelen verschiedener Konzentrationen (von 5-10 %) unter reduzierenden bzw. nichtreduzierenden Bedingungen. Für kleine SDS-Polyacrylamid-Gele (80 x 7,3 x 0,75 mm) wurde die Mini-Protean II (BioRad) eingesetzt. Die großen Gele (160 x 200 x 1,5 mm) wurden in der Protean II xi (BioRad) entwickelt.

Die Lösung für das **Trenngel** wird unmittelbar nach der Herstellung mit einer Spritze bis etwa 3 cm unterhalb des oberen Randes luftblasenfrei in die Gießapparatur gefüllt. Mit Isopropanol wird überschichtet und somit für eine glatte Oberfläche des Trenngels gesorgt. Nach Beendigung der Polymerisation – nach etwa 30 Minuten – wird das Isopropanol abgegossen und die restliche Flüssigkeit vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt, ohne das Gel zu berühren. Als nächstes wird die Lösung für das **Sammelgel** hergestellt und unmittelbar danach bis zur Oberkante der Platten eingefüllt, der Kamm vorsichtig in die Lösung gedrückt, und 30 Minuten polymerisieren gelassen. Vor der Auftragung der Proben wird das Pufferreservoir mit Laufpuffer gefüllt, die Platten mit dem Gel aus der Gießapparatur genommen und in den Halter der Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Die Kämmen werden entfernt, die Taschen mit Laufpuffer gewaschen und 10-30 µL Probensolubilisat durch Unterschichten in die Taschen aufgetragen. Als Marker wird der Proteinstandard Precision Plus Protein™ Standard Dual Color (BioRad) verwendet. Das innere Probenreservoir wird ebenfalls mit Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese gestartet. Die eingestellte Zeit und Stromstärke während der SDS-PAGE betragen für die kleinen Gele ca. 90 Minuten bei 25 mA. Die Elektrophorese wird gestoppt, wenn die violette „Bromphenolblau-Front“ aus dem Gel austritt.

Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgt durch Färbung mit **Coomassie-Brilliant Blau**. Dazu wird das Gel über Nacht in Färbelösung (0,252 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 45 % Methanol, 9 % Essigsäure) eingetaucht und anschließend in die Entfärbelösung (45 % Methanol, 9 % Essigsäure) überführt. Diese wird mehrmals erneuert, bis der Gelhintergrund klar wird. Die Aufbewahrung der gefärbten Gele erfolgt – falls erforderlich – in 9 %iger Essigsäure. Nach der Entwicklung werden die Elektropherogramme mit der Digitalkamera fotografiert oder mit dem Geldokumentationssystem bearbeitet.

Probenvorbereitung

Die Proben werden in einem denaturierenden, reduzierenden Lysispuffer (10 % Glycerin, 2 % SDS, 67 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % β-Mercaptoethanol, 0,01 % Bromphenolblau) resuspendiert und 5 Minuten bei 99°C im Thermomixer aufgeköcht. Je nach Größe des eingesetzten Kammes werden zwischen 10 und 30 µl des Solubilisats auf das Gel aufgetragen.

Tab. 7.13: Lösungen für die SDS-PAGE

Lösung	Herstellung
30 % Acrylamid/ Methyl- bisacrylamid-Lsg.	29 g Acrylamid + 1 g Methylbisacrylamid ad 100,0 mL Aqua dest.
1,0 M Tris-HCl, pH 8,8	12,1 g TRIZMA®-Base (Mr = 121 g/mol) ad 100,0 mL Aqua dest. (mit HCl auf pH 8,8 einstellen)
1,0 M Tris-HCl, pH 6,8	12,1 g TRIZMA®-Base (Mr = 121 g/mol) ad 100,0 mL Aqua dest. (mit HCl auf pH 6,8 einstellen)
10 % SDS-Lösung	10 g Natriumdodecylsulfat (Mr = 288,37 g/mol) ad 100,0 mL Aqua dest.
10 % APS-Lösung	10 g Ammoniumperoxodisulfat (Mr = 228,2 g/mol) ad 100,0 mL Aqua dest.
Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS)	3,0 g TRIZMA®-Base (Mr = 121 g/mol) + 14,4 g Glycin (Mr = 75 g/mol) + 1,0 g SDS (Mr = 288,37 g/mol) ad 1000,0 mL Aqua dest.
Probenpuffer (67 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % Glycerin, 2 % SDS, 0,01 % Bromphenol Blau, 1,7 % Mercaptoethanol)	Für <i>3fach</i> -Puffer: 10 mL der 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8 (s.o) + 15 g Glycerin (Mr = 92,09 g/mol) + 3,0 g SDS (Mr = 288,37 g/mol) + 0,015 g Bromphenolblau (Mr = 691,9 g/mol) ad 50,0 mL Aqua dest. <i>Frisch hinzusetzen:</i> Mercaptoethanol 50 µL + 3fach-Puffer ad 1,0 mL

Tab. 7.14: Herstellung der Gele für die SDS-PAGE (Minigele)

Lösungen	Trenngel 10 %, pH 8,8 (15 mL)	Trenngel 6 %, pH 8,8 (15 mL)	Sammelgel, pH 6,8 (8 mL)
Aqua dest.	5,9 ml	7,9 mL	5,5 mL
29 % Acrylamid/ 1 % Bisacrylamid	5,0 mL	3,0 mL	1,3 mL
1,0 M Tris-HCl, pH 8,8	3,8 mL	3,8 mL	-
1,0 M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	1,0 mL
10 %ige SDS-Lösung	0,15 mL	0,15 mL	0,08 mL
10 %ige APS-Lösung*	0,15 mL	0,15 mL	0,08 mL
TEMED	0,006 mL	0,012 mL	0,008 mL

***frisch hinzugeben!**

7.8 Isolierung und Aufreinigung der Uridin-Cytidin-Kinase

Das Enzym Uridin-Cytidin-Kinase wurde aus Kalbs-Thymus isoliert und mithilfe der Anionenaustausch-Chromatographie und der Gelchromatographie aufgereinigt. In **Abb. 7.12** sind alle durchgeführten Reinigungsschritte chronologisch aufgeführt. Die Durchführung der einzelnen Aufreinigungsschritte werden in den jeweiligen Abschnitten näher beschrieben.

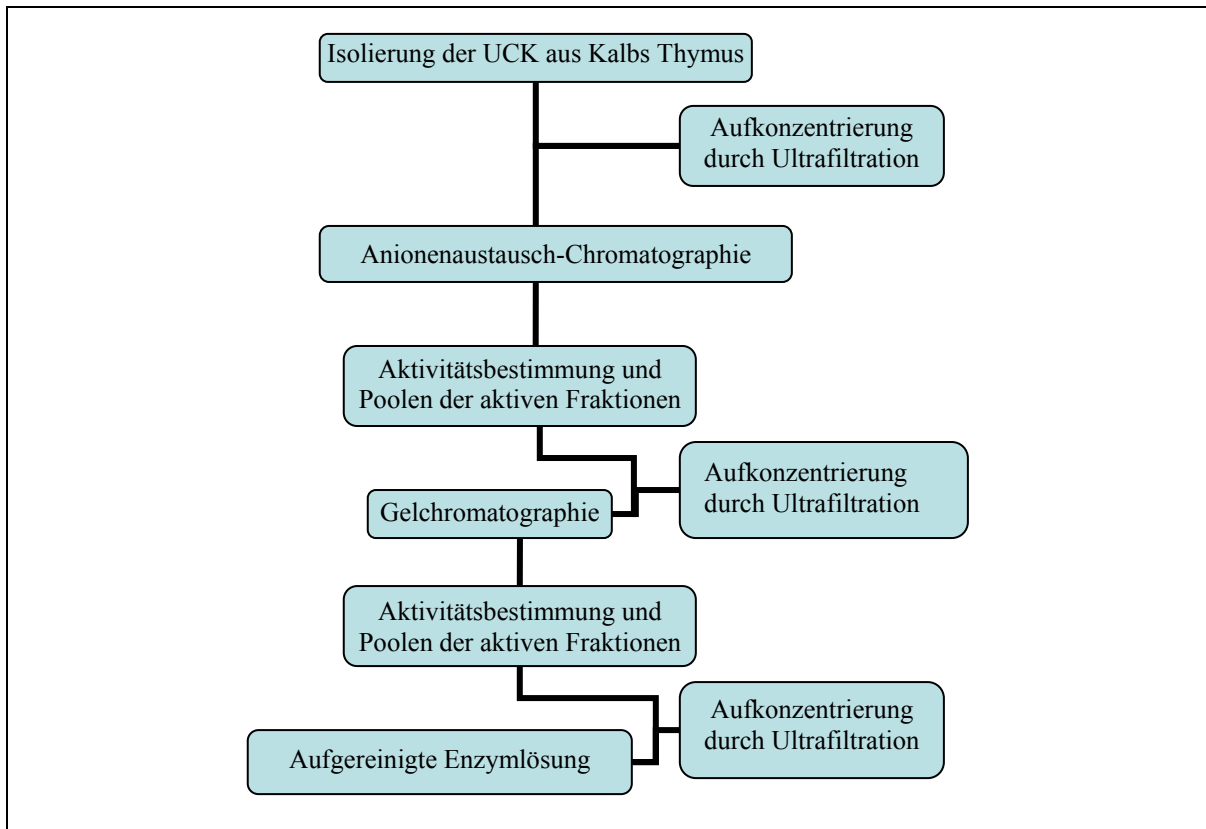


Abb. 7.12: Isolierung und Aufreinigung der Uridin-Cytidin Kinase

7.8.1 Isolierung der Uridin-Cytidin-Kinase

Die Isolierung wurde in Anlehnung an den Artikel von Lee et al.³¹⁸ durchgeführt. Während der gesamten Prozedur wurde bei einer Temperatur von 4°C gearbeitet.

Der gefrorene *Kalbs-Thymus* [664 g Naßgewicht] wird in kleine Stücke geschnitten, in 1000 mL einer 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 suspendiert und drei Minuten mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Um das Homogenat nicht zu erwärmen, wird das Gewebe stoßweise (mehrmals jeweils 20 Sekunden bei mittlerer Rotationsgeschwindigkeit der Scheren mit zwei Minuten Pause dazwischen) zerkleinert. Anschließend wird das Gewebehomogenat 30 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird durch vier Lagen von Gaze filtriert. Zu dem gesammelten Überstand werden 0,9 mL *2-Mercaptoethanol 14 M* hinzugefügt (*Fraktion 1*).

Zu 965 mL der Fraktion 1 werden 48,7 mL einer *10 %igen Streptomycinsulfat-Lösung pH 7,0* langsam in einer Zeitspanne von 10 Minuten unter Rühren hinzugefügt. Nach weiterem 15minütigem Rühren wird die Suspension 30 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wird weiter verarbeitet (*Fraktion 2*).

965 mL der Fraktion 2 werden mit 195 mL einer *2 %igen Protaminsulfat-Lösung, pH 7,0* unter Rühren in einer Zeitspanne von 10 Minuten versetzt. Nach weiterem 15minütigem Rühren wird 15 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem Protamin-Präzipitat werden 200 mL einer *2 %igen Ammoniumsulfat-Lösung* in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM 2-Mercaptoethanol enthaltend, zugesetzt und die Suspension 60 Minuten gerührt bis die Suspension milchig weiß wird. Anschließend wird 10 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand bildet die *Fraktion 3*.

Zu 200 mL der Fraktion 3 werden 31 g *Ammoniumsulfat* unter Rühren in einer Zeitspanne von 15 Minuten hinzugefügt und die Mischung für weitere 15 Minuten gerührt. Danach wird 10 Minuten bei 30.000 g zentrifugiert und das Präzipitat verworfen. Zu 200 mL des Überstandes werden 11,9 g Ammoniumsulfat über eine Zeitspanne von 10 Minuten hinzugefügt und nach weiterem 15minütigem Rühren wird 10 Minuten bei 30.000 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 20 mL einer *100 mM Tris-HCl, pH 7,5*, 10 mM 2-Mercaptoethanol enthaltend, gelöst und zur Aufbewahrung in den -20er Gefrierschrank gestellt (*Fraktion 4*).

7.8.2 Ultrafiltration

Filtereinheiten:

Centricon® YM-30, 30000 MW cut-off, Centrifugal Filter Devices; MILLIPORE
Amicon®Ultra 10,000 MWCO, Centrifugal Filter Devices, MILLIPORE

Die eingefrorene Enzymlösung (ca. 25 mL, siehe Abschnitt 7.8.1) wird auf 4°C aufgetaut. Die Hälfte des Volumens wird auf sechs Centricon Filtereinheiten gleichmäßig verteilt und drei Stunden bei 4°C und 4.000 g und Bremsung 4 zentrifugiert. Der sich bildende weiße Überstand wird abgetrennt und es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt von zwei Stunden. Danach wird mit je 400 µL Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM 2-Mercaptoethanol) pro Filtereinheit gewaschen. Nach Abnahme und Vereinigung der Filtrate werden die Filtereinheiten zwecks Überführung des Protein-Pellets in das „Auffang-Vial“ umgedreht und drei Minuten bei 1.000 g, 4°C, Bremsung 4 zentrifugiert. Dann werden je 400 µL Puffer hinzugefügt und nochmals drei Minuten zentrifugiert. Schließlich werden alle Enzymlösungen aus den Filtereinheiten vereinigt. Die gleiche Prozedur wird mit der restlichen Enzymsuspension durchgeführt und schließlich wird die gesamte Enzymlösung zu einem Endvolumen von ca. 10 mL vereinigt. Im nächsten Schritt wird die Enzymlösung mit der Anionenaustausch-Chromatographie weiter aufgereinigt (siehe Abschnitt 7.8.3).

Nach der Ionenaustausch-Chromatographie wird erneut die Methode der Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung angewendet. Nach Vereinigung der Fraktionen mit nachweisbarer Enzymaktivität wird die Enzymlösung (30 mL) auf zwei Amicon-Filtereinheiten verteilt und zweieinhalb Stunden bei 4.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Enzymlösung wird auf diesem Wege auf ein Volumen von insgesamt ca. 2,5 mL aufkonzentriert, wobei die Lösung daraufhin eine leichte Trübung zeigt. Diese Enzymsuspension wird auf drei Eppendorffreaktionsgefäße verteilt (je 800 µL) und 1 h bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird von dem kleinen Pellet durch Abpipettieren getrennt und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert, wonach keine weitere Pelletierung mehr beobachtet werden kann. Die klare Enzymlösung wird im nächsten Schritt mittels Gelchromatographie weiter aufgereinigt.

7.8.3 Anionenaustausch-Chromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde ein *GradiFrac™ System* (Abb. 7.13) der Firma Amersham Pharmacia Biotech (später Amersham Biosciences) verwendet.

Das System besteht aus folgenden Einzelbausteinen:

Kontrolleinheit	GradiFrac zur Programmierung und Fraktionssammlung
Pumpe	Hiload pump P-50
UV-Detektor	Monitor UV-1
Schreiber	Recorder REC 102

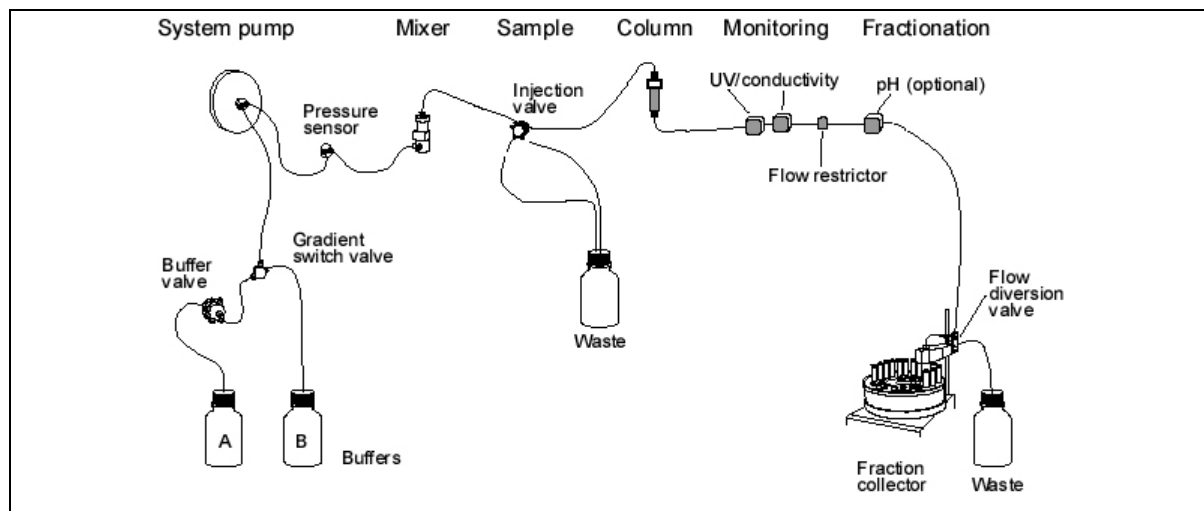


Abb. 7.13: Schematischer Aufbau einer FPLC-Anlage³⁸¹

Für die Chromatographie wurden folgende Parameter bei dem GradiFrac™ System eingestellt:

Method base	volume
Pump calib.value	1582
Mix vol	60 µL
Delay UV to frac	200 µL
Flow	0,5 mL/ min
Fractn	4 mL
Gradient	Target 100 % B after 300 mL

Als Säulenmatrix wurde *DEAE Cellulose* (SIGMA) und als Elutionspuffer folgende Puffer verwendet:

Puffer A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5
20 mM 2-Mercaptoethanol
20 % Glycerol

Puffer B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5/1,0 M KCl
20 mM 2-Mercaptoethanol
20 % Glycerol

Regenerierung der DEAE-Cellulose³⁸²:

10 g DEAE-Cellulose (40 mL Volumen im Meßzylinder) werden in 200 mL reinem Wasser suspendiert und 45 Minuten absitzen gelassen. Das abgesetzte Volumen des Ionenaustauscherharzes wird abgemessen. Dieses Volumen stellt das sogenannte Säulenvolumen SV (column volume [CV]) dar (= 90 mL). Die Suspension wird in einem Büchner-Trichter mit einem Druck von ca. 800 mbar abfiltriert. Das Harz wird in 180 mL (2 SV) 0,1 M NaOH/0,5 M NaCl 10 Minuten lang suspendiert. Die Suspension wird danach in einen Büchner-Trichter gegeben und langsam mit einem Druck von ca. 800 mbar abfiltriert. Das Ionenaustauscherharz wird mit weiteren 180 mL 0,1 M NaOH/ 0,5 M NaCl gewaschen. Als nächstes wird das Harz in 2 SV (180 mL) 0,5 M NaCl suspendiert und in einem Büchner-Trichter wie oben beschrieben abfiltriert. Die Matrix wird mit weiteren 180 mL 0,5 M NaCl gewaschen. Dieselbe Prozedur wird mit 0,1 M HCl/0,5 M NaCl wiederholt und ein weiteres mal mit reinem Wasser durchgeführt. Das Harz wird mit weiteren 500 mL reinem Wasser gewaschen und der pH-Wert des Filtrats gemessen, wobei das Filtrat einen pH-Wert von 6 aufweist. Das Ionenaustauscherharz wird in 180 mL 1 M NaCl suspendiert und nach Einstellung des pH-Wertes auf 8 (mit NaOH) mit dem Büchner-Trichter filtriert und mit 450 mL reinem Wasser gewaschen. Das Harz wird in 180 mL 10fach-Puffer (500 mM Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM 2-Mercaptoethanol, 20 % Glycerol) resuspendiert und abfiltriert. Dann wird das Harz in 450 mL 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5, 20 mM 2-Mercaptoethanol, 20 % Glycerol suspendiert und abfiltriert. Als nächstes wird das Harz in 180 mL Puffer resuspendiert. Eine kleine Menge der Suspension wird abfiltriert und es wird überprüft, ob das Filtrat einen pH-Wert von $\pm 0,15$ des pH-Wertes des Puffers aufweist. Das regenerierte Ionenaustauscherharz wird nun in die Säule gepackt und die Chromatographie begonnen.

Entwicklung der Anionenaustausch-Chromatographie:

Die vorbereitete Matrix (DEAE-Cellulose) wird in eine XK26/16-Säule gepackt und mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5, 20 mM 2-Mercaptoethanol, 20 % Glycerol equilibriert. Das zuvor mittels Ultrafiltration aufkonzentrierte Enzym (gelöst in einer 100 mM Tris-Puffer, pH 7,5, 10 mM 2-Mercaptoethanol enthaltend, siehe dazu Abschnitt 7.8.2) wird auf die Säule gegeben und die Chromatographie durch Gradientenelution mit steigenden KCl-Ionenkonzentration bei einer Flussrate von 0,5 mL pro Minute entwickelt. Fraktionen von 4,0 mL werden gesammelt. Die Fraktionen werden auf die Enzymaktivität hin untersucht, die „aktiven Fraktionen“ vereinigt und nach Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration gel-chromatographisch weiter aufgereinigt.

7.8.4 Größenausschlußchromatographie

Für die Gelchromatographie wurde im Rahmen dieser Arbeit eine **Superose 12 HR 10/30-Säule** (Amersham Biosciences) verwendet. Diese Säule eignet sich für einen Molekulargewichtsbereich von 1.000-300.000 Dalton.

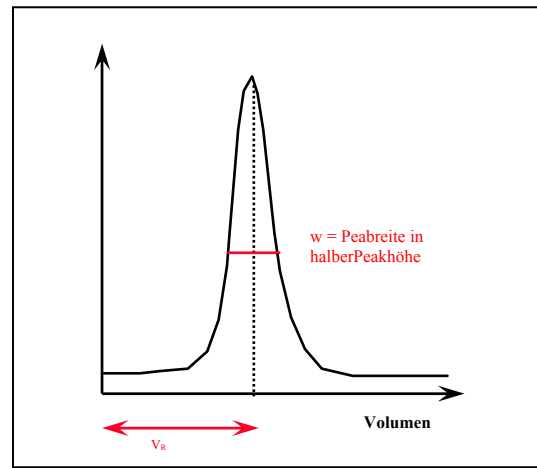
Zunächst wird die Säule mit 50 mL Wasser gespült. Danach wird der **Aceton-Funktions-test**³⁸³ durchgeführt: 100 µL Aceton p.a. (5 mg/mL) werden auf die Säule gegeben und mit reinem Wasser eluiert. Die Effizienz der Säule, angegeben als **Anzahl theoretischer Trennstufen pro Meter (H^{-1})**, wird nach der folgenden Gleichung bestimmt:

$$H^{-1} = 5,54 \times (V_R/wh)^2 \times (1000/L),$$

wobei **L** die Säulenlänge (mm),

V_R das Retentions- bzw. Elutions-Volumen und **wh** die Peakbreite in halber Höhe (mL) ist.

Die Anzahl der theoretischen Trennstufen pro Meter sollte mehr als 30.000 betragen.



Das in vorangegangenen Reinigungsschritten bearbeitete Enzym (siehe Abschnitte 7.8.2 und 7.8.3) wird auf eine Superose 12 HR 10/30-Säule (Amersham Biosciences) gegeben, welche vorher mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5, 20 mM 2-Mercaptoethanol, 20 % Glycerol equilibriert wurde. Die Säule wird mit demselben Puffer bei einer Flußrate von 30 mL pro Stunde eluiert. Die Fraktionen (7,5 mL) werden in 15 Minuten-Intervallen gesammelt. Die Fraktionen werden auf die Enzymaktivität hin untersucht und die drei Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität werden gepoolt. Die vereinigte Lösung (9 mL) wird in eine Amicon-Filtereinheit überführt und durch 16minütiges Zentrifugieren bei 4.000 g und 4°C auf **3,5 mL** aufkonzentriert. Die gereinigte und aufkonzentrierte Enzymlösung wird in zwei Falcon-Gefäße überführt (3 mL und 0,5 mL) und bei -25°C tiefgefroren. Einige Tage später werden die 3 mL in Eppendorf-Gefäße zu je 100 µL aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

7.9 Radioassay zur Aktivitätsbestimmung der Uridin-Cytidin-Kinase

Die Enzymaktivität wird mithilfe eines Radioassays bestimmt, bei der die ATP-abhängige Umsetzung von radioaktiv markiertem Uridin zu Uridinmonophosphat bestimmt wird. Das umgesetzte [^3H]UMP wird anschließend mit Lanthanchlorid ausgefällt. Die Reaktionsmischung (100 μL) für die Aktivitätsbestimmung von Uridin-Cytidin-Kinase enthält 50 mM Tris, pH 7,4, 10 μM [^3H]Uridin mit einer spezifischen Aktivität von 250 mCi/mmol, 2 mM ATP, 2,5 mM MgCl_2 und 10 mM 2-Mercaptoethanol. Die Reaktion wird durch Zusatz von 10 μL Uridin-Cytidin-Kinase (20 μg Protein) gestartet und das Reaktionsgemisch 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wird das Reaktionsgemisch ohne das Enzym inkubiert und wie nachstehend beschrieben weiterverarbeitet. Nach der Inkubationszeit wird 1 mL kalte 0,1 M LaCl_3 -Lösung hinzugefügt, um die Reaktion abzustoppen. Die Suspension wird etwa eine Stunde unter Eiskühlung inkubiert und anschließend über Nitrocellulosefilter (Absaugtopf) filtriert und mit insgesamt 25 mL eiskaltem Wasser gewaschen. Dadurch werden das mit Lanthanchlorid ausgefällte [^3H]UMP und das nicht präzipitierte [^3H]Uridin voneinander getrennt. Die Filter werden in 4 mL Szintillationsvials überführt und mit je 2,5 mL Ultima-Gold-Szintillations-Cocktail versetzt. Die Proben werden 9 Stunden präinkubiert und danach je eine Minute im LSC-Counter gezählt. Es werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

7.9.1 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m , welche einen Hinweis auf die Affinität des Substrates (geringe K_m -Werte kennzeichnen eine hohe Affinität) gibt, wird das Enzym mit steigenden Substrat-, also Radioligand-Konzentrationen, inkubiert. Zunächst wird eine Radioligand-Verdünnungsreihe von acht verschiedenen Konzentrationen (1 nM-100 μM) hergestellt. 80 μL Inkubationspuffer (50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 2 mM ATP, 2,5 mM MgCl_2 und 10 mM 2-Mercaptoethanol) werden vorgelegt und mit 10 μL [^3H]Uridin in der jeweiligen Konzentration versetzt. Im Abstand von 30 Sekunden werden 10 μL Enzym-Lösung hinzupipettiert und damit die Reaktion gestartet. Die Reaktionsansätze werden jeweils 30 Minuten bei 37°C inkubiert und dann zum Stoppen der Reaktion mit 1,0 mL einer kalten 0,1 M-Lanthanchlorid-Lösung versetzt. Das Gemisch wird etwa eine Stunde auf Eis gelagert und anschließend über Nitrocellulosefilter filtriert. Die Filter werden mit 20-25 mL kaltem Wasser gewaschen und anschließend wie oben beschrieben im LSC-Counter gezählt.

7.9.2 Steady-State-Phase

Bei den kinetischen Experimenten wird die Uridin-Cytidin-Kinase in einer Proteinkonzentration von 80 µg Protein pro Reaktionsansatz mit dem Substrat ($[^3\text{H}]$ Uridin, 10 µM) 10 Minuten bis 240 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgt analog wie oben bereits beschrieben.

7.9.3 Erniedrigung der spezifischen Aktivität von $[^3\text{H}]$ Uridin

Da bei dem Enzymassay eine hohe Substratkonzentration benötigt wird, muß die spezifische Bindung des gekauften Radioliganden erniedrigt werden, um erstens einen immensen Verbrauch an Radioligand zu vermeiden und zweitens keine zu hohen Counts zu erhalten. Eine Erniedrigung der spezifische Aktivität eines kommerziell erworbenen Radioliganden kann erreicht werden, indem der Radioligand mit einer berechneten Menge an Kaltligand, also derselben, aber unmarkierten Substanz verstreckt wird. Die benötigte Menge W [mg] an Kaltsubstanz, welche zu der Radioligand-Lösung hinzugegeben werden muß, um eine bestimmte, niedrigere spezifische Aktivität zu erreichen, wird nach der folgenden Gleichung³⁸⁴ berechnet:

$$W = M \cdot a [1/A' - 1/A]$$

wobei

M das Molekulargewicht der Substanz [mg/mmol],

a die Gesamtaktivität (in GBq, mCi) der entnommenen Menge an RL,

A die mol. spezifische Aktivität (in GBq/mmol, mCi/mmol) der gekauften RL-Lösung und

A' die mol. spezifische Aktivität (in GBq/ mmol, mCi/ mmol) der 'verdünnten' RL-Lösung ist.

Zur Erniedrigung der spezifischen Aktivität von $[^3\text{H}]$ Uridin (125 µL) von 39,0 Ci/mmol auf 250 mCi/mmol, ergibt das Einsetzen der Variablen in die obige Formel eine Uridin-Menge von 0,12 mg:

$$W = 244 \text{ mg/mmol} \times 0,125 \text{ mCi} [1/250 \text{ mCi/mmol} - 1/ 39000 \text{ mCi/mmol}] = \mathbf{0,12 \text{ mg}}$$

Da diese Menge zu klein ist, um sie verlässlich abzuwiegen, wird eine Stocklösung (10 mg/mL in reinem Wasser) des Kaltliganden hergestellt, die Lösung durch eine Membranfilter (0,22 µm Durchmesser) gegeben und 12,1 µL (0,12 mg) dieser Lösung zu 125 µL $[^3\text{H}]$ Uridin-Lösung hinzupipettiert. Durch Zugabe der 12,1 µL erhöht sich bei gleich bleibender Gesamtradioaktivität das Volumen der Radioligand-Lösung, was zu einer Erniedrigung der Radioaktivkonzentration von 1,0 mCi/mL auf 0,9 mCi/mL führt. Dies wird später bei der Herstellung der RL-Lösungen für den Einsatz im Enzym-Assay berücksichtigt.

Literaturverzeichnis

-
- 1 Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* **1953**, *171*, 738-739.
 - 2 Bentley, S. D. et al. Complete Genome Sequence of the Model Actinomycete *Streptomyces Coelicolor* A3 (2). *Nature* **2002**, *417*, 141-147.
 - 3 Sasaki, T. The Genome Sequence and Structure of Rice Chromosome 1. *Nature* **2002**, *420*, 312-316.
 - 4 Lander, E. S. et al. Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
 - 5 Venter, J. C. The Sequence of the Human Genome. *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
 - 6 Gygi, S. P.; Rochon, Y.; Franza, B. R.; Aebersold, R. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 1720-1730.
 - 7 Wilkins, M. R.; Pasquali, C.; Appel, R. D.; Ou, K.; Golaz, O.; Sanchez, J. C.; Yan, J. X.; Gooley, A.; Hughes, G.; Humphery-Smith, I.; Williams, K. L.; Hochstrasser, D. F. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Biotechnology (NY)* **1996**, *14*, 61-65.
 - 8 Wise, A.; Jupe, S. C.; Rees, S. The Identification of Ligands at Orphan G-protein Coupled Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44*, 43-66. Review.
 - 9 Jones, M. E. Pyrimidine Nucleotide Biosynthesis in Animals: Genes, Enzymes, and Regulation of UMP Biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 253-279.
 - 10 Mihana, M. D.; Portoles, M.; Jorda, A.; Grisolia, S. Lesch-Nyhan Syndrome, Caffeine Model: Increase of Purine and Pyrimidine Enzymes in Rat Brain. *J. Neurochem.* **1984**, *43*, 1556-1560.
 - 11 Denis-Duphil, M. Pyrimidine Biosynthesis in *Saccharomyces Cerevisiae*: the Ura2 Cluster Gene, its Multifunctional Enzyme Product, and other Structural or Regulatory Genes Involved in de novo UMP synthesis. *Biochem. Cell. Biol.* **1989**, *67*, 612-631. Review.
 - 12 Mori, M.; Tatibana, M. Dissociation by Elastase Digestion of Enzyme Complex Catalyzing the Initial Steps of Pyrimidine Biosynthesis in Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *54*, 1525-1531.
 - 13 Mori, M.; Tatibana, M. Purification of Homogeneous Glutamine-dependent Carbamyl Phosphate Synthetase from Ascites Hepatoma Cells as a Complex with Aspartate Transcarbamylase and Dihydroorotase. *J. Biochem. (Tokyo)* **1975**, *78*, 239-242.
 - 14 Mori, M.; Ishida, H.; Tatibana, M. Aggregation States and Catalytic Properties of the Multienzyme Complex Catalyzing the Initial Steps of Pyrimidine Biosynthesis in Rat Liver. *Biochemistry* **1975**, *14*, 2622-2630.
 - 15 Coleman, P. F.; Suttle, D. P.; Stark, G. R. Purification from Hamster Cells of the Multifunctional Protein that Initiates de novo Synthesis of Pyrimidine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 6379-6385.
 - 16 Mori, M.; Tatibana, M. A Multi-enzyme Complex of Carbamoyl-phosphate Synthase (Glutamine): Aspartate Carbamoyltransferase: Dihydroorotase (Rat Ascites Hepatoma Cells and Rat Liver). *Methods. Enzymol.* **1978**, *51*, 111-120.
 - 17 Mori, M.; Tatibana, M. Multi-enzyme Complex of Glutamine-dependent Carbamoyl-phosphate Synthetase with Aspartate Carbamoyltransferase and Dihydroorotase from Rat Ascites-hepatoma Cells. Purification, Molecular Properties and Limited Proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *86*, 381-388.
 - 18 Sungman, C. Development of Inhibitors of Pyrimidine Metabolism. *Yonsei. Medical. Journal* **1989**, *30*, 315-326.

-
- 19 Tatibana, M.; Ito, K. Control of Pyrimidine Biosynthesis in Mammalian Tissues. I. Partial Purification and Characterization of Glutamine-utilizing Carbamyl Phosphate Synthetase of Mouse Spleen and its Tissue Distribution. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 5403-5413.
 - 20 Tatibana, M.; Shigesada, K. Control of Pyrimidine Biosynthesis in Mammalian Tissues. V. Regulation of Glutamine-dependent Carbamyl Phosphate Synthetase: Activation by 5-Phosphoribosyl 1 Pyrophosphate and Inhibition by Uridine Triphosphate. *J. Biochem. (Tokyo)* **1972**, *72*, 549-560.
 - 21 Carrey, E. A.; Campbell, D. G.; Hardie, D. G. Phosphorylation and Activation of Hamster Carbamyl Phosphate Synthetase II by cAMP-dependent Protein Kinase. A Novel Mechanism for Regulation of Pyrimidine Nucleotide Biosynthesis. *EMBO J.* **1985**, *4*, 3735-3742.
 - 22 Graves, L. M.; Guy, H. I.; Kozlowski, P.; Huang, M.; Lazarowski, E.; Pope, R. M.; Collins, M.A.; Dahlstrand, E. N.; Earp, H. S. 3rd, Evans, D. R. Regulation of Carbamoyl Phosphate Synthetase by MAP Kinase. *Nature* **2000**, *403*, 328-332.
 - 23 Sigoillot, F. D.; Evans, D. R.; Guy, H. I. Growth-dependent Regulation of Mammalian Pyrimidine Biosynthesis by the Protein Kinase A and MAPK Signaling Cascades. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15745-15751.
 - 24 Hoogenraad, N. J. Reaction Mechanism of Aspartate Transcarbamylase from Mouse Spleen. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *161*, 76-82.
 - 25 Swyrd, E. A.; Seaver, S. S.; Stark, G. R. N-(Phosphonacetyl)-L-Aspartate, a Potent Transition State Analog Inhibitor of Aspartate Transcarbamylase, Blocks Proliferation of Mammalian Cells in Culture. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 6946-6950.
 - 26 Moyer, J. D.; Malinowski, N.; Ayers, O. Salvage of Circulating Pyrimidine Nucleosides by Tissues of the Mouse. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2812-2818.
 - 27 Moyer, J. D.; Henderson, J. F. Salvage of Uridine in the Mouse. Effect of Uridine Phosphorylase Pre-treatment. *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 101-105.
 - 28 Peters, G. J.; Veerkamp, J. H. Purine and Pyrimidine Metabolism in Peripheral Blood Lymphocytes. *Int. J. Biochem.* **1983**, *15*, 115-123. Review.
 - 29 Connolly, G. P.; Duley, J. A. Uridine and its Nucleotides: Biological Actions, Therapeutic Potentials. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 218-225. Review.
 - 30 Brunngraber, E. F.; Chargaff, E. Purification and Properties of a Nucleoside Phosphotransferase from Carrot. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 4834-4840.
 - 31 Brunngraber, E. F.; Chargaff, E. Transferase from *Escherichia coli* Effecting Low-energy Phosphate Transfer to Nucleosides and Nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1970**, *67*, 107-112.
 - 32 Ayengar, P.; Gibson, D. M.; Sanadi, D. R. Transphosphorylations between Nucleoside Phosphates. *Biochim. Biophys. Acta.* **1956**, *21*, 86-91.
 - 33 Lieberman, I.; Kornberg, A.; Simms, E. S. Enzymatic Synthesis of Nucleoside Diphosphates and Triphosphates. *J. Biol. Chem.* **1955**, *215*, 429-440.
 - 34 Van Rompay, A. R.; Johansson, M.; Karlsson, A. Phosphorylation of Deoxycytidine Analog Monophosphates by UMP-CMP Kinase: Molecular Characterization of the Human Enzyme. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 562-569.
 - 35 Berg, P.; Joklik, W. K. Transphosphorylation between Nucleoside Polyphosphates. *Nature* **1953**, *172*, 1008-1009.
 - 36 Berg, P.; Joklik, W. K. Enzymatic Phosphorylation of Nucleoside Diphosphates. *J. Biol. Chem.* **1954**, *210*, 657-672.

-
- 37 Nakamura, H.; Sugino, Y. Metabolism of Deoxyribonucleotides. 3. Purification and some Properties of Nucleoside Diphosphokinase of Calf Thymus. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 4917-4922.
- 38 Gotto, A. M.; Belkhole, M. L.; Touster, O. Stimulatory Effects of Inosine and Deoxyinosine on the Incorporation of Uracil-2-14-C, 5-Fluorouracil-2-14-C, and 5-Bromouracil-2-14-C into Nucleic Acids by Ehrlich Ascites Tumor Cells in Vitro. *Cancer Res.* **1969**, *29*, 807-811.
- 39 Itzhaki, S. Regulation of Uracil Utilization for RNA Synthesis in Ehrlich Ascites Tumour Cells by Glucose Metabolism. *Life Sci. II.* **1972**, *11*, 649-655.
- 40 Grenson, M. The Utilization of Exogenous Pyrimidines and the Recycling of uridine-5'-phosphate Derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, as Studied by Means of Mutants Affected in Pyrimidine Uptake and Metabolism. *Eur. J. Biochem.* **1969**, *11*, 249-260.
- 41 Krenitsky, T. A.; Barclay, M.; Jacquez, J. A. Specificity of Mouse Uridine Phosphorylase. Chromatography, Purification, and Properties. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 805-812.
- 42 Pontis, H.; Degerstedt, G.; Reichard, P. Uridine and Deoxyuridine Phosphorylases from Ehrlich Ascites Tumor. *Biochim. Biophys. Acta.* **1961**, *51*, 138-147.
- 43 Niedzwicki, J. G.; el Kouni, M. H.; Chu, S. H.; Cha, S. Structure-activity Relationship of Ligands of the Pyrimidine Nucleoside Phosphorylases. *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 399-415.
- 44 Ishitsuka, H.; Miwa, M.; Takemoto, K.; Fukuoka, K.; Itoga, A.; Maruyama, H. B. Role of Uridine Phosphorylase for Antitumor Activity of 5'-Deoxy-5-fluorouridine. *Gann.* **1980**, *71*, 112-123.
- 45 Birnie, G. D.; Kroeger, H.; Heidelberger, C. Studies of Fluorinated Pyrimidines. XVIII The degradation of 5-Fluoro-2'-Desoxyuridine and related compounds by Nucleoside Phosphorylase. *Biochemistry* **1963**, *2*, 566-572.
- 46 Prusoff, W. H. A review of some aspects of 5-Iododeoxyuridine and Azauridine. *Cancer Res.* **1963**, *23*, 1246-1259.
- 47 Zimmerman, M.; Seidenberg, G. J. Deoxyribosyl Transfer I. Thymidine Phosphorylase and Nucleoside Deoxyribosyltransferase in Normal and Malignant Tissues. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2618-2621.
- 48 Kono, A.; Hara, Y.; Sugata, S.; Karube, Y.; Matsushima, Y.; Ishitsuka, H. Activation of 5'-Deoxy-5-fluorouridine by Thymidine Phosphorylase in Human Tumors. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1983**, *31*, 175-178.
- 49 Kono, A.; Hara, Y.; Sugata, S.; Matsushima, Y.; Ueda, T. Substrate Specificity of a Thymidine Phosphorylase in Human Liver Tumor. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1984**, *32*, 1919-1921.
- 50 Wang, T. P.; Sable, H. Z.; Lampen, J. O. Enzymatic Deamination of Cytosine Nucleosides. *J. Biol. Chem.* **1950**, *184*, 17-28.
- 51 Durham, J. P.; Ives, D. H. Deoxycytidine Kinase. II. Purification and General Properties of the Calf Thymus Enzyme. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 2276-2284.
- 52 Cohen, S. S. Studies on Controlling Mechanisms in the Metabolism of Virus-infected Bacteria. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **1953**, *18*, 221-235.
- 53 Wondrack, L. M.; Hsu, C. A.; Abbott, M. T. Thymine 7-Hydroxylase and Pyrimidine Deoxyribonucleoside 2'-hydroxylase Activities in *Rhodotorula glutinis*. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6511-6515.
- 54 Stubbe, J. Identification of Two Alpha-ketoglutarate-dependent Dioxygenases in Extracts of *Rhodotorula glutinis* Catalyzing Deoxyuridine Hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 9972-9975.
- 55 Canellakis, E. S. Pyrimidine Metabolism. II. Enzymatic Pathways of Uracil Anabolism. *J. Biol. Chem.* **1957**, *227*, 329-338.

-
- 56 Canellakis, E. S. Pyrimidine Metabolism. III. The Interaction of the Catabolic and Anabolic Pathways of Uracil Metabolism. *J. Biol. Chem.* **1957**, *227*, 701-709.
- 57 Canellakis, E. S.; Jaffe, J. J.; Mantsavinos, R.; Krakow, J. S. Pyrimidine Metabolism. IV. A Comparison of Normal and Regenerating rat Liver. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 2096-2099.
- 58 Ogawa, J.; Shimizu, S. Beta-ureidopropionase with N-Carbamoyl-alpha-L-amino Acid Amidohydrolyase Activity from an Aerobic Bacterium, *Pseudomonas putida* IFO 12996. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *223*, 625-630.
- 59 Fink, R. M.; McGaughey, C.; Cline, R. E.; Fink, K. Metabolism of Intermediate Pyrimidine Reduction Products in vitro. *J. Biol. Chem.* **1956**, *218*, 1-7.
- 60 Canellakis, E. S. Pyrimidine Metabolism. I. Enzymatic Pathways of Uracil and Thymine Degradation. *J. Biol. Chem.* **1956**, *221*, 315-322.
- 61 Fritzson, P.; Pihl, A. The Catabolism of C14-labeled Uracil, Dihydrouracil, and Beta-ureido-propionic Acid in the Intact Rat. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 229-235.
- 62 Kanehisa, M. The KEGG Database. *Novartis Found Symp.* **2002**, *247*, 91-101; discussion 101-113, 119-128, 244-252. Review.
- 63 Fritzson, P. Properties and Assay of Dihydrouracil Dehydrogenase of rat Liver. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 719-725.
- 64 Shiotani, T.; Weber, G. Purification and Properties of Dihydrothymine dehydrogenase from Rat Liver. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 219-224.
- 65 Campbell, L. L. Jr. Reductive Degradation of Pyrimidines. III. Purification and Properties of Dihydrouracil Dehydrogenase. *J. Bio. Chem.* **1957**, *227*, 693-700.
- 66 Wasternack, C.; Lippmann, G.; Reinbotte, H. Pyrimidine-degrading Enzymes. Purification and Properties of Beta-ureidopropionase of *Euglena Gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1979**, *570*, 341-351.
- 67 Hayaishi, O.; Kornberg, A. Metabolism of Cytosine, Thymine, Uracil, and Barbituric Acid by Bacterial Enzymes. *J. Biol. Chem.* **1952**, *197*, 717-732.
- 68 Wang, T. P.; Lampen, J. O. Uracil Oxidase and the Isolation of Barbituric Acid from Uracil Oxidation. *J. Biol. Chem.* **1952**, *194*, 785-791.
- 69 Biggs, H. G.; Doumas, B. Oxidative catabolisms of thymine. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 2470-2473.
- 70 Lara, F. J. On the Decomposition of Pyrimidines by Bacteria. I. Studies by Means of the Technique of Simultaneous Adaptation. *J. Bacteriol.* **1952**, *64*, 271-277.
- 71 Lara, F. J. On the Decomposition of Pyrimidines by Bacteria. II. Studies with Cell-free Enzyme Preparations. *J. Bacteriol.* **1952**, *64*, 279-285.
- 72 Caren, R.; Morton, M. E. Pyrimidine Metabolism in Diabetes Mellitus Studied with N15 Labeled Uracil. *Am. J. Med. Sci.* **1954**, *227*, 141-148.
- 73 Caren, R.; Morton, M. E. Pyrimidine Metabolism in Normal Man Studied with N15 Labeled Uracil. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1953**, *13*, 1021-1029.
- 74 Rutman, R. J.; Cantarow, A.; Paschkis, K. E. The Catabolism of Uracil in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* **1954**, *210*, 321-329.

-
- 75 Hyde, R. J.; Cass, C. E.; Young, J. D.; Baldwin, S. A. The ENT Family of Eukaryote Nucleoside and Nucleobase Transporters: Recent Advances in the Investigation of Structure/Function Relationships and the Identification of Novel Isoforms. *Mol. Membr. Biol.* **2001**, *18*, 53-63. Review.
- 76 Griffiths, M.; Yao, S. Y.; Abidi, F.; Phillips, S. E. V.; Cass, C. E.; Young, J. D.; Baldwin, S. A. Molecular Cloning and Characterization of a Nitrobenzylthioinosine-sensitive (*ei*) Equilibrative Nucleoside Transporter from Human Placenta. *Biochem. J.* **1997**, *328*, 739-743.
- 77 Yao, S. Y.; Ng, A. M.; Muzyka, W. R.; Griffiths, M.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A.; Young, J. D. Molecular Cloning and Functional Characterization of Nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (*es*) and NBMPR-insensitive (*ei*) Equilibrative Nucleoside Transporter Proteins (rENT1 and rENT2) from Rat Tissues. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28423-28430.
- 78 Plagemann, P. G.; Wohlhueter, R. M.; Woffendin, C. Nucleoside and Nucleobase Transport in animal Cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1988**, *947*, 405-443.
- 79 Jarvis, S. M.; Williams, T. C.; Lee, C. W.; Cheeseman, C. I. Active Transport of Nucleosides and Nucleoside Drugs. *Biochem. Soc. Trans.* **1989**, *17*, 448-450.
- 80 Skou, J. C. The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves. *Biochim. Biophys. Acta.* **1957**, *23*, 394-401.
- 81 Baldwin, S. A.; Mackey, J. R.; Cass, C. E.; Young, J. D. Nucleoside Transporters: Molecular Biology and Implications for Therapeutic Development. *Mol. Med. Today* **1999**, *5*, 216-224. Review.
- 82 Ritzel, M. W.; Ng, A. M.; Yao, S. Y.; Graham, K.; Loewen, S. K.; Smith, K. M.; Ritzel, R. G.; Mowles, D. A.; Carpenter, P.; Chen, X. Z.; Karpinski, E.; Hyde, R. J.; Baldwin, S. A.; Cass, C. E.; Young, J. D. Molecular Identification and Characterization of Novel Human and Mouse Concentrative Na⁺-nucleoside Cotransporter Proteins (hCNT3 and mCNT3) Broadly Selective for Purine and Pyrimidine Nucleosides (system *cib*). *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2914-2927.
- 83 Vijayalakshmi, D.; Belt, J. A. Sodium-dependent Nucleoside Transport in Mouse Intestinal Epithelial Cells. Two Transport Systems with Differing Substrate Specificities. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 19419-19423.
- 84 Williams, T. C.; Doherty, A. J.; Griffith, D. A.; Jarvis, S. M. Characterization of Sodium-dependent and Sodium-independent Nucleoside Transport Systems in Rabbit Brush-border and Basolateral Plasma-membrane Vesicles from the Outer Renal Cortex. *Biochem. J.* **1989**, *264*, 223-231.
- 85 Moseley, R. H.; Jarose, S.; Permod, P. Adenosine Transport in Rat Liver Plasma Membrane Vesicles. *Am. J. Physiol.* **1991**, *261*, G716-22.
- 86 Ruiz-Montasell, B.; Javier Casado, F.; Felipe, A.; Pastor-Anglada, M. Uridine Transport in Basolateral Plasma Membrane Vesicles from Rat Liver. *J. Membr. Biol.* **1992**, *128*, 227-233.
- 87 Che, M.; Nishida, T.; Gatmaitan, Z.; Arias, I. M. A Nucleoside Transporter is Functionally Linked to Ectonucleotidases in Rat Liver Canalicular Membrane. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9684-9688.
- 88 Mercader, J.; Gomez-Angelats, M.; del Santo, B.; Casado, F. J.; Felipe, A.; Pastor-Anglada, M. Nucleoside Uptake in Rat Liver Parenchymal Cells. *Biochem. J.* **1996**, *317*, 835-842.
- 89 Li, J. Y.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M. Cloned Blood-brain Barrier Adenosine Transporter is Identical to the Rat Concentrative Na⁺ nucleoside Cotransporter CNT2. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2001**, *21*, 929-936.
- 90 Wu, X.; Yuan, G.; Brett, C. M.; Hui, A. C.; Giacobini, K. M. Sodium-dependent Nucleoside Transport in Choroid Plexus from Rabbit. Evidence for a Single Transporter for Purine and Pyrimidine Nucleosides. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8813-8818.
- 91 Hong, M.; Schlichter, L.; Bendayan, R. A Na⁺-dependent Nucleoside Transporter in Microglia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 366-374.

-
- 92 Darnowski, J. W.; Holdridge, C.; Handschumacher, R. E. Concentrative Uridine Transport by Murine Splenocytes: Kinetics, Substrate Specificity, and Sodium Dependency. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 2614-2619.
- 93 Plagemann, P. G.; Aran, J. M. Characterization of Na⁺-dependent, Active Nucleoside Transport in Rat and Mouse Peritoneal Macrophages, a Mouse Macrophage Cell Line and Normal Rat Kidney Cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1990**, *1028*, 289-298.
- 94 Crawford, C. R.; Ng, C. Y.; Noel, L. D.; Belt, J. A. Nucleoside Transport in L1210 Murine Leukemia Cells. Evidence for Three Transporters. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 9732-9736.
- 95 Jakobs, E. S.; Van Os-Corby, D.; Paterson, A. R. Expression of Sodium-linked Nucleoside Transport Activity in Monolayer Cultures of IEC-6 Intestinal Epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 22210-22216.
- 96 Sokoloski, J. A.; Sartorelli, A. C.; Handschumacher, R. E.; Lee, C. W. Inhibition by Pertussis Toxin of the Activation of Na⁽⁺⁾-dependent Uridine Transport in Dimethyl-sulphoxide-induced HL-60 Leukaemia Cells. *Biochem. J.* **1991**, *280*, 515-519.
- 97 Jones, K. W.; Rylett, R. J.; Hammond, Jr. Effect of Cellular Differentiation on Nucleoside Transport in Human Neuroblastoma Cells. *Brain Res.* **1994**, *660*, 104-112.
- 98 Meckling-Gill, K. A.; Cass, C. E. Effects of Transformation by v-fps on Nucleoside Transport in Rat-2 Fibroblasts. *Biochem. J.* **1992**, *282*, 147-154.
- 99 Woffendin, C.; Plagemann, P. G. Nucleoside Transporter of Pig Erythrocytes. Kinetic Properties, Isolation and Reaction with Nitrobenzylthioinosine and Dipyridamole. *Biochim. Biophys. Acta.* **1987**, *903*, 18-30.
- 100 Lee, G.; Dallas, S.; Hong, M.; Bendayan, R. Drug Transporters in the Central Nervous System: Brain Barriers and Brain Parenchyma Considerations. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 569-596. Review.
- 101 Wang, J.; Schaner, M. E.; Thomassen, S.; Su, S. F.; Piquette-Miller, M.; Giacomini, K. M. Functional and Molecular Characteristics of Na⁺-dependent Nucleoside Transporters. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1524-1531.
- 102 Cass, C. E.; Young, J. D.; Baldwin, S. A. Recent Advances in the Molecular Biology of Nucleoside Transporters of Mammalian Cells. *Biochem. Cell. Biol.* **1998**, *76*, 761-770.
- 103 Ward, J. L.; Sherali, A.; Mo, Z. P.; Tse, C. M. Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8375-8381.
- 104 Yao, S. Y.; Ng, A. M.; Vickers, M. F.; Sundaram, M.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A.; Young, J. D. Functional and Molecular Characterization of Nucleobase Transport by Recombinant Human and Rat Equilibrative Nucleoside Transporters 1 and 2. Chimeric Constructs Reveal a Role for the ENT2 helix 5-6 region in Nucleobase Translocation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24938-24948.
- 105 Zhang, J.; Visser, F.; Vickers, M. F.; Lang, T.; Robins, M. J.; Nielsen, L. P.; Nowak, I.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; Cass, C. E. Uridine binding motifs of human concentrative nucleoside transporters 1 and 3 produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 1512-1520.
- 106 Gerstin, K. M.; Dresser, M. J.; Giacomini, K. M. Specificity of human and rat orthologs of the concentrative nucleoside transporter, SPNT. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2002**, *283*, F344-F349.
- 107 Wang, J.; Su, S. F.; Dresser, M. J.; Schaner, M. E.; Washington, C. B.; Giacomini, K. M. Na⁽⁺⁾-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization. *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, F1058-F1065.

-
- 108 Schaner, M. E.; Wang, J.; Zhang, L.; Su, S. F.; Gerstin, K. M.; Giacomini, K. M. Functional characterization of a human purine-selective, Na⁺-dependent nucleoside transporter (hSPNT1) in a mammalian expression system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1487-1491.
- 109 Kalaria, R. N.; Harik, S. I. Nucleoside Transporter of Cerebral Microvessels and Choroid Plexus. *J. Neurochem.* **1986**, *47*, 1849-1856.
- 110 Thomas, S. A.; Segal, M. B. Saturation Kinetics, Specificity and NBMPR Sensitivity of Thymidine Entry into the Central Nervous System. *Brain Res.* **1997**, *760*, 59-67.
- 111 Spector, R. Nucleoside Transport in Choroid Plexus: Mechanism and Specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *216*, 693-703.
- 112 Wu, X.; Yuan, G.; Brett, C. M.; Hui, A. C.; Giacomini, K. M. Sodium-dependent Nucleoside Transport in Choroid Plexus from Rabbit. Evidence for a Single Transporter for Purine and Pyrimidine Nucleosides. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8813-8818.
- 113 Anderson, C. M.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; Cass, C. E.; Parkinson, F. E. Distribution of mRNA Encoding a Nitrobenzylthioinosine-insensitive Nucleoside Transporter (ENT2) in Rat Brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1999**, *70*, 293-297.
- 114 Anderson, C. M.; Xiong, W.; Geiger, J. D.; Young, J. D.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A.; Parkinson, F. E. Distribution of Equilibrative, Nitrobenzylthioinosine-sensitive Nucleoside Transporters (ENT1) in Brain. *J. Neurochem.* **1999**, *73*, 867-873.
- 115 De Koning, H.; Diallinas, G. Nucleobase transporters (review). *Mol. Membr. Biol.* **2000**, *17*, 75-94.
- 116 Domin, B. A.; Mahony, W. B.; Zimmerman, T. P. Purine nucleobase transport in human erythrocytes. Reinvestigation with a novel "inhibitor-stop" assay. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 9276-9284.
- 117 Domin, B. A.; Mahony, W. B.; Zimmerman, T. P. Transport of 5-fluorouracil and uracil into human erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 503-510.
- 118 Mahony, W. B.; Domin, B. A.; McConnell, R. T.; Zimmerman, T. P. Acyclovir transport into human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 9285-9291.
- 119 Mahony, W. B.; Domin, B. A.; Zimmerman, T. P. Ganciclovir permeation of the human erythrocyte membrane. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41*, 263-271.
- 120 Mahony, W. B.; Domin, B. A.; Daluge, S. M.; Miller, W. H.; Zimmerman, T. P. Enantiomeric selectivity of carbovir transport. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 19792-19797.
- 121 Griffith, D. A.; Jarvis, S. M. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1996**, *1286*, 153-181. Review.
- 122 Haddock, P. S. Evidence for sodium-dependent hypoxanthine uptake in isolated guinea pig ventricular myocytes: stimulation by extracellular Ni²⁺. *Cardiovasc. Res.* **1995**, *30*, 130-137.
- 123 Barros, L. F. Hypoxanthine transport in the guinea pig and human placenta is a carrier-mediated process that does not involve nucleoside transporters. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1994**, *171*, 111-117.
- 124 Griffith, D. A.; Jarvis, S. M. High affinity sodium-dependent nucleobase transport in cultured renal epithelial cells (LLC-PK1). *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 20085-20090.
- 125 Griffith, D. A.; Jarvis, S. M. Characterization of a sodium-dependent concentrative nucleobase-transport system in guinea-pig kidney cortex brush-border membrane vesicles. *Biochem. J.* **1994**, *303*, 901-905.

-
- 126 Washington, C. B.; Giacomini, K. M. Mechanisms of nucleobase transport in rabbit choroid plexus. Evidence for a Na(+)-dependent nucleobase transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22816-22819.
- 127 Bronk, J. R.; Hastewell, J. G. The transport of pyrimidines into tissue rings cut from rat small intestine. *J. Physiol.* **1987**, *382*, 475-488.
- 128 Yuasa, H.; Matsuhisa, E.; Watanabe, J. Intestinal brush border transport mechanism of 5-fluorouracil in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 94-99.
- 129 Katgely, B. W.; Bridges, R. J.; Rummel, W. Inhibition of the intestinal transport of uracil by hexoses and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1986**, *862*, 429-434.
- 130 Schmidt, A.; Su, Y. H.; Kunze, R.; Warner, S.; Hewitt, M.; Slocum, R. D.; Ludewig, U.; Frommer, W. B.; Desimone, M. UPS1 and UPS2 from Arabidopsis mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44817-44824.
- 131 de Koning, H. P.; Jarvis, S. M. A highly selective, high-affinity transporter for uracil in *Trypanosoma brucei brucei*: evidence for proton-dependent transport. *Biochem. Cell. Biol.* **1998**, *76*, 853-858.
- 132 Papageorgiou, I. G.; Yakob, L.; Al Salabi, M. I.; Diallinas, G.; Soteriadou, K. P.; De Koning, H. P. Identification of the first pyrimidine nucleobase transporter in *Leishmania*: similarities with the *Trypanosoma brucei* U1 transporter and antileishmanial activity of uracil analogues. *Parasitology* **2005**, *130*, 275-283.
- 133 Burchmore, R. J.; Wallace, L. J.; Candlish, D., Al-Salabi, M. I.; Beal, P. R.; Barrett, M. P.; Baldwin, S. A.; de Koning, H. P. Cloning, Heterologous Expression, and in situ Characterization of the First High Affinity Nucleobase Transporter from a Protozoan. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 23502-23507.
- 134 Parker, M. D.; Hyde, R. J.; Yao, S. Y.; McRobert, L.; Cass, C. E.; Young, J. D.; McConkey, G. A.; Baldwin, S. A. Identification of a Nucleoside/Nucleobase Transporter from *Plasmodium falciparum*, a Novel Target for Anti-malarial Chemotherapy. *Biochem. J.* **2000**, *349*, 67-75.
- 135 Carter, N. S.; Ben Mamoun, C.; Liu, W.; Silva, E. O.; Landfear, S. M.; Goldberg, D. E.; Ullman, B. Isolation and Functional Characterization of the PfNNT1 Nucleoside Transporter Gene from *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10683-10691.
- 136 Rager, N.; Mamoun, C. B.; Carter, N. S.; Goldberg, D. E.; Ullman, B. Localization of the *Plasmodium falciparum* PfNNT1 Nucleoside Transporter to the Parasite Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41095-41099.
- 137 Rutman, R. J.; Cantarow, A.; Paschkis, K. E. Studies in 2-Acetylaminofluorene Carcinogenesis.III. The Utilization of Uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer Res.* **1954**, *14*, 119-123.
- 138 Heidelberger, C.; Chaudhuri, N. K.; Danneberg, P.; Mooren, D.; Griesbach, L.; Duschinsky, R.; Schnitzer, R. J.; Plevin, E.; Scheiner, J. Fluorinated Pyrimidines, a New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* **1957**, *179*, 663-666.
- 139 Duschinsky, R.; Plevin, E.; Heidelberger, C. The Synthesis of 5-Fluoropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4559-4560.
- 140 Heidelberger, C. Fluorinated pyrimidines. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **1965**, *4*, 1-50. Review.
- 141 Heidelberger, C. Chemical Carcinogenesis, Chemotherapy: Cancer's Continuing Core Challenges--G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* **1970**, *30*, 1549-1569. Review.
- 142 Heidelberger, C. Antineoplastic and Immunosuppressive Agents (Sartorelli, A. C.; John, D. G., eds) **1975**, Part 11, 193-231, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

-
- 143 Mross, K.; Semsek, D. Die Chemotherapie des Kolonkarzinoms im Jahr 2001, Klinik für Tumorbiologie an der Albert Ludwig Universität Freiburg. *Praxis* **2001**, *90*, 497–510.
- 144 Malet-Martino, M.; Martino, R. Clinical Studies of Three Oral Prodrugs of 5-Fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): a Review. *Oncologist* **2002**, *7*, 288-323.
- 145 Mukherjee, K. L.; Heidelberger, C. Studies on Fluorinated Pyrimidines. IX. The Degradation of 5-Fluorouracil-6-C¹⁴. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 433-437.
- 146 Somadossi, J. P.; Gewirtz, D. A.; Diasio, R. B.; Aubert, C.; Cano, J. P.; Goldman, I. D. Rapid Catabolism of 5-Fluorouracil in Freshly Isolated Rat Hepatocytes as Analyzed by High Performance Liquid Chromatography. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 8171-8176.
- 147 Iyer, L.; Ratain, M. J. 5-Fluorouracil Pharmacokinetics: Causes for Viability and Strategies for Modulation in Cancer Chemotherapy. *Cancer Investig.* **1999**, *17*, 494–506.
- 148 Lu, Z.; Zhang, R.; Diasio, R. B. Purification and Characterization of Dihydropyrimidine Dehydrogenase from Human Liver. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17102–17109.
- 149 Martino, R.; Lopez, A.; Malet-Martino, M. C. et al. Release of Fluoride Ion from 5'-Deoxy-5-fluorouridine, an Antineoplastic Fluoropyrimidine, in Humans. *Drug Metab. Dispos.* **1985**, *13*, 116-118.
- 150 Martino, R.; Malet-Martino, M. C.; Vialaneix, C. et al. ¹⁹F Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Carbamate Reaction of α -Fluoro- β -alanine (FBAL), the Major Catabolite of Fluoropyrimidines. Application to FBAL Carbamate Determination in Body Fluids of Patients Treated with 5'-Deoxy-5-fluorouridine. *Drug Metab. Dispos.* **1987**, *15*, 897-904.
- 151 Sweeny, D. J.; Barnes, S.; Heggie, G. D. et al. Metabolism of 5-Fluorouracil to an N-Cholyl-2-fluoro- β -alanine conjugate: Previously unrecognized Role for Bile Acids in Drug Conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 5439-5443.
- 152 Malet-Martino, M. C.; Bernadou, J.; Martino, R. et al. ¹⁹F NMR Spectrometry Evidence for Bile Acid Conjugates of α -Fluoro- β -alanine as the Main Biliary Metabolites of Antineoplastic Fluoropyrimidines in Humans. *Drug Metab. Dispos.* **1988**, *16*, 78-84.
- 153 Lemaire, L.; Malet-Martino, M. C.; de Forni, M. et al. Cardiotoxicity of Commercial 5-Fluorouracil Vials Stems from the Alkaline Hydrolysis of this Drug. *Br. J. Cancer* **1992**, *66*, 119-127.
- 154 Porter, D. J. Y.; Harrington, J. A.; Almond, M. R. et al. Enzymatic Elimination of Fluoride from Alpha-fluoro-beta-alanine. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 1475-1484.
- 155 Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavec, M.; Roth, H. J. Medizinische Chemie – Targets und Arzneistoffe. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart **2005**, S. 479.
- 156 Schilsky, R. L. Biochemical and Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. *Oncology (Williston Park)*. **1998**, *12*, 13-18. Review.
- 157 Aschele, C.; Sombrero, A.; Faderan, M. A. et al. Novel Mechanism(s) of Resistance to 5-Fluorouracil in Human Colon Cancer (HCT-8) Sublines Following Exposure to two Different Clinically Relevant Dose Schedules. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 1855-1864.
- 158 Sombrero, A. F.; Aschele, C.; Guglielmi, A. P. et al. Synergism and Lack of Cross-resistance between Short-term and Continuous Exposure to Fluorouracil in Human Colon Adenocarcinoma Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, *85*, 1937-1944.
- 159 Sombrero, A. F.; Aschele, C.; Bertino, J. R. Fluorouracil in Colorectal Cancer - a Tale of two Drugs: Implications for Biochemical Modulation. *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 368-381.

-
- 160 Harris, B. E.; Song, R.; Soong, S. J.; Diasio, R. B. Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 197-201.
- 161 Diasio, R. B.; Johnson, M. R. Dihydropyrimidine Dehydrogenase: its Role in 5-Fluorouracil Clinical Toxicity and Tumor Resistance. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 2672-2673.
- 162 Guimbaud, R.; Guichard, S.; Dusseau, C. et al. Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity in Normal, Inflammatory and Tumour Tissues of Colon and Liver in Humans. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2000**, *45*, 477-482.
- 163 Salonga, D.; Danenberg, K. D.; Johnson, M.; Metzger, R.; Groshen, S.; Tsao-Wei, D. D.; Lenz, H. J.; Leichman, C. G.; Leichman, L.; Diasio, R. B.; Danenberg, P. V. Colorectal Tumors Responding to 5-Fluorouracil have Low Gene Expression Levels of Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Thymidylate Synthase, and Thymidine Phosphorylase. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1322-1327.
- 164 Diasio, R. B.; Harris, B. E. Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. *Clin. Pharmacokinet.* **1989**, *16*, 215-237.
- 165 Fleming, R. A.; Milano, G. A.; Gaspard, M. H. et al. Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity in Cancer Patients. *Eur. J. Cancer.* **1993**, *5*, 740-744.
- 166 Lu, Z.; Zhang, R.; Diasio, R. B. Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Liver: Population Characteristics, Newly Identified Deficient Patients, and Clinical Implication in 5-Fluorouracil Chemotherapy. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5433-5438.
- 167 Etienne, M. C.; Cheradame, S.; Fischel, J. L. et al. Response to Fluorouracil Therapy in Cancer Patients: The Role of Tumoral Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity. *J. Clin. Oncol.* **1995**, *13*, 1663-1670.
- 168 Lu, Z.; Zhang, R.; Carpenter, J. T. et al. Decreased Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity in a Population of Patients with Breast Cancer: Implication for 5-Fluorouracil-based Chemotherapy. *Clin Cancer Res.* **1998**, *4*, 325-329.
- 169 Fleming, R. A.; Milano, G.; Thyss, A. et al. Correlation between Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity in Peripheral Mononuclear Cells and Systemic Clearance of Fluorouracil in Cancer Patients. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2899-2902.
- 170 Etienne, M. C.; Lagrange, J. L.; Dassonville, O. et al. Population Study of Dihydropyrimidine Dehydrogenase in Cancer Patients. *J. Clin. Oncol.* **1994**, *12*, 2248-2253.
- 171 Ezzeldin, H.; Diasio, R. Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency, a Pharmacogenetic Syndrome Associated with Potentially Life-Threatening Toxicity Following 5-Fluorouracil Administration. *Clin. Colorectal Cancer* **2004**, *4*, 181-189. Review.
- 172 Rougier, P.; Buyse, M.; Ryan, L.; Hansen, R.; Zee, B.; Weinermann, B.; Pater, J.; Benedetti, J.; Leichmann, C.; MacDonald, J.; Laplanche, A.; Pignon, J. P.; Lokich, J.; Fryer, J.; Isacson, R.; Brufman, G.; Piedbois, P. Metaanalysis of all Trials Comparing Intravenous Bolus Administration to Continuous Infusion of 5-Fluorouracil in Patients with Advanced Colorectal Cancer. *ASCO Proceedings* **1997**, *16*, 267a.
- 173 Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. *J. Clin. Oncol.* **1992**, *10*, 896-903.
- 174 Arazaki, M.; Ishitsuka, H.; Kuruma, I. et al. N-Oxycarbonyl Substituted 5'-Deoxy-5 fluorocytidines. Eur. Patent Appl. 1992; no. 92121538.0.

-
- 175 Budman, D. R.; Meropol, N. G.; Reigner, B.; Creaven, P. J.; Lichtman, S.; Berghorn, E. et al. Preliminary studies of a Novel Oral Fluoropyrimidine Carbamate: Capecitabine. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 1795 - 1802.
- 176 Frings, S. Capecitabine – a Novel Oral Tumor Activated Fluoropyrimidine. *Onkologie* **1998**, *21*, 451–458.
- 177 Cunningham, D.; James, R. D. Integrating the Oral Fluoropyrimidines into the Management of Advanced Colorectal Cancer. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 826-834. Review.
- 178 Maroun, J. A. Capecitabine in the Management of Colorectal Cancer. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* **2001**, *1*, 327-333.
- 179 Carmichael, J.; Popiela, T.; Radstone, D.; Falk, S.; Borner, M.; Oza, A.; Skovsgaard, T.; Munier, S.; Martin, C. Randomized Comparative Study of Tegafur/Uracil and Oral Leucovorin Versus Parenteral Fluorouracil and Leucovorin in Patients with Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 3617-3627.
- 180 Douillard, J. Y.; Hoff, P. M.; Skillings, J. R.; Eisenberg, P.; Davidson, N.; Harper, P.; Vincent, M. D.; Lembersky, B. C.; Thompson, S.; Maniero, A.; Benner, S. E. Multicenter Phase III Study of Uracil/Tegafur and Oral Leucovorin Versus Fluorouracil and Leucovorin in Patients with Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 3605-3616.
- 181 Deutsche Apotheker Zeitung, Ausgabe 2002/06, Neue Arzneimittel, Produktinformation, Neues orales Chemotherapeutikum, Tegafur.
- 182 Schilsky, R.; Bukowski, R.; Burris, H.; Crawford, J.; Hochster, H.; O'Rourke, M.; Steinfeldt, H.; Doucette, M.; Levin, J.; Hohneker, J. A Phase II-study of a Five Day Regimen of Oral 5-Fluorouracil (5-FU) plus GW776 (776C85) with or without Leucovorin in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *ASCO Proceedings* **1997**, *16*, 271a.
- 183 Mani, S.; Beck, T.; Chevlen, E.; Hochster, H.; O'Rourke, M.; Weaver, C.; Bell, W.; McGuirt, C.; Levin, J.; Hohneker, J.; Lokich, J. A phase II open-label study to evaluate a 28-day regimen of oral 5-fluorouracil (5-FU) plus 776C85 for the treatment of patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *ASCO Proceedings* **1998**, *17*, 281 a.
- 184 Schilsky, R. L.; Kindler, H. L. Eniluracil: an Irreversible Inhibitor of Dihydropyrimidine Dehydrogenase. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* **2000**, *9*, 1635-1649. Review.
- 185 Baker, S. D.; Diasio, R. B.; O'Reilly, S.; Lucas, V. S.; Khor, S. P.; Sartorius, S. E.; Donehower, R. C.; Grochow, L. B.; Spector, T.; Hohneker, J. A.; Rowinsky, E. K. Phase I and Pharmacologic Study of Oral Fluorouracil on a Chronic Daily Schedule in Combination with the Dihydropyrimidine Dehydrogenase Inactivator Eniluracil. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 915-926.
- 186 Schilsky, R. L.; Hohneker, J.; Ratain, M. J.; Janisch, L.; Smetzer, L.; Lucas, V. S.; Khor, S. P.; Diasio, R.; Von Hoff, D. D.; Burris, H. A. Phase I Clinical and Pharmacologic Study of Eniluracil plus Fluorouracil in Patients with Advanced Cancer. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 1450-1457.
- 187 Meropol, N. J.; Niedzwiecki, D.; Hollis, D.; Schilsky, R. L.; Mayer, R. J. Cancer and Leukemia Group B. Phase II Study of Oral Eniluracil, 5-Fluorouracil, and Leucovorin in Patients with Advanced Colorectal Carcinoma. *Cancer* **2001**, *91*, 1256-1263.
- 188 Smith, I. E.; Johnston, S. R.; O'Brien, M. E.; Hickish, T. F.; de Boer, R. H.; Norton, A.; Cirkel, D. T.; Barton, C. M. Low-dose Oral Fluorouracil with Eniluracil as First-line Chemotherapy against Advanced Breast Cancer: a Phase II Study. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 2378-2384.
- 189 Mani, S.; Hochster, H.; Beck, T.; Chevlen, E. M.; O'Rourke, M. A.; Weaver, C. H.; Bell, W. N.; White, R.; McGuirt, C.; Levin, J.; Hohneker, J.; Schilsky, R. L.; Lokich, J. Multicenter Phase II Study to Evaluate a 28-day Regimen of Oral Fluorouracil plus Eniluracil in the Treatment of Patients with Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 2894-2901.

-
- 190 Schilsky, R. L.; Levin, J.; West, W. H.; Wong, A.; Colwell, B.; Thirlwell, M. P.; Ansari, R. H.; Bell, W. N.; White, R. L.; Yates, B. B.; McGuirt, P. V.; Pazdur, R. Randomized, Open-label, Phase III Study of a 28-day Oral regimen of Eniluracil plus Fluorouracil Versus Intravenous Fluorouracil plus Leucovorin as First-line Therapy in Patients with Metastatic/advanced Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 1519-2156.
- 191 Shirasaka, T.; Shimamoto, Y.; Ohshimo, H. et al. Development of a Novel Form of an Oral 5-Fluorouracil Derivative (S-1) directed to the Potentiation of the Tumor Selective Cytotoxicity of 5-Fluorouracil by two Chemical Modulators. *Anticancer Drugs*, **1996**, *7*, 548-557.
- 192 Ueno, H.; Okusaka, T.; Ikeda, M.; Takezako, Y.; Morizane, C. An Early Phase II Study of S-1 in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer. *Oncology* **2005**, *68*, 171-178.
- 193 Hokita, S.; Aikou, T.; Miyazono, F.; Ishigami, S.; Aridome, K.; Maenohara, S.; Saihara, T.; Suenaga, K.; Nomura, H.; Maeda, S.; Takatori, H.; Arima, H.; Uchikado, Y.; Natsugoe, S.; Takao, S. A Phase I Combination Chemotherapy Study of Biweekly Paclitaxel and S-1 Administration in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, 1-5.
- 194 Schoffski, P. The Modulated Oral Fluoropyrimidine Prodrug S-1, and its Use in Gastrointestinal Cancer and other Solid Tumors. *Anticancer Drugs* **2004**, *15*, 85-106. Review.
- 195 Taguchi, T.; Inuyama, Y.; Kanamaru, R. et al. Phase I Study of S-1. S-1 Study Group. *Gan To Kagaku Ryoho.* **1997**, *24*, 2253-2264. Japanese.
- 196 Hoff, P. M.; Wenske, C. A.; Medgyesy, D. C. et al. Phase I and Pharmacokinetic (PK) Study of a Novel Oral Fluoropyrimidine S-1. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1999**, *18*, 665a.
- 197 Van Groeningen, C. J.; Peters, G. J.; Schornagel, J. H. et al. Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Oral S-1 in Patients with Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 2772-2779.
- 198 Meropol, N. J.; Leishman, C. G.; Yeslow, G. et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of Single Daily Oral Administration of S-1. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2001**, *20*, 361a.
- 199 Koizumi, W.; Kurihara, M.; Nakano, S. et al. Phase II Study of S-1, a Novel Oral Derivative of 5-Fluorouracil, in Advanced Gastric Cancer. For the S-1 Cooperative Gastric Cancer Study Group. *Oncology* **2000**, *58*, 191-197.
- 200 Ohtsu, A.; Baba, H.; Sakata, Y. et al. Phase II Study of S-1, a Novel Oral Fluoropyrimidine Derivative, in Patients with Metastatic Colorectal Carcinoma. S-1 Cooperative Colorectal Carcinoma Study Group. *Br. J. Cancer.* **2000**, *83*, 141-145.
- 201 Sano, M.; Saeki, T.; Takashima, S. et al. Late Phase II Study of S-1 in Patients with Advanced and/or Recurrent Breast Cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2000**, *19*, 404a.
- 202 Kawahara, M.; Furuse, K.; Segawa, Y. et al. Phase II Study of S-1, a Novel Oral Fluorouracil, in Advanced Non-small-cell Lung Cancer. *Br. J. Cancer.* **2001**, *85*, 939-943.
- 203 Yoneda K, Yamamoto T, Ueta E, Osaki T. The Inhibitory Action of BOF-A2, a 5-Fluorouracil Derivative, on Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Lett.* **1999**, *137*, 17-25.
- 204 Nakai, Y.; Furuse, K.; Ohta, M.; Yamaguchi, Y.; Fujii, M.; Asakawa, M.; Fukuoka, M.; Yoshida, K.; Niitani, H. Efficacy of a New 5-Fluorouracil Derivative, BOF-A2, in Advanced Non-small Cell Lung Cancer. A Multi-center Phase II Study. *Acta Oncol.* **1994**, *33*, 523-526.
- 205 Tatsumi, K.; Yamauchi, T.; Kiyono, K.; Kishi, K.; Yanagihara, Y.; Imaoka, T.; Kawaguchi, T.; Kubo, M. 3-Cyano-2,6-dihydropyridine (CNDP), a New Potent Inhibitor of Dihydrouracil Dehydrogenase. *J. Biochem. (Tokyo)* **1993**, *114*, 912-918.
- 206 Okayasu, T.; Sugiyama, K.; Miyauchi, S. Inhibition of Catabolic Pathway of 5-Fluorouracil by 3-Cyano-2,6-dihydropyridine in Human Lung Cancer Tissues. *Jpn. J. Cancer Res.* **1994**, *85*, 101-105.

-
- 207 Nakai, Y.; Furuse, K.; Ohta, M.; Yamaguchi, Y.; Fujii, M.; Asakawa, M.; Fukuoka, M.; Yoshida, K.; Niitani, H. Efficacy of a New 5-Fluorouracil Derivative, BOF-A2, in Advanced Non-small Cell Lung Cancer. A Multi-center Phase II Study. *Acta. Oncol.* **1994**, *33*, 523-526.
- 208 Sugimachi, K.; Maehara, Y. A Phase II Trial of a New 5-Fluorouracil Derivative, BOF-A2 (Emitefur), for Patients with Advanced Gastric Cancer. *Surg. Today* **2000**, *30*, 1067-1072.
- 209 Fujii, S. BOF-A1 and BOF-A2, new 5-FU Degradation-inhibitory Agents. *Gan To Kagaku Ryoho.* **1987**, *14*, 2244-2250. Japanese.
- 210 Wenzel, D. G.; Keplinger, M. L. Central Depressant Properties of Uracil and Related Oxypyrimidines. *J. Amer. Pharm. Ass.* **1955**, *44*, 56-59.
- 211 Burckhalter, J. H.; Scarborough, H. C. The synthesis of uracils as anticonvulsants. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. (Baltim).* **1955**, *44*, 545-550.
- 212 Wenzel, D. G. Anticonvulsant Activity of Some Uracils and Related Compounds. *J. Amer. Pharm. Ass.* **1955**, *44*, 550-553.
- 213 Roberts, C. A. Anticonvulsant Effects of Uridine: Comparative Analysis of Metrazol and Penicillin Induces Foci. *Brain Res.* **1973**, *55*, 291-308.
- 214 Bonavita, V.; Zito, M. Analisi dell'azioni di nucleosidi pirimidinici sull'elettroencefalogramma umano attivato con megimide. *Riv. Neurol.* **1968**, *38*, 1-6.
- 215 Krooth, R. S.; Hsiao, W. L.; Lam, G. F. Effects of natural pyrimidines and of certain related compounds on the spontaneous activity of the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1978**, *207*, 504-514.
- 216 Tateoka, Y.; Kimura, T.; Watanabe, K.; Yamamoto, I.; Ho, I. K. Potentiating effects of N1,N3-diallyluracil, N1,N3-diallylthymine and N1,N3-diallyl-6-methyluracil on pentobarbital-induced sleep and diazepam-induced motor incoordination. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1987**, *35*, 4928-4934.
- 217 Tateoka, Y.; Kimura, T.; Watanabe, K.; Yamamoto, I.; Ho, I. K. Effects of N1,N3-diallyluracil and N1,N3-diallylthymine on hepatic drug-metabolizing enzymes of mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1989**, *64*, 135-143.
- 218 Tateoka, Y.; Hiramura, S.; Usami, N.; Kimura, T.; Watanabe, K.; Yamamoto, I. [Syntheses and central depressant activity in mice of uracil derivatives. Studies on development of new sedative-hypnotics. II] *Yakugaku Zasshi* **1992**, *112*, 470-478.
- 219 Imaizumi, M.; Kano, F.; Sakata, S. Novel uracil derivatives: newly synthesized centrally acting agents. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1992**, *40*, 1808-1813.
- 220 Imaizumi, M.; Miyazaki, S.; Watanabe, Y.; Machida, H. Pharmacological profile of the novel putative anxiolytic agent 1-amino-5-bromouracil. *Arzneimittelforschung* **1994**, *44*, 285-288.
- 221 Imaizumi, M.; Miyazaki, S.; Machida, H. Discriminative stimulus properties of diazepam and the novel anxiolytic agent 1-amino-5-bromouracil in rats. *Arzneimittelforschung* **1994**, *44*, 1105-1107.
- 222 Miyazaki, S.; Imaizumi, M.; Machida, H. Effect of 1-amino-5-bromouracil on brain monoamine metabolism in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**, *49*, 471-475.
- 223 Miyazaki, S.; Imaizumi, M.; Machida, H. Effects of 1-amino-5-bromouracil on the benzodiazepine-GABAA receptor complex. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *271*, 179-184.
- 224 Draminski, M.; Turski, K.; Tateoka, Y.; Kimura, T.; Watanabe, K.; Kondo, S.; Ho, I. K.; Yamamoto, I. Synthesis and sedative-hypnotic effects of N3-allyl- and N1-allyl-5,6-substituted 2-thiouracil derivatives in mice. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1998**, *46*, 1370-1373.

-
- 225 Lüllmann, H.; Mohr, K. *Pharmakologie und Toxikologie – Arzneimittelwirkungen verstehen-Medikamente gezielt einsetzen*. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 1999.
- 226 Krooth, R. S.; May, S. R.; Stern, H. J. A theory for the chemical mediation of the excitability of the brain, with special reference to natural and drug-induced sleep. *J. Theor. Biol.* **1977**, *66*, 595-652. Review.
- 227 Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H.-Q.; Wintmolders, C.; Van den Wyngaert, I.; Van Oers, I.; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 8573-8578.
- 228 Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von Kugelgen, I.; Muller, C. E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 955-64.
- 229 Bruns, R. F.; Lawson-Wendling, K.; Pugsley, T. A Rapid Filtration Assay for Soluble Receptors Using Polyethylenimine-treated Filters. *Anal. Biochem.* **1983**, *132*, 74-81.
- 230 Hulme, E.C. *Receptor-ligand interactions. A practical approach*. Oxford University Press **1992**.
- 231 Motulsky, H. J. *Analyzing data with GraphPad Prism*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA **1999**.
- 232 Karlson, P.; *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 13. Auflage, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 1988.
- 233 Levene, P. A. The structure of yeast nucleic acid. IV. Ammonia hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **1919**, *40*, 415-424.
- 234 Levene, P. A.; Tipson, R. S. The partial synthesis of ribose nucleotides. I. Uridine 5-phosphoric acid. *J. Biol. Chem.* **1934**, *106*, 113-124
- 235 Fredholm, B. B.; Ijzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. R.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527-552.
- 236 Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413-492.
- 237 Klotz, K. N.; Hessling, J.; Hegler, J.; Owman, C.; Kull, B.; Fredholm, B. B.; Lohse, M. J. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes – characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1998**, *357*, 1-9.
- 238 Klotz, K. N.; Camaioni, E.; Volpini, R.; Kachler, S.; Vittori, S.; Cristalli, G. 2-Substituted N-Ethyl-carboxamidoadenosine derivatives as high-affinity agonists at human A₃ adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1999**, *360*, 103-108.
- 239 Bruns, R. F.; Lu, G. H.; Pugsley, T. A. Characterization of the A₂ Adenosine Receptor Labeled by [³H]NECA in Rat Striatal Membranes. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 331-346.
- 240 van Galen, P. J. M.; van Bergen, A. H.; Gallo-Rodriguez, C.; Melman, N.; Olah, M. E.; Ijzerman, A. P.; Stiles, G. L.; Jacobson, K. A. A binding site model and structure activity relationships for the rat A₃ adenosine receptor. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 1101-1111.
- 241 Linden, J.; Thai, T.; Figler, H.; Jin, X.; Robeva, A. S. Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 705-713.

-
- 242 Lorenzen, A.; Nitsch-Kirsch, M.; Vogt, H.; Schwabe, U. Characterization of membranebound and solubilized high-affinity binding sites for 5'-N-ethylcarboxamido-[³H]adenosine from bovine cerebral cortex. *J. Neurochem.* **1993**, *60*, 745-751.
- 243 Yoshioka, K.; Matsuda, A.; Nakata, H. Pharmacology of a unique adenosine binding site in rat brain using a selective ligand. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2001**, *28*, 278-284.
- 244 Snyder, S. H.; Katims, J. J.; Annau, Z.; Bruns, R. F.; Daly, J. W. Adenosine Receptors and Behavioral Actions of Methylxanthines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 3260-3264.
- 245 Müller, C. E. A1 Adenosine Receptors and Their Ligands: Overview and Recent Developments. *Farmaco* **2001**, *56*, 77-80.
- 246 Bormann, J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 16-19. Review.
- 247 Kaila, K. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **1994**, *42*, 489-537. Review.
- 248 Kattenstroth, G. Regulations- und Modulationsmechanismen der synaptischen Transmission in neocortikalen Neuronen von Nagetieren. *Dissertation, Universität Bochum*, **2003**.
- 249 Meusel, M. Entwicklung neuer Syntheseverfahren für biologisch aktive Ureide und Hydantoine. *Dissertation, Universität Bonn*, **2005**.
- 250 Guyenet, P. G. Is the hypotensive effect of clonidine and related drugs due to imidazoline binding sites? *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, R1580-1584. Review.
- 251 Lachaud, V.; Coupry, I.; Podevin, R. A.; Dausse, J. P.; Koenig, E.; Parini, A. Interaction of clonidine and rilmenidine with imidazoline-preferring receptors. *J. Hypertens. Suppl.* **1988**, *6*, S511-513.
- 252 Regunathan, S.; Reis, D. J. Imidazoline receptors and their endogenous ligands. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 511-544. Review.
- 253 Harker, L. A.; Kadatz, R. A. Mechanism of action of dipyridamole. *Thromb. Res. Suppl.* **1983**, *4*, 39-46. Review.
- 254 Shinohara, T.; Harada, M.; Ogi, K.; Maruyama, M.; Fujii, R.; Tanaka, H.; Fukusumi, S.; Komatsu, H.; Hosoya, M.; Noguchi, Y.; Watanabe, T.; Moriya, T.; Itoh, Y.; Hinuma, S. Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to β -alanine. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 23559-23564.
- 255 Tunaru, S.; Lattig, J.; Kero, J.; Krause, G.; Offermanns, S. Characterization of determinants of ligand binding to the nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 1271-1280.
- 256 Pike, N. B. Flushing out the role of GPR109A (HM74A) in the clinical efficacy of nicotinic acid. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 3400-3403.
- 257 Kimura, T.; Miki, M.; Ikeda, M.; Yonemoto, S.; Watanabe, K.; Kondo, S.; Ho, I. K.; Yamamoto, I. Possible Existence of a novel receptor for uridine analogues in the central nervous system using two isomers, N3-(S)-(+)- and N3-R-(-)- α -Hydroxy- β -Phenethyluridines. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 729-731.
- 258 Kovacs, I.; Lasztozci, B.; Szarics, E.; Heja, L.; Sagi, G.; Kardos, J. Characterisation of an uridine-specific binding site in rat cerebrocortical homogenates. *Neurochem. Int.* **2003**, *43*, 101-112.
- 259 *Sybyl 6.7.1*, Tripos, Inc., 1699 St. Hanley Road, Suite 303, St. Louis, MO, 63144.
- 260 McCudden, C. R.; Hains, M. D.; Kimple, R. J.; Siderovski, D. P.; Willard, F. S. G-protein signaling: back to the future. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 551-577. Review.

-
- 261 Simon, M. I.; Strathmann, M. P.; Gautam, N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **1991**, *252*, 802-808. Review.
- 262 Sutherland, E. W.; Rall, T. W. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.* **1958**, *232*, 1077-1091.
- 263 Rall, T. W.; Sutherland, E. W. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.* **1958**, *232*, 1065-1076.
- 264 Chang, L.; Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascade. *Nature* **2001**, *410*, 37-40. Review.
- 265 Johnson, G. L.; Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **2002**, *298*, 1911-1912.
- 266 Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **1992**, *258*, 607-614. Review.
- 267 Dekker, L. V.; Parker, P. J. Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 73-77. Review.
- 268 Beavo, J. A.; Brunton, L. L. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, *3*, 710-718.
- 269 <http://www.cvphysiology.com>
- 270 Sullivan, G. W.; Carper, H. T.; Mandell, G. L. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram combined with adenosine reduces tumor necrosis factor-alpha-primed neutrophil oxidative activity. *Int. J. Immunopharmacol.* **1995**, *17*, 793-803.
- 271 Shryock, J. C.; Ozeck, M. J.; Belardinelli, L. Inverse agonists and neutral antagonists of recombinant human A1 adenosine receptors stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, 886-893.
- 272 Milligan, G. Principles: extending the utility of [³⁵S]GTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 87-90. Review.
- 273 Kukkonen, J. P. Regulation of receptor-coupling to (multiple) G proteins. A challenge for basic research and drug discovery. *Receptors Channels* **2004**, *10*, 167-83. Review.
- 274 Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440-3450
- 275 Takahashi, A.; Camacho, P.; Lechleiter, J. D.; Herman, B. Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 1089-1125
- 276 Kaulich, M. P2Y₂-Rezeptoren und weitere pyrimidinerge P2Y-Rezeptorsubtypen: Funktionelle Charakterisierung, Klonierung und Suche nach selektiven Liganden. *Dissertation, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*, **2003**.
- 277 Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian. *Nature* **2004**, *428*, 493-521.
- 278 Yuan, C. S.; Borchardt, R. T. Photoaffinity labeling of human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase with [2-³H]8-azido-adenosine. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16140-16146.
- 279 Saitoh, Y.; Nakata, H. Photoaffinity labeling of a P3 purinoceptor-like protein purified from rat brain membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 469-474.

-
- 280 Kerkhoff, C.; Trumbach, B.; Gehring, L.; Habben, K.; Schmitz, G.; Kaever, V. Solubilization, partial purification and photolabeling of the integral membrane protein lysophospholipid:acyl-CoA acyltransferase (LAT). *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6339-6345.
- 281 Chiara, D. C.; Trinidad, J. C.; Wang, D.; Ziebell, M. R.; Sullivan, D.; Cohen, J. B. Identification of amino acids in the nicotinic acetylcholine receptor agonist binding site and ion channel photolabeled by 4-[(3-trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoylcholine, a novel photoaffinity antagonist. *Biochemistry*. **2003**, *42*, 271-283.
- 282 Fleet, G. W. J.; Porter, R. R.; Knowles, J. R. Affinity Labelling of Antibodies with Aryl Nitrene as Reactive Group. *Nature* **1969**, *224*, 511-512.
- 283 Singh, A.; Thornton, E. R.; Westheimer, F.H; The photolysis of diazoacetylchymotrypsin. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3006-3008.
- 284 Brunner, J.; Senn, H.; Richards, F. M. 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313-3318.
- 285 Neugebauer, J. M. Detergents: an overview. *Methods Enzymol.* **1990**, *182*, 239-53.
- 286 Lau, F. W.; Bowie, J. U. A method for assessing the stability of a membrane protein. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5884-5892.
- 287 Dong, M.; Baggetto, L. G.; Falson, P.; Le Maire, M.; Penin, F. Complete removal and exchange of sodium dodecyl sulfate bound to soluble and membrane proteins and restoration of their activities, using ceramic hydroxyapatite chromatography. *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 333-341.
- 288 Lund, S.; Orłowski, S.; de Foresta, B.; Champeil, P.; le Maire, M.; Moller, J. V. Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 4907-4915.
- 289 Stubbs, G. W.; Smith, H. G. Jr.; Litman, B. J. Alkyl glucosides as effective solubilizing agents for bovine rhodopsin. A comparison with several commonly used detergents. *Biochim. Biophys. Acta.* **1976**, *426*, 46-56.
- 290 Yu, S. M.; McQuade, D. T.; Quinn, M. A.; Hackenberger, C. P.; Krebs, M. P.; Polans, A. S.; Gellman, S. H. An improved tripod amphiphile for membrane protein solubilization. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 2518-2527.
- 291 Theisen, M. J.; Potocky, T. B.; McQuade, D. T.; Gellman, S. H.; Chiu, M. L. Crystallization of bacteriorhodopsin solubilized by a tripod amphiphile. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1751*, 213-216.
- 292 Tribet, C.; Audebert, R.; Popot, J. L. Stabilization of Hydrophobic Colloidal Dispersions in Water with Amphiphilic Polymers: Application to Integral Membrane Proteins. *Langmuir* **1997**, *13*, 5570-5576.
- 293 Tribet, C.; Audebert, R.; Popot, J. Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 15047-15050.
- 294 Champeil, P.; Menguy, T.; Tribet, C.; Popot, J. L.; le Maire, M. Interaction of Amphipols with Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8623-18637.
- 295 De Grip, W. J. Thermal stability of rhodopsin and opsin in some novel detergents. *Methods Enzymol.* **1982**, *81*, 256-265.
- 296 Knudsen, P.; Hubbell, W. L. Stability of rhodopsin in detergent solutions. *Membr. Biochem.* **1978**, *1*, 297-322.
- 297 Rosevear, P.; VanAken, T.; Baxter, J.; Ferguson-Miller, S. Alkyl glycoside detergents: a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **1980**, *19*, 4108-4115.

-
- 298 Witzmann, F.; Jarnot, B.; Parkerm D. Dodecyl maltoside detergent improves resolution of hepatic membrane proteins in two-dimensional gels. *Electrophoresis* **1991**, *12*, 687-688.
- 299 Bass, W. T.; Bricker, T. M. Dodecyl maltoside sodium dodecyl sulfate two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of chloroplast thylakoid membrane proteins. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 330-338.
- 300 Luche, S.; Santoni, V.; Rabilloud, T. Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **2003**, *3*, 249-253.
- 301 Kuhlbrandt, W. Three-dimensional crystallization of membrane proteins. *Q. Rev. Biophys.* **1988**, *21*, 429-477. Review.
- 302 Hjelmeland, L. M. Solubilization of native membrane proteins. *Methods Enzymol.* **1990**, *182*, 253-264.
- 303 Hjelmeland, L. M.; Chrambach, A. Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol.* **1984**, *104*, 305-318.
- 304 Meselson, M.; Stahl, F. W.; Vinograd, J. Equilibrium Sedimentation of Macromolecules in Density Gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1957**, *43*, 581-588.
- 305 Komoda, Y.; Ishikawa, M.; Nagasaki, H.; Iriki, M.; Honda, K.; Inoue, S.; Higashi, A.; Uchizono, K. Uridine, a Sleep-Promoting Substance from Brainstems of Sleep-Deprived Rats. *Biomed. Res.* **1983**, *4*, 223-227.
- 306 Yamamoto, I.; Kimura, T.; Tateoka, Y.; Watanabe, K.; Ho, I. K. N3-benzyluridine exerts hypnotic activity in mice. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1985**, *33*, 4088-4090.
- 307 Yamamoto, I.; Kimura, T.; Tateoka, Y.; Watanabe, K.; Ho, I. K. N-substituted oxypyrimidines and nucleosides: structure-activity relationship for hypnotic activity as central nervous system depressant. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 2227-2231.
- 308 Yamamoto, I.; Kuze, J.; Kimura, T.; Watanabe, K.; Kondo, S.; Ho, I. K. The potent depressant effects of N3-phenacyluridine in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, *17*, 514-516.
- 309 Kimura, T.; Miki, M.; Watanabe, K.; Kondo, S.; Ho, I. K.; Yamamoto, I. Binding affinity of N3-substituted uridine for synaptic membrane and their CNS depressant effects. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1995**, *34*, 147-148.
- 310 Kimura, T.; Kuze, J.; Watanabe, K.; Kondo, S.; Ho, I. K.; Yamamoto, I. N3-phenacyluridine, a novel hypnotic compound, interacts with the benzodiazepine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *311*, 265-269.
- 311 Kimura, T.; Miki, M.; Watanabe, K.; Kondo, S.; Ho, I. K.; Yamamoto, I. Metabolism of a novel hypnotic, N3-phenacyluridine, and hypnotic and sedative activities of its enantiomer metabolites in mouse. *Xenobiotica* **2000**, *30*, 643-653.
- 312 Kimura, T.; Ho, I. K.; Yamamoto, I. Uridine receptor: discovery and its involvement in sleep mechanism. *Sleep* **2001**, *24*, 251-260. Review.
- 313 Schumacher, T. Synthese und Eigenschaften neuer Nucleosid- und Nucleotid-Rezeptor-Liganden mit Uridin-Partialstruktur. *Dissertation, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*, **2005**.
- 314 Zukin, S. R.; Young, A. B.; Synder, S. H. Gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **1974**, *71*, 4802-4807.
- 315 Canellakis, E. S. Pyrimidine metabolism. II. Enzymatic pathways of uracil anabolism. *J. Biol. Chem.* **1957**, *227*, 329-338.

-
- 316 Koizumi, K.; Shimamoto, Y.; Azuma, A.; Wataya, Y.; Matsuda, A.; Sasaki, T.; Fukushima, M. Cloning and expression of uridine/cytidine kinase cDNA from human fibrosarcoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **2001**, *8*, 273-278.
- 317 Van Rompay, A. R.; Norda, A.; Linden, K.; Johansson, M.; Karlsson, A. Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1181-1186.
- 318 Lee, T.; Karon, M.; Momparler, R. L. Kinetic studies on phosphorylation of 5-azacytidine with the purified uridine-cytidine kinase from calf thymus. *Cancer Res.* **1974**, *34*, 2482-2488.
- 319 Reichard, P.; Sköld, O. Enzymes of uracil metabolism in the Ehrlich ascites tumour and mammalian liver. *Biochim. Biophys. Acta.* **1958**, *28*, 376-385.
- 320 Orengo, A. Regulation of enzymic activity by metabolites. I. Uridine-cytidine kinase of Novikoff ascites rat tumor. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 2204-2209.
- 321 Drake, J. C.; Stoller, R. G.; Chabner, B. A. Characteristics of the enzyme uridine-cytidine kinase isolated from a cultured human cell line. *Biochem. Pharmacol.* **1977**, *26*, 64-66.
- 322 Herzfeld, A.; Raper, S. M. Uridine kinase activities in developing, adult and neoplastic rat tissues. *Biochem. J.* **1979**, *182*, 771-778.
- 323 Suzuki, N. N.; Koizumi, K.; Fukushima, M.; Matsuda, A.; Inagaki, F. Crystallization and preliminary X-ray analysis of human uridine-cytidine kinase 2. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 1477-1478.
- 324 Suzuki, N. N.; Koizumi, K.; Fukushima, M.; Matsuda, A.; Inagaki, F. Structural basis for the specificity, catalysis, and regulation of human uridine-cytidine kinase. *Structure* **2004**, *12*, 751-764.
- 325 Appleby, T. C.; Larson, G.; Cheney, I. W.; Walker, H.; Wu, J. Z.; Zhong, W.; Hong, Z.; Yao, N. Structure of human uridine-cytidine kinase 2 determined by SIRAS using a rotating-anode X-ray generator and a single samarium derivative. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 278-84.
- 326 Yan, H.; Tsai, M. D. Nucleoside monophosphate kinases: structure, mechanism, and substrate specificity. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **1999**, *73*, 103-134. Review.
- 327 Strominger, J. L.; Heppel, L. A.; Maxwell, E. S. Nucleoside monophosphate kinases. I. Transphosphorylation between adenosine triphosphate and nucleoside monophosphates. *Biochim. Biophys. Acta.* **1959**, *32*, 412-421.
- 328 Muller-Dieckmann, H. J.; Schulz, G. E. The structure of uridylate kinase with its substrates, showing the transition state geometry. *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 361-367.
- 329 Anderson, E. P.; Brockman, R. W. Feedback Inhibition of Uridine Kinase by Cytidine Triphosphate and Uridine Triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* **1964**, *91*, 380-386.
- 330 Payne, R. C.; Traut, T. W. Regulation of uridine kinase quaternary structure. Dissociation by the inhibitor CTP. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12485-12488.
- 331 Payne, R. C.; Cheng, N.; Traut, T. W. Uridine kinase from Ehrlich ascites carcinoma. Purification and properties of homogeneous enzyme. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 10242-10247.
- 332 Cheng, N.; Payne, R. C.; Traut, T. W. Regulation of uridine kinase. Evidence for a regulatory site. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13006-13012.
- 333 Greenberg, M.; Shum, D. E.; Wee, T. E. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *69*, 217-222.

-
- 334 Kang, G. J.; Cooney, D. A.; Moyer, J. D.; Kelley, J. A.; Kim, H. Y.; Marquez, V. E.; Johns, D. G. Cyclopentenylcytosine triphosphate. Formation and inhibition of CTP synthetase. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 713-718.
- 335 Verschuur, A. C.; Van Gennip, A. H.; Leen, R.; Meinsma, R.; Voute, P. A.; van Kuilenburg, A. B. In vitro inhibition of cytidine triphosphate synthetase activity by cyclopentenyl cytosine in paediatric acute lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2000**, *110*, 161-169.
- 336 Schimmel, K.; Bennink, R.; de Bruin, K.; Leen, R.; Sand, K.; van den Hoff, M.; van Kuilenburg, A.; Vanderheyden, J. L.; Steinmetz, N.; Pfaffendorf, M.; Verschuur, A.; Guchelaar, H. J. Absence of cardiotoxicity of the experimental cytotoxic drug cyclopentenyl cytosine (CPEC) in rats. *Arch. Toxicol.* **2005**, *79*, 268-276.
- 337 Tabata, S.; Tanaka, M.; Endo, Y.; Obata, T.; Matsuda, A.; Sasaki, T. Anti-tumor mechanisms of 3'-ethynyluridine and 3'-ethynylcytidine as RNA synthesis inhibitors: development and characterization of 3'-ethynyluridine-resistant cells. *Cancer Lett.* **1997**, *116*, 225-231.
- 338 Takatori, S.; Kanda, H.; Takenaka, K.; Wataya, Y.; Matsuda, A.; Fukushima, M.; Shimamoto, Y.; Tanaka, M.; Sasaki, T. Antitumor mechanisms and metabolism of the novel antitumor nucleoside analogues, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine and 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)uracil. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, *44*, 97-104.
- 339 Hattori, H.; Nozawa, E.; Iino, T.; Yoshimura, Y.; Shuto, S.; Shimamoto, Y.; Nomura, M.; Fukushima, M.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. Nucleosides and nucleotides. 175. Structural requirements of the sugar moiety for the antitumor activities of new nucleoside antimetabolites, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine and -uracil. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2892-2902.
- 340 Shimamoto, Y.; Koizumi, K.; Okabe, H.; Kazuno, H.; Murakami, Y.; Nakagawa, F.; Matsuda, A.; Sasaki, T.; Fukushima, M. Sensitivity of human cancer cells to the new anticancer ribo-nucleoside TAS-106 is correlated with expression of uridine-cytidine kinase 2. *Jpn. J. Cancer Res.* **2002**, *93*, 825-833.
- 341 Murata, D.; Endo, Y.; Obata, T.; Sakamoto, K.; Syouji, Y.; Kadohira, M.; Matsuda, A.; Sasaki, T. A crucial role of uridine/cytidine kinase 2 in antitumor activity of 3'-ethynyl nucleosides. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 1178-1182.
- 342 Vesely, J.; Cihak, A. Uridine kinase in embryonic rat liver. Modulation of enzyme activity by 5-azacytidine. *Biochem. J.* **1973**, *133*, 609-613.
- 343 Khan, R.; Aggerholm, A.; Hokland, P.; Hassan, M.; Hellstrom-Lindberg, E. A pharmacodynamic study of 5-azacytidine in the P39 cell line. *Exp. Hematol.* **2006**, *34*, 35-43.
- 344 Kuykendall, J. R. 5-azacytidine and decitabine monotherapies of myelodysplastic disorders. *Ann. Pharmacother.* **2005**, *39*, 1700-1709. Review.
- 345 Lee, T. T.; Momparier, R. L. Inhibition of uridine-cytidine kinase by 5-azacytidine 5'-triphosphate. *Med. Pediatr. Oncol.* **1976**, *2*, 265-270.
- 346 Ahmed, N. K. Multiple forms and inhibitors of uridine-cytidine kinase in neoplastic cells. *Int. J. Biochem.* **1982**, *14*, 259-262.
- 347 Moyer, J. D.; Karle, J. M.; Malinowski, N.; Marquez, V. E.; Salam, M. A.; Malspeis, L.; Cysyk, R. L. Inhibition of uridine kinase and the salvage of uridine by modified pyrimidine nucleosides. *Mol. Pharmacol.* **1985**, *28*, 454-460.
- 348 Lim, M. I.; Moyer, J. D.; Cysyk, R. I.; Marquez, V. E. Cyclopentenyluridine and cyclopentenylcytidine analogues as inhibitors of uridine-cytidine kinase. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1536-1538.
- 349 Macdonald, G.; Walker, T.; Assef, R.; Duggan, K. Uridine kinase inhibition is involved in the vasodilator effects of minoxidil in the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1990**, *17*, 287-290.

-
- 350 Najarian, T.; Traut, T. W. Nifedipine and nimodipine competitively inhibit uridine kinase and orotidine-phosphate decarboxylase: theoretical relevance to poor outcome in stroke. *Neurorehabil. Neural. Repair.* **2000**, *14*, 237-241.
- 351 Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.
- 352 Peterson, G. L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **1977**, *83*, 346-356.
- 353 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- 354 Michaelis, L.; Menten, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Zeitschr.* **1913**, *49*, 333-369.
- 355 Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658-666.
- 356 Sköld, O. Uridine kinase from ehrlich ascites tumor: purification and properties. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 3273-3279.
- 357 Orengo, A.; Saunders, G. F. Regulation of a thermostable pyrimidine ribonucleoside kinase by cytidine triphosphate. *Biochemistry* **1972**, *11*, 1761-1767.
- 358 Shen, F.; Look, K. Y.; Yeh, Y. A.; Weber, G. Increased uridine kinase (ATP: uridine 5'-phosphotransferase; EC 2.7.1.48) activity in human and rat tumors. *Cancer Biochem. Biophys.* **1998**, *16*, 1-15.
- 359 Liacouras, A. S.; Garvey, T. Q.; Millar, F. K.; Anderson, E. P. Uridine-cytidine kinase. Kinetic studies and reaction mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* **1975**, *168*, 74-80.
- 360 <http://www.brenda.uni-koeln.de>
- 361 Anderson, E. P. Uridine-cytidine kinase from a murine neoplasm. *Methods Enzymol.* **1978**, *51*, 314-321.
- 362 Ahmed, N. K.; Baker, D. R. Properties of uridine-cytidine kinase derived from L1210 leukemia cells. *Cancer Res.* **1980**, *40*, 3559-3563.
- 363 Fulchignoni-Lataud, M. C.; Tuilie, M.; Roux, J. M. Uridine--cytidine kinase from foetal and adult rat liver. Purification and study of some properties. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *69*, 217-222.
- 364 Orengo, A.; Kobayashi, S. H.; Uridine-cytidine kinase from Novikoff ascites rat tumor and *Bacillus stearothermophilus*. *Methods Enzymol.* **1978**, *51*, 299-307.
- 365 Valentin-Hansen, P. Uridine-cytidine kinase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **1978**, *51*, 308-314.
- 366 Gibco™ Invitrogen Produkte für die Zellkultur · Medien · Seren · Reagenzien. Katalog 2003
- 367 Tritsch, G. L.; Moore, G. E. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media. *Exp. Cell Res.* **1962**, *28*, 360-364.
- 368 *Product Information Sheet, TRYPAN BLUE 0,4 %*,
online: <http://www.stemcell.com/technical/07050-PIS.pdf>
- 369 anatomy.uams.edu/.../atlas_html/n2a1p1.html
- 370 Lohse, M. J.; Lenschow, V.; Schwabe, U. Interaction of Barbiturates with Adenosine Receptors in Rat Brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1984**, *326*, 69-74.

-
- 371 Bruns, R. F.; Lu, G. H.; Pugsley, T. A. Characterization of the A₂ receptor labeled by [³H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 331-346.
- 372 Markwell, M. A. K.; Haas, S. M.; Bieber, L. L.; Tolbert, N. E. A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **1978**, *87*, 206-210.
- 373 Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
- 374 Rosenthal, H. E. Graphical method for the determination and presentation of binding parameters in complex system. *Anal. Biochem.* **1967**, *20*, 525-532.
- 375 Dieckmann, M. Charakterisierung neuer Radioliganden als pharmakologische Werkzeuge für A₂B- und A₃ Adenosinrezeptoren, Identifizierung neuer Leitstrukturen & Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien. *Dissertation, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*, **2003**.
- 376 Weiland, G. A.; Molinoff, P. B. Quantitative analysis of drug-receptor interactions I. Determination of kinetic and equilibrium properties. *Life Sci.* **1981**, *29*, 313-330.
- 377 Molinoff, P. B.; Wolfe, B. B.; Weiland, G. A. Quantitative analysis of drug-receptor interactions II. Quantitation of receptor subtypes. *Life Sci.* **1981**, *29*, 427-442.
- 378 Manual GraphPad Prism version 3, Analyzing data with GraphPad Prism;
<http://www.graphpad.com/manuals/AnalyzingData.pdf>
- 379 Seamon, K. B.; Daly, J. W.; Metzger, H.; de Souza, N. J.; Reden, J. Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 436-439.
- 380 Cyclic AMP (3H) assay system, code TRK 432, Instruction/Protocol, Amersham Biosciences
- 381 <http://www.chemie.uni-greifswald.de/~biotech/assets/downloads/chromatographie.pps#2>
- 382 SIGMA® Product Information/REGENERATION OF DEAE-CELLULOSE, Sigma Prod. No. D 0909 for Dry Resin
- 383 Superose 12 HR 10/30 Instructions (Amersham)
[http://www1.amershambiosciences.com/aprix/upp00919.nsf/\(FileDownload\)?OpenAgent&docid=FE7DE86EED066669C1256EB40044A84A&file=52176800.pdf](http://www1.amershambiosciences.com/aprix/upp00919.nsf/(FileDownload)?OpenAgent&docid=FE7DE86EED066669C1256EB40044A84A&file=52176800.pdf)
- 384 Amersham Biosciences Katalog 2003 & Radiochemicals & Radiation Safety & Technical Information – Radiochemicals & specific activity & Dilution to a lower specific activity;

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das möglichste getan hat*

*J.W. Goethe, Italienische Reise
16.3.1787*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin **Frau Prof. Christa E. Müller**, die mir die Arbeit an diesem sehr interessanten Thema ermöglicht hat. Besonders danke ich ihr, dass sie mir den nötigen Freiraum bei der Erstellung dieser Arbeit gegeben hat und gleichzeitig auch immer für anregende Diskussionen zur Verfügung stand. Liebe Christa, dein Enthusiasmus und fortwährendes Interesse an der Arbeit haben mich angespornt und den Fortschritt dieser Arbeit stark gefördert.

Frau Priv. Doz. Daniela Gündisch danke ich ganz herzlich für ihre unentwegte Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit. Liebe Daniela, danke für die vielen Anregungen und Diskussionen, für die gemeinsamen Fahrten zum Schlachthof (wie gut, dass Du ein Navigationssystem hast...), für die Bereitstellung von Humanhirn-Membranpräparationen und für die vielen anderen Dinge, die mir bei der Erstellung der Dissertation sehr geholfen haben. Danke auch für die sehr gute Zusammenarbeit im Semester. Du bist eine tolle Semesterleiterin!

Ich danke **Dr. Lenka Muñoz** für die gemeinsam durchstandene – teils schwierige, teils aber auch wunderschöne – Promotionszeit in Bonn. Meine liebe Lenka, dein Verständnis und dein Zuspruch haben mir in vielen schwierigen Situationen während der Promotion weitergeholfen. Danke für's Zuhören, danke für alles! Du bist eine wunderbare Freundin, auf die man sich immer verlassen kann. Auch wenn Du jetzt weit weg im „Amiland“ bist, unsere Freundschaft bleibt!

Dr. Karl Vollmann danke ich für die leider viel zu kurze, aber tolle gemeinsame Zeit in unserem, wie er so schön formuliert hat, „Denkraum“. Lieber Karl, danke, dass Du mir zu Beginn meiner Promotionszeit geduldig und immer mit einem Lächeln alles wichtige erklärt hast. Danke für den superdünnen Kaffee (starker Kaffee ist sowieso ungesund), für die Nussecken vom Bioladen, vor allem aber für die sehr interessanten Gespräche. Die gemeinsame Zeit im Institut war kurz, wird aber unvergessen bleiben.

Ich danke **Fabian Heisig** für die gemeinsame sehr schöne und lustige Promotionszeit und unsere legendäre Reise nach Prag...Lieber Fabian, danke für das Erlernen der türkischen (und nicht zu vergessen natürlich der „Ding“) Sprache, auch wenn Du sie manchmal gegen mich verwendet hast. Danke für den gleichleibend tollen Empfang, immer wenn ich zur Tür reingekommen bin. Und danke für die vielen kontroversen Diskussionen über Religion, Toleranz und Gleichberechtigung: sorry, aber ich bin immer noch der Meinung, dass Männer keinen Gleichstellungsbeauftragten brauchen...es war immer sehr schön, mit Dir das Büro zu teilen!

Andreas Brunschweiger danke ich für die vielen schönen Momente in Poppelsdorf sowie in Prag. Danke für die wohltuenden Rückenmassagen und Dein Interesse an der türkischen Sprache. Lieber Andreas, mein Angebot gilt: Wenn Fabian mitkommt, mache ich bei der Fahrradtour durch Rußland mit...

Frank Umbach danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Arbeiten (und Rumschrauben) an der „alten“ CE (gemeinsam leidet es sich besser...) und für die LC/MS-Untersuchungen. **Heiko Meyer** danke ich für die QSAR-Studien und sein nettes Lächeln (☺). Lieber Heiko, danke dafür, dass Du mit deiner lockeren und netten Art immer für lustige Momente gesorgt hast!

Stephan Rathmann danke ich sehr für seine Hilfsbereitschaft. Lieber Stephan, danke, dass Du mir immer geholfen hast, wenn Not am Mann war: danke u.a. für die Fahrt zum Schlachthof im Caprio, für deinen Einsatz an der CE sowie für die sehr gute „Kooperation“ bei der Schrankabgabe des 5.Semesters.

Allen Jungs zudem ein großes Dankeschön für die immer lustigen und kurzweiligen Mittagspausen beim „Türken“ (die eigentlich gar keine Türken waren...)! Ihr seid schon sehr nette deutsche Männer!

Daniel Geich-Gimbel danke ich dafür, dass er sich so schnell bei uns eingelebt und tatkräftig zur guten Laune im Büro beigetragen hat. Lieber Daniel, danke auch für die hilfreichen Tipps in Sachen Promotions-Zulassung!

Ich danke **Dr. Till Schumacher** für die Unterstützung bei unserem „Uridin-Projekt“. **Thomas Bormann** und **Dr. Huu Phuoc Lee** danke ich für die Synthese von Uridil-Derivaten.

Danke an die lieben Kolleginnen und Kollegen im alten (Endenich) und neuen (Biozentrum) Isolabor **Svenja Lacher**, **Markus Genau**, **Nicole Florin**, **Dieter Baumert**, **Stefan Künne** (Viel Glück in Österreich!), **Dr. Marko Kaulich**, **Sonja Hinz**, **Marion Schneider**, **Birgit Preiss**, **Dr. Martina Dieckmann**, **Dr. Cristina Tilotta**, **Franziska Streicher**, **Aliaa Abdelrahman**, **Geun Yung Ko**, **Anja Scheiff**, **Simone Gorzalka**, **Petra Hillmann** und **Andrea Themann** für die Hilfsbereitschaft und die (trotz unerträglicher Hitze im Sommer) heitere und angenehme Atmosphäre.

Darüber hinaus danke ich **Svenja Lacher** dafür, dass sie mir bei so vielen Dingen geholfen hat. Liebe Svenja, danke für die sehr interessanten Diskussionen über das „Uridin-Projekt“, die zahlreichen „Taxi-Fahrten“ in und um Poppelsdorf. Und dafür, dass Du während meiner „Schreibphase“ so vieles für mich im Institut erledigt hast! Danke!

Markus Genau danke ich sehr für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen zur Klärung von Problemen. Lieber Markus, die Abende im Isolabor waren in Deiner Anwesenheit viel besser zu ertragen, herzlichen Dank für alles!

Dieter Baumert danke ich ganz herzlich für seine Unterstützung im Isolabor, angefangen von gemeinsamen Fahrten zum Schlachthof bis hin zum Präparieren von Kalbshirnen. Lieber Dieter, danke für die lustige und schöne Zeit. Es hat immer Spaß gemacht mit Dir zusammenzuarbeiten! Du bist nicht nur ein lieber Kollege, sondern auch ein guter Freund! Ich danke **Nicole Florin** für die wirklich schöne gemeinsame Zeit im Isolabor. Liebe Nicole, danke für Deine Unterstützung und die Freundschaft, die sich in so kurzer Zeit entwickelt hat!

Simone Gorzalka danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Züchtung der zahlreichen Zelllinien, bei der Autoradiographie sowie bei den cAMP-Versuchen.

Ich möchte mich bei unserem **IT-Team Dr. Marcus Hubert, Dr. Sven Freudenthal, Heiko Meyer, Markus Pietsch** und **Frank Umbach** ganz herzlich für das Beheben von kleinen und großen „Störungen“ bedanken. Ich weiß, es war nicht immer einfach mit mir. Lieber Marcus, danke für das Lösen von teilweise schwerwiegenden Computerproblemen, auch wenn ich Dich manchmal mit Telefonterror dazu zwingen musste☺. Inzwischen habe ich schon eingesehen, dass auch Computer-Experten nicht alle auftretenden Probleme sofort lösen können und dass man ab und zu die Mails löschen muss...Ein großes Dankeschön gilt auch an Sven, dem es nichts gebracht hat, das Institut zu wechseln. Rechnerprobleme kann man auch über´s Telefon lösen, zumindest kann man´s versuchen. Lieber Sven, insbesondere während der „Schreibphase“ hat es mir sehr weitergeholfen, immer einen wahren Computer-Experten zu Rate ziehen zu können. Ich verstehe zwar immer noch nicht, warum man bei Word nichts mehr hinter das Literaturverzeichnis einfügen kann, aber dank deiner Hilfe hat es ja auch so geklappt.

Bei **Dr. Friederike Fülle** möchte ich mich sehr herzlich für die aufmunternden Worte in der letzten Zeit bedanken. Liebe Fritzi, gratuliere Dir ganz herzlich zur Hochzeit!

Ich danke **Dr. Ralf Mayer** dafür, dass er als Sicherheitsbeauftragter immer um unser Wohl besorgt war und für die sehr angenehme Gesellschaft (und witzigen Sprüchen) insbesondere während meiner „Keller-Labor-Zeit“.

Wolfgang Bosse danke ich sehr für die Hilfen beim Kampf mit der Technik. Lieber Wolfgang, danke für die tolle Unterstützung vor allem, aber nicht nur, während meiner „CE- und FPLC-Zeit“.

Frau Spsychala danke ich ganz ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre immer freundliche und nette Art. Liebe Frau Spsychala, ich weiß nicht, ob ich Ihnen das schon mal gesagt habe, aber ich war immer froh, Sie in der Analysenausgabe vorzufinden, sowohl damals als Studentin als auch später als Doktorandin.

Herrn Belasin danke für die netten und lustigen Gespräche während seinen abendlichen Streifzügen durch die Labore.

Ein großes Dankeschön an unsere **Postdocs:**

Dr. Joachim Burbiel und **Dr. Jörg Hockemeyer** für die Unterstützung bei chemischen Fragestellungen und das „Verschönern“ von teilweise nicht so toll gelungenen Strukturformeln für die Dissertation. Lieber Jörg, ich danke Dir und Marina für die perfekt vorbereiteten Uracil-Stammlösungen.

Dr. Anke Schiedel gilt mein Dank für die vielen interessanten Diskussionen bei biologisch-pharmakologisch angesiedelten Problemen. Nichts gegen die Chemiker, aber es ist schön, endlich mal eine Biologin als Postdoc zu haben! **Dr. Rhalid Akkari** danke ich für die netten Gespräche im Treppenhaus und seinen schönen französischen Akzent (gefällt mir irgendwie...).

AK Gütschow danke ich für die tolle Nachbarschaft und für das (regelmäßige) Aushelfen mit Kaffee, Zucker und Milch. Allen voran danke ich dem Chef der Gruppe Herrn **Prof. Gütschow**, dass er geduldig sein Schicksal ertragen hat, neben dem lautesten Büro des Instituts zu hausen.

Den Mädels **Sonja Kolb, Camino González, Dr. Manuela Meusel** und **Agnieszka Ambrożak** danke ich für die leider (aus Zeitmangel) seltenen, aber dafür umso schöneren Frauenabende („Ich glaube, wir sind hier die lautesten...“). Ihr seid toll! Liebe Sonja, liebe Camino, danke für die Gespräche sowohl fachlicher als auch nicht-fachlicher Natur. Liebe Manuela, danke für die schöne Zeit in Würzburg. **Markus Pietsch** und seinem Mitarbeiter **Reik Löser** (☺) danke ich sehr, dass sie mir nicht nur „ihre“ Geräte (UV/VIS-Spektrometer, Zentrifuge usw.) zur Verfügung gestellt, sondern auch durch perfekte Einarbeitung mir die Arbeit erleichtert haben. Lieber Reik, lieber Markus, danke auch für die vielen Diskussionen über biochemische Methoden und Probleme.

Danke an das gesamte „Gütschow-Team“, dafür, dass ich immer in euren Labors willkommen war und dass ihr mich bei meiner „Mission“, in einem chemischen Institut biochemisch zu arbeiten, so tatkräftig unterstützt habt!

Ein großes Dankeschön an die tollen Frauen unseres Sekretariats **Beate Ponatowski** und **Martina Krumbiegel** für die vielen vielen schnellen und unbürokratischen Hilfen bei der Bewältigung der Bürokratie. Ich war immer sehr gerne bei euch! Liebe Martina, danke auch für den leckeren Kaffee zwecks Überbrückung von Wartezeiten...Liebe Beate, danke auch für die netten Gespräche während den Zugreisen zwischen Bonn und Brühl! Schön, dass wir euch haben!

Ich danke den lieben „Keller-Labor-Kindern“ **Alaa Hayallah, Stephanie Weyler, Heiko Kiefer, Ali Abdelrahman** und **Sven Freudenthal** für die netten Gespräche und Diskussionen und für die (anfängliche) Hilfe beim regelmäßigen Suchen von Labor-Utensilien (das Labor ist einfach zu groß). Lieber Ali, danke für unsere gemeinsame „FPLC-Zeit“ (die Kälte hält einen jung) und danke für die aufwärmenden „Tee-Pausen“ (schwarzer Tee ist das einzig wahre). Lieber Alaa, danke für die Verbreitung von guter Laune und dafür, dass Du in meiner Anwesenheit immer meine arabische Lieblingsmusik gespielt hast!

Meiner lieben Freundin **Susan Asghari-Sehat** danke ich für ihre Unterstützung während meines Studiums und während meiner Promotionszeit und die endlosen Gespräche bei literweise schwarzem Tee. Liebe Susi, ich habe Dir viel zu verdanken, danke für die lange und innige Freundschaft, die uns trotz der Entfernung verbindet.

Meiner lieben Freundin **Güngör Öztürker**, die ich seit meinem 11. Lebensjahr kenne, danke ich sehr für die Unterstützung während der Promotion und die vielen gemeinsamen Erlebnisse. Liebe Güngör, danke für die Aufmunterung in der letzten Zeit, danke für die lange und intensive Freundschaft.

Der größte Dank gebührt meiner Familie, die mir durch uneingeschränkte Unterstützung ermöglicht hat, auch mit einem Kind flexibel und „sorgenlos“ an meiner Promotion zu arbeiten. Ich danke meinen **lieben Eltern**, meinen lieben Schwestern **Emine, Selma, Ebru, Sibel** und **Esra Nur** (genannt Eggi) und meinen lieben Brüdern **Atila, Mustafa** und **Tuncay**, dass sie immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe. Wenn ich einzeln aufzählen müsste, was sie schon alles für mich gemacht haben, wäre meine Doktorarbeit wahrscheinlich doppelt so lang. Es ist schön, eine Großfamilie zu haben, auf die man sich immer verlassen kann! *Hepinizi çok seviyorum!*

Ich danke **meiner Tochter Tuğçe** dafür, dass sie alle Strapazen, die ihr als Tochter einer alleinerziehenden Mutter und Doktorandin nicht erspart geblieben sind, so locker ertragen hat ohne sich je darüber zu beschweren. Und mehr noch: sie hat mich während der Schreibphase immer liebevoll mit Tee und Kekse versorgt. Ich danke ihr, dass sie es immer geschafft hat – egal wie anstrengend der Arbeitstag war – mir ein Lächeln abzubringen. *Canım kızım, seninle gurur duyuyorum!*

DANKE AN ALLE, die durch tatkräftige und moralische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.