

Entwicklung, Charakterisierung, Analytik und Anwendung von Tracern und Tool-Verbindungen für Gq-Proteine

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Markus Kuschak

aus

Velbert

Bonn 2018

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Christa E. Müller
2. Gutachter: PD Dr. Anke Schiedel
3. Gutachter: Prof. Dr. Gabriele König
4. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Manthey

Tag der Promotion: 27.09.2018

Erscheinungsjahr: 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2013 bis Juni 2018 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für das interessante Promotionsthema, ihre Unterstützung, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso bedanke ich mich an dieser Stelle bei PD Dr. Anke Schiedel für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Für Sandra, Merle, meine Eltern und meine Familie.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Bedeutung, Einteilung und Funktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Funktionsweise von GPCRs	3
1.3. G_q -gekoppelte Rezeptoren und $G\alpha_q$ -Unterklassen	4
1.4. Bedeutung und Rolle des G_q -Proteins	5
1.4.1. Einleitung	5
1.4.2. $G\alpha_q$ -interagierende Moleküle	6
1.4.2.1. Phospholipase C β	6
1.4.2.2. Regulatoren der G-Protein-Signaltransduktion	7
1.4.2.3. Rho-Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor, p63RhoGEFn	8
1.4.2.4. $G\alpha$ -Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor, Ric-8	9
1.4.2.5. Gerüstproteine in der Mikrodomäne der Zellmembran	9
1.4.2.6. Toxine als pharmakologische Werkzeuge	10
1.4.2.7. $G\alpha_q$ -spezifische Inhibitoren: FR900359 & YM-254890	11
1.4.2.8. Einsatz von G_q -spezifischen Inhibitoren in der physiologischen Forschung	12
2. Zielsetzung und Zusammenfassung der Arbeit	13
3. Radioligand-Bindungsstudien	14
3.1. Einleitung	14
3.2. Theoretische Grundlagen der Radioligand-Bindungsstudien	15
3.2.1. Das Massenwirkungsgesetz	15
3.2.2. Berechnung von K_d und B_{max} und die Sättigungsfunktion	16
3.2.3. Berechnung von K_i und IC_{50} in Kompetitionsstudien	16
3.2.4. Berechnung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit	18
3.2.5. Berechnung der Potenz von Inhibitoren	19
3.2.6. Der Hill-Koeffizient n_H	20
4. [3H]PSB-15900 - ein neuer hochselektiver Radioligand zur Charakterisierung des $G\alpha_q$-Proteins	21
4.1. Entwicklung und Synthese	21
4.2. Charakterisierung des Radioliganden [3H]PSB-15900	21
4.3. Methodenentwicklung	23
4.3.1. Strategie	23
4.3.2. Ergebnisse & Diskussion	25
4.3.2.1. Methodenentwicklung der Radioligandbinungsstudien an Rattencortex-Membranpräparationen	25
4.3.2.2. Methodenentwicklung des Radioligandbindungsassays an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen	34
4.3.2.3. Methodenentwicklung an Rattenstriatum-Membranpräparationen	36
4.3.2.4. Methodenentwicklung von Radioligandbinungsstudien an intakten Thrombozyten	37
4.4. Kinetik	39
4.4.1. Assoziationsexperimente – Ergebnisse & Diskussion	40
4.4.2. Dissoziationsexperimente – Ergebnisse und Diskussion	42
4.4.3. Assoziations- & Dissoziationsexperimente – Zusammenfassung	44
4.5. Sättigungsexperimente	45
4.6. Konkurrenzexperimente	47
4.6.1. Testung bekannter und potentieller $G\alpha_q$ -Inhibitoren	47

4.6.2.	Kompetitionsexperimente an humanen Thrombozyten-Membran-präparationen und Rattencortex-Membranpräparationen	47
4.6.2.1.	Ergebnisse aus Kompetitionsexperimenten mit Rattencortex-Membranpräparationen	48
4.6.2.2.	Ergebnisse aus Kompetitionsexperimenten mit humanen Thrombozyten-Membranpräparationen	49
4.6.3.	Kompetitionsexperimente an intakten humanen Thrombozyten	51
4.6.3.1.	Ergebnisse aus Kompetitionsexperimenten mit humanen Thrombozyten-Membranpräparationen	52
4.7.	<i>Kompetitionsexperimente im High-Throughput-Format</i>	53
4.7.1.	Einleitung	53
4.7.2.	Methodenentwicklung	54
4.7.3.	Ergebnisse und Diskussion	56
4.8.	<i>Selektivität des Radioliganden zu den $G\alpha_q$-Protein Untereinheiten</i>	57
4.8.1.	Einleitung	57
4.8.2.	Methodenentwicklung	57
4.8.2.1.	Retrovirale Transfektion von CRISPR- $G\alpha_q$ -knockout HEK Zellen mit humanen $G\alpha_{q11^-}$, $G\alpha_{q14^-}$, $G\alpha_{q15^-}$ -Protein und mit murinem $G\alpha_q$ -Proteinen	57
4.8.2.2.	Bindungsstudien an in CRISPR- $G\alpha_q$ -knockout HEK Zellen überexprimierten $G\alpha_{q11^-}$, $G\alpha_{q14^-}$, $G\alpha_{q15^-}$ und murinen $G\alpha_q$ -Proteinen	59
4.8.3.	Ergebnisse & Diskussion	59
4.9.	<i>Bindungsstudien an Nativen Geweben und Zelllinien</i>	61
4.9.1.	Einleitung	61
4.9.2.	Methode	62
4.9.3.	Ergebnisse & Diskussion	62
4.10.	<i>Einfluss von [3H]PSB-15900 auf die Bindung durch Ionen, Nukleotide, Rezeptor-Agonisten und Phospholipiden</i>	64
4.10.1.	Einleitung	64
4.10.2.	Ergebnisse & Diskussion	65
5.	[3H]PSB-16254 ein neuer hochselektiver Radioligand zur Charakterisierung des $G\alpha_q$-Proteins	68
5.1	<i>Entwicklung & Synthese</i>	68
5.2	<i>Charakterisierung des Radioliganden</i>	69
5.3	<i>Methodenentwicklung</i>	71
5.4	<i>Kinetik</i>	72
5.4.1	Assoziationsexperimente – Ergebnisse & Diskussion	72
5.4.2	Dissoziationsexperimente – Ergebnisse & Diskussion	74
5.4.3	Assoziations- & Dissoziationsexperimente – Zusammenfassung	75
5.5	<i>Sättigungsexperimente</i>	77
5.6	<i>Zusammenfassung der Sättigungsexperimente</i>	78
5.7	<i>Kompetitionsexperimente</i>	79
5.7.1	Einleitung	79
5.7.2	Kompetitionsexperimente an humanen Thrombozyten- Membranpräparationen mit [3H]PSB-16254	79
5.7.3	Ergebnisse aus Kompetitionsexperimenten an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen mit [3H]PSB-16254	79
5.8	<i>Selektivität des Radioliganden zu den $G\alpha_q$-Untereinheiten</i>	80
5.8.1	Einleitung	80
5.8.2	Methode	81
5.8.3	Bindungsstudien an überexprimierten $G\alpha_{q11^-}$, $G\alpha_{q14^-}$, $G\alpha_{q15^-}$ und murinen $G\alpha_q$ aus CRISPR- $G\alpha_q$ -knockout-HEK-Zellen	81

5.8.4	Ergebnisse & Diskussion	81
5.8.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	84
6.	Struktur-Wirkungsbeziehungen der neuen hochselektiven Radioliganden	84
6.1	<i>Einleitung</i>	84
6.2	<i>Analyse der Kinetik-Daten</i>	87
7.	Screening nach neuen potentiellen $G\alpha q$-Inhibitoren	88
7.1	<i>Einleitung</i>	88
7.2	<i>Screening von Arzneistoffbibliotheken</i>	89
7.3	<i>Screening-Methoden</i>	90
7.4	<i>Ergebnisse & Diskussion</i>	91
8.	Bindungsstudien an $G\alpha q$-Proteinen von Insekten	99
8.1	<i>Einleitung</i>	99
8.2	<i>Methode</i>	99
8.3	<i>Ergebnisse & Diskussion</i>	100
9.	Weitere $G\alpha q$-Inhibitoren: BIM und GÜ Verbindungen	100
9.1	<i>Einleitung</i>	100
9.2	<i>Methode und Ergebnisse</i>	101
9.2.1	Kompetitionsstudien an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen	101
9.2.2	Kompetitionsstudien von BIM-Monomer und Dimer gegen [^3H]PSB-15900 an intakten humanen Thrombozyten	104
9.2.3	Zusammenfassung	105
10.	<i>In vivo</i> Studien mit FR900359 an Mäusen – Quantifizierung von FR900359 in Geweben	105
10.1	<i>Einleitung</i>	105
10.2	<i>Etablierung einer hochsensiblen Quantifizierungsmethode mittels LC/MS</i>	105
10.2.1	<i>Einleitung</i>	105
10.2.2	<i>Methode</i>	106
10.2.3	<i>Präzision und Genauigkeit der Methode</i>	106
10.3	<i>Stabilität von FR900359 unter verschiedenen physiologischen und nichtphysiologischen Bedingungen</i>	108
10.3.1	<i>Einleitung</i>	108
10.3.2	<i>Methode</i>	108
10.3.3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	111
10.3.4	<i>Ergänzungen zur Stabilität von FR900359</i>	112
10.4	<i>Extraktion von FR900359 aus nativem Gewebe und Plasma</i>	114
10.4.1	<i>Einleitung</i>	114
10.4.2	<i>Methode & Bestimmung der Wiederfindungsraten</i>	115
10.4.3	<i>Methodenentwicklung - Extraktion von FR900359 mit einem internem Standard</i>	119
10.4.4	<i>Extraktion & Bestimmung des Gehaltes von FR900359 aus nativen Geweben aus <i>in vivo</i>-Studien</i>	122
10.5	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	123
11.	Zusammenfassung der Arbeit und Ausblick	126
11.1	<i>Zusammenfassung</i>	126
11.2	<i>Ausblick</i>	130
12.	ALLGEMEINE ANGABEN	131
12.1	<i>Geräte</i>	131
12.2	<i>Computerprogramme</i>	131

12.3	<i>Materialien</i>	131
12.3.1	Chemikalien und Lösungsmittel	131
12.4	<i>Gewebe-, Zell- & Blutproduktpräparationen</i>	134
12.4.1	Grundlagen	134
12.4.2	Präparation von Rattencortex als Quelle für $G\alpha_q$ -Proteine	134
12.4.3	Präparation von Rattenstriatum als Quelle für $G\alpha_q$ -Proteine	135
12.4.4	Präparation rekombinanter $G\alpha_q$ -Proteine aus HEK-Zellen	135
12.4.5	Präparation von Thrombozyten-Aphärese-Konzentrate als Quelle für $G\alpha_q$ -Proteine	136
12.5	<i>Proteinbestimmung</i>	137
12.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford	137
12.5.2	Proteinbestimmung nach Lowry	137
12.6	<i>Zellkulturmethoden</i>	137
12.6.1	Medium für HEK-Zellen	137
12.6.2	Auftauen neuer HEK-Zellen	138
12.6.3	Kultur von HEK-Zellen / retroviral transfizierter HEK-Zellen	138
12.6.4	Herstellen von HEK-Zellen-Stammlösung	139
13.	Abkürzungsverzeichnis	139
14.	Abbildungsverzeichnis	142
15.	Tabellenverzeichnis	147
16.	Verzeichnis mathematischer Gleichungen	148
17.	Literaturverzeichnis	149
18.	Publikationen	155

1. BEDEUTUNG, EINTEILUNG UND FUNKTION VON G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN

1.1. Einleitung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), auch als 7-Transmembran- (7TM-) Rezeptoren bezeichnet, sind Zielstrukturen von Arzneistoffen und nach wie vor Schwerpunkte umfangreicher Forschungsanstrengungen in Wissenschaft und Pharma-Industrie. Auch wenn zu beobachten ist, dass der derzeitige Trend hin zu monoklonalen Antikörpern geht und bei der Anzahl der Neuzulassungen diese immer häufiger vertreten sind^a, spielen Arzneistoffe, die an GPCRs wirken, weiterhin eine große Rolle. Nicht ohne Grund adressieren in etwa 30 % der zugelassenen verschreibungspflichtigen Arzneimittel GPCRs.¹ Dies liegt vor allem daran, dass viele Botenstoffe, die für die Regulation von Funktionen im Körper zuständig sind, Zellmembranen nicht überwinden können. Um eine Signalweiterleitung oder -Hemmung zu ermöglichen, muss eine Ligand-vermittelte Aktivierung oder Inhibierung an einem Rezeptor stattfinden, die wiederum eine intrazelluläre Signaltransduktion in Gang setzt oder abstellt, und letztendlich in einem biologischen Effekt resultiert. Aufgrund von GPCRs sind wir in der Lage, Reize wie z.B. Riechen, Schmecken, Sehen und Schmerz überhaupt erst zu verarbeiten.

Fredriksson et al. identifizierten 802 humane 7TMR-Gene (auch als GPCR-Gene bezeichnet) und teilten sie basierend auf phylogenetischen Kriterien in fünf Familien ein (Abb. 1). Heute zu Tage sind etwa 826 verschiedene humane 7TMR-Gene bekannt.² Die Familien wurden als *Glutamat*, *Rhodopsin*, *Adhesion*, *Frizzled/Taste2* und *Secretin* abgekürzt, und als GRAFS bezeichnet.² Die Proteine teilen sich zwei Merkmale: Erstens besitzen sie alle sieben Partiaalsequenzen, bestehend jeweils aus 25 bis 35 Aminosäuren mit einem hohen Grad an Hydrophobie, die es ihnen ermöglicht, die Zellmembran zu überspannen. Zweitens besitzen sie die Fähigkeit, mit heterotrimeren G-Proteinen zu interagieren.^{2, 3} Die Adhäsions-Rezeptorfamilie besteht aus 33 Mitgliedern und kann in acht Untergruppen unterteilt werden. Die Mitglieder dieser Familie besitzen diverse, lange N-Termini mit einer proteolytischen Bindungsstelle und mehreren funktionellen Domänen. Die Secretin-Rezeptorfamilie besteht aus 15 Mitgliedern. Alle deorphanisierten Mitglieder dieser Familie binden Peptidhormone. Die Glutamat-Rezeptorfamilie besteht aus 22 7TMR, darunter acht metabotrope Glutamatrezeptoren, 2 GABA-Rezeptoren, ein Calcium-sensitiver Rezeptor, sowie sieben Orphan-Rezeptoren. Die Frizzled/Taste2 Rezeptorfamilie besteht aus 36 Mitgliedern. An Frizzled-Rezeptoren bindet die Familie der Wnt-Glycoproteine. Frizzled-Rezeptoren sind für das kontrollierte Zellsterben, die Proliferation und die

^a European public assessment reports (EPAR) für Humanarzneimittel veröffentlicht durch die European Medicines Agency (EMA).

Polarität der Zellen wichtig. Mit 672 Mitgliedern ist die Rhodopsin-Rezeptorfamilie mit Abstand die größte 7TMR-Rezeptorfamilie. Diese Familie wurde weiter in α -, β -, γ - und δ -Zweige unterteilt. Der α -Zweig enthält viele wichtige Ziele von Arzneistoffen, wie Histamin-, Dopamin- und Serotoninrezeptoren. Der β -Zweig umfasst hauptsächlich Peptid-bindende Rezeptoren wie Endothelin- und Oxytocin-Rezeptoren. Der γ -Zweig hat mehrere Mitglieder, die für die Arzneimittelentwicklung von Interesse sind, wie Angiotensin-, Opioid- und Somatostatin-Rezeptoren. Der δ -Zweig enthält eine Vielzahl von Rezeptoren, die durch Nukleotide, Lipide oder Peptide aktiviert werden, z.B. P2Y-Rezeptoren, Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR), Leukotrien-Rezeptoren sowie die olfaktorischen und viele Orphan-Rezeptoren.^{2;4}

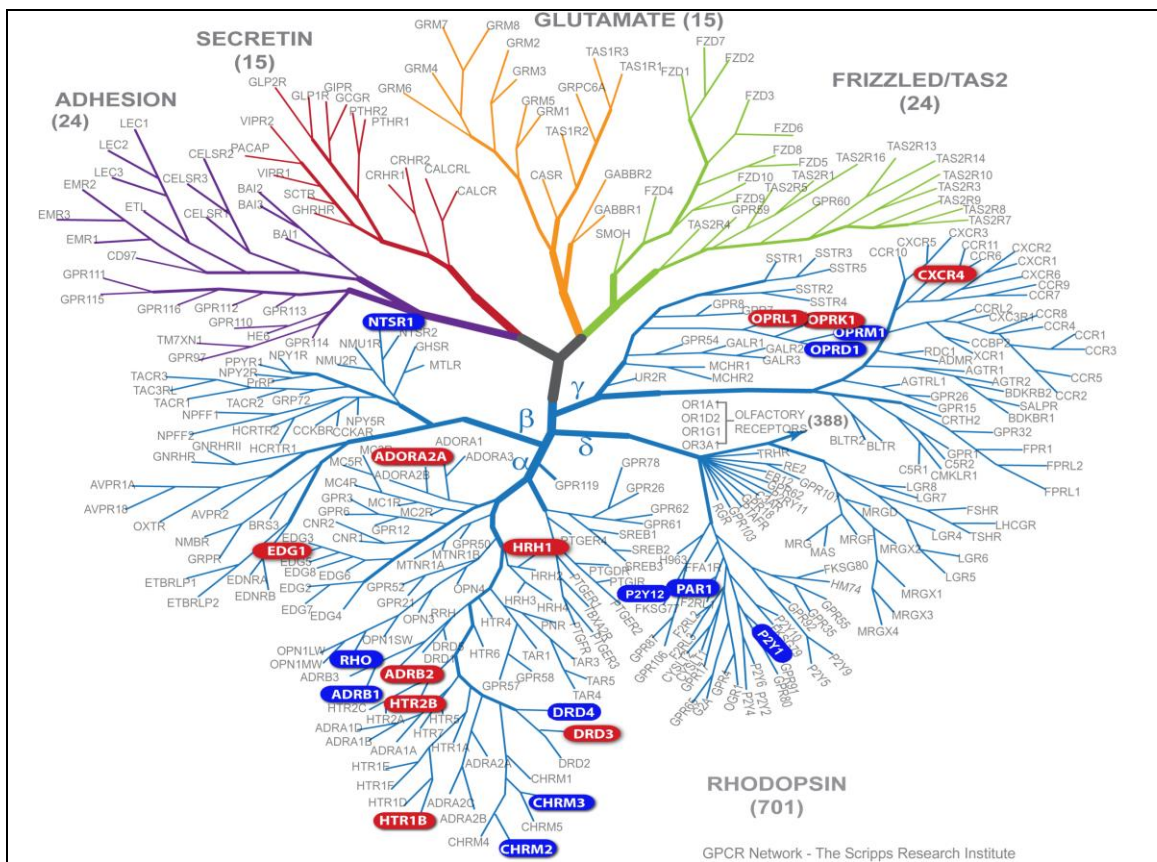


Abb. 1: Phylogenetischer GPCR-Baum^a.

Die Fähigkeit, eine breite Palette an Liganden, einschließlich anorganischer Ionen, kleiner organischer Verbindungen, Lipide, Peptide und sogar Proteine, zu binden und durch diese einen Signal in der Zelle zu induzieren, haben die 7TMR im Verlauf der Evolution des eukaryotischen Lebens unersetzlich gemacht. Dies liegt vor allem daran, dass 7TMRs es vielen Organismen ermöglichten, sich leicht an neue sensorische Funktionen anzupassen, was letztendlich zu einem evolutionären Vorteil führte.^{6;5}

^a Phylogenetischer GPCR-Baum, Abbildung von GPCR network, University of Southern California 2018

1.2. Funktionsweise von GPCRs

Ein genereller Mechanismus bei der Signaltransduktion von GPCRs ist, dass nach der Bindung eines Agonisten an den Rezeptor eine Konformationsänderung der transmembranären Helices stattfindet. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung des Rezeptors. Der aktivierte GPCR katalysiert den Austausch von GDP zu GTP an der α -Untereinheit des G-Protein-Heterotrimeres bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheit. Nachdem GTP an die α -Untereinheit gebunden hat, löst sich das Heterotrimer vom Rezeptor und dissoziiert in die α -Untereinheit und die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Diese können getrennt ihre jeweiligen Effektorsysteme beeinflussen. Zur Terminierung des Effektes wird GTP, das an die α -Untereinheit assoziiert vorliegt, durch dessen intrinsische GTPase-Aktivität zu GDP hydrolysiert. Dies führt zur Reassoziierung des Heterotrimeres und zur Inaktivierung des GPCR (Abb. 2).⁷

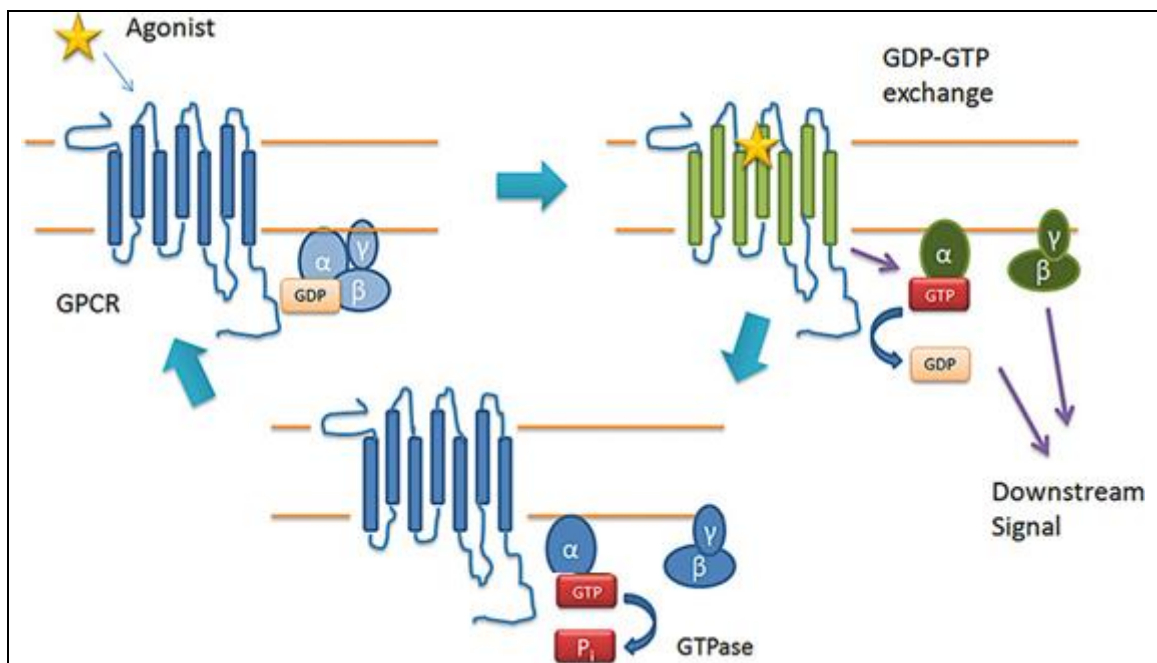


Abb. 2: Aktivierung eines GPCR ⁷.

G-Proteine werden nach ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften, bezogen auf ihre α -Untereinheit, in vier Gruppen unterteilt: G_s , G_i , G_q und $G_{12/13}$, und unterscheiden sich darüber hinaus in ihren Signaltransduktionswegen, vgl. Abb. 3.⁸

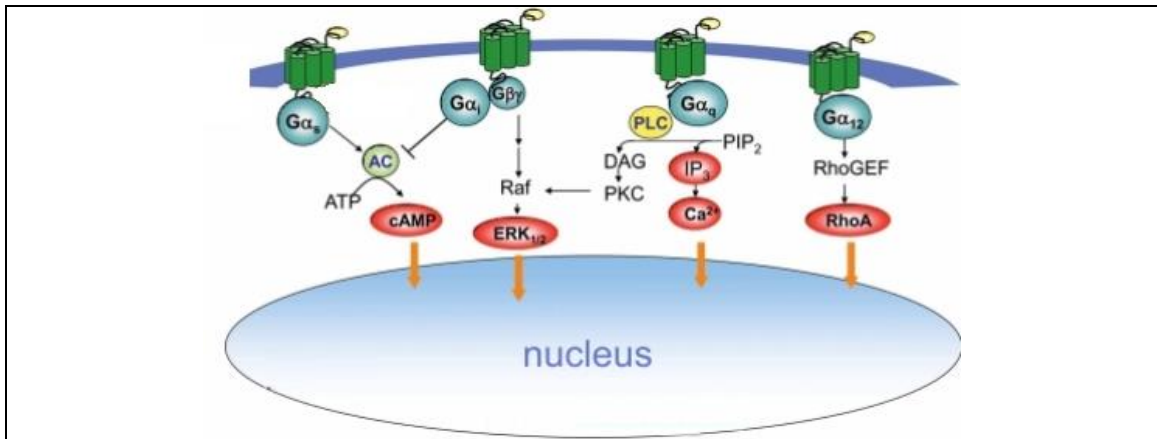


Abb. 3: G α -Signaltransduktionswege.⁹ AC (Adenylatzyklase), ATP (Adenosin-trisphosphat), cAMP (cyclisches-Adenosin-Monophosphat), DAG (Diacylglycerol), IP₂ (Inositol-bisphosphat), IP₃ (Inositol-trisphosphat), PIP₂ (Phosphatidylinositol-bisphosphat), PKC (Proteinkinase C), PLC (Phospholipase C).

1.3. G $_q$ -gekoppelte Rezeptoren und G α_q -Unterklassen

Mitglieder der G α_q -Familie, dies schließt G α_q , G α_{11} , G α_{14} und G $\alpha_{15/16}$ (murin/human) ein, stimulieren die β -Isoform der Phospholipase C (PLC- β), die die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP₂) katalysiert und die Bildung von Inositol-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) zur Folge hat. Diese zwischengeschalteten Botenstoffe dienen dazu, das G $_q$ -vermittelte Signal durch intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung aus IP₃-regulierten intrazellulären Speichern im endoplasmatischen Retikulum (ER) und durch DAG-abhängige Proteinkinase C-(PKC)-Aktivierung zu amplifizieren (Abb. 4). Ca²⁺ und die PKC sind an diversen Signalwegen beteiligt, die verschiedene zelluläre Ereignisse auslösen können.¹⁰

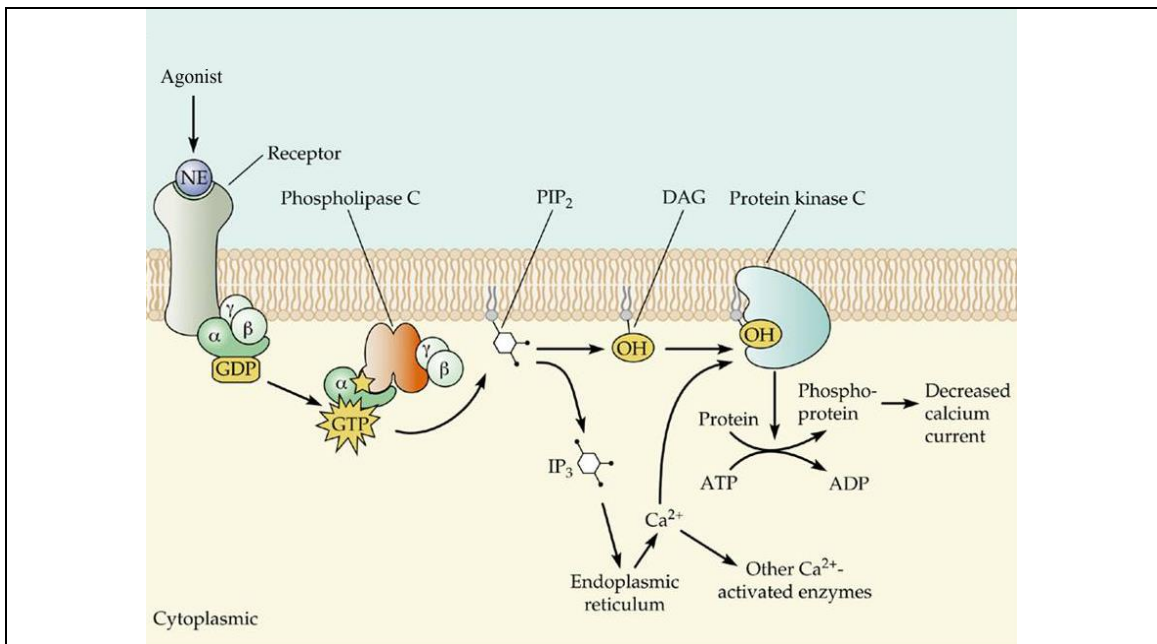


Abb. 4: G $_q$ -vermittelte Signaltransduktion (nach Sinnauer Associates, Inc. 2001).¹¹

Betrachtet man die G α -Untereinheit, so besteht diese aus einer GTPase-Domäne und einer α -helikalen-Domäne (Abb. 5).³ Die GTPase-Domäne ähnelt der anderer Mitglieder der GTP-

bindenden Protein-Superfamilie, einschließlich der monomeren kleinen GTPasen und der translationalen Elongationsfaktoren. Die $G\alpha$ -GTPase-Domäne katalysiert die Hydrolyse von GTP zu GDP und besitzt Bindungsstellen für das $G\beta\gamma$ -Dimer, die GPCRs und weitere Effektoren. Diese Domäne besitzt drei flexible Schleifen, die als Schalterregionen (Switches) I, II und III bezeichnet werden, deren Konformationen von der GDP- bzw. GTP-Bindung abhängen (Abb. 5). Die helikale Domäne enthält sechs Helices und ist einzigartig für $G\alpha$ -Untereinheiten, wobei die genaue Funktion der helikalen Domänen bei der G-Protein-Signaltransduktion noch geklärt werden muss.

12

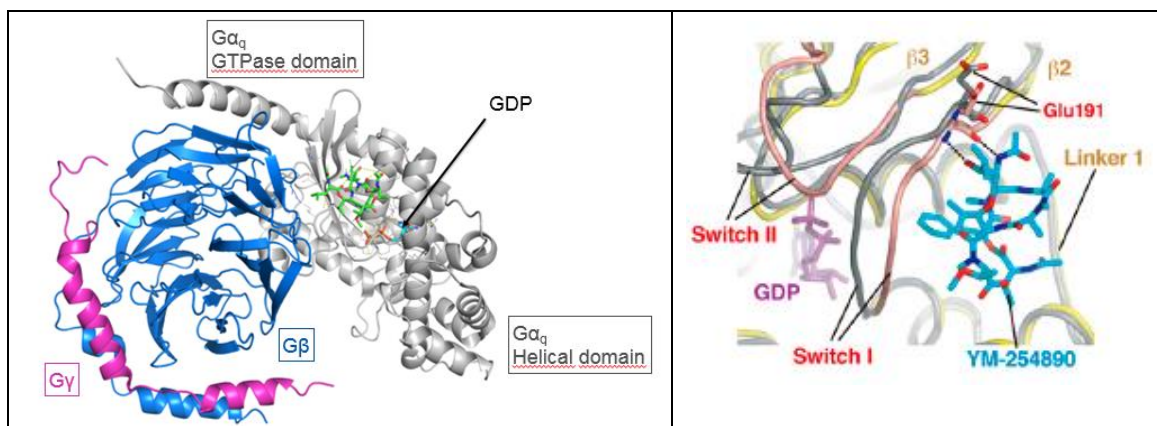


Abb. 5: Darstellung des G-Proteins ($G\alpha\beta\gamma$ -Komplex)^a (links) und Linker/Switch Region der α -Untereinheit (rechts).¹²

1.4. Bedeutung und Rolle des G_q -Proteins

1.4.1. Einleitung

Um die Bedeutung und Rolle des G_q -Proteins zu verstehen, ist es wichtig, einen Überblick über die G_q -interagierenden Proteine, die für die Signalübermittlung wichtigen Moleküle, Bindungspartner und deren physiologische Funktion zu besitzen.

So haben Bindungspartner von G_q das Potential, entweder als Effektoren von G_q oder als Modulatoren der G_q -Signaltransduktion zu wirken. Um den regulatorischen Mechanismus des GTPase-Zyklus zu verstehen und um zu untersuchen, welche G-Protein-Signaltransduktion an bestimmten zellulären Reaktionen beteiligt ist, können Moleküle, wie YM-254890 und FR900359, als nützliche Werkzeuge eingesetzt werden. Die $G\alpha_q$ -Subspezies, ihre Effektoren, Interaktionspartner und regulatorischen Moleküle sind in Tab. 1 zusammengefasst.

^a Abbildung erstellt durch Dr. Vigneshwaran Namasivayam, AG Müller, Universität Bonn.

Tab. 1: $G\alpha_q$ -Subspezies und ihre Bindungs- oder Regulationsmoleküle (Säugetiere).¹⁰

$G\alpha_q$ -Subspezies	$G\alpha_q$	$G\alpha_{q11}$	$G\alpha_{q14}$	$G\alpha_{q15/16}$
Übereinstimmung mit $G\alpha_q$	100%	90%	80%	57%
Vorkommen	Ubiquitär	Ubiquitär	Nieren, Leber, Lunge	Hämatopoetisch
Effektoren				
PLC- β	PLC- β 1, 3, 4	PLC- β 1, 3, 4	PLC- β 1, 3, 4	PLC- β 1, 2, 3
p63-RhoGEF	p63-RhoGEF	p63-RhoGEF	ND*	ND
RGS-Proteine	B/R4 RGS	B/R4 RGS	ND	ND
Interaktionspartner				
Ric-8	Ric-8A, -8B	Ric-8A, -8B	ND	ND
Flotillin	Flotillin-1, -2	Flotillin-1, -2	ND	ND
Caveolin	Caveolin-1	caveolin-1	ND	ND
Regulatorische Moleküle				
PMT (Pasteurella-Pasteurella-multocida-Toxin)	Sensitiv	Unsensitiv	ND	ND
YM-254890, FR900359	Sensitiv	Sensitiv	Sensitiv	Unsensitiv

*ND = nicht bekannt

1.4.2. $G\alpha_q$ -interagierende Moleküle

1.4.2.1. Phospholipase C β

Die PLC- β -Isoformen bei Säugetieren enthalten eine N-terminale Pleckstrin-Homologie- (PH-) Domäne, vier EF-Handmotive (Strukturdomäne in Ca^{2+} -bindenden Proteinen), eine katalytische X/Y-Domäne, eine C2-Domäne und eine C-terminale Erweiterung die aus 400 Aminosäure-Resten besteht; diese ist einzigartig für die PLC- β -Familie (Abb. 6). Die vier Isoformen der PLC- β (β 1- β 4) werden durch $G\alpha_q$ -GTP und $G\beta\gamma$ stimuliert und katalysieren den Inositolphospholipidabbau.¹³ Der detaillierte Mechanismus der Aktivierung durch $G\alpha_q$ ist noch nicht bekannt, aber die C-terminale Verlängerung der PLC- β ist für die Aktivierung und Interaktion mit der $G\alpha_q$ -Untereinheit erforderlich. Alle aktivierten G_q -Subspezies stimulieren alle vier PLC- β Isoformen. Dabei konnte gezeigt werden, dass gereinigtes rekombinantes $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$ und $G\alpha_{14}$ die Isoformen β 1, β 3 und β 4 der PLC aktivieren und nur eine schwache Aktivierung an der β 2-Isoform existiert.^{15-17; 14}

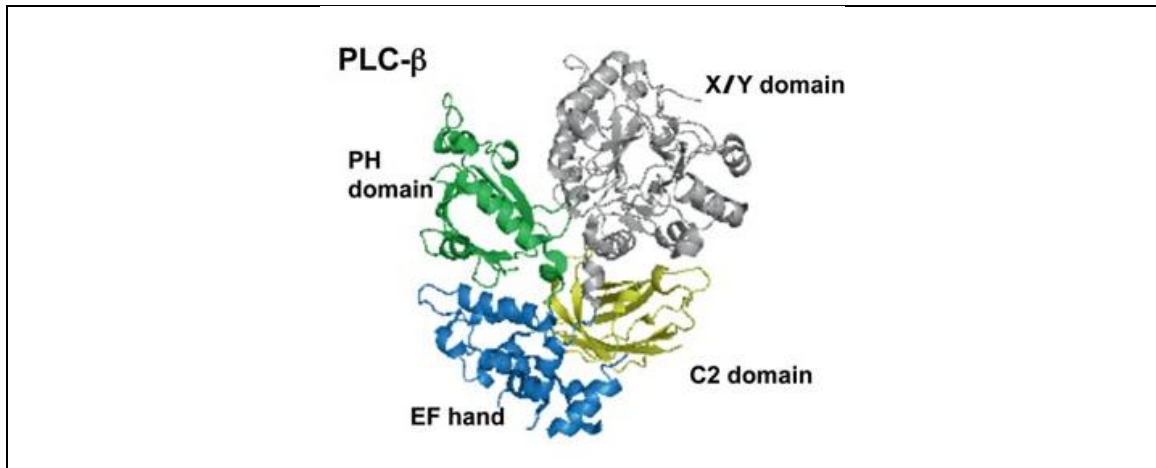


Abb. 6: Phospholipase C β .¹⁰

Die physiologische Relevanz der unterschiedlichen G α -Proteine, G α_q , G α_{11} und G α_{14} , in Zellen und Geweben konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Im Gegensatz dazu aktiviert G $\alpha_{15/16}$, welches nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, die PLC- β_1 , β_2 und β_3 *in vitro*, obwohl PLC- β_2 spezifisch in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird.¹⁸ Daher besteht die Hypothese, dass G $\alpha_{15/16}$ und PLC- β_2 in diesen Zellen funktionell verknüpft sind. Insgesamt existieren Hinweise, dass einige G $_q$ -Subspezies selektiv an Isoformen der PLC- β koppeln und in nativen Zellen eine Gewebe- oder zellspezifische Antwort *in vivo* generieren können.

Die G-Protein-Signaltransduktion wird mittels Hydrolyse von an G α gebundenem GTP zu GDP durch intrinsische Aktivität der GTPase terminiert, wobei diese durch die α -Untereinheit selbst katalysiert wird. Dieser Deaktivierungsprozess von G $_q$ wurde im Detail durch Rekonstitution von M $_1$ -Muscarin Rezeptoren, G-Protein und PLC- β_1 in Lipidvesikeln beschrieben.¹⁹ Hier wurde gezeigt, dass in Gegenwart der PLC- β_1 eine Aktivität induziert werden konnte, wodurch nahe liegt, dass PLC- β_1 ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für G α_q ist. Kinetische Analysen zeigten, dass PLC- β direkt auf G α_q wirkt, um die Hydrolyse von gebundenem GTP anzuregen, und dass die anderen Komponenten des rekonstituierten Systems (M $_1$ -Muskarinrezeptor, G $\beta\gamma$ und Phospholipide) nur den GDP-GTP-Austausch während der steady-state-Hydrolyse fördern.²⁰ Ebenso wurde gezeigt, dass ein Fragment der C-terminalen Region der PLC- β_1 (Reste 903-1042) GAP-Aktivität zeigte.²¹ Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Rezeptor und die PLC- β_1 die Stärke des PLC-Signals steuern und auch die Signalbeendigung regulieren.

1.4.2.2. Regulatoren der G-Protein-Signaltransduktion

Es wurden mehrere Proteine identifiziert, die an der Regulation des GTPase-Zyklus beteiligt sind (Abb. 7). Der GTPase-Zyklus wird durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) (Abb. 7, grün) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert (Abb. 7, violett), wobei der Regulator von G-

Protein-Signalproteinen (RGS) für $G\alpha$ als GAP wirkt und zur Terminierung des G-Protein-Zyklus führt. RGS-Proteine interagieren vorzugsweise mit $G\alpha$ im Übergangszustand der GTP-Hydrolyse und beschleunigen die endogene GTPase-Aktivität von $G\beta\gamma$. Mehr als 20 Mitglieder von RGS-Proteine wurden bisher identifiziert.²² Die RGS-Familie enthält eine konservierte 120-Aminosäure-„RGS-Box“, die $G\alpha$ -GTP bindet um GAP-Aktivität zu induzieren. RGS-Proteine werden in 6-9 Unterfamilien klassifiziert (A/RZ, B/R4, C/R7, D/R12, E/RA, F/GEF, G/GRK, H/SNX, etc.), basierend auf Homologie und Funktion der konservierten Domänen außerhalb der RGS-Domäne. Mitglieder der B/R4-Unterfamilie, einschließlich RGS1, RGS2, RGS3, RGS4, RGS5, RGS8, RGS13, RGS16 und RGS18, sind relativ kleine Proteine (20-25 kDa).^{23; 22} Es wurde berichtet, dass viele dieser Mitglieder an die G_q -Familie binden und die Inositol-Lipid- / Ca^{2+} -Signaltransduktion inhibieren.^{26; 25; 24} Es wurde gezeigt, dass limitierte RGS-Proteine (RGS2, RGS3, RGS4 und RGS18) GAP-Aktivität an $G\alpha_q$ zeigen.²⁷ Die B/R4-Unterfamilie wurde zuerst als GAP für $G\alpha_{i/o}$ identifiziert, daher wurde gezeigt, dass diese RGS-Proteine sowohl $G_{q/11}$ - als auch $G_{i/o}$ -vermittelte Signale in Zellen regulieren. Während die B/R4-Klasse der RGS-Proteine allgemein als negative Modulatoren der $G\alpha_q$ -Signaltransduktion betrachtet werden, besteht die Möglichkeit, dass $G\alpha_q$ auch mit anderen RGS-Klasse-Proteinen interagiert. Daher sind weitere Studien erforderlich, um zu klären, ob diese RGS-Proteine die $G\alpha_q$ -Familie direkt regulieren.

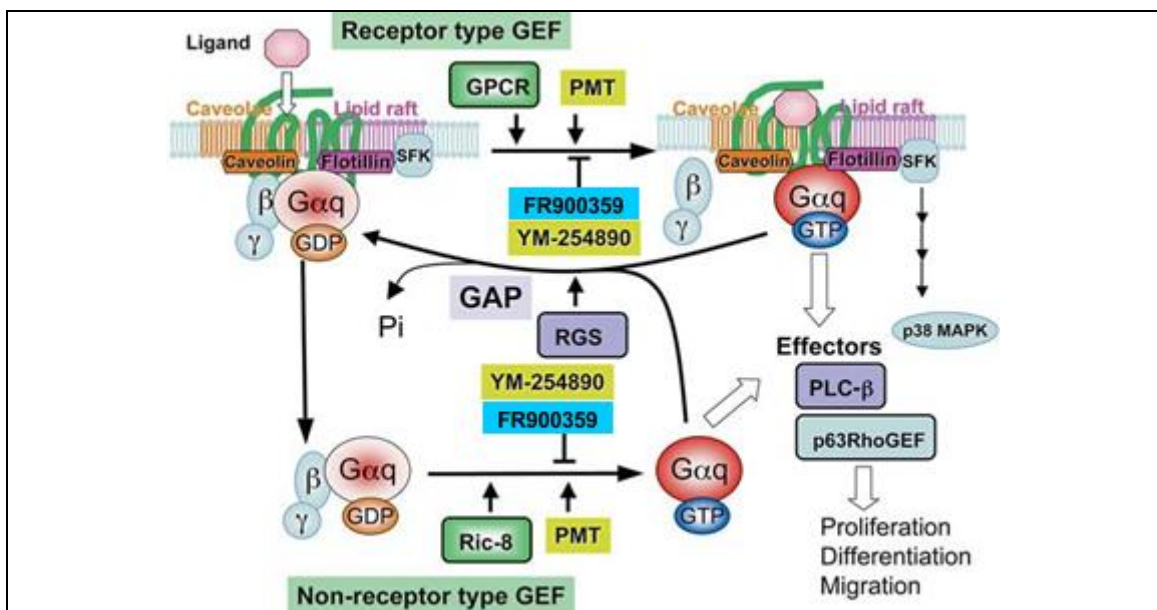


Abb. 7: G_q -Zyklus und die involvierten regulatorischen Moleküle, modifiziert nach Mizuno et al.¹⁰.

1.4.2.3. Rho-Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor, p63RhoGEF_n

Die kleinen GTPasen der Rho-Familie regulieren essentielle zelluläre Prozesse, einschließlich morphologischer Veränderungen, Zellmigration und Proliferation. RhoA, Rac1 und Cdc42 sind die am besten charakterisierten Mitglieder dieser Familie. Sie kontrollieren die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und stimulieren die Gentranskription durch verschiedene Transkriptionsfaktoren,

wie den Serum-Response-Faktor (SRF) oder Nuklear-Faktor κB (NF- κB).²⁸ Der Aktivierungsschritt von einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand zu einem aktiven GTP-gebundenen Zustand wird durch eine große Familie von Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEFs) beschleunigt. Die Signalübertragung von der Stimulation des GPCR zur Aktivierung von RhoA wird durch Dbl-GEFs vermittelt, die auf aktivierte $G\alpha$ -Untereinheiten reagieren. G_q -gekoppelte GPCRs können das Signal an RhoA über einen Weg, der unabhängig von PLC- β ist, übertragen. Durch eine Kristallstruktur von $G\alpha_q$ -p63RhoGEF-RhoA im Komplex konnten die Details der Wechselwirkungen von $G\alpha_q$ mit p63RhoGEF gezeigt werden. p63RhoGEF assoziiert direkt und spezifisch mit aktiviertem $G\alpha_q$, um den Guaninnukleotidaustausch von RhoA, RhoB und RhoC zu verstärken.²⁹

1.4.2.4. $G\alpha$ -Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor, Ric-8

Ric-8 wurde durch eine genetische Untersuchung von Mutanten von *C. elegans* identifiziert, die gegen Inhibitoren der Acetylcholinesterase resistent sind.³⁰ Die Freisetzung von Neurotransmittern in *C. elegans* wird durch die G_q - und G_o -Signalwege gesteuert. Es existieren zwei Homologe von RIC-8 die in Säugetieren vorkommen. Sie werden als Ric-8A und Ric-8B bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass Ric-8A eine GEF-Aktivität für $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$ aufweist, nicht jedoch für $G\alpha_s$.³¹ Obwohl die Interaktion von Ric-8B mit $G\alpha_q$ nachgewiesen wurde, ist die Rolle von Ric-8B in der G_q -Signalübertragung noch nicht komplett aufgeklärt.³²

1.4.2.5. Gerüstproteine in der Mikrodomäne der Zellmembran

In Zellmembranen scheinen Cholesterin, Glykolipide und lipidverankerte Proteine Mikrodomänen zu organisieren, die gegenüber der nichtionischen Detergens-Solubilisierung resistent sind. Zwei Domänen, die als Caveolae und Lipid Rafts bezeichnet werden, sind morphologisch und biochemisch unterscheidbar. Beide Domänen enthalten viele Signalmoleküle und es wird angenommen, dass sie an der Kompartimentierung und der Zelloberflächen-Signalweiterleitung beteiligt sind. Lipid Rafts sind die Mikrodomänen von Zellmembranen, die mit verschiedenen Lipiden wie Cholesterin und Sphingolipiden angereichert sind.³³ Lipid Rafts werden unterteilt in flache Domänen, welche reich an Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Proteinen sind, und in lipidmodifizierte Proteine, in denen ihre Bildung und Detergensresistenz hauptsächlich auf Lipid-Lipid-Wechselwirkungen beruht. Im Gegensatz dazu sind Caveolae („kleine Kavitäten“) glatte, kolbenförmige Invasionen an der Zelloberfläche. Caveolin-1 ist ein an Caveolae angereichertes Gerüstprotein. Ein intaktes Caveolin-1-Gerüst ist für eine effiziente $G\alpha_q$ -Rezeptorkopplung wichtig (Abb. 7, orange).³⁴ Des Weiteren existieren die Lipid-Raft-ständigen Proteine, Flotillin-1/Reggie-2 und Flotillin-2/Reggie-1, die mit $G\alpha_q$ interagieren (Abb. 7, pink).

Flotillin-1 / Reggie-2 und sein Paralog Flotillin-2/Reggie-1, wurden erstmals als Proteine identifiziert, deren Expression während der Axonregeneration in Goldfischen erhöht war.³⁵ Die Expression von Flotillinen wird in verschiedenen zellulären Prozessen wie bei der Insulin-Signaltransduktion, T-Zell-Aktivierung, Membrantransport, Phagozytose, Zellmotilität und Transformation reguliert.³⁶ Es existiert Evidenz, dass Caveolin und Flotillin als Gerüstproteine stabilisierend wirken und wichtig für die Signaltransduktion von G_q sind.³⁷

1.4.2.6. Toxine als pharmakologische Werkzeuge

Die ersten bakteriellen Toxine, die zur Beschreibung der molekularen Mechanismen der heterotrimeren G-Proteinaktivierung und der Adenylatcyclase-vermittelten Signalwege verwendet wurden, waren Cholera toxin (CTX) und Pertussis-Toxin (PTX). CTX wirkt auf die α -Untereinheit von G_s und führt zur konstitutiven Aktivierung von $G\alpha_s$ ^{38; 39}, während PTX auf den heterotrimeren Komplex von $G_{i/o}$ wirkt und zu deren Entkopplung von den Rezeptoren führt^{40; 41}. PTX wurde ursprünglich verwendet, um PTX-unempfindliche G-Proteine zu identifizieren.⁴² Eine dieser G-Protein-Familien wurde als G_q -Familie identifiziert, welche die PLC- β stimuliert. Bis vor einigen Jahren gab es keine spezifisch modulierende Verbindung, um die Rolle von G_q -Proteinen in der hormonabhängigen Kommunikation der Zellen und deren Signaltransduktion zu untersuchen. Ein Toxin, das aus *Pasteurella multocida* (PMT) isoliert wurde und die cyclischen Depsipeptide YM-254890 (aus *Chromobacterium* sp. QS3666) und FR900359 (aus dem Endosymbionten *Candidatus Burkholderia crenata* der *Ardisia crenata*) können nun zur Liste der von Bakterien abgeleiteten Moleküle hinzugefügt werden, die die G_q -Signalweiterleitung modulieren (Abb. 7).

***P. multocida* Toxin (PMT):**

PMT ist ein bakterielles Protein-Toxin aus dem Erreger *P. multocida*.⁴³ Es besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette von 1.285 Aminosäuren, die N-terminale Region des Toxins bindet an Rezeptoren vom Gangliosidtyp und dringt über eine rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen ein.⁴⁴ In der Zellbiologie ist bekannt, dass PMT als hochpotentes Mitogen auf verschiedene Arten von kultivierten Zellen einwirkt. Es wurde festgestellt, dass PMT die G_q -abhängige PLC- β -Stimulation aktiviert.⁴⁵ Dies ermöglichte vielen Wissenschaftlern, PMT als pharmakologisches Werkzeug zur Untersuchung von G_q -gekoppelten PLC-Signalen zu verwenden.⁴⁶ PMT scheint die $G\alpha_q$ -Kopplung an PLC- β_1 zu erleichtern, was zu der gleichen zellulären Antwort führt wie die, welche durch G_q -gekoppelte Rezeptoren hervorgerufen wird. Wilson et al.⁴⁷ identifizierten das intrazelluläre Ziel von PMT unter Verwendung der Antikörper gegen die IP_3 -Signalproteine in *Xenopus*-Oozyten. Der Antikörper gegen $G\alpha_{q/11}$ blockierte PMT-induzierte Ca^{2+} -abhängige Cl-

Ströme, während die Antikörper gegen andere $G\alpha$ oder $G\beta$ dies nicht taten. Der genaue molekulare Mechanismus der Wirkung von PMT blieb bis dahin jedoch unbekannt. Maus-Knockout-Zelllinien wurden daraufhin verwendet, um zu bestätigen, dass die PMT-induzierte Bildung von Inositolphosphat ausschließlich von $G\alpha_q$, nicht jedoch von $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$ oder $G\alpha_{13}$ abhängig war.⁴⁷ Eine in 2004 durchgeführte Studie, mit einer Reihe von Chimären zwischen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ in $G\alpha_{q/11}$ -Knockout-Zellen, identifizierte eine Region in der helikalen Domäne von $G\alpha_q$, die für die PMT-induzierte Aktivierung von PLC- β wichtig ist.⁴⁸ Weitere Forschungen aus 2013 ergaben, dass das Toxin wichtige Glutamin-Reste (Gln) in dieser Domäne der $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12/13}$ und $G\alpha_{i1/2/3}$ desamidiert. Alle diese Desamidierungsreaktionen, die durch PMT katalysiert werden, bewirken eine anhaltende Aktivierung der G-Proteine.⁴⁹

1.4.2.7. $G\alpha_q$ -spezifische Inhibitoren: FR900359 & YM-254890

YM-254890 ist ein cyclisches Depsipeptid, das aus Kulturen von *Chromobacterium sp.* QS3666 gewonnen werden kann. Erste Studien aus 2003 bis 2006 mit YM254890 zeigten, dass die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation mit einem IC_{50} -Wert von 0,26 μM gehemmt wurde^{50; 51; 51}, und antithrombotische und thrombolytische Effekte zu beobachten waren^{52; 54; 53}. YM-254890 inhibiert die durch ADP in Plättchen- und P2Y1-exprimierenden Zellen induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung. Darüber hinaus konnte die Blockade der Ca^{2+} -Mobilisierung durch mehrere $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren beobachtet werden, jedoch nicht bei G_i - und G_{15} -gekoppelten Rezeptoren⁵⁵, was darauf hindeutet, dass YM-254890 ein spezifischer Modulator der $G_{q/11}$ -Aktivierung ist. YM-254890 blockiert die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung und die SRF (Serum-Response-Faktor)-vermittelte Gentranskription in Reaktion auf G_q -gekoppelte Rezeptoren. Darüber hinaus wird die durch Agonisten induzierte GTP-Bindung an das Heterotrimer von $G_{q/11}$ an Zellmembranpräparationen durch YM-254890 gehemmt.⁵⁵ Bisher konnten keine YM-254890-Derivate und Analoga hergestellt oder aus dem beschriebenen Chromobakterium isoliert werden, die eine höhere Affinität in verschiedenen *in-vitro*-Bindungsstudien vorwiesen als YM-254890. Die Totalsynthese des synthetisch sehr schwer zugänglichen Moleküls wurde kürzlich veröffentlicht.^{56; 57} YM-254890 stellt ein nützliches Werkzeug dar, das zur Analyse der G-Protein-Aktivierung und der G_q -vermittelten Signaltransduktion verwendet werden kann (Abb. 7).

FR900359 ist ein cyclisches Depsipeptid, welches erstmalig 1988 aus den Blättern der immergrünen Pflanze *Ardisia Crenata* isoliert werden konnte.⁵⁸ Obwohl dies nunmehr 30 Jahre her ist, wurde dieses Molekül nie hinreichend systematisch erforscht. Erst seit kurzem fokussiert sich die Forschung auf dieses Molekül, dessen Struktur der des gut beschriebenen YM-254890 ähnelt.

Durch die Arbeitsgruppe Kostenis, Universität Bonn, wurde gezeigt, dass FR-900359 in die G_q -Aktivität des komplexen Signalnetzwerks, sowohl in lebenden Zellen, als auch in einem *ex-vivo*-Modell der G_q -vermittelten Vasokonstriktion eingreift. Darüber hinaus wurde durch CRISPR-Cas9-Gq-KO Zellen gezeigt, dass FR900359 nicht die Signaltransduktion beeinflusst, wenn $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ nicht mehr vorhanden sind, wodurch ein exklusiver Wirkmechanismus an $G_{q/11}$ gezeigt wurde. Das Inhibitionspotential der G_q -vermittelten Signaltransduktion von FR900359 wurde in Ca^{2+} -Mobilisierungsstudien wie auch durch IP_3 -Assays an $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, jedoch nicht an $G\alpha_{15}$ gezeigt.⁵⁹ Hierdurch kann FR900359 als ein selektiver pan- G_q -Inhibitor bezeichnet werden, der ein nützliches Werkzeug für die weitere Erforschung der G_q -vermittelten Signaltransduktion aufweist und darüber hinaus Potential hat, als Arzneistoff eingesetzt zu werden.

1.4.2.8. Einsatz von Gq-spezifischen Inhibitoren in der physiologischen Forschung

Auf dem Gebiet der Neurowissenschaften verwendeten bisher mehrere Forscher YM-254890. So konnte ein neuer G_q -gekoppelter Orphan-GPCR, GPRg1 genannt, der bevorzugt in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems exprimiert wird, identifiziert werden⁶⁰, sowie die Beteiligung von $G_{q/11}$ -Signalwegen am Endothelin-B-Rezeptor bei der Proliferation neuraler Vorläuferzellen aufgeklärt werden.⁶¹

FR900359 wurde auf vasorelaxierende Wirkung an Rattenaortenarterien untersucht. In endothelium-denudierten Ringen der Arterien führte FR900359 in sehr niedrigen Konzentrationen (0,1 μ M) zu einer signifikanten Abschwächung der durch K^+ -induzierten Kontraktionen und verhinderte vollständig Ca^{2+} -induzierte Kontraktionen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein vasorelaxierender Effekt von FR900359 durch die erhöhte Freisetzung von NO aus Endothelzellen bei niedrigen Konzentrationen vermittelt wird.⁶²

Die G_q -vermittelte Signaltransduktion spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Atemwegserkrankungen und beeinflusst die Bronchokonstriktion und den Umbau der Atemwege, einschließlich des Wachstums und der Entzündungsreaktionen der glatten Muskulatur der Atemwege. Die Hemmung der Aktivierung von G_q kann hier ein vorteilhafter therapeutischer Ansatz sein. So wurde bereits *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* gezeigt, dass FR900359 in diesem Zusammenhang selektiv mehrere G_q -gekoppelte Rezeptoren hemmt, einschließlich dem Protease-aktivierten Rezeptor 1, dem muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor M_3 und dem Histamin- H_1 -Rezeptor, und sich dies positiv auf den Tonus und die Physiologie auswirkt.^{64; 63}

In braunem und beigem Fettgewebe wurde gezeigt, dass FR900359 in den G_q -vermittelten Signaltransduktionsweg eingreift und aktiv die Bildung von braunem Fettgewebe beeinflusst. Hemmung von G_q verstärkte die Differenzierung von humanen und murinen braunen Adipozyten,

wohingegen die Aktivierung von G_q die Bildung von braunem Fettgewebe unterband. Braunes und beiges Fettgewebe sind, im Gegensatz zu weißem Fettgewebe, in der Lage, die Energie aus Nahrung in Wärme umzuwandeln. Diese Erkenntnisse könnten ebenfalls zu einem neuen therapeutischen Ansatz zur Bekämpfung von Fettleibigkeit führen. ⁶⁵

GPCRs können Multiprotein-Komplexe (Heteromere) bilden, die die Pharmakologie und Funktionen der konstituierenden Rezeptoren verändern können. So wurde gezeigt, dass der $G_{q/11}$ -gekoppelte Serotonin-5-HT_{2A}-Rezeptor und der $G_{i/o}$ -gekoppelte metabotrope Glutamat 2 – (mGlu2-) Rezeptor sich zu einem heteromeren Komplex vereinigen können und an der Signaltransduktion beteiligt sind, die mit Psychosen (Schizophrenie) assoziiert wird. FR900359 konnte dabei die Ca^{2+} -Mobilisierung über den 5-HT_{2A}-Rezeptor verhindern, was signifikant die Bildung eines Heteromers mit dem mGlu2-Rezeptor verhindern konnte. ⁶⁶

Auch in Bezug auf die Krebsforschung sind selektive G_q -Inhibitoren von Bedeutung. So unterdrückt FR900359 viele der Hauptmerkmale, die für die Malignität von Melanomzellen von zentraler Bedeutung sind, wie zum Beispiel die Zellmigration. Durch den Einsatz von FR900359 können neue Möglichkeiten für therapeutische Interventionen geschaffen werden. ⁵⁹

Da etwa 21 Prozent der GPCRs im Menschen an G_q koppeln, stellen FR900359 und YM-254890 äußerst wichtige pharmakologische Werkzeuge dar, was die aufgeführten Beispiele aus der aktuellen Forschung bekräftigen. ⁶⁵ Beide Moleküle bieten die Möglichkeit, ein genaueres Verständnis über die pathophysiologischen Mechanismen verschiedener Rezeptoren und Signalwege, in denen die G_q -vermittelte Signaltransduktion eine Rolle spielt, zu erlangen. Darüber hinaus können sie neue therapeutische Ansätze liefern.

2. ZIELSETZUNG UND ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der beiden Radioliganden [³H]PSB-15900 und [³H]PSB-16254, die im Arbeitskreis Müller in Kooperation mit der AG König, Universität Bonn, als pharmakologische Werkzeuge zur Untersuchung des $G\alpha_q$ -Proteins entwickelt wurden. G_q -gekoppelte Rezeptoren sind weit verbreitet und spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion durch die sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. [³H]PSB-15900 und [³H]PSB-16254, die auf der Struktur der pan- G_q -Inhibitoren FR900359 und YM-254890 basieren und durch deren Hydrierung mit Tritiumgas hergestellt wurden, werden benötigt, um selektive $G\alpha_q$ -Inhibitoren zu identifizieren, die als potentielle Arzneistoffe zur Behandlung von Krankheitsbildern, deren Verlauf über die Inhibition des $G\alpha_q$ -Proteins verbessert oder geheilt

werden kann. Dies konnte bisher auf Grund des Fehlens eines kommerziell verfügbaren, hochselektiven und hochaffinen $G\alpha_q$ -Antagonisten nicht geleistet werden.

Neben der Charakterisierung der Radioliganden [3H]PSB-15900 und [3H]PSB-16254, wurde für diese ein Bindungsassay entwickelt, der die Voraussetzung für die Entdeckung neuer Wirkstoffe darstellt. Des Weiteren wurde der etablierte Radioligand-Bindungsassay auf die Methode des Hochdurchsatz-Screening (HTS) für beide Radioliganden übertragen, die Assays wurden etabliert und mittels dieser Methode nach neuen potentiellen Arzneistoffen gesucht. Die Ergebnisse aus den HTS-Assays wurden analysiert und die identifizierten Hit-Verbindungen charakterisiert. Weitergehend wurden die Eigenschaften der Radioliganden verglichen, um deren Bindungseigenschaften genauer erklären zu können.

Mittels Radioligand-Bindungsstudien mit [3H]PSB-15900 und [3H]PSB-16254 wurden die pan- G_q -Inhibitoren FR900359, dessen Derivate und YM-254890 charakterisiert, sowie die Affinitäten der beiden Radioliganden zu den verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten ($G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$) untersucht.

Mittels Radioligand-Bindungsstudien mit [3H]PSB-15900 wurde der Einfluss von Ionen, Lipiden und Agonisten auf die $G\alpha_q$ -Bindung des Liganden sowie das Vorkommen von $G\alpha_q$ -Proteinen in verschiedenen humanen und murinen nativen Geweben und Zellen untersucht.

In einem Kooperationsprojekt wurden Beiträge (Analytik von FR900359) zur möglichen Anwendung des pan- G_q -Inhibitors FR900359 als Bronchodilatator in *in vivo*-Studien an Mäusen geleistet. Dafür wurden in Zusammenarbeit mit den AG Wenzel und Fleischmann, Universität Bonn, FR900359-Konzentrationen in Organen nach *in vivo*-Applikation quantifiziert, um dessen Verteilung und Metabolisierung zu erforschen. Um FR900359 in, bzw. aus nativen Geweben quantitativ nachweisen zu können, wurde eine hochsensible und exakte LCMS-Methode, wie auch ein Extraktionsverfahren für FR900359 aus nativen Geweben entwickelt. Des Weiteren wurden Stabilitäts- und Metabolisierungsstudien durchgeführt.

3. RADIOLIGAND-BINDUNGSSTUDIEN

3.1. Einleitung

Radioligand-Bindungsstudien bieten die Möglichkeit einen Radioliganden, das heißt ein radioaktiv markiertes Molekül, welches sich durch eine hohe spezifischen Aktivität und Affinität zu einer bestimmten Zielstruktur auszeichnet, wie zum Beispiel zu einem Rezeptor oder zu einem Protein, einzusetzen, um Aufschluss über neue Rezeptoren, die Zielstruktur, zu gewinnen und um Rezeptorsubtypen zu charakterisieren. ⁶⁷ Diese mehr als 35 Jahre alte Technik hat nicht an

Aktualität verloren und bietet eine direkte Möglichkeit, die Bindungsstellen biochemisch zu charakterisieren.

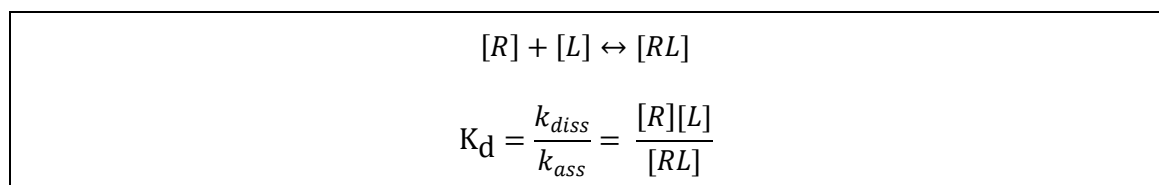
Dabei wird in der Regel die zu untersuchende Testsubstanz mit Membranpräparationen von Zellen, intakten Zellen oder intakten Geweben zusammen mit dem Radioliganden inkubiert. Testsubstanz und Radioligand können so um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren (Kompetitionsstudie), bis sich ein Bindungs-Gleichgewicht eingestellt hat. Um nicht gebundenen Radioliganden und nicht gebundene Testsubstanz von dem Teil, welcher an das eingesetzte Protein gebunden hat, zu separieren, setzt man einen Filtrationsprozess ein. Dies kann z.B. über eine Filtermembran geschehen, die nur das eingesetzte Protein im Filter zurückhält, wodurch es von den löslichen Komponenten getrennt wird. Dieser Filter wird daraufhin auf Radioaktivität untersucht und gibt Aufschlüsse, ob nur der Radioligand gebunden hat, oder auch die Testsubstanz. Dabei würde eine niedrige gemessene Radioaktivität für die erfolgreiche Bindung der Testsubstanz sprechen, da diese den Radioliganden aus seiner Bindung verdrängt hat. Eine hohe gemessene Radioaktivität würde bedeuten, dass die Testsubstanz nicht in der Lage war, den Radioliganden zu verdrängen, und folglich nicht gebunden hat. Auf diese Weise erhält man Daten zur Affinität von Liganden zu Rezeptoren / Zielstrukturen, ermittelt die maximale Rezeptoranzahl in Geweben und erhält direkt Auskunft über die Bindung.

3.2. Theoretische Grundlagen der Radioligand-Bindungsstudien

3.2.1. Das Massenwirkungsgesetz

Da für Radioliganden diverse Zielstrukturen existieren, wird im folgenden Verlauf die Zielstruktur vereinfacht als Rezeptor bezeichnet.

Die Wechselwirkungen zwischen Rezeptor [R] und Ligand [L] und die Bildung des Radioligand-Komplexes [RL] lassen sich durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben ⁶⁸:



Gl. 1: Das Massenwirkungsgesetz.

Die Reaktion des Liganden mit dem unbesetzten Rezeptor zum Rezeptor-Ligand-Komplex [RL] ist durch die Assoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{ass} gekennzeichnet. Die Rezeptor-Ligand-Komplexe zerfallen anschließend in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{diss} . Im Gleichgewicht gilt:

$$k_{diss}[R][L] = k_{ass}[RL]$$

Gl. 2: Gleichgewicht der Reaktion zwischen Assoziation und Dissoziation.

3.2.2. Berechnung von K_d und B_{max} und die Sättigungsfunktion

Als Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor verwendet man die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d , die sich aus dem Quotienten aus k_{diss} und k_{ass} ergibt:

$$K_d = \frac{k_{diss}}{k_{ass}} = \frac{[R][L]}{[RL]}$$

Gl. 3: Berechnung des K_d -Wertes I.

Die spezifische Bindung des Liganden an den Rezeptor ist sättigbar. Die Summe der freien und besetzten Rezeptoren ergibt B_{max} .

$$B_{max} = [R] + [RL]$$

Gl. 4: Berechnung von B_{max} .

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_d), sowie die Gesamtzahl der Rezeptoren B_{max} können durch homologe Kompetitions-Experimente bestimmt werden, wobei der K_d proteinspezifisch ist und daher für jede unterschiedliche Art, wie z.B. humane Thrombozyten-Membranpräparation oder Rattencortex-Membranpräparation, jedes Mal neu bestimmt werden muss. Da angenommen wird, dass hier der Ligand im Überschuss vorliegt ergibt sich K_d wie folgt:

$$K_d = \frac{[B_{max} - RL] \cdot [L]}{[RL]}$$

Gl. 5: Berechnung des K_d -Wertes II.

Die Gleichgewichtskonstante K_d ist daher ein Maß für die Affinität des Liganden zu dem Rezeptor. Löst man diese Gleichung nach $[RL]$ auf, erhält man die sogenannte Sättigungsfunktion.

Sie zeigt, dass die Menge der besetzten Rezeptoren von der Konzentration des Liganden abhängt.

$$[RL] = \frac{B_{max} \cdot [L]}{K_d + [L]}$$

Gl. 6: Die Sättigungsfunktion.

3.2.3. Berechnung von K_i und IC_{50} in Kompetitionsstudien

Die Messung der Effekte des Kompetitors, in der Regel die Kaltsubstanz des Radioliganden, auf die Assoziations- oder Dissoziationskinetik des jeweiligen Radioliganden erfolgt durch die Erfassung der Anzahl der Rezeptor-Ligand-Komplexe in Abhängigkeit von der Zeit. Dazu werden die Versuchsbedingungen derart gewählt, dass Assoziations- oder Dissoziationsvorgänge isoliert

beobachtet werden können, die im Gleichgewicht durch folgende Gleichung beschrieben werden können:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{ass}[R][L] - k_{diss}[RL]$$

Gl. 7: Bildung der Rezeptor-Ligand-Komplexe in Abhängigkeit von der Zeit.

Bei der Durchführung von Konkurrenz-Experimenten unterscheidet man die homologe und die heterologe Konkurrenz. Im Falle der homologen Konkurrenz unterscheiden sich Radioligand und Konkurrent nicht in ihrer Struktur, wohingegen bei der heterologen Konkurrenz Radioligand und Konkurrent verschiedene Strukturmerkmale aufweisen. In beiden Fällen wird jedoch dieselbe orthosterische Bindungsstelle am Rezeptor angenommen.

Mit Hilfe der homologen Konkurrenz lassen sich die Affinität des Liganden zum Rezeptor (K_d) und die Gesamtzahl der möglichen Bindungsstellen (B_{max}) bestimmen, die wiederum von der Menge an eingesetzten Protein abhängt. Durch halblogarithmische Auftragung der Daten und anschließende Analyse mittels nichtlinearer Regressionsanalyse und Verwendung der logistischen Gleichung ergibt sich ein charakteristischer sigmoidaler Kurvenverlauf.

Hieraus ergibt sich auch der IC_{50} -Wert. Dieser gibt die Ligandkonzentration an, bei der die spezifische Radioligandbindung auf 50% des Ausgangswertes reduziert ist. Unter Zugrundelegung des ermittelten IC_{50} -Wertes, sowie der eingesetzten Radioligand-Konzentration $[L]$ und der Bindungsaffinität des Radioliganden (K_D), lässt sich die Affinität des Konkurrenten zum Rezeptor (K_i) berechnen.⁶⁹

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_d}}$$

Gl. 8: Berechnung des K_i -Wertes.

Da Radioligand und Konkurrent im Falle der homologen Konkurrenz strukturell identisch sind und somit identische Affinität zum Rezeptor aufweisen, gilt $K_d = K_i$. Die Gleichung kann somit wie folgt vereinfacht werden:

$$K_d = IC_{50} - [L]$$

Gl. 9: Berechnung des K_d -Wertes III.

Die Substitution von K_d im Massenwirkungsgesetz entspricht folgende Gleichung⁷⁰:

$$B_{max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]}$$

B_0 = spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors

Gl. 10: Berechnung von B_{max} II.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Bindungsparameter K_d und B_{max} stellt die Analyse nach Scatchard (1949) dar⁷¹. Dabei werden Daten aus der homologen Konkurrenz einer linearen Regressionsanalyse anhand der Scatchard-Gleichung unterzogen:

$$\frac{B}{F} = \frac{1}{K_d} \cdot B + \frac{B_{max}}{K_d}$$

Gl. 11: Analyse nach Scatchard.

B entspricht hier der Gesamtkonzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe wobei F für die freie Ligand-Konzentration steht. Der Schnittpunkt der erhaltenen Gerade mit der Abszisse ergibt den B_{max} -Wert. K_d entspricht dem negativen Kehrwert der Steigung. Zur Ermittlung der Werte mittels dieser Analyse müssen nach Bennett und Yamamura (1985) bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. So muss das Bindungsverhalten dem Massenwirkungsgesetz folgen, die Experimente müssen unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt werden, es muss eine einheitliche Rezeptorpopulation vorliegen, B_{max} sollte nicht größer sein als 10 % des K_d -Wertes, und es sollten nicht mehr als 10% des Radioliganden gebunden vorliegen, damit die Konzentration des frei vorliegenden Radioliganden als konstant betrachtet werden kann.

3.2.4. Berechnung der Assoziation- und Dissoziationgeschwindigkeit

Die Dissoziations- und Assoziationsreaktionen des Radioliganden am Rezeptor geschehen immer gleichzeitig und mit konstanter Geschwindigkeit sobald sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Damit Assoziation und Dissoziation einzeln betrachtet werden können, muss einer der beiden Effekte unterbunden werden. Zum Bestimmen der Assoziationsrate wird eine definierte Konzentration an Radioligand dem Rezeptor vom Zeitpunkt Null an, zeitlich versetzt, hinzugefügt. Im Falle, dass die Dissoziationsrate bestimmt werden soll muss der Kompetitor, nach Erreichen des Bindungsgleichgewichtes, im Überschuss hinzugefügt werden.

Der gemessene Parameter bei der Assoziation ist die Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante der Radioligand-Bindung k_{obs} . Diese ermöglicht die Berechnung der apparenten Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{ass} .

Für die Geschwindigkeit des Assoziation gilt:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{ass}[R][L]$$

Gl. 12: Berechnung der apparenten Assoziationsgeschwindigkeitskonstante I.

Vereinfacht ergibt sich nach Schröter et al. 1999 die Berechnung von k_{ass} aus k_{obs} wie folgt:

$$k_{ass} = \frac{k_{obs} \cdot B_{spez,e}}{[L] \cdot B_{max}}$$

Gl. 13: Berechnung von der apparenten Assoziationsgeschwindigkeitskonstante II.

$B_{spez,e}$: Spezifische Radioligandbindung im Gleichgewicht in nM

k_{obs} : Beobachtete Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante in min^{-1}

k_{ass} : Apparente Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante in $\text{nM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

L: Radioligand-Konzentration in nM

B_{max} : Rezeptorkonzentration in nM

Für die Zerfallsgeschwindigkeit der Dissoziation gilt:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{diss}[RL]$$

$$B_{Ges,t} = B_{spez,e} \cdot e^{-k_{diss} \cdot t} + U$$

Gl. 14: Zerfallsgeschwindigkeit der Dissoziation.

$B_{Ges,t}$: Gesamtbindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t

$B_{spez,e}$: Spezifische Bindung des Radioliganden im Gleichgewicht

U: Unspezifische Bindung des Radioliganden

Die nicht-lineare Regressionsanalyse ergibt einen hyperbolen Kurvenverlauf mit der Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstanten k_{diss} . Wobei die Halbwertszeit sich wie folgt berechnen lässt:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}}$$

Gl. 15: Berechnung der Halbwertszeit.

3.2.5. Berechnung der Potenz von Inhibitoren

Der IC_{50} -Wert beschreibt die halbmaximale Hemmung des Radioliganden durch einen Liganden (Inhibitor) und ist ein Maß für dessen Potenz. Er ist außerdem abhängig von der Konzentration des Inhibitors und der Konzentration des Radioliganden. Die Hemmung eines Rezeptors wird wie folgt beschrieben:

$$RL^*(I) = RL_0^* - \frac{RL_0^* \cdot [I]}{([I] + IC_{50})} = \frac{RL_0^* \cdot IC_{50}}{([I] + IC_{50})}$$

Gl. 16: Hemmung eines Rezeptors durch einen Inhibitor.

RL_0^* = Anzahl der Radioligand-Rezeptor-Komplexe in Abwesenheit des Inhibitors

I = Inhibitor

3.2.6. Der Hill-Koeffizient n_H

Eine Linearisierung der Gleichung Gl. 16 sollte in der Regel eine Steigung mit dem Wert -1 ergeben. Dies trifft jedoch nicht immer auf die experimentell ermittelten Werte von Inhibitoren zu. Um dies zu berücksichtigen wurde der Hill-Koeffizient (n_H) eingeführt, der die Steilheit der Inhibitionskurve beschreibt. Er gibt die Kooperativität (cooperativity) an mit der ein Ligand an seinen Rezeptor bindet und die Bindung weiteren Liganden an den Rezeptor begünstigt wird oder nicht.

$$\log \frac{RL^*}{RL_0^* - RL^*} = n_H \cdot \log IC_{50} - n_H \cdot \log I$$

Gl. 17: Der Hill-Koeffizient.

Steile Kurven besitzen einen Hill-Koeffizienten $n_H > 1$. Dies bedeutet, dass die Bindung des Radioliganden L^* die Bindung weiteres Radioliganden erleichtert (positive Kooperativität).

Bei flachen Hemmkurven mit einem Hill-Koeffizienten $n_H < 1$ erschwert die Bindung des Radioliganden L^* die Bindung von weiteren Radioligand (negative Kooperativität), oder es liegen zwei Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität vor, wie z.B. verursacht durch eine allosterische Bindungsstelle. Ein Beispiel ist in Abb. 8 dargestellt.

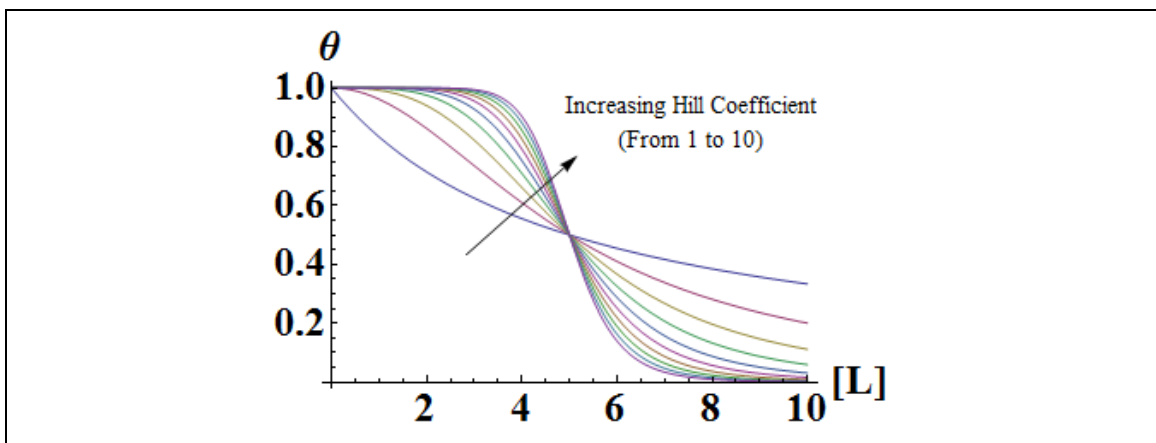


Abb. 8: Veranschaulichung des Hill-Koeffizienten. ⁷²

4. [³H]PSB-15900 - EIN NEUER HOCHSELEKTIVER RADIOLIGAND ZUR CHARAKTERISIERUNG DES Gα_q-PROTEINS

4.1. Entwicklung und Synthese

Bisher stand kein Radioligand zur Verfügung, der selektiv an Gα_q-Proteine bindet und diese inhibiert. Das aus der immergrünen Pflanze *Ardisia crenata* gewonnene Depsipeptid FR900359 konnte in funktionellen Testungen als potenter Gα_q-Inhibitor charakterisiert werden.⁵⁹ Auf Basis der vorangegangenen Ergebnisse wurde der neue Radioligand [³H]PSB-15900 entwickelt. Das Molekül FR900359 besitzt auf Grund seiner exozyklischen Doppelbindung eine gute Möglichkeit, eine selektive Tritiiierung in dieser Position durchzuführen. In vorangegangenen Versuchen⁵⁹ wurde gezeigt, dass FR900359 selektiv durch katalytische Hydrierung in das Produkt FR900359red überführt werden kann (Abb. 9).

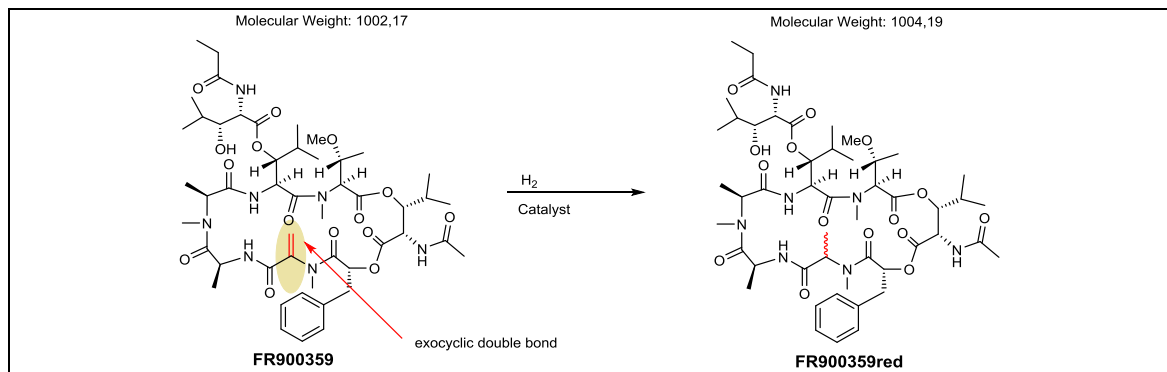


Abb. 9: Katalytische Hydrierung von FR900359.⁵⁹

4.2. Charakterisierung des Radioliganden [³H]PSB-15900

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde das Edukt FR900359 tritiiert, um den neuen Radioliganden [³H]PSB-15900 zu erhalten.^a Da zu erwarten war, dass ein Gemisch von zwei tritiierten Diastereomeren entsteht, und die Gewinnung der reinen Stereoisomere angestrebt wurde, erfolgte mittels HPLC eine Diastereomerentrennung, und es wurden die Massen der einzelnen Fraktionen durch ESI(+)-TOF-MS bestimmt. In bereits publizierten Ergebnissen zu der strukturell sehr verwandten Substanz YM-254890 wurde postuliert, dass nur das *R*-konfigurierte Molekül an Gα_q aktiver ist, als das *S*-konfigurierte Epimer.¹² TRQ41026 ([³H]iso-PSB-15900) zeigte in Bindungsstudien zu Gα_q keine hohe Affinität, wodurch geschlossen werden kann, dass es sich um das *S*-konfigurierte Diastereomer handeln dürfte. TRQ41027 und TRQ40998 zeigten hingegen in Versuchen eine hochaffine Bindung an Gα_q (Abb. 11). Dementsprechend ist davon

^a Die radioaktive Markierung wurde über Quotient Bioresearch Ltd, Cardiff, England, durchgeführt. Die Extraktion der Vorstufe FR900359 aus *ardisia crenata* wurde von R. Reher, Arbeitskreis Prof. Dr. G. König, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, im Rahmen seiner laufenden Dissertation, durchgeführt.

auszugehen, dass es sich wahrscheinlich um das *R*-konfigurierte Produkt handelt. TRQ41027 und TRQ40998 unterscheiden sich in ihrer Masse (1006.4 und 1009.5 g/mol) und ihrer spezifischen Aktivität (37 und 77 Ci/mmol), was auf die unterschiedliche Anzahl der durch Tritium substituierten Wasserstoffatome zurückzuführen ist. Auf Grund der identischen Affinität und Selektivität zu *Gα_q* mit einem *K_d* von 6,55 nM an Rattencortex-Membranpräparationen und 4,28 nM an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen werden TRQ41027 und TRQ40998 beide als [³H]PSB-15900 bezeichnet.

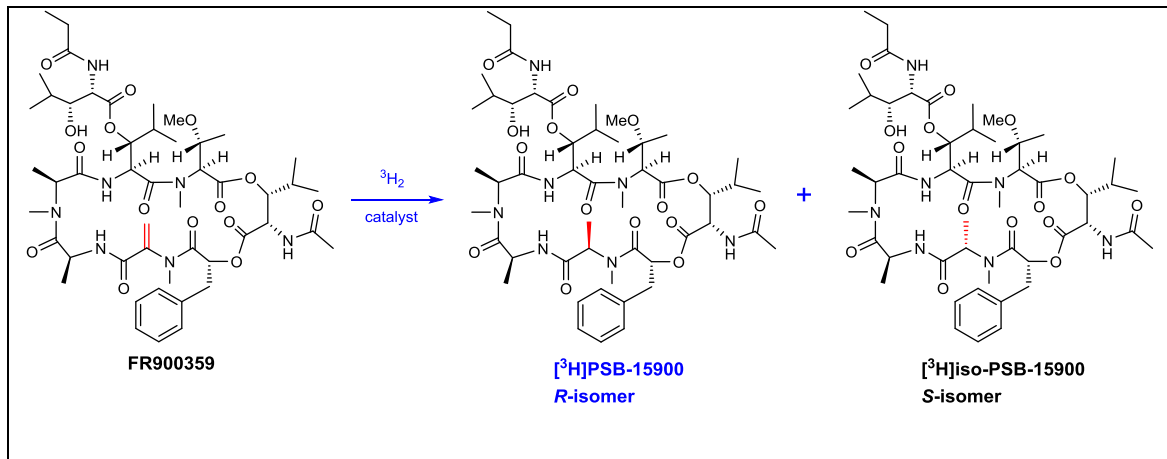


Abb. 10: Katalytische Tritiierung von FR900359.

Tab. 2: Übersicht und Einteilung der Tritiierungsprodukte von FR900359.

Kennung	Bezeichnung	Fraktion	Molmasse	Spezifische Aktivität	Radiochem. Konzentration
TRQ41026	[³ H]iso-PSB-15900	Isomer 1	1006.4 g/mol	32 Ci/mmol	0.2 Ci/l
TRQ41027	[³ H]PSB-15900	Isomer 2	1009.5 g/mol	77 Ci/mmol	0.2 Ci/l
TRQ40998	[³ H]PSB-15900	Isomer 2A	1006.7 g/mol	37 Ci/mmol	0.2 Ci/l

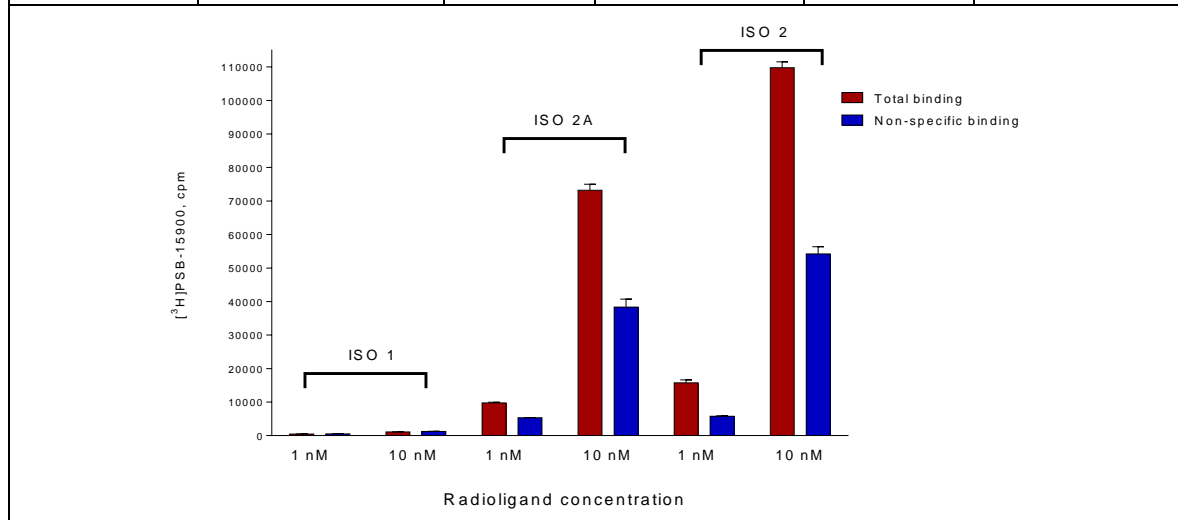


Abb. 11: Bindung der verschiedenen [³H]PSB-15900-Isomere in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 5 und 15 nM) an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0 °C, unter nicht optimierten Assay-Bedingungen. Unspezifische Bindung und Gesamtbindung dargestellt in cpm.

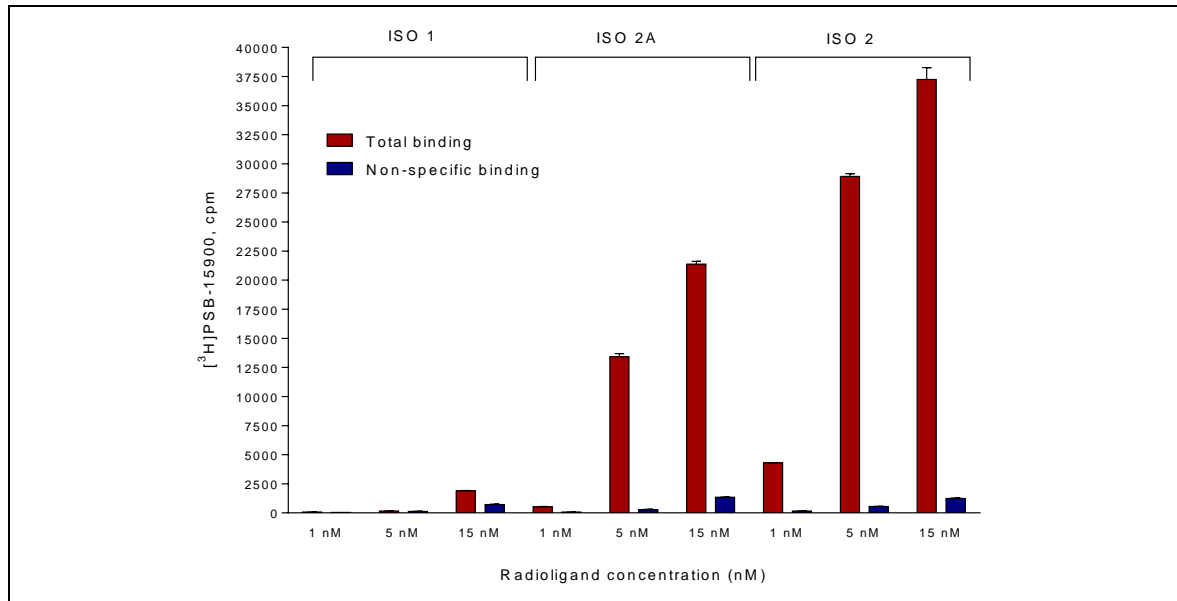


Abb. 12: Bindung der verschiedenen [³H]PSB-15900-Isomere an humane Thrombozyten-Membran-Präparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C.

4.3. Methodenentwicklung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der neue G α_q -Radioligand [³H]PSB-15900 charakterisiert und ein Standardassay für Radioligand-Bindungsstudien etabliert werden.

4.3.1. Strategie

Die Richtigkeit, Genauigkeit und Robustheit eines Radioligandbindungs-Assays wird durch viele Faktoren beeinflusst. So besitzt der Radioligand selbst bestimmte physikochemische Eigenschaften. Des Weiteren sind Inkubationstemperatur, pH-Wert des Puffers, Proteinquelle, wie auch die Materialien im Filtrationsprozess von Bedeutung, um präzise Ergebnisse zu erzielen.

Da [³H]PSB-15900 selektiv an G α_q -Proteine bindet, wurde nach geeigneten natürlichen Geweben gesucht, welche über eine hohe Expressionsrate an G α_q verfügen. Rattencortex verfügt auf Grund der diversen im Cortex exprimierten G α_q -gekoppelten Rezeptoren eine entsprechend hohe Dichte an G α_q .⁷³ Da in Thrombozyten unter anderem Purin-Rezeptoren (P2Y₁), Thromboxan-Rezeptoren (TP), Oxytocin-Rezeptoren (OT), Arginin-Vasopressin (V1A) und Adenosin-Rezeptoren (A_{2B}) exprimiert werden, die G α_q -gekoppelt sind, sollten sich auch diese sehr gut eignen.⁷⁴ Erste Etablierungsversuche wurden mit Rattencortex durchgeführt, und die Optimierungsstudien wurden mit humanen Thrombozyten-Präparationen weitergeführt.

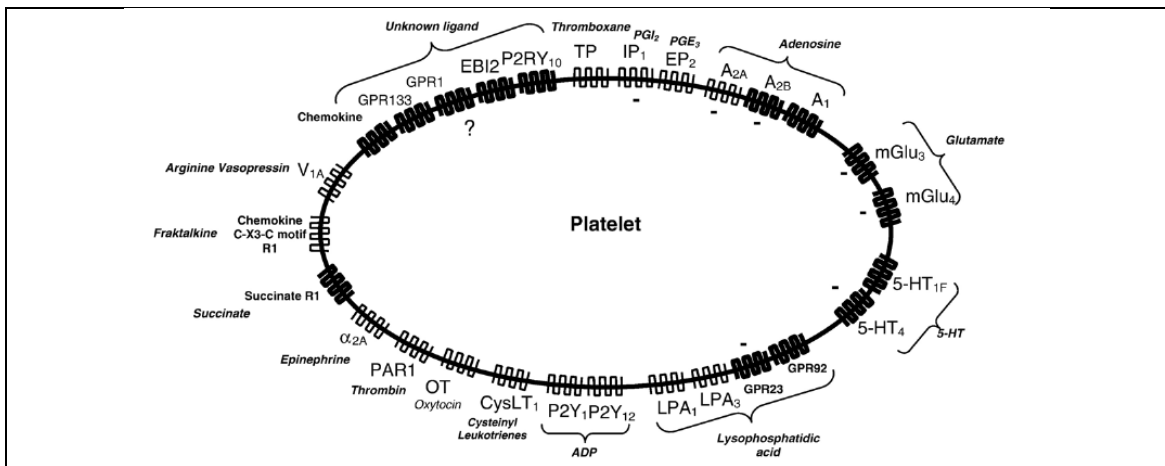


Abb. 13 Wichtige exprimierte GPCRs in humanen Thrombozyten. ⁷⁴

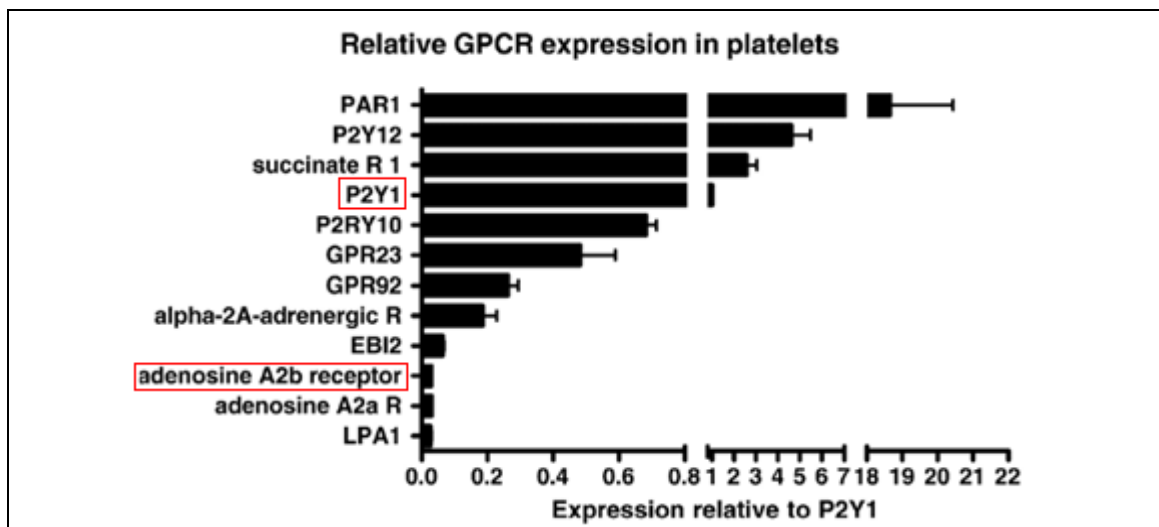


Abb. 14: Expressionsraten von GPCRs in Thrombozyten, bezogen auf die Expressionsrate des P2Y₁-Rezeptors. Daten aus mRNA-Expression erhoben. G_i-gekoppelte Rezeptoren sind in rot markiert. ⁷⁴

Es ist bekannt, dass verschiedene Salze und weitere Zusätze Einfluss auf die Bindung eines Liganden an die Zielstruktur haben können. So können Magnesium-Ionen die Konformation mancher GPCRs allosterisch modulieren, wodurch es zu einer erhöhten Bindung von Agonisten kommen kann. ^{76; 74; 75}

Der pH-Wert eines Inkubationspuffers kann Einfluss auf die Protein-Ligand-Bindung haben. Liganden können durch Protonierung oder Deprotonierung eine höhere oder niedrigere Affinität zu ihrer Bindungsstelle besitzen. Ebenfalls ist es möglich, dass durch Einstellung eines bestimmten pH-Wertes das Protein in einer Konformation stabilisiert wird und hierdurch der Ligand mit einer höheren oder niedrigeren Affinität bindet. ⁷⁷

Salzzusätze und weitere Additive in den Inkubationspuffern sollen die physiologischen Bedingungen nachstellen und können in Kombination mit dem richtigen pH-Wert auf Proteinkonformationen stabilisierend wirken und so die Ligandbindung begünstigen.

Alle Materialien, die für die Bindungsstudie essenziell sind, kommen mit dem Protein und dem Liganden in Berührung und können auf die Ergebnisse großen Einfluss nehmen. Adsorptionseffekte

an Inkubationsgefäße, die aus Glas oder insbesondere aus Kunststoff bestehen, wie auch an die für die Filtration verwendeten Glasfasermembranen können sehr groß sein. Dies kann zu Artefakten, und im Falle von Adsorptionseffekten an der Glasfasermembran im Filtrationsprozess zur dramatischen Erhöhung der unspezifischen Bindung führen. Diese Effekte werden primär von den physikochemischen Eigenschaften des Liganden oder des Proteins bestimmt. Lipophile Stoffe in einem hydrophilen System neigen eher dazu, an Oberflächen anzuhaften, als hydrophilere Stoffe. Um die Bindung des freien Liganden an Glasfasermembranen zu reduzieren, bestehen mehrere Möglichkeiten. Glasfasermembranen sind in verschiedenen Dicken, Porengrößen und Modifizierungen erhältlich. Durch Imprägnierung der Glasfaserfilter mit einer Polyethylenimin-Lösung (PEI)^a, einem Polymer mit einem mittleren Molekulargewicht von 25.000, können die endständigen, schwach sauer reagierenden Silanolgruppen neutralisiert werden.⁷⁸ Zudem kann der Waschpuffer, der für den Filtrationsprozess verwendet wird, mit Detergenzien wie Tween 20^b oder Bovinem Serum-Albumin (BSA)^c versetzt werden.

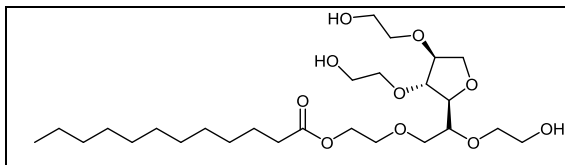


Abb. 15: Tween 20.

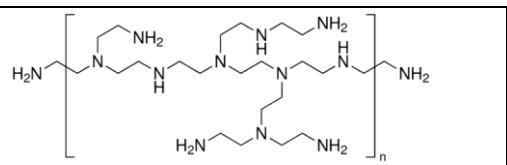


Abb. 16: Polyethylenimin (PEI).

Tween 20 ist ein nichtionisches Tensid und verringert die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten durch Mizellbildung und Anlagerung an Oberflächen. BSA ist ein Serum-Protein welches aus Kühen gewonnen wird und in der Zellbiologie häufig als Zusatz zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen verwendet wird. Beide Zusätze können die unspezifische Bindung reduzieren.

4.3.2. Ergebnisse & Diskussion

4.3.2.1. Methodenentwicklung der Radioligandbindestudien an Rattencortex-Membranpräparationen

Da vermutet wurde, dass der Assay recht sensibel in der Handhabung und der Kinetik des Radioliganden sein könnte, wurden erste Experimente zur Etablierung mit verschiedenen Radioligand- und Proteinkonzentrationen durchgeführt, um einzusetzende Konzentrationen des

^a *Polyethylenimin*: [Poly(iminoethylen), PEI]. Bezeichnung für Polyamine, die durch säurekatalysierte Homopolymerisation von Ethylenimin (Aziridin) erhältlich sind.

^b *Tween 20*: (Polysorbat 20). Bezeichnung für ein nichtionisches Tensid, das durch Veresterung von Sorbitol mit Laurinsäure und Umsetzung mit Ethylenoxid als Polysorbat erhältlich ist.

^c *Bovines Serum-Albumin*: [BSA]. Bezeichnung für einen Proteinbestandteil, der durch Fraktionierung von Rinderplasma gewonnen wird.

Radioliganden und des Proteins zu bestimmen. Der Inkubationspuffer enthielt 50 mM Tris-HCl pH 7,4; Vials enthielten 10 µl der Testverbindung (10 nM FR900359 in DMSO), 100 µl (1, 10 oder 30 nM Endkonzentration) [³H]PSB-15900 (77 Ci/mmol) und 100 µl (1, 5, 10, 15, 25, 30, 50, 100, 150 oder 200 µg Protein/vial) Rattencortex-Membranpräparationen in einem Gesamtvolumen von 400 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Rattencortex-Membranpräparation gestartet und für 2 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Nach Inkubationsende wurde eine Vakuumfiltration über einen GF/B-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester durchgeführt. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer, 50 mM, pH 7,4, (3 ml) gespült, um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben wurden nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-15900 wurde unter Verwendung von FR900359 (10 µM in DMSO) bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO.

In den ersten Versuchen zeigte sich, dass das verwendete Rattencortex-Protein eine hohe Expression an Gα_q-Proteinen enthält. Dies führte zu dem Effekt der Radioligand-Depletion.¹⁸ Die „Verarmung“ an freiem, nichtgebundenen Radioliganden bewirkt, dass die gelöste Konzentration nicht konstant ist. So sollten ca. 90% des Radioliganden frei vorliegen, um die Kinetik nach anerkannten Modellen berechnen zu können.

Abb. 18 zeigt, dass die optimale Proteinkonzentration für Rattencortex zwischen 1 - 10 µg lag, da in diesem Konzentrationsbereich > 90 % der [³H]PSB-15900 ungebunden vorlagen.

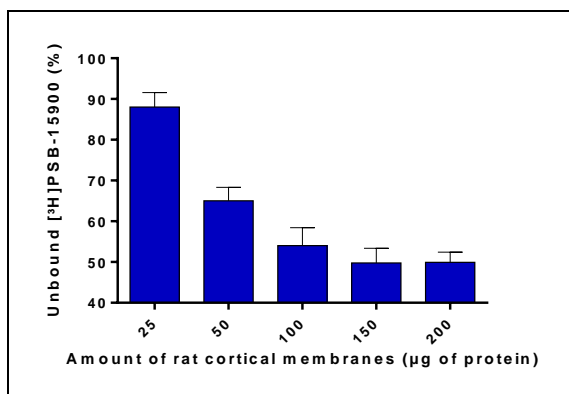


Abb. 17: Anteil an frei vorliegendem Radioliganden (10 nM [³H]PSB-15900) in %, bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Rattencortex-Membranpräparationen.

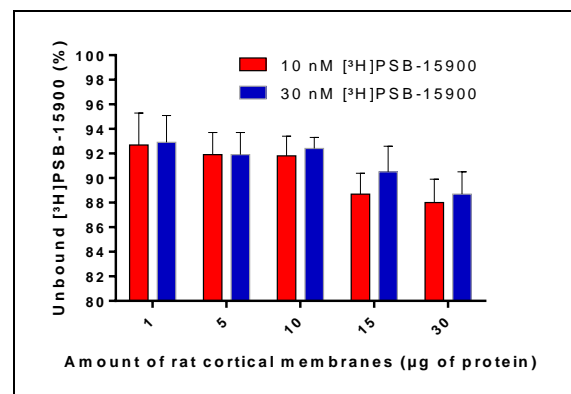


Abb. 18: Anteil an frei vorliegendem Radioliganden (10 nM und 30 nM [³H]PSB-15900) in %, bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein).

Wie in Abb. 19 und Abb. 20 zu erkennen ist, ist der Wert der gemessenen spezifischen Bindung von der Menge des eingesetzten Proteins und der Wert der Gesamtbindung von der eingesetzten [³H]PSB-15900 Konzentration abhängig. So steigt die spezifische Bindung mit zunehmender Proteinkonzentration (Abb. 19), und die Gesamtbindung mit zunehmender Radioligandkonzentration (Abb. 20).

Vor allem ist zu beobachten, dass bei Erhöhung der Konzentration an Radioligand die unspezifische Bindung stark ansteigt, vgl. Abb. 19. Dies liegt daran, dass bei zunehmenden Konzentrationen vermehrt Radioligand an die GF/B-Filtermembran unspezifisch bindet und durch den Filtrationsprozess nicht abgewaschen werden kann.

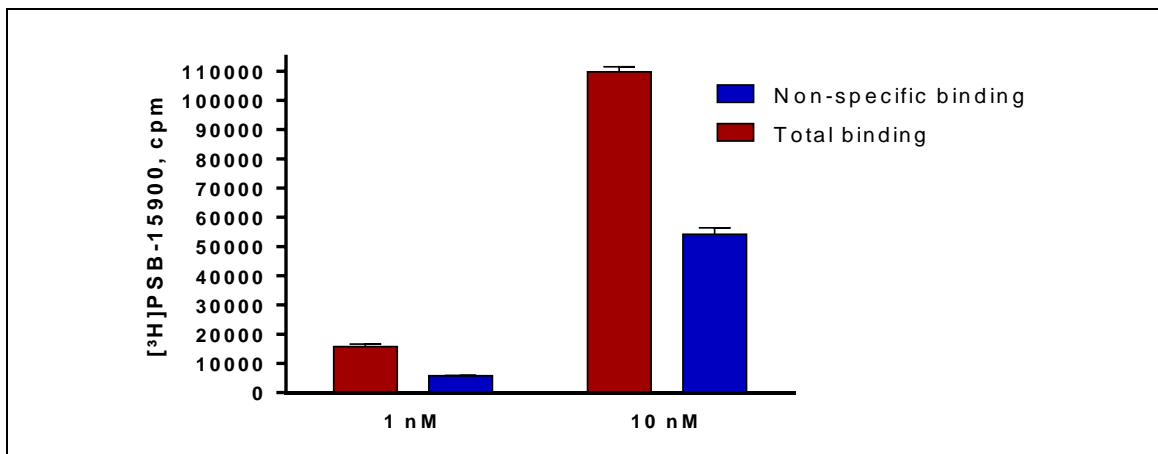


Abb. 19: Darstellung der unspezifischen Bindung und der Gesamtbindung von 1 und 10 nM [³H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein).

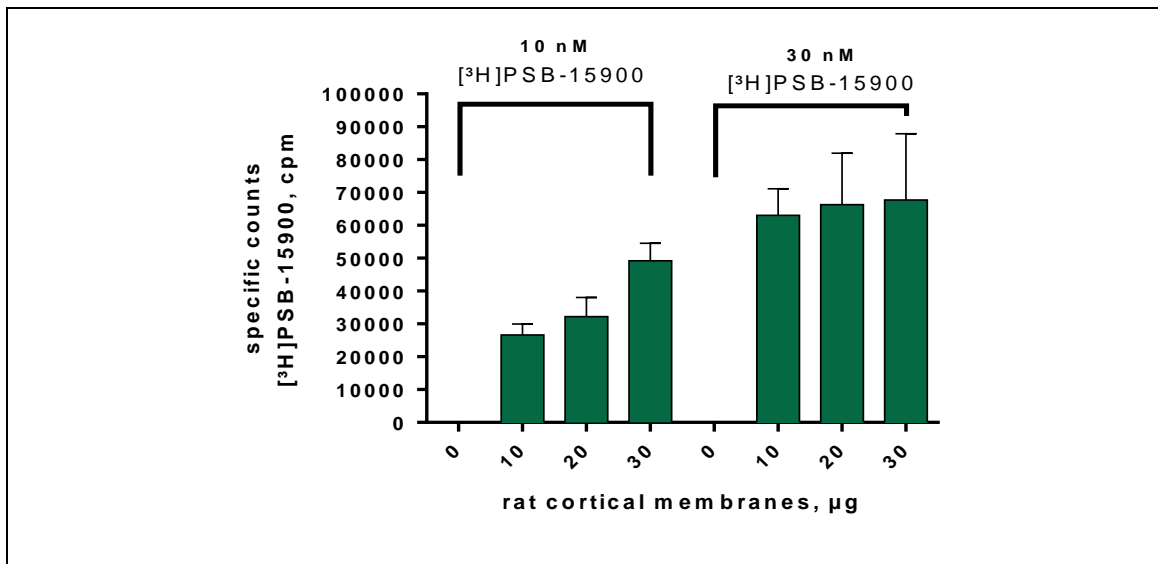


Abb. 20: Spezifische Bindung (cpm) von 10 und 30 nM [³H]PSB-15900 mit verschiedenen Konzentrationen an Rattencortex-Membranpräparationen.

Eine hohe unspezifische Bindung beeinflusst, ähnlich wie ein Grundrauschen oder Hintergrundsignal, die Auswertbarkeit wie auch die Genauigkeit des Assays. Dementsprechend

wurde versucht, die unspezifische Bindung durch Optimierung der Parameter auf ein akzeptables Maß zu senken.

Hierfür wurden verschiedene Inkubationspuffer, Glasfaserfiltertypen, Waschpuffer und die Imprägnierung des Glasfaserfilters mit PEI getestet. In diesen Versuchen betrug die Radioligandkonzentration immer 10 nM [³H]PSB-15900, mit einer Proteinkonzentration von 10 µg Rattencortex-Membranpräparationen pro Vial.

Gängige Filtrationsmembranen für Radioligand-Bindungsstudien sind Whatman GF/B (1821-047) und GF/C (1822-024) Filter.⁷⁹ Sie bestehen aus nichtmodifizierten Borsilikat-Glas und haben, im Falle von GF/B-Filtern eine mittlere Porengröße von 1,0 µm bei einer Dicke von 0,68 mm. GF/C-Filter besitzen eine mittlere Porengröße von 1,2 µm bei einer Dicke von 0,26 mm.

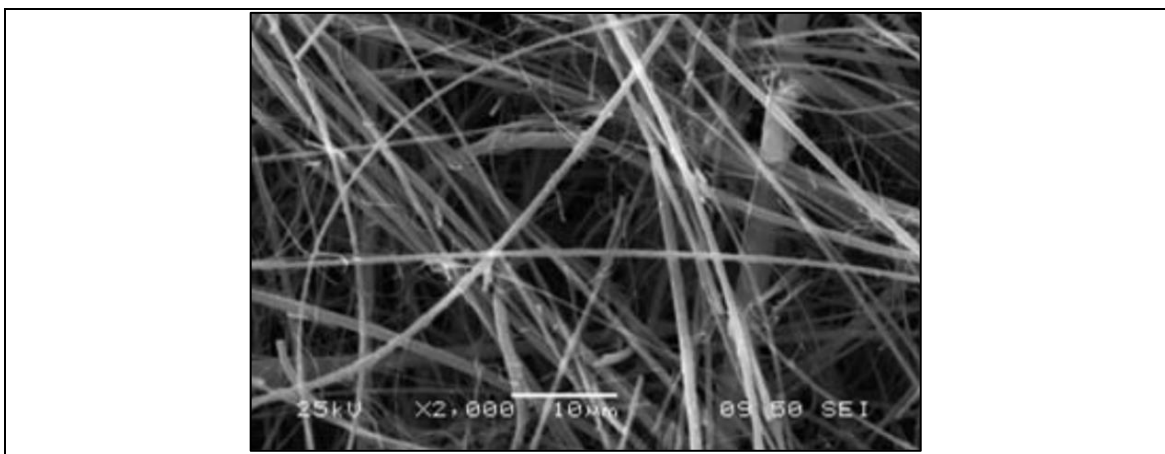


Abb. 21: Elektronenmikroskopaufnahme von einem nichtmodifizierten Glasfasermembranfilter⁷⁹.

Wie aus Tab. 3 und Tab. 4 ersichtlich ist, wurden verschiedene Inkubations-Puffersysteme getestet die auf der Grundlage von 50 mM TRIS-HCl oder 25 mM HEPES Puffer basierten. Als Zusätze zu den Inkubationspuffern wurden 10 mM MgCl₂, 0,2 % BSA und 0,05 % Tween 20 beigelegt, wobei Kombinationen der Zusätze ebenfalls getestet wurden. Als Filtermaterial wurde ein GF/B bzw. ein GF/C-Filter verwendet. Als Waschpuffer diente eiskalter Tris-HCl Puffer pH 7,4, mit Zusatz von 0,1% BSA. Der Zusatz von 0,1 % BSA wurde gewählt, da durch dessen Zugabe eine Reduzierung der unspezifischen Bindung erwartet wurde.

Aus dem Versuch, vgl. Abb. 22 und Abb. 23, kann man erkennen, dass sich generell GF/C-Filter mit einem größeren Porendurchmesser und einer geringeren Schichtdicke, gegenüber GF/B-Filtern besser eignen. Dies zeigt sich in einer generell niedrigeren unspezifischen Bindung. Die unterschiedlichen pH-Werte, ebenso wie die Zusätze MgCl₂ und EDTA, führen zu keiner wesentlichen Verbesserung. Die niedrigsten Werte für die unspezifische Bindung wurden mit Zusätzen von BSA und Tween 20 gemessen. Dies lässt schlussfolgern, dass Detergenzien wie Tween 20 und BSA die unspezifische Bindung reduzieren. Auch ist der modifizierte Absaugpuffer mit 0,1

% BSA positiv zu bewerten und hat im Vergleich zu dem zuvor verwendeten Absaugpuffer die unspezifische Bindung verringert.

Tab. 3: Unspezifische Bindung von 10 nM [³H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0 °C Inkubationstemperatur unter Filtration über GF/B-Filter mit verschiedenen Puffern, pH-Werten und Zusätzen.

Puffer	Zusatz 1	Zusatz 2	Zusatz 3	pH	Unspezifische Bindung (cpm)	± SEM
Tris				6,5	12104	356
Tris				7,4	11466	422
Tris				8,2	11219	1035
Tris	MgCl ₂			6,5	10519	671
Tris	MgCl ₂			7,4	11623	285
Tris	MgCl ₂			8,2	11061	931
Tris	BSA			6,5	13650	344
Tris	BSA			7,4	13460	1127
Tris	BSA			8,2	13059	631
Tris	MgCl ₂	BSA		6,5	12219	494
Tris	MgCl ₂	BSA		7,4	10279	496
Tris	MgCl ₂	BSA		8,2	11210	284
Tris	MgCl ₂	EDTA		6,5	9178	450
Tris	MgCl ₂	EDTA		7,4	11016	1112
Tris	MgCl ₂	EDTA		8,2	14056	601
Tris	MgCl ₂	BSA	Tween	6,5	5047	94
Tris	MgCl ₂	BSA	Tween	7,4	6170	148
Tris	MgCl ₂	BSA	Tween	8,2	5984	212
Hepes				6,5	16583	570
Hepes				7,4	17948	321
Hepes				8,2	14394	1158
Hepes	BSA			6,5	8801	294
Hepes	BSA			7,4	12495	1285
Hepes	BSA			8,2	9854	157
Hepes	MgCl ₂	BSA	Tween	6,5	6166	262
Hepes	MgCl ₂	BSA	Tween	7,4	6339	96
Hepes	MgCl ₂	BSA	Tween	8,2	5746	256
Hepes	MgCl ₂	EDTA		6,5	14535	805
Hepes	MgCl ₂	EDTA		7,4	11840	360
Hepes	MgCl ₂	EDTA		8,2	14313	1096
Hepes	MgCl ₂	BSA		6,5	13066	1256
Hepes	MgCl ₂	BSA		7,4	11814	1302

Tab. 4: Unspezifische Bindung von 10 nM [³H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0 °C Inkubationstemperatur unter Filtration über GF/C-Filter mit verschiedenen Puffern, pH-Werten und Zusätzen.

Puffer	Zusatz 1	Zusatz 2	Zusatz 3	pH	Unspezifische Bindung (cpm)	± SEM
Tris				6,5	7537	426
Tris				7,4	7285	225
Tris				8,2	7468	853
Tris	MgCl ₂			6,5	6134	881
Tris	MgCl ₂			7,4	7341	143
Tris	MgCl ₂			8,2	5570	288
Tris	BSA			6,5	6697	548
Tris	BSA			7,4	6719	344
Tris	BSA			8,2	6454	444
Tris	MgCl ₂	BSA		6,5	5182	111
Tris	MgCl ₂	BSA		7,4	6250	1292
Tris	MgCl ₂	BSA		8,2	7157	720
Tris	MgCl ₂	EDTA		6,5	6536	233
Tris	MgCl ₂	EDTA		7,4	6236	509
Tris	MgCl ₂	EDTA		8,2	6215	300
Tris	MgCl ₂	BSA	Tween	6,5	2568	188
Tris	MgCl ₂	BSA	Tween	7,4	2830	148
Tris	MgCl ₂	BSA	Tween	8,2	3147	175
Hepes				6,5	9632	308
Hepes				7,4	9154	795
Hepes				8,2	8531	307
Hepes	BSA			6,5	5677	64
Hepes	BSA			7,4	6280	140
Hepes	BSA			8,2	7043	851
Hepes	MgCl ₂	BSA	Tween	6,5	2823	292
Hepes	MgCl ₂	BSA	Tween	7,4	3101	102
Hepes	MgCl ₂	BSA	Tween	8,2	2683	126
Hepes	MgCl ₂	EDTA		6,5	7735	257
Hepes	MgCl ₂	EDTA		7,4	8194	320
Hepes	MgCl ₂	EDTA		8,2	7727	68
Hepes	MgCl ₂	BSA		6,5	6486	220
Hepes	MgCl ₂	BSA		7,4	6494	390

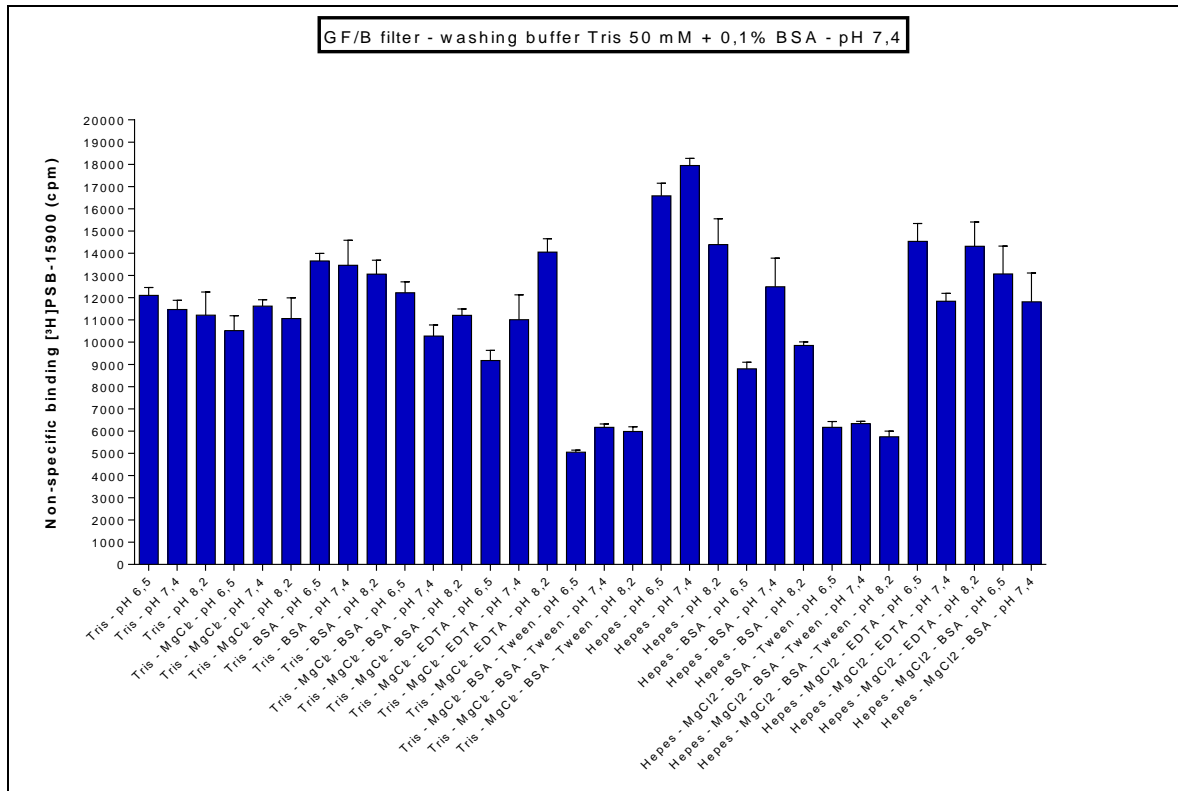


Abb. 22: Unspezifische Bindung von 10 nM [³H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0 °C Inkubationstemperatur in cpm, unter Inkubation in diversen Puffersystemen mit anschließender Filtration über GF/B-Filter. Als Waschpuffer wurde 50 mM Tris, pH 7,4, 0,1% BSA verwendet.

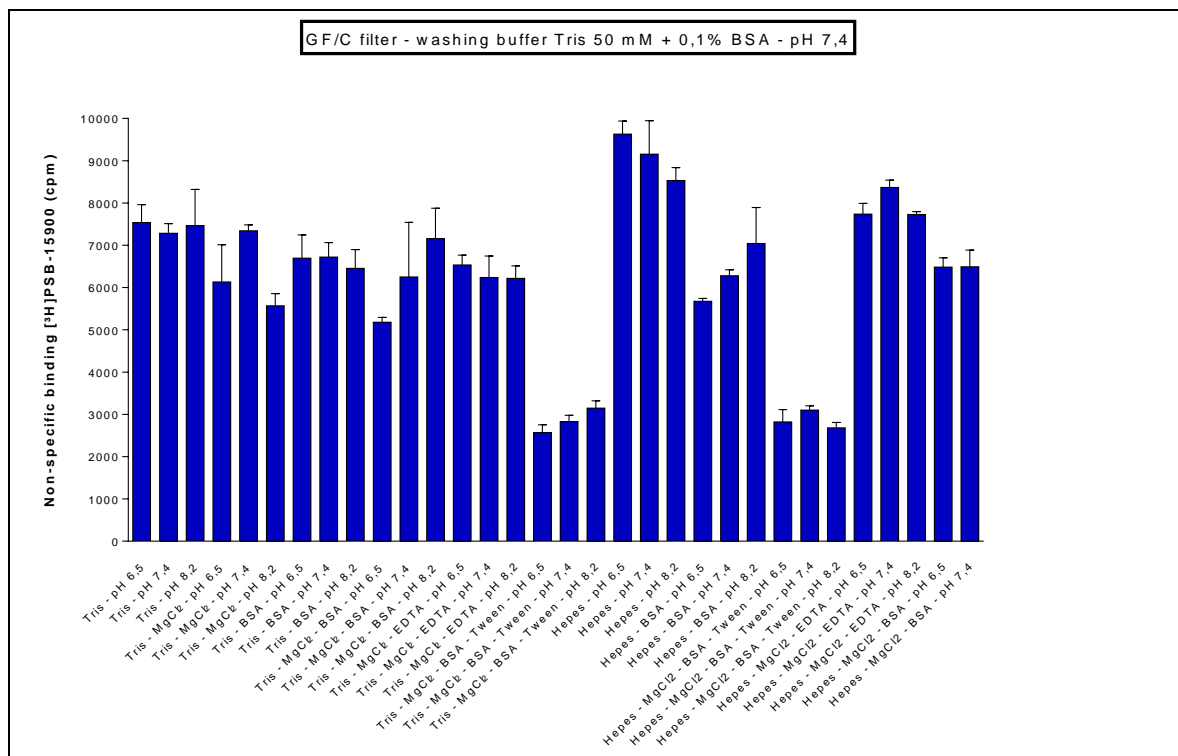


Abb. 23: Unspezifische Bindung von 10 nM [³H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0 °C Inkubationstemperatur in cpm, unter Inkubation in diversen Puffersystemen mit anschließender Filtration über GF/C-Filter. Als Waschpuffer wurde 50 mM Tris, pH 7,4, 0,1% BSA verwendet.

Es konnte beobachtet werden, dass Tween 20 im Inkubationspuffer einen reduzierenden Effekt auf die unspezifische Bindung hat. So wurde zur weiteren Optimierung dem Waschpuffer der aus 50 mM Tris-HCl pH 7,4 und 0,1 % BSA bestand, 0,1 % Tween 20 zugesetzt. Da pH-Werte in den Bereichen zwischen 6,5 und 8,2 keinen großen Einfluss auf die unspezifische Bindung haben, wurde entschieden, sich auf den physiologischen pH-Wert von 7,4 zu fokussieren, und mit diesem pH-Wert verschiedene Puffersysteme und Zusätze zu testen. Des Weiteren wurde getestet, ob die Präinkubation des GF/C-Filters mit PEI Vorteile bringt.

Abb. 24 zeigt, dass durch den Zusatz von 0,1 % Tween 20 und 0,1% BSA im TRIS-HCl pH 7,4 Waschpuffer die unspezifische Bindung von [³H]PSB-15900 dramatisch gesenkt werden kann. Eine Präinkubation von GF/C-Filtern für 20 Minuten mit 0,3 % PEI-Lösung bringt hingegen keine großen Vorteile. Die unspezifische Bindung war im Vergleich der einzelnen Puffer immer höher, als die ohne Präinkubation mit PEI. Auch zeigte dieser Versuch, dass kein spezieller Inkubationspuffer besondere Vorteile bietet.

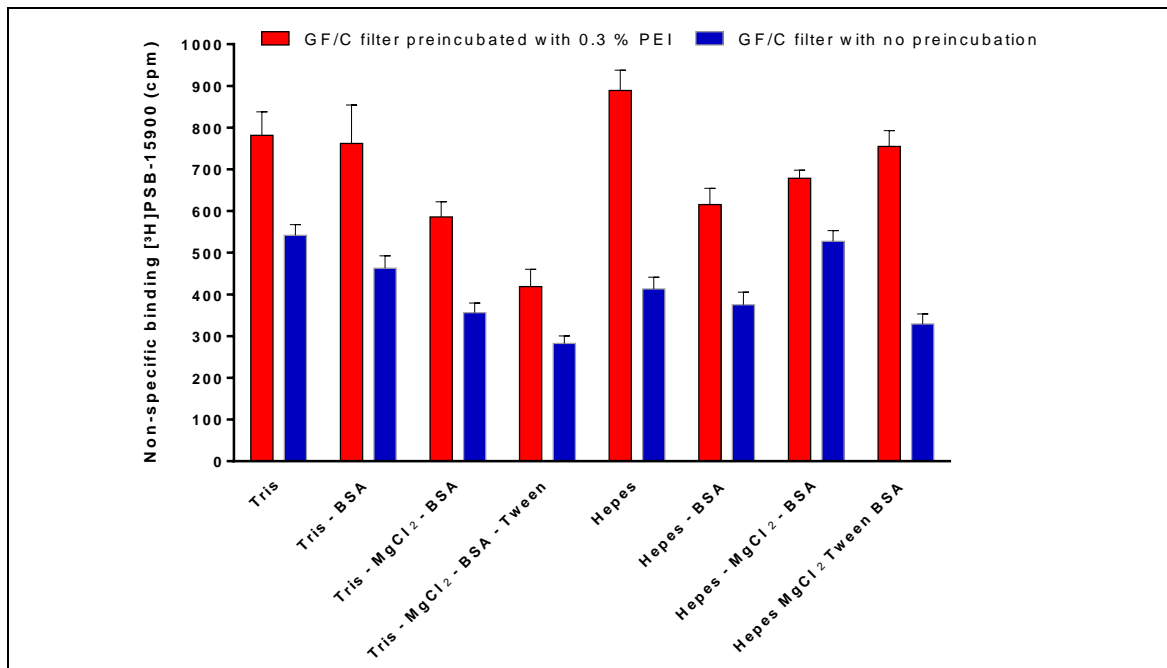


Abb. 24: Vergleich der unspezifischen Bindung in cpm von 10 nM [³H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0 °C Inkubationstemperatur zwischen GF/C-Filtern mit und ohne Präinkubation mit 0,3% PEI-Lösung unter Verwendung eines 50 mM pH 7,4 Tris-HCl Waschpuffers, dem 0,1% Tween 20 und 0,1 % BSA zugesetzt wurden. Der pH-Wert aller verwendeten Inkubationspuffer betrug 7,4.

Im direkten Vergleich zwischen optimierten und nichtoptimierten Bedingungen (Abb. 25) wird der Unterschied besonders deutlich. So lag die unspezifische Bindung bei Verwendung von 10 µg Rattencortex-Membranpräparationen und einer [³H]PSB-15900-Konzentration von 10 nM unter nicht optimierten Bedingungen (GF/B Filter, Tris-HCl pH 7,4 Waschpuffer) bei über 50.000 cpm, unter optimierten Bedingungen (GF/C Filter, Tris-HCl pH 7,4 mit 0,1 % BSA und 0,1 % Tween 20) bei gleichen Parametern für Protein und Radioligand bei ca. 500 cpm. Dies bedeutet, dass die unspezifische Bindung um den Faktor 100, durch Wahl der richtigen Bedingungen, gesenkt werden

konnte. Abb. 26 zeigt, dass unter Verwendung der optimierten Bedingungen auch der Anteil von frei vorliegendem [³H]PSB-15900, im Konzentrationsbereich von 5 bis 30 nM, im optimalen Bereich von über 90 % liegt. Die in Abb. 27 dargestellte unspezifische Bindung und Gesamtbindung bei 10 nM [³H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparation (10 µg Protein) verdeutlicht, wie gut der Assay unter den optimierten Bedingungen funktioniert und auswertbar ist. Die Gesamtbindung entspricht in etwa dem achtfachen der unspezifischen Bindung, wobei die unspezifische Bindung bei etwa nur 500 cpm liegt (ca. 10 % der Gesamtbindung), vgl. Abb. 28. Tab. 5 zeigt zusammengefasst die optimierten Bedingungen, die durch die Versuche ermittelt wurden.

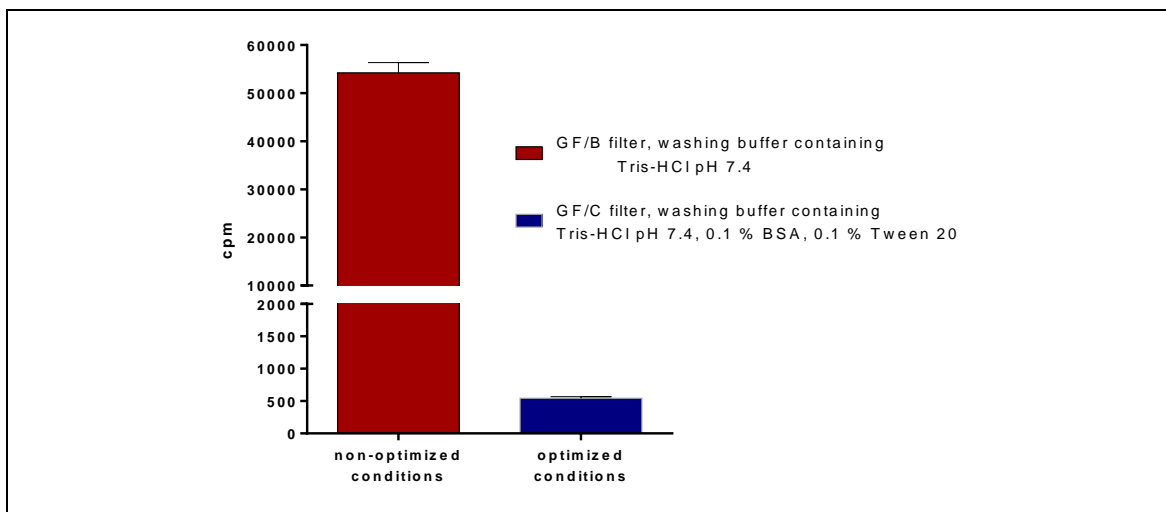


Abb. 25: Vergleich der unspezifischen Bindung in cpm zwischen optimierten und nichtoptimierten Inkubations- und Filtrationsbedingungen unter Verwendung von 10 nM [³H]PSB-15900 an Rattencortex Membranpräparationen (10 µg Protein).

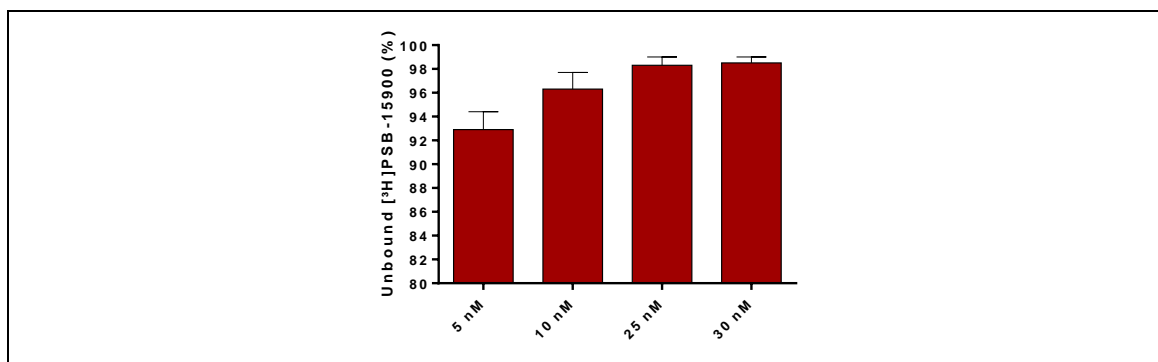


Abb. 26: Anteil des frei vorliegenden Radioliganden (5, 10, 25 und 30 nM [³H]PSB-15900) in %, bei Inkubation mit Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) unter optimierten Bedingungen.

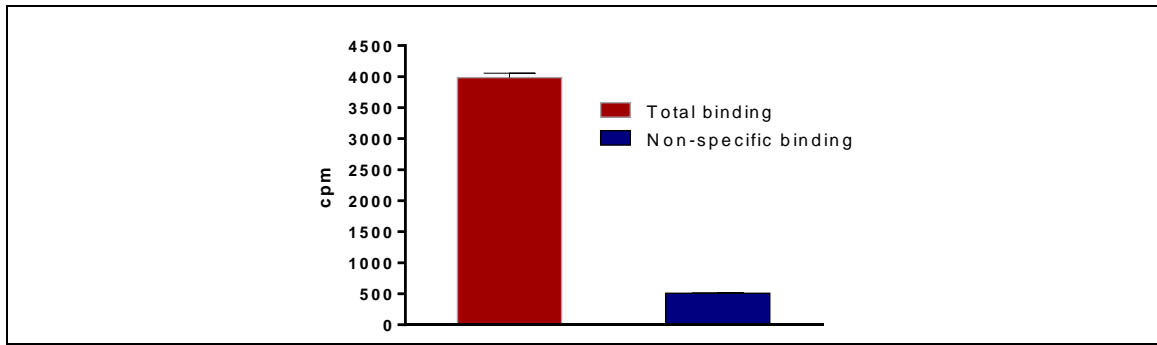


Abb. 27: Unspezifische und Gesamtbindung von 10 nM [³H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein).

Tab. 5: Optimierte Bedingung für die Durchführung eines Bindungsassays mit [³H]PSB-15900 an Rattencortex Membranpräparationen.

Inkubationspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4
Inkubationstemperatur	0 °C unter leichtem Schütteln
Inkubationszeit	120 min
Proteinmenge	10 µg Rattencortex Membranpräparationen
Radioligand-Konzentration	10 nM [³ H]PSB-15900
Unspezifische Bindung	5 µM FR900359
Gesamtbindung	DMSO
Glasfaserfiltertyp für die Filtration	GF/C (1822-024)
Waschpuffer für die Filtration	50 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20, 0,1% BSA pH 7,4 (eiskalt)
Szintillationscocktail	2,5 ml Luma Safe®

4.3.2.2. Methodenentwicklung des Radioligandbindungsassays an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen

Um Bindungsdaten auch aus humaner *G_q*-Quelle zu erhalten, wurde wie bereits erwähnt, Thrombozyten-Aphärese-Konzentrat aus Blutspenden^a aufgearbeitet und als Proteinquelle verwendet. Die optimierten Assay-Bedingungen (vgl. Tab. 5) wurden auf die Vorversuche mit den Thrombozyten angewendet. Ziel der Vorversuche war es, die optimale Menge an Thrombozyten-Membranpräparation zu bestimmen, die eingesetzt werden sollte, um eine ausreichende Bindung zu erhalten. In dem Vorversuch wurden verschiedene Mengen an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (0, 10, 30, 50, 100, 150 und 200 µg) mit 10 nM [³H]PSB-15900 getestet.

^a Die Herstellung des humanen Thrombozyten-Aphärese-Konzentrats aus Blutprodukten wurde durch das Universitätsklinikum Bonn, Transfusionsmedizin, Prof. Oldenburg, durchgeführt.

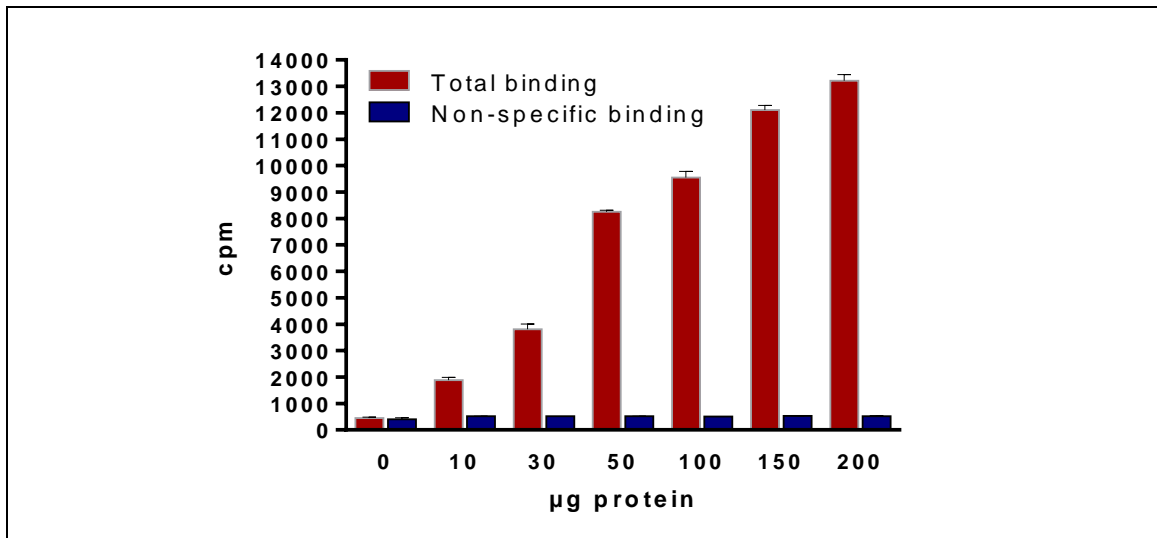


Abb. 28: Nicht-spezifische und Gesamtbindung von 10 nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (0, 10, 30, 50, 100, 150, 200 µg Protein)

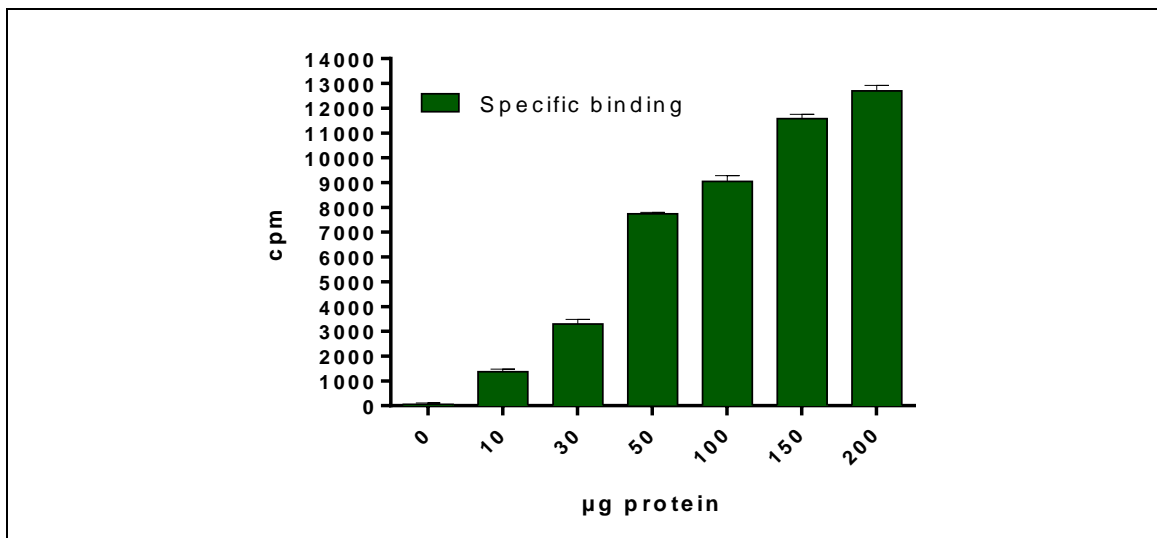


Abb. 29: Spezifische Bindung von 10 nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (0, 10, 30, 50, 100, 150, 200 µg Protein)

Wie in Abb. 28 zu erkennen ist, steigt die Gesamtbindung mit Erhöhung der Menge an eingesetztem Protein. Die unspezifische Bindung ist hingegen nahezu unabhängig von der Mengen an eingesetzten Thrombozyten-Membranpräparation und weist nur einen geringen Wert von ca. 500 cpm auf. Betrachtet man die spezifische Bindung in Abb. 29, so steigt diese mit der Menge an eingesetztem Protein und hat den höchsten Wert von ca. 12.000 cpm bei 200 µg an eingesetzten Protein. Eine spezifische Bindung von 8.000 cpm, was einer Proteinmenge von 50 µg entspricht, ist für die Genauigkeit und Auswertbarkeit des Assays mehr als ausreichend. Dementsprechend wurde für zukünftige Versuche die Menge an eingesetzter Membranpräparation auf 50 µg festgelegt.

Tab. 6: Bedingung für die Durchführung eines Bindungsassays mit [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen.

Inkubationspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4
Inkubationstemperatur	0 °C unter leichtem Schütteln
Inkubationszeit	120 min
Proteinmenge	50 µg humane Thrombozyten Membranpräparationen
Radioligand-Konzentration	10 nM [³ H]PSB-15900
Unspezifische Bindung	5 µM FR900359
Gesamtbindung	DMSO
Glasfaserfildertyp für die Filtration	GF/C (1822-024)
Waschpuffer für die Filtration	50 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20, 0,1% BSA pH 7,4 (eiskalt)
Szintillationscocktail	2,5 ml Luma Safe®

4.3.2.3. Methodenentwicklung an Rattenstriatum-Membranpräparationen

Rattencortex wird, wie bereits erwähnt, durch Sektion von Rattenhirnen gewonnen. In den vorherigen Versuchen wurde nur der Cortex als Quelle zur Proteinherstellung verwendet. Des Weiteren wurde Striatum präpariert und untersucht, das ebenfalls über G_q-Proteine verfügt.⁷³ Entsprechend wurden 2 und 15 nM [³H]PSB-15900 und [³H]iso-PSB-15900 an 150 µg Ratten-Striatum-Membranpräparation auf Bindung getestet. Abb. 30 zeigt, dass [³H]iso-PSB-15900 kaum bindet, wohingegen [³H]PSB-15900 hochaffin bindet. Die unspezifische Bindung liegt für den Einsatz von 15 nM [³H]PSB-15900 in einem akzeptablen Bereich von ungefähr 1.000 cpm. Die zugehörige Gesamtbindung beträgt ca. 2.000 cpm. Eine eingesetzte Konzentration von 2 nM [³H]PSB-15900 liefert entsprechend niedrige counts (Abb. 31). Dieser Versuch zeigt, dass sich auch Rattenstriatum als G_q-Proteinquelle eignet. Jedoch kann man sagen, dass auf Grund der niedrigeren spezifischen Bindung bei gleichzeitig hohen Einsatz an Protein (150 µg) sich Rattencortex gegenüber Rattenstriatum für den Einsatz in Bindungsstudien besser eignet, da es mehr G_q-Proteine zu exprimieren scheint.

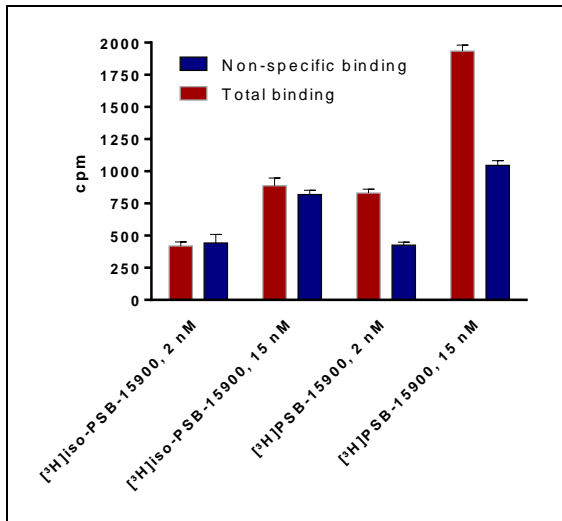


Abb. 30: Nichtspezifische Bindung und Gesamtbindung von 2 und 15 nM [³H]PSB-1500 und [³H]iso-PSB-1500 an Rattenstriatum-Membranpräparationen (150 µg Protein) bei 0°C.

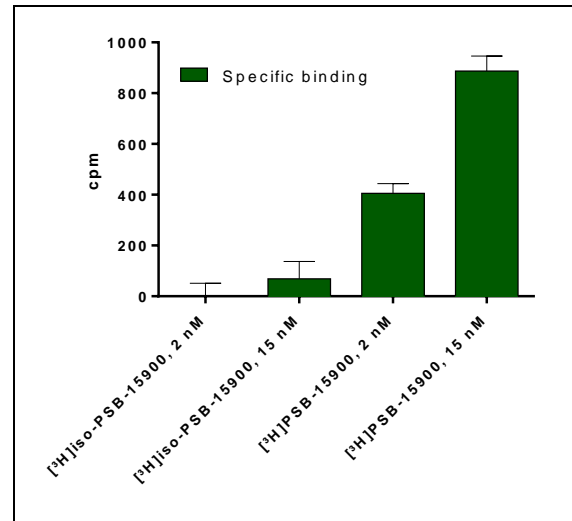


Abb. 31: Spezifische Bindung von 2 und 15 nM [³H]PSB-15900 und [³H]iso-PSB-1500 an Rattenstriatum-Membranpräparationen (150 µg Protein) bei 0°C.

4.3.2.4. Methodenentwicklung von Radioligandbindungsstudien an intakten Thrombozyten

Humane Thrombozyten können nicht nur in Form einer Membranpräparation als G α_q -Proteinquelle für Bindungsstudien verwendet werden, sondern bieten auch als ganze Zellen die Möglichkeit Liganden an einem System mit intakter Zellwand zu testen.⁸⁰ Da G α_q -Proteine auf der intrazellulären Seite lokalisiert sind, muss der potentielle Ligand unter *in vivo*-Bedingungen erst die Zellmembran passieren, um am Zielort wirken zu können.⁵⁹ Eine gute Membrangängigkeit spielt eine ebenso wichtige Rolle wie die Affinität zur Zielstruktur. Ergebnisse an intakten humanen Thrombozyten können mit denen an Membranpräparationen verglichen werden und bieten auf diese Weise einen zusätzlichen Hinweis auf die potentielle Membrangängigkeit des Liganden.

Thrombozyten-Konzentrate stellen Arzneimittel mit gültiger Zulassungsnummer dar, die einm hohen Anspruch an Qualität, Sicherheit und Unbedenklichkeit unterliegen. Die Herstellung des Thrombozyten-Aphärese-Konzentrats (TK) erfolgt mittels Hämaphärese als Thrombozytaphärese oder als Teil einer Multikomponentenspende. Die Leukozytendepletion ist in diesem Herstellungsverfahren bereits integriert⁸¹. So enthält das TK $\geq 2 \times 10^{11}$ /U Thrombozyten, $< 1 \times 10^6$ /U Leukozyten und $< 1 \times 10^9$ Erythrozyten, die in Citrat-Plasma agglomerationsarm gepuffert sind und bei 22 °C unter leichtem Schütteln gelagert werden.⁸¹

Um zu testen, ob sich unbehandeltes TK als Proteinquelle eignet und der Radioligand als auch die Kaltsubstanz membrangängig ist, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. So wurde getestet,

ob Plättchen-reiches-Plasma (PRP) ⁸², welches mit den TKs gleichzusetzen ist, im Vergleich zu Plättchen-armen-Plasma (PPP) ⁸², welches gleichzusetzen ist mit dem Citrat-Plasma, Bindung gegenüber [³H]PSB-15900 zeigt, und ob diese Bindung durch FR900359 verdrängt werden kann. PPP, welches keinerlei feste Zellbestandteile sondern nur lösliche Salze und Proteine enthält ⁸², sollte optimaler Weise keine oder nur eine niedrige Bindung mit [³H]PSB-15900 zeigen, die der unspezifischen Bindung entsprechen würde. PRP hingegen sollte eine gute Gesamtbindung wie auch spezifische Bindung zeigen.

Um PPP zu erhalten, wurde PRP für 60 min bei 25.000 g für 60 min zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. PPP wurde aus den vorliegenden TK-Beuteln (3,09 x 10¹¹ Thrombozyten/U) abgefüllt und unter leichten Schütteln ebenfalls bei RT gelagert. Die Bindungsstudie wurde unter den Bedingungen wie in Tab. 7 dargestellt durchgeführt und die Bindung von [³H]PSB-15900 an PPP und PRP, wurde miteinander verglichen. PPP und PRP wurden in einem Verhältnis von 1:10 und 1:100 mit Tris-HCl, pH 7,4, verdünnt. Die Inkubation wurde auf Basis der Ergebnisse aus Kapitel 4.4.2 bei 37 °C durchgeführt. ^a

Tab. 7: Bedingungen für die Durchführung eines Bindungsassays mit [³H]PSB-15900 an intakten humanen Thrombozyten.

Inkubationspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4
Inkubationstemperatur	37 °C unter leichtem Schütteln
Inkubationszeit	90 min
Proteinmenge	1:10 und 1:100 Verdünnung des PPP 1:10 und 1:100 Verdünnung des PRP (7,5 x 10 ⁶ Thrombozyten)
Radioligand-Konzentration	10 nM [³ H]PSB-15900
Unspezifische Bindung	5 µM FR900359
Gesamtbindung	DMSO
Glasfaserfiltertyp für die Filtration	GF/C (1822-024)
Waschpuffer für die Filtration	50 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20, 0,1% BSA pH 7,4 (eiskalt)
Szintillationscocktail	2,5 ml Luma Safe [®]

^a Versuche wurden von Dr. Aliaa Abdelrahman, AK Müller, Universität Bonn, durchgeführt.

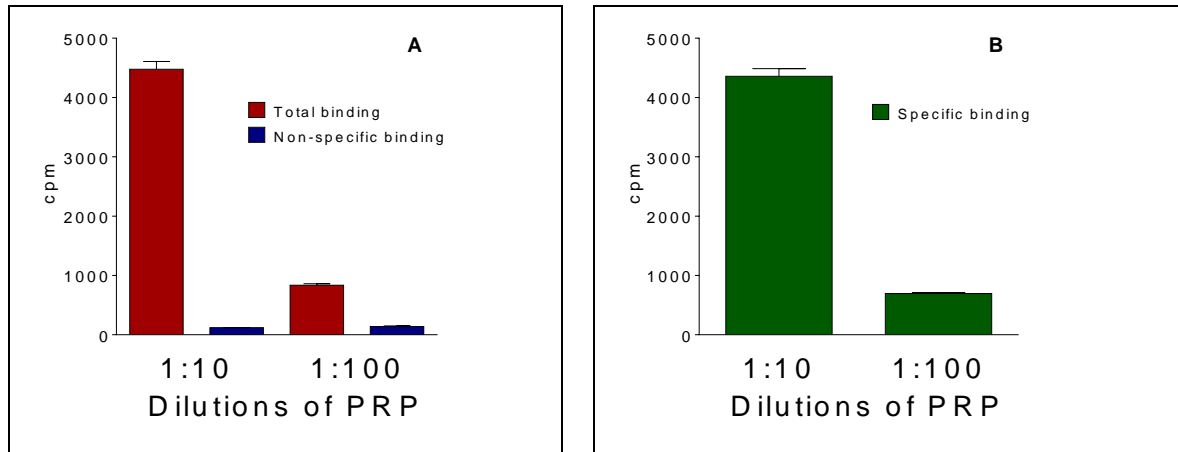


Abb. 32: Gesamtbindung und unspezifische Bindung (A) und spezifische Bindung (B) von 10 nM [³H]PSB-15900 an 1:10 und 1:100 Verdünnungen von PRP.

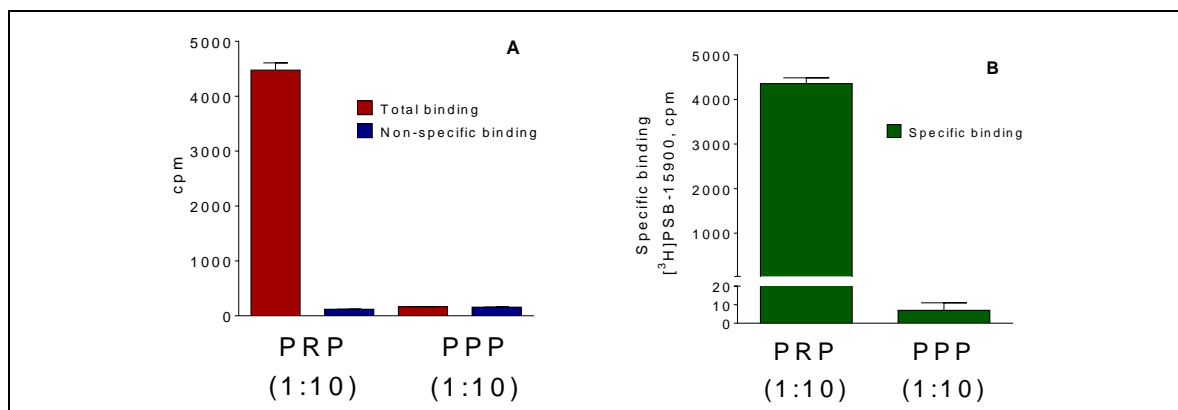


Abb. 33: Vergleich der Gesamtbindung und unspezifischen Bindung (A) und der spezifische Bindung (B) von 10 nM [³H]PSB-15900 an PRP und PPP mit einer Verdünnung von 1:10.

Aus Abb. 32A ist zu erkennen, dass [³H]PSB-15900 eine sehr hohe Gesamtbindung und eine sehr niedrige unspezifische Bindung an PRP aufweist. Die Gesamtbindung wie auch die unspezifische Bindung von [³H]PSB-15900 an PPP sind sehr niedrig und nahezu äquivalent, was besonders aus Aus Abb. 32B anhand der spezifischen Bindung ersichtlich ist. PPP hat keinen Einfluss auf die unspezifische Bindung, da die Gesamtbindung von PPP nahezu denselben Wert wie die unspezifische Bindung von PRP aufweist. Abb. 33A und Abb. 33B, zeigen dass eine 1:10-Verdünnung von PRP, was einer Konzentration von $7,5 \times 10^6$ Thrombozyten/vial entspricht, als einzusetzende Menge am besten eignet. Eine 1:100-Verdünnung von PRP weist im Vergleich zu einer 1:10-Verdünnung eine wesentlich niedrigere spezifische Bindung auf (vgl. Abb. 33B). Zusammengefasst kann gesagt werden, dass sich intakte humane Thrombozyten aus TK sehr gut für die Anwendung in Bindungsstudien mit [³H]PSB-15900 eignen.

4.4. Kinetik

Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten sind wichtige Kenngrößen für die Charakterisierung eines Radioliganden. Sie geben an, wie schnell ein Radioligand an das Zielprotein

bindet (Assoziation) und aus seiner Bindung durch einen Kompetitor verdrängt werden kann (Dissoziation). Darüber hinaus kann aus den bestimmten Geschwindigkeiten k_{on} und k_{off} ein K_d -Wert errechnet werden und so, mit dem aus Sättigungsstudien ermittelten K_d -Wert verglichen werden.

Alle Kinetikstudien mit [³H]PSB-15900 wurden mit einer Radioligand-Konzentration von 10 nM an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) und humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei verschiedenen Inkubationstemperaturen (0 °C, 25 °C (RT) und 37 °C) durchgeführt.

4.4.1. Assoziationsexperimente – Ergebnisse & Diskussion

Assoziationsexperimente wurden durch zeitversetzte Inkubation mit [³H]PSB-15900 (10 nM Endkonzentration) an Rattencortex-Membranpräparationen, humanen Thrombozyten-Membranpräparationen und intakten humanen Thrombozyten durchgeführt. In Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur (0 °C, RT und 37 °C) wurde die Assoziation über verschieden lange Zeiträume beobachtet (90 bis 420 min). Die Gesamtzeit der Inkubation betrug bei 0 °C 7 h, bei RT 3 h und bei 37 °C 1,5 h. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation unter leichtem Schütteln gestartet. Das Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM pH 7,4, der 0,1% BSA und 0,1% Tween 20 enthielt, (3 ml) gespült, um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe[®] Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-15900 wurde unter Verwendung von 10 µM FR900359 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO. Alle Experimente wurden dreimal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt, wobei Duplikate pro Messpunkt aufgenommen wurden.

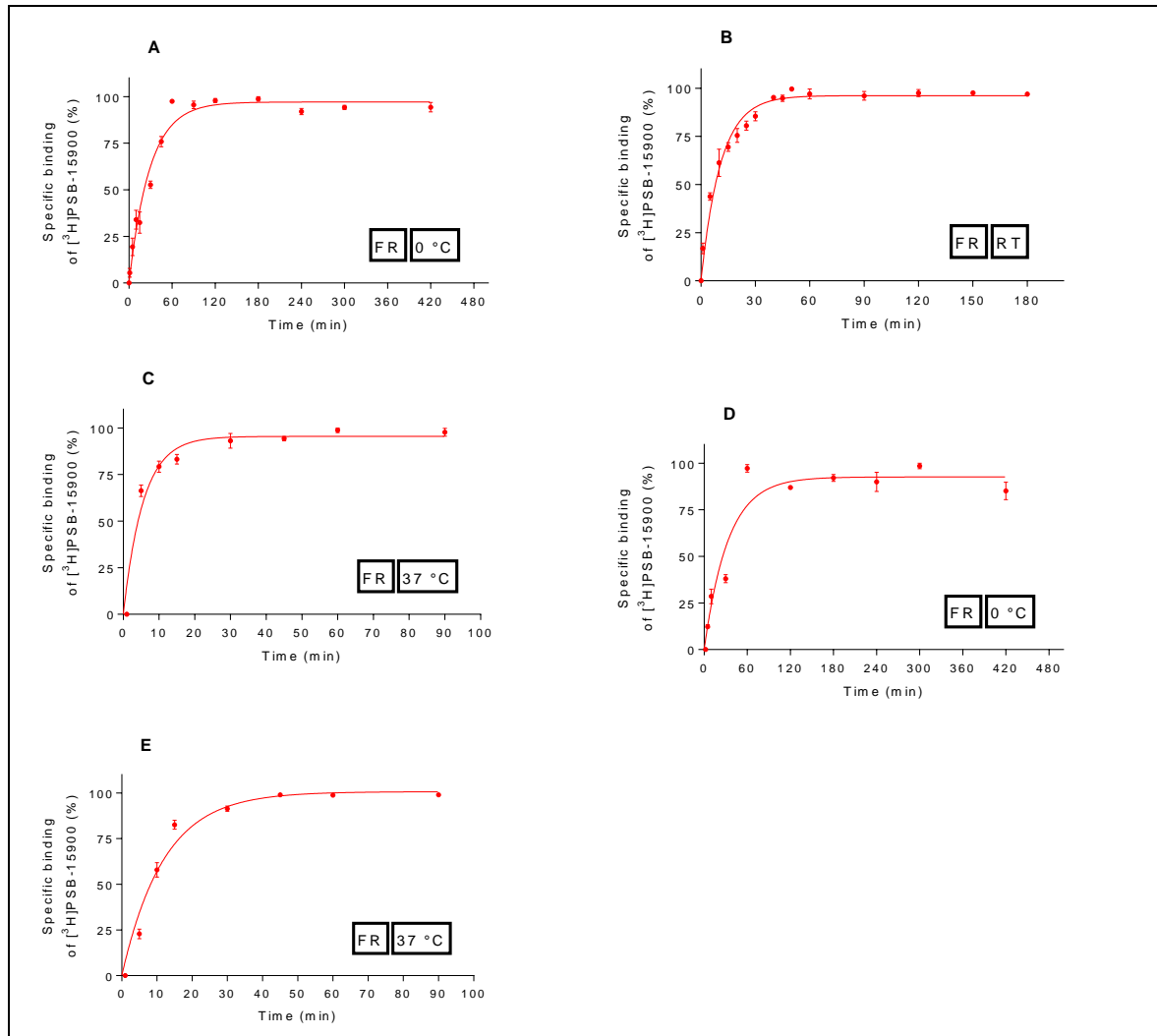


Abb. 34: Assoziationsexperimente von 10 nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) bei 0 °C (A), RT (B) und 37 °C Inkubationstemperatur (C); an Rattencortex-Membranpräparationen (10 μg Protein) bei 0 °C (D) und an intakten humanen Thrombozyten (7,5x 10⁶ Thrombozyten) (E).

Die Assoziationskurven spiegeln die zeitabhängige Bindung des Radioliganden an das G_q-Protein wieder, die nach Präinkubation mit Membranpräparation eingeleitet wurde. So ergaben sich folgende Kinetiken für humane Thrombozyten-Membranpräparationen: 0 °C - $K_{on} = 0,03446 \text{ min}^{-1} \text{ nM}^{-1}$, $t_{1/2} = 19,7 \text{ min}^{-1}$ (Abb. 34A); RT - $K_{on} = 0,09264 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 7,17 \text{ min}$ (Abb. 34B); 37 °C - $K_{on} = 0,17555 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 3,86 \text{ min}$ (Abb. 34C); für Rattencortex-Membranpräparationen bei 0 °C - $K_{on} = 0,03003 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 15,72 \text{ min}$ (Abb. 34D); für intakte humane Thrombozyten bei 37 °C - $K_{on} = 0,008377 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 8,27 \text{ min}$ (Abb. 34E).

[³H]PSB-15900 erreicht bei allen gemessenen Temperaturen und Membranpräparationen den Gleichgewichtszustand der Bindung (Equilibrium) und bleibt über dies hinaus weiterhin stabil. Das Gleichgewicht wurde bei Zugabe von Membranpräparation von humane Thrombozyten bei 0 °C innerhalb von 90 Minuten (Abb. 34A), bei RT innerhalb von 50 Minuten (Abb. 34B) und bei 37 °C

innerhalb von 30 Minuten erreicht (Abb. 34C). An Rattencortex-Membranpräparationen bei 0 °C wird das Gleichgewicht nach 90 min erreicht (Abb. 34D). Im Allgemeinen kann von einer zügigen Assoziation von [³H]PSB-15900 gesprochen werden, wobei eine Erhöhung der Temperatur die Assoziationskinetik beschleunigt.

4.4.2. Dissoziationsexperimente – Ergebnisse und Diskussion

Bei den Dissoziationsexperimenten wurde [³H]PSB-15900 (10 nM Endkonzentration) mit den Membranpräparationen bis zum Gleichgewicht der Bindung zwischen Radioligand und Protein vorinkubiert. Diese Zeit der Vorinkubation betrug 3 h bei 0 °C, 1,5 h bei RT und 1 h bei 37 °C. Anschließend wurde zeitversetzt die Dissoziation durch die Zugabe von 10 μM FR900359 initiiert. Das Ende der Dissoziation wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM pH 7,4, der 0,1% BSA und 0,1% Tween 20 enthielt, gespült, um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-15900 wurde unter Verwendung von 10 μM FR900359 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO. Alle Experimente wurden dreimal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt, wobei Duplikate pro Messpunkt aufgenommen wurden.

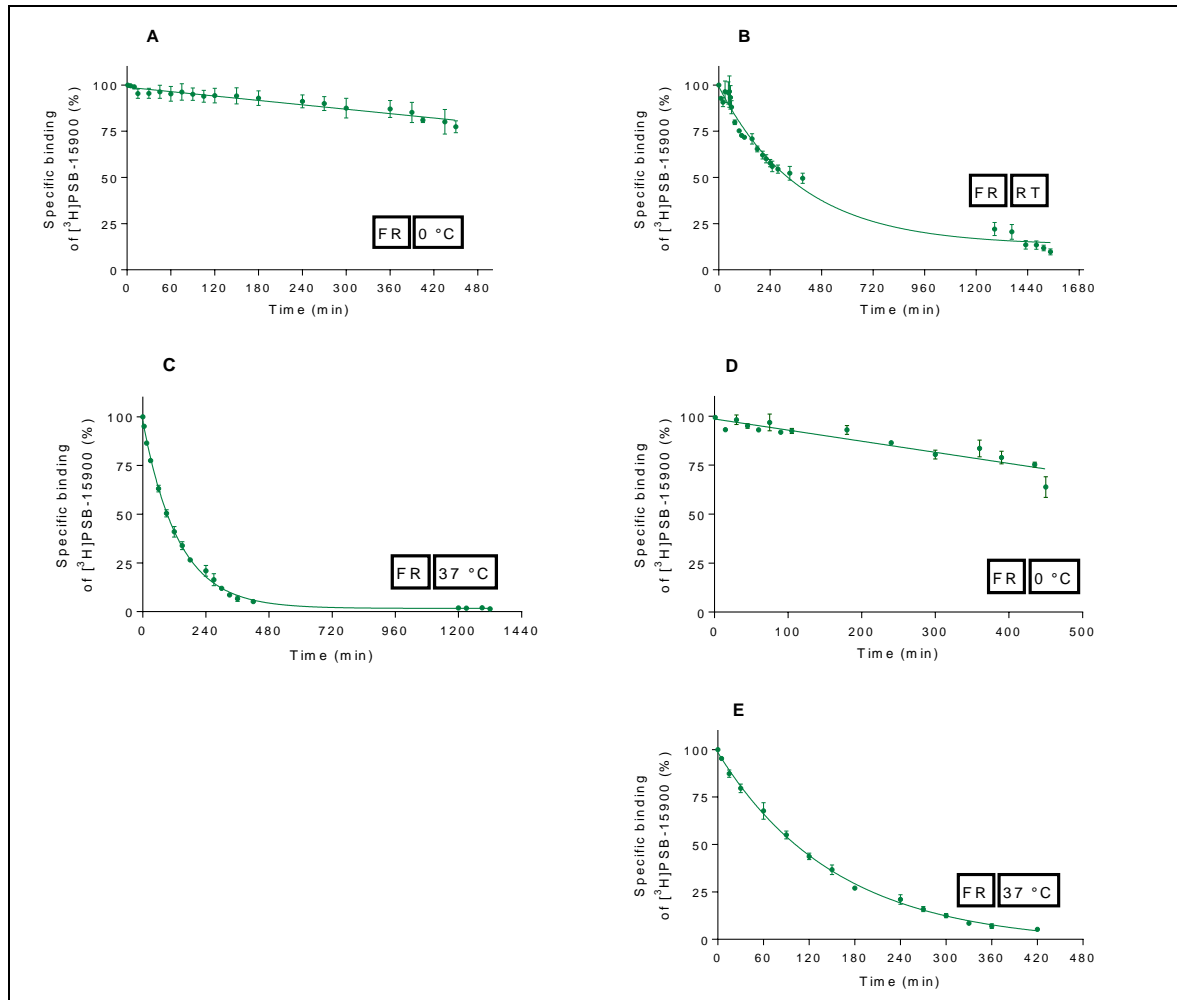


Abb. 35: Dissoziationsexperimente von 10 nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) bei 0 °C (A), RT (B) und 37 °C Inkubationstemperatur (C); an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0°C (D) und an intakten humanen Thrombozyten (7,5x 10⁶ Thrombozyten) bei 37 °C (E).

Die Dissoziationskurven (Abb. 35) spiegeln die zeitabhängige Dissoziation der Radioliganden vom G_q-Protein, durch Zugabe einer hohen Konzentration an nicht radioaktiven FR900359 wieder, das den Radioliganden aus dem während der Präinkubation gebildeten Komplex verdrängt. Dabei ergaben sich folgende Dissoziationskinetiken für humane Thrombozyten-Membranpräparationen: 0 °C - K_{off} ≈ 3,312 x10⁻⁶ min⁻¹, theoretische t_{1/2} = 3488 h (Abb. 35A); RT - K_{off} = 0,002639 min⁻¹, t_{1/2} = 263 min (Abb. 35B); 37 °C - K_{off} = 0,007431 min⁻¹, t_{1/2} = 93 min (Abb. 35C); für Rattencortex-Membranpräparationen bei 0 °C - K_{off} = 2,6676 x10⁻⁶ min⁻¹, theoretische t_{1/2} = ≈ 4179 h (Abb. 35D); für intakte Thrombozyten bei 37 °C - K_{off} = 0,006449 min⁻¹, t_{1/2} = 108 min (Abb. 35E)

Zu beobachten ist, dass [³H]PSB-15900 bei einer niedrigen Temperatur von 0 °C eine ultra-langsame Dissoziation zeigt (t_{1/2} = 3488 h), die Bindung kann daher als pseudoirreversibel bezeichnet werden. Eine genaue Dissoziationskonstante kann daher für diesen Temperaturbereich nicht berechnet werden. [³H]PSB-15900 zeigt eine temperaturabhängige Dissoziation, die durch Erhöhung der Inkubationstemperatur zunimmt vgl. Abb. 35E (RT t_{1/2} = 263 min) und Abb. 35F (37 °C t_{1/2} = 93

min). Daraus ergibt sich, dass für zukünftige Konkurrenzexperimente eine Inkubationstemperatur von 37 °C sinnvoll ist, um eine Konkurrenz zu ermöglichen.

4.4.3. Assoziations- & Dissoziationsexperimente – Zusammenfassung

[³H]PSB-15900 zeigt eine schnelle Assoziations- und eine extrem langsame Dissoziationskinetik. Die langsame Dissoziation lässt vermuten, dass der Radioligand [³H]PSB-15900 in seiner Bindungstasche festgehalten wird. Mögliche Erklärungen hierfür werden in Kapitel 6.2 erörtert. Tab. 8 und Abb. 36 fassen die ermittelten Ergebnisse zusammen, und ermöglicht einen direkten Vergleich der Assoziation und Dissoziation von [³H]PSB-15900 an verschiedenen Geweben und Inkubationstemperaturen.

Tab. 8: Zusammenfassung der Halbwertszeiten der Assoziation und Dissoziation von 10 nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen, intakten humanen Thrombozyten und Rattencortex-Membranpräparationen.

	$t_{1/2} \pm \text{SEM}$ (min)
0°C	
Assoziation Humane Thrombozyten-Membranpräparationen	19.7 ± 0.99
Dissoziation Humane Thrombozyten-Membranpräparationen	>450
Assoziation Ratten Cortex- Membranpräparationen	15.7 ± 0.09
Dissoziation Ratten Cortex- Membranpräparationen	>450
21°C (RT)	
Assoziation Humane Thrombozyten-Membranpräparationen	7.2 ± 0.61
Dissoziation Humane Thrombozyten-Membranpräparationen	265.3 ± 15.3
37°C	
Assoziation Humane Thrombozyten-Membranpräparationen	3.9 ± 0.29
Dissoziation Humane Thrombozyten-Membranpräparationen	93.3 ± 2.55
Assoziation Intakte humane Thrombozyten	7.13 ± 0.42
Dissoziation Intakte humane Thrombozyten	107.6 ± 3.80

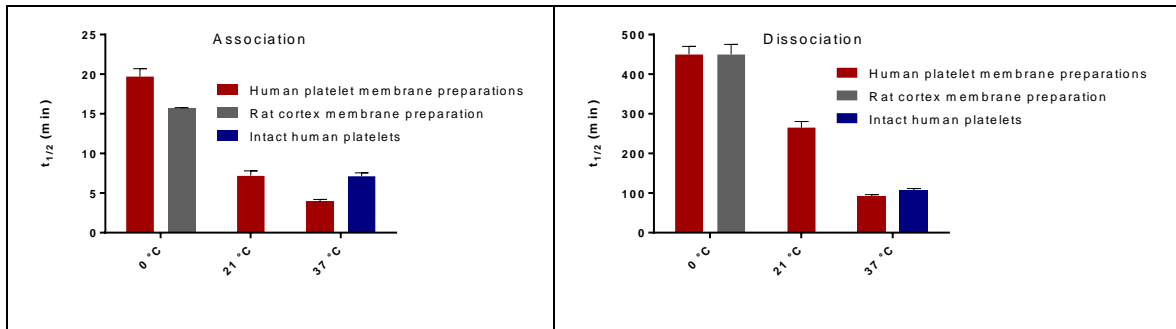
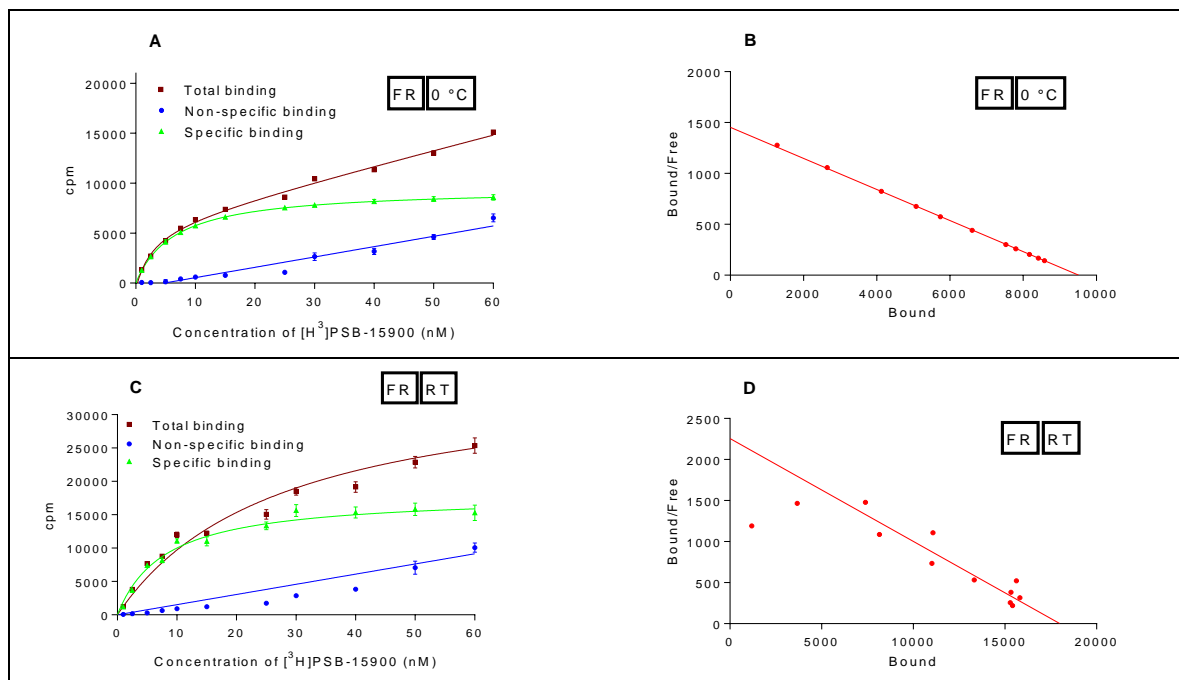


Abb. 36: Zusammenfassung der Halbwertszeiten der Assoziation (links) und Dissoziation (rechts) von 10 nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen, intakten humanen Thrombozyten und Rattencortex-Membranpräparationen bei verschiedenen Temperaturen.

4.5. Sättigungsexperimente

Alle Sättigungsstudien mit [³H]PSB-15900 (Abb. 37) wurden mit verschiedenen Radioligandkonzentrationen von 1 bis 60 nM an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) und humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei verschiedenen Inkubationstemperaturen (0 °C, 25 °C (RT) und 37 °C) durchgeführt. Die Experimente wurden dreimal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt, wobei Duplikate pro Messpunkt aufgenommen wurden.



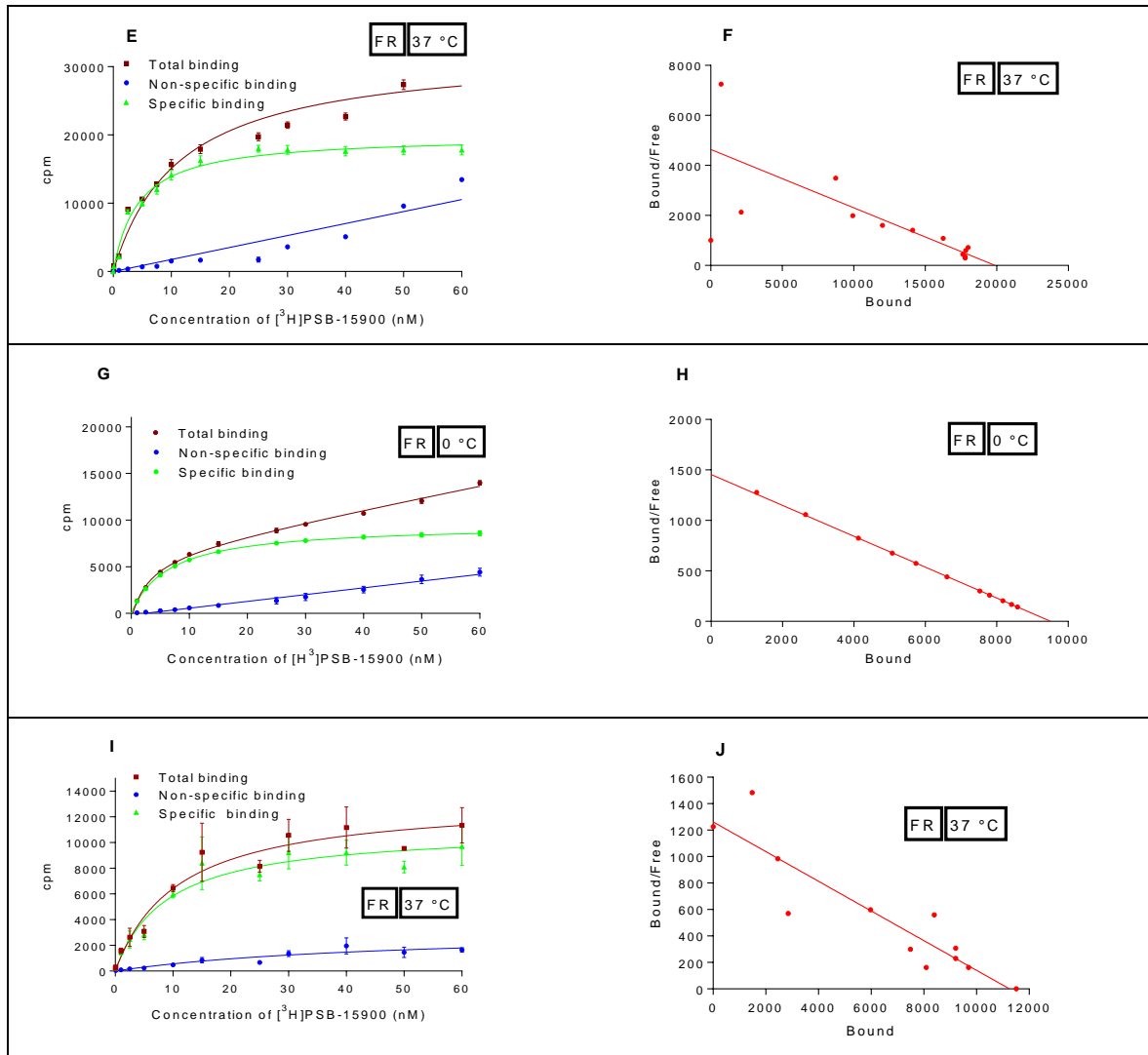


Abb. 37: Sättigungsexperimente von [³H]PSB-15900 an Membranpräparationen von humanen Thrombozyten (50 µg Protein) bei 0 °C (A), RT (C) und 37 °C (E), Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0 °C (G) und intakten humanen Thrombozyten bei 37 °C (7,5 × 10⁶ Thrombozyten) (I). Gesamtbinding (■), unspezifische Bindung (●) und spezifische Bindung (▲) wurden bei einer Radioligand-Konzentration von 1 bis 60 nM gemessen. (B), (D), (F), (H) und (J) zeigen die korrespondierenden Scatchard-Rosenthal-Plots.^a

Die unspezifische Bindung, die in Gegenwart von FR-900359 (5 µM) bestimmt wurde, ist gering und hängt von der eingesetzten [³H]PSB-15900-Konzentration ab, wobei die unspezifische Bindung sättigbar ist. Der Radioligand zeigt eine hohe Affinität bei allen getesteten Inkubationstemperaturen an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen: $K_d = 6,55 \pm 0,32$ nM bei 0 °C, $7,98 \pm 0,98$ nM bei RT und $4,28$ nM bei 37 °C. An Rattencortex-Membranpräparationen besitzt [³H]PSB-15900 einen K_d von $6,50 \pm 0,31$ nM bei 0 °C; an intakten humanen Thrombozyten $K_d = 8,91 \pm 2,30$ bei 37 °C. Die Gesamtzahl der Bindungsstellen (B_{max}) entspricht $186 \pm 4,11$ pmol/mg Protein an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen, $576 \pm 8,87$ pmol/mg Protein an Rattencortex-Membranpräparationen und $682 \pm 85,2$ Bindungsstellen pro Thrombozyt an intakten humanen Thrombozyten. Alle aus den Sättigungsexperimenten ermittelten Werte für den K_d und

^a Sättigungsstudien an intakten humanen Thrombozyten wurden von Dr. Aalia Abdelrahman durchgeführt.

B_{max} wurden statistisch untersucht (unpaired two tailed t test) und sind nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Die Sättigungsexperimente zeigen, dass es sich bei [³H]PSB-15900 um einen hochaffinen Radioliganden handelt, der sich exzellent für die Anwendung in Bindungsstudien eignet.

4.6. Konkurrenzexperimente

4.6.1. Testung bekannter und potentieller Gα_q-Inhibitoren

Um neue Liganden für bekannte Zielstrukturen zu finden und bereits bekannte Liganden zu charakterisieren, untersucht man, ob die entsprechende Substanz in der Lage ist, mit dem Radioliganden um die Bindung an die Zielstruktur zu konkurrieren. Durch Konkurrenzexperimente kann die Affinität einer Verbindung zur Zielstruktur bestimmt werden. Bindet eine Verbindung an einer Zielstruktur, in unserem Fall das Gα_q-Protein, so kann diese Bindung kompetitiv oder nicht-kompetitiv sein. Im Falle einer kompetitiven Bindung bindet der Ligand an derselben Stelle (orthosterisch) wie der Radioligand. Im Falle einer nicht-kompetitiven Bindung bindet der Ligand an einer anderen Stelle des Proteins (allosterisch) als der Radioligand und bewirkt eventuell eine Konformationsänderung der Zielstruktur, die sich wiederum auf die Bindung des Radioliganden auswirken kann. Die Bindung des Radioliganden, kann durch einen negativen allosterischen Modulator (NAM) erniedrigt, aber auch durch einen positiven allosterischen Modulator (PAM) erhöht werden.⁸³

Als potente, selektive Gα_q-Inhibitoren wurden bisher YM-254890 und FR900359, sowie Derivate und Analoge, in funktionellen Bindungsstudien charakterisiert.^{12; 59; 56} Daten aus Radioligandbindungsstudien, die nicht funktioneller Natur waren, konnten bisher auf Grund des Fehlens eines verfügbaren Radioliganden der dieselbe Bindungsstelle wie YM-254890 adressiert, nicht erhoben werden. [³H]PSB-15900 ermöglicht dies erstmals und erlaubt einen Vergleich mit Daten aus funktionellen Experimenten.

4.6.2. Konkurrenzexperimente an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen und Rattencortex-Membranpräparationen

Alle Konkurrenzexperimente wurden in einem Inkubationspuffer, der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 enthielt, durchgeführt. Vials enthielten 5 µl der Testverbindung in DMSO, 50 µl [³H]PSB-15900 (77 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und 50 µl Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bzw. humane Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg) in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation für 90 min bei 37 °C (3h bei 0 °C für

Rattencortex) unter leichtem Schütteln gestartet. Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4 gespült, um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-15900 wurde unter Verwendung von 10 µM FR900359 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO. Für die Berechnungen der K_i -Werte und der korrespondierenden pK_i -Werte wurden die aus den Sättigungsexperimenten bestimmten K_d -Werte an Rattencortex-Membranpräparationen von 6,50 nM und 4,28 nM für humane Thrombozyten-Membranpräparationen herangezogen.

4.6.2.1. Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten mit Rattencortex-Membranpräparationen

In Konkurrenzstudien gegen [³H]PSB15900 an Rattencortex-Membranpräparationen wurde der K_i - und IC_{50} -Wert von FR900359 bestimmt (Tab. 9). Dabei bindet FR900359 hochaffin und besitzt einen K_i -Wert von 4,47 nM und einen IC_{50} von 17,6 nM. FR900359 zeigt über einen Konzentrationsbereich von 0,001 – 5 µM eine vollständige Inhibitionskurve (Abb. 38). Der korrespondierende pK_i -Wert ist in Abb. 39 dargestellt.

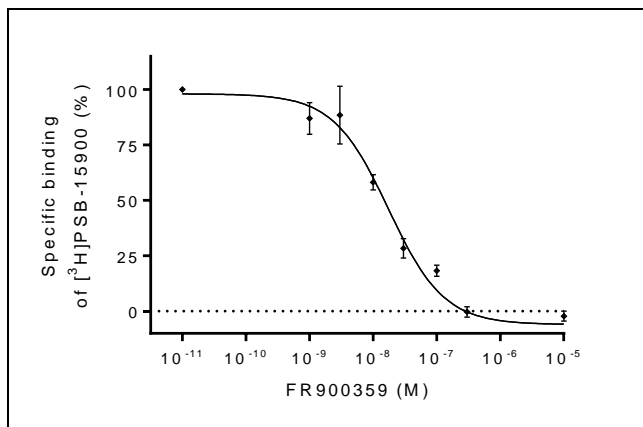


Abb. 38: Konkurrenzkurve von FR900359 an Rattencortex-Membranpräparation (10 µg Protein) gegen 5 nM [³H]PSB-15900 bei 0 °C.

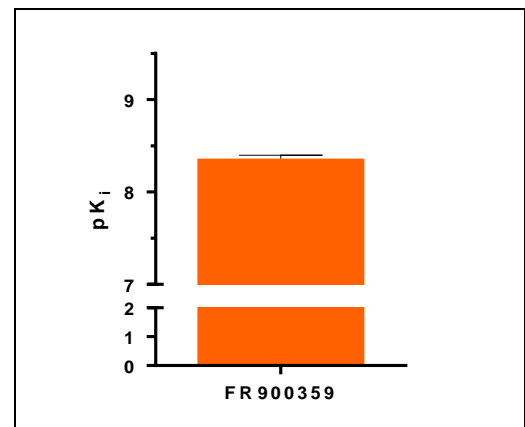


Abb. 39: pK_i -Wert von FR900359 an Rattencortex-Membranpräparation (10 µg Protein) gegen 5 nM [³H]PSB-15900 bei 0 °C.

Tab. 9: Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten an Rattencortex-Membranpräparation (10 µg Protein) gegen 5 nM [³H]PSB-15900 bei 0 °C Inkubationstemperatur.

Verbindung	$K_i \pm SEM$ (nM)	$pK_i \pm SEM$	$IC_{50} \pm SEM$ (nM)	$pIC_{50} \pm SEM$
FR900359	4,47 ± 0,71	8,36 ± 0,07	17,6 ± 2,60	7,76 ± 0,06

4.6.2.2. Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten mit humanen Thrombozyten-Membranpräparationen

Die in den Konkurrenzexperimenten mit humanen Thrombozyten-Membranpräparationen getesteten Verbindungen (vgl. Tab. 10) sind strukturell dem FR900359 verwandt und sind ebenfalls Depsipeptide. Neben dem bereits bekannten selektiven Gα_q-Inhibitor YM-254890 (Abb. 41) wurden ein semisynthetisches Derivat von FR900359 (FR-Hex) sowie auch aus *Ardisia crenata* isolierte Strukturen, welche sich in den Modifikationen ihrer Seitenketten von FR900359 unterscheiden, getestet. Die in Abb. 40 zu dargestellten Verbindungen AC-0, AC-1 und AC-3 sind natürliche FR900359-Analoga die nur in geringem Maße aus der Pflanze, genauer gesagt aus dem Endosymbionten, unter großem Aufwand isoliert werden konnten. FR-Hex stellt ein semisynthetisches Produkt aus FR900359, welches durch eine Veresterung mit einer Hexansäure dargestellt wurde.^a

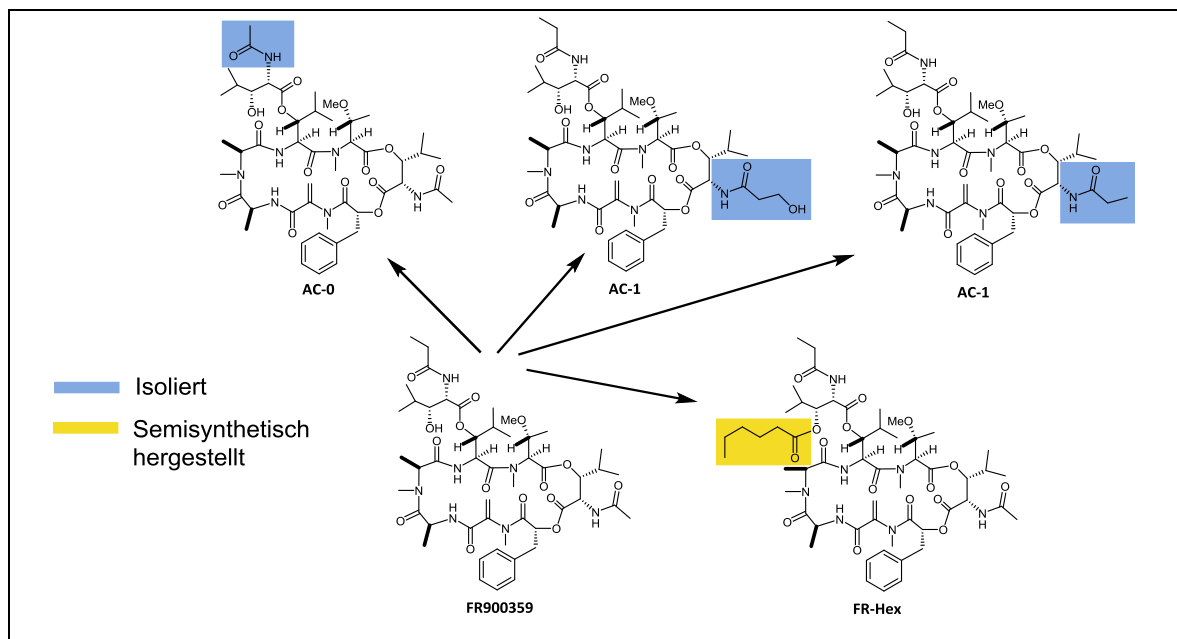


Abb. 40: FR900359 und FR-Derivate aus *A. crenata* isoliert bzw. semisynthetisch hergestellt.

^a Synthese und Isolierung wurden von R. Reher, Arbeitskreis Prof. Dr. G. König, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, im Rahmen seiner laufenden Dissertation, durchgeführt.

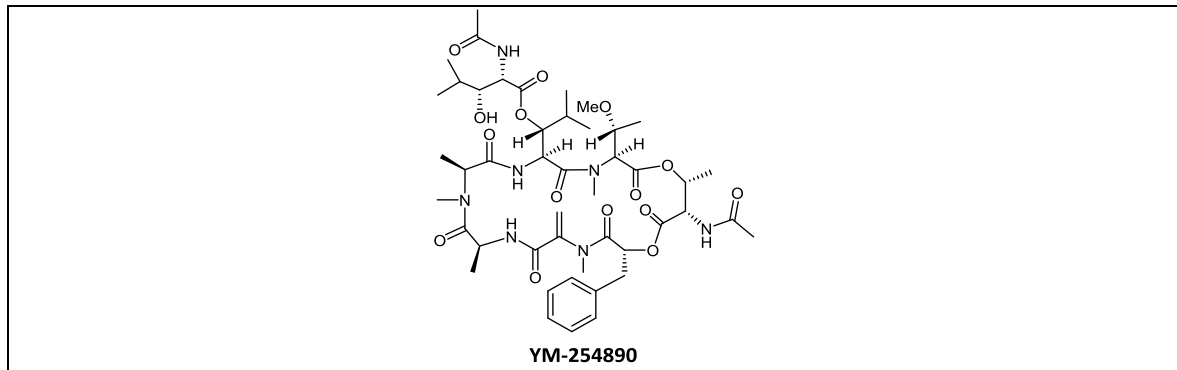


Abb. 41: Struktur von YM-254890.

Wie aus Tab. 10 zu erkennen ist, zeigen FR900359 und YM-254890 vergleichbare K_i -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich (FR900359 - $K_i = 6,19$ nM; YM-254890 - $K_i = 4,54$ nM). Demnach besitzt YM-254890 eine leicht höhere Affinität als FR900359. Der bestimmte K_d -Wert von [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten bei 37 °C von 4,28 nM ist mit dem ermittelten K_i -Wert von FR900359 (6,19 nM) vergleichbar, demnach entsprechen sich beide Verbindungen in ihrer Affinität. Die Strukturen aus pflanzlicher Herkunft AC-0, AC-1 und AC-3 weisen ebenfalls eine hochaffine Bindung zu Gα_q auf, wobei die Affinität von AC-3 ($K_i = 1.24$ nM) über AC-1 ($K_i = 6,32$ nM) zu AC-0 ($K_i = 10,5$ nM) sinkt. Das semisynthetische Derivat FR-Hex weist im Vergleich zu den anderen getesteten Strukturen die niedrigste Affinität mit 35700 nM auf und bindet somit nicht hochaffin. Durch diese Ergebnisse kann gesagt werden, dass eine Modifikation in der vorliegenden Form nicht toleriert wird und zu einer verringerten Affinität führt. Abb. 42 zeigt die Bindungskurven der getesteten Verbindungen. Hier zeigt sich deutlich, dass FR-Hex im Gegensatz zu den anderen Verbindungen eine niedrige Affinität besitzt. Des Weiteren scheint die Verbindung in höheren Konzentrationen Löslichkeitsprobleme zu besitzen, wodurch keine komplette Kurve dargestellt werden kann. Alle anderen Verbindungen zeigen einen kompletten Kurvenverlauf mit maximaler Inhibition. In Abb. 43 sind die korrespondierenden pK_i -Werte dargestellt.

Tab. 10: Ergebnisse und Signifikanzen (unpaired two tailed t test) aus Konkurrenzexperimenten an humanen Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) gegen 5nM [³H]PSB-15900 bei 37°C.

Substanz	$K_i \pm \text{SEM}$ (nM)	$pK_i \pm \text{SEM}$	$IC_{50} \pm \text{SEM}$ (nM)	P-Wert; FR als Kontrolle
AC-0	10.5 ± 1.79	7.99 ± 0.07	16.8 ± 3.20	0,3261 ns ^a
AC-1	6.32 ± 0.72	8.21 ± 0.05	9.28 ± 0.98	0,0255 *
AC-3	1.24 ± 0.06	8.91 ± 0.02	2.30 ± 0.12	0,0001 ***
FR-Hex	35700 ± 6100	4.46 ± 0.08	56600 ± 13200	< 0,0001 ****
FR900395	6.91 ± 1.30	8.18 ± 0.08	18.5 ± 4.55	
YM-254890	4.54 ± 0.81	8.36 ± 0.07	6.81 ± 0.63	0,0026 **

^a ns = nicht signifikant

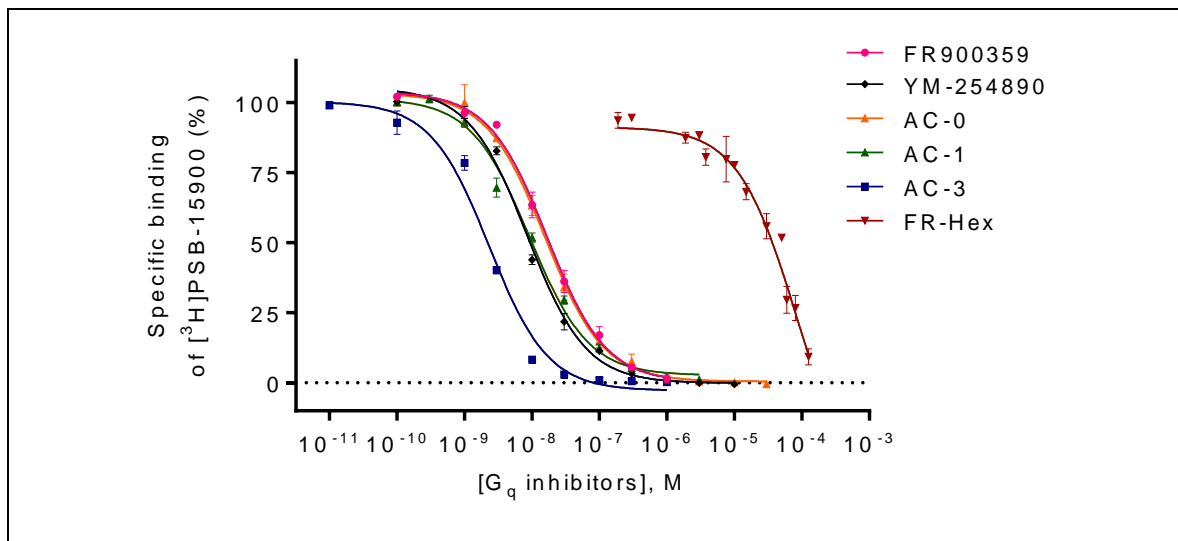


Abb. 42: Bindungskurven von Gα_q-Inhibitoren an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) gegen 5nM [³H]PSB-15900 bei 37 °C.

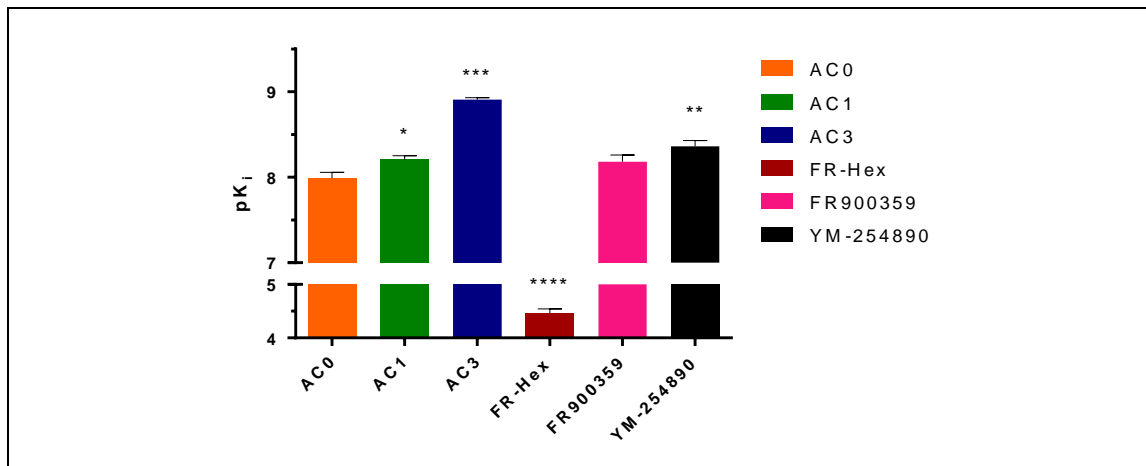


Abb. 43: pK_i-Werte von Gα_q-Inhibitoren an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) gegen 5nM [³H]PSB-15900 bei 37 °C. Signifikant unterschiedlich zu FR900359: * = P ≤ 0.05; ** = P ≤ 0.01; *** = P ≤ 0.001; **** = P ≤ 0.0001.

4.6.3. Konkurrenzexperimente an intakten humanen Thrombozyten

Nach Vorbild der Konkurrenzstudien an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen wurden Konkurrenzstudien mit FR900359 und YM-254890 an intakten humanen Thrombozyten durchgeführt.

Alle Konkurrenzexperimente wurden in einem Inkubationspuffer der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, enthielt durchgeführt. Vials enthielten 5 µl der Testverbindung in DMSO, 50 µl [³H]PSB-15900 (77 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und 50 µl einer 1:10 Verdünnung des Aphärese-Konzentrats humaner Thrombozyten (TK), was einer Konzentration von 7,5 x 10⁶ Thrombozyten pro Vial entspricht, in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe des 1:10 TK bei 37 °C unter

leichtem Schütteln gestartet und für 90 min durchgeführt. Das Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4 gespült, um gebundenen von freiem Radioligand zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-15900 wurde unter Verwendung von 10 μM FR900359 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO. Für die Berechnungen der K_i -Werte und der korrespondierenden pK_i -Werte wurden die aus den Sättigungsstudien bestimmten K_d -Werte von 8,91 nM für intakte humane Thrombozyten herangezogen.

4.6.3.1. Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten mit humanen Thrombozyten-Membranpräparationen

Die beiden untersuchten Verbindungen YM-245890 und FR900359 zeigen an intakten humanen Thrombozyten sehr ähnliche Affinitäten (vgl. Tab. 11). Der K_i beträgt für YM-254890 1,56 nM und für FR900359 1,15 nM. Somit besitzen FR900359 und YM-254890 auch an intakten Thrombozyten eine hohe Affinität, woraus auf eine gute Membrangängigkeit beider Verbindungen zu schließen ist. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Wettbewerbsstudien an Membranpräparation von Thrombozyten zeigen beide Verbindungen eine leicht höhere Affinität, die aber ebenfalls in selben niedrigen einstelligen nanomolaren Bereich liegt. Die Bindungskurven beider Verbindungen zeigen eine komplette Inhibition (vgl. Abb. 44). Abb. 45 zeigt die korrespondierenden pK_i -Werte im Vergleich. Demnach sind auf FR900359 und YM-254890 an intakten humanen Thrombozyten in ihrer Affinität gleichwertig.

Tab. 11: Ergebnisse und Signifikanzen (unpaired two tailed t test) aus Konkurrenzexperimenten an intakten humanen Thrombozyten ($7,5 \times 10^6$ Thrombozyten) gegen 5nM [³H]PSB-15900 bei 37°C.

Substanz	$K_i \pm \text{SEM}$ (nM)	$pK_i \pm \text{SEM}$	$IC_{50} \pm \text{SEM}$ (nM)	P-Wert; FR als Kontrolle
YM-254890	2,21 \pm 0,15	8,66 \pm 0,06	3,20 \pm 0,39	ns
FR900395	2,05 \pm 0,20	8,69 \pm 0,04	3,78 \pm 0,38	

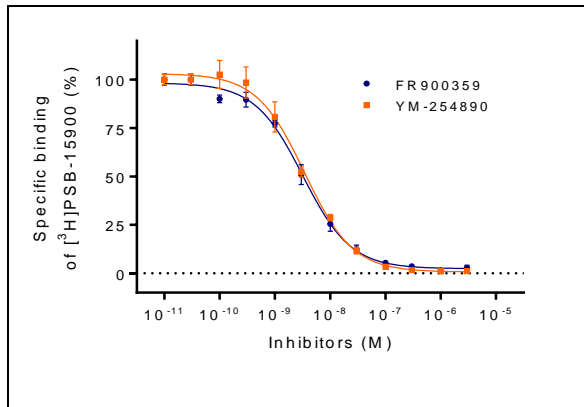


Abb. 44: Kompetitionskurven: FR900359; YM-254890 an intakten humanen Thrombozyten ($7,5 \times 10^6$ Thrombozyten) gegen 5nM [³H]PSB15900 bei 37 °C.

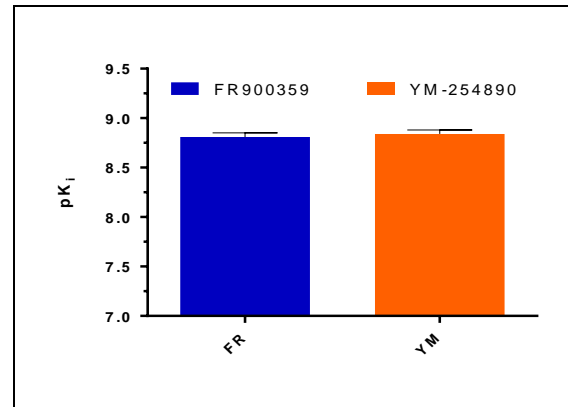


Abb. 45: pK_i-Werte von FR900359; YM-254890 an intakten humanen Thrombozyten ($7,5 \times 10^6$ Thrombozyten) gegen 5 nM [³H]PSB15900 bei 37°C.

4.7. Konkurrenzexperimente im High-Throughput-Format

4.7.1. Einleitung

Radioligand-Bindungsstudien können in verschiedenen Formaten durchgeführt werden. Ganz nach den eigenen Bedürfnissen kann die Inkubation der Testsubstanzen mit Radioligand und Protein in Inkubationsgefäßen, z.B. Mikrotiterplatten, stattfinden, die 6, 12, 24, 48, 96, 384 oder sogar 1536 voneinander getrennte Kavitäten (wells) besitzen. Steigert man die Anzahl der Substanzen, die gleichzeitig inkubiert werden, erhöht sich automatisch der Durchsatz und somit die Anzahl der Ergebnisse pro Versuch. Neben dem geringeren Verbrauch an Radioligand, Chemikalien, und Testsubstanz bringt der Umstieg auf ein größeres Format auch eine große zeitliche Ersparnis mit sich. Viele Arbeitsschritte müssen nicht mehrmals ausgeführt werden oder können durch die Wahl eines größeren Formates durch bestimmte Hilfsmittel automatisierter durchgeführt werden. Hochdurchsatz- (HTS)-Verfahren sind heutzutage für die standardisierte pharmakologische Testung bei der Suche nach potentiellen Arzneistoffen die Methode der Wahl und haben klassische kleine Formate abgelöst.^{85; 84} Große Substanzbibliotheken die 10.000 und mehr Substanzen enthalten, können auf diese Weise schnell und effektiv auf neue potentielle Wirkstoffe untersucht werden. Eine Adaption von einem Kleinformat auf ein Großformat stellt einen wichtigen Schritt für die zukünftige Verwendung von [³H]PSB-15900 dar. Eine Hochskalierung unter Verwendung anderer Gerätschaften als die, die in den konventionellen Bindungsstudien zum Einsatz kommen, birgt natürlich das Risiko ein, dass Sensitivität, Genauigkeit oder Reproduzierbarkeit geringer werden. Daher müssen Ergebnisse aus dem HTS-Format mit denen aus den konventionellen Bindungsstudien auf Vergleichbarkeit überprüft werden. Zudem ist es wichtig die Qualität des HTS-Assays durch den Z'-Faktor zu bestimmen. Der Z'-Faktor beschreibt die Qualität, ähnlich wie ein Signal-Rausch-Verhältnis, berücksichtigt jedoch dabei im Vergleich mehr Variablen die

gegeneinander in Verhältnis gesetzt werden. Nämlich die Variabilität der Positiv- und Negativkontrollen (Variabilitätsband), den dynamischen Bereich zwischen den Kontrollen und den daraus resultierenden Abstand zwischen beiden (Trenn-Band), was in Abb. 46 dargestellt ist.⁸⁶ Je kleiner die Variabilitätsbänder, desto größer das Trenn-Band und je größer der dynamische Bereich ist, desto größer ist der Z'-Faktor ($Z' = \frac{\text{Trennband}}{\text{dynamischer Bereich}}$). Der Z-Faktor kann einen Wert zwischen 0 und 1,0 besitzen, wobei 1,0 ideal wäre. Ab einem Z-Wert von > 0,5 gilt die Qualität eines Assay als ideal und kann somit für Screening-Methoden verwendet werden.

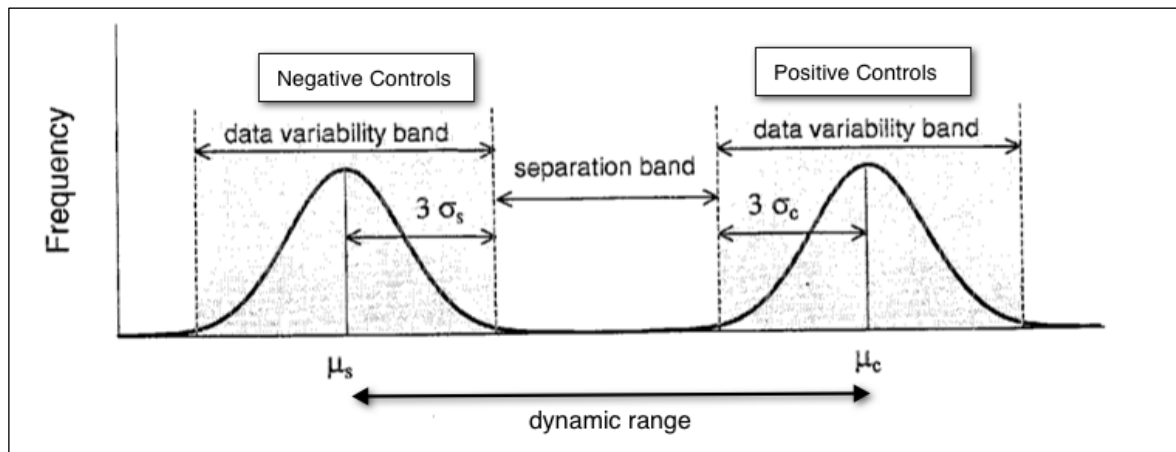


Abb. 46: Darstellung des statistischen Trennbandes zwischen Positiv- und Negativkontrolle.⁸⁶

4.7.2. Methodenentwicklung

Ziel bei der Entwicklung einer HTS-Methode war es, die Methode des bereits entwickelten Standard-Assays auf die Anforderungen eines HTS-Assays zu übertragen. Für den Standard-Assay wurde bisher ein 24er-Zellharvester der Firma Brandel (Abb. 48) mit passendem GF/C Membranfilter (Abb. 50) eingesetzt. Um den Durchsatz zu steigern, werden statt der bisher verwendeten Membranfilter, GF/C Unifilter™ (Abb. 50) die über 96 Filterpositionen verfügen und mittels eines 96er-Zellharvesters von Brandel (Abb. 47) vakuumfiltriert werden können, eingesetzt. Die Inkubation von Radioligand, Protein und Testsubstanz finden in Mikrotiterplatten mit ausreichendem Füllvolumen statt. Für die Messung wurde ein Mikrofilterplatten-Szintillations-Counter der Firma Canberra Packard vom Typ Topcount NXT® für 96-well-Platten verwendet (Abb. 49).

Alle Konkurrenzexperimente zur HTS-Etablierung wurden in einem Inkubationspuffer, der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 enthielt, durchgeführt. Wells der Mikrotiterplatte enthielten 5 µl der Testverbindung in DMSO, 50 µl [³H]PSB-15900 (77 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und humane Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation für 90 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln gestartet. Das Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über GF/C-UniFilter™ mit

einem Brandel 96-Well-Harvester eingeleitet. Die Filterplatten wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4 gespült (ca. 3 ml), um gebundenen von freiem Radioligand zu trennen. Anschließend wurden die Filter für 2 h getrocknet. Ultima Gold® Szintillationscocktail (50 µl pro Kavität) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Mikrofilterplatten-Szintillations-Counter vermessen. Die Gesamtbindung von [³H]PSB-15900 wurde unter Verwendung von 10 µM FR900359 in DMSO bestimmt, die spezifische Bindung durch Zugabe von DMSO. Für die Berechnungen der K_i -Werte und korrespondierenden pK_i -Werte wurde der aus den Sättigungsstudien bestimmten K_d -Werte von 4,28 nM für humane Thrombozyten-Membranpräparation herangezogen.

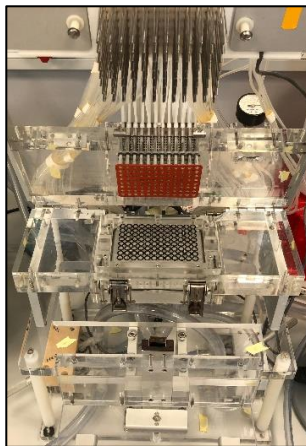


Abb. 47: Brandel 96er-Zellharvester, geschlossen (links), geöffnet (rechts).

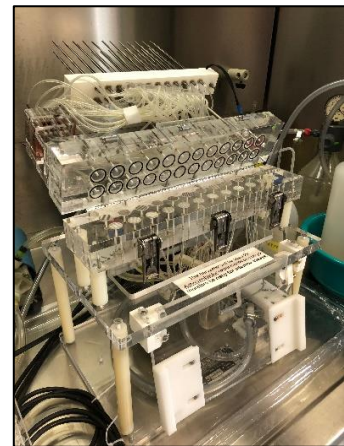


Abb. 48: Brandel 24er-Zellharvester.

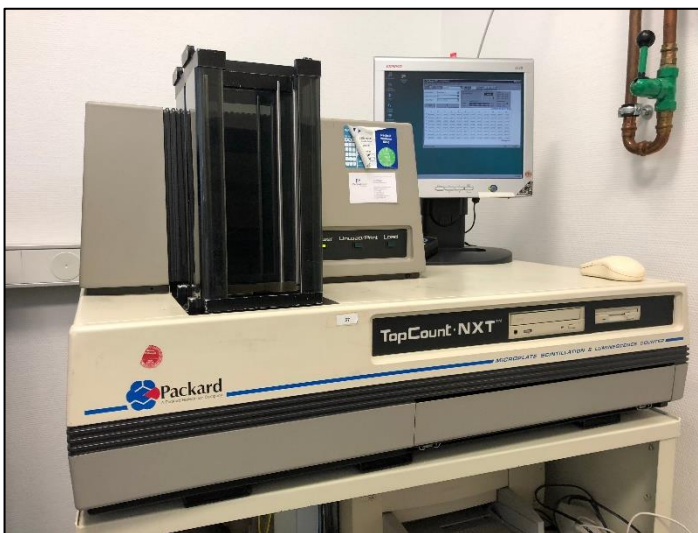


Abb. 49: TopCount NXT® Packard.

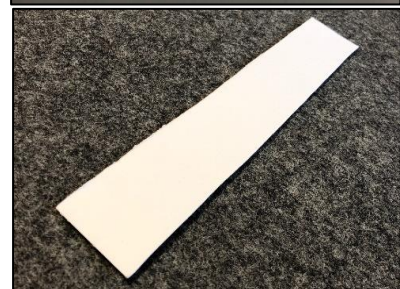
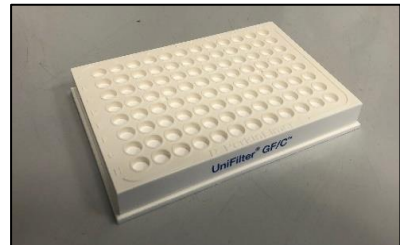


Abb. 50: GF/C - UniFilter™ 96-wells (oben); GF/C Membranfilter für 24-wells (unten).

Für die Bestimmung des Z' -Wertes wurden je eine Filterplatte mit 48 Positiv- und 48-Negativkontrollen an drei verschiedenen Tagen vermessen. Inkubationsbedingungen und

Filtrationsprozess entsprachen denen des Protokolls für die HTS-Etablierung. Daten wurden mittels GraphPad Prism, Version 6.01 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA) ausgewertet.

4.7.3. Ergebnisse und Diskussion

Unter HTS-Bedingungen zeigte FR900359 einen K_i -Wert von 6,19 nM, der im Vergleich mit dem gemessenen K_i -Wert von 6,91 nM unter Standard-Assay-Bedingungen vergleichbar ist (vgl. Tab. 12). Vergleicht man die Kurve von FR900359 unter HTS-Bedingungen mit der unter Standard-Assay-Bedingungen, so sind beide Kurven in ihrem Verlauf nahezu identisch (vgl. Abb. 51) und sind statistisch nicht signifikant unterschiedlich (unpaired two tailed t test). Dies spiegelt sich auch in den korrespondierenden pK_i -, IC_{50} - und pIC_{50} -Werten wieder (vgl. Tab. 12). Die Berechnung des Z' -Wertes aus den negativ und positiv Kontrollen (vgl. Tab. 13) für die HTS-Methode ergab einen Wert von 0,69. Dies bedeutet, dass sich der Assay unter durchgeführten Bedingungen hervorragend für das High-Throughput-Screening eignet und für das Screening von Substanzbibliotheken besonders gut geeignet ist.

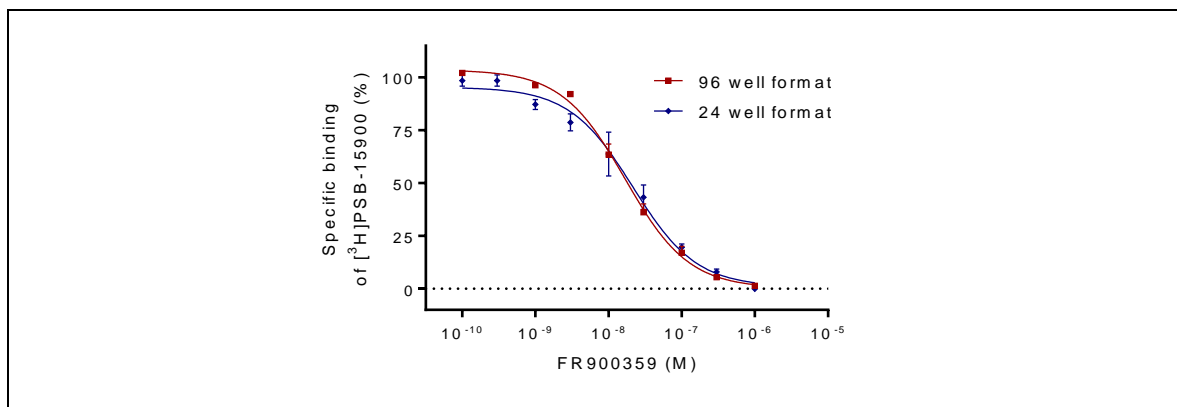


Abb. 51: Vergleich der Bindungskurven von FR900359 im 96- und 24-well Format an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) gegen [³H]PSB-15900 (5 nM) bei 37 °C.

Tab. 12: Vergleich der Ergebnisse von FR900359 gegen [³H]PSB15900 zwischen HTS- und Standard-Assay.

Format	$K_i \pm SEM$ (nM)	$pK_i \pm SEM$	$IC_{50} \pm SEM$ (nM)	Unpaired two tailed t test
24-well	6,91 ± 1,30	8,18 ± 0,08	18,5 ± 2,55	Kontrolle ns
96-well HTS	6,19 ± 2,49	8,24 ± 0.11	18,0 ± 4,38	

Tab. 13: Berechnung des Z'-Wertes für [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen.

	Mittelwert (cpm)	Varianz (SD)	Variabilität der Daten (3 x SD)	n
Positiv-Kontrolle (10 μ M FR900359)	447,8	90,81	272,4	144
Negativ-Kontrolle (DMSO)	13454	1235	3705	144

	Formel	Berechneter Wert
Positiver Schwellenwert (PS)	Mittelwert + 3 x SD	720,2
Negativer Schwellenwert (NS)	Mittelwert – 3 x SD	9749
Trennband (S)	PS – NS	9029
Dynamischer Bereich (R)	Mittelwert positiv Kontrolle – Mittelwert negativ Kontrolle	13006
Z'-Wert	S / R	0,69

4.8. Selektivität des Radioliganden zu den $G\alpha_q$ -Protein Untereinheiten

4.8.1. Einleitung

In den bisher durchgeführten Bindungsstudien mit [³H]PSB-15900 wurden native Gewebe von Ratten und humanen Thrombozyten als Quelle für $G\alpha_q$ -Proteine verwendet. Die Membranpräparationen enthalten eine Mischung aller in dem Gewebe nativ vorkommenden $G\alpha_q$ -Proteine, sowie auch eine Vielzahl von anderen G-Proteinen und vielen weiteren Proteinen einschließlich Rezeptoren. Umso wichtiger ist es, die Selektivität von [³H]PSB-15900 zu den einzelnen $G\alpha_q$ -Subspezies (vgl. Kapitel 4.8) zu bestimmen und auch zu beweisen, dass der Radioligand selektiv an $G\alpha_q$ bindet und die erhobenen Ergebnisse aus Bindungsstudien nicht durch Bindung an andere Zielstrukturen herrühren oder dadurch beeinflusst werden.

4.8.2. Methodenentwicklung

Ziel war es selektiv murines $G\alpha_q$ - wie auch humane $G\alpha_{q11}$, $G\alpha_{q14}$, $G\alpha_{q15}$ - Proteine in einem geeignetem Zellsystem zu überexprimieren, um deren Interaktion mit [³H]PSB-15900 untersuchen zu können. Hierfür wurde ein Nullhintergrund benötigt.

4.8.2.1. Retrovirale Transfektion von CRISPR- $G\alpha_q$ -knockout HEK Zellen mit humanen $G\alpha_{q11}$, $G\alpha_{q14}$, $G\alpha_{q15}$ -Protein und mit murinem $G\alpha_q$ -Proteinen

Zum Start und als Voraussetzung für die folgenden Experimente wurden die α -Untereinheiten der humanen $G\alpha_{q11}$, $G\alpha_{q14}$, $G\alpha_{q15}$ - und Maus- $G\alpha_q$ -Guaninnukleotid-bindenden Proteine mittels der kodierenden cDNA in den Vektor pcDNA3.1+ subkloniert. ^a Als Expressionssystem wurden CRISPR-

G α _q-knockout humane embryonale Nieren (HEK-) Zellen^a ausgewählt, da diese Zelllinie über keine eigene G_q-Produktion mehr verfügt und sich optimal als Zelllinie mit einem Null-Hintergrund eignet.

Die Proteinsequenzen der menschlichen und murinen G α _q-Proteine unterscheiden sich nur um eine Aminosäure in Position 171 (Alanin im Menschen und Serin in der Maus). Das Maus-G α _q-Protein enthielt ein internes Hämagglutinin (HA)-Tag, welches durch die Modifikationen E125D, N126V, Y128D, V129Y und D130A eingeführt wurde. Für die Durchführung der retroviralen Transfektion wurde die Methode nach *Hillmann et al.* angewendet.⁸⁷

Die kodierende Sequenz der humanen G α _{q11}-, G α _{q14}-, G α _{q15}- und Maus-G α _q-Proteine (mit einem internen HA-tag versehen) wurden jeweils in den retroviralen Expressionsvektor pQCXIN kloniert, amplifiziert, gereinigt und sequenziert. Anschließend wurde dieser zusammen mit der vesikulären Stomatitis-Virus-G (VSV-G) Protein-DNA unter Verwendung von Lipofectamin 2000 in GP⁺envAM-12 Verpackungszellen transfiziert.

Nach 16 h wurde 3 ml Dulbecco's-modified-Eagle-Medium (DMEM) welches 10% fötales Rinderserum, 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (Endkonzentrationen: Penicillin = 100 U/ml, Streptomycin = 0,1 mg/ml) und Natriumbutyrat (5 mM) enthielt den Verpackungszellen hinzugegeben.

Diese wurden 48 Stunden lang bei 32 °C und 5% CO₂ kultiviert, wobei in dieser Zeit die entstehenden viralen Vektoren, die die Rezeptorsequenz enthielten, in das umgebende Medium freigesetzt wurden. Die Vektoren wurden abgetrennt, mittels eines 45 µm Sterilfilter filtriert und mit HEK CRISPR-G α _q-knockout Zellen vereint. Anschließend wurde Polybrenlösung (6 µl, 4 mg/ml in H₂O, filtriert) dem Gemisch beigelegt.

Nach 2,5 Stunden wurde das Virus enthaltende Medium verworfen und DMEM (für HEK-Zellen) mit 10% fötalem Rinderserum und 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (Endkonzentration Penicillin 100U/ml, Streptomycin 0,1 mg/ml) hinzugefügt und für weitere zwei Tage kultiviert.

Anschließend wurden erfolgreich transfizierte Zellen mit Geneticin-Resistenz selektiert, dem Medium G418 (200 µg/ml) beigelegt und weiterhin in diesem Medium bei 37 °C und 10% CO₂ kultiviert. Die dichtgewachsenen Zellen wurden im letzten Schritt abgetrennt und für eine Membranpräparation vorbereitet.

^a CRISPR-G α _q-knockout HEK Zellen und cDNA der G α _q-Proteine kloniert in Vektoren, wurden durch das Labor von Prof. Dr. Evi Kostenis, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt. CRISPR-G α _q-knockout HEK Zellen stammen ursprünglich von Masahiko Yamaguchi, Tohoku University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Sendai, Japan. Die gentechnischen Experimente wurden von Dr. Muhammad Rafahi, Universität Bonn, durchgeführt.

Als Endergebnis wurden 4 verschiedene Membranpräparationen ($G\alpha_{q11}$ -, $G\alpha_{q14}$ -, $G\alpha_{q15}$ - und Maus- $G\alpha_q$) angefertigt, die in den Bindungsstudien mit [³H]PSB-15900 eingesetzt wurden.

4.8.2.2. Bindungsstudien an in CRISPR- $G\alpha_q$ -knockout HEK Zellen überexprimierten $G\alpha_{q11}$ -, $G\alpha_{q14}$ -, $G\alpha_{q15}$ - und murinen $G\alpha_q$ -Proteinen

Alle Konkurrenzexperimente zur Evaluierung der verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten und der CRISPR- $G\alpha_q$ -knockout HEK-Zellen wurden in einem Inkubationspuffer, der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 enthielt, durchgeführt. Die Tubes enthielten 5 μ l der Testverbindung (FR900359 in verschiedenen Konzentrationen in DMSO), 50 μ l [³H]PSB-15900 (77 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und der $G\alpha_q$ -Membranpräparation (30 μ g Protein) respektive der HEK- $G\alpha_q$ -KO-Membranpräparation (30 μ g Protein), in einem Gesamtvolumen von 200 μ l. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation gestartet und für 90 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Das Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über GF/C-Filter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filterplatten wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4, gespült (3 ml), um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-15900 wurde unter Verwendung von 10 μ M FR900359 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO.

4.8.3. Ergebnisse & Diskussion

[³H]PSB-15900 zeigt eine hochaffine Bindung an $G\alpha_q$ -, $G\alpha_{q11}$ - und $G\alpha_{q14}$ - Untereinheiten, jedoch nicht zu $G\alpha_{q15}$. Wie zu erwarten war, bindet [³H]PSB-15900 nicht an Membranen von $G\alpha_q$ -knockout-HEK-Zellen, da diese Zelllinie über kein natives $G\alpha_q$ mehr verfügt. Dies bedeutet, dass man von einem Nullhintergrund und einer selektiven Bindung von [³H]PSB-15900 an den Membranpräparationen der verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten ausgehen kann, und gleichzeitig, dass die bestimmten Werte nicht durch eine Hintergrundbindung beeinflusst werden. Da keine Sättigungsstudien mit [³H]PSB-15900 an den $G\alpha_q$ -Untereinheiten durchgeführt wurden, wurden rechnerisch die pseudo K_d - und pseudo B_{max} -Werte aus der Konkurrenz bestimmt (Tab. 14). Dem zugrunde liegend wurden anschließend die pseudo K_i -Werte für FR900359 an den $G\alpha_q$ -Untereinheiten bestimmt (Tab. 15). Die Affinitäten von FR900359 zu $G\alpha_q$, $G\alpha_{q11}$ und $G\alpha_{q14}$ sind liegen im niedrigen nanomolaren Bereich, was aus ihren korrespondierenden Bindungskurven in Abb. 52 zu erkennen ist. Sie betragen an $G\alpha_q$ 3,46 nM, an $G\alpha_{q11}$ 5,75 nM und an $G\alpha_{q14}$ 1,76 nM. Die

Expressionsrate der verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten ist hoch (Tab. 14), wie die hohen Gesamtbindungen bei gleichzeitig sehr niedriger unspezifischer-Bindung in Abb. 53 zeigen. Durch dieses wichtige Experiment konnte gezeigt werden, dass [³H]PSB-15900 und FR900359 selektiv und hochaffin an $G\alpha_q$, $G\alpha_{q11}$ und $G\alpha_{q14}$ binden während $G\alpha_{q15}$ keine affine Bindungsstelle für [³H]PSB-15900 und FR900359 aufweist. Verglichen mit dem gemessenen IC_{50} -Wert (18 nM) von FR900359 gegen [³H]PSB-15900 in Bindungsstudien an Membranpräparationen von humanen Thrombozyten bindet FR900359 an den in diesem Versuch aufgearbeiteten Membranen leicht affiner. Die bestimmten K_i -Werte aus Bindungsstudien an humanen Thrombozyten sind jedoch nahezu identisch und liegen im Bereich von 6 nM.

Aus diesem Experiment kann geschlussfolgert werden, dass [³H]PSB-15900 selektiv an $G\alpha_q$, $G\alpha_{q11}$ und $G\alpha_{q14}$ bindet und die bisher in Kompetitionsstudien eingesetzten Membranpräparationen von humanen Thrombozyten und Rattencortex sich sehr gut für den Einsatz in Bindungsstudien eignen.

Tab. 14: Berechnete pseudo K_D -Werte und pseudo B_{max} -Werte von 5 nM [³H]PSB-15900 an verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten bei 37 °C.

G α -Untereinheit	[³ H]PSB-15900 gegen FR900359	
	Berechneter Pseudo- K_D (nM) \pm SEM	Berechneter Pseudo- B_{max} (pmol/mg) \pm SEM
G α_q	2.41 \pm 0.52	313 \pm 20.9
G α_{q11}	5.67 \pm 2.34	318 \pm 13.9
G α_{q14}	0.92 \pm 0.39	212 \pm 7.20
G α_{q15}	Keine spezifische Bindung	

Tab. 15: Berechnete pseudo K_i -Werte für FR900359 gegen 5 nM [³H]PSB-15900 an verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten bei 37°C.

G α -Untereinheit	FR900359	
	Berechneter Pseudo- K_i (nM) \pm SEM	
G α_q	3.46 \pm 0.38	
G α_{q11}	5.75 \pm 0.61	
G α_{q14}	1.44 \pm 0.17	
G α_{q15}	Keine spezifische Bindung	

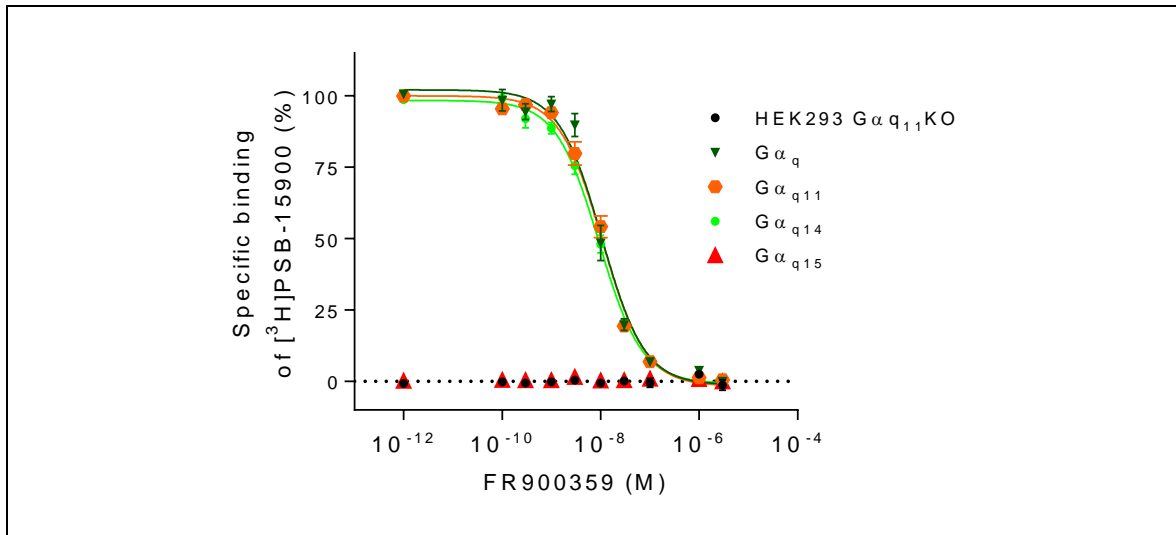


Abb. 52: Bindungskurven von FR900395 an verschiedenen G α_q -Untereinheiten Membranpräparationen und Membranpräparationen von HEK-G α_q -KO-Zellen gegen 5 nM [³H]PSB-15900 bei 37 °C.

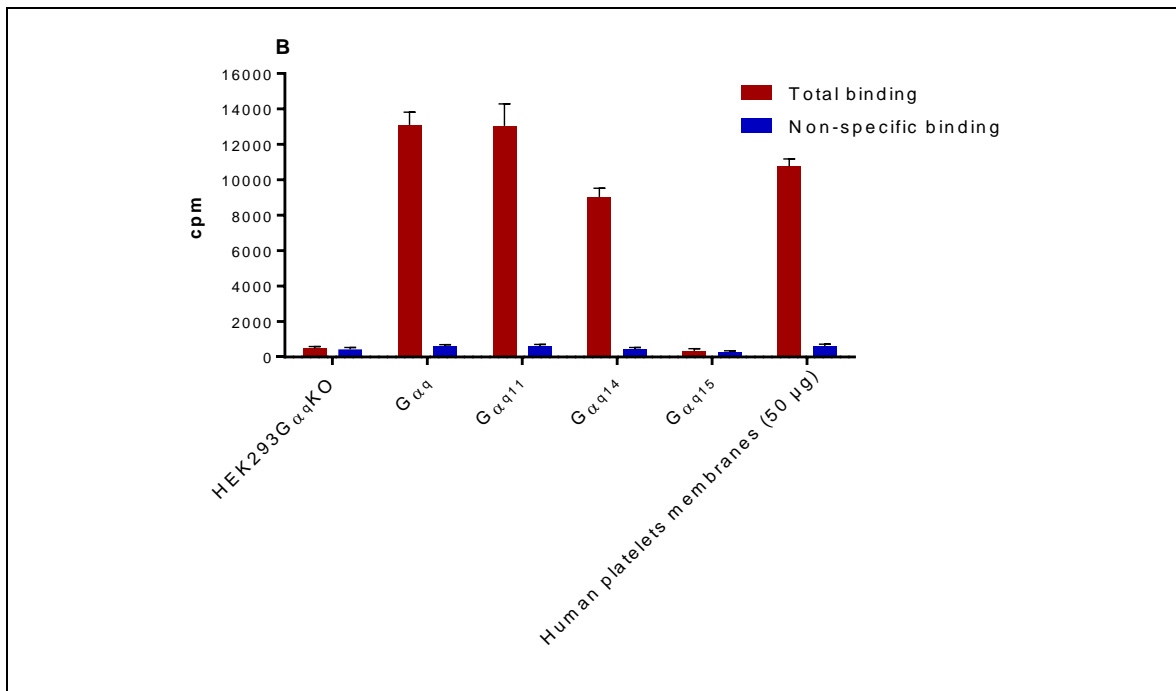


Abb. 53: Gesamtbindung und unspezifische-Bindung von [³H]PSB-15900 an verschiedenen G α_q -Untereinheiten und Membranpräparationen von HEK-G α_q -KO Zellen (30 μ g Protein) bei 37 °C.

4.9. Bindungsstudien an Nativen Geweben und Zelllinien

4.9.1. Einleitung

[³H]PSB-15900 bietet erstmals die Möglichkeit, neben den bisher bekannten Methoden wie z.B. Western-Blot, Expressionsniveaus an G α_q -Proteinen in nativen Geweben und Zellen zu bestimmen und im Gegensatz zu bisherigen Verfahren, genau zu quantifizieren.

4.9.2. Methode

Um die Expressionsniveaus von Gα_q-Proteinen in verschiedenen Zelllinien und Geweben zu untersuchen, wurden Membran- und Gewebepreparate aus Nagetier- und menschlichen Quelle hergestellt und für Radioligandbindungsstudien mit [³H]PSB-15900 verwendet.

Alle Bindungsstudien zur Bestimmung der Gα_q-Expression der verschiedenen Gewebe und Zelllinien wurden in einem Inkubationspuffer, der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 enthielt, durchgeführt. Die Tubes enthielten 5 µl FR900359 (10 µM in DMSO) zur Bestimmung der unspezifischen Bindung respektive 5 µl DMSO zur Bestimmung der Gesamtbindung, 50 µl [³H]PSB-15900 (77 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und 25 µg (Proteingehalt) der entsprechenden Membranpräparation, in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe der Membranpräparation gestartet und für 90 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Das Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über GF/C-Filter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4 gespült (3ml), um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen.

Getestete Präparationen der Gewebe und Zelllinien aus Nagetierquelle waren: Niere (Maus), Leber (Maus), Lunge (Maus), Herz (Maus), Gehirn (Maus), Cortex (Ratte) und Striatum (Ratte), Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO K1wt), *Rattus norvegicus* Leberhepatomzellen (MCA RH7777), Ratten C6 Gliomzellen (C6 Gliom). Aus menschlicher Quelle wurden untersucht: humane Thrombozyten, humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK293), humane embryonale Nieren Gα_q-knock-out-Zellen (HEKGα_qKO), 1321N1 Astrozytomzellen, Hela Zellen (Gebärmutterhalskrebszellen), dreifach negative Brustkrebszellen (TNBC), Jurkat T-Zellen (Jurkat) und humane primäre Glioblastomzellen (U87).

4.9.3. Ergebnisse & Diskussion

Hohe Expressionsniveaus in Geweben können an Leber (Maus), Gehirn (Maus), Cortex (Ratte) und Lunge (Maus) beobachtet werden. Auch einige Krebszelllinien zeigen hohe Expressionsniveaus: Jurkat-T-Zellen, 1321N1-Astrozytomzellen, dreifach negative Brustkrebszellen (TNBC) und HEK293-Zellen, als auch humane Thrombozyten. Durchschnittlich hohe Expressionsniveaus wurden in Mäuseniere gefunden. Niedrige Expressionsniveaus wurden am Herzen (Maus) nachgewiesen. Eine Zusammenfassung der getesteten Gewebe und Zelllinien sind in Abb. 54 dargestellt. Vergleicht man die aus Bindungsstudien ermittelten Niveaus mit den mRNA-Expressionsleveln, die in der Literatur

für das GNAQ-Gen (Abb. 55) beschrieben sind, so korrelieren diese im Allgemeinen gut miteinander. Bei den durchgeführten Bindungsstudien mit [³H]PSB-15900 konnte jedoch eine wesentlich höhere Expression von Gα_q in Leber (Maus) und HEK293 Zellen ermittelt werden, als in der Literatur durch mRNA-Expressionlevel beschrieben.

Diese mit [³H]PSB-15900 durchgeführte Methode zur quantitativen Bestimmung der Expression von Gα_q, bietet die Möglichkeit die tatsächliche Menge an Gα_q in Gewebe und Zellen zu bestimmen. Darüber hinaus können Gewebe und Zelllinien charakterisiert oder bereits ermittelte Ergebnisse überprüft werden.

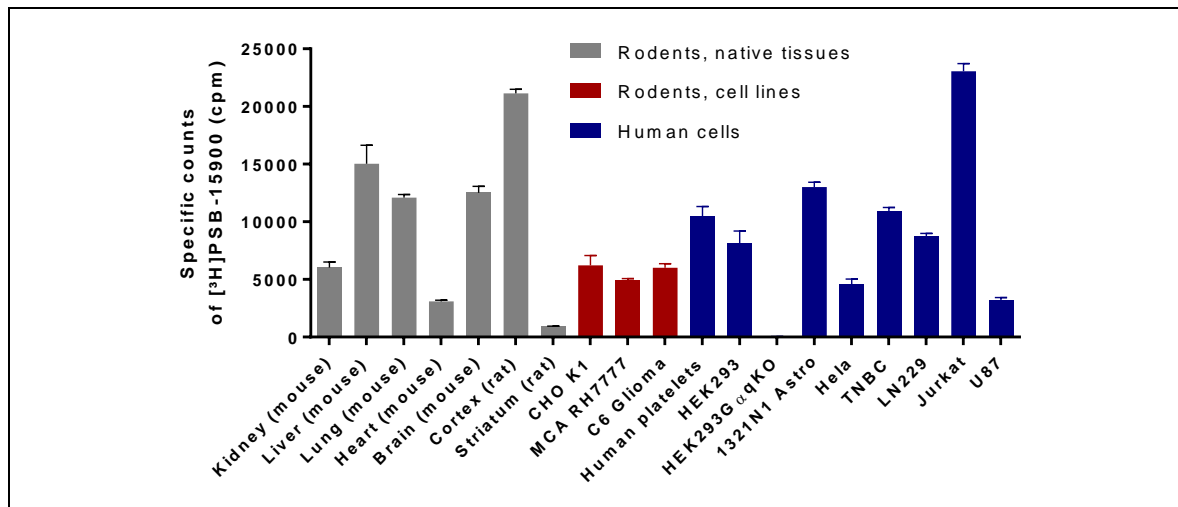


Abb. 54 Gα_q-Expressionsniveaus verschiedener Gewebe und Zelllinien aus Nagetieren und menschlichen Ursprungs. Die Ergebnisse zeigen die spezifische Bindung (cpm) von [³H]PSB-15900 (5 nM) an Präparation (20 µg Proteingehalt) der verschiedenen Gewebe oder der Zelllinien.

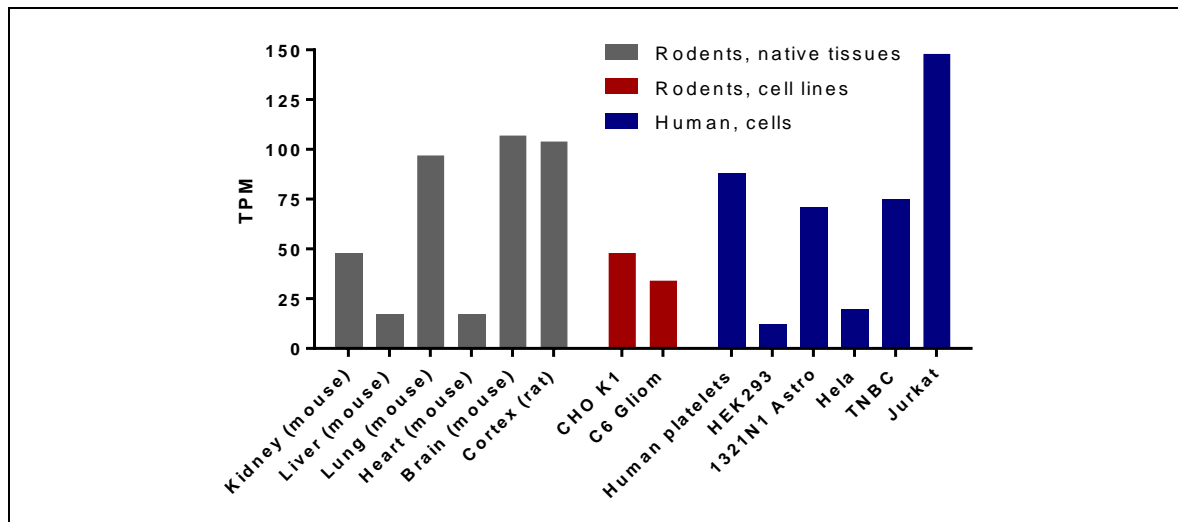


Abb. 55: mRNA-Expressionslevels von GNAQ in TPM (Transcripts Per Million) von verschiedenen Gewebe und Zelllinien aus Nagetieren und menschlichen Ursprungs.^a

^a Daten basierend auf der Genexpressions-Datenbank „Expression Atlas“ des EMBL-EBI 2018

4.10. Einfluss von [³H]PSB-15900 auf die Bindung durch Ionen, Nukleotide, Rezeptor-Agonisten und Phospholipiden

4.10.1. Einleitung

Die Signaltransduktion vom Rezeptor zum G-Protein umfasst Interaktionen an diversen Bindungsstellen. So sind zum Beispiel die Domänen, die an der zweiten und dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors lokalisiert sind, für die Freisetzung von GDP von der α -Untereinheit des G-Proteins verantwortlich.⁸⁸ Diese Interaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Aktivierung des G-Proteins dar, dem eine hochaffine Bindung von zytosolischem GTP an die α -Untereinheit folgt. In diesem Zusammenhang spielt Mg²⁺ für die Aktivierung der α -Untereinheit eine sehr wichtige Rolle und wird ebenso für die nachfolgende hydrolytische Aktivität benötigt.⁸⁹

Die in dem Zyklus von Aktivierung und Desaktivierung des G-Proteins zeitweise entstehenden konformellen Änderungen eröffnen spezifische Bindungsstellen, die für potentielle Reaktionspartner zugänglich sind und die Aktivität des G-Proteins beeinflussen.⁹⁰ In der Literatur wurden bisher nicht-peptidische, peptidische und lipid-ähnliche Aktivatoren und Inhibitoren für G α_q -Proteine beschrieben, die natürlich alle Interaktionspartner die an der Aktivierung des G-Proteins beteiligt sind mit einschließt.^{91; 90} Das Wissen über eine eventuelle Modulation der Bindung von [³H]PSB-15900 durch Ionen, Nukleotide, Agonisten an G α_q -gekoppelten GPCRs und Lipide wäre von großem Interesse, da hierdurch Co-Faktoren, die die Bindung von [³H]PSB-15900 an G α_q beeinflussen, identifiziert werden können. So wäre es zum Beispiel möglich, dass die Aktivität einer Testsubstanz daher rührt, dass die Verbindung als Natrium-Salz oder Magnesium-Salz vorliegt und die Bindung des Radioliganden durch die resultierende, höhere Salzkonzentration im Inkubationspuffer falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse zur Folge hat. Gleiches gilt für Nukleotide, Phospholipide und Agonisten, die eventuell auf Grund von bestimmten Inkubationsbedingungen hinzugefügt wurden, oder auf Grund einer speziellen Membranpräparationsmethode nativ vorhanden sind.

Da als G α_q -Protein-Quelle für Bindungsstudien humane Thrombozyten eingesetzt werden, wurden in den Versuchen Agonisten getestet (Tab. 16), die an G α_q -gekoppelte GPCRs binden die durch humanen Thrombozyten exprimiert sind.⁷⁴ Des Weiteren wurde untersucht, ob die Bindung durch Nukleotide, Ionen und Lipide moduliert werden kann, die direkt in die den Signaltransduktionsweg eingreifen, im Zytosol vorkommen und dadurch einen Einfluss haben könnten. Diese sind ebenfalls in Tab. 16 aufgelistet.

Tubes enthielten 95 µl Inkubationspuffer, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, in dem die Testsubstanzen gelöst wurden, 5 µl FR900359 (10 µM in DMSO) zur Bestimmung der unspezifischen Bindung respektive 5 µl DMSO zur Bestimmung der Gesamtbindung, 50 µl [³H]PSB-15900 (77 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und humane Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein), in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation gestartet und für 90 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Das Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über GF/C-Filter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4 gespült (3 ml), um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Anschließend wurde die Gesamtbindung und unspezifische Bindung berechnet und auf die Bindung der Kontrolle (ohne Zugabe von Agonisten, Ionen, Nukleotiden oder Phospholipiden), normalisiert.

Tab. 16: Gegen 5 nM [³H]PSB-15000 an humane Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C getestete Rezeptor-Agonisten, Ionen, Nukleotide und Phospholipide.

Rezeptor-Agonisten	Ionen	Nukleotide	Phospholipide
100 µM Adenosin	10 mM Na ⁺	100 µM GMP	1 µM L-α-Phosphatidylcholin
1 mM Adenosin	100 mM Na ⁺	1 mM GMP	10 µM L-α-Phosphatidylcholin
100 µM NECA	10 mM Mg ²⁺	100 µM GDP	100 µM L-α-Phosphatidylcholin
100 µM AMP	100 mM Mg ²⁺	1 mM GDP	1 µM L-α-Phosphatidylserin
1 µM CGS21680	10 mM Li ⁺	1 mM GTP	10 µM L-α-Phosphatidylserin
10 µM 2-Met-ADP	100 mM Li ⁺	100 µM GTP	100 µM L-α-Phosphatidylserin
10 µM AP ₄ A	10 mM Ca ²⁺	100 µM GTPδS	1 µM Phosphatidylinositol
2 U/ml ADA	100 mM Ca ²⁺	100 µM ADP	10 µM Phosphatidylinositol
100 µM U 46619		100 µM ATP	100 µM Phosphatidylinositol
100 µM TFLLR-NH ₂		100 µM UDP	1 µM 3- <i>sn</i> -Phosphatidsäure
100 µM NBOH-2C-CN HCl		100 µM UTP	10 µM 3- <i>sn</i> -Phosphatidsäure
100 µM Guanfacin HCl		100 µM IMP	100 µM 3- <i>sn</i> -Phosphatidsäure
100 µM MRS 2365		100 µM IDP	1 µM 3- <i>sn</i> -Phosphatidylethanolamin
		100 µM ITP	10 µM 3- <i>sn</i> -Phosphatidylethanolamin
			100 µM 3- <i>sn</i> -Phosphatidylethanolamin

4.10.2. Ergebnisse & Diskussion

Falls eine Modulation der Bindung von [³H]PSB-15900 durch den potentiellen Modulator stattgefunden hätte, würde die gemessene Gesamtbindung wie auch die spezifische Bindung im Vergleich zur Kontrolle, einen anderen Wert (in cpm) aufweisen. Durch die Normalisierung auf den Wert der Kontrolle (cpm), die als 100 % definiert wurde, würde ein Wert < 100 %, eine negative

Modulation bedeuten (verminderte Bindung von [³H]PSB-15900), wohingegen ein Wert > 100 % eine positive Modulation (vermehrte Bindung von [³H]PSB-15900) bedeuten würde.

Es zeigt sich, dass die getesteten Rezeptor-Agonisten, vgl. Abb. 56, allesamt keinen statistisch signifikanten Einfluss (unpaired two-tailed t test) auf die Bindung von [³H]PSB-15900 haben. Bei den getesteten Ionen, vgl. Abb. 57, konnte eine leichte negative Modulation in Gegenwart Mg²⁺ und Ca²⁺ bei einer Konzentration von 100 mM beobachtet werden der statistisch signifikant war (unpaired two-tailed t test). Physiologischen Konzentrationen im Cytosol liegen für Ca²⁺ bei < 0,001 mM und für Mg²⁺ bei 15 mM. Dies bedeutet, dass unter physiologischen Bedingungen keine Modulation der Bindung stattfindet. Gleiches gilt für die getesteten Nukleotide, die in Abb. 58 dargestellt sind. Bei Untersuchungen der Phospholipide wurde festgestellt, dass hohe Konzentrationen an Phosphatidylinositol (100 μM), welches Substrat der Phospholipase C-β (PLCβ) ist, eine leichte negative Modulation (ca. 75 % zur Kontrolle) bewirken, vgl. Abb. 59. Auch hier entspricht die eingesetzte Konzentration ein Mehrfaches der physiologischen Konzentration.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die getesteten Ionen, Nukleotide, Agonisten und Phospholipide unter physiologischen Bedingungen keinen Einfluss auf die Bindung von [³H]PSB-15900 an Gα_q haben.

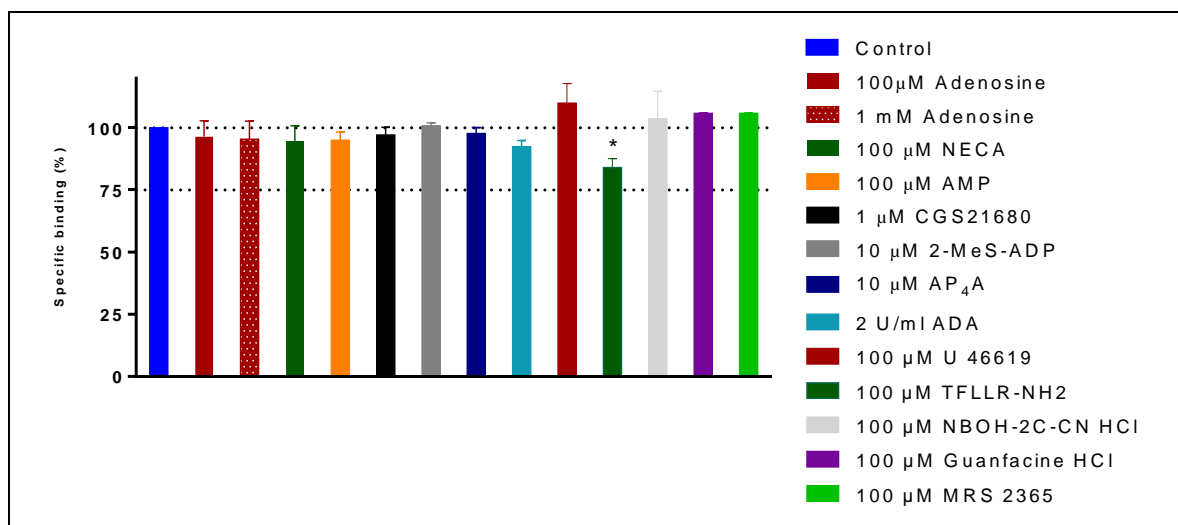


Abb. 56: Einfluss von agonistischen Modulatoren auf die Bindung von 5nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) bei 37 °C. Der Einfluss auf die Bindung war für 100 μM TFLLR-NH₂ statistisch signifikant. P-Wert: 0,117 (unpaired two-tailed t test).

4 [³H]PSB-15900 - ein neuer hochselektiver Radioligand zur Charakterisierung des *Gαq*-Proteins

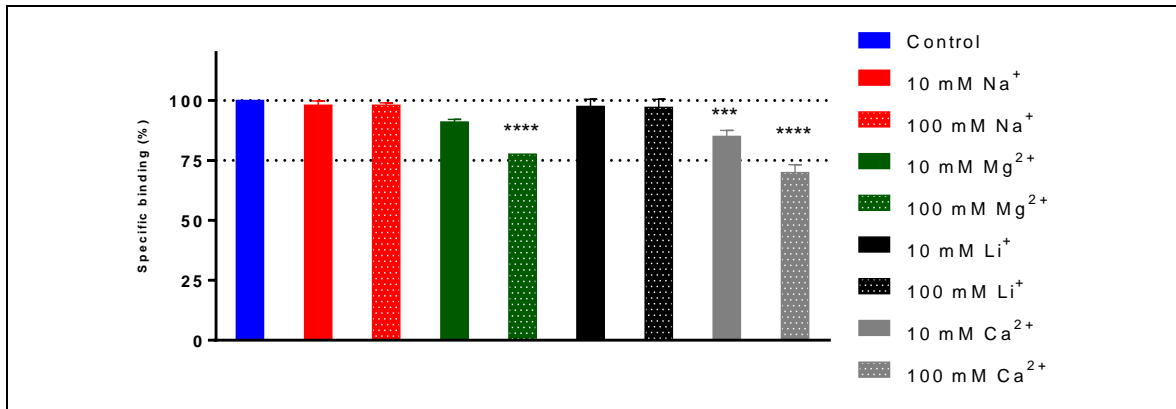


Abb. 57: Einfluss von Ionen auf die Bindung von 5nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C. Der Einfluss auf die Bindung war für 100 mM Mg²⁺, 10 mM und 100 mM Ca²⁺ statistisch signifikant. P-Wert: 0,117 (unpaired two-tailed t test).

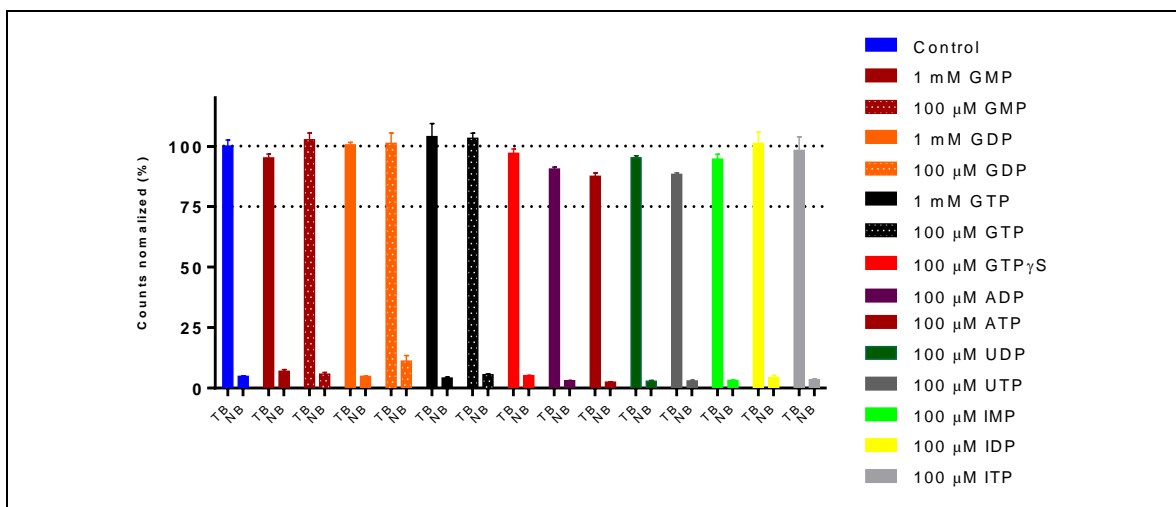


Abb. 58: Einfluss von Nukleotiden auf die Bindung von 5nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C.

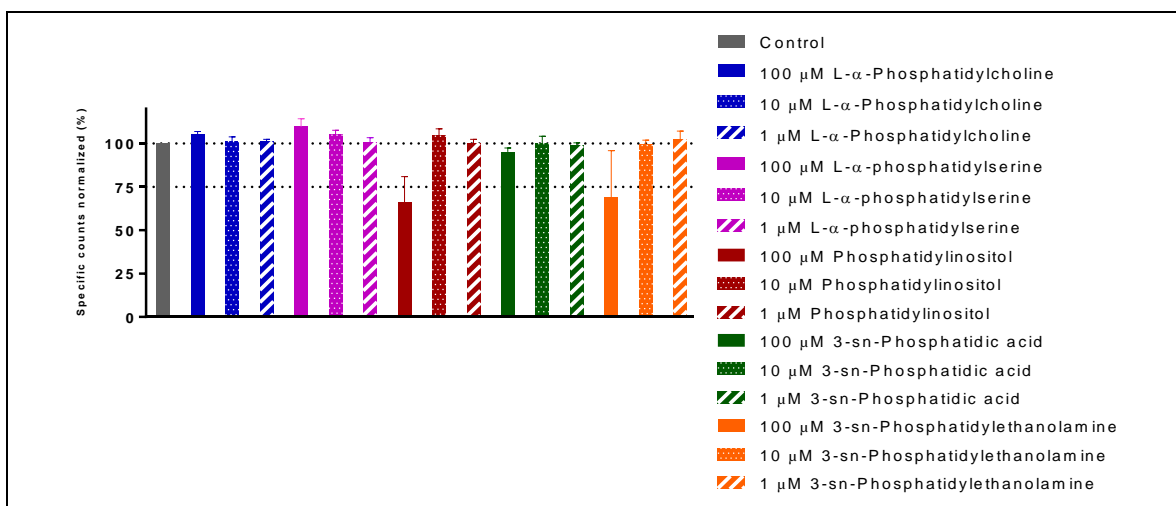


Abb. 59: Einfluss von Phospholipiden auf die Bindung von 5nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C.

5. [³H]PSB-16254 EIN NEUER HOCHSELEKTIVER RADIOLIGAND ZUR CHARAKTERISIERUNG DES Gα_q-PROTEINS

5.1 Entwicklung & Synthese

Wie in Kapitel 4 beschrieben, wurde [³H]PSB-15900 als erster Radioligand, der selektiv Gα_q inhibiert, entwickelt und charakterisiert. Wie ebenfalls in Kapitel 4 bereits beschrieben, sind nicht nur [³H]PSB-15900 und FR900359 in der Lage, Gα_q zu inhibieren. So besitzt YM-254890 nach Ergebnissen aus Bindungsstudien, vgl. Abb. 42 und Tab. 10, eine ebenso hohe Affinität zu Gα_q. Vergleicht man die Strukturen von YM-254890 und FR900359, die in Abb. 60 dargestellt sind, so unterscheiden sich YM-254890 und FR900359 nur in der Anzahl der Methylreste voneinander (Abb. 60 orange markiert). YM-254890 weist einen Acetamid-Rest und einen Methyl-Rest auf, wohingegen FR900359 einen Propionamid-Rest und einen Isopropyl-Rest aufweist. Auf Grund der Erkenntnisse aus Bindungsstudien und den Strukturähnlichkeiten zwischen YM-254890 und FR900359, wurde versucht einen weiteren hochpotenten und hochselektiven Radioliganden für Gα_q zu entwickeln und zu etablieren.

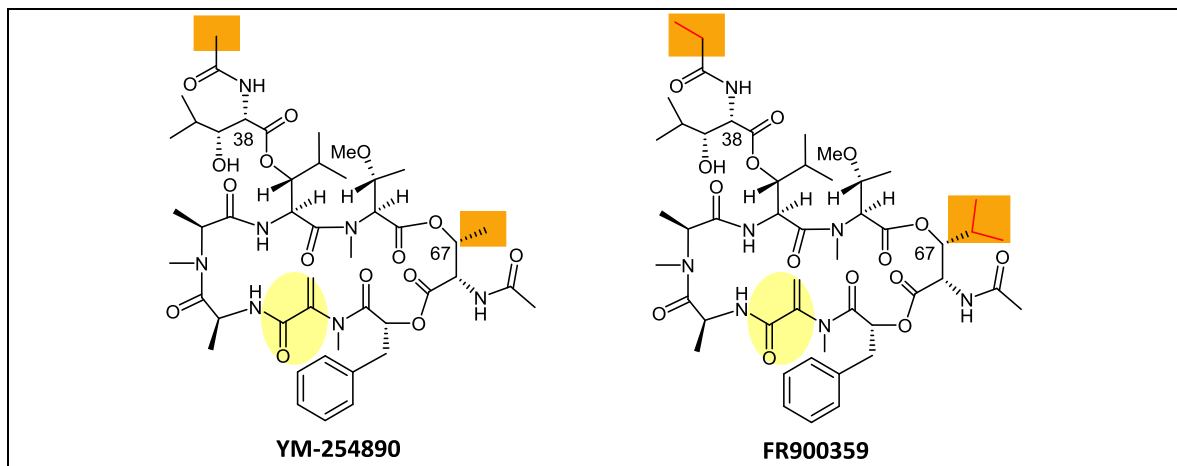
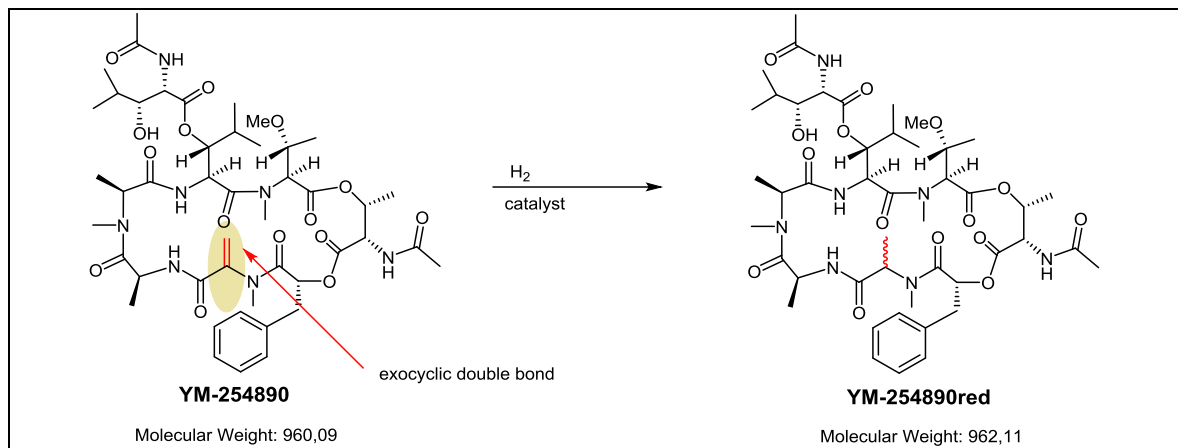


Abb. 60: Strukturen von YM-254890 und FR900359. Unterschiede sind in Orange hervorgehoben.

Wie FR900359 besitzt auch YM-254890 eine exozyklische Doppelbindung, die als Michael-Akzeptor fungiert und eine gute Möglichkeit bietet, eine selektive Tritiiierung in dieser Position durchzuführen. In Versuchen konnte eine selektive katalytische Hydrierung an der gewünschten Position gezeigt werden.⁵¹ So war ebenfalls wie bei FR900359 zu erwarten, dass eine Tritiiierung nur in dieser Position stattfinden würde, was zu einer geringen Anzahl an tritiierten Spezies führen würde. Das Produkt einer Hydrierung von YM-254890 ist in Abb. 61 dargestellt.

Abb. 61: Katalytische Hydrierung von YM-254890. ⁵¹

5.2 Charakterisierung des Radioliganden

Das Edukt YM-254890 wurde katalytisch tritiiert, die entstandenen Produkte mittels HPLC Diastereomeren-rein getrennt und die Masse mittels TOF MS ESI+ bestimmt. ^a Hierdurch wurden zwei Radioliganden erhalten, die die interne Kennung TRQ41560 und TRQ41571 erhielten. Beide Fraktionen weisen ein Molekulargewicht von 966,55 g/mol und eine radiochemische Konzentration von 1,0 Ci/l auf, wobei eine spezifische Aktivität von 47 Ci/mmol für TRQ41560 und von 51 Ci/mmol für TRQ41571 ermittelt wurde, vgl. Tab. 17. Um herauszufinden, bei welchem der beiden erhaltenen Produkte es sich um das vermutlich *S*-konfigurierte inaktive Diastereomer bzw. vermutlich das *R*-konfigurierte hochaktive Diastereomer handelt, wurde in einem Vorversuch die Bindung der beiden Radioliganden an Gα_q untersucht.

Dabei wurden die bereits für [³H]PSB-15900 etablierten Inkubations- und Filtrationsbedingungen verwendet. Alle Bindungsexperimente wurden in einem Inkubationspuffer, der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, enthielt, durchgeführt. Die Vials enthielten 5 µl YM-254890 in DMSO (5 µM) zur Bestimmung der unspezifischen Bindung respektive 5 µl DMSO zur Bestimmung der Gesamtbindung, 50 µl TRQ41560 (47 Ci/mmol) respektive 50 µl TRQ41571 (51 Ci/mmol) in einer Endkonzentration von 1, 5 oder 15 nM und 50 µl humane Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein), in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe der Membranpräparation gestartet und für 90 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Das Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4 gespült (3 ml), um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen

^a Die radioaktive Markierung wurde von Quotient Bioresearch Ltd, Cardiff, England, durchgeführt.

überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen.

Es zeigt sich, vgl. Abb. 63, dass nur TRQ41571 in allen gemessen Konzentrationen eine hochaffine Bindung zeigt. Daher stellt TRQ41560 vermutlich das *S*-konfigurierte und TRQ41571 vermutlich das *R*-konfigurierte Diastereomer dar. Analog zu der bereits verwendeten Nomenklatur von [³H]PSB-15900, wurde TRQ41560 die PSB-Nummer [³H]iso-PSB-16254 und TRQ41571 die PSB-Nummer [³H]PSB-16254 zugeteilt.

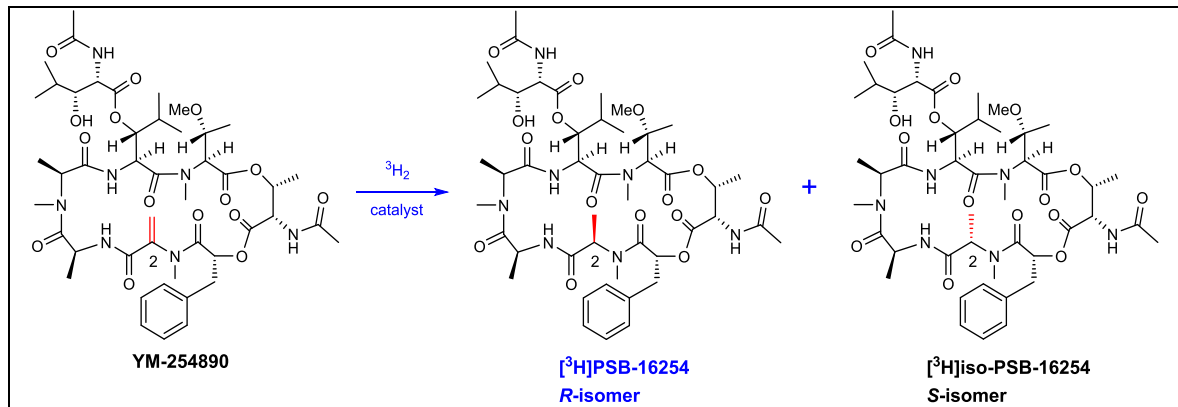


Abb. 62: Katalytische Tritiierung von YM-254890.

Tab. 17: Übersicht und Einteilung der Tritiierungsprodukte von YM-254890.

Kennung	PSB Nummer	Fraktion	Molmasse	Spezifische Aktivität	Radiochemische Konzentration
TRQ41560	[³ H]iso-PSB-16254	Diastereomer 1	966,5 g/mol	47 Ci/mmol	1,0 Ci/l
TRQ41571	[³ H]PSB-16254	Diastereomer 2	966,5 g/mol	51 Ci/mmol	1,0 Ci/l

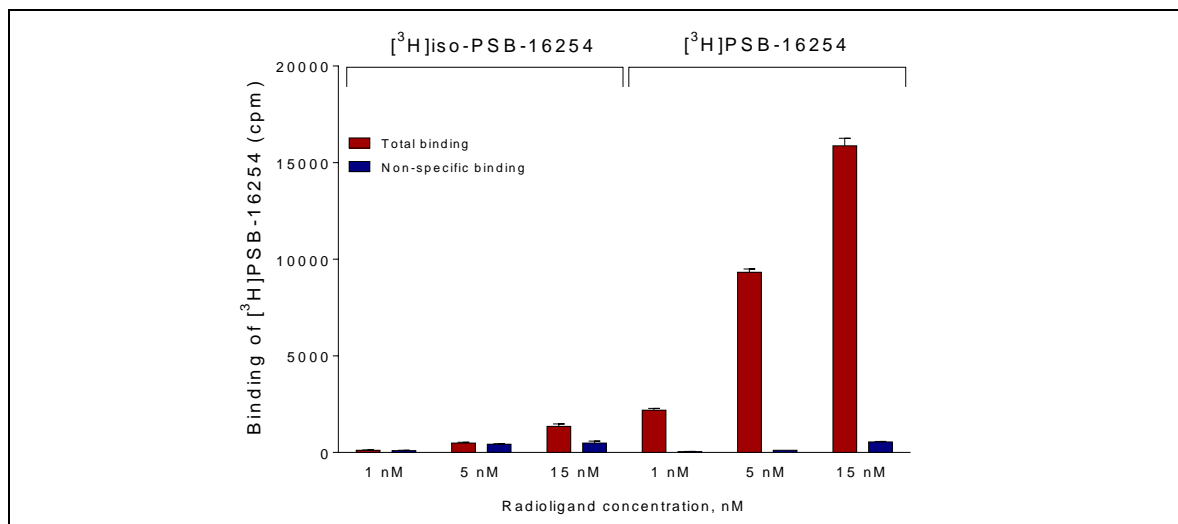


Abb. 63: Bindung der beiden von YM-254890 abgeleiteten ³H-markierten Diastereomere in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 5 und 15 nM) an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C. Unspezifische Bindung und Gesamtbinding in cpm dargestellt.

5.3 Methodenentwicklung

[³H]PSB-16254 zeigte in den ersten Vorversuchen eine hochaffine Bindung an Gα_q. Daher wurden die Bindungsdaten weitergehend ausgewertet und der Anteil an freivorliegendem Radioliganden, Werte der unspezifischen Bindung, Gesamtbindung und der spezifische Bindung genauer analysiert. Initiale Probleme bei der Etablierung des Assays mit [³H]PSB-15900 lagen an der Radioliganddepletion, wie auch an den sehr hohen Werten für die unspezifische Bindung, die durch eine hohe Filterbindung verursacht wurde. In den Vorversuchen wurden daher dieselben Inkubations- und Filtrationsbedingungen gewählt, wie sie final für [³H]PSB-15900 angewendet wurden. Betrachtet man die Werte für die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung, vgl. Abb. 64, so besitzt die unspezifische Bindung einen äußerst niedrigen Wert von ca. 120 cpm, wobei gleichzeitig der Wert der Gesamtbindung über 9.000 cpm beträgt und die korrespondierende spezifische Bindung nahe zu dem Wert der Gesamtbindung entspricht. Gleichzeitig zeigt [³H]PSB-16254 für die eingesetzten Konzentrationen von 1, 5 und 15 nM unter den gewählten Bedingungen einen hohen Anteil von über 90 % an noch frei vorliegendem, nicht an das Protein gebundenem Radioliganden. Hierdurch kann sichergestellt werden, dass die zugrunde liegenden Berechnungsmodelle für zukünftige Bestimmungen von Affinitäten und Kinetiken angewendet werden können. Zusammengefasst bedeutet dies, dass keine weiteren Optimierungen mehr in Bezug auf die Handhabung des Assays (Inkubationsbedingungen, Filtrationsbedingungen) für [³H]PSB-16254 durchgeführt werden müssen und die für [³H]PSB-15900 etablierten Bedingungen von für [³H]PSB-16254 übernommen werden können.

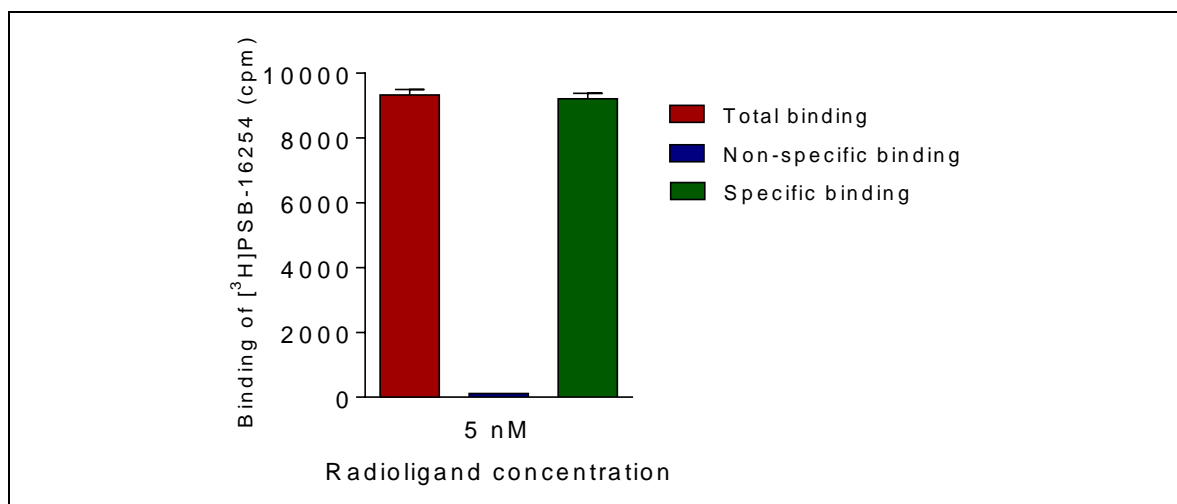


Abb. 64: Gesamtbindung, unspezifische Bindung und spezifische Bindung in cpm von 5 nM [³H]PSB-16254 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C. Die nicht spezifische Bindung wurde gegen 5 µM YM-254890, die Gesamtbindung gegen DMSO aufgenommen.

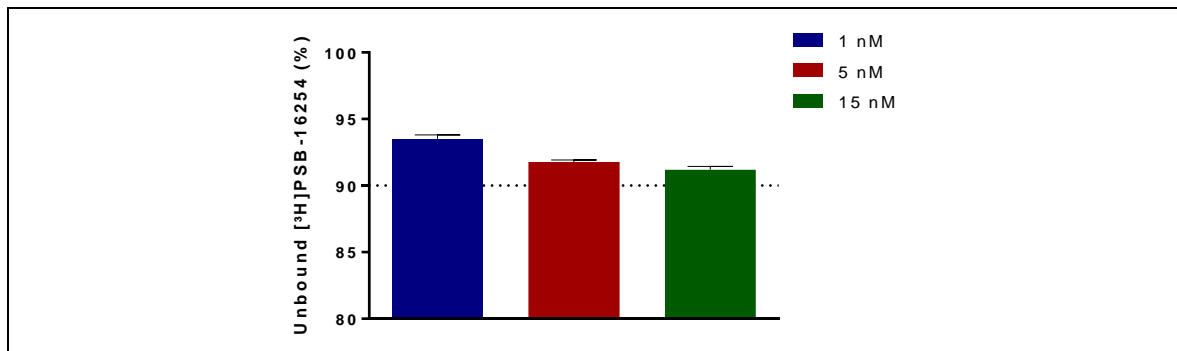


Abb. 65: Anteil (%) von frei vorliegenden, nicht gebundenen [³H]PSB-16254 bei verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 15 nM) an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C.

5.4 Kinetik

Auch für [³H]PSB-16254 wurde die Geschwindigkeit der Assoziation und Dissoziation in Kinetikstudien bestimmt. Als Kompetitor bei den durchgeführten Kinetikstudien zu [³H]PSB-16254 wurde YM-254890 eingesetzt.

Alle Kinetikstudien mit [³H]PSB-16254 wurden mit einer Radioligandkonzentration von 10 nM an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei Inkubationstemperaturen von 25 °C (RT) und 37 °C durchgeführt.

5.4.1 Assoziationsexperimente – Ergebnisse & Diskussion

Assoziationsexperimente wurden durch zeitversetzte Inkubation mit [³H]PSB-16254 (10 nM Endkonzentration) an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei RT und 37 °C und an intakten humanen Thrombozyten durchgeführt, wobei die Inkubationsdauer immer 90 min betrug. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation unter leichtem Schütteln gestartet. Das Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM pH 7,4 der 0,1% BSA und 0,1% Tween 20 enthielt gespült (3ml), um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-16254 wurde unter Verwendung von 5 μ M YM-254890 bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO. Alle Experimente wurden dreimal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt, wobei Duplikate pro Messpunkt aufgenommen wurden.

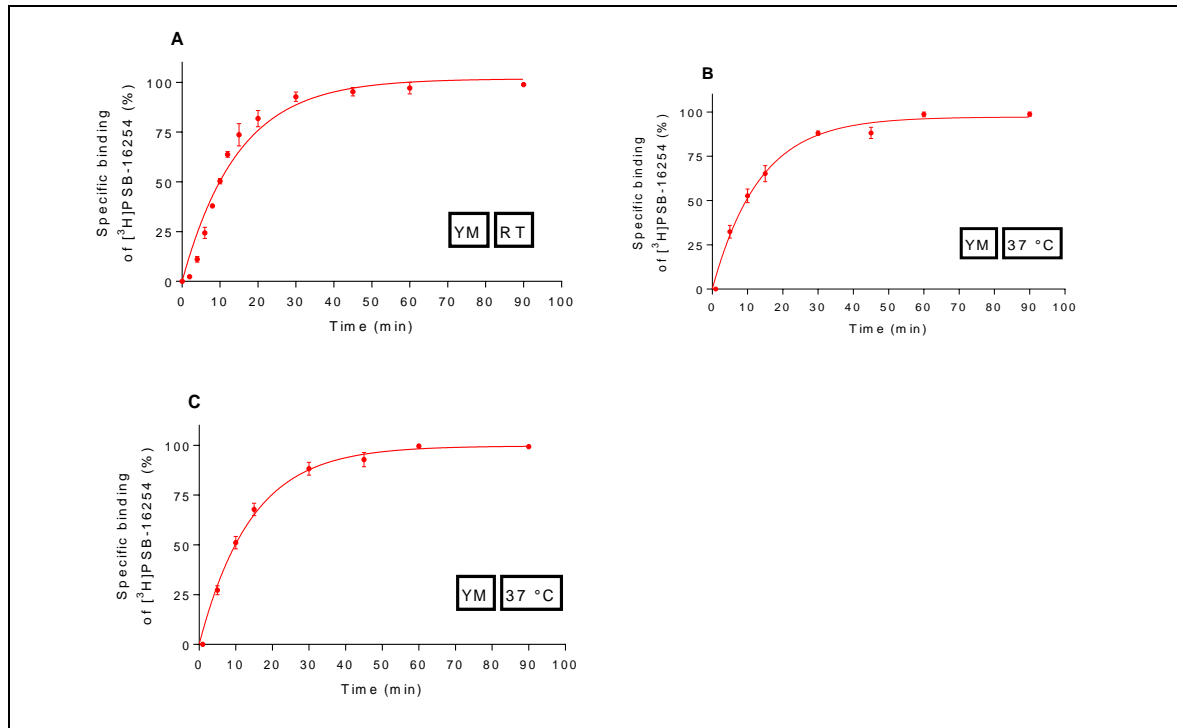


Abb. 66: Assoziationsexperimente von 10 nM [³H]PSB-16254 an humanen Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) bei RT (A), 37 °C (B) und bei 37 °C an intakten humanen Thrombozyten (7,5x 10⁶ Thrombozyten) (E).

Die Assoziationskurven spiegeln die zeitabhängige Bindung des Radioliganden an das Gα_q-Protein, die nach Präinkubation mit Membranpräparationen eingeleitet wurde, wieder. So ergaben sich folgende Kinetiken für humane Thrombozyten-Membranpräparationen: RT - $K_{on} = 0,06829 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 10,15 \text{ min}$ (Abb. 66A) und 37 °C - $K_{on} = 0,07517 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 9,22 \text{ min}$ (Abb. 66B); intakten humanen Thrombozyten bei 37 °C - $K_{on} = 0,07068 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 9,80 \text{ min}$ (Abb. 66C).

Die Bindung von [³H]PSB-16254 erreicht bei allen gemessenen Temperaturen den Gleichgewichtszustand (Equilibrium) und bleibt über dies hinaus weiterhin stabil. Das Gleichgewicht wurde nach Zugabe von Membranpräparation von humanen Thrombozyten bei RT innerhalb von 50 Minuten (Abb. 66A) und bei 37 °C innerhalb von 30 Minuten für intakte humane Thrombozyten und Membranpräparationen erreicht (Abb. 66B und C). Im Allgemeinen kann von einer schnellen Assoziation bei [³H]PSB-16254 gesprochen werden, wobei eine Erhöhung der Temperatur die Assoziationskinetik etwas beschleunigt. Im Vergleich zu [³H]PSB-15900 besitzt [³H]PSB-16254 eine leicht langsamere Kinetik, vgl. Tab. 18. Dies hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die benötigte Inkubationszeit, so dass die bisher gewählte Inkubationszeit von 90 min mehr als ausreichend ist um das Equilibrium der Bindung zu erreichen.

Tab. 18: Vergleich der Assoziationskinetiken zwischen 10 nM [³H]PSB-16254 und [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein).

Humane Thrombozyten-Membranpräparationen	K _{on}		t _{1/2}	
	RT	37 °C	RT	37°C
[³ H]PSB-16254	0,06829 nM ⁻¹ min ⁻¹	0,07517 nM ⁻¹ min ⁻¹	10,15 min	9,22 min
[³ H]PSB-15900	0,09264 nM ⁻¹ min ⁻¹	0,17555 nM ⁻¹ min ⁻¹	7,17 min	3,86 min
Intakte humane Thrombozyten		0,07068 nM ⁻¹ min ⁻¹		9,80 min

5.4.2 Dissoziationsexperimente – Ergebnisse & Diskussion

Bei den Dissoziationsexperimenten wurde [³H]PSB-16254 (10 nM Endkonzentration) mit humanen Thrombozyten-Membranpräparation und intakten humanen Thrombozyten bis zum Gleichgewicht der Bindung zwischen Radioligand und Protein vorinkubiert. Diese Zeit der Vorinkubation betrug 90 min bei RT und 37 °C. Anschließend wurde zeitversetzt die Dissoziation durch die Zugabe von 5 µM YM-254890 initiiert. Das Ende der Dissoziation wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM pH 7,4 der 0,1% BSA und 0,1% Tween 20 enthielt (3ml) gespült, um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-16254 wurde unter Verwendung von 5 µM YM-254890 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO. Alle Experimente wurden dreimal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt, wobei Duplikate pro Messpunkt aufgenommen wurden.

Die Dissoziationskurven (Abb. 67) spiegeln die zeitabhängige Verdrängung des Radioliganden wieder. Dabei ergaben sich folgende Dissoziationskinetiken für humane Thrombozyten-Membranpräparationen: RT - K_{off} = 0,05815 min⁻¹, t_{1/2} = 11,9 min (Abb. 67A); 37 °C - K_{off} = 0,1964 min⁻¹, t_{1/2} = 3,53 min (Abb. 67B); für intakte humane Thrombozyten: 37 °C - K_{off} = 0,2125 min⁻¹, t_{1/2} = 3,26 min. [³H]PSB-16254 besitzt eine relativ schnelle Dissoziationskinetik.

Besonders interessant ist hierbei der Unterschied in den Dissoziationskinetiken zwischen [³H]PSB-15900 und [³H]PSB-16254, vgl. Tab. 19. So sind bei gleicher Inkubationstemperatur von 37 °C 5 Halbwertszeiten, was der nahezu vollständigen Dissoziation des Radioliganden entspricht, für [³H]PSB-16254 bereits nach 17,65 min erreicht, wohingegen dies für [³H]PSB-15900 erst nach 466,5 min der Fall ist. Dieser enorme Unterschied in den Dissoziationskinetiken der beiden Radioliganden muss an den unterschiedlichen Struktur-Wirkungsbeziehungen der Verbindungen liegen. Um

diesen Sachverhalt zu ergründen und Erklärungen für die unterschiedliche Kinetik zu finden, wurde eine Docking-Simulationen mit beiden Radioliganden durchgeführt. Die Ergebnisse hieraus sind in Kapitel 6 - Strukturwirkungsbeziehungen der neuen hochselektiven Radioliganden, aufgeführt.

Tab. 19: Vergleich der Dissoziationskinetiken zwischen [³H]PSB-16254 und [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen.

Radioligand	K _{off}		t _{1/2}	
	RT	37 °C	RT	37°C
[³ H]PSB-16254	0,05815 min ⁻¹	0,1964 min ⁻¹	11,9 min	3,53 min
[³ H]PSB-15900	0,002639 min ⁻¹	0,007431 min ⁻¹	262,6 min	93,3 min

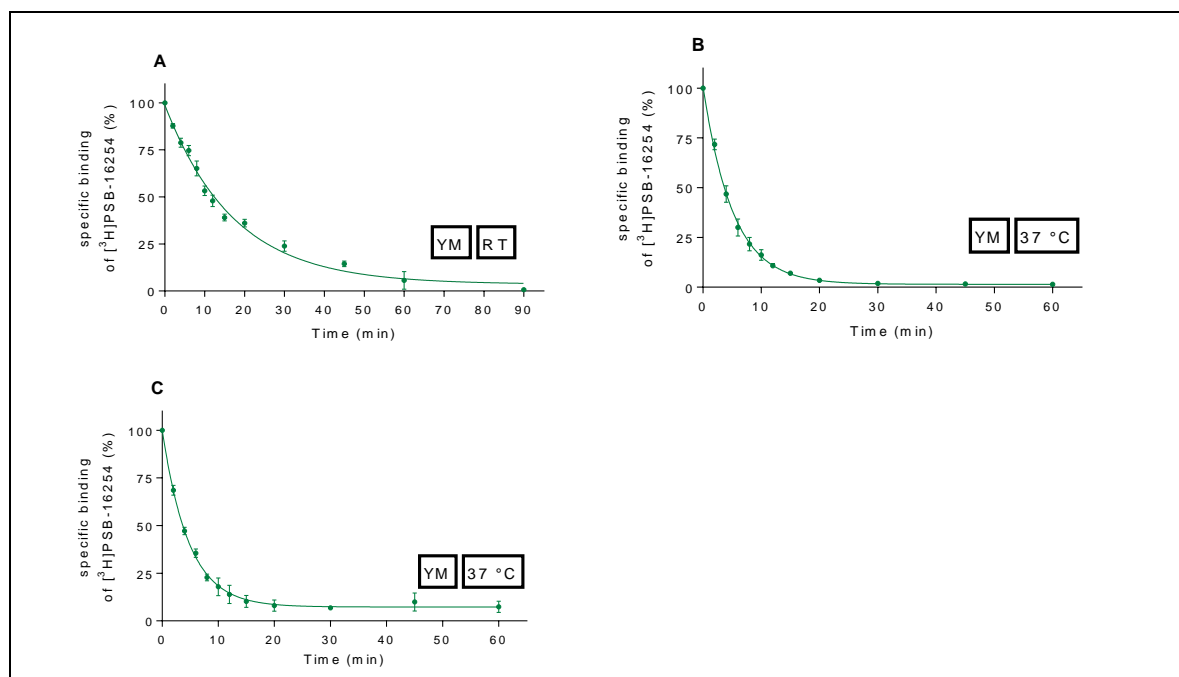


Abb. 67: Dissoziationsexperimente von 5 nM [³H]PSB-16254 an 50 µg humanen Thrombozyten Membranpräparation bei RT (A), 37 °C (B) und an intakten humanen Thrombozyten (7,5x 10⁶ Thrombozyten) bei 37 °C (E).

5.4.3 Assoziations- & Dissoziationsexperimente – Zusammenfassung

Die Ergebnisse aus den Experimenten zur Assoziation und Dissoziation von [³H]PSB-16254 haben gezeigt, dass ein großer Unterschied zwischen [³H]PSB-16254 und [³H]PSB-15900 besteht. So besitzt [³H]PSB-16254 bei 37 °C sowohl eine schnelle Assoziations-, als auch eine schnelle Dissoziationskinetik. Dabei besitzt die Dissoziation eine etwas geringere Halbwertszeit als die Assoziation (vgl. Tab. 18, Tab. 19). Tab. 20 und Abb. 68 fassen die ermittelten Ergebnisse zusammen, und ermöglicht einen direkten Vergleich der Assoziation und Dissoziation zwischen [³H]PSB-16254 und [³H]PSB-15900 an verschiedenen Geweben und Inkubationstemperaturen.

Tab. 20: Zusammenfassung der Halbwertzeiten der Assoziation, Dissoziation und Signifikanzen der ermittelten Werte zwischen [³H]PSB-15900 und [³H]PSB-16254.

	[³ H]PSB-15900 $t_{1/2} \pm \text{SEM}$ (min)	[³ H]PSB-16254 $t_{1/2} \pm \text{SEM}$ (min)	P-Wert (Unpaired two tailed t test) [³ H]PSB-15900 vs [³ H]PSB-16254
0 °C			
Assoziation Humane Thrombozyten- Membranpräparationen	19.7 ± 0.99	n.d. ^a	
Dissoziation Humane Thrombozyten- Membranpräparationen	>450	n.d.	
Assoziation Ratten Cortex- Membranpräparationen	15.7 ± 0.09	n.d.	
Dissoziation Ratten Cortex- Membranpräparationen	>450	n.d.	
21 °C (RT)			
Assoziation Humane Thrombozyten- Membranpräparationen	7.2 ± 0.61	10.2 ± 0.39	* 0.0319
Dissoziation Humane Thrombozyten- Membranpräparationen	265.3 ± 15.3	11.9 ± 0.49	**** < 0.0001
37 °C			
Assoziation Humane Thrombozyten- Membranpräparationen	3.9 ± 0.29	9.22 ± 0.82	** 0.0095
Dissoziation Humane Thrombozyten- Membranpräparationen	93.3 ± 2.55	3.53 ± 0.20	**** < 0.0001
Assoziation Intakte humane Thrombozyten	7.13 ± 0.42	8.09 ± 0.50	ns 0.2160
Dissoziation Intakte humane Thrombozyten	107.6 ± 3.80	3.26 ± 0.09	**** < 0.0001

^a n.d. = nicht ermittelt

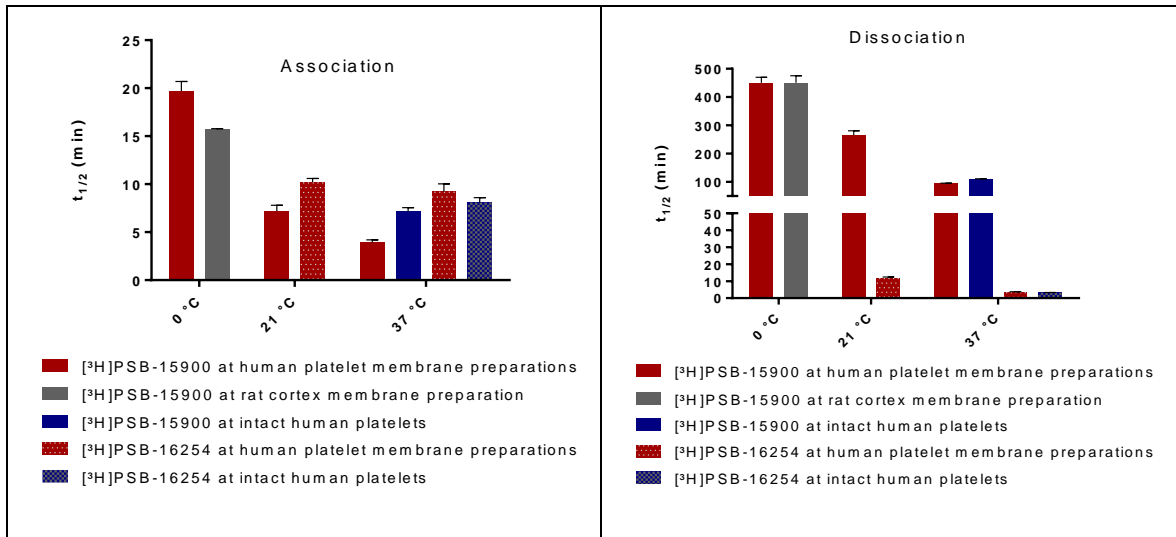


Abb. 68: Zusammenfassung der Halbwertszeiten der Assoziation, Dissoziation und Signifikanzen der ermittelten Werte zwischen [³H]PSB-15900 und [³H]PSB-16254 an intakten Thrombozyten, verschiedenen Membranpräparationen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen.

5.5 Sättigungsexperimente

Alle Sättigungsstudien mit [³H]PSB-16254 (Abb. 69) wurden mit verschiedenen Radioligandkonzentrationen von 1 bis 60 nM an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C Inkubationstemperatur durchgeführt. Die Experimente wurden dreimal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt, wobei Duplikate pro Messpunkt aufgenommen wurden.

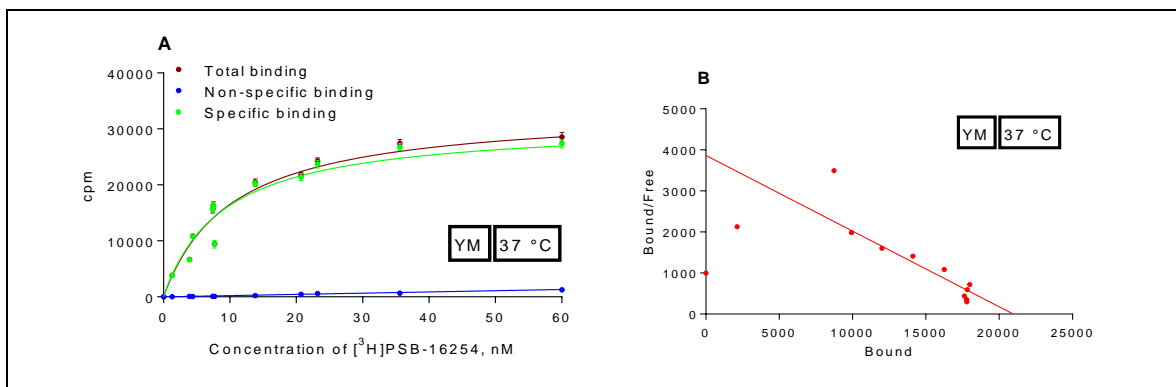


Abb. 69: Sättigungsexperimente von [³H]PSB-16254 an Membranpräparationen von humanen Thrombozyten (50 µg Protein) bei 37 °C (A). Gesamtbindung (■), unspezifische Bindung (●) und spezifische Bindung (▲) wurden bei einer Radioligandkonzentration von 1,0 bis 60 nM gemessen. (B) zeigt den korrespondierenden Scatchard-Rosenthal Plot.

Die unspezifische Bindung, die in Gegenwart von YM-254890 (5 µM) bestimmt wurde, ist gering und abhängig von der eingesetzten [³H]PSB-16254-Konzentration, wobei die unspezifischen Bindung sättigbar ist. Der Radioligand zeigt eine hohe Affinität bei an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen: $K_d = 8,94$ nM bei 37 °C. Die Gesamtzahl der Bindungsstellen (B_{max}) entspricht $212 \pm 8,12$ pmol/mg. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei [³H]PSB-16254 um einen

hochselektiven Radioliganden handelt, der sich exzellent für die Anwendung in Bindungsstudien eignet.

5.6 Zusammenfassung der Sättigungsexperimente

Tab. 21 zeigt zusammenfassend aus allen durchgeführten Sättigungsversuchen die ermittelten K_D-Werte und B_{max}-Werte von [³H]PSB-15900 und [³H]PSB-16254. Zu erkennen ist, dass unter verschiedenen Inkubationsbedingungen [³H]PSB-15900 hochaffin an Gα_q bindet und auch [³H]PSB-16254 hochaffin an Gα_q von humanen Thrombozyten-Membranpräparationen bindet.

Tab. 21: Zusammenfassung der ermittelten K_D-Werte und B_{max}-Werte aus Sättigungsstudien von [³H]PSB-15900 und [³H]PSB-16254 an Zellen und Membranpräparationen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen.

	K _D value (nM) (B _{max} values ± SEM in pmol/mg of protein)				P value (Unpaired t test – two tailed) [³ H]PSB-15900 vs [³ H]PSB-16254
	[³ H]PSB-15900		[³ H]PSB-16254		
	K _D value (nM)	B _{max} values (pmol/mg)	K _D value (nM)	B _{max} values (pmol/mg)	
Human platelet membranes 0°C	6.55 ± 0.32	186 ± 4.11	nd ^a	nd	
Human platelet membranes 21°C	7.98 ± 0.98	199 ± 1.78	nd	nd	
Human platelet membranes 37°C	4.28 ± 0.41	213 ± 4.21	8.94 ± 0.92	212 ± 8.12	*
Intact human platelets 37°C	8.91 ± 2.30	682 ± 85.2 sites/cell	nd	nd	
Rat brain cortical membranes 0°C	6.50 ± 0.31	576 ± 8.87	nd	nd	

5.7 Konkurrenzexperimente

5.7.1 Einleitung

Wie bei den Konkurrenzexperimenten mit [³H]PSB-15900 soll mit [³H]PSB-16254 die Affinität von verschiedenen, selektiven G_q-Inhibitoren gezeigt werden. Hierzu wurden die beiden Verbindungen FR900359 und YM-254890 gegen [³H]PSB-16254 auf ihre Affinität hin getestet.

5.7.2 Konkurrenzexperimente an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen mit [³H]PSB-16254

Alle Konkurrenzexperimente wurden in einem Inkubationspuffer, der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, enthielt, durchgeführt. Die Vials enthielten 5 µl der Testverbindung in DMSO, 50 µl [³H]PSB-16254 (51 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und 50 µl humane Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation für 90 min gestartet und bei 37 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4, (3 ml) gespült, um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-16254 wurde unter Verwendung von 5 µM YM-254890 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO. Für die Berechnungen der K_i-Werte und korrespondierenden pK_i-Werte, wurde der aus den Sättigungsexperimenten bestimmte K_d-Wert von 8,94 nM an humanen Thrombozyten-Membranpräparation herangezogen.

5.7.3 Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen mit [³H]PSB-16254

In den durchgeführten Konkurrenzexperimenten gegen [³H]PSB-16254 zeigen FR900359 und YM-254890 eine hochaffine Bindung im niedrigen nanomolaren Bereich, vgl. Tab. 22, die mit den bereits bestimmten Affinitäten gegen [³H]PSB-15900 vergleichbar sind. FR900359 zeigt gegen [³H]PSB-15900 eine leicht geringere Affinität (K_i = 6,91 nM) als gegen [³H]PSB-16254 (K_i = 2,42). YM-254890 hingegen besitzt gegen [³H]PSB-16254 eine sehr ähnliche Affinität (K_i = 5,08 nM) wie gegen [³H]PSB-15900 (K_i = 4,54 nM). Beide Verbindungen zeigen im gemessenen Konzentrationsbereich eine vollständige Inhibitionskurve, ohne Löslichkeitsprobleme oder andere Effekte aufzuweisen (vgl. Abb. 70). Da es sich hierbei aber um zwei unterschiedliche Gruppen (ermittelte Ergebnisse aus

Kompetitionen mit verschiedenen Radioliganden) handelt, zeigt Tab. 23 einen statistischen Vergleich, um die Ergebnisse besser interpretieren zu können. Hier ist zu sehen, dass FR900359 einen statistisch signifikant unterschiedlichen (unpaired two-tailed t test) K_i-Wert im direkten Vergleich bei der Competition gegen [³H]PSB-15900 und [³H]PSB-16254 besitzt. Dies könnte an den speziellen Bindungseigenschaften von FR900359 liegen. YM-254890 zeigt hingegen an beiden Radioliganden keine statistisch signifikanten Unterschiede.

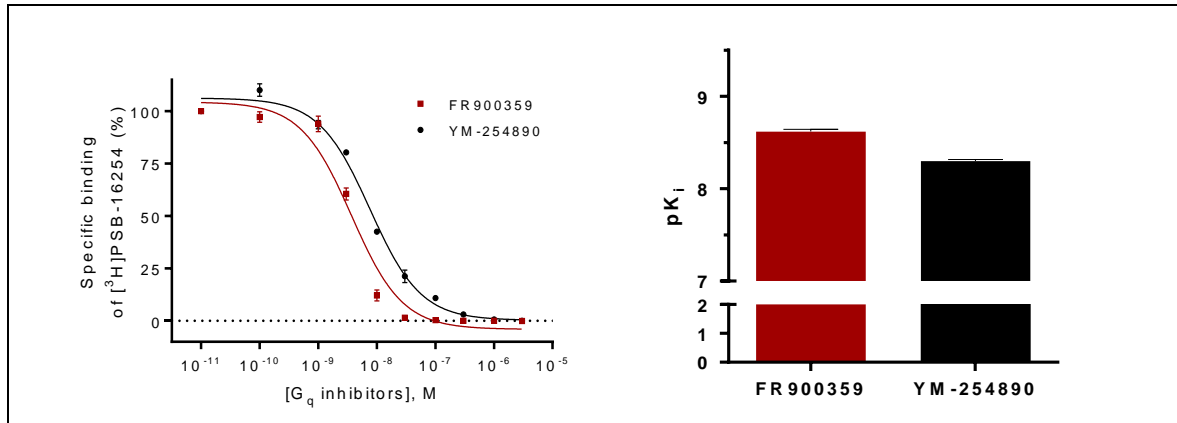


Abb. 70: Konkurrenzkurven von FR900359 und YM-254890 (links) an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) gegen 5 nM [³H]PSB16254 bei 37 °C und korrespondierende pK_i-Werte (rechts).

Tab. 22: Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten an humanen Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) gegen 5 nM [³H]PSB-16254 bei 37 °C.

Verbindung	K _i ± SEM (nM)	pK _i ± SEM	IC ₅₀ ± SEM (nM)
FR900359	2.42 ± 0.20	8.62 ± 0.04	3.77 ± 0.32
YM-254890	5.08 ± 0.33	8.30 ± 0.03	7.93 ± 0.30

Tab. 23: Vergleich der Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten an humanen Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) gegen 5 nM [³H]PSB-15900 und 5 nM [³H]PSB-16254 bei 37 °C.

	[³ H]PSB-15900	[³ H]PSB-16254	Unpaired two-tailed t test
Verbindung	K _i ± SEM (nM)	K _i ± SEM (nM)	P-Wert
FR900359	6.91 ± 1.30	2.42 ± 0.20	0.0325 *
YM-254890	4.54 ± 0.81	5.08 ± 0.33	ns

5.8 Selektivität des Radioliganden zu den Gα_q-Untereinheiten

5.8.1 Einleitung

Wie für [³H]PSB-15900 wurden Präparationen von humanen Thrombozyten als Quelle für Gα_q-Protein verwendet. Die Membranpräparationen enthalten eine Mischung aller in dem Gewebe

nativ vorkommenden Gα_q-Proteine, wie auch eine Vielzahl von anderen Proteinen. Wie für [³H]PSB-15900 soll hier die Selektivität zu einzelnen Gα_q-Subspezies (vgl. Kapitel 4.8) gezeigt werden und somit bewiesen werden, dass der Radioligand selektiv an Gα_q bindet und die erhobenen Ergebnisse aus Bindungsstudien nicht durch Bindung an andere Zielstrukturen herrühren oder positiv beeinflusst werden. Des Weiteren soll durch die Ergebnisse die Affinität von [³H]PSB-16254 zu den einzelnen Subtypen von Gα_q gezeigt werden.

5.8.2 Methode

Ziel war es, wie für [³H]PSB-15900, die Affinität von [³H]PSB-16254 an in Gα_q-Null-HEK-Zellen überexprimierten, murine Gα_q wie auch humane Gα_{q11}-, Gα_{q14}-, Gα_{q15}-Proteine zu untersuchen. Als Quelle des Proteins wurden wie in Kapitel 4.8 beschrieben, die Membranpräparationen der überexprimierten Untereinheiten aus CRISPR-Gα_q-knockout-HEK-Zellen verwendet. Zur Kontrolle dienten Membranpräparationen der unveränderten CRISPR-Gα_q-knockout-HEK-Zellen.

5.8.3 Bindungsstudien an überexprimierten Gα_{q11}-, Gα_{q14}-, Gα_{q15}- und murinen Gα_q aus CRISPR-Gα_q-knockout-HEK-Zellen

Alle Konkurrenzexperimente zur Evaluierung der verschiedenen Gα_q-Untereinheiten und den CRISPR-Gα_q-knockout-HEK-Zellen wurden in einem Inkubationspuffer der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, enthielt durchgeführt. Tubes enthielten 5 µl der Testverbindung (YM-254890 in verschiedenen Konzentrationen) in DMSO zur, 50 µl [³H]PSB-16254 (51 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und Gα_q-Membranpräparation respektive der HEK-Gα_q-KO-Membranpräparation (30 µg Protein), in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation gestartet und für 90 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Filter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filterplatten wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4, (3 ml) gespült, um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-16254 wurde unter Verwendung von 10 µM YM-254890 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO.

5.8.4 Ergebnisse & Diskussion

[³H]PSB-16254 zeigt eine hochaffine Bindung an Gα_q-, Gα_{q11}- und Gα_{q14}- Untereinheiten. Zu Gα₁₅ und Gα_q-knockout-HEK-Membranpräparationen kann hingegen keine Bindung gemessen werden.

Dies bedeutet, dass man von einem Nullhintergrund und einer selektiven Bindung von [³H]PSB-16254 an den Membranpräparationen der verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten ausgehen kann, und gleichzeitig, dass die bestimmten Werte nicht durch eine Hintergrundbindung beeinflusst werden. Da keine Sättigungsstudien mit [³H]PSB-16254 an den $G\alpha_q$ -Untereinheiten durchgeführt wurden, wurden rechnerisch die pseudo K_d - und pseudo B_{max} -Werte aus der Konkurrenz bestimmt (Tab. 24). Dem zugrunde liegend wurden anschließend die pseudo K_i -Werte für FR900359 an den $G\alpha_q$ -Untereinheiten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 24 und Tab. 25 dargestellt.

Die Affinitäten von YM-254890 zu $G\alpha_q$, $G\alpha_{q11}$ und $G\alpha_{q14}$ liegen im niedrigen nanomolaren Bereich, welche aus den Bindungskurven in Abb. 71 zu erkennen sind. Sie betragen an $G\alpha_q$ 2,78 nM, an $G\alpha_{q11}$ 3,25 nM und an $G\alpha_{q14}$ 2,39 nM. Die Expressionsrate der verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten ist hoch (Tab. 24), wie die hohen Gesamtbindungen bei gleichzeitig sehr niedriger unspezifischer-Bindung in Abb. 72 zeigen. Hierdurch wird gezeigt, dass auch [³H]PSB-16254 selektiv und hochaffin an $G\alpha_q$, $G\alpha_{q11}$ und $G\alpha_{q14}$ binden und $G\alpha_{q15}$ keine affine Bindungsstelle für [³H]PSB-16254 aufweist.

Tab. 24: Berechnete pseudo K_d -Werte und pseudo B_{max} -Werte von 5 nM [³H]PSB-16254 an verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten bei 37 °C.

	[³ H]PSB-16254 vs YM-254890			
$G\alpha$ -Untereinheit	berechneter Pseudo- K_D (nM) \pm SEM		berechneter Pseudo- B_{max} (pmol/mg) \pm SEM	
$G\alpha_q$	2.78	0.12	289	21.8
$G\alpha_{q11}$	4.09	0.13	327	14.7
$G\alpha_{q14}$	1.74	0.38	124	15.0
$G\alpha_{q15}$	Keine spezifische Bindung			

Tab. 25: Berechnete pseudo K_i -Werte für YM-254890 gegen 5 nM [³H]PSB-16254 an verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten bei 37°C.

	FR900359	
$G\alpha$ -Untereinheit	Berechneter Pseudo- K_i (nM) \pm SEM	
$G\alpha_q$	2.78	\pm 0.47
$G\alpha_{q11}$	3.25	\pm 0.05
$G\alpha_{q14}$	2.39	\pm 0.14
$G\alpha_{q15}$	Keine spezifische Bindung	

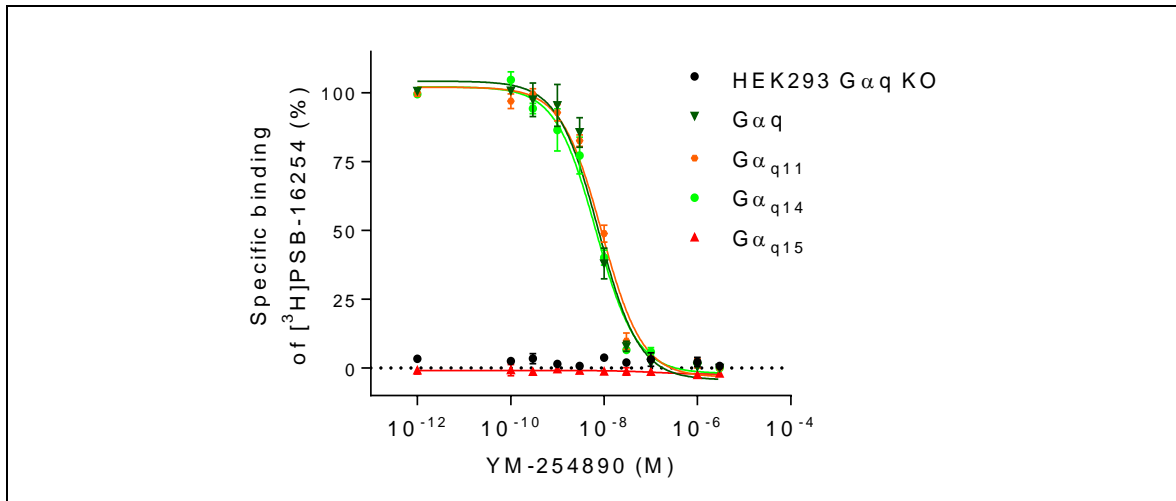


Abb. 71: Bindungskurven von YM-254890 gegen 5 nM [³H]PSB-16254 an verschiedenen G α_q -Untereinheiten und Membranpräparationen (30 μ g Protein) von HEK-CRISPR-G α_q -KO Zellen bei 37 °C.

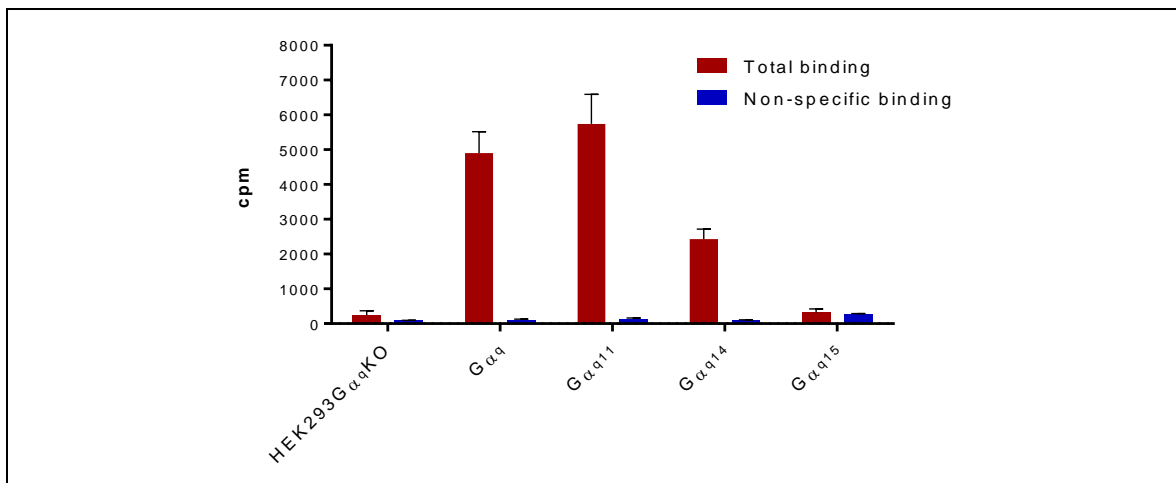


Abb. 72: Gesamtbindung und unspezifische-Bindung von 5 nM [³H]PSB-16254 an verschiedenen G α_q -Untereinheiten Membranpräparationen und Membranpräparationen (30 μ g Protein) von HEK-CRISPR-G α_q -KO-Zellen bei 37 °C.

5.8.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

[³H]PSB-15900 und [³H]PSB-16254 zeigen ähnliche Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich (ermittelte pseudo K_i -Werte) an $G\alpha_q$, $G\alpha_{q11}$, $G\alpha_{q14}$ und keine spezifische Bindung an $G\alpha_{q15}$. Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Affinitäten der beiden Radioliganden im direkten Vergleich zwischen den einzelnen Untereinheiten (unpaired two-tailed t test).

Tab. 26: Zusammenfassung der ermittelten pseudo K_i -Werte aus Kompetitionen gegen verschiedene $G\alpha_q$ -Untereinheiten.

	[³ H]PSB-16254 vs YM-254890		[³ H]PSB-15900 vs FR900359	
$G\alpha$ -Untereinheit	Berechneter pseudo K_i (nM) \pm SEM		Berechneter pseudo K_i (nM) \pm SEM	
$G\alpha_q$	2.78	\pm 0.47	2.41	\pm 0.52
$G\alpha_{q11}$	3.25	\pm 0.05	5.67	\pm 2.34
$G\alpha_{q14}$	2.39	\pm 0.14	0.92	\pm 0.39
$G\alpha_{q15}$	Keine spezifische Bindung		Keine spezifische Bindung	

6. STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN DER NEUEN HOCHSELEKTIVEN RADIOLIGANDEN

6.1 Einleitung

Um die neuen Radioliganden [³H]PSB-15900 und [³H]PSB-16254 vergleichen zu können, wurde durch die Arbeit von Nishimura et al. 2010 ein wichtiger Grundstein gelegt. Seitdem ist eine Kristallstruktur von $G\alpha_{q/11}\beta\gamma$ gebunden an YM-254890 (PDB ID 3AH8) in einer Auflösung von 2,9 Å verfügbar (Abb. 73). Die Kristallstruktur zeigt die Bindungsstelle von YM-254890 und gibt Aufschlüsse über die Interaktionen mit den umliegenden Aminosäuren in der Bindungstasche (Abb. 74). Da [³H]PSB-16254 und [³H]PSB-15900 strukturell YM-254890 stark ähneln und in Bindungsstudien (vgl. Kapitel 4 und Kapitel 5) gezeigt wurde, dass YM-254890 und die beschriebenen Radioliganden vergleichbare Affinitäten zeigen, lässt sich die Röntgenstruktur für Dockingstudien aller Derivate nutzen.

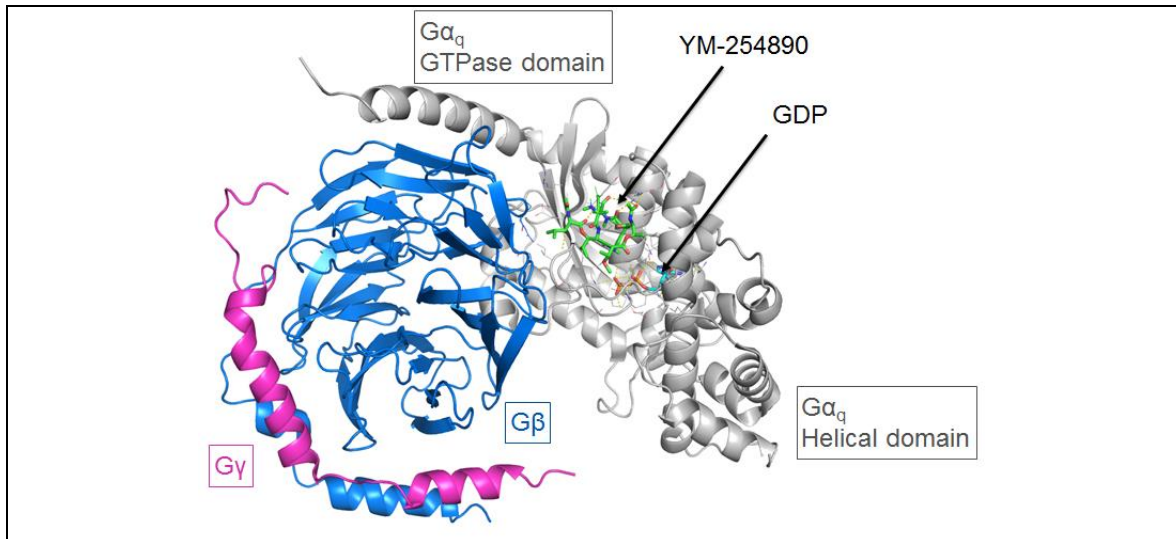


Abb. 73: $G\alpha_{q/11}\beta\gamma$ gebunden an YM-254890. ^a

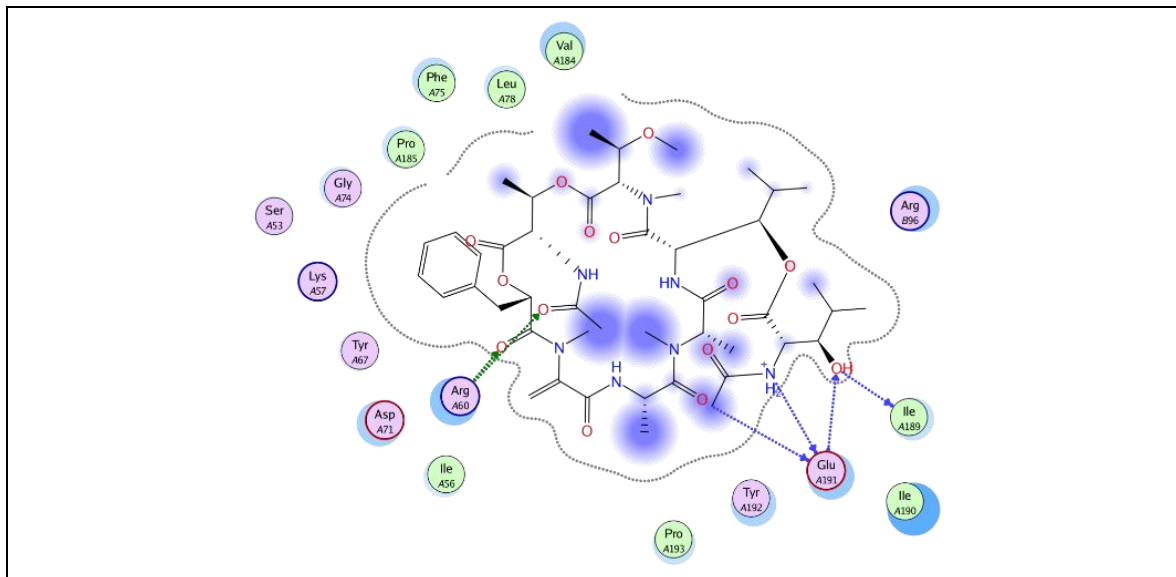


Abb. 74: 2D-Interaktions-Diagramm von YM-254890 in der Bindungstasche. ^a

Um den Wirkmechanismus von YM-254890 und strukturell verwandten Substanzen zu verstehen, ist ein genaues Verständnis der Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit von großer Bedeutung. Zusammen mit der durch die Röntgenstruktur bekannten Bindungsstelle von YM-254890, lässt sich erklären, warum die $G\alpha_q$ -Signalübertragung gehemmt wird.

Die $G\alpha$ -Untereinheit befindet sich normalerweise im GDP-gebundenen Zustand und bildet zusammen mit der β - und γ -Untereinheit ein Heterotrimer. Durch Aktivierung eines GPCRs wird ein Guanosin-Austausch-Faktor (GEF) rekrutiert, der den Austausch von gebundenen GDP zu GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit stimuliert. Die GTP-Bindung bewirkt eine Konformationsänderung der drei flexiblen Bereiche (Switch I, II und III) der $G\alpha$ -Untereinheit, was zur Dissoziation des $G\beta\gamma$ -Komplexes

^a Abbildungen wurden basierend auf der Kristallstruktur nach Nishimura et al. (2010) durch Dr. Vigneshwaran Namasivayam, AG Müller, Universität Bonn, erstellt.

und der anschließenden Bindung von $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ an weitere Signal-Effektoren führt. Die Signal-Termination wird durch Hydrolyse von GTP zu GDP durch GTPase-aktivierende-Proteine (GAP) eingeleitet, was wieder zur Rückbildung eines inaktiven Heterotrimeres führt.⁹²

YM-254890 bindet in dem Spalt zwischen Linker 1 und Switch I (Linker 2), der die GTPase- und helikale-Domäne miteinander verbindet (Abb. 75 Links). Dreizehn Aminosäure-Reste sind an nichtpolaren Wechselwirkungen mit YM-254890 beteiligt, wobei der aromatische Phenylring von YM-254890 in eine kleine hydrophobe Tasche hineinragt und intensive Wechselwirkungen mit Aminosäureresten des Switch I (Val184 und Thr186) und der GTPase-Domäne (Ile56, Lys57, und Ile190) eingeht (Abb. 74). Des Weiteren bestehen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Seitenkette mit den Aminosäure-Resten Glu191 und Ile189 des Backbones von Switch I (Abb. 74). Diese Wechselwirkungen von YM-254890 mit der $G\alpha$ -Untereinheit können nur im GDP-gebundenen Zustand stattfinden, da im GTP-gebundenen Zustand der für die Bindung wichtige Switch I um ca. 2 Å von der YM-254890-Bindungstasche verschoben vorliegt, im Vergleich zum GDP-gebundenen Zustand.¹²

Die durch YM-254890-Bindung vermittelte Stabilisierung der beiden Inter-Domänen-Linker, Linker 1 und Switch I (Linker 2), verhindert die Freisetzung und den Austausch von gebundenen GDP gegen GTP. Bildlich veranschaulicht setzt sich YM-254890 wie ein Keil zwischen die beiden Domänen und verhindert sterisch dass GDP gegen GTP ausgetauscht werden kann (Abb. 75A und B rechts).¹²

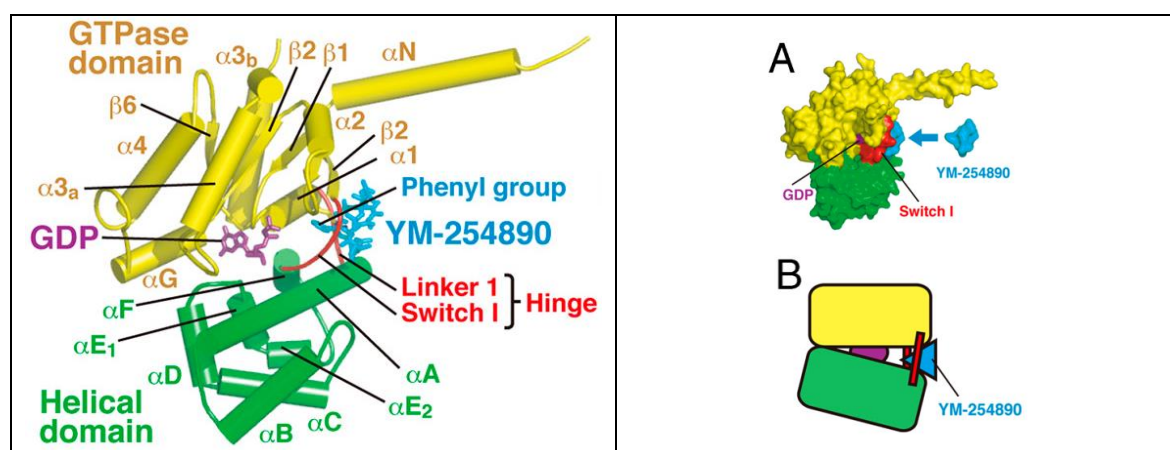


Abb. 75: Detaillierte Darstellung der Bindungsposition von YM-254890 an der $G\alpha_q$ -Untereinheit (links); Veranschaulichung der Bindung von YM an der $G\alpha_q$ -Untereinheit (rechts).

Wie in Kapitel 4.8 und 5.8 gezeigt, zeigen [^3H]PSB-15900 und [^3H]PSB-16254 dies für die $G\alpha$ -Untereinheiten q, 11, und 14, jedoch nicht für 15/16, da 15/16 nicht über den Switch-I verfügen, der für die Bindung der Substanzen essentiell ist.¹²

6.2 Analyse der Kinetik-Daten

Die durchgeführten Kinetik-Studien zeigen, dass die Assoziation von [³H]PSB-15900 (von FR900359 abgeleiteter Radioligand) und [³H]PSB-16254 (von YM-254890 abgeleiteter Radioligand), eine ähnliche Assoziationskinetik, jedoch eine extrem unterschiedliche Dissoziationskinetik aufweisen - [³H]PSB-15900 $t_{1/2} = 93,3$ min; [³H]PSB-16254 $t_{1/2} = 3,53$ min bei 37 °C Inkubationstemperatur an humanen Thrombozyten. In Bezug auf die Struktur der beiden Moleküle unterscheiden sich [³H]PSB-16254 und [³H]PSB-15900 in der Anzahl der Methylreste voneinander (Abb. 76). [³H]PSB-16254 weist einen Acetamid-Rest und einen Isopropyl-Rest auf, wohingegen [³H]PSB-15900 einen Propionamid-Rest und einen Methyl-Rest aufweist (vgl. Abb. 76 in Gelb markiert).

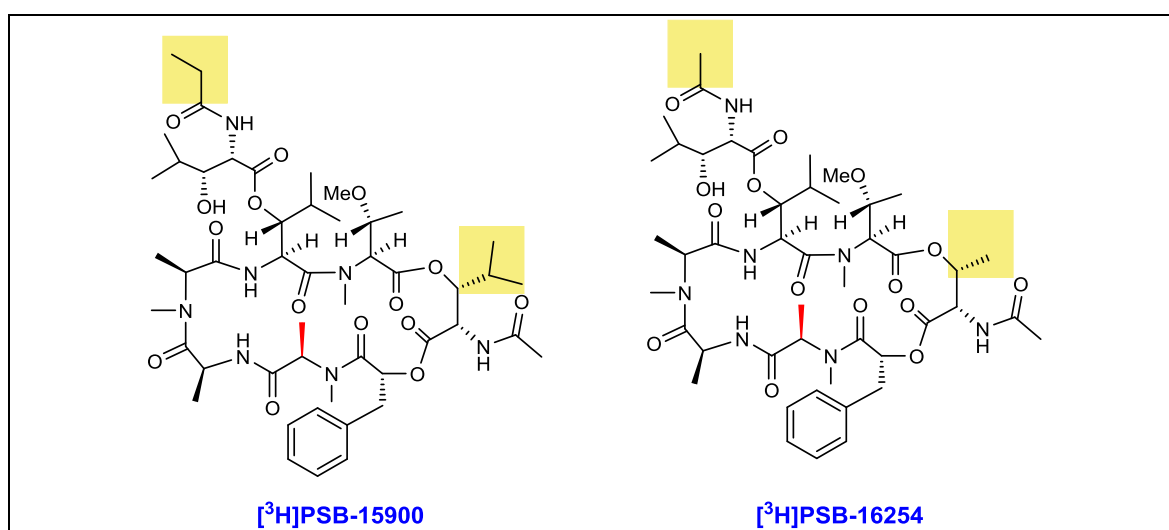


Abb. 76: Strukturen von [³H]PSB-16254 und [³H]PSB-15900 im direkten Vergleich.

Eine mögliche Erklärung warum [³H]PSB-16254 schneller dissoziiert, liefern Erkenntnisse aus Docking-Simulationen^a der beiden Radioliganden an der postulierten Bindungsstelle von $G\alpha_q$.

Nach Eintritt in die Bindungstasche und Ausbildung von Wechselwirkungen, bleibt [³H]PSB-15900 in der Tasche stecken. Die lipophilen Reste, die [³H]PSB-15900 von [³H]PSB-16254 unterscheiden, verhindern eine schnelle Dissoziation und führen dazu, dass das Molekül länger verweilt. Im Gegensatz dazu dissoziiert [³H]PSB-16254, dem die zwei lipophilen "Griffe" fehlen, viel schneller. In den durchgeführten Docking-Simulationen verkantet sich [³H]PSB-15900 wie eine Art Dübel in der Bindungstasche wodurch dessen pseudo-irreversible-Bindung zu erklären wäre. Die korrespondierenden Darstellungen sind in Abb. 77 aufgeführt.

^a Docking-Simulationen wurden durch Dr. Vigneshwaran Namasivayam, AG Müller, Universität Bonn, durchgeführt.

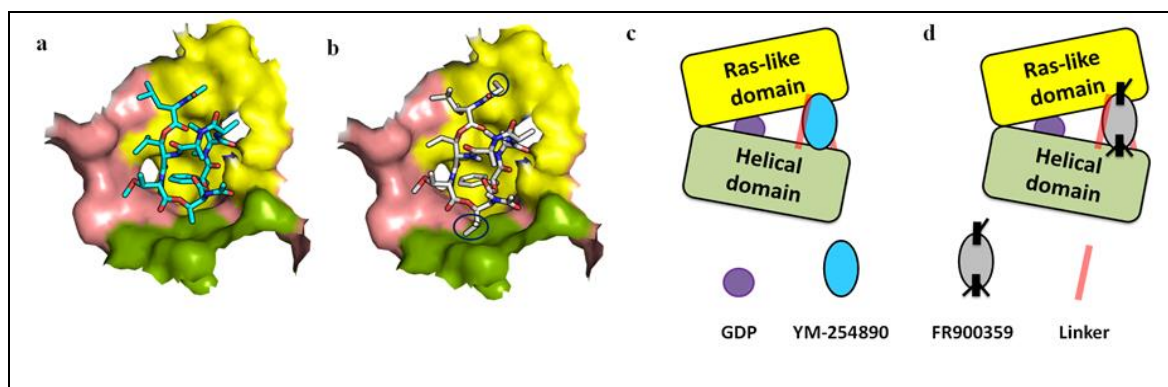


Abb. 77: YM-254890 (a) und FR900359 (b) in der Bindungstasche ^a; Schematische Darstellung der unterschiedlichen Bindung von YM-254890 (c) und FR900359 (d).

Der Unterschied zwischen FR900359 und YM-254890 ist in Bezug auf die Kinetik sehr interessant. In zukünftigen Loss-of-Function-Mutations soll durch Mutagenese der in der Bindung involvierten Aminosäure-Reste herausgefunden werden, welche Strukturmerkmale die Kinetik beeinflussen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können als Vorschläge für synthetische Modifikationen an der Grundstruktur der Liganden verwendet werden, um Derivate zu erhalten, die unterschiedliche Dissoziationskinetiken aufweisen. Des Weiteren kann hierdurch gezeigt werden, welche Aminosäure-Reste die Kinetik signifikant beeinflussen und essentiell für die Bindung sind.

7. SCREENING NACH NEUEN POTENTIELLEN $G\alpha_q$ -INHIBITOREN

7.1 Einleitung

Durch die Adaptierung des Standard-Assays für [³H]PSB-15900 auf HTS Format, welche in Kapitel 4.7 beschrieben ist, kann nun eine Hochdurchsatz-Testung durchgeführt werden. Dieses Format ermöglicht einen theoretischen Durchsatz von mehr als 1000 Proben pro Tag. Im Vergleich zu Konfokal-Fluoreszenz-Methoden im Ultra-High-Throughput-Format (UHTS), bei denen der theoretische Durchsatz bei ca. 10⁶ Proben pro Tag liegt, erscheint ein theoretischer Durchsatz von 1000 Proben pro Tag für die entwickelte [³H]PSB-15900-Methode, als sehr gering ⁹³. Jedoch muss man dazu sagen, dass der theoretische Durchsatz eines HTS- oder UHTS-Assay stark von der Automatisierung, der Genauigkeit der verwendeten Geräte und dem Assay-Design abhängt. Um höchsten Durchsatz bei gleichzeitig guter Genauigkeit und Verlässlichkeit leisten zu können, muss ein hohes Maß an Qualität der Zellbiologie, Arbeitsmaterialien und Ausgangsstoffe gelegt werden. Diese enormen Durchsätze sind auf Grund der hierfür benötigten Materialien und der stetigen Qualitätskontrolle extrem kostspielig und können derzeit nur durch wenige große Unternehmen geleistet werden. Die Möglichkeit, hohe Durchsätze an Proben zur Testung zu ermöglichen macht nur Sinn, wenn eine entsprechend große Substanzbibliothek im Hintergrund existiert, um die

^a Graphische Darstellung der Bindungstasche wurden durch Dr. Vigneshwaran Namasivayam, AG Müller, Universität Bonn, durchgeführt.

entsprechende Methode auslasten zu können. Der Arbeitskreis Müller, Universität Bonn, hat eine Substanzbibliothek in Besitz die mehr als 15.000 Feststoffe, 10.000 Stock-Lösungen und mehrere tausend Stoffe in separaten Bibliotheken enthält. Ein Bild der Substanzbibliothek ist in Abb. 78 dargestellt. Diese Substanzen können automatisiert konzentrationsgenau auf Mikrotiter-Platten übertragen und für die Testung bereitgestellt werden.



Abb. 78: Substanzbibliothek des Arbeitskreises Müller, Universität Bonn.

7.2 Screening von Arzneistoffbibliotheken

Ziel bei der Bearbeitung der Substanzbibliotheken ist es, neue Moleküle zu finden, die an $G\alpha_q$ binden. Als Vorgabe bei der Wahl der Substanzbibliotheken und der darin enthaltenen Testsubstanzen, galten mehrere Kriterien. So sollte ein Großteil der Substanzen zu der Klasse der „small molecules“ gehören, was bedeutet dass sie eine Molmasse von kleiner als 500 g/mol besitzen. Diese verfügen meist über eine Grundstruktur, die synthetisch zugänglich ist und zudem Raum für Modifikationen bietet. Dadurch können Verbindungen die als „Hit“, also als potentiell vielversprechende Struktur identifiziert wurden, semisynthetisch verändert und durch die Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen weiter optimiert werden, bis sie eine ausreichende Affinität und oder Selektivität vorweisen. Zum anderen sollte, durch Testung der Arzneistoffbibliothek (Tab. 27) überprüft werden, ob bereits bekannte und kommerziell eingesetzte Arzneistoffe einen Effekt auf $G\alpha_q$ besitzen, wobei zunächst die Interaktionen mit der Bindungsstelle von [^3H]PSB-15900 untersucht wird.

Tab. 27: Gegen [³H]PSB-15900 getestete Substanzbibliotheken.

Substanzbibliothek	Anzahl der enthaltenen Verbindungen	Klassifizierung der Verbindungen
Approved drug library	600	Arzneistoffe
Tocris library	1.400	Pharmakologisch aktive Substanzen
Prof. Menche	60	Heterozyklische Alkaloide aus Pflanzen
PR-Library	50	Organische Moleküle
Alexander Dömling Library	200	Organische Moleküle
Natural compounds	90	Naturstoffe

7.3 Screening-Methoden

Das Screening der Substanzbibliotheken „Approved drug library“ und „Tocris library“, vgl. Tab. 27, wurden mit der etablierten HTS-Methode für [³H]PSB-15900 durchgeführt. Alle weiteren Substanzbibliotheken wurden an einem 48er Brandel-Harvester unter Verwendung der Standardmethode durchgeführt.^a

Alle Konkurrenzexperimente wurden in einem Inkubationspuffer der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, enthielt durchgeführt. Vials enthielten 5 µl der Testverbindung (25 µM) in DMSO, 50 µl [³H]PSB-15900 (77 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und 50 µl humane Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation gestartet und für 90 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 48-Well-Harvester für die Standard-Methode bzw. über einem GF/C-UniFilter™ mit einem Brandel 96-Well-Harvester für die HTS-Methode eingeleitet. Die Filter bzw. Filterplatten wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4, (3 ml) gespült, um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Bei der Standard-Methode wurden anschließend die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Bei der HTS-Methode wurden die Filterplatten für 2 h getrocknet, anschließend Ultima Gold® Szintillationscocktail (50 µl) pro Kavität hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Mikrofilterplatten-Szintillations-Counter vermessen. Bei beiden Methoden wurde die unspezifische Bindung von [³H]PSB-15900 unter Verwendung von 10 µM FR900359 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO. Für die Berechnungen der K_i-Werte und korrespondierenden pK_i-Werte wurden die aus den

^a Die PR-Bibliothek wurde durch Serina Bach, Universität Bonn, gescreent.

Sättigungsstudien bestimmten K_d -Werte für humane Thrombozyten-Membranpräparation herangezogen.

Alle Verbindungen wurden zweimal gegen [^3H]PSB-15900 getestet. Zeigte eine Verbindung bei mindestens einer Kompetition eine Inhibition von $\geq 50\%$ wurde diese ein drittes Mal getestet. Ließ sich dieses Ergebnis reproduzieren, wurde eine Verdünnungsreihe, ab 250 μM , der Verbindung angefertigt und drei Kompetitionskurve wurden aufgenommen.

7.4 Ergebnisse & Diskussion

Die Testung der rund 2.400 Substanzen ergab 2 „Hits“, die das Kriterium von einer Inhibition von $\geq 50\%$ erfüllten; vgl. Abb. 79. Dabei handelt es sich um die Verbindungen Ebselen und SCH-202676 (Abb. 80).

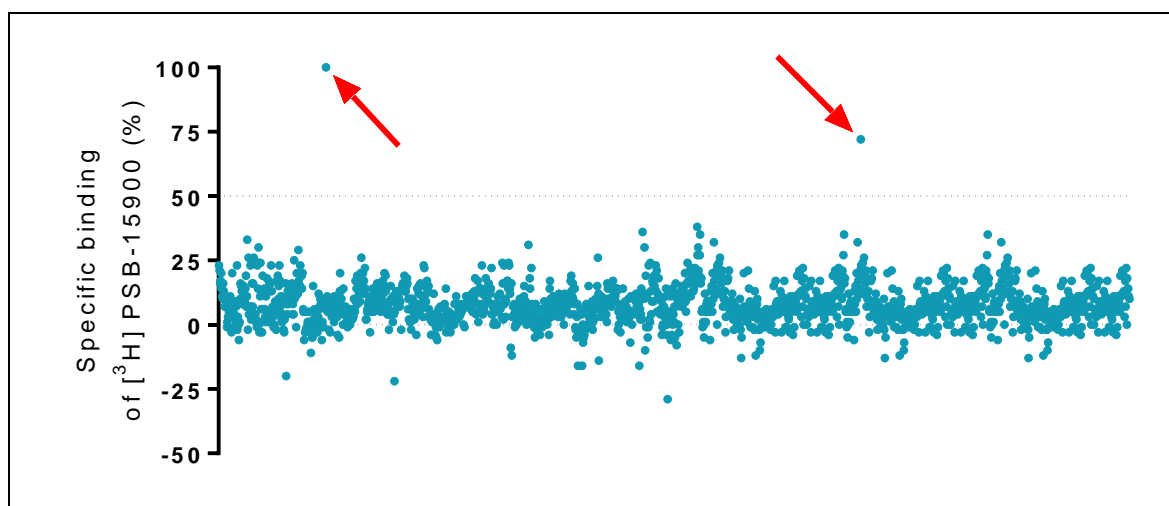


Abb. 79: Darstellung aller getesteten Substanzen in Bezug auf Ihre Bindung. Hits sind mit roten Pfeilen markiert.

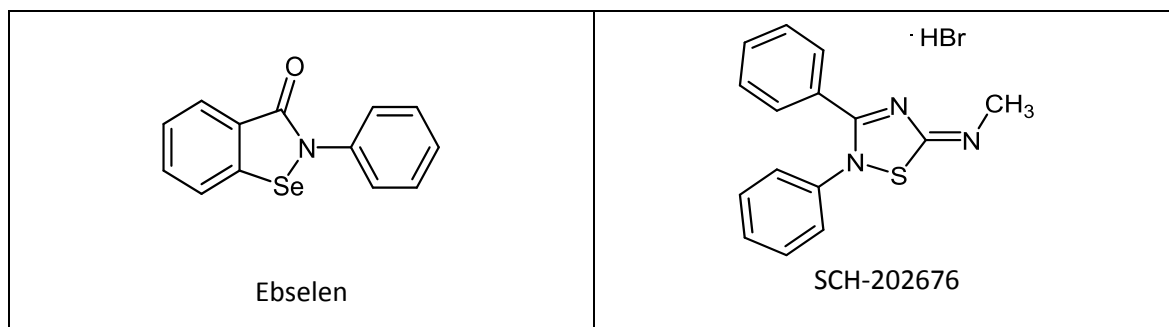


Abb. 80: Strukturen der beiden Hit-Verbindungen, Ebselen (links) und SCH-202676 (rechts).

Bei Ebselen, auch als PZ 51 und SPI-1005 bezeichnet, handelt es sich um ein synthetisches Organoselen-Molekül mit entzündungshemmender, antioxidativer und zytoprotektiver Wirkung. Es ahmt die Glutathionperoxidase nach und kann auch mit Peroxynitrit reagieren.⁹⁴ Es wird als mögliche Behandlung von ischämischen Reperfusionsschäden (Schäden nach einer Minderdurchblutung von Extremitäten oder Organen) und Schlaganfällen^{95; 96}, Hörverlust und

Tinnitus⁹⁷, sowie bipolarer Störung untersucht.⁹⁸ Darüber hinaus kann Ebselen gegen *Clostridium difficile*-Infektionen wirksam sein.⁹⁹ Ebselen ist ein potenter Radikalfänger von Wasserstoffperoxid sowie Hydroperoxiden und Cholesterylesterhydroperoxiden. Es wurde gezeigt, dass diverse Ebselen-Analoga Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Thiolen abfangen können.¹⁰⁰ Ein Überblick über die verschiedenen Wirkungen von Ebselen sind in Abb. 81 gegeben. In den letzten Jahren wurden diverse analytische Methoden wie Röntgendiffraktometrie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Kernspinresonanzspektroskopie, Circular dichroismus und UV/VIS-Spektroskopie herangezogen, um die Ligand-Protein-Bindung näher zu charakterisieren. Die verschiedenen Methoden zeigten, dass Ebselen in der Lage ist, mit Thiolen eine stabile Selenulfidbindung einzugehen. Darüber hinaus scheint Ebselen über verschiedene Transduktionswege und Proteininteraktionen zu wirken, wodurch der intrazelluläre Wirkmechanismus als pleiotrop beschrieben werden kann. In den meisten Fällen reagiert Ebselen mit Thiolen von Enzymen und Proteinen die für die Bindung essentiell sind. Die Reaktivität von Ebselen mit Protein-Thiolen macht Ebselen zu einem potenten Modulator von Proteinen, die Cystein für ihre Funktion benötigen. Diese Inhibition kann in vielen Fällen durch die Zugabe eines Reduktionsmittels wie Dithiothreitol (DTT) aufgehoben werden.¹⁰¹ Eine Zusammenstellung der bekannten Interaktionen von Proteinen und Enzymen mit Ebselen ist in Tab. 28 dargestellt. Ebselen scheint die Bindungsstelle von [³H]PSB-15900 zu modulieren und zeigte in Bindungsstudien gegen [³H]PSB-15900 einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt mit einer moderaten Affinität $K_i = 9,72 \pm 1,09 \mu\text{M}$, vgl. Tab. 29.

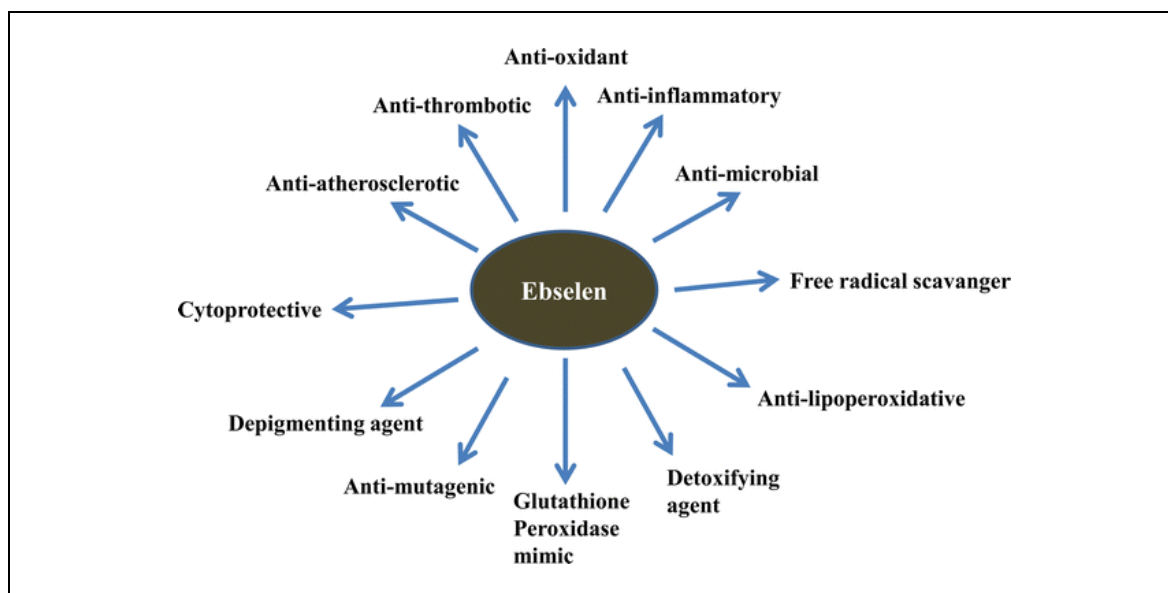
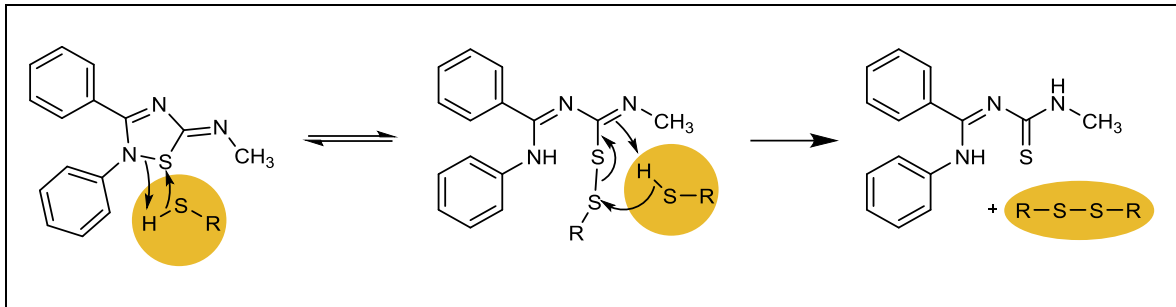


Abb. 81: Verschieden Wirkungen von Ebselen.¹⁰¹

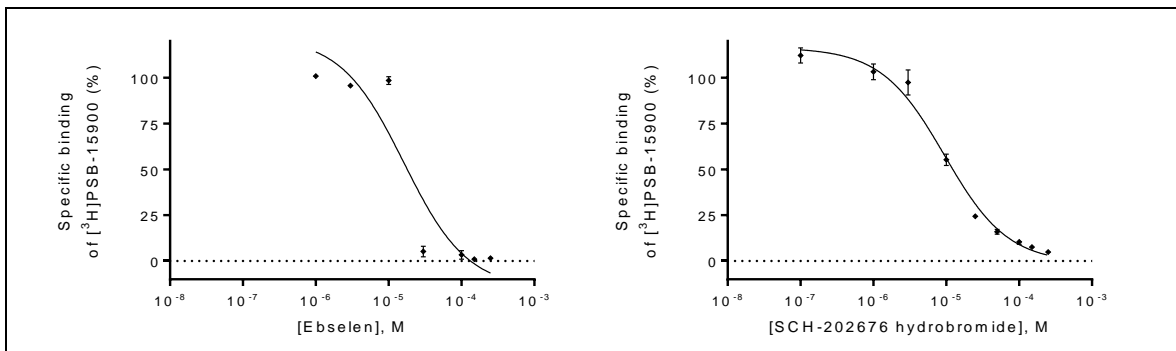
Tab. 28: Liste von Proteinen, deren Aktivität durch Ebselen moduliert wird. ¹⁰¹

S. No.	Enzyme/protein	Action of ebselen
1	JMJD2A	Disrupts Zn binding site
2	TFIIIA and xeroderma pigmentosum group A	Disrupts Zn finger motif
3	Alcohol dehydrogenase and metallothionine (MT)	Disrupts Zn finger motif
4	Fpg (formamidopyrimidine-DNA glycosylase)	Disrupts Zn finger motif
5	Lipoxygenases	Alteration of the iron ligand sphere
6	NO synthases	Reacts with its critical thiol group
7	NADPH oxidases (Nox)	Inhibits assembly of the Nox2 regulatory subunits
8	Horseradish peroxidase	Interferes with sulfhydryl groups
9	H ⁺ /K ⁺ -ATPase	Interferes with sulfhydryl groups
10	Lactate dehydrogenase	Interacts with critical thiol groups
11	P50 subunit of NF-κB and Sp1	Disrupts its Zn finger motif
12	Heme enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)	reacts with multiple cysteine residues and disrupts its active site
13	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Interacts with critical thiol groups of this enzyme
14	Inositol Monophosphatase (IMPase)	Covalent and irreversible inhibition
15	<i>P. falciparum</i> Hexokinase (Pfhk)	Non-covalent interaction with HK
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Diguanylate cyclases	Reacts with its critical thiol group
17	divalent metal transporter-1 (DMT1)	Noncovalent interaction

SCH-202676, ursprünglich durch die Firma Schering entwickelt, ist ein organisches Thiadiazol-Derivat und wurde 2004 als Inhibitor von sowohl Agonist- und Antagonist-Bindung an G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren identifiziert. SCH-202676 inhibierte die Bindung von Radioliganden an strukturell unterschiedlichen heterolog exprimierten GPCRs, einschließlich der humanen μ -, κ - und δ -Opioid-Rezeptoren, α - und β -adrenergen-Rezeptoren, muskarinischen M₁- und M₂-Rezeptoren, dopaminergen D₁- und D₂-Rezeptoren und Adenosin-Rezeptoren. Es wurde vermutet, dass auf Grund der großen Anzahl von adressierbaren Rezeptoren, eine Interaktion mit gemeinsamen Strukturmotiven, oder Proteinen die in die GPCR-Regulation eingreifen, stattfindet. Eine direkte Beeinflussung der α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins wurde ausgeschlossen. ¹⁰² Des Weiteren wurde, durch Ergebnisse aus Bindungsstudien an M₁-Rezeptoren, ein dualer Wirkmechanismus vermutet, der eine extrazelluläre allosterische wie auch eine intrazelluläre Bindung von SCH-202676 vermuten lässt. ¹⁰³ Stabilitätsstudien aus 2005 zeigten, dass SCH-202676 eine hochreaktive Thiol-modifizierende Verbindung ist und durch Thiolgruppen von Cystein-Resten in die Thioharnstoffvorstufe reduziert wird (Abb. 82). ¹⁰⁴

Abb. 82: Reaktion von SCH-202676 mit einem Thiol-Rest eines Zysteins (in Gelb markiert).¹⁰⁴

Diese Art der unselektiven Modifikation von Bindungsstellen an Rezeptoren und Proteinen könnte die Wirkung von SCH-202676 als Modulator an diversen GPCRs erklären und wurde 2006 durch Bindungsstudien und $^1\text{H-NMR}$ -Analyse bestätigt.¹⁰⁵ SCH-202676 scheint die Bindungsstelle von $[^3\text{H}]\text{PSB-15900}$ zu modulieren und zeigt in Bindungsstudien gegen $[^3\text{H}]\text{PSB-15900}$ einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt mit einer moderaten Affinität ($K_i = 3,63 \mu\text{M}$), vgl. Tab. 29.

Abb. 83: Kompetitionskurven von Ebelen (links) und SCH-202676 (rechts) gegen 5 nM $[^3\text{H}]\text{PSB-15900}$ an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) bei 37 °C.Tab. 29: Affinitäten der Hit-Verbindungen aus Testungen gegen $[^3\text{H}]\text{PSB-15900}$.

Substanz	$K_i \pm \text{SEM} (\mu\text{M})$	
Ebelen	9,72	$\pm 1,09$
SCH-202676	3,63	$\pm 0,60$

Weitergehend wurde getestet, ob eine Bindung von SCH-202676 und Ebelen in Gegenwart von DTT beobachtet werden kann. Wie durch Azad et al. 2014 beschrieben, kann DTT das als thiolreaktive Reduktionsmittel wirkt, eine Reaktion von Ebelen und SCH-202676 mit Cystein-Resten von Proteinen verhindern und dazu führen, dass keine Bindung stattfindet. Dies lässt erste Rückschlüsse zu, ob eine Cystein-vermittelte Modulation des $G\alpha_q$ -Proteins stattfindet.

Für diese Zwecke wurde 10 mM DTT, für 10 Minuten mit dem Protein vorinkubiert bevor der Radioligand und die Testsubstanzen hinzugefügt wurden.

Abb. 84 zeigt, dass unter Zugabe von 10 mM DTT die Bindung von Ebselen, und auch die von SCH-202676, komplett unterbunden werden kann. Die Zugabe von DTT führt dazu, dass weder Ebselen noch SCH-202676 binden, was sich in einer hohen spezifischen Bindung von [³H]PSB-15900 widerspiegelt. Die Bindung von FR900359 hingegen wird durch DTT nicht beeinflusst. Abb. 85 zeigt dass eine Zugabe von 10 mM DTT in dem Inkubationspuffer die Affinität von FR900359 nicht verändert. Es konnte ein IC₅₀ = 3.69 nM bestimmt werden. Entsprechend besteht ein Hinweis, dass die Bindung beider Substanzen Cystein-vermittelt ist.

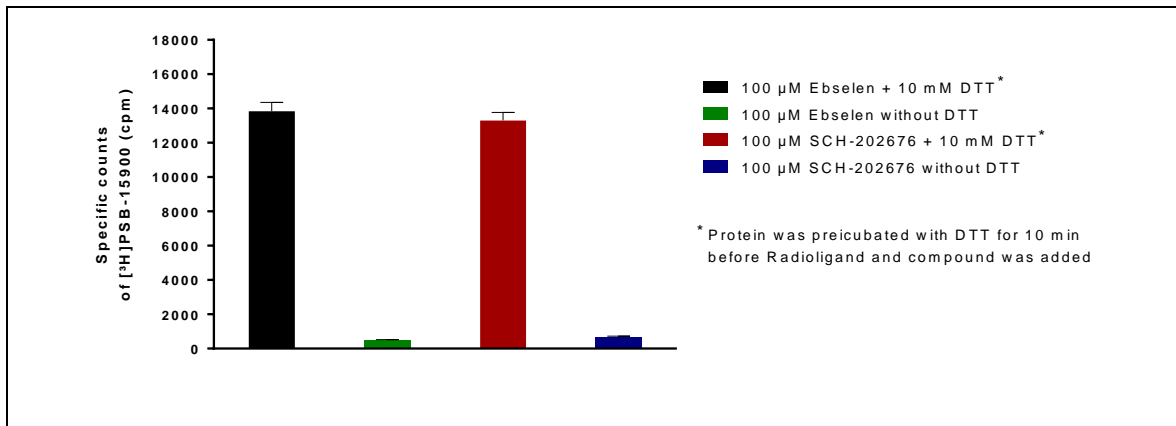


Abb. 84: Effekt von DTT auf die Bindung von Ebselen und SCH-202676 gegen [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) bei 37 °C. Protein wurde 10 min mit DTT vorinkubiert bevor Radioligand und Testsubstanz hinzugefügt wurden.

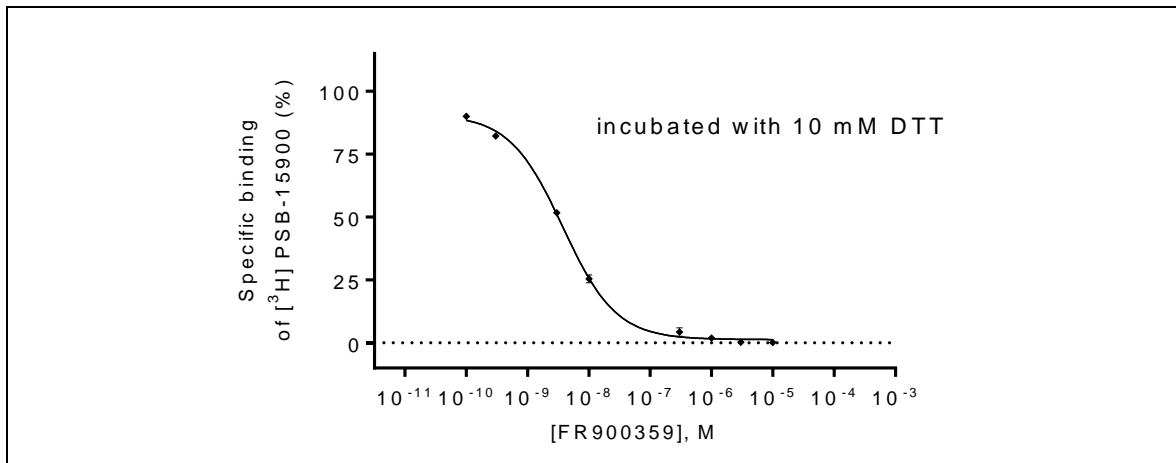


Abb. 85: Konkurrenz von FR900359 gegen 5 nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) bei 37 °C. Protein wurde 10 min mit DTT vorinkubiert bevor Radioligand und Testsubstanz hinzugefügt wurden.

Um zu untersuchen, ob die Bindung von SCH-202676 und Ebselen reversibel oder irreversibel ist, was ein weiterer Hinweis für eine Interaktion mit Cystein-Resten wäre, wurden Auswaschversuche nach Präinkubation mit humanen Thrombozyten-Membranpräparationen durchgeführt.

Hierfür wurden 50 μl Membranen von humanen Thrombozyten (50 μg Protein) mit 250 μM SCH-202676, respektive 250 μM Ebselen, versetzt und für 60 min präinkubiert. Anschließend wurde 1,0

ml Tris-HCl Puffer, pH 7,4, hinzugefügt, für 2 min gevortext und bei 15.000 *g* für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, verworfen und die Prozedur zwei weitere Male wiederholt. Des Weiteren wurden 50 µl an Membransuspension von humanen Thrombozyten (50 µg Protein), ohne Zugabe von Liganden, auf dieselbe Weise behandelt um die nicht-spezifische Bindung und die Gesamtbindung gegen [³H]PSB-15900 bestimmen zu können. Anschließend wurden Bindungsstudien gegen [³H]PSB-15900 durchgeführt. Zum direkten Vergleich der Methode wurden dieselben Bedingungen ohne den durchgeführten Waschprozess durchgeführt.

Vials enthielten 50 µl [³H]PSB-15900 in Puffer (5 nM) und 50 µl der mit Ebselen / SCH-202676 präinkubierte und gewaschenen, respektive nicht gewaschenen, Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation gestartet und unter leichtem Schütteln bei 37 °C durchgeführt. Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4, (3 ml) gespült, um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [³H]PSB-15900 wurde unter Verwendung von 10 µM FR900359 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO.

Abb. 86 zeigt, dass die Bindung von Ebselen und SCH-202676 durch den durchgeführten Waschprozess nicht aufgehoben werden kann, was für eine kovalente Bindung der getesteten Verbindungen spricht. So zeigt die gemessene Bindung von Ebselen und SCH-202676 für „gewaschen“ bzw. „nicht gewaschen“ einen vergleichbaren niedrigen Wert wie die gemessene unspezifische Bindung. Der Wert für die gemessene Gesamtbindung ist zwischen „gewaschen“ und „nicht gewaschen“ unterschiedlich. Dies ist darauf zu führen, dass Teile des Proteins beim Prozess des Abdekantierens aufgenommen und dadurch für die Bindungsstudie verloren gingen.

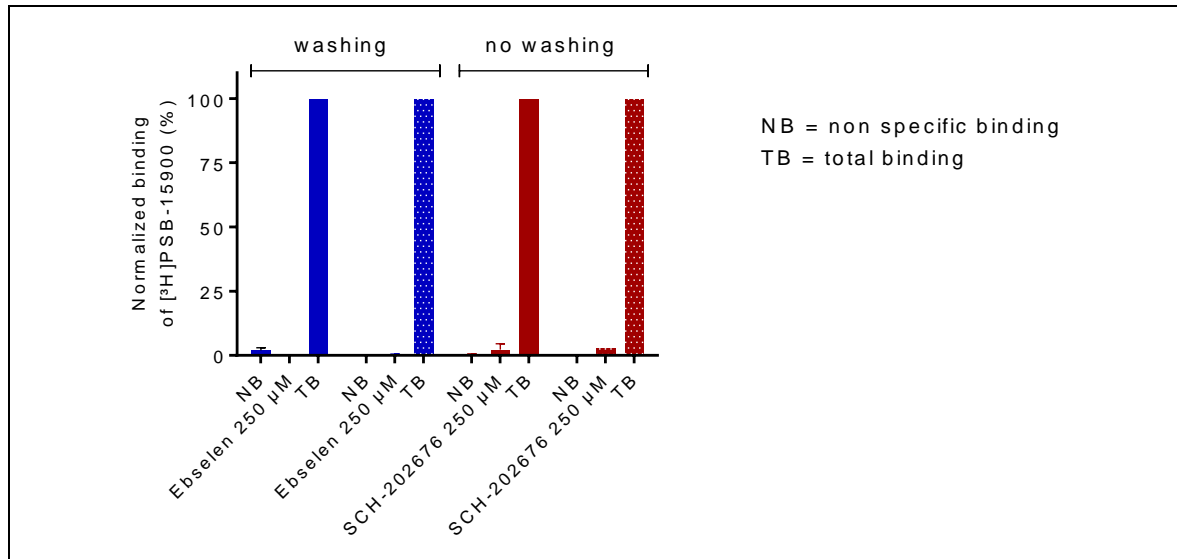
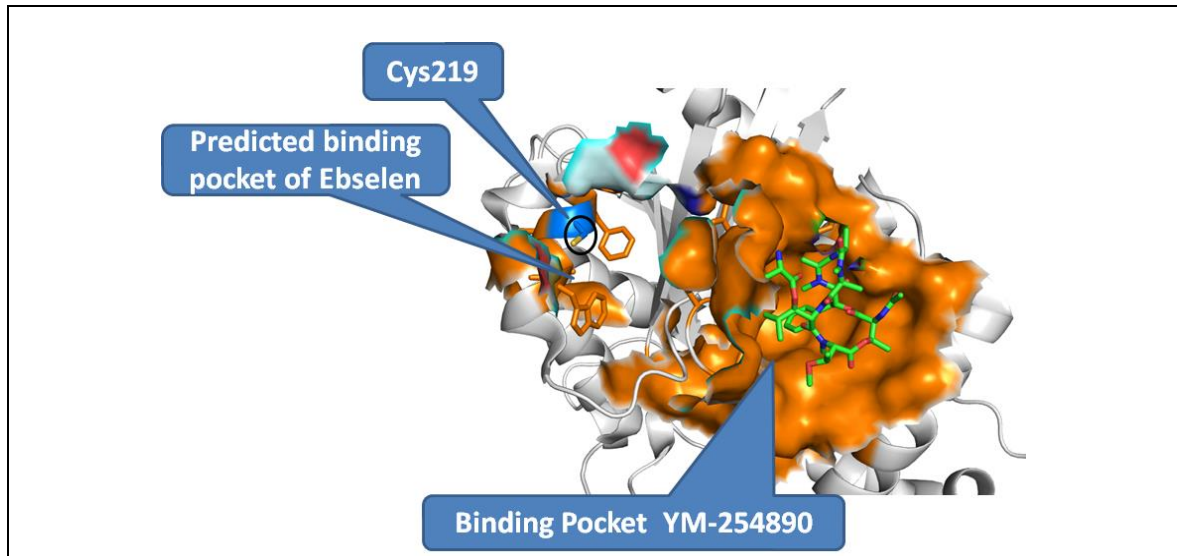
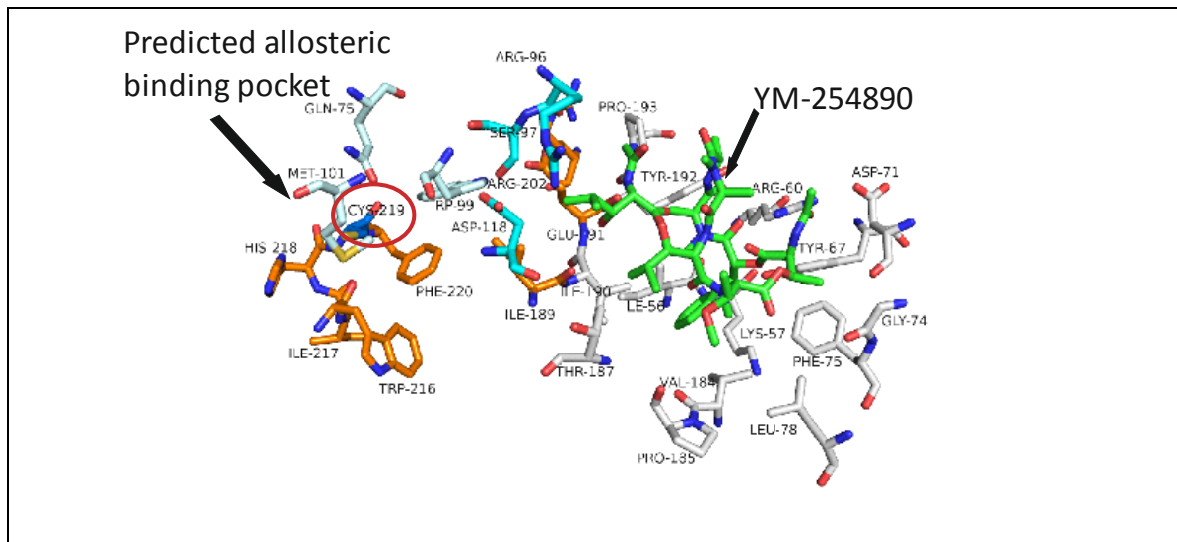
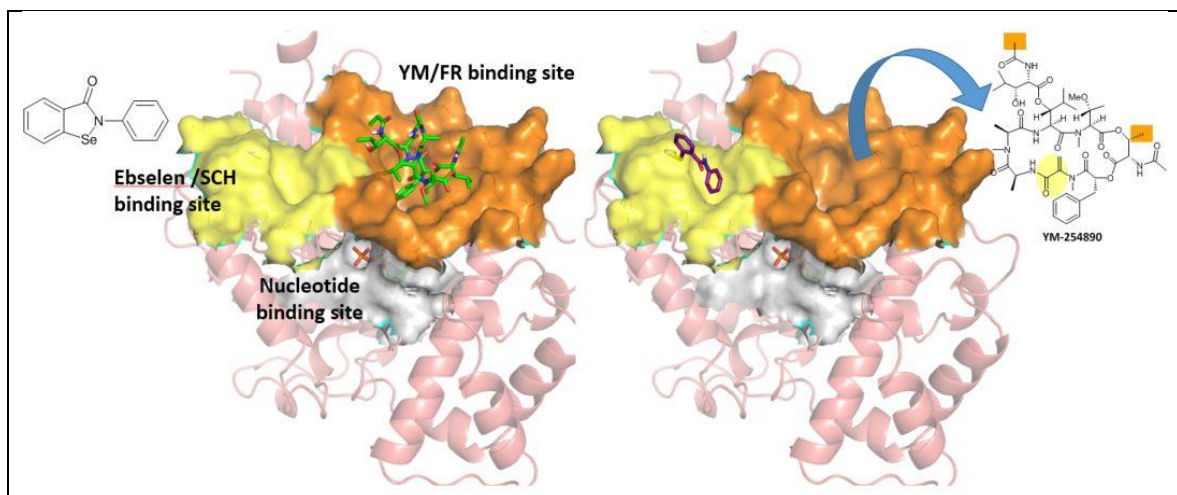


Abb. 86: Auswaschbarkeit der Bindung von SCH-202676 und Ebselen nach 60 min Präinkubation an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) mit anschließender Konkurrenz gegen 5 nM $[^3\text{H}]$ PSB-15900 bei 37 °C.

Auf Grund der Ergebnisse aus den Bindungsstudien wurde eine molekulare Erklärung für die Bindung von Ebselen und SCH-202676 gesucht. Basierend auf der Kristallstruktur von $G\alpha_q\beta\gamma$ gebunden an YM-254890 nach Nishimura et al. 2010 wurde durch Docking-Simulationen eine mögliche allosterische Bindungstasche für Ebselen und SCH-202676 berechnet.^a Diese für beide Moleküle identische Bindungstasche (Abb. 87) liegt neben der Bindungstasche von YM-254890 und verfügt über einen Cystein-Rest und einem Phenylalanin-Rest, der hydrophobe Wechselwirkungen zulässt. Ebselen und SCH-202676 könnten Berechnungen zufolge mit Cys-219 (Abb. 88) eine kovalente Bindung eingehen. Die durch Bindung von Ebselen, respektive SCH-202676, resultierende Konformationsänderung bewirkt möglicherweise ebenfalls eine Konformationsänderung der YM-254890-Bindungstasche, wodurch die Bindung von YM-254890 verhindert wird (Abb. 89). Um diese Hypothese zu überprüfen und zu verifizieren, soll zukünftig eine Mutagenese-Studie durchgeführt werden, bei der der Aminosäure-Rest Cys219 gegen Alanin ausgetauscht wird. Stimmt die Annahme, dass die berechnete Bindungstasche adressiert wird und Cys219 eine kovalente Bindung mit Ebselen eingeht, würde eine Mutation der Aminosäure zur Folge haben, dass Ebselen und SCH-202676 nicht mehr in der Lage sind, die Bindungsstelle von $[^3\text{H}]$ PSB-15900 und $[^3\text{H}]$ PSB-16254 zu modulieren und, sollten entsprechend in Bindungsstudien keine Affinität mehr zeigen.

^a Docking-Simulationen wurden durch Dr. Vigneshwaran Namasivayam, AG Müller, Universität Bonn, durchgeführt.

Abb. 87: Durch Docking-Simulationen berechnete allosterische Bindungstasche für Ebsele.^aAbb. 88: Bindungstasche von YM-254890 und allosterische Bindungstasche von Ebsele.^aAbb. 89: Beeinflussung der Bindung von YM-254890 durch allosterische Bindung von Ebsele und SCH-202676.^a^a Docking-Simulationen wurden durch Dr. Vigneshwaran Namasivayam, AG Müller, Universität Bonn, durchgeführt.

8. BINDUNGSSTUDIEN AN $G\alpha_q$ -PROTEINEN VON INSEKTEN

8.1 Einleitung

Da FR900359 ein pan- $G\alpha_q$ -Inhibitor ($G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$) ist, liegt es nahe dass auch andere Organismen außer Säugetieren mit homologen $G\alpha_q$ -Proteinen, wie zu Beispiel Insekten, durch dessen Wirkung beeinflusst werden. Dies könnte auf eine ökologische Funktion von FR900359 hinweisen.¹⁰⁶

Daher wurde untersucht, ob FR900359 auch Affinität zu $G\alpha_q$ -Proteinen von Insekten zeigt. Hierfür wurden Bindungsstudien mit [3 H]PSB-15900 an Sf9-Insektenzellmembranen (Zellen von *Spodoptera frugiperda* – fall army worm) und G_q -Proteinen von *Bombyx mori* (Seidenspinner) und *Bemisia tabaci* (Weiße Fliege) die in $G\alpha_q$ -knockout HEK-Zellen exprimiert wurden, durchgeführt.^a Bei diesen Insekten handelt es sich um Pflanzenschädlinge. Des Weiteren wurden Bindungsstudien an Drosophila S2-Zellen (Schneider Zellen) durchgeführt.

8.2 Methode

Alle Konkurrenzexperimente wurden in einem Inkubationspuffer der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, enthielt durchgeführt. Vials enthielten 5 μ l der Testverbindung in DMSO, 50 μ l [3 H]PSB-15900 (71 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und 50 μ l Membranpräparation (SF9, Tabaci, Drosophila S2 oder Mori) in einem Gesamtvolumen von 200 μ l. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Membranpräparation (100 μ g SF9-Membranpräparation, 170 μ g Mori-Protein, 200 μ g Drosophila S2 bzw. 150 μ g Tabaci-Protein) gestartet und für 90 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4, (3 ml) gespült, um gebundenen von freiem Radioliganden zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe[®] Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [3 H]PSB-15900 wurde unter Verwendung von 10 μ M FR900359 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO. Für die Bestimmung der Inhibitionskurve in den Konkurrenzexperimenten wurden 9 verschiedene Konzentrationen an FR900359 die von 0,1 nM bis 3 μ M reichten eingesetzt. Es wurden für jede Proteinquelle drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und anschließend ausgewertet.

^a Die Expression und Aufarbeitung der $G\alpha_q$ -Proteine wurde durch die AG Kostenis, Universität Bonn, durchgeführt.

8.3 Ergebnisse & Diskussion

FR900359 zeigt an SF9-Membranpräparationen einen pIC_{50} -Wert von $8,13 \pm 0,06$ nM, an Mori- G_q -Präparationen einen pIC_{50} -Wert von $8,98 \pm 0,05$ nM und an Tabaci- G_q -Präparationen einen pIC_{50} -Wert von $9,27 \pm 0,10$ nM, vgl. Abb. 90 und Tab. 30.

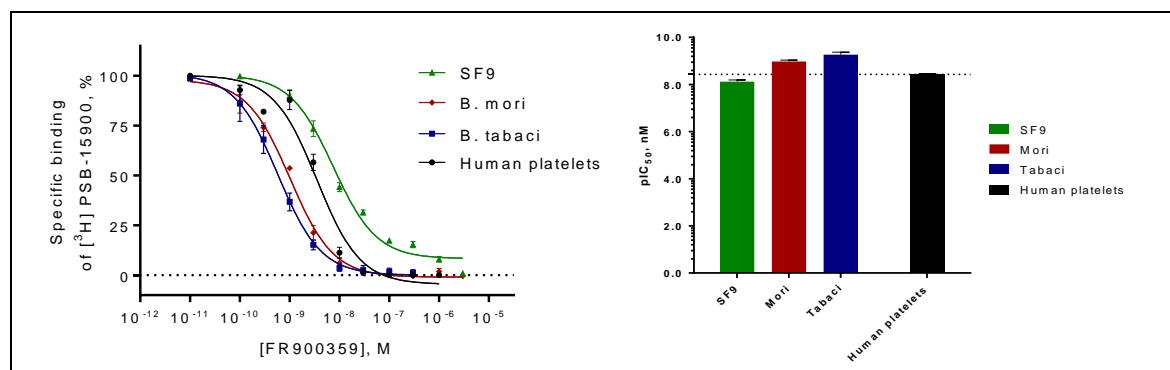


Abb. 90: Inhibitionskurven (links) und pIC_{50} -Werte (rechts) von FR900359 an verschiedenen Insekten-Proteinen und humanen Thrombozyten-Membranpräparationen gegen 5 nM $[^3H]$ PSB-15900 bei 37 °C.

Tab. 30: IC_{50} - und pIC_{50} -Werte von FR900359 an verschiedenen Insekten-Proteinen und humanen Thrombozyten-Membranpräparationen gegen 5 nM $[^3H]$ PSB-15900 bei 37 °C.

Protein	SF9	B. mori	B. tabaci	Drosophila S2	Humane Thrombozyten
$IC_{50} \pm SEM$ (nM)	7,45 \pm 0,42	1,01 \pm 0,12	0,57 \pm 0,11	Keine spezifische Bindung	3,77 \pm 0,32
$pIC_{50} \pm SEM$	8,13 \pm 0,06	8,98 \pm 0,05	9,27 \pm 0,10		8,43 \pm 0,04

FR900359 zeigt Inhibition an SF9, B. mori, B. tabaci Insektenproteinen, jedoch konnte keine spezifische Bindung an Drosophila S2 gemessen werden. Die Affinität an SF9-Membranpräparationen ist mit der an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen vergleichbar. Interessanterweise besitzt FR900359 eine höhere Affinität an Insekten- $G\alpha_q$ -Proteinen von *B. mori* und *B. tabaci* als an $G\alpha_q$ aus humaner Quelle. An $G\alpha_q$ aus Drosophila, welches kein typischer Fraßschädling ist, besitzt $[^3H]$ -PSB15900 keine Affinität. Diese Tatsache könnte ein weiterer Hinweis auf die ökologische Funktion von FR900359 als Fraßschutz sein.

9. WEITERE $G\alpha_q$ -INHIBITOREN: BIM UND GÜ VERBINDUNGEN

9.1 Einleitung

BIM-46174 (Abb. 91 links) ist ein kleines synthetisches Moleküle, das in 2006 als pan-G-Protein Inhibitoren klassifiziert wurde und in Untersuchungen, als Anti-Krebsmittel, die Proliferation von Krebszellen verringern konnte.¹⁰⁷ Hieraus stellte sich die Frage, welchem Wirkmechanismus die Beeinflussung von G-Proteine durch BIM-46174 zu Grunde liegt. In 2014 wurde berichtet, dass BIM-46174 bevorzugt die Signaltransduktion von $G\alpha_q$ inhibiert. Dies geschieht, indem BIM-46174 an $G\alpha_q$

in der empty-pocket-Konformation bindet und die Freisetzung von gebundenem GDP erlaubt. Der darauf folgende Austausch gegen GTP wird jedoch unterbunden.¹⁰⁸ Auf Grund dieser Beobachtung wurden diverse BIM-Derivate (GÜ-Verbindungen), vgl. Tab. 31, durch die AG Gütschow, Universität Bonn, synthetisiert und auf Inhibition von $G\alpha_q$ durch etablierten Radioligandbindungsassay mit [^3H]PSB-15900 untersucht.^a Die getesteten Substanzen umfassten dabei nicht nur Monomere, sondern auch Dimere, die über eine Disulfidbindung miteinander verknüpft sind, wie zum Beispiel in Abb. 91 rechts dargestellt.

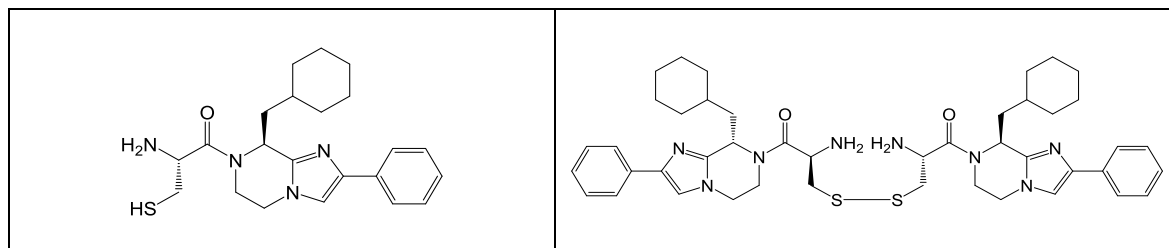


Abb. 91: BIM-46174 (Monomer) (links); BIM-46187 (Dimer) (rechts).

9.2 Methode und Ergebnisse

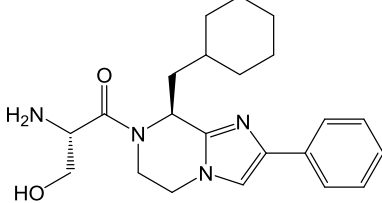
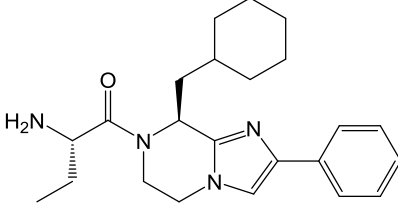
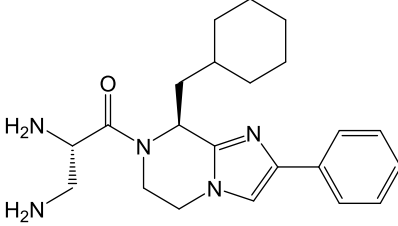
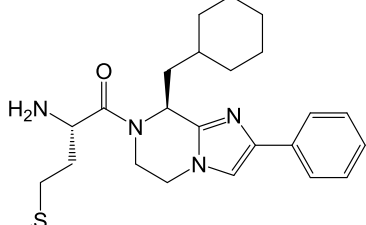
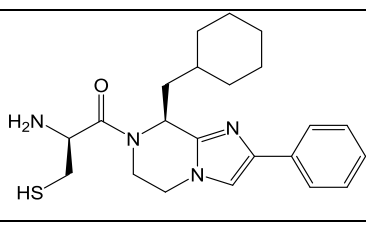
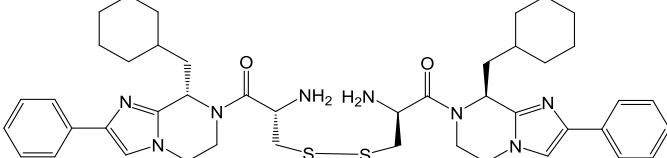
9.2.1 Kompetitionsstudien an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen

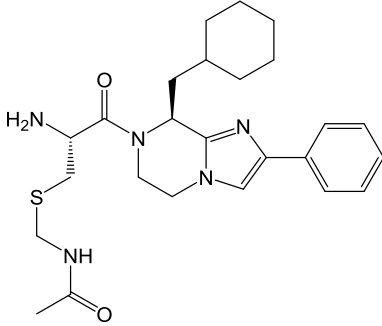
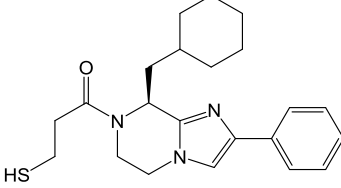
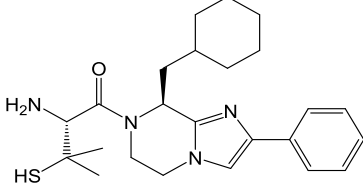
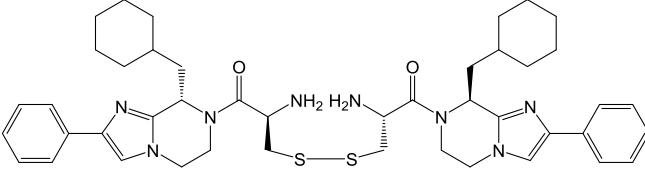
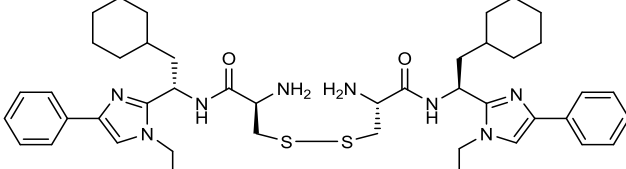
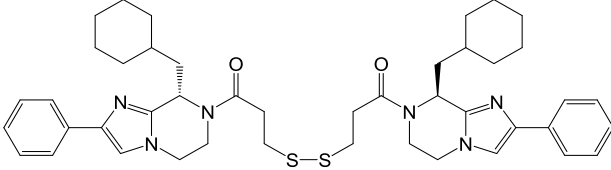
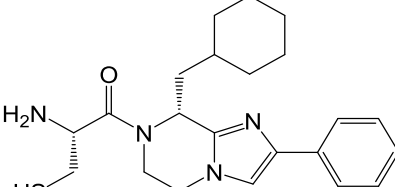
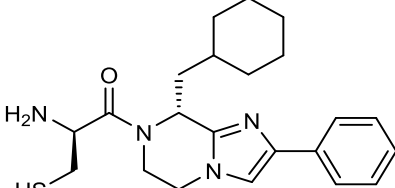
Alle Konkurrenzexperimente wurden in einem Inkubationspuffer der 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, enthielt durchgeführt. Vials enthielten 5 μl der Testverbindung in DMSO, 50 μl [^3H]PSB-15900 (71 Ci/mmol) in Puffer (5 nM) und 50 μl humane Thrombozyten-Membranpräparation (50 μg Protein) in einem Gesamtvolumen von 200 μl . Auf Grund der Tatsache, dass die BIM-Verbindungen ihre inhibitorische Wirkung auf G-Proteine nur durch eine lange Inkubationszeit zeigen¹⁰⁸, wurde eine Präinkubation mit humanen Thrombozyten-Membranpräparationen von 180 min bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Konkurrenz durch Zugabe des Radioliganden gestartet und für 90 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Inkubationsende wurde durch Vakuumfiltration über einen GF/C-Glasfaserfilter mit einem Brandel 24-Well-Harvester eingeleitet. Die Filter wurden dreimal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer 50 mM, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween 20, pH 7,4, (3 ml) gespült, um gebundenen von freiem Radioligand zu trennen. Anschließend wurden die Filter ausgestanzt und in 4 ml große Szintillationsröhrchen überführt. Luma Safe® Szintillationscocktail (2,5 ml) wurde hinzugefügt und die Proben nach 6 h für jeweils 1 min in einem Flüssig-Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die unspezifische Bindung von [^3H]PSB-15900 wurde unter Verwendung von 10 μM FR900359 in DMSO bestimmt, die Gesamtbindung durch Zugabe von DMSO. Für die Bestimmung der Inhibitionskurven in den Konkurrenzexperimenten wurden

^a Teile der Testung wurden durch Serina Bach, Universität Bonn, durchgeführt

immer 7 Konzentrationen (1 - 250 μ M) der getesteten Substanzen eingesetzt. Es wurden für jede Substanz drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Tab. 31: Strukturen der getesteten Verbindungen gegen 5nM [3 H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C.

GÜ 2908	
GÜ 2909	
GÜ 2961	
GÜ3034	
GÜ3038	
GÜ3039	

GÜ3077	
GÜ3078	
GÜ3087	
GÜ3122	
GÜ3129	
JK232	
GÜ3103	
GÜ3123	

GÜ3128	
BIM-46187	
BIM-46174	

Die Verbindungen GÜ3103, GÜ3123 und GÜ3128, welches alle Monomere sind, zeigen eine schwache Inhibition der Radioligand-Bindung, vgl. Abb. 92. Die weiteren getesteten GÜ-Monomere und GÜ-Dimere, wie auch das BIM-Monomer und der BIM-Dimer zeigten keinen Effekt.

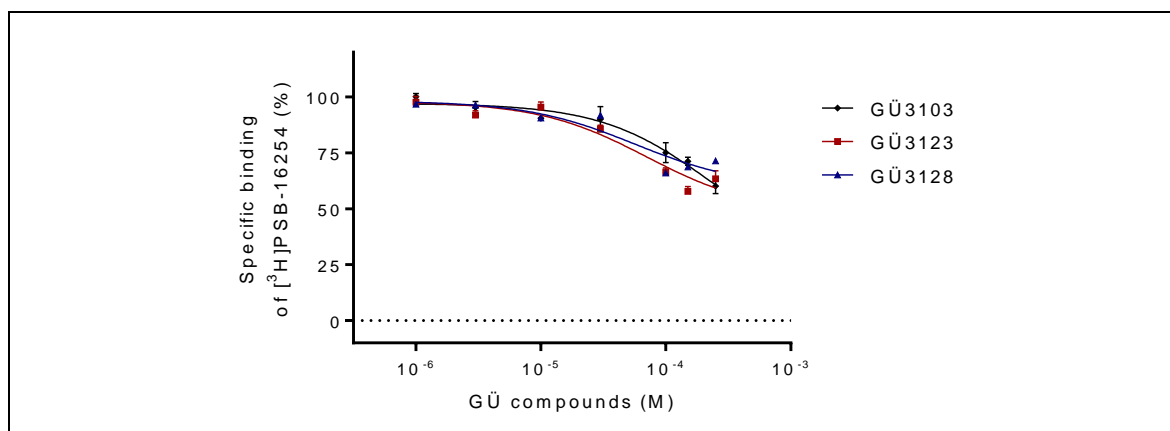


Abb. 92: Kompetitionsstudien von GÜ3103, GÜ3123 und GÜ3128 gegen 5 nM [³H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C Inkubationstemperatur.

9.2.2 Kompetitionsstudien von BIM-Monomer und Dimer gegen [³H]PSB-15900 an intakten humanen Thrombozyten

Wie mittels Kompetitionsstudien an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen wurden Kompetitionsstudien mit BIM-46174 (Monomer) und BIM-46187 (Dimer) gegen 5 nM [³H]PSB-15900 an intakten humanen Thrombozyten durchgeführt.^a Hierbei wurden die beiden Substanzen

^a Kompetitionsstudien wurden durch Dr. Aliaa Abdelrahman, Universität Bonn, durchgeführt.

ebenfalls für 180 min intakten humanen Thrombozyten ($7,1 \times 10^6$ Thrombozyten/vial) präinkubiert, bevor die Konkurrenz durch Zugabe des Radioliganden gestartet wurde. Hier konnte jedoch keine Inhibition der Verbindungen beobachtet werden (Abb. 93). Auf Grund von Löslichkeitsproblemen konnten keine Daten mit höheren Konzentration erhoben werden, wodurch kein K_i -Wert der beiden Verbindungen ermittelt werden kann.

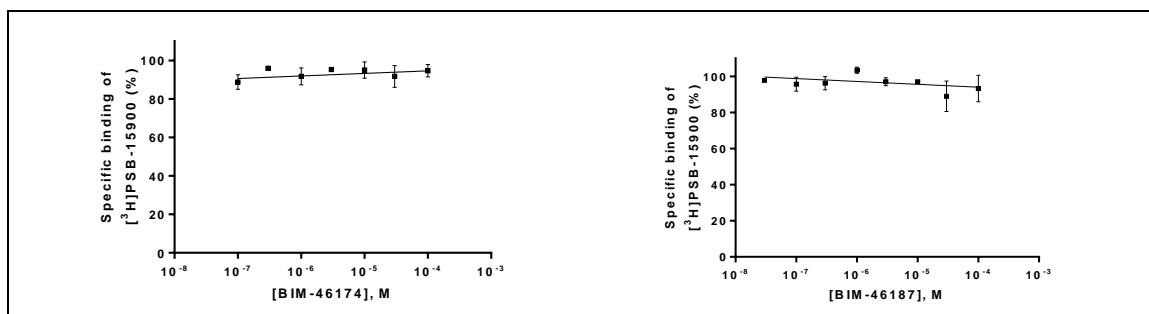


Abb. 93: Kompetitionsstudien von BIM-46174 (links) und BIM-46187 (rechts) gegen 5 nM $[^3\text{H}]$ PSB-15900 an intakten humanen Thrombozyten bei 37 °C.

9.2.3 Zusammenfassung

Die BIM-Verbindungen wurden bisher in der Literatur, die auf Daten aus funktionellen Assays basiert, als $\text{G}\alpha_q$ -Inhibitoren beschrieben. Aus den durchgeführten Versuchen kann geschlossen werden, dass BIM-46174 und BIM-46187 nicht dieselbe Bindungsstelle wie $[^3\text{H}]$ PSB-15900 besitzen, bzw. die Bindung von $[^3\text{H}]$ PSB-15900 an $\text{G}\alpha_q$ durch die beiden Verbindungen nicht unterbunden wird. GÜ3103, GÜ3123 und GÜ3128 zeigen eine moderate Inhibition. Eine Aussage über den genauen Wirkmechanismus der Verbindungen kann derzeit noch nicht gegeben werden.

10. IN VIVO STUDIEN MIT FR900359 AN MÄUSEN – QUANTIFIZIERUNG VON FR900359 IN GEWEBEN

10.1 Einleitung

Im Rahmen eines weiteren Teilprojektes sollten empfindliche analytische Methoden entwickelt werden, um FR900359 zu quantifizieren. Die Methode sollte in Kooperation mit der AG Wenzel / Fleischmann auf biologische Proben angewendet werden.

10.2 Etablierung einer hochsensiblen Quantifizierungsmethode mittels LC/MS

10.2.1 Einleitung

Für pharmakokinetische Studien sind empfindliche quantitative Messungen von Wirkstoffkonzentrationen unerlässlich. FR900359 stellt dabei eine besondere Herausforderung dar, da als Anforderung nicht nur die akkurate qualitative Bestimmung mittels Massenspektrometrie,

sondern auch eine gleichzeitige genaue Quantifizierung mit einer niedrigen Nachweisgrenze (LOD) gefordert ist. Die Methode sollte in der Lage sein, kleinste Mengen an FR900359, die entweder in biologischen Proben vorliegen oder aus biologischen Proben gewonnen wurden, zuverlässig analysieren und quantifizieren zu können. Die Analytische Methode wurde auf YM-254890 übertragen.

Mit diesen Vorgaben wurde eine LCMS-Methode etabliert, mit der nanomolare FR900359-Spiegel in biologischen Proben bestimmt werden können.

10.2.2 Methode

Die chromatographische Trennung von FR900359 und YM-254890 wurde mittels einer HPLC - Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), gekoppelt mit integriertem Detektor für variable Wellenlängen und anschließender Massenbestimmung durch ein Massenspektrometer micrOTOF-Q (Bruker, MA, USA) mit ESI-Quelle, durchgeführt.

Die verwendete Säule ist eine EC50/2 Nucleodur C18 Gravity 3 μm (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland). Stickstoff wurde von einem Hochreinheitsgenerator Parker G4600E (Parker Hannifin Manufacturing Ltd., Gateshead, UK) generiert und als Quellengas verwendet.

Die Probenlösung (5 μl) wurde mit einem Fluss von 0,3 ml/min injiziert. Das Ausgangslösungsmittel bestand aus einem 40% Methanol/Wassergemisch, das 2 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure enthielt.

Der Gradient begann nach 1 min, wobei nach 9 min 100% Methanol, 2 mM Ammoniumacetat und 0,1% Ameisensäure erreicht wurden. Im Anschluss wurde die Säule weitere 5 min mit demselben Lösungsmittel gespült. Zur Bestimmung der Masse wurde ein Positive-Fullscan-MS von 200 bis 1500 m/z durchgeführt. Das EIC (Extraktions-Ionen-Chromatogramm) von $1002,537 \pm 0,05$ m/z wurde zur Identifizierung und Quantifizierung von FR900359 respektive $960,4958 \pm 0,01$ m/z für YM-254890 unter Anwendung des QuantAnalysis-Programms (Bruker, MA, USA) verwendet.

10.2.3 Präzision und Genauigkeit der Methode

Alle Messungen wurden nach Vorgaben und Bestimmungen der US-FDA-Leitlinie - Bioanalytical Method Validation (2001) - durchgeführt, die durch inter- und intra-day-measurements (jeweils drei Messungen an drei verschiedenen Tagen) gewährleistet wurde. Die Ergebnisse der Präzision (Precision), Genauigkeit (Accuracy), der Nachweisgrenze (LOD), der Quantifizierungsgrenze (LOQ) und der Linearität der Kalibrierung von FR900359 und YM-254890 wurden bestimmt, indem Messwerte aus acht verschiedenen Konzentrationen von FR900359 bzw. YM-254890 analysiert wurden (FR900359 0-20 nM; YM-254890 0-10 nM). Des Weiteren wurden für einen größeren

Konzentrationsbereich von 1 bis 1500 nM Kalibriergeraden separat vermessen. Alle Ergebnisse der getesteten Proben lagen innerhalb der akzeptierten Grenzen (RE%: ± 15 ; RSD%: ± 15).

Unter Berücksichtigung eines Konzentrationsbereiches des Analyten von 0,5 bis 10 bzw. 20 nM wurde eine Linearität von $\geq 0,99$ mit einer Genauigkeit von $\leq 4\%$ (Abb. 95) und einer Präzision $\leq \pm 15$ RSD% sowohl für FR900359 als auch für YM-254890 erreicht. Die Nachweisgrenze (LOD) betrug für FR900359 und YM-254890 unter 1 nM, bei einer gleichzeitigen Quantifizierungsgrenze (LOQ) von 1 nM. Die korrespondierenden Kalibriergeraden sind in Abb. 94 dargestellt. Für den Konzentrationsbereich von 1 – 1500 nM wurde ebenfalls eine Linearität von $\geq 0,99$ erreicht.

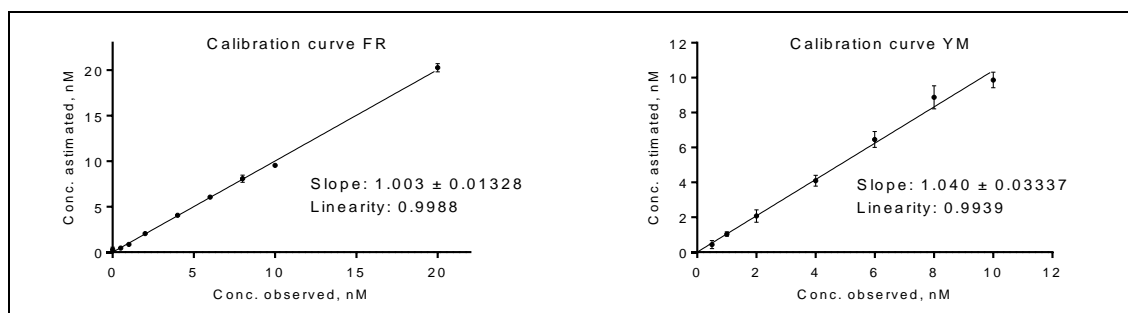


Abb. 94: Kalibriergerade von FR900359 (links) und YM-254890 (rechts) in Methanol im Konzentrationsbereich von 0,5 – 20 nM für FR900359 und YM-254890 0,5 - 10 nM.

Diese hochsensible und genaue Methode zeigt, dass FR900359 in kleinsten Mengen mit zuverlässiger Präzision und Genauigkeit nachgewiesen werden kann, und sollte so eine gute Quantifizierung von FR900359 in biologischen Proben ermöglichen (Abb. 95).

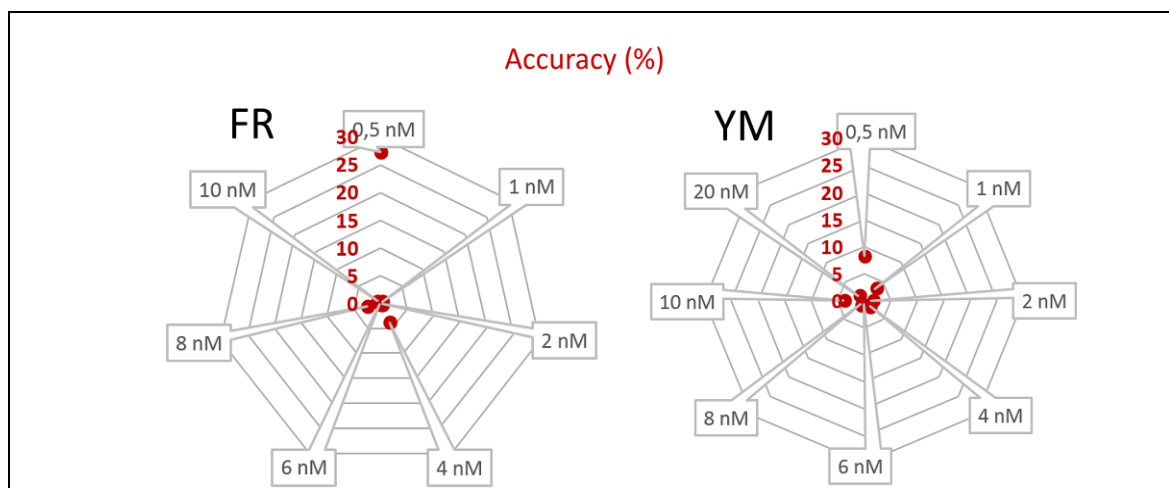


Abb. 95: Genauigkeit der etablierten LCMS-Methode für verschiedene Konzentrationen von FR900359 (links) und YM-254890 (rechts).

10.3 Stabilität von FR900359 unter verschiedenen physiologischen und nichtphysiologischen Bedingungen

10.3.1 Einleitung

Die Stabilität eines potentiellen Arzneistoffes unter physiologischen Bedingungen bzw. in einzelnen Kompartimenten, die für die Metabolisierung im Körper verantwortlich sind, ist eine wichtige Eigenschaft die darüber entscheiden kann, ob sich dieser für eine zukünftige Anwendung am Patienten eignet. So kann der potentielle Arzneistoff bei oraler Gabe durch den sehr stark sauren Magensaft zerstört werden, durch den basischen pH-Wert im Dünndarm ebenfalls verändert bzw. zerstört werden, oder durch Biotransformation in Phase I und II durch Leber-Enzyme metabolisiert werden.^{109; 110} Dies kann dazu führen, dass eine gewünschte Wirkung ausbleibt, da der Arzneistoff nicht mehr in genügendem Maße zur Verfügung steht, oder der entstandene Metabolit keine Wirksamkeit zeigt. Im schlimmsten Fall kann ein aktiver Metabolit sogar lebertoxische oder letale Folgen haben.¹¹¹

Aus diesen Gründen wurde die Stabilität von FR900359 bei 37 °C unter verschiedenen pH-Werten (1,2 (künstlicher Magensaft), 9 und 11), die entweder physiologische oder extreme pH-Bedingungen widerspiegeln sollten, unter Inkubation mit Lebermikrosomen, die die metabolische Stabilität zeigen sollten, unter Plasma, das die Plasma-Eiweißbindung berücksichtigt, und unter Inkubation mit Lungengewebe, welches das Organ darstellt, an dem FR900359 als Wirkstoff vorzugsweise appliziert werden soll, getestet.

10.3.2 Methode

Um die verschiedenen Systeme darzustellen in denen die Stabilität von FR900359 zu untersuchen, wurden nachstehende Lösungen hergestellt und unter bestehenden Bedingungen inkubiert und vermessen:

1. Wässrige Lösungen pH 11:

H₂O + 0.001 N NaOH (auf pH = 11,0)

450 µl der Lösung (pH = 11) wurden mit 50 µl FR900359 (1 mM) versetzt. Anschließend wurde bei 37 °C inkubiert.

Es wurden 4 Proben je 100 µl nach 0, 15, 30, 60, 120 Minuten gezogen und mit eiskaltem Acetonitril 1:1 versetzt, gevortext und 3 min abzentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden in ein Vial für die Messung übertragen. Endkonzentration der Probe FR900359 = 50 µM. Jede Probe wurde mit einem Volumen von 5 µl in die HPLC injiziert und mit der etablierten Quantifizierungsmethode für FR900359 vermessen.

2. Wässrige Lösung pH 9:

H₂O + 0.001 N NaOH (auf pH = 9,0)

450 µl der Lösung (pH = 9) wurden mit 50 µl FR900359 (1 mM) versetzt. Anschließend wurde bei 37 °C inkubiert.

Es wurden 4 Proben zu je 100 µl nach 0, 15, 30, 60, 120 Minuten gezogen und mit eiskalten Acetonitril 1:1 versetzt, gevortext und 3 min abzentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden in ein Vial für die Messung übertragen. Endkonzentration der Probe FR900359 = 50 µM. Jede Probe wurde mit einem Volumen von 5 µl in die HPLC injiziert und mit der etablierten Quantifizierungsmethode für FR900359 vermessen.

3. Lebermikrosomen (Ratte):

50 µl der präparierten Lebermikrosomen (Ratte) wurden mit 400 µL NADPH-Puffer und 50 µl FR900359 (1 mM) versetzt. Anschließend wurde bei 37 °C inkubiert.

NADPH regenerierendes System (de Graaf et al.) 2 ml Ansatz:

NADP (M = 744,41): 0,57 mM - 0,89 mg

NADH (M = 709,5): 0,57 mM - 0,80 mg

Isocitrat (M = 258,07): 6,4 mM - 3,3 mg

Isocitrat Dehydrogenase: 0,57 mM - 12,79 µl

MgCl₂ (M = 95,211): 23,4 mM - 4,44 mg

Anschließend auf pH 7,2 eingestellt

Es wurden 6 Proben zu je 80 µl nach 0, 15, 30, 60, 120, 240 Minuten gezogen und mit eiskalten Acetonitril 1:1 versetzt, gevortext und 3 min abzentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden in ein Vial für die Messung übertragen. Endkonzentration der Probe FR900359 = 50 µM. Jede Probe wurde mit einem Volumen von 5 µl in die HPLC injiziert und mit der etablierten Quantifizierungsmethode für FR900359 vermessen.

4. Lungengewebe (Maus):

Das vorhandene Lungengewebe (Maus) wurde mit einem Nassgewicht von 311,6 mg eingewogen. Anschließend wurde das Lungengewebe mit 1,0 ml HEPES Puffer pH 7,4 versetzt und mit dem Ultra-Turrax 30 s unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein Eppendorf-tube überführt.

HEPES Puffer:

HEPES 11,915g (238,3 g/mol) 50 mM

NaOH 1,0g (40 g/mol)

NaCl 9,0g (58,44 g/mol) 154 mM

ad 1000,0 ml H₂O (Millipore)

pH = 7,4

450 µl des Lungenhomogenisates wurden mit 50 µl FR900359 (1 mM) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Es wurden 6 Proben zu je 80 µl nach 0, 15, 30, 60, 120, 240 Minuten gezogen und mit eiskaltem Acetonitril 1:1 versetzt, gevortext und 3 min abzentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden in ein Vial für die Messung übertragen. Endkonzentration der Probe FR900359 = 50 µM. Jede Probe wurde mit einem Volumen von 5 µl in die HPLC injiziert und mit der etablierten Quantifizierungsmethode für FR900359 vermessen.

5. Künstlicher Magensaft pH 1,2:

450 µl des künstlichen Magensafts wurden mit 50 µl FR900359 (1 mM) versetzt. Anschließend wurde bei 37 °C inkubiert.

Künstlicher Magensaft nach Ph.Eur. 7.2:

0,32 g Pepsin vom Schwein 35.000 i.E.

0,2 g NaCl

8 ml HCl (1 mol/l)

Ad 100,0 ml Aqua dem pH = 1,2

Es wurden 4 Proben je 100 µl nach 0, 15, 30, 60, 120 Minuten gezogen und mit eiskaltem Acetonitril 1:1 versetzt, gevortext und 3 min abzentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden in ein Vial für die Messung übertragen. Endkonzentration der Probe FR900359 = 50 µM. Jede Probe wurde mit einem Volumen von 5 µl in die HPLC injiziert und mit der etablierten Quantifizierungsmethode für FR900359 vermessen.

6. Plasma (Maus):

90 µl des vorhandenen Plasmas wurden mit 10 µl FR900359 (1 mM) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Es wurden 6 Proben je 10 µl nach 0, 15, 30, 60, 120, 240 Minuten gezogen und mit eiskaltem Acetonitril 1:1 versetzt, gevortext und 3 min abzentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden in ein Vial für die Messung übertragen. Endkonzentration der Probe FR900359 = 10 µM. Jede Probe wurde mit einem Volumen von 5 µl in die HPLC injiziert und mit der etablierten Quantifizierungsmethode für FR900359 vermessen.

10.3.3 Ergebnisse und Diskussion

FR900359 zeigte unter allen physiologischen Bedingungen eine hohe Stabilität, vgl. Abb. 96. So war FR900359 bei pH 9 und selbst unter sehr sauren Bedingungen (künstlicher Magensaft, pH 1,2) über die komplette Messzeit von 5 h hinweg stabil. Auch in Lungengewebe und Plasma sinkt der Wert an gemessenen FR900359 nicht unter 95 % der Ausgangskonzentration. Bei der Inkubation mit Lebermikrosomen zeigt FR900359 einen linearen Abbau auf 70 % der Ausgangskonzentration über einen Zeitraum von 240 min. Zu beobachten ist, dass FR900359 sehr instabil bei einem pH von 11 ist und der Gehalt über 240 min auf 25 % des Ausgangswertes sinkt. Interessant ist zu beobachten, dass wenn es zu einer Instabilität von FR900359 kommt, ein Isomer mit gleicher Masse linear gebildet wird, das durch seine unterschiedliche Retentionszeit zu FR900359 im Chromatogramm identifiziert werden kann. Dieses Phänomen konnte nicht in Lebermikrosomen beobachtet werden und betrug generell nur 5 % der Ausgangskonzentration bei pH 11 und 7 % bei der Inkubation mit Plasma. Unter allen anderen gewählten Bedingungen lag der Wert bei unter 2 % der Ausgangskonzentration.

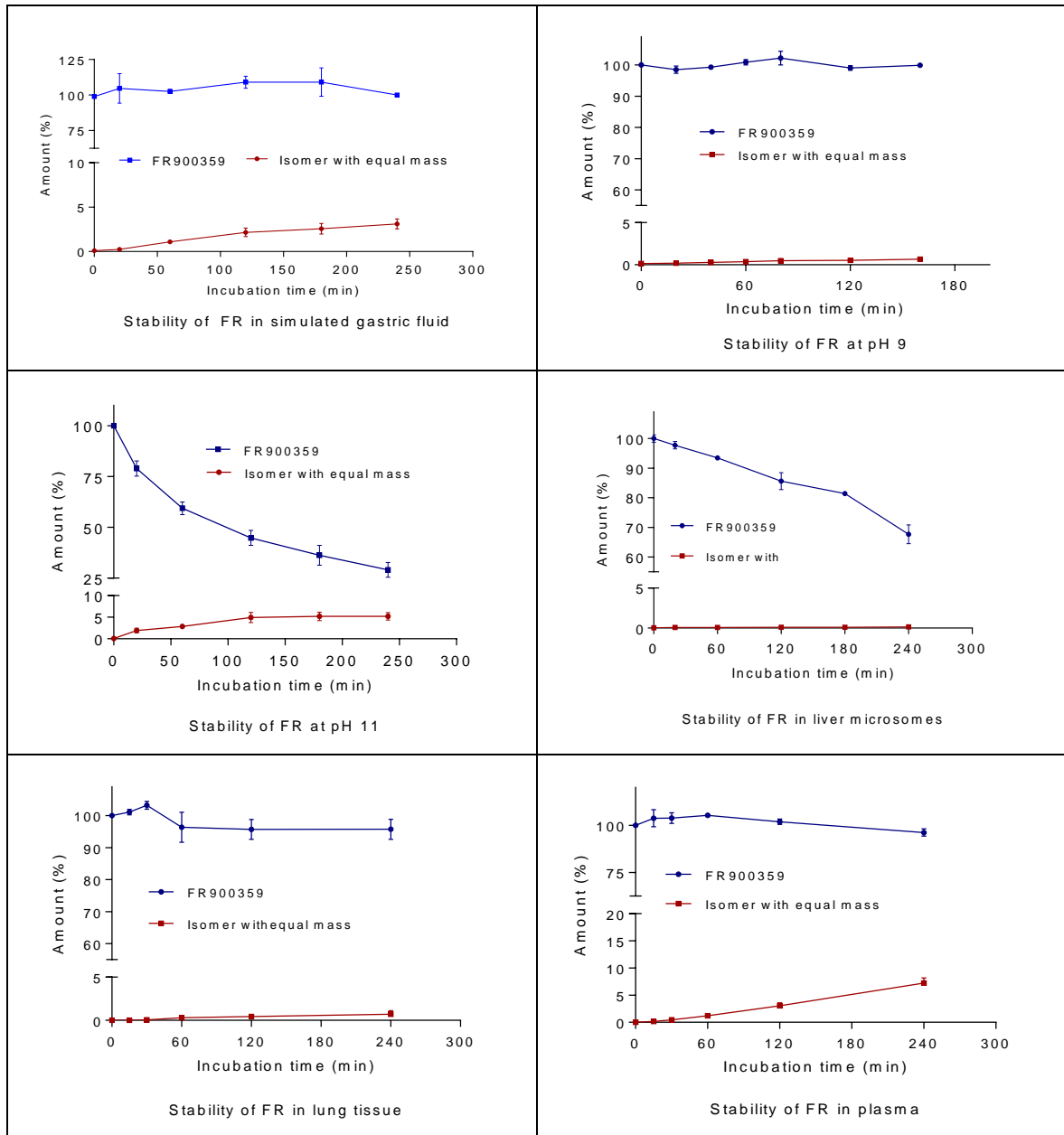


Abb. 96: Stabilität von FR900359 unter verschiedenen Bedingungen. FR900359 in Blau, Isomerisierungsprodukt in Rot dargestellt.

Da ein pH von 11 nicht physiologisch relevant ist, handelt es sich bei FR900359 unter physiologischen Bedingungen um ein sehr stabiles Molekül.

10.3.4 Ergänzungen zur Stabilität von FR900359

Die Firma Pharmacelsus, Saarbrücken, Deutschland, bietet kommerziell an, Arzneistoff-Metabolisierung und Pharmakokinetik (DMPK) Daten für Arzneistoffe an Hand etablierter Methoden zu bestimmen. FR900359 wurde an Pharmacelsus geschickt, um weitere Daten zur Stabilität zu gewinnen. So wurden an FR900359 die hepatische intrinsische Clearance (Cl_{int}), ein Caco-2-Permeabilitäts-Test und die Inhibition von Cytochrom P450-Enzymen der Leber getestet.

Die hepatische intrinsische Clearance beschreibt die maximale Fähigkeit der Leber, den freien Arzneistoff durch Metabolisierung irreversibel aus dem Blut zu eliminieren. Diese ist unabhängig von dem Leberblutfluss, und von der Proteinbindung des Arzneistoffes und gibt an, ob ein Arzneistoff in der Leber eventuell akkumuliert.¹¹²

Cytochrom P450-Enzyme sind eine Gruppe von Hämproteinen die vorwiegend in der Leber lokalisiert sind und einen wichtigen Beitrag dazu leisten, wasserunlösliche Stoffe durch Oxidation zu verstoffwechseln (Biotransformation). Es existieren über 50 Subtypen, wobei die wichtigsten Subtypen für die Biotransformation von Arzneistoffen, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 sind. CYP-Substrate können Arzneimittel-Wechselwirkungen mit Inhibitoren oder Induktoren hervorrufen und schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen.¹¹³

Der Caco-2 Permeabilitäts-Test wird zur Vorhersage der *in-vivo*-Absorption von Wirkstoffen durch die Dünndarm-Wand verwendet. Dies geschieht indem die Transportgeschwindigkeit einer Verbindung über die Caco-2-Zelllinie gemessen wird. Caco-2-Zellen stammen ursprünglich von einem humanen Kolonkarzinom ab und haben Eigenschaften die auch Darmepithelzellen besitzen, wie Tight-junctions, p-GP Transporter, Proteine und Enterozyten. Die Beurteilung des Transports des Wirkstoffes in beiden Richtungen (apikal zu basolateral (A-B) und basolateral zu apikal (B-A)) über die Zellmonoschicht ermöglicht die Bestimmung eines Efflux-Verhältnisses. Dies liefert einen Indikator, ob eine Verbindung einem aktiven Efflux unterliegt. Unterliegt der Arzneistoff einem hohen Efflux ist er nur sehr schlecht bioverfügbar.¹¹⁴

FR900359 besitzt nach Ergebnissen von Pharmacelsus eine hepatisch-intrinsische-Clearance von 171 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein und wird mit einer Halbwertszeit von 8,1 min schnell von humanen Lebermikrosomen abgebaut (Abb. 97). Im Vergleich zu Lebermikrosomen von Ratten (vgl. Abb. 96), bei denen eine Halbwertszeit von 415 min bestimmt wurde, wird FR900359 in humanen Lebermikrosomen wesentlich schneller abgebaut. Die Plasma-Protein-Bindung ist mit 35 % niedrig, was bedeutet, dass ein hoher Anteil der Fraktion frei vorliegt. Des Weiteren wurde die Löslichkeit von FR900359 in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung mit 1 % DMSO auf 189 μM bestimmt. Dies bedeutet eine relativ hohe Wasserlöslichkeit. Der Caco-2-Test zeigt, dass eine niedrige perorale Bioverfügbarkeit zu erwarten ist, vgl. Tab. 32. In Bezug auf die CYP450-Enzym-Inhibition zeigt FR900359 keine signifikante Inhibition an den für Arzneistoffe relevanten CYP-Enzymen, vgl. Abb. 98.

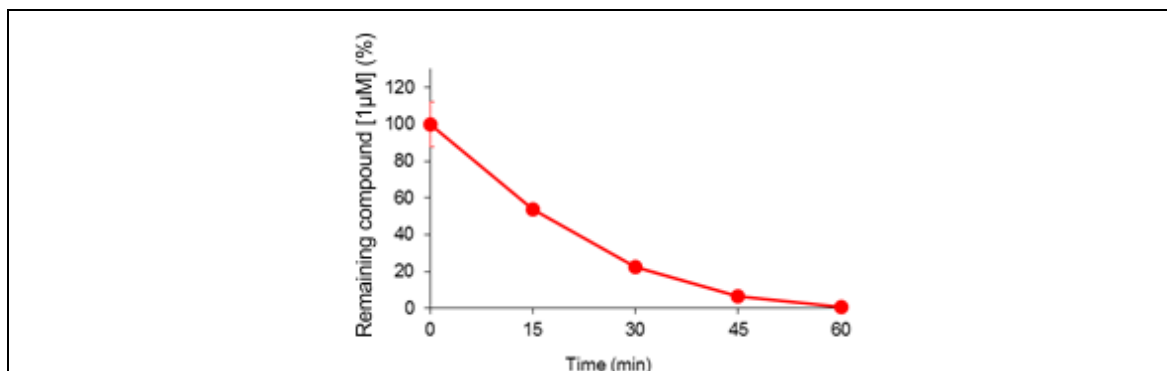


Abb. 97: Metabolisierung von FR900359 durch humane Lebermikrosomen.^a

Tab. 32: Caco-2-Permeabilität von FR900359 und anderen Arzneistoffen zum Vergleich.

Substanz	Flussrichtung	Papp [cm/sec]	Papp *10 ⁻⁶ [cm/sec]	Bioverfügbarkeit
Atenolol	A-B	6,64E-07	0,7	niedrig
Testosteron	A-B	8,54E-06	8,5	hoch
FR900359	A-B	3,95E-07	0,4	niedrig

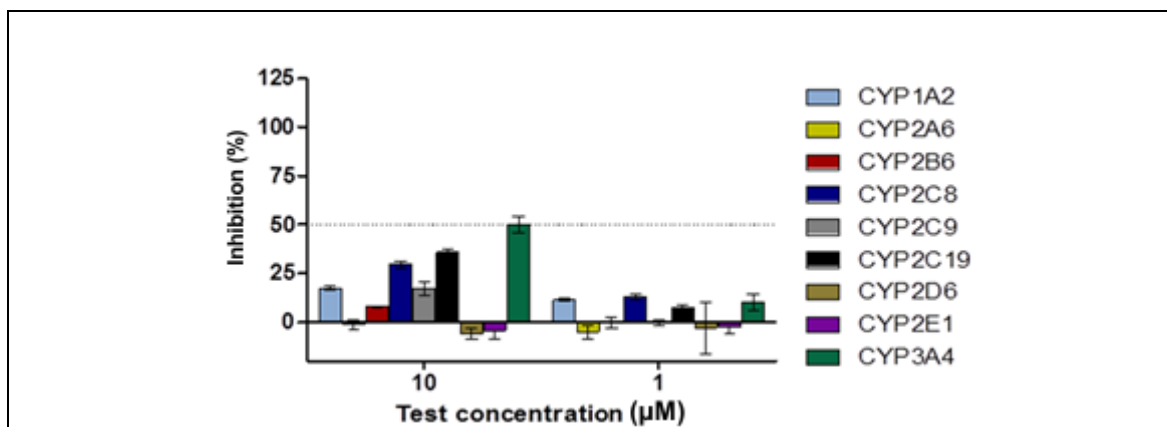


Abb. 98: Inhibition von CYP450 Enzymen durch FR900359.^a

Die erhobenen Daten ergänzen das Bild von FR900359 in Bezug auf die Pharmakokinetik und die Metabolisierung sehr gut und zeigen, dass sich FR900359 mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht sehr gut peroral resorbiert wird.

10.4 Extraktion von FR900359 aus nativem Gewebe und Plasma

10.4.1 Einleitung

Für die aus *in vivo*-Studien der AG Wenzel, Fleischmann, Universität Bonn erhaltenen Organe von Mäusen sollte eine geeignete Extraktionsmethode entwickelt werden. Diese soll es ermöglichen FR900359 quantitativ in Geweben und Plasma nachzuweisen. Es besteht die Herausforderung,

^a Versuche durch Pharmacelsus, Saarbrücken, durchgeführt

kleinste Mengen an FR900359, die sich durch inhalative Aufnahme und anschließender Distribution im Körper und den Organen der Maus ansammeln, in einem ausreichendem Maß quantitativ zu extrahiert um anschließend den Gehalt mittels der etablierten FR-LCMS-Methode zu bestimmen. Die Ergebnisse sollen Aufschlüsse über die Verteilung von FR900359 im Körper geben und zeigen, ob FR900359 lokal in der Lunge verbleibt, oder eine Verteilung auch zu anderen Organen stattfindet.

Um FR900359 quantitativ aus Gewebe und Plasma zu extrahieren, wurde eine erschöpfende Flüssig-flüssig-Extraktionsmethode mit anschließender Aufkonzentrierung der Proben etabliert, vgl. Abb. 99. Dies beinhaltete, dass für jedes zu untersuchende Organ eine Wiederfindungsrate bestimmt werden musste. Eine Wiederfindungsrate ist gewebespezifisch und gibt an, wie effizient der Extraktionsprozess stattgefunden hat und dient als Korrekturfaktor der durch die LCMS bestimmten Konzentrationen von FR900359 aus den einzelnen Proben.

10.4.2 Methode & Bestimmung der Wiederfindungsraten

Die Extraktionsmethode wurde für die Extraktion von FR900359 aus den Organen Auge, Niere, Lunge, Herz, Leber, Gehirn, Darm, Magen, sowie weißes und braunes Fettgewebe und Plasma von Mäusen etabliert und optimiert. Nach erfolgreicher Etablierung wurde für jedes Organ eine spezifische Wiederfindungsrate ermittelt.

Dabei wurden für die Etablierung und Ermittlung der Wiederfindungsraten definierte Mengen an Gewebe bzw. Plasma mit einer definierten Menge an FR900359 versetzt, inkubiert, extrahiert und der Gehalt mittels etablierter FR-LCMS-Methode quantifiziert.

Extraktionsprotokoll von Geweben - Wiederfindungsrate:

1. Alle einzelnen Organproben hatten ein Gewicht von ca. 250 mg je Stück.
2. Die Organproben wurden mit 1,0 ml einer 100 nM FR900359 Stammlösung (FR gelöst in FR-HPLC-Puffer (0.1% HCOOH , 2mM NH_4OAc)) versetzt, im TissuLyser LT (Qiagen, Venlo, NL) für 15 min, 50 Hübe/s homogenisiert, anschließend bei 15000 g für 15 min abzentrifugiert, der Überstand abdekantiert und gesammelt. Weitere zweimal wurde das Organpellet mit je 1,0 ml 100 % Methanol versetzt und wie im vorigen Schritt extrahiert. Als letzter Schritt wurde das gesammelte Extraktionsfluid für 45 min 15000 g abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert.
3. Das abzentrifugierte gesammelte Extraktionsfluid wurde anschließend in einer SpeedVac (Thermo Scientific) bei 0 bar und 40 °C bis zur Trockenheit eingengt, in 100 μl MeOH

aufgenommen, für 3 min gevortext, 5 min bei 15000 *g* abzentrifugiert und der Überstand in die Messvials überführt und mittels etablierter FR-LCMS-Methode vermessen. Erwartete Wiederfindungsrate: 100 % = 1000 nM

Extraktionsprotokoll von Plasma - Wiederfindungsrate:

1. Die 100 µl der Plasma-Proben wurden mit einer 1,0 ml einer 100 nM FR Lösung (FR gelöst in einem Puffer bestehend aus 2 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure in 100 % Methanol) versetzt.
2. Anschließend 20 min bei 15000 *g* bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert.
3. Der Überstand wurde anschließend in einer SpeedVac bei 0 bar und 40 °C bis zur Trockenheit eingengt, in 100 µl Methanol aufgenommen, für 3 min gevortext, 5 min bei 15000 *g* abzentrifugiert und der Überstand in die Messvials überführt . Erwartete Wiederfindungsrate: 100 % = 1000 nM

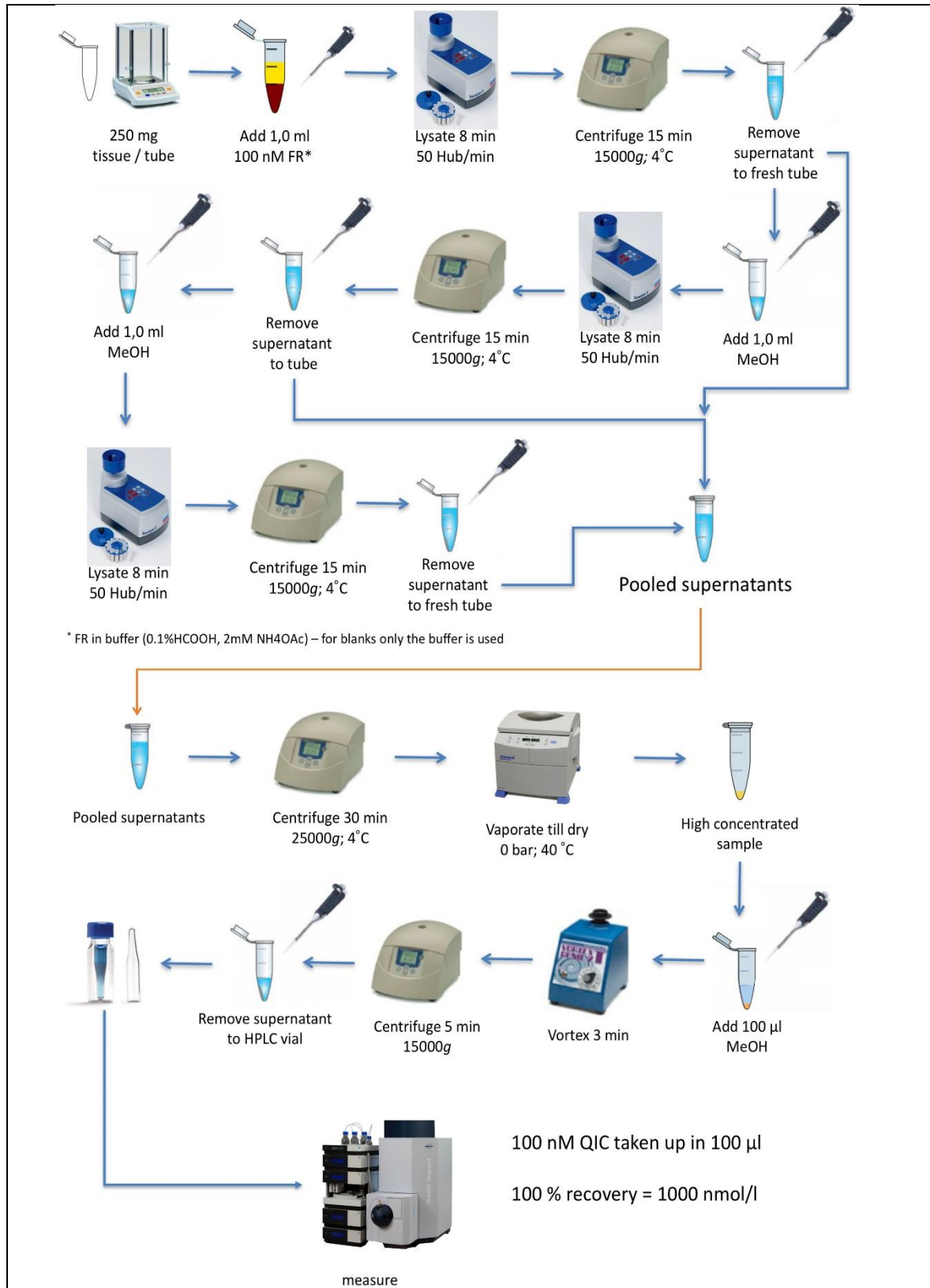


Abb. 99: Bestimmung der Wiederfindungsrate einer Flüssig-flüssig-Extraktion von FR900359 aus nativen Geweben mit anschließender Aufkonzentrierung.

Wie aus Tab. 33 und Abb. 100 zu erkennen ist, liegen die Wiederfindungsraten in allen Geweben und im Plasma bei ca. 50 %. Die Abweichungen innerhalb der biologischen Proben sind gering und zeigen, dass die Extraktionen in Bezug auf den wiedergefundenen Gehalt reproduzierbar sind. Bestrebungen eine höhere Wiederfindungsrate als 50 % zu erzielen, zum Beispiel durch das Hinzufügen von weiteren Extraktionsschritten in das Protokoll, waren nicht förderlich. Dies lässt darauf schließen, dass Matrixeffekte der Gewebe oder der verwendeten Laborgeräte für die Reduktion der Wiederfindungsrate verantwortlich sind und den limitierenden Faktor in dieser Methode darstellen.

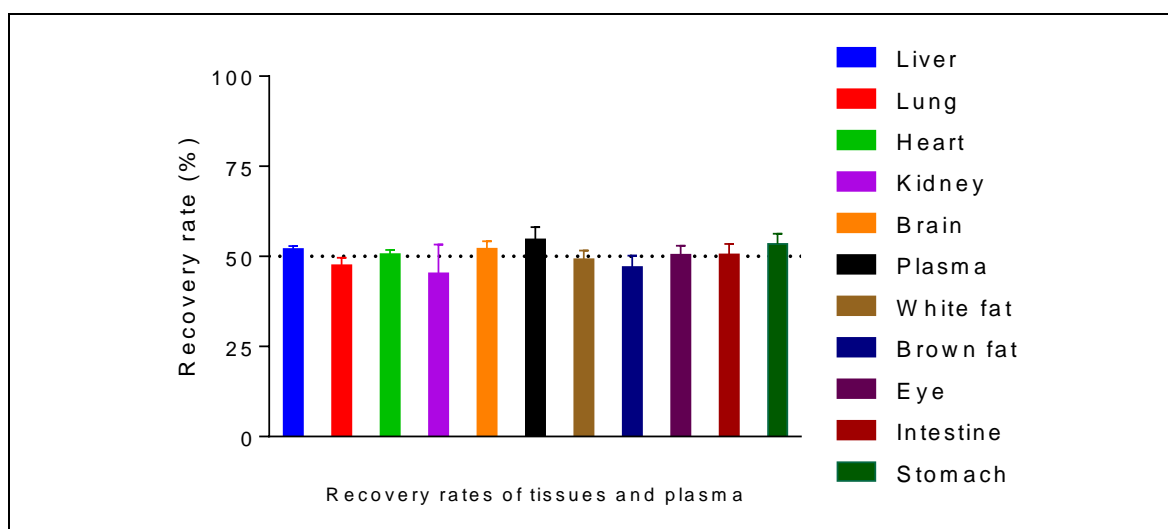


Abb. 100: Wiederfindungsraten von FR900359 nach Extraktion in verschiedenen Geweben und Plasma.

Tab. 33: Proteingehalt der getesteten Gewebe und Wiederfindungsraten von FR900359 nach Extraktion in verschiedenen Geweben und Plasma.

Gewebe	Leber	Lunge	Herz	Niere	Gehirn	
Wiederfindungsrate (%)	52	48	51	45	54	
Proteingehalt in Relation zum Nassgewicht (%)	0,0220	0,0093	0,0128	0,0108	0,0180	
Gewebe	Plasma	Weißes Fett	Braunes Fett	Auge	Darm	Magen
Wiederfindungsrate (%)	52	49	47	50	51	53
Proteingehalt in Relation zum Nassgewicht (%)	0,0260	0,0093	0,0093	0,0097	0,0119	0,0123

10.4.3 Methodenentwicklung - Extraktion von FR900359 mit einem internem Standard

Die etablierte Extraktionsmethode für FR900359 liefert zufriedenstellende und reproduzierbare Wiederfindungsraten. Jedoch wäre es interessant, die zuvor durch Standardproben bestimmte Wiederfindungsrate von FR900359 in jeder einzelnen *in vivo*-Probe ein weiteres Mal zu überprüfen. Dies kann durch Versetzen der *in vivo*-Probe mit einer definierten Menge eines internen-Standards realisiert werden. Entsprechend könnte man bei der Extraktion einer *in vivo*-Probe, FR900359 und den internen-Standards gleichzeitig extrahieren und über die Menge an extrahiertem internen-Standards auf die probenspezifische Wiederfindungsrate zurückschließen. Ein hierfür geeigneter Interne-Standard müsste, um für diese Methode eingesetzt werden zu können, mehrere Grundvoraussetzungen erfüllen. So muss dieser eine ähnliche Struktur, Molmasse und physikochemische Eigenschaften wie FR900359 besitzen. Um eine Trennung in der HPLC zu erreichen, müssen die chromatographischen Eigenschaften sich voneinander unterscheiden. Zudem darf der interne Standard den Analyten in seiner Extraktionsfähigkeit und Detektierbarkeit nicht beeinflussen.

Unter diesen Gesichtspunkten wurden die Verbindungen Erythromycin A ($M = 737,47 \text{ g/mol}$) und Ciclosporin ($M = 1202,84 \text{ g/mol}$) als potentielle interne Standards ausgewählt (vgl. Abb. 101). Ciclosporin ist ebenfalls ein ringförmiges Peptid und besitzt eine leicht höhere molekulare Masse als FR900359. Bei Erythromycin handelt es sich um ein Glykosid bzw. Makrolidantibiotikum welches eine geringere Masse als FR900359 besitzt und ebenfalls eine ringförmige Struktur aufweist. Beide Stoffe sind wie FR900359 in Methanol gut löslich.

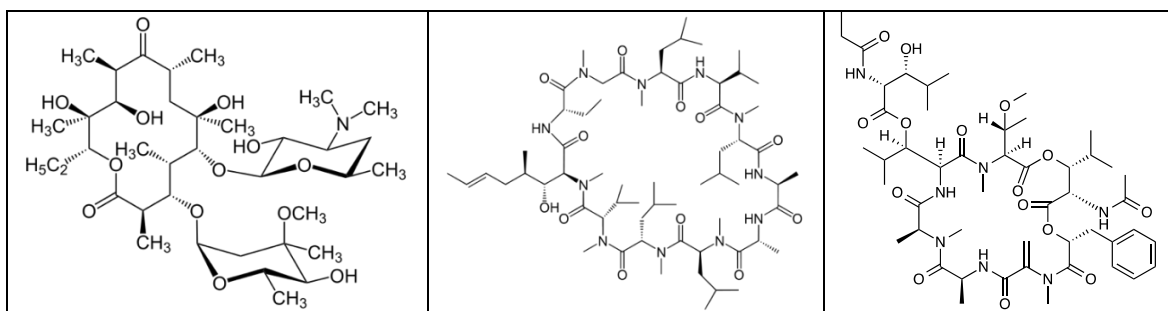


Abb. 101: Strukturen von Erythromycin A (links), Ciclosporin (mitte) und FR900359 (rechts).

Um herauszufinden, ob eine Interne-Standard-Methode zur Bestimmung der Wiederfindungsrate geeignet ist, wurden unbehandelte Leber, Lunge, Niere, Herz und Plasma von Mäusen mit 1,0 ml einer Lösung an Erythromycin (100 mM), Ciclosporin (100 mM) und FR900359 (mM) in FR-HPLC Puffer versetzt und wie im beschriebenen Extraktionsverfahren, in Abb. 99 dargestellt, extrahiert und

anschließend der Gehalt der einzelnen Komponenten durch die etablierte FR-LCMS-Methode bestimmt.

Die in Abb. 102 dargestellten Wiederfindungsraten zeigen, dass die eingesetzten internen Standards einen negativen Einfluss auf die Wiederfindungsraten von FR900359 haben. So besitzt FR900359 in Leber, Herz, Niere und Plasma eine wesentlich geringere Wiederfindungsrate als bei der etablierten Extraktionsmethode ohne eingesetzten internen Standard. Zudem schwankt die Wiederfindungsrate zwischen den einzelnen Geweben, ohne dass ein spezifisches Muster zu erkennen wäre. Aus diesen gemessenen Ergebnissen geht hervor, dass ein interner Standard aus einem Mix von Ciclosporin und Erythromycin nicht geeignet ist.

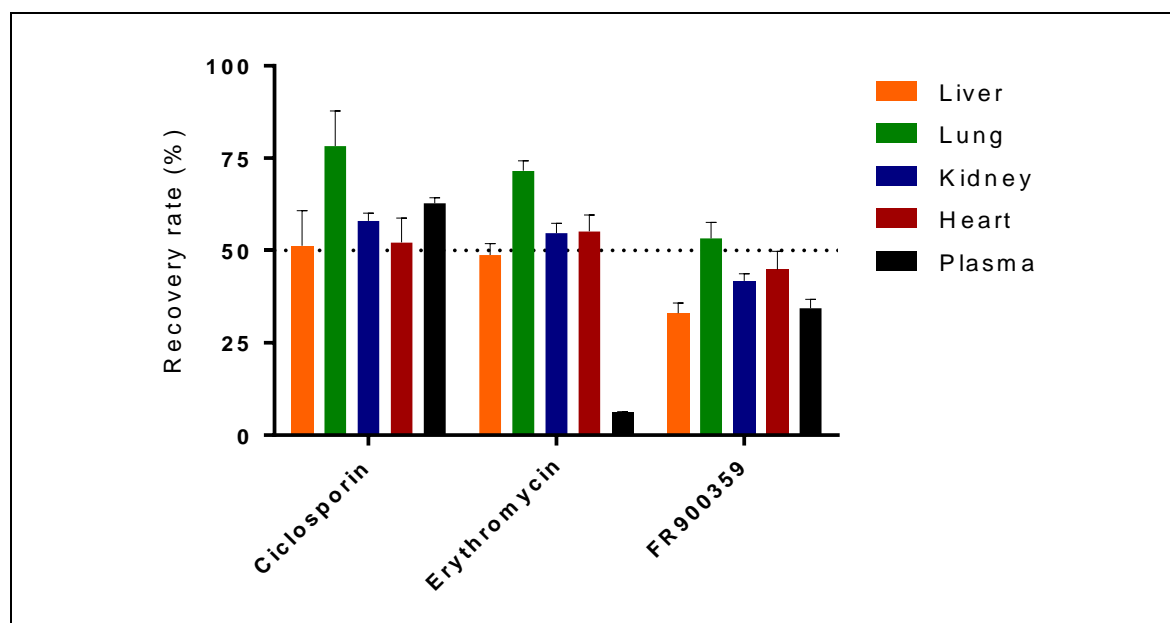


Abb. 102: Wiederfindungsraten von Ciclosporin, Erythromycin und FR900359 nach Extraktion aus verschiedenen Geweben und Plasma.

Weitergehend wurde untersucht ob die Zugabe von nur einem internen Standard für die Extraktion positivere Ergebnisse zu Folge haben würde. Daher wurde der vorangehende Versuch mit einem Mix nur aus Ciclosporin (100 mM) und FR900359 (100 mM) als Additiv zu den Proben wiederholt.

Abb. 103 zeigt, dass die Wiederfindungsraten bei den getesteten Geweben für Ciclosporin und FR900359 stabil sind. Dabei zeigt Ciclosporin eine, zwischen den einzelnen Geweben konstante, zufriedenstellende Wiederfindungsrate von 50 %. Die Wiederfindungsrate von FR900359 ist zwischen den einzelnen getesteten Geweben ebenfalls konstant, liegt allerdings mit einer Wiederfindungsrate von nur 30 % weit unter der der bereits etablierten Methode (50 %). Daher ist davon auszugehen, dass Ciclosporin die Wiederfindung von FR900359 negativ beeinflusst und diese Interne-Standard-Methode nicht zu bevorzugen ist.

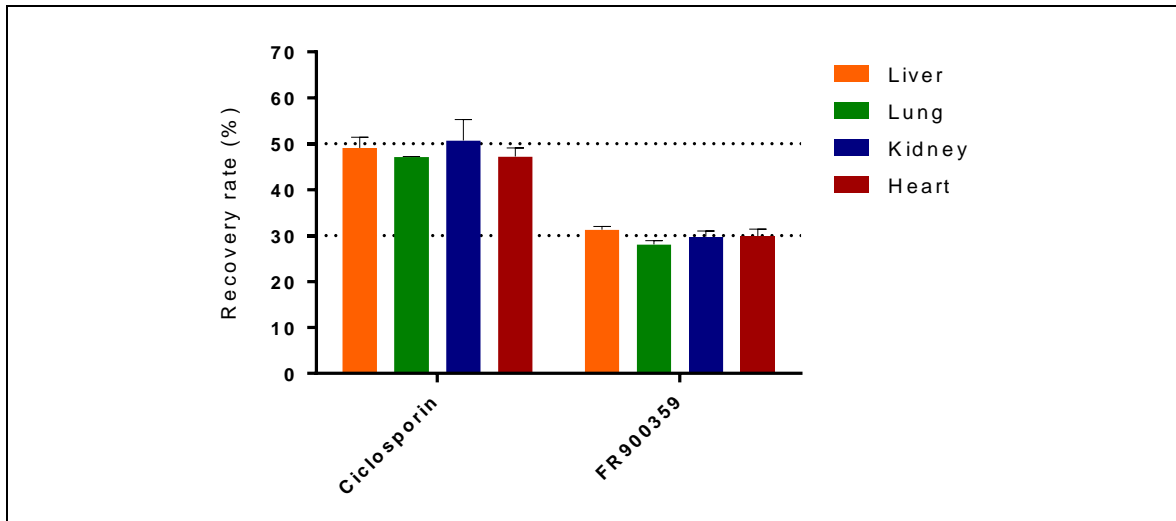


Abb. 103: Wiederfindungsraten von Cyclosporin als Internen-Standard und FR900359 nach Extraktion aus verschiedenen Geweben und Plasma.

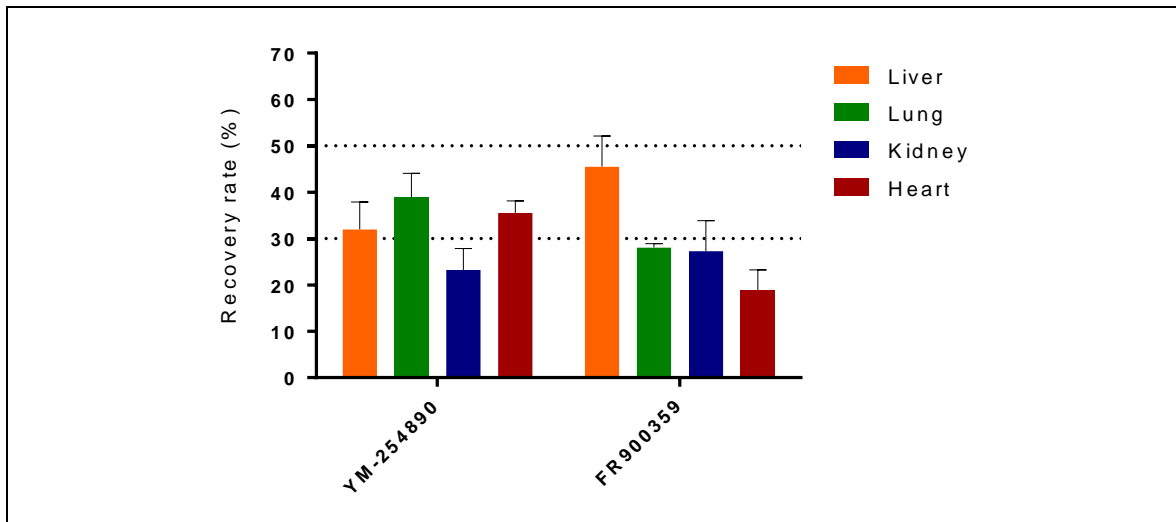


Abb. 104: Wiederfindungsraten von YM-254890 als Internen-Standard und FR900359 nach Extraktion aus verschiedenen Geweben und Plasma.

Daraufhin wurde versucht nur YM-254890 als internen-Standard einzusetzen. Die in Abb. 104 dargestellten Wiederfindungsraten zeigen, dass YM-254890 einen negativen Einfluss auf die Wiederfindungsraten von FR900359 hat. So besitzt FR900359 in Herz, Niere und Plasma eine wesentlich geringere Wiederfindungsrate als bei der etablierten Extraktionsmethode ohne eingesetzten internen Standard. Zudem schwanken die Wiederfindungsraten für YM-254890 und FR900359 zwischen den einzelnen Geweben, ohne dass ein spezifisches Muster zu erkennen wäre. Aus den Messungen geht hervor, dass ein interner Standard mit YM-254890 nicht geeignet ist.

Für die weitergehende Bestimmung des Gehalts an FR900359 aus *in vivo*-Proben wurde daher entschieden, die bereits etablierte Extraktions-Methode zu verwenden, da diese für alle getesteten Organe eine zufriedenstellende konstante Wiederfindungsrate bietet. Als zukünftige Interne-Standard-Methode wäre die Wahl eines ¹³C markierten FR900359 am sinnvollsten. Hier wären, in

Bezug auf die Wiederfindungsrate von FR900359 die wenigsten Einflüsse zu erwarten, da FR900359 und das ^{13}C markierte FR900359 sich in ihren physikochemischen Eigenschaften nicht voneinander unterscheiden und dennoch mittels LCMS, auf Grund ihrer unterschiedlichen Masse, voneinander getrennt werden können.

10.4.4 Extraktion & Bestimmung des Gehaltes von FR900359 aus nativen Geweben aus *in vivo*-Studien

Für die aus der AG Wenzel, Fleischmann, Universität Bonn, erhaltenen *in vivo*-Proben von Mäusen, die eine inhalative bzw. eine perorale Verabreichung von FR900359 erhalten hatten, wurden nachstehende Extraktionsprotokolle verwendet. Da für die gewebespezifische Auswertung des Gehaltes an FR900359 das Gewicht und die Proteinmenge entscheidend sind, wurde die bereits etablierte Extraktions-Methode um diesen Punkt erweitert.

Extraktionsprotokoll von Geweben:

1. Alle einzelnen Organproben hatten ein Gewicht von ca. 250 mg je Stück, das Gewicht notiert und eine von demselben Gewebe eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt.
2. Die Organproben wurden mit 1,0 ml FR-HPLC-Puffer (0.1 % HCOOH, 2mM NH₄OAc in 100 % Methanol) versetzt, im TissuLyser LT (Qiagen, Venlo, NL) für 15 min, 50 hub/s homogenisiert, anschließend bei 15000 g für 15 min abzentrifugiert, der Überstand abdekantiert und gesammelt. Weitere zweimal wurde das Organpellet mit je 1,0 ml 100 % Methanol versetzt und wie im vorigen Schritt extrahiert. Als letzten Schritt wurde das gesammelte Extraktionsfluid für 45 min 15000 g abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert.
3. Das abzentrifugierte gesammelte Extraktionsfluid wurde anschließend in einer SpeedVac (Thermo Scientific) bei 0 bar und 40 °C bis zur Trockenheit eingeengt, in 100 µl MeOH aufgenommen, für 3 min gevortext, 5 min bei 15000 g abzentrifugiert und der Überstand in die Messvials überführt und mittels etablierter FR-LCMS-Methode vermessen.

Extraktionsprotokoll von Plasma - Wiederfindungsrate:

Extraktionsprotokoll von Plasma:

1. Die 100 µl der Plasma-Proben wurden mit einer 1,0 ml FR-HPLC-Puffer (0.1 % HCOOH, 2mM NH₄OAc in 100 % Methanol) versetzt.
2. Anschließend 20 min bei 15000 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert.
3. Der Überstand wurde anschließend in einer SpeedVac bei 0 bar und 40 °C bis zur Trockenheit eingeengt, in 100 µl Methanol aufgenommen, für 3 min gevortext, 5 min bei 15000 g abzentrifugiert und der Überstand in die Messvials überführt.

10.5 Ergebnisse und Diskussion

Mäuse die auf Bronchorelaxation getestet wurden, erhielten eine definierte Dosis von FR900359 peroral (100 µl einer 100 µM Stammlösung) bzw. inhalativ (20 µl einer 100 µM Stammlösung). Nach Verabreichung wurden Atemtonus und Effekt der Behandlung dokumentiert. Plasma wurde nach 15, 30 und 60 Minuten der Gabe von FR900359 entnommen und gesammelt. Nach Beendigung des Experimentes wurde den behandelten Mäusen die Organe entnommen und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die erhaltenen Gewebe (Auge, Niere, Lunge, Herz, Leber, Gehirn weißes und braunes Fett, Darm, Magen) und Plasma aus *in vivo*-Studien an Mäusen wurden nach etablierter Methode extrahiert und anschließend nach etablierter FR-LCMS-Methode vermessen. In die Berechnung des Gehaltes für die einzelnen Gewebe und Plasma wurde die spezifische Wiederfindungsrate, als auch die Proteinkonzentration, respektive das Nassgewicht, berücksichtigt.

Die durchgeführten Extraktions- und Quantifizierungsexperimente waren erfolgreich. Es konnten FR900359-Gehalte im niedrigen nanomolaren Bereich in den verschiedenen Geweben und Plasma nachgewiesen werden.

Abb. 105 und Tab. 34 zeigen für die perorale Gabe die gefundenen Konzentrationen an FR900359 in den einzelnen Geweben und Plasma. FR900359 konnte bei den untersuchten Geweben nicht im Gehirn und nur in äußerst geringen Mengen im Darm nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass FR900359 nicht die Blut-Hirn-Schranke überschreitet. Im Magen konnte, auf Grund der peroralen Gabe, die höchste Konzentration gemessen werden. Die geringe Konzentration, die im Darm gemessen wurde, lässt darauf schließen, dass die Zeit nach Gabe und Entnahme der Organe nicht ausreichend war, dass sich relevante Konzentrationen im Darm ansammeln konnten. Diese Vermutung wäre in Übereinstimmung mit der Säurestabilität von FR900359, vgl. Kapitel 10.3, wodurch eine Zerstörung von FR900359 durch Magensäure ausgeschlossen werden kann. Im Plasma konnte eine sehr geringe Konzentration an FR900359 nach 15 Minuten beobachtet werden, die nach 30 und 60 Minuten an der unteren Grenze der Nachweisbarkeit lag. Dies lässt darauf schließen, dass FR900359 über das Plasma schnell abtransportiert wird und eine geringe Plasma-Eiweiß-Bindung vorliegt. Weiterhin konnten höhere Konzentrationen in der Niere, Lunge, Herz, Leber und weißem- und braunem Fettgewebe bestimmt werden. Die gefundenen Konzentrationen in Leber und Niere zeigen, dass FR900359 innerhalb kurzer Zeit metabolisiert und eliminiert werden kann. Äußerst interessant ist, dass hohe Konzentrationen im Auge gefunden wurden. Warum dies der Fall ist, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklären und muss durch zukünftige Testungen

weitergehend erforscht werden. Jedoch bietet die Tatsache, dass sich FR900359 gut im Auge anreichern kann, eine weitere Therapieoption für G_q-vermittelte Erkrankungen, wie das Uvea-Karzinom.

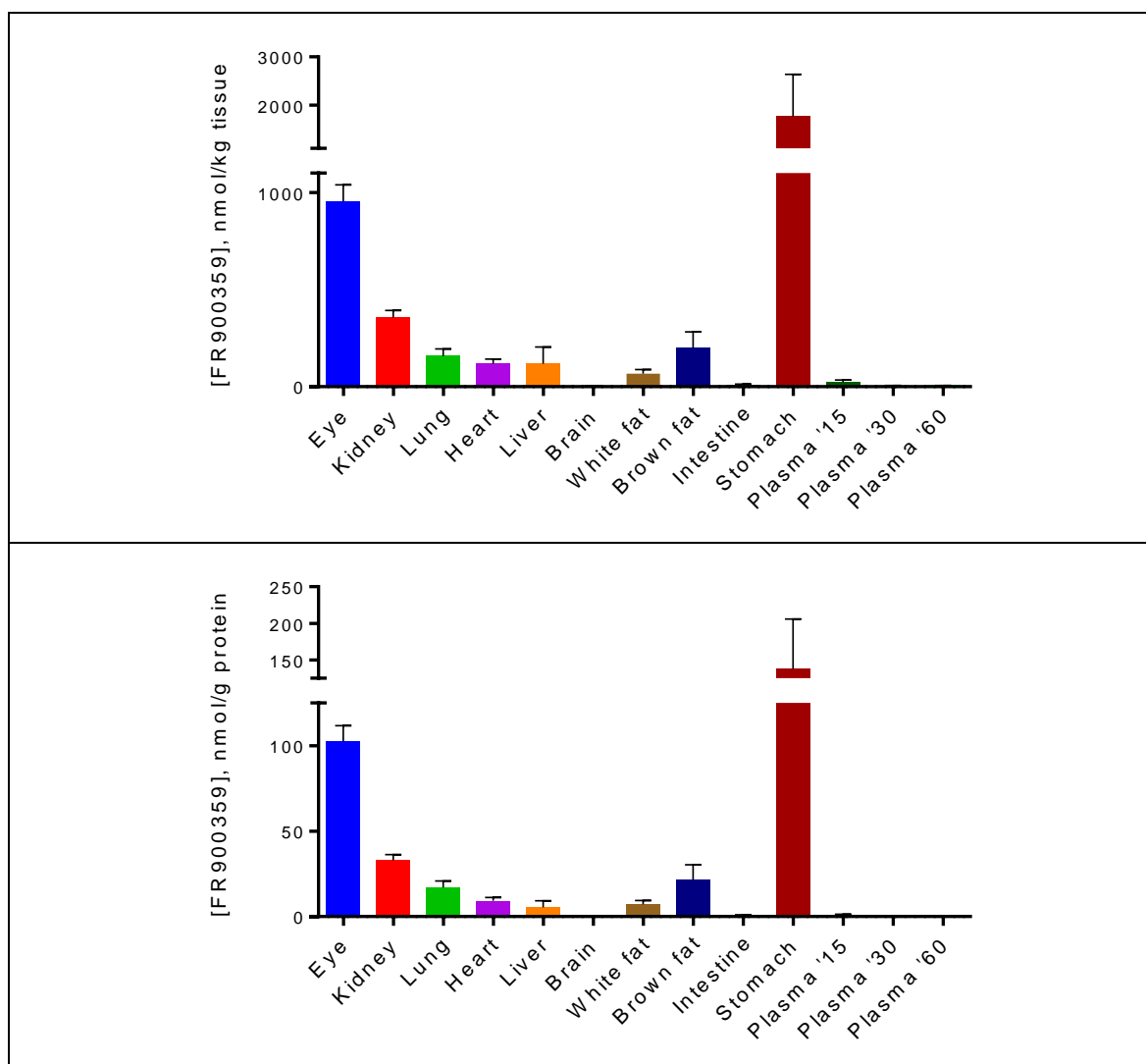


Abb. 105: Konzentrationen \pm SEM von FR900359 in nmol/kg Gewebe (oben) und nmol/g Protein (unten) in verschiedenen Geweben nach peroraler Applikation (100 μ l einer 100 μ M Stammlösung) an Mäusen aus *in vivo*-Studien.

Tab. 34: Konzentrationen \pm SEM von FR900359 in nmol/kg Gewebe und nmol/g Protein in verschiedenen Geweben nach inhalativer Applikation (20 μ l einer 100 μ M Stammlösung) an Mäusen aus *in vivo*-Studien.

FR900359	Auge	Niere	Lunge	Herz	Leber	Gehirn	
nmol/kg Gewebe	955 \pm 147	356 \pm 64	158 \pm 63	119 \pm 40	118 \pm 68	0	
nmol/g Protein	103 \pm 15,8	32,9 \pm 5,60	17,0 \pm 6,71	9,26 \pm 3,20	5,36 \pm 4,23	0	

FR900359	Weißes Fett	Braunes Fett	Darm	Magen	Plasma '15	Plasma '30	Plasma '60
nmol/kg Gewebe	66,8 \pm 36	200 \pm 142	9,1 \pm 8,3	1767 \pm 862	24 \pm 12	6,2 \pm 2,3	5,8 \pm 2,9
nmol/g Protein	7,18 \pm 3,24	21,6 \pm 7,58	0,71 \pm 0,34	138 \pm 86,2	0,92 \pm 0,23	0,24 \pm 0,12	0,22 \pm 0,05

Bei der inhalativen Gabe von FR900359 an Mäusen konnten nach Extraktion der einzelnen entnommenen Gewebe hohe Konzentrationen in der Lunge festgestellt werden (Abb. 106). Diese betrugen 90,5 nmol/kg Gewebe, respektive 9,82 nmol/g Protein (Tab. 35). In den anderen untersuchten Organen Leber, Herz, Niere und im Plasma konnten nur sehr geringe Mengen an FR900359 detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass FR900359 primär lokal in der Lunge verbleibt und nur langsam über den Blutkreislauf in die anderen Organe gelangt. Auch der Übergang in das Plasma ist sehr gering. Daher erscheint eine inhalative Applikation als sehr sinnvoll.

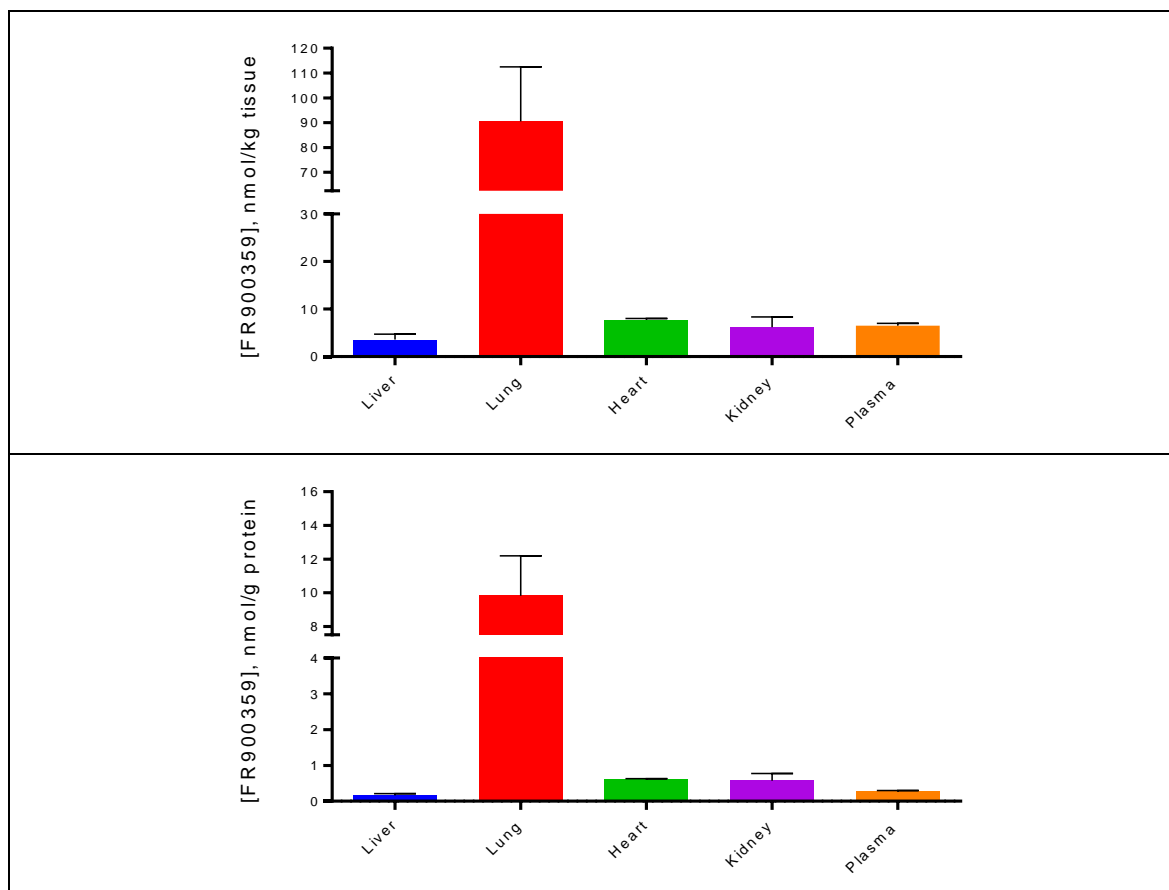


Abb. 106: Konzentrationen ± SEM von FR900359 in nmol/kg Gewebe (oben) und nmol/g Protein (unten) in verschiedenen Geweben nach inhalativer Applikation (20 µl einer 100 µM Stammlösung) an Mäusen aus *in vivo*-Studien.

Tab. 35: Konzentrationen ± SEM von FR900359 in nmol/kg Gewebe und nmol/g Protein in verschiedenen Geweben nach inhalativer Applikation (20 µl einer 100 µM Stammlösung) an Mäusen aus *in vivo*-Studien.

FR900359	Leber	Lunge	Herz	Niere	Plasma
nmol/kg Gewebe	3,60 ± 1,10	90,5 ± 21,9	7,70 ± 0,30	6,20 ± 2,20	6,53 ± 0,83
nmol/g Protein	0,16 ± 0,05	9,82 ± 2,37	0,60 ± 0,02	0,57 ± 0,20	0,26 ± 0,02

11. ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT UND AUSBLICK

11.1 Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind wichtige Zielstrukturen von Arzneistoffen. Sie aktivieren intrazelluläre G-Proteine, die wichtige Signalwege steuern. Die Blockade von G_q -Proteinen könnte eine neue Strategie zur Behandlung komplexer Krankheiten wie Krebs, chronischen Lungenerkrankungen und Immunsystem-assoziierten Erkrankungen darstellen. Gegenwärtig sind keine Tool-Verbindungen oder Methoden verfügbar, um G_q -Proteine in ihrer nativen Konformation direkt zu markieren, was für zahlreiche biologische und klinische Anwendungen nützlich wäre. In der durchgeführten Arbeit wurden G_{α_q} -spezifische chemische Sonden (Tracer) durch Tritiumierung der makrocyclischen Naturstoffe FR900359 (FR) und YM-254890 (YM) hergestellt und charakterisiert (Abb. 76). Diese erwiesen sich als wichtige Werkzeuge für die Analyse von G_q -Proteinen und ihren Funktionen.

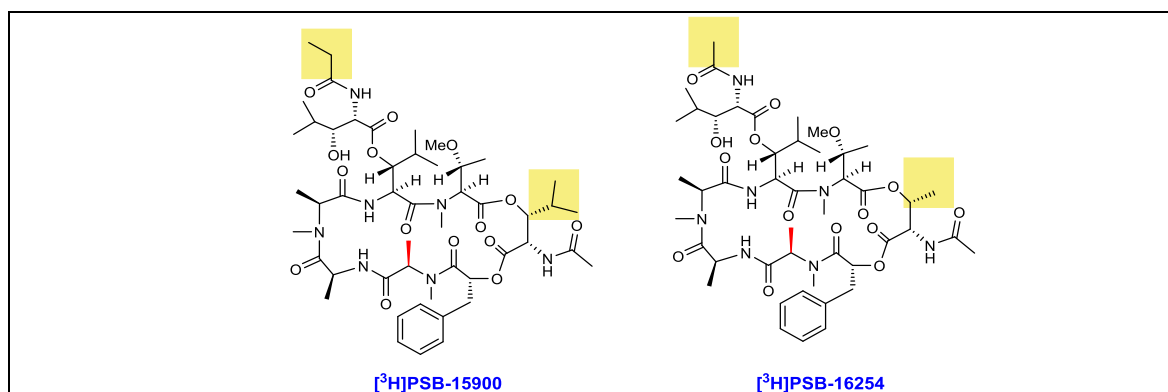


Abb. 76: Strukturen von $[^3\text{H}]$ PSB-16254 und $[^3\text{H}]$ PSB-15900 im direkten Vergleich.

Diese Tracer erlauben es, ihre direkten Wechselwirkungen mit G_{α_q} -Proteinen zu messen, Affinitäten von G_{α_q} -Inhibitoren zu bestimmen (Abb. 107) und Bindungskinetiken zu messen.

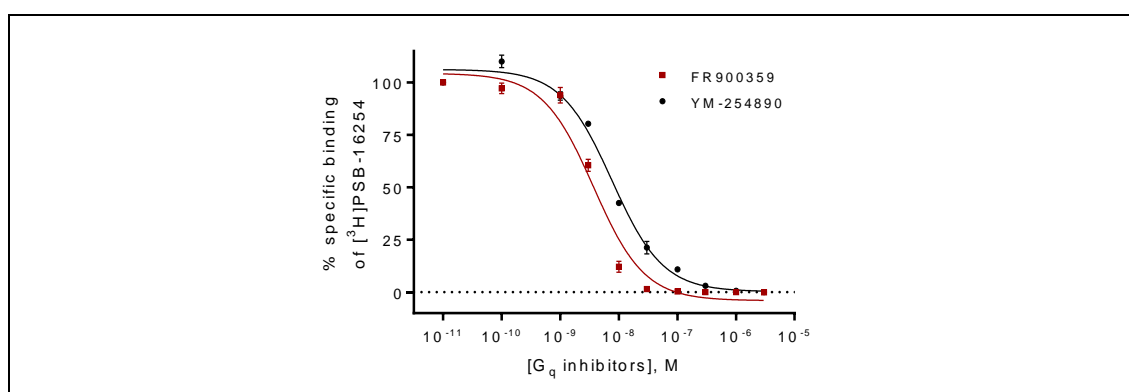


Abb. 107: Kompetitionskurven von FR900359 und YM-254890 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) gegen 5 nM $[^3\text{H}]$ PSB16254 bei 37 °C.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Tracer, $[^3\text{H}]$ PSB-15900 (von FR900359 abgeleitet) und $[^3\text{H}]$ PSB-16254 (von YM-254890 abgeleitet) signifikant verschieden sind und extrem unterschiedliche Bindungskinetiken aufweisen (Abb. 108). Während der von dem lipophileren

FR900359 abgeleitete Tracer eine extrem langsame Dissoziation und damit pseudo-irreversible Gq-Hemmung aufweist, zeigt der YM-254890-abgeleitete Radioligand eine schnelle Dissoziationskinetik. Die Assoziationskinetiken beider Tracer sind hingegen sehr ähnlich.

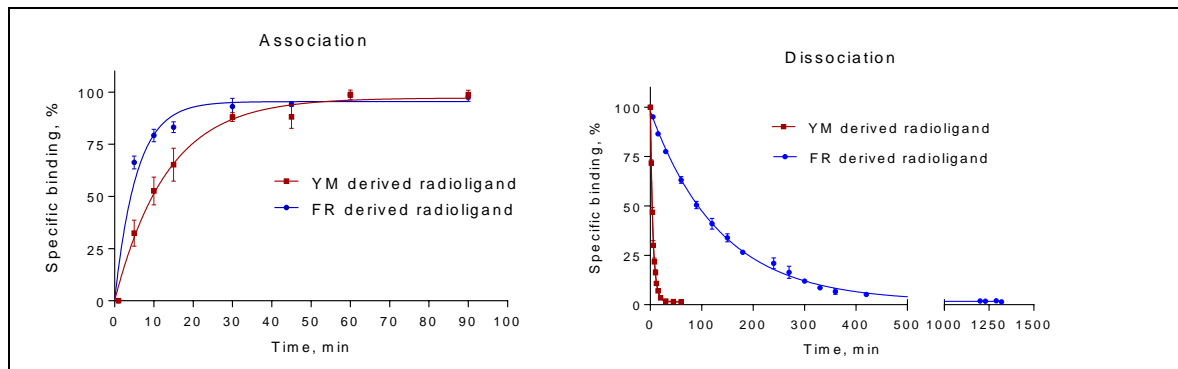


Abb. 108: Assoziations- (links) und Dissoziationsexperimente (rechts) von $[^3\text{H}]\text{PSB-15900}$ und $[^3\text{H}]\text{PSB-16254}$ an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) bei 37 °C.

Ein "Dübel-Effekt" von FR900359, der durch Computer-Moleküldynamik-Simulationen entdeckt wurde, und auf die beiden lipophilen Reste, v.a. die Isopropylgruppe in FR900359, zurückzuführen ist, liefert eine plausible Erklärung für die beobachteten Effekte auf molekularer Ebene (Abb. 77). Es wird erwartet, dass sich diese Unterschiede auch auf die pharmakologischen Wirkungen von FR900359 im Vergleich zu YM-254890 auswirken.

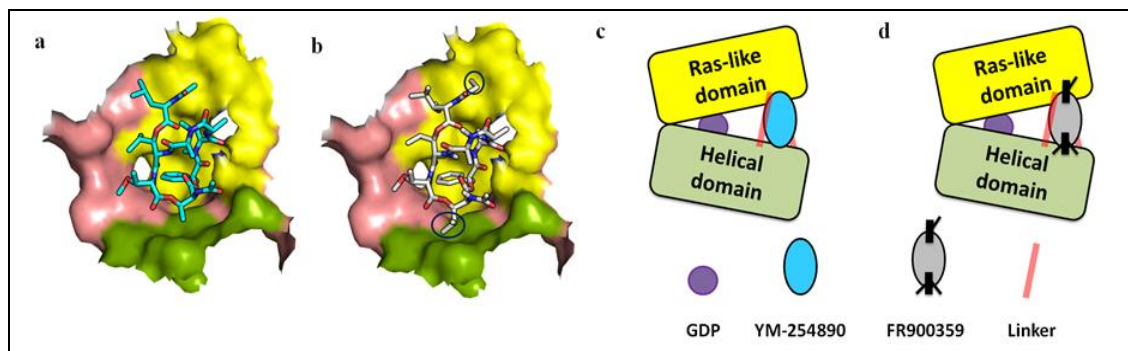


Abb. 77: YM-254890 (a) und FR900359 (b) in der Bindungstasche; Schematische Darstellung der unterschiedlichen Bindung von YM-254890 (c) und FR900359 (d).

Es wurden CRISPR/Cas9- $\text{G}\alpha_q$ -Knockout-Zellen mit den verschiedenen $\text{G}\alpha_q$ -Subtypen transfiziert, um deren Interaktion mit FR900359 und YM-254890 zu untersuchen. Beide Tracer zeigten eine ähnlich hohe Affinität zu $\text{G}\alpha_q$, $\text{G}\alpha_{11}$, und $\text{G}\alpha_{14}$, wohingegen $\text{G}\alpha_{15/16}$ keine messbare Affinität aufwies (Abb. 109).

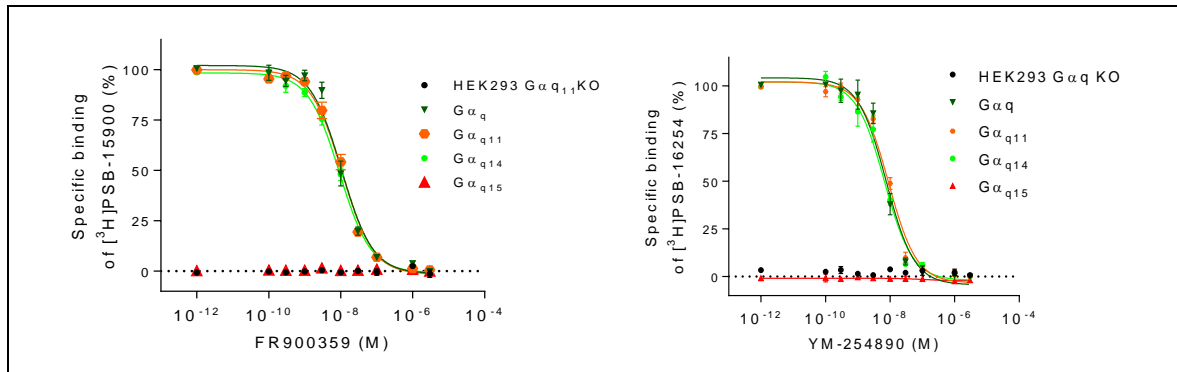


Abb. 109: Bindungskurven von FR900395 gegen [3H]PSB-15900 (links) und YM-254890 gegen [3H]PSB-16254 (rechts) an Membranpräparationen der verschiedenen Gα_q-Untereinheiten (30 µg Protein) exprimiert in HEK-Gα_q-KO-Zellen bei 37 °C.

Des Weiteren dienten die Tracer dazu, Gα_q-Proteine in einer Vielzahl von Organen, Zellen und Geweben mit hoher Genauigkeit nachzuweisen und zu quantifizieren (Abb. 110).

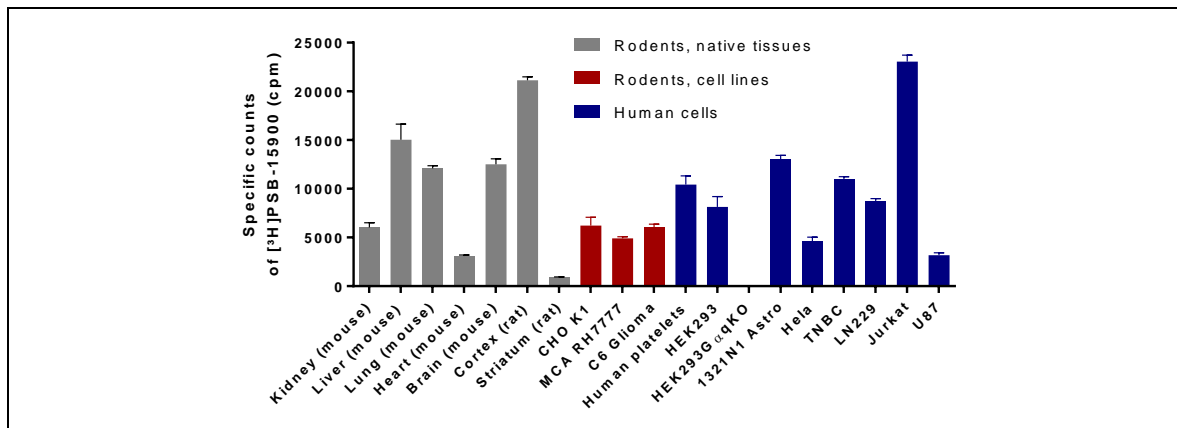


Abb. 110 Gα_q-Expressionsniveaus verschiedener Gewebe und Zelllinien aus Nagetieren und menschlichen Ursprungs. Die Ergebnisse zeigen die spezifische Bindung (cpm) von [3H]PSB-15900 (5 nM) an Präparation (20 µg Proteingehalt) der verschiedenen Gewebe oder der Zelllinien.

Darüber hinaus wurde ein HTS (high throughput screening)-Assay etabliert, der zur Entdeckung von zwei kleinen Molekülen mit Gα_q-Protein-inhibitorischer Aktivität führte (Abb. 79 und Abb. 80). Es handelt sich um die thiol-reaktiven Verbindungen Ebselen und SCH-202676.

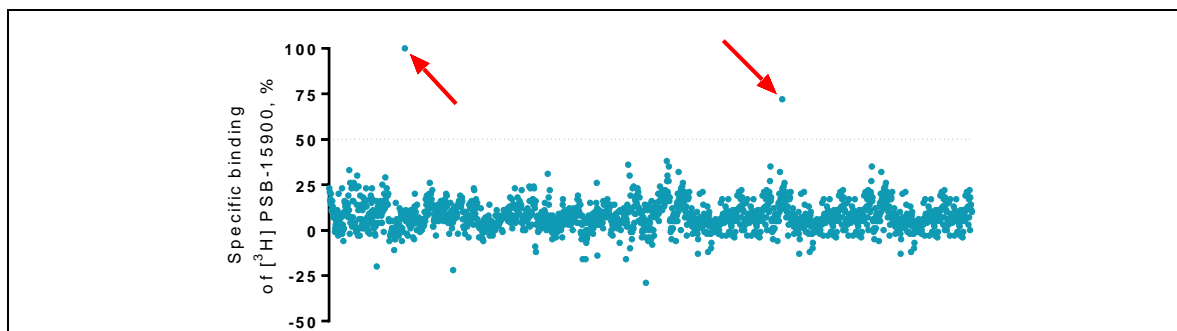


Abb. 79: Darstellung aller getesteten Substanzen in Bezug auf Ihre Bindung. Hits sind mit roten Pfeilen markiert.

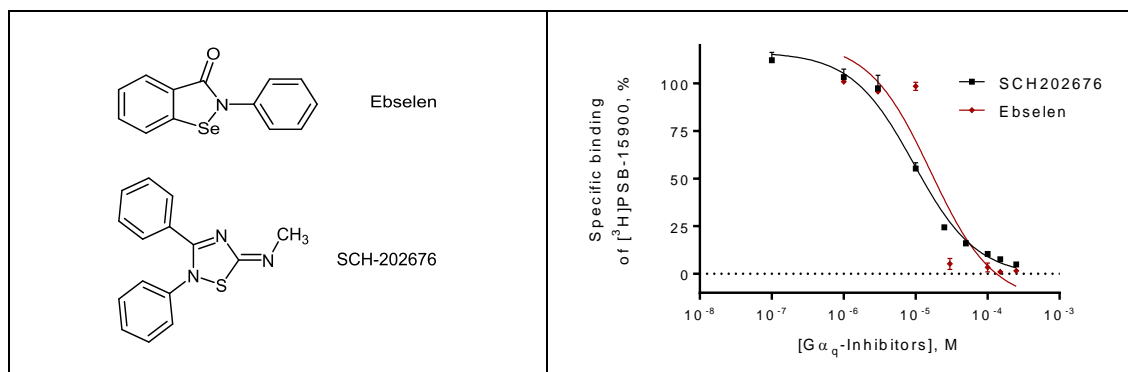


Abb. 80: Strukturen der beiden Hit-Verbindungen. Ebselen und SCH-202676 (links). Bindungskurven gegen [³H]PSB-15900 (5 nM) an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg) bei 37 °C (rechts).

Für pharmakokinetische Studien sind empfindliche quantitative Messungen von Wirkstoffkonzentrationen erforderlich. Im Rahmen eines weiteren Teilprojektes wurde eine hochempfindliche analytische Methode (mittels LC/MS) für FR900359 und YM-254890 (Abb. 111), sowie in Kooperation mit der AG Wenzel / Fleischmann eine Extraktionsmethode für FR900359 aus biologischen Proben (Maus-Gewebe) entwickelt (Abb. 112). Für die entwickelte Methode konnte eine Nachweisgrenze (LOD) für FR900359 und YM-254890 von < 1 nM und eine Quantifizierungsgrenze (LOQ) von 1 nM erzielt werden.

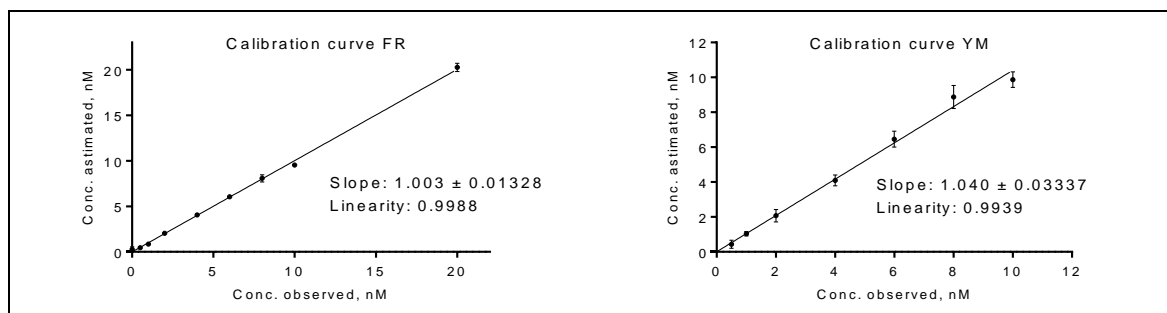


Abb. 111: Kalibriergerade von FR900359 (links) und YM-254890 (rechts) in Methanol im Konzentrationsbereich von 0,5 – 20 nM für FR900359 und YM-254890 0,5 - 10 nM.

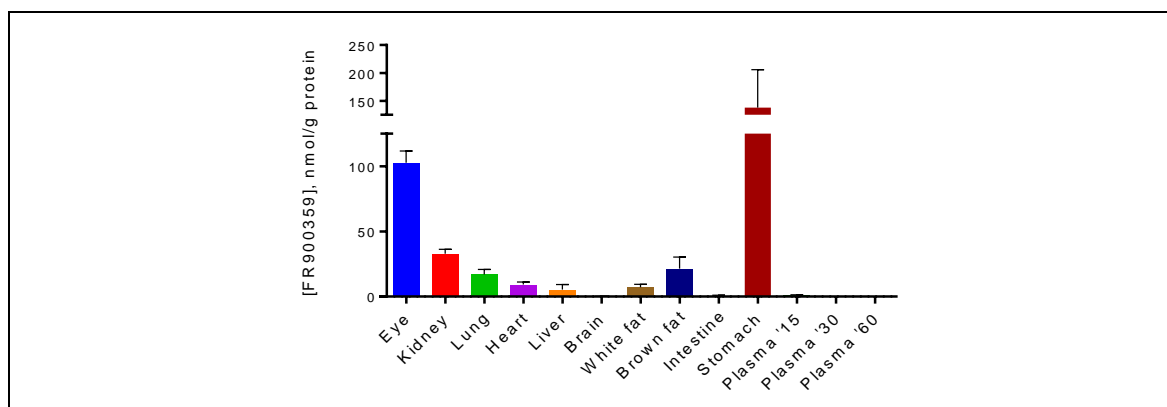


Abb. 112: Konzentrationen ± SEM von FR900359 in nmol/g Protein in verschiedenen Geweben nach peroraler Applikation (100 µl einer 100 µM Stammlösung) an Mäusen aus *in vivo*-Studien.

Es zeigte sich, dass FR900359 keine hohe perorale Resorption aufweist. Interessanterweise zeigte sich eine recht hohe Konzentration (100 nmol/g Protein) im Auge, was sich möglicherweise therapeutisch nutzen ließe.

11.2 Ausblick

Die sehr unterschiedlichen Dissoziationskinetiken der Radioliganden [^3H]PSB-15900 und [^3H]PSB-16254 sollen noch genauer untersucht werden. Zum einem soll die Dissoziation an den verschiedenen $\text{G}\alpha_q$ -Untereinheiten bestimmt werden. Zum anderen soll durch Mutagenese-Studien untersucht werden, ob und wie die Dissoziationsgeschwindigkeit von [^3H]PSB-15900 und [^3H]PSB-16254 durch gezielte Mutationen, der in der Bindung involvierten Aminosäuren, beeinflusst werden kann.

Des Weiteren sollen die in Screenings identifizierte Hit-Verbindungen Ebselen und SCH-202676 näher auf ihre $\text{G}\alpha_q$ -Interaktion untersucht werden. Die Hypothese, dass der Cystein-Rest Cys219 für die Bindung von Ebselen und SCH-202676 essenziell ist, soll durch Mutagenese-Studien bestätigt werden.

Das Screening nach neuen $\text{G}\alpha_q$ -Inhibitoren wird fortgesetzt. Zusätzlich soll ein virtuelles Screening erfolgen und ausgewählte Verbindungen sollen getestet werden.

[^3H]PSB-15900 und [^3H]PSB-16254 werden eingesetzt um neue, selektive $\text{G}\alpha_q$ -Inhibitoren von Kooperationspartnern zu testen und zu charakterisieren.

Die etablierte Quantifizierungsmethode mittels LC/MS soll weiterhin optimiert und angewendet werden, um FR900359- und YM-254890-Konzentrationen in Geweben zu quantifizieren. ^{13}C -markiertes FR900359 soll zukünftig bei der etablierten Extraktionsmethode als interner Standard eingesetzt werden, um noch zuverlässiger die Wiederfindungsrate bestimmen zu können.

12. ALLGEMEINE ANGABEN

12.1 Geräte

Glasfaserfilter	Whatman GF/B, GF/C, Brandel, Gaithersburg, MD, USA
Harvester	Brandel M24, M48, M96, Gaithersburg, MD, USA
Homogenisatoren	RW 16 Basic, IKA Labortechnik, Staufen, DE TissueLyser LT, Qiagen, Venlo, NL
Ultraturrax	T25 Basic, IKA Labortechnik, Staufen, DE
Inkubatoren	Memmert INC246, Schwabach, DE Memmert IPP 110, Schwabach, DE
LSC-Counter	TRICARB® 2100 TR, 2900 TR, Canberra Packard/Perkin-Elmer TopCounter NXT, Canberra Packard/Perkin-Elmer, MC, USA γ-Counter Cobra, Canberra Packard/Perkin-Elmer, MC, USA
pH-Meter	FiveEasy FE20, Mettler-Toledo, Schwarzbach, CH
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf Multipette Plus und Eppendorf Research+, Hamburg, DE
Ultraschallbad	Sonorex RK 52H, Bandelin, Berlin, DE
Vortex	Vortex 3, IKA Labortechnik, Staufen, DE
Zentrifugen	Avanti™, J-20I, Beckman-Coulter, Krefeld, DE MIKRO 200R, Hettich, Kirchlingern, DE Allegra X-30R, Beckman-Coulter, Krefeld, DE
Photometer	DU® 530, Beckmann-Coulter, Krefeld, DE
HPLC	Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, MA, USA
MS	micrOTOF-Q, Bruker, MA, USA

12.2 Computerprogramme

Bindungskonstanten und funktionelle Parameter der durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien wurden mit Hilfe des Software-Programms Prism, Version 6.1 (GraphPAD, San Diego, CA, USA) berechnet.

Zur Erstellung der Strukturformeln wurde das Programm ChemDraw® Professional, Version 15.0 (PerkinElmer Informatics Inc.) verwendet. Zur dreidimensionalen Betrachtung von Molekülstrukturen wurde das Programm Pymol und zur Berechnung von Docking-Simulationen (Protein-Liganden-Interaktionen) diente das Programm AutoDock 4.

12.3 Materialien

12.3.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien, Feinchemikalien und Lösungsmittel wurden in p.a.-Qualität von der Firma Sigma-Aldrich/RBI bezogen.

12.3.1.1 Radioliganden

[³ H]iso-PSB-15900 (in EtOH)	SA = 32 Ci/mmol, Quotient Bioresearch Ltd, Cardiff, GB
[³ H]PSB-15900 – ISO 2 (in EtOH)	SA = 77 Ci/mmol, Quotient Bioresearch Ltd, Cardiff, GB
[³ H]PSB-15900 – ISO 2A (in EtOH)	SA = 37 Ci/mmol, Quotient Bioresearch Ltd, Cardiff, GB
[³ H]iso-PSB-16254 (in EtOH)	SA = 47 Ci/mmol, Quotient Bioresearch Ltd, Cardiff, GB
[³ H]PSB-16254 (in EtOH)	SA = 51 Ci/mmol, Quotient Bioresearch Ltd, Cardiff, GB

12.3.1.2 Gewebe & Membranen

Rattenhirne	Pel Freez, Rogers, Arkansas, USA
Humane Thrombozyten-Aphärese-Konzentrate	Transfusionsmedizin, Uniklinikum Bonn, Bonn, DE

12.3.1.3 Puffer

1) TRIS-Puffer 50 mM / pH 7,4

6,05 g TRIZMA®-Base (50 mM)

+ 1,0 l Aqua dest.; mit Salzsäure (37%) auf pH 7,4 einstellen

2) TRIS-Benzamidin-Puffer / pH 6,5

7,88 g TRIS-HCl (50 mM)

2,033 g MgCl₂ (10 mM)

0,372 g EDTA (1 mM)

0,1 mM Benzamidin

+ 1,0 l Aqua dest.; mit Salzsäure (37%) auf pH 6,5 einstellen

3) TME-Puffer / pH 7,4

7,88 g TRIS-HCl (50 mM)

2,033 g MgCl₂ (10 mM)

0,372 g EDTA (1 mM)

+ 1,0 l Aqua dest.; mit Salzsäure (37%) auf pH 6,5 einstellen

4) HEPES-Puffer 50 mM / pH 7,4

2,38 g HEPES (10 mM)

4,67 g NaCl (80 mM)

0,27 KCl (36 mM)

0,11 MgCl₂ x 6 H₂O (0,53 mM)

0,18 g CaCl₂ x 2 H₂O (1,2 mM)

+ 1 L Aqua dest.; mit gesättigter NaOH-Lösung auf pH 7,4 einstellen

5) Sucrose-Lösung

109,5 mg Sucrose

+ 1 l Aqua dest.; auf pH 7,4 einstellen

6) PBS-Lösung

NaCl (150 mM), KCl (2.5 mM), Na₂HPO₄ x 2 H₂O (7.5 mM), KH₂PO₄ (1.5 mM) / pH = 7.2

40 g NaCl (MW = 58.44)

1 g KCl (MW = 74.55)

7 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (MW = 178)

1 g KH₂PO₄ (MW = 136.1)

Ca. 4,5 l Reinstwasser (Raumtemperatur) zugeben, und unter Rühren lösen. Die Lösung in 500 ml Schott-Glasflaschen aliquotieren, bei 120 °C für 20 min mit halboffenem Verschluss autoklavieren und anschließend bei 4°C lagern.

7) Trypsin-EDTA-Lösung

= PBS-Lösung mit 0,05 % Trypsin, 0.016 % EDTA, 0.0015 % Phenolrot

500 ml PBS (Ca/Mg-frei)

0,6 ml EDTA-Stammlösung (0.5 M / pH=7.6)

in 500 ml Schott-Glasflaschen aliquotieren, bei 120 °C für 20 min mit halboffenem Verschluss autoklavieren, anschließend fügt man zu 10 ml steriles Trypsin (2.5 %) (Böhringer) 1,5 ml steriles Phenolrot (0.5 %) (Biochrom) und lagert die Lösung bei -20 °C.

12.4 Gewebe-, Zell- & Blutproduktpräparationen

12.4.1 Grundlagen

Der wichtigste Faktor beim Umgang mit Gewebe ist das konsequente Arbeiten bei 0 - 4°C unter Eiskühlung, um Autoprotolyse-Prozesse soweit wie möglich zu verhindern. Fertige Gewebepräparationen werden zur Lagerung bei -80 °C eingefroren, da bekannt ist, dass dies keinen Einfluss auf die Qualität von Membranrezeptoren und Proteinen hat. Zellmembranen bestehen, bezogen auf die Trockenmasse, aus 60 – 70 % Lipiden, 30 – 40 % Proteinen und 1 - 10 % kovalent gebundenen Kohlenhydraten. Die Anzahl der Rezeptoren ist in der Regel sehr gering und typische Rezeptordichten liegen bei ca. 1 pmol/mg, weshalb eine Reinigung des Gewebes Voraussetzung für die Herstellung aktiver Präparationen ist. Durch aufeinander abgestimmte Homogenisations- und Zentrifugationsschritte, die für das jeweilige Gewebe optimiert werden müssen, ist die Anreicherung von Membranrezeptoren und -Proteine möglich. Unter mechanischen Zellaufschluss und unter Verwendung von Homogenisatoren können durch Reibung hohe Temperaturen entstehen, so dass dieser Prozess nur wenige Sekunden dauern darf und unter konsequenter Kühlung durchzuführen ist. Zur Isolierung der Zellmembranen aus homogenisiertem Gewebe macht man sich die unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit von Teilchen verschiedener Größe und Dichte zu Nutze. Dabei spielen auch die verwendeten Puffer eine Rolle. In einem ersten Zentrifugationsschritt von 10 - 15 Minuten und bei niedrigen g -Zahlen zwischen 800 g und 1.000 g trennt man Zellkerne, Zelltrümmer und Erythrozyten - das sogenannte P1-Pellet - aus dem Homogenisat ab. Aus dem Überstand (S1) isoliert man durch Sedimentation bei hohen g -Zahlen von 20.000 g bis 40.000 g über eine Dauer von 30 - 60 Minuten das P2-Pellet. Es enthält Mitochondrien sowie Membranbruchstücke unterschiedlicher Größe aus Zellmembranen, Lysomen. Durch Resuspension und Rezentrifugation unter gleichen Bedingungen kann die Qualität der Trennung verbessert werden, jedoch wird die Ausbeute dadurch verringert.^a

12.4.2 Präparation von Rattencortex als Quelle für $G\alpha_q$ -Proteine

Zur Präparation des Cortex lässt man 25 Rattenhirne auf Eis langsam auftauen, anschließend werden diese in Sucrose-Lösung gegeben und auf einer Glasplatte unter Eiskühlung präpariert. Zur Isolierung des Cortex werden die äußeren 2 - 3 mm des Rattenhirns, die sogenannte Hirnrinde, mit einem Skalpell beziehungsweise einer Rasierklinge abgeschabt und in Sucrose-Lösung gesammelt. Nach der Bestimmung des Nassgewichtes wird das Gewebe zur groben Zerkleinerung durch eine Spritze ohne Kanüle gedrückt und in etwas TRIS-Puffer mit einem Glas-Teflon-

^a Standardprotokolle – Präparationen - AG Müller, Universität Bonn

Homogenisator (Potter, Stufe 1.100, 10 sec) homogenisiert. Das Gewebe wird bei 1.000 g und 4°C für 10 Minuten zur Gewinnung des Überstands S1 und des Pellets P1 zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und bei 37.000 g und 4 °C 60 min erneut zentrifugiert. Der Überstand S2 wird verworfen und das P2-Pellet zur Aufreinigung in 20 ml TRIS-Puffer resuspendiert, mit Hilfe des Polytron auf Stufe 3 für 2 - 3 Sekunden homogenisiert und erneut bei 37.000 g und 4 °C 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen, und das Pellet zur Aufreinigung nochmals in 20 ml TRIS-Puffer resuspendiert, mit Hilfe des Polytron auf Stufe 3 für 2-3 Sekunden homogenisiert und erneut bei 37.000 g und 4°C 60 Minuten zentrifugiert. Dann wird das Pellet in 20 ml TRIS-Puffer resuspendiert und homogenisiert (Polytron, Stufe 3, 2-3 sec) und in TRIS -Puffer (1 ml Puffer pro 100 mg Nassgewicht) aufgenommen, in Kryovials abgefüllt und bei -80°C gelagert.

12.4.3 Präparation von Rattenstriatum als Quelle für $G\alpha_q$ -Proteine

Nachdem der Cortex vom Rattenhirn entfernt wurde, wird durch einen schrägen Schnitt im unteren Drittel der beiden Hirnhälften das Striatum freigelegt und präpariert. Es wird in kaltem TRIS-Puffer gesammelt. Nach der Bestimmung des Nassgewichtes wird das Gewebe mit dem Ultra-Turrax auf Stufe 3 bis 4 circa 2 bis 3 Sekunden homogenisiert. Das Homogenisat wird bei 35.000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in TRIS-Puffer resuspendiert und der Waschvorgang (35.000 g, 4 °C, 20 min) noch zweimal wiederholt. Die letzte Resuspendierung wird mit möglichst wenig Puffer durchgeführt, um eine hohe Konzentration der Gewebelösung zu erhalten. Im letzten Schritt wird das Pellet in TRIS-Puffer (1 ml TRIS-Puffer pro 100 mg Nassgewicht) aufgenommen, in Kryovials abgefüllt und bei -80°C gelagert.

12.4.4 Präparation rekombinanter $G\alpha_q$ -Proteine aus HEK-Zellen

Eingesetzt werden 20 Zellkulturschalen ($\emptyset = 15$ cm), die bei 70 Prozent Konfluenz nach Spülen mit PBS Puffer (s.u.) bei - 80°C eingefroren wurden. Man lässt die Schalen im Kühlschrank bei ca. 4° C kurz antauen, alle folgenden Schritte werden unter konsequenter Kühlung auf Eis durchgeführt: jede Platte wird mit 3 ml 5/2-Puffer (5 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7.4) versetzt, die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers gelöst und die Zellsuspensionen in einem Becherglas vereinigt. Alle Platten werden mit 1 ml 5/2-Puffer nachgespült. Nun wird die Zellsuspension 2 x 15 Sekunden auf Eis mit einem Ultraturrax-Homogenisator auf maximaler Stufe homogenisiert. Dann überführt man die Zellsuspension in Falkontubes und zentrifugiert bei 4°C und 3200 rpm für 10 min. Der S1-Überstand wird vorsichtig dekantiert und bei 4° C und 50000 g zur Gewinnung der P2-Fraktion erneut zentrifugiert. Anschließend nimmt die Pellets in je 2 ml TRIS-Puffer (50 mM, pH=7.4) auf

und suspendiert mit dem Vortex. Mit dem Potter wird das Protein von Hand vorsichtig homogenisiert, das Homogenat aliquotiert und bei -80°C gelagert.

12.4.5 Präparation von Thrombozyten-Aphärese-Konzentrate als Quelle für Ga_q -Proteine

Die Thrombozyten-Aphärese-Konzentrate werden über die Blutbanken-Abteilungen für Transfusionsmedizin der Uniklinik Bonn und der Uniklinik Bonn bezogen. Konzentrate werden in sterilen Infusionsbeuteln in den Unikliniken bei 22°C unter leichtem Schütteln gelagert. Die Infusionsbeutel werden geöffnet und die Suspension vorsichtig in Zentrifugenröhrchen gegossen. Die Suspension wird bei 1000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. In dem zu verwerfenden Pellet befinden sich u.a. Reste an roten Blutkörperchen. Der Überstand wird in saubere Zentrifugenröhrchen überführt und bei 48400 g und 4°C für 60 min zentrifugiert.

Die entstandenen Pellets werden in Puffer 1 mit Hilfe einer großen Eppendorf-Pipette resuspendiert und erneut bei den gleichen Einstellungen zentrifugiert. Die letzte Fraktion an Pellets wird nun in einem geeigneten Volumen an Puffer 2 resuspendiert und dann homogenisiert. Die Proteinsuspension wird anschließend in einem Volumen von 2 ml in Kryovials aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

Puffer für die Membranpräparation von humanen Thrombozyten (bezogen auf 1 l)

Puffer 1

Substanz	Konzentration (mM)	Einwaage (g)
Tris-HCl	50	6,050
EDTA	5	1,461
NaCl	150	8,766

Puffer 2

Substanz	Konzentration (mM)	Einwaage (g)
Tris-HCl	5	0,6057
EDTA	5	1,461

Die in deionisiertem Wasser hergestellten Puffer werden mit konzentrierter Salzsäure auf $\text{pH } 7,4$ eingestellt.

12.5 Proteinbestimmung

12.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford^a

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wird eine Stammlösung hergestellt aus 0,1 g Coomassie-Brillant Blue G, gelöst in 50 % Ethanol (v/v), das mit 100 mL Phosphorsäure (85%) und Aquadest. zu 240 mL verdünnt wird. Unmittelbar vor dem Gebrauch wird die Stammlösung im Verhältnis von 1:5 mit Aqua dest. versetzt und über Papierfilter filtriert. Als Standard dient bovines Serumalbumin. Mit diesem wird in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 250 µg Protein photometrisch eine Kalibriergerade ($\lambda = 595 \text{ nm}$) erstellt. Die zu vermessenden Proben werden mit Aqua dest. so verdünnt, dass ihr Gehalt ca. 10-100 µg Protein beträgt und 0,1 mL dieser Verdünnungen mit 2,0 mL Bradford-Reagenz vermischt. Nach 30 min Inkubationszeit wird ihr Proteingehalt bestimmt.

12.5.2 Proteinbestimmung nach Lowry^b

Für die Proteinbestimmung nach Lowry wird eine Verdünnungsreihe mit einem Volumen von je 500 µl des Proteinstandards bovines Serumalbumin, sowie geeignete Verdünnungen der zu vermessenden Homogenate hergestellt. Diese werden mit jeweils 500 µl SDS-haltigem Lowry-Reagenz versetzt und 20 min inkubiert, um die Proteine zu solubilisieren. Dann werden alle Proben unter sofortigem Mischen mit dem Folin-Farbreagenz versetzt und weitere 30 Minuten inkubiert. Dann wird in einem Zeitraum von maximal 30 Minuten eine Kalibriergerade im Absorptionsmaximum von 750 nm erstellt und die Proben im Vergleich hierzu vermessen. Allgemeine Angaben Gewebepräparation & Aufarbeitung von Blutprodukten.

12.6 Zellkulturmethoden

12.6.1 Medium für HEK-Zellen

DMEM F12, Mixture HAM

10% FCS (0.1 µM)

1% PEN/STREP (10000 U Penicillin/ml und 10 mg Streptomycin/ml)

1% L-Glutamin (200 mM in 0.85% NaCl-Lösung)

0.4% G418 (aktive Konzentration = 200 µg/ml Medium)

^a Bio-Rad Protein Assay, Best. Nr. 500-0002

^b Sigma-Aldrich Protein Assay, Best. Nr. P5656

12.6.2 Auftauen neuer HEK-Zellen

1. Die als 1 ml DMSO-Stammlösung konservierten Zellen, die bei -80°C im Tiefkühlschrank oder bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert werden, schnell auftauen lassen.
2. Das Nährmedium im Wasserbad auf 37°C erwärmen.
3. Die aufgetauten Zellen in 25 ml Medium überführen.
4. Die Zellen bei 1000 g und 20°C für 5 Minuten zentrifugieren. Dieser Schritt dient der Entfernung des zum Einfrieren verwendeten DMSO.
5. Vier große Zellkulturflaschen mit je 15 ml Medium füllen.
6. Den Überstand mit einer Pipette absaugen und verwerfen.
7. Das Pellet in 20 ml vorgewärmtem Medium aufnehmen und die Zelle durch Auf- und Absaugen mit der Pipette vereinzeln.
8. Je 5 ml der Zell-Suspension auf die Zellkulturflaschen verteilen.
9. Über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubieren.
10. Am nächsten Tag das Medium mit der Pipette absaugen und durch frisches Medium ersetzen.
11. Die Zellen wachsen lassen, bis sie ca. 70% des Bodens bedecken. Ist das Medium vorher verbraucht (Farbindikator), so muss es gewechselt werden.

12.6.3 Kultur von HEK-Zellen / retroviral transfizierter HEK-Zellen

Man lässt die Zellen wachsen bis die Platten 70% - 80% konfluent sind, d.h. der Plattenboden zu 70% mit Zellen bewachsen ist. Um möglichst nur Zellen zu kultivieren, die gewünschte Mutation enthalten, setzt man dem Zellkulturmedium G418 als Selektionsmarker zu.

Um Zellen zu splitten verfährt man wie folgt:

1. Das Nährmedium und das Trypsin werden im Wasserbad auf 37°C erwärmt.
2. Aus den zu ungefähr 70 % bis 80 % mit HEK-Zellen konfluent bewachsenen Flaschen wird das Medium abgesaugt.
3. Anschließend gibt man PBS-Puffer hinzu, lässt ihn 2-3 Minuten einwirken und pipettiert ihn ab.
4. Zum Ablösen der Zellen pipettiert man so viel Trypsin/EDTA-Lösung in die Flasche, dass der Boden gerade bedeckt ist und stellt diese dann für 1-2 Minuten in den Brutschrank, bis sich die Zellen vom Boden zu lösen beginnen.

5. Durch Klopfen gegen den Flaschenboden löst man die Zellen ab und nimmt sie mit einem Überschuss Medium auf.
6. Diese Suspension wird auf 20 bereits mit Medium befüllte Flaschen verteilt und die Zellen werden anschließend im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) für 2 bis 3 Tage inkubiert.
7. Wenn die Schalen zu ca. 70 % konfluent bewachsen sind, wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit circa 1-2 ml PBS gewaschen.
8. Die Platten können nun bis zur Membranpräparation bei –80°C gelagert werden.

12.6.4 Herstellen von HEK-Zellen-Stammlösung

Die zu konservierenden Zellen werden erst mit PBS-Puffer gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA von der Flasche abgelöst. Die Zellsuspension wird mit Medium verdünnt und die Zellen bei 1000 g zentrifugiert. Das Pellet wird einer Mischung aus Zellen, Medium und 10 % DMSO (3 ml/Zellkulturflasche) aufgenommen und in Kryovials aliquotiert. Die Suspension wird bei –80°C eingefroren und anschließend bei -196°C gelagert.

13.ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7TMR	7-transmembranärer-Rezeptor
Abb.	Abbildung
ADA	Adenosindesaminase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AR	Adenosinrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	copy DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHO	Chinesische Hamster Ovarien Zellen
CPM	Counts pro Minute
CTX	Choleratoxin
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	Halbmaximale Aktivierungskonzentration

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
EPAR	European public assessment reports
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
FR	FR900359
g	Gramm
<i>g</i>	Zentrifugalkraft in Bezug auf die Erdschwerebeschleunigung
G-418	Genticinsulfat
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosin-triphosphat-Austausch-Faktor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	<i>N</i> -(2-hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethanesulfon Säure)
HPLC	high performance liquid chromatography
hub/min	Hübe pro Minute
HTS	High Throughput Screening (Hochdurchsatztestung)
IP ₃	Inositol-triphosphat
K _i	Inhibitionskonstante
K _d	Dissoziationskonstante
KO	knockout
IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration
I.U.	International Units (Internationale Einheiten) KW-3902
i.v.	Intravenös
LSC	Liquid Scintillation Counting (Flüssigkeits-Szintillations-Messung) mM, μM, nM
M	Molar
MeOH	Methanol
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NB	Non-specific binding (unspezifische Bindung)
n.b.	nicht bestimmt
ND	nicht beschrieben (not described)
NECA	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance

PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PEI	Polyethylenimin
PLC	Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PMT	<i>Pasteurella multocida</i> toxin
PS	Penicilline-Streptomycin Lösung
PSB	Pharmaceutical Sciences Bonn
PTX	Pertussistoxin
rk	rekombinant
RG	Reagenzgläser
RGS	G-Protein-Signalprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed phase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAR	Structure Activity Relationship (Struktur-Wirkungs-Beziehung)
SCH	SCH-202676
SEM	standard error of the mean
Sf9	Immortalisierte Insekten-Zelllinie aus Ovarien von <i>Spodoptera frugiperda</i>
Tab.	Tabelle
TB	Total binding (Gesamtbindung)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UMP	Uridin-Monophosphat
UHTS	Ultra High Throughput Screening (ultra Hochdurchsatztestung)
WBB	Wasserstoffbrückenbindung
wt	wild-type
YM	YM-254890
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

14. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Phylogenetischer GPCR-Baum.....	2
Abb. 2: Aktivierung eines GPCR ⁷	3
Abb. 3: G α -Signaltransduktionswege. ⁹ AC (Adenylatzyklase), ATP (Adenosin-trisphosphat), cAMP (cyclisches-Adenosin-Monophosphat), DAG (Diacylglycerol), IP ₂ (Inositol-bisphosphat), IP ₃ (Inositol-trisphosphat), PIP ₂ (Phosphatidylinositol-bisphosphat), PKC (Proteinkinase C), PLC (Phospholipase C).	4
Abb. 4: G _q -vermittelte Signaltransduktion (nach Sinnauer Associates, Inc. 2001). ¹¹	4
Abb. 5: Darstellung des G-Proteins (G $\alpha_{q\beta\gamma}$ -Komplex) (links) und Linker/Switch Region der α -Untereinheit (rechts). ¹²	5
Abb. 6: Phospholipase C β . ¹⁰	7
Abb. 7: G _q -Zyklus und die involvierten regulatorischen Moleküle, modifiziert nach Mizuno et al. ¹⁰ ...	8
Abb. 8: Veranschaulichung des Hill-Koeffizienten. ⁷²	20
Abb. 9: Katalytische Hydrierung von FR900359. ⁵⁹	21
Abb. 10: Katalytische Tritiiierung von FR900359.....	22
Abb. 11: Bindung der verschiedenen [³ H]PSB-15900-Isomere in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 5 und 15 nM) an Rattencortex-Membranpräparationen (10 μ g Protein) bei 0 °C, unter nicht optimierten Assay-Bedingungen. Unspezifische Bindung und Gesamtbindung dargestellt in cpm.	22
Abb. 12: Bindung der verschiedenen [³ H]PSB-15900-Isomere an humane Thrombozyten-Membran-Präparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C.....	23
Abb. 13 Wichtige exprimierte GPCRs in humanen Thrombozyten. ⁷⁴	24
Abb. 14: Expressionsraten von GPCRs in Thrombozyten, bezogen auf die Expressionrate des P2Y ₁ -Rezeptors. Daten aus mRNA-Expression erhoben. G _q -gekoppelte Rezeptoren sind in rot markiert. ⁷⁴	24
Abb. 15: Tween 20.	25
Abb. 16: Polyethylenimin (PEI).	25
Abb. 17: Anteil an frei vorliegendem Radioliganden (10 nM [³ H]PSB-15900) in %, bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Rattencortex-Membranpräparationen.	26
Abb. 18: Anteil an frei vorliegendem Radioliganden (10 nM und 30 nM [³ H]PSB-15900) in %, bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Rattencortex-Membranpräparationen (10 μ g Protein).	26
Abb. 19: Darstellung der unspezifischen Bindung und der Gesamtbindung von 1 und 10 nM [³ H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 μ g Protein).	27
Abb. 20: Spezifische Bindung (cpm) von 10 und 30 nM [³ H]PSB-15900 mit verschiedenen Konzentrationen an Rattencortex-Membranpräparationen.	27
Abb. 21: Elektronenmikroskopaufnahme von einem nichtmodifizierten Glasfasermembranfilter ⁷⁹ . .	28
Abb. 22: Unspezifische Bindung von 10 nM [³ H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 μ g Protein) bei 0 °C Inkubationstemperatur in cpm, unter Inkubation in diversen Puffersystemen mit anschließender Filtration über GF/B-Filter. Als Waschpuffer wurde 50 mM Tris, pH 7,4, 0,1% BSA verwendet.	31
Abb. 23: Unspezifische Bindung von 10 nM [³ H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 μ g Protein) bei 0 °C Inkubationstemperatur in cpm, unter Inkubation in diversen Puffersystemen mit anschließender Filtration über GF/C-Filter. Als Waschpuffer wurde 50 mM Tris, pH 7,4, 0,1% BSA verwendet.	31
Abb. 24: Vergleich der unspezifischen Bindung in cpm von 10 nM [³ H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 μ g Protein) bei 0 °C Inkubationstemperatur zwischen GF/C-Filtern mit und ohne Präinkubation mit 0,3% PEI-Lösung unter Verwendung eines 50 mM	

	pH 7,4 Tris-HCl Waschpuffers, dem 0,1% Tween 20 und 0,1 % BSA zugesetzt wurden. Der pH-Wert aller verwendeten Inkubationspuffer betrug 7,4.	32
Abb. 25:	Vergleich der unspezifischen Bindung in cpm zwischen optimierten und nichtoptimierten Inkubations- und Filtrationsbedingungen unter Verwendung von 10 nM [³ H]PSB-15900 an Rattencortex Membranpräparationen (10 µg Protein).	33
Abb. 26:	Anteil des frei vorliegenden Radioliganden (5, 10, 25 und 30 nM [³ H]PSB-15900) in %, bei Inkubation mit Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) unter optimierten Bedingungen.	33
Abb. 27:	Unspezifische und Gesamtbindung von 10 nM [³ H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein).	34
Abb. 28:	Nicht-spezifische und Gesamtbindung von 10 nM [³ H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (0, 10, 30, 50, 100, 150, 200 µg Protein)	35
Abb. 29:	Spezifische Bindung von 10 nM [³ H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (0, 10, 30, 50, 100, 150, 200 µg Protein)	35
Abb. 30:	Nichtspezifische Bindung und Gesamtbindung von 2 und 15 nM [³ H]PSB-1500 und [³ H]iso-PSB-1500 an Rattenstriatum-Membranpräparationen (150 µg Protein) bei 0°C.	37
Abb. 31:	Spezifische Bindung von 2 und 15 nM [³ H]PSB-15900 und [³ H]iso-PSB-1500 an Rattenstriatum-Membranpräparationen (150 µg Protein) bei 0 °C.	37
Abb. 32:	Gesamtbindung und unspezifische Bindung (A) und spezifische Bindung (B) von 10 nM [³ H]PSB-15900 an 1:10 und 1:100 Verdünnungen von PRP.	39
Abb. 33:	Vergleich der Gesamtbindung und unspezifischen Bindung (A) und der spezifische Bindung (B) von 10 nM [³ H]PSB-15900 an PRP und PPP mit einer Verdünnung von 1:10.	39
Abb. 34:	Assoziationsexperimente von 10 nM [³ H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 0 °C (A), RT (B) und 37 °C Inkubationstemperatur (C); an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0°C (D) und an intakten humanen Thrombozyten (7,5x 10 ⁶ Thrombozyten) (E).	41
Abb. 35:	Dissoziationsexperimente von 10 nM [³ H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) bei 0 °C (A), RT (B) und 37 °C Inkubationstemperatur (C); an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0°C (D) und an intakten humanen Thrombozyten (7,5x 10 ⁶ Thrombozyten) bei 37 °C (E).	43
Abb. 36:	Zusammenfassung der Halbwertszeiten der Assoziation (links) und Dissoziation (rechts) von 10 nM [³ H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen, intakten humanen Thrombozyten und Rattencortex-Membranpräparationen bei verschiedenen Temperaturen.	45
Abb. 37:	Sättigungsexperimente von [³ H]PSB-15900 an Membranpräparationen von humanen Thrombozyten (50 µg Protein) bei 0 °C (A), RT (C) und 37 °C (E), Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0 °C (G) und intakten humanen Thrombozyten bei 37 °C (7,5 x 10 ⁶ Thrombozyten) (I). Gesamtbinding (■), unspezifische Bindung (●) und spezifische Bindung (▲) wurden bei einer Radioligand-Konzentration von 1 bis 60 nM gemessen. (B), (D), (F), (H) und (I) zeigen die korrespondierenden Scatchard-Rosenthal-Plots.	46
Abb. 38:	Kompetitionskurve von FR900359 an Rattencortex-Membranpräparation (10 µg Protein) gegen 5 nM [³ H]PSB-15900 bei 0 °C.	48
Abb. 39:	pK _i -Wert von FR900359 an Rattencortex-Membranpräparation (10 µg Protein) gegen 5 nM [³ H]PSB-15900 bei 0 °C.	48
Abb. 40:	FR900359 und FR-Derivate aus <i>A. crenata</i> isoliert bzw. semisynthetisch hergestellt.	49
Abb. 41:	Struktur von YM-254890.	50

Abb. 42: Bindungskurven von $G\alpha_q$ -Inhibitoren an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) gegen 5nM [3 H]PSB-15900 bei 37 °C.	51
Abb. 43: pK_i -Werte von $G\alpha_q$ -Inhibitoren an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) gegen 5nM [3 H]PSB-15900 bei 37 °C. Signifikant unterschiedlich zu FR900359: * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$; **** = $P \leq 0.0001$	51
Abb. 44: Kompetitionskurven: FR900359; YM-254890 an intakten humanen Thrombozyten ($7,5 \times 10^6$ Thrombozyten) gegen 5nM [3 H]PSB15900 bei 37 °C.	53
Abb. 45: pK_i -Werte von FR900359; YM-254890 an intakten humanen Thrombozyten ($7,5 \times 10^6$ Thrombozyten) gegen 5 nM [3 H]PSB15900 bei 37°C.	53
Abb. 46: Darstellung des statistischen Trennbandes zwischen Positiv- und Negativkontrolle. ⁸⁶	54
Abb. 47: Brandel 96er-Zellharvester, geschlossen (links), geöffnet (rechts).	55
Abb. 48: Brandel 24er-Zellharvester.	55
Abb. 49: TopCount NXT® Packard.	55
Abb. 50: GF/C - UniFilter™ 96-wells (oben); GF/C Membranfilter für 24-wells (unten).	55
Abb. 51: Vergleich der Bindungskurven von FR900359 im 96- und 24-well Format an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) gegen [3 H]PSB-15900 (5 nM) bei 37 °C.	56
Abb. 52: Bindungskurven von FR900395 an verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten Membranpräparationen und Membranpräparationen von HEK- $G\alpha_q$ -KO-Zellen gegen 5 nM [3 H]PSB-15900 bei 37 °C.	61
Abb. 53: Gesamtbindung und unspezifische-Bindung von [3 H]PSB-15900 an verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten und Membranpräparationen von HEK- $G\alpha_q$ -KO Zellen (30 μ g Protein) bei 37 °C.	61
Abb. 54 $G\alpha_q$ -Expressionsniveaus verschiedener Gewebe und Zelllinien aus Nagetieren und menschlichen Ursprungs. Die Ergebnisse zeigen die spezifische Bindung (cpm) von [3 H]PSB-15900 (5 nM) an Präparation (20 μ g Proteingehalt) der verschiedenen Gewebe oder der Zelllinien.	63
Abb. 55: mRNA-Expressionslevels von GNAQ in TPM (Transcripts Per Million) von verschiedenen Gewebe und Zelllinien aus Nagetieren und menschlichen Ursprungs.	63
Abb. 56: Einfluss von agonistischen Modulatoren auf die Bindung von 5nM [3 H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C. Der Einfluss auf die Bindung war für 100 μ M TFLLR-NH ₂ statistisch signifikant. P-Wert: 0,117 (unpaired two-tailed t test).	66
Abb. 57: Einfluss von Ionen auf die Bindung von 5nM [3 H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C. Der Einfluss auf die Bindung war für 100 mM Mg ²⁺ , 10 mM und 100 mM Ca ²⁺ statistisch signifikant. P-Wert: 0,117 (unpaired two-tailed t test).	67
Abb. 58: Einfluss von Nukleotiden auf die Bindung von 5nM [3 H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C.	67
Abb. 59: Einfluss von Phospholipiden auf die Bindung von 5nM [3 H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C.	67
Abb. 60: Strukturen von YM-254890 und FR900359. Unterschiede sind in Orange hervorgehoben. ...	68
Abb. 61: Katalytische Hydrierung von YM-254890. ⁵¹	69
Abb. 62: Katalytische Tritiierung von YM-254890.	70
Abb. 63: Bindung der beiden von YM-254890 abgeleiteten ³ H-markierten Diastereomere in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 5 und 15 nM) an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C. Unspezifische Bindung und Gesamtbindung in cpm dargestellt.	70
Abb. 64: Gesamtbindung, unspezifische Bindung und spezifische Bindung in cpm von 5 nM [3 H]PSB-16254 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C. Die	

	nicht spezifische Bindung wurde gegen 5 μM YM-254890, die Gesamtbindung gegen DMSO aufgenommen.....	71
Abb. 65:	Anteil (%) von frei vorliegenden, nicht gebundenen [^3H]PSB-16254 bei verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 15 nM) an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) bei 37 $^\circ\text{C}$	72
Abb. 66:	Assoziationsexperimente von 10 nM [^3H]PSB-16254 an humanen Thrombozyten-Membranpräparation (50 μg Protein) bei RT (A), 37 $^\circ\text{C}$ (B) und bei 37 $^\circ\text{C}$ an intakten humanen Thrombozyten ($7,5 \times 10^6$ Thrombozyten) (E).....	73
Abb. 67:	Dissoziationsexperimente von 5 nM [^3H]PSB-16254 an 50 μg humanen Thrombozyten Membranpräparation bei RT (A), 37 $^\circ\text{C}$ (B) und an intakten humanen Thrombozyten ($7,5 \times 10^6$ Thrombozyten) bei 37 $^\circ\text{C}$ (E).....	75
Abb. 68:	Zusammenfassung der Halbwertszeiten der Assoziation, Dissoziation und Signifikanzen der ermittelten Werte zwischen [^3H]PSB-15900 und [^3H]PSB-16254 an intakten Thrombozyten, verschiedenen Membranpräparationen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen.	77
Abb. 69:	Sättigungsexperimente von [^3H]PSB-16254 an Membranpräparationen von humanen Thrombozyten (50 μg Protein) bei 37 $^\circ\text{C}$ (A). Gesamtbindung (\blacksquare), unspezifische Bindung (\bullet) und spezifische Bindung (\blacktriangle) wurden bei einer Radioligandkonzentration von 1,0 bis 60 nM gemessen. (B) zeigt den korrespondierenden Scatchard-Rosenthal Plot.	77
Abb. 70:	Kompetitionskurven von FR900359 und YM-254890 (links) an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) gegen 5 nM [^3H]PSB16254 bei 37 $^\circ\text{C}$ und korrespondierende pK_i -Werte (rechts).....	80
Abb. 71:	Bindungskurven von YM-254890 gegen 5 nM [^3H]PSB-16254 an verschiedenen $\text{G}\alpha_q$ -Untereinheiten und Membranpräparationen (30 μg Protein) von HEK-CRISPR- $\text{G}\alpha_q$ -KO Zellen bei 37 $^\circ\text{C}$	83
Abb. 72:	Gesamtbindung und unspezifische-Bindung von 5 nM [^3H]PSB-16254 an verschiedenen $\text{G}\alpha_q$ -Untereinheiten Membranpräparationen und Membranpräparationen (30 μg Protein) von HEK-CRISPR- $\text{G}\alpha_q$ -KO-Zellen bei 37 $^\circ\text{C}$	83
Abb. 73:	$\text{G}\alpha_{q/11}\beta\gamma$ gebunden an YM-254890.....	85
Abb. 74:	2D-Interaktions-Diagramm von YM-254890 in der Bindungstasche. ^a	85
Abb. 75:	Detaillierte Darstellung der Bindungsposition von YM-254890 an der $\text{G}\alpha_q$ -Untereinheit (links); Veranschaulichung der Bindung von YM an der $\text{G}\alpha_q$ -Untereinheit (rechts).	86
Abb. 76:	Strukturen von [^3H]PSB-16254 und [^3H]PSB-15900 im direkten Vergleich.....	87
Abb. 77:	YM-254890 (a) und FR900359 (b) in der Bindungstasche ; Schematische Darstellung der unterschiedlichen Bindung von YM-254890 (c) und FR900359 (d).....	88
Abb. 78:	Substanzbibliothek des Arbeitskreises Müller, Universität Bonn.	89
Abb. 79:	Darstellung aller getesteten Substanzen in Bezug auf Ihre Bindung. Hits sind mit roten Pfeilen markiert.	91
Abb. 80:	Strukturen der beiden Hit-Verbindungen, Ebselen (links) und SCH-202676 (rechts).....	91
Abb. 81:	Verschieden Wirkungen von Ebselen. ¹⁰¹	92
Abb. 82:	Reaktion von SCH-202676 mit einem Thiol-Rest eines Zysteins (in Gelb markiert). ¹⁰⁴	94
Abb. 83:	Kompetitionskurven von Ebselen (links) und SCH-202676 (rechts) gegen 5 nM [^3H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) bei 37 $^\circ\text{C}$	94
Abb. 84:	Effekt von DTT auf die Bindung von Ebselen und SCH-202676 gegen [^3H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μg Protein) bei 37 $^\circ\text{C}$. Protein wurde 10 min mit DTT vorinkubiert bevor Radioligand und Testsubstanz hinzugefügt wurden. ...	95

Abb. 85: Konkurrenz von FR900359 gegen 5 nM [³ H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C. Protein wurde 10 min mit DTT vorinkubiert bevor Radioligand und Testsubstanz hinzugefügt wurden.....	95
Abb. 86: Auswaschbarkeit der Bindung von SCH-202676 und Ebselen nach 60 min Präinkubation an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) mit anschließender Konkurrenz gegen 5 nM [³ H]PSB-15900 bei 37 °C.	97
Abb. 87: Durch Docking-Simulationen berechnete allosterische Bindungstasche für Ebselen. ^a	98
Abb. 88: Bindungstasche von YM-254890 und allosterische Bindungstasche von Ebselen. ^a	98
Abb. 89: Beeinflussung der Bindung von YM-254890 durch allosterische Bindung von Ebselen und SCH-202676.	98
Abb. 90: Inhibitionskurven (links) und pIC ₅₀ -Werte (rechts) von FR900359 an verschiedenen Insekten-Proteinen und humanen Thrombozyten-Membranpräparationen gegen 5 nM [³ H]PSB-15900 bei 37 °C.	100
Abb. 91: BIM-46174 (Monomer) (links); BIM-46187 (Dimer) (rechts).	101
Abb. 92: Konkurrenzstudien von GÜ3103, GÜ3123 und GÜ3128 gegen 5 nM [³ H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C Inkubationstemperatur.....	104
Abb. 93: Konkurrenzstudien von BIM-46174 (links) und BIM-46187 (rechts) gegen 5 nM [³ H]PSB-15900 an intakten humanen Thrombozyten bei 37 °C.....	105
Abb. 94: Kalibriergerade von FR900359 (links) und YM-254890 (rechts) in Methanol im Konzentrationsbereich von 0,5 – 20 nM für FR900359 und YM-254890 0,5 - 10 nM.....	107
Abb. 95: Genauigkeit der etablierten LCMS-Methode für verschiedene Konzentrationen von FR900359 (links) und YM-254890 (rechts).	107
Abb. 96: Stabilität von FR900359 unter verschiedenen Bedingungen. FR900359 in Blau, Isomerisierungsprodukt in Rot dargestellt.	112
Abb. 97: Metabolisierung von FR900359 durch humane Lebermikrosomen.....	114
Abb. 98: Inhibition von CYP450 Enzymen durch FR900359. ^a	114
Abb. 99: Bestimmung der Wiederfindungsrate einer Flüssig-flüssig-Extraktion von FR900359 aus nativen Geweben mit anschließender Aufkonzentrierung.	117
Abb. 100: Wiederfindungsraten von FR900359 nach Extraktion in verschiedenen Geweben und Plasma.	118
Abb. 101: Strukturen von Erythromycin A (links), Ciclosporin (mitte) und FR900359 (rechts).....	119
Abb. 102: Wiederfindungsraten von Ciclosporin, Erythromycin und FR900359 nach Extraktion aus verschiedenen Geweben und Plasma.....	120
Abb. 103: Wiederfindungsraten von Ciclosporin als Internen-Standard und FR900359 nach Extraktion aus verschiedenen Geweben und Plasma.	121
Abb. 104: Wiederfindungsraten von YM-254890 als Internen-Standard und FR900359 nach Extraktion aus verschiedenen Geweben und Plasma.	121
Abb. 105: Konzentrationen ± SEM von FR900359 in nmol/kg Gewebe (oben) und nmol/g Protein (unten) in verschiedenen Geweben nach peroraler Applikation (100 µl einer 100 µM Stammlösung) an Mäusen aus <i>in vivo</i> -Studien.....	124
Abb. 106: Konzentrationen ± SEM von FR900359 in nmol/kg Gewebe (oben) und nmol/g Protein (unten) in verschiedenen Geweben nach inhalativer Applikation (20 µl einer 100 µM Stammlösung) an Mäusen aus <i>in vivo</i> -Studien.....	125
Abb. 107: Konkurrenzkurven von FR900359 und YM-254890 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) gegen 5 nM [³ H]PSB16254 bei 37 °C.	126
Abb. 108: Assoziations- (links) und Dissoziationsexperimente (rechts) von [³ H]PSB-15900 und [³ H]PSB-16254 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 µg Protein) bei 37 °C...	127

Abb. 109: Bindungskurven von FR900395 gegen [³ H]PSB-15900 (links) und YM-254890 gegen [³ H]PSB-16254 (rechts) an Membranpräparationen der verschiedenen Gα _q -Untereinheiten (30 µg Protein) exprimiert in HEK-Gα _q -KO-Zellen bei 37 °C.....	128
Abb. 110 Gα _q -Expressionsniveaus verschiedener Gewebe und Zelllinien aus Nagetieren und menschlichen Ursprungs. Die Ergebnisse zeigen die spezifische Bindung (cpm) von [³ H]PSB-15900 (5 nM) an Präparation (20 µg Proteingehalt) der verschiedenen Gewebe oder der Zelllinien.....	128
Abb. 111: Kalibriergerade von FR900359 (links) und YM-254890 (rechts) in Methanol im Konzentrationsbereich von 0,5 – 20 nM für FR900359 und YM-254890 0,5 - 10 nM.....	129
Abb. 112: Konzentrationen ± SEM von FR900359 in nmol/g Protein in verschiedenen Geweben nach peroraler Applikation (100 µl einer 100 µM Stammlösung) an Mäusen aus <i>in vivo</i> -Studien.	129

15. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Gα _q -Subspezies und ihre Bindungs- oder Regulationsmoleküle (Säugetiere). ¹⁰	6
Tab. 2: Übersicht und Einteilung der Tritiiierungsprodukte von FR900359.	22
Tab. 3: Unspezifische Bindung von 10 nM [³ H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0 °C Inkubationstemperatur unter Filtration über GF/B-Filter mit verschiedenen Puffern, pH-Werten und Zusätzen.	29
Tab. 4: Unspezifische Bindung von 10 nM [³ H]PSB-15900 an Rattencortex-Membranpräparationen (10 µg Protein) bei 0 °C Inkubationstemperatur unter Filtration über GF/C-Filter mit verschiedenen Puffern, pH-Werten und Zusätzen.	30
Tab. 5: Optimierte Bedingung für die Durchführung eines Bindungsassays mit [³ H]PSB-15900 an Rattencortex Membranpräparationen.....	34
Tab. 6: Bedingung für die Durchführung eines Bindungsassays mit [³ H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen.....	36
Tab. 7: Bedingungen für die Durchführung eines Bindungsassays mit [³ H]PSB-15900 an intakten humanen Thrombozyten.	38
Tab. 8: Zusammenfassung der Halbwertszeiten der Assoziation und Dissoziation von 10 nM [³ H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen, intakten humanen Thrombozyten und Rattencortex-Membranpräparationen.	44
Tab. 9: Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten an Rattencortex-Membranpräparation (10 µg Protein) gegen 5 nM [³ H]PSB-15900 bei 0 °C Inkubationstemperatur.	48
Tab. 10: Ergebnisse und Signifikanzen (unpaired two tailed t test) aus Konkurrenzexperimenten an humanen Thrombozyten-Membranpräparation (50 µg Protein) gegen 5nM [³ H]PSB-15900 bei 37°C.	50
Tab. 11: Ergebnisse und Signifikanzen (unpaired two tailed t test) aus Konkurrenzexperimenten an intakten humanen Thrombozyten (7,5 x 10 ⁶ Thrombozyten) gegen 5nM [³ H]PSB-15900 bei 37°C.	52
Tab. 12: Vergleich der Ergebnisse von FR900359 gegen [³ H]PSB15900 zwischen HTS- und Standard-Assay.	56
Tab. 13: Berechnung des Z'-Wertes für [³ H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen.....	57

Tab. 14: Berechnete pseudo K_d -Werte und pseudo B_{max} -Werte von 5 nM [3H]PSB-15900 an verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten bei 37 °C.....	60
Tab. 15: Berechnete pseudo K_i -Werte für FR900359 gegen 5 nM [3H]PSB-15900 an verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten bei 37°C.....	60
Tab. 16: Gegen 5 nM [3H]PSB-15000 an humane Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C getestete Rezeptor-Agonisten, Ionen, Nukleotide und Phospholipide.	65
Tab. 17: Übersicht und Einteilung der Tritiiierungsprodukte von YM-254890.....	70
Tab. 18: Vergleich der Assoziationskinetiken zwischen 10 nM [3H]PSB-16254 und [3H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein).	74
Tab. 19: Vergleich der Dissoziationskinetiken zwischen [3H]PSB-16254 und [3H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen.....	75
Tab. 20: Zusammenfassung der Halbwertszeiten der Assoziation, Dissoziation und Signifikanzen der ermittelten Werte zwischen [3H]PSB-15900 und [3H]PSB-16254.....	76
Tab. 21: Zusammenfassung der ermittelten K_d -Werte und B_{max} -Werte aus Sättigungsstudien von [3H]PSB-15900 und [3H]PSB-16254 an Zellen und Membranpräparationen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen.	78
Tab. 22: Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten an humanen Thrombozyten-Membranpräparation (50 μ g Protein) gegen 5 nM [3H]PSB-16254 bei 37 °C.....	80
Tab. 23: Vergleich der Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten an humanen Thrombozyten-Membranpräparation (50 μ g Protein) gegen 5 nM [3H]PSB-15900 und 5 nM [3H]PSB-16254 bei 37 °C.....	80
Tab. 24: Berechnete pseudo K_d -Werte und pseudo B_{max} -Werte von 5 nM [3H]PSB-16254 an verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten bei 37 °C.....	82
Tab. 25: Berechnete pseudo K_i -Werte für YM-254890 gegen 5 nM [3H]PSB-16254 an verschiedenen $G\alpha_q$ -Untereinheiten bei 37°C.....	82
Tab. 26: Zusammenfassung der ermittelten pseudo K_i -Werte aus Konkurrenzexperimenten gegen verschiedene $G\alpha_q$ -Untereinheiten.	84
Tab. 27: Gegen [3H]PSB-15900 getestete Substanzbibliotheken.....	90
Tab. 28: Liste von Proteinen, deren Aktivität durch Ebselen moduliert wird. ¹⁰¹	93
Tab. 29: Affinitäten der Hit-Verbindungen aus Testungen gegen [3H]PSB-15900.	94
Tab. 30: IC_{50} - und pIC_{50} -Werte von FR900359 an verschiedenen Insekten-Proteinen und humanen Thrombozyten-Membranpräparationen gegen 5 nM [3H]PSB-15900 bei 37 °C.....	100
Tab. 31: Strukturen der getesteten Verbindungen gegen 5nM [3H]PSB-15900 an humanen Thrombozyten-Membranpräparationen (50 μ g Protein) bei 37 °C.	102
Tab. 32: Caco-2-Permeabilität von FR900359 und anderen Arzneistoffen zum Vergleich.	114
Tab. 33: Proteingehalt der getesteten Gewebe und Wiederfindungsraten von FR900359 nach Extraktion in verschiedenen Geweben und Plasma.	118
Tab. 34: Konzentrationen \pm SEM von FR900359 in nmol/kg Gewebe und nmol/g Protein in verschiedenen Geweben nach inhalativer Applikation (20 μ l einer 100 μ M Stammlösung) an Mäusen aus <i>in vivo</i> -Studien.....	124
Tab. 35: Konzentrationen \pm SEM von FR900359 in nmol/kg Gewebe und nmol/g Protein in verschiedenen Geweben nach inhalativer Applikation (20 μ l einer 100 μ M Stammlösung) an Mäusen aus <i>in vivo</i> -Studien.....	125

16. VERZEICHNIS MATHEMATISCHER GLEICHUNGEN

Gl. 1: Das Massenwirkungsgesetz.....	15
Gl. 2: Gleichgewicht der Reaktion zwischen Assoziation und Dissoziation.	16

Gl. 3: Berechnung des K_d -Wertes I.....	16
Gl. 4: Berechnung von B_{max}	16
Gl. 5: Berechnung des K_d -Wertes II.....	16
Gl. 6: Die Sättigungsfunktion.	16
Gl. 7: Bildung der Rezeptor-Ligand-Komplexe in Abhängigkeit von der Zeit.	17
Gl. 8: Berechnung des K_i -Wertes.	17
Gl. 9: Berechnung des K_d -Wertes III.....	17
Gl. 10: Berechnung von B_{max} II.	18
Gl. 11: Analyse nach Scatchard.....	18
Gl. 12: Berechnung der apparenten Assoziationsgeschwindigkeitskonstante I.....	19
Gl. 13: Berechnung von der apparenten Assoziationsgeschwindigkeitskonstante II.....	19
Gl. 14: Zerfallsgeschwindigkeit der Dissoziation.	19
Gl. 15: Berechnung der Halbwertszeit.	19
Gl. 16: Hemmung eines Rezeptors durch einen Inhibitor.	20
Gl. 17: Der Hill-Koeffizient.	20

17. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R. *Biochemie*; Thieme: Stuttgart, 2016.
- (2) Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **2003**, *63*, 1256–1272.
- (3) Oldham, W. M.; Hamm, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9*, 60–71.
- (4) Lagerström, M. C.; Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 339–357.
- (5) Strotmann, R.; Schröck, K.; Bösel, I.; Stäubert, C.; Russ, A.; Schöneberg, T. Evolution of GPCR. Change and continuity. *Mol Cell Endocrinol* **2011**, *331*, 170–178.
- (6) Katritch, V.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* **2012**, *33*, 17–27.
- (7) Smith, T. H.; Sim-Selley, L. J.; Selley, D. E. Cannabinoid CB1 receptor-interacting proteins. Novel targets for central nervous system drug discovery? *Br J Pharmacol* **2010**, *160*, 454–466.
- (8) Simon, M. I.; Strathmann, M. P.; Gautam, N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **1991**, *252*, 802–808.
- (9) Cheng, Z.; Garvin, D.; Paguio, A.; Stecha, P.; Wood, K.; Fan, F. Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr Chem Genomics* **2010**, *4*, 84–91.
- (10) Mizuno, N.; Itoh, H. Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals* **2009**, *17*, 42–54.
- (11) Purves, D.; Williams, S. M., Eds. *Neuroscience*; Sinauer Associates: Sunderland, Mass, 2001.
- (12) Nishimura, A.; Kitano, K.; Takasaki, J.; Taniguchi, M.; Mizuno, N.; Tago, K.; Hakoshima, T.; Itoh, H. Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* **2010**, *107*, 13666–13671.
- (13) Rhee, S. G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **2001**, *70*, 281–312.
- (14) Wu, D.; Katz, A.; Lee, C. H.; Simon, M. I. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 25798–25802.

- (15) Bristol, J.A.; Rhee, S. G. Regulation of phospholipase C- β isozymes by G-proteins. *Trends Endocrin Met* **1994**, *5*, 402–406.
- (16) Hepler, J. R.; Kozasa, T.; Smrcka, A. V.; Simon, M. I.; Rhee, S. G.; Sternweis, P. C.; Gilman, A. G. Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant Gq α and G11 α . Activation of purified phospholipase C isozymes by G α subunits. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 14367–14375.
- (17) Jiang, H.; Wu, D.; Simon, M. I. Activation of phospholipase C beta 4 by heterotrimeric GTP-binding proteins. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 7593–7596.
- (18) Kozasa, T.; Hepler, J. R.; Smrcka, A. V.; Simon, M. I.; Rhee, S. G.; Sternweis, P. C.; Gilman, A. G. Purification and characterization of recombinant G16 α from Sf9 cells. Activation of purified phospholipase C isozymes by G-protein α subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**, *90*, 9176–9180.
- (19) Biddlecome, G. H.; Berstein, G.; Ross, E. M. Regulation of phospholipase C- β 1 by Gq and m1 muscarinic cholinergic receptor. Steady-state balance of receptor-mediated activation and GTPase-activating protein-promoted deactivation. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 7999–8007.
- (20) Chidiac, P.; Ross, E. M. Phospholipase C- β 1 directly accelerates GTP hydrolysis by Galphaq and acceleration is inhibited by Gbeta gamma subunits. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 19639–19643.
- (21) Paulssen, R. H.; Woodson, J.; Liu, Z.; Ross, E. M. Carboxyl-terminal fragments of phospholipase C- β 1 with intrinsic Gq GTPase-activating protein (GAP) activity. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 26622–26629.
- (22) Siderovski, D. P.; Willard, F. S. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein α subunits. *Int J Biol Sci* **2005**, *1*, 51–66.
- (23) Hollinger, S.; Hepler, J. R. Cellular regulation of RGS proteins. Modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* **2002**, *54*, 527–559.
- (24) Huang, C.; Hepler, J. R.; Gilman, A. G.; Mumby, S. M. Attenuation of Gi- and Gq-mediated signaling by expression of RGS4 or GAIP in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**, *94*, 6159–6163.
- (25) Heximer, S. P.; Watson, N.; Linder, M. E.; Blumer, K. J.; Hepler, J. R. RGS2/GOS8 is a selective inhibitor of Gq α function. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**, *94*, 14389–14393.
- (26) Beadling, C.; Druet, K. M.; Richter, G.; Kehrl, J. H.; Smith, K. A. Regulators of G protein signaling exhibit distinct patterns of gene expression and target G protein specificity in human lymphocytes. *J Immunol* **1999**, *162*, 2677–2682.
- (27) Scheschonka, A.; Dessauer, C. W.; Sinnarajah, S.; Chidiac, P.; Shi, C. S.; Kehrl, J. H. RGS3 is a GTPase-activating protein for g(i α) and g(q α) and a potent inhibitor of signaling by GTPase-deficient forms of g(q α) and g(11 α). *Mol Pharmacol* **2000**, *58*, 719–728.
- (28) Sadok, A.; Marshall, C. J. Rho GTPases. Masters of cell migration. *Small GTPases* **2014**, *5*, e29710.
- (29) Lutz, S.; Shankaranarayanan, A.; Coco, C.; Ridilla, M.; Nance, M. R.; Vettel, C.; Baltus, D.; Evelyn, C. R.; Neubig, R. R.; Wieland, T.; Tesmer, J. J. G. Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* **2007**, *318*, 1923–1927.
- (30) Miller, K. G.; Emerson, M. D.; McManus, J. R.; Rand, J. B. RIC-8 (Synembryn). A novel conserved protein that is required for G(q) α signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron* **2000**, *27*, 289–299.
- (31) Tõnissoo, T.; Meier, R.; Talts, K.; Plaas, M.; Karis, A. Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. *Gene Expr Patterns* **2003**, *3*, 591–594.
- (32) Dannecker, L. E. C. von; Mercadante, A. F.; Malnic, B. Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphaolf. *J Neurosci* **2005**, *25*, 3793–3800.
- (33) Brown, D. A.; London, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 17221–17224.
- (34) Bhatnagar, A.; Sheffler, D. J.; Kroeze, W. K.; Compton-Toth, B.; Roth, B. L. Caveolin-1 interacts with 5-HT2A serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected Galphaq-coupled protein receptors. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 34614–34623.

- (35) Schulte, T.; Paschke, K. A.; Laessing, U.; Lottspeich, F.; Stuermer, C. A. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development* **1997**, *124*, 577–587.
- (36) Browman, D. T.; Hoegg, M. B.; Robbins, S. M. The SPFH domain-containing proteins. More than lipid raft markers. *Trends Cell Biol* **2007**, *17*, 394–402.
- (37) Yamauchi, J.; Nagao, M.; Kaziro, Y.; Itoh, H. Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase by Signaling through G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 27771–27777.
- (38) Moss, J.; Vaughan, M. Activation of adenylate cyclase by cholera toxin. *Annu Rev Biochem* **1979**, *48*, 581–600.
- (39) van Dop, C.; Tsubokawa, M.; Bourne, H. R.; Ramachandran, J. Amino acid sequence of retinal transducin at the site ADP-ribosylated by cholera toxin. *J Biol Chem* **1984**, *259*, 696–698.
- (40) Katada, T.; Ui, M. Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1982**, *79*, 3129–3133.
- (41) Kurose, H.; Katada, T.; Amano, T.; Ui, M. Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J Biol Chem* **1983**, *258*, 4870–4875.
- (42) Fields, T. A.; Casey, P. J. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* **1997**, *321 (Pt 3)*, 561–571.
- (43) Foged, N. T. Pasteurella multocida toxin. The characterisation of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs. *APMIS Suppl* **1992**, *25*, 1–56.
- (44) Pettit, R. K.; Ackermann, M. R.; Rimler, R. B. Receptor-mediated binding of Pasteurella multocida dermonecrotic toxin to canine osteosarcoma and monkey kidney (vero) cells. *Lab Invest* **1993**, *69*, 94–100.
- (45) Murphy, A. C.; Rozengurt, E. Pasteurella multocida toxin selectively facilitates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by bombesin, vasopressin, and endothelin. Requirement for a functional G protein. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 25296–25303.
- (46) Wilson, B. A.; Ho, M. Pasteurella multocida toxin as a tool for studying Gq signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **2004**, *152*, 93–109.
- (47) Wilson, B. A.; Zhu, X.; Ho, M.; Lu, L. Pasteurella multocida toxin activates the inositol triphosphate signaling pathway in Xenopus oocytes via G(q)alpha-coupled phospholipase C-beta1. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 1268–1275.
- (48) Orth, J. H. C.; Lang, S.; Aktories, K. Action of Pasteurella multocida toxin depends on the helical domain of Galphaq. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 34150–34155.
- (49) Orth, J. H. C.; Fester, I.; Siegert, P.; Weise, M.; Lanner, U.; Kamitani, S.; Tachibana, T.; Wilson, B. A.; Schlosser, A.; Horiguchi, Y.; Aktories, K. Substrate specificity of Pasteurella multocida toxin for α subunits of heterotrimeric G proteins. *FASEB J* **2013**, *27*, 832–842.
- (50) Taniguchi, M.; Nagai, K.; Arai, N.; Kawasaki, T.; Saito, T.; Moritani, Y.; Takasaki, J.; Hayashi, K.; Fujita, S.; Suzuki, K.-I.; Tsukamoto, S.-I. YM-254890, a novel platelet aggregation inhibitor produced by Chromobacterium sp. QS3666. *J Antibiot* **2003**, *56*, 358–363.
- (51) Taniguchi, M.; Suzumura, K.-I.; Nagai, K.; Kawasaki, T.; Takasaki, J.; Sekiguchi, M.; Moritani, Y.; Saito, T.; Hayashi, K.; Fujita, S.; Tsukamoto, S.-I.; Suzuki, K.-I. YM-254890 analogues, novel cyclic depsipeptides with Galpha(q/11) inhibitory activity from Chromobacterium sp. QS3666. *Bioorg Med Chem* **2004**, *12*, 3125–3133.
- (52) Kawasaki, T.; Taniguchi, M.; Moritani, Y.; Hayashi, K.; Saito, T.; Takasaki, J.; Nagai, K.; Inagaki, O.; Shikama, H. Antithrombotic and thrombolytic efficacy of YM-254890, a G q/11 inhibitor, in a rat model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost* **2003**, *90*, 406–413.

- (53) Uemura, T.; Takamatsu, H.; Kawasaki, T.; Taniguchi, M.; Yamamoto, E.; Tomura, Y.; Uchida, W.; Miyata, K. Effect of YM-254890, a specific Galphaq/11 inhibitor, on experimental peripheral arterial disease in rats. *Eur J Pharmacol* **2006**, *536*, 154–161.
- (54) Uemura, T.; Kawasaki, T.; Taniguchi, M.; Moritani, Y.; Hayashi, K.; Saito, T.; Takasaki, J.; Uchida, W.; Miyata, K. Biological properties of a specific Galpha q/11 inhibitor, YM-254890, on platelet functions and thrombus formation under high-shear stress. *Br J Pharmacol* **2006**, *148*, 61–69.
- (55) Takasaki, J.; Saito, T.; Taniguchi, M.; Kawasaki, T.; Moritani, Y.; Hayashi, K.; Kobori, M. A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 47438–47445.
- (56) Xiong, X.-F.; Zhang, H.; Underwood, C. R.; Harpsøe, K.; Gardella, T. J.; Wöldike, M. F.; Mannstadt, M.; Gloriam, D. E.; Bräuner-Osborne, H.; Strømgaard, K. Total synthesis and structure-activity relationship studies of a series of selective G protein inhibitors. *Nat Chem* **2016**, *8*, 1035–1041.
- (57) Zhang, H.; Xiong, X.-F.; Boesgaard, M. W.; Underwood, C. R.; Bräuner-Osborne, H.; Strømgaard, K. Structure-Activity Relationship Studies of the Cyclic Depsipeptide Natural Product YM-254890, Targeting the Gq Protein. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 830–834.
- (58) Fujioka, M.; Koda, S.; Morimoto, Y.; Biemann, K. Structure of FR900359, a cyclic depsipeptide from *Ardisia crenata* sims. *J Org Chem* **1988**, *53*, 2820–2825.
- (59) Schrage, R.; Schmitz, A.-L.; Gaffal, E.; Annala, S.; Kehraus, S.; Wenzel, D.; Büllsbach, K. M.; Bald, T.; Inoue, A.; Shinjo, Y.; Galandrin, S.; Shridhar, N.; Hesse, M.; Grundmann, M.; Merten, N.; Charpentier, T. H.; Martz, M.; Butcher, A. J.; Slodczyk, T.; Armando, S.; Effern, M.; Namkung, Y.; Jenkins, L.; Horn, V.; Stößel, A.; Dargatz, H.; Tietze, D.; Imhof, D.; Galés, C.; Drewke, C.; Müller, C. E.; Hölzel, M.; Milligan, G.; Tobin, A. B.; Gomeza, J.; Dohlman, H. G.; Sondek, J.; Harden, T. K.; Bouvier, M.; Laporte, S. A.; Aoki, J.; Fleischmann, B. K.; Mohr, K.; König, G. M.; Tüting, T.; Kostenis, E. The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. *Nat Commun* **2015**, *6*, 10156.
- (60) Matsuo, A.; Matsumoto, S.-i.; Nagano, M.; Masumoto, K.-h.; Takasaki, J.; Matsumoto, M.; Kobori, M.; Katoh, M.; Shigeyoshi, Y. Molecular cloning and characterization of a novel Gq-coupled orphan receptor GPRg1 exclusively expressed in the central nervous system. *Biochem Bioph Res Co* **2005**, *331*, 363–369.
- (61) Morishita, R.; Ueda, H.; Ito, H.; Takasaki, J.; Nagata, K.-I.; Asano, T. Involvement of Gq/11 in both integrin signal-dependent and -independent pathways regulating endothelin-induced neural progenitor proliferation. *Neurosci Res* **2007**, *59*, 205–214.
- (62) Zaima, K.; Deguchi, J.; Matsuno, Y.; Kaneda, T.; Hirasawa, Y.; Morita, H. Vasorelaxant effect of FR900359 from *Ardisia crenata* on rat aortic artery. *J Nat Med* **2013**, *67*, 196–201.
- (63) Matthey, M.; Roberts, R.; Seidinger, A.; Simon, A.; Schröder, R.; Kuschak, M.; Annala, S.; König, G. M.; Müller, C. E.; Hall, I. P.; Kostenis, E.; Fleischmann, B. K.; Wenzel, D. Targeted inhibition of Gq signaling induces airway relaxation in mouse models of asthma. *Sci Transl Med* **2017**, *9*.
- (64) Carr, R.; Koziol-White, C.; Zhang, J.; Lam, H.; An, S. S.; Tall, G. G.; Panettieri, R. A.; Benovic, J. L. Interdicting Gq Activation in Airway Disease by Receptor-Dependent and Receptor-Independent Mechanisms. *Mol Pharmacol* **2016**, *89*, 94–104.
- (65) Klepac, K.; Kilić, A.; Gnad, T.; Brown, L. M.; Herrmann, B.; Wilderman, A.; Balkow, A.; Glöde, A.; Simon, K.; Lidell, M. E.; Betz, M. J.; Enerbäck, S.; Wess, J.; Freichel, M.; Blüher, M.; König, G.; Kostenis, E.; Insel, P. A.; Pfeifer, A. The Gq signalling pathway inhibits brown and beige adipose tissue. *Nat Commun* **2016**, *7*, 10895.
- (66) Moreno, J. L.; Miranda-Azpiazu, P.; García-Bea, A.; Younkin, J.; Cui, M.; Kozlenkov, A.; Ben-Ezra, A.; Voloudakis, G.; Fakira, A. K.; Baki, L.; Ge, Y.; Georgakopoulos, A.; Morón, J. A.; Milligan, G.; López-Giménez, J. F.; Robakis, N. K.; Logothetis, D. E.; Meana, J. J.; González-Maeso, J. Allosteric signaling through an mGlu2 and 5-HT2A heteromeric receptor complex and its potential contribution to schizophrenia. *Sci Signal* **2016**, *9*, ra5.
- (67) Linden, J. Calculating the dissociation constant of an unlabeled compound from the concentration required to displace radiolabel binding by 50%. *J Cyclic Nucleotide Res* **1982**, *8*, 163–172.

- (68) Motulsky, H. J.; Mahan, L. C. The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action. *Mol Pharmacol* **1984**, *25*, 1–9.
- (69) Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**, *22*, 3099–3108.
- (70) DeBlasi, A.; O'Reilly, K.; Motulsky, H. J. Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* **1989**, *10*, 227–229.
- (71) Scatchard, G. Equilibrium in non-electrolyte mixtures. *Chem Rev* **1949**, *44*, 7–35.
- (72) Wall, M. E.; Hlavacek, W. S.; Savageau, M. A. Design of gene circuits. Lessons from bacteria. *Nat Rev Genet* **2004**, *5*, 34–42.
- (73) Regard, J. B.; Sato, I. T.; Coughlin, S. R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* **2008**, *135*, 561–571.
- (74) Amisten, S.; Braun, O. O.; Bengtsson, A.; Erlinge, D. Gene expression profiling for the identification of G-protein coupled receptors in human platelets. *Thromb Res* **2008**, *122*, 47–57.
- (75) Birdsall, N. J. M.; Lazerno, S. To What Extent Can Binding Studies Allow the Quantification of Affinity and Efficacy? *Ann NY Acad Sci* **1997**, *812*, 41–47.
- (76) Higashijima, T.; Ferguson, K. M. Effects of Mg and beta-gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G Proteins. *Biol Chem* **1987**, *262*, 762–766.
- (77) Abu-Salah, K. M. Receptor-effector coupling. A practical approach. *Biochem Edu* **1992**, *20*, 246.
- (78) Bruns, R. F.; Lawson-Wendling, K.; Pugsley, T. A. A rapid filtration assay for soluble receptors using polyethylenimine-treated filters. *Anal Biochem* **1983**, *132*, 74–81.
- (79) Renkecz, T.; Ceolin, G.; Horváth, V. Selective solid phase extraction of propranolol on multiwell membrane filter plates modified with molecularly imprinted polymer. *Analyst* **2011**, *136*, 2175–2182.
- (80) Macfarlane, D. E.; Srivastava, P. C.; Mills, D. C. 2-Methylthioadenosine[beta-32P]diphosphate. An agonist and radioligand for the receptor that inhibits the accumulation of cyclic AMP in intact blood platelets. *J Clin Invest* **1983**, *71*, 420–428.
- (81) Acker, J. P.; Marks, D. C.; Sheffield, W. P. Quality Assessment of Established and Emerging Blood Components for Transfusion. *J Blood Transfus* **2016**, *2016*, 4860284.
- (82) Saucedo, J. M.; Yaffe, M. A.; Berschback, J. C.; Hsu, W. K.; Kalainov, D. M. Platelet-rich plasma. *J Hand Surg Am* **2012**, *37*, 587-9; quiz 590.
- (83) Jacobson, K. A. New paradigms in GPCR drug discovery. *Biochem Pharmacol* **2015**, *98*, 541–555.
- (84) Mayr, L. M.; Bojanic, D. Novel trends in high-throughput screening. *Curr Opin Pharmacol* **2009**, *9*, 580–588.
- (85) Macarrón, R.; Hertzberg, R. P. Design and implementation of high throughput screening assays. *Mol Biotechnol* **2011**, *47*, 270–285.
- (86) Zhang; Chung; Oldenburg. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **1999**, *4*, 67–73.
- (87) Hillmann, P.; Ko, G.-Y.; Spinrath, A.; Raulf, A.; Kügelgen, I. von; Wolff, S. C.; Nicholas, R. A.; Kostenis, E.; Höltje, H.-D.; Müller, C. E. Key determinants of nucleotide-activated G protein-coupled P2Y(2) receptor function revealed by chemical and pharmacological experiments, mutagenesis and homology modeling. *J Med Chem* **2009**, *52*, 2762–2775.
- (88) Koesling, D.; Nürnberg, B. Platelet G Proteins and Adenylyl and Guanylyl Cyclases. In *Platelets and Their Factors*. Bruchhausen, F. von; Walter, U., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg; pp. 181–218.
- (89) Higashijima, T.; Ferguson, K. M.; Smigel, M. D.; Gilman, A. G. The effect of GTP and Mg²⁺ on the GTPase activity and the fluorescent properties of Go. *J Biol Chem* **1987**, *262*, 757–761.

- (90) Leschke, C.; Storm, R.; Breitweg-Lehmann, E.; Exner, T.; Nürnberg, B.; Schunack, W. Alkyl-substituted amino acid amides and analogous di- and triamines. New non-peptide G protein activators. *J Med Chem* **1997**, *40*, 3130–3139.
- (91) Breitweg-Lehmann, E.; Czupalla, C.; Storm, R.; Kudlacek, O.; Schunack, W.; Freissmuth, M.; Nürnberg, B. Activation and inhibition of G proteins by lipoamines. *Mol Pharmacol* **2002**, *61*, 628–636.
- (92) Stanley, R. J.; Thomas, G. M. H. Activation of G Proteins by Guanine Nucleotide Exchange Factors Relies on GTPase Activity. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151861.
- (93) Winkler, T.; Kettling, U.; Koltermann, A.; Eigen, M. Confocal fluorescence coincidence analysis. An approach to ultra high-throughput screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 1375–1378.
- (94) Schewe, T. Molecular actions of ebselen—an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol* **1995**, *26*, 1153–1169.
- (95) Parnham, M.; Sies, H. Ebselen. Prospective therapy for cerebral ischaemia. *Expert Opin Investig Drugs* **2000**, *9*, 607–619.
- (96) Yamaguchi, T.; Sano, K.; Takakura, K.; Saito, I.; Shinohara, Y.; Asano, T.; Yasuhara, H. Ebselen in acute ischemic stroke. A placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke* **1998**, *29*, 12–17.
- (97) Kil, J.; Pierce, C.; Tran, H.; Gu, R.; Lynch, E. D. Ebselen treatment reduces noise induced hearing loss via the mimicry and induction of glutathione peroxidase. *Hear Res* **2007**, *226*, 44–51.
- (98) Singh, N.; Halliday, A. C.; Thomas, J. M.; Kuznetsova, O. V.; Baldwin, R.; Woon, E. C. Y.; Aley, P. K.; Antoniadou, I.; Sharp, T.; Vasudevan, S. R.; Churchill, G. C. A safe lithium mimetic for bipolar disorder. *Nat Commun* **2013**, *4*, 1332.
- (99) Bender, K. O.; Garland, M.; Ferreyra, J. A.; Hryckowian, A. J.; Child, M. A.; Puri, A. W.; Solow-Cordero, D. E.; Higginbottom, S. K.; Segal, E.; Banaei, N.; Shen, A.; Sonnenburg, J. L.; Bogyo, M. A small-molecule antivirulence agent for treating *Clostridium difficile* infection. *Sci Transl Med* **2015**, *7*, 306ra148.
- (100) Satheeshkumar, K.; Mugesh, G. Synthesis and antioxidant activity of peptide-based ebselen analogues. *Chemistry* **2011**, *17*, 4849–4857.
- (101) Azad, G. K.; Tomar, R. S. Ebselen, a promising antioxidant drug. Mechanisms of action and targets of biological pathways. *Mol Biol Rep* **2014**, *41*, 4865–4879.
- (102) Fawzi, A. B.; Macdonald, D.; Benbow, L. L.; Smith-Torhan, A.; Zhang, H.; Weig, B. C.; Ho, G.; Tulshian, D.; Linder, M. E.; Graziano, M. P. SCH-202676. An allosteric modulator of both agonist and antagonist binding to G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **2001**, *59*, 30–37.
- (103) Lanzafame, A.; Christopoulos, A. Investigation of the interaction of a putative allosteric modulator, N-(2,3-diphenyl-1,2,4-thiadiazole-5-(2H)-ylidene) methanamine hydrobromide (SCH-202676), with M1 muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, *308*, 830–837.
- (104) Göblyös, A.; Vries, H. de; Brussee, J.; Ijzerman, A. P. Synthesis and biological evaluation of a new series of 2,3,5-substituted 1,2,4-thiadiazoles as modulators of adenosine A1 receptors and their molecular mechanism of action. *J Med Chem* **2005**, *48*, 1145–1151.
- (105) Lewandowicz, A. M.; Vepsäläinen, J.; Laitinen, J. T. The 'allosteric modulator' SCH-202676 disrupts G protein-coupled receptor function via sulphhydryl-sensitive mechanisms. *Br J Pharmacol* **2006**, *147*, 422–429.
- (106) Sieber, S.; Carlier, A.; Neuburger, M.; Grabenweger, G.; Eberl, L.; Gademann, K. Isolation and Total Synthesis of Kirkamide, an Aminocyclitol from an Obligate Leaf Nodule Symbiont. *Angew Chem* **2015**, *127*, 8079–8081.
- (107) Prévost, G. P.; Lonchamp, M. O.; Holbeck, S.; Attoub, S.; Zaharevitz, D.; Alley, M.; Wright, J.; Brezak, M. C.; Coulomb, H.; Savola, A.; Huchet, M.; Chaumeron, S.; Nguyen, Q.-D.; Forgez, P.; Bruyneel, E.; Bracke, M.; Ferrandis, E.; Roubert, P.; Demarquay, D.; Gespach, C.; Kasprzyk, P. G. Anticancer activity of BIM-46174, a new inhibitor of the heterotrimeric G α /G β gamma protein complex. *Cancer Res* **2006**, *66*, 9227–9234.

- (108) Schmitz, A.-L.; Schrage, R.; Gaffal, E.; Charpentier, T. H.; Wiest, J.; Hiltensperger, G.; Morschel, J.; Hennen, S.; Häußler, D.; Horn, V.; Wenzel, D.; Grundmann, M.; Büllsbach, K. M.; Schröder, R.; Brewitz, H. H.; Schmidt, J.; Gomeza, J.; Galés, C.; Fleischmann, B. K.; Tüting, T.; Imhof, D.; Tietze, D.; Gütschow, M.; Holzgrabe, U.; Sondek, J.; Harden, T. K.; Mohr, K.; Kostenis, E. A cell-permeable inhibitor to trap Gαq proteins in the empty pocket conformation. *Chem Biol* **2014**, *21*, 890–902.
- (109) Almazroo, O. A.; Miah, M. K.; Venkataramanan, R. Drug Metabolism in the Liver. *Clin Liver Dis* **2017**, *21*, 1–20.
- (110) Lohr, J. W.; Willsky, G. R.; Acara, M. A. Renal drug metabolism. *Pharmacol Rev* **1998**, *50*, 107–141.
- (111) Smith, G. F. Designing drugs to avoid toxicity. *Prog Med Chem* **2011**, *50*, 1–47.
- (112) Chiba, M.; Ishii, Y.; Sugiyama, Y. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. *AAPS J* **2009**, *11*, 262–276.
- (113) Ogu, C. C.; Maxa, J. L. Drug interactions due to cytochrome P450. *Proc Rev* **2000**, *13*, 421–423.
- (114) Artursson, P.; Karlsson, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Bioph Res Co* **1991**, *175*, 880–885.

18. PUBLIKATIONEN

Matthey, M.; Roberts, R.; Seidinger, A.; Simon, A.; Schröder, R.; Kuschak, M.; Annala, S.; König, G. M.; Müller, C. E.; Hall, I. P.; Kostenis, E.; Fleischmann, B. K.; Wenzel, D. Targeted inhibition of Gq signaling induces airway relaxation in mouse models of asthma. *Sci Transl Med* **2017**, *9*.

Crüsemann, M.; Reher, R.; Schamari, I.; Brachmann, A. O.; Ohbayashi, T.; Kuschak, M.; Malfacini, D.; Seidinger, A.; Pinto-Carbó, M.; Richarz, R.; Reuter, T.; Kehraus, S.; Hallab, A.; Attwood, M.; Schiöth, H. B.; Mergaert, P.; Kikuchi, Y.; Schäberle, T. F.; Kostenis, E.; Wenzel, D.; Müller, C. E.; Piel, J.; Carlier, A.; Eberl, L.; König, G. M. Heterologous Expression, Biosynthetic Studies, and Ecological Function of the Selective Gq-Signaling Inhibitor FR900359. *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, *57*, 836–840.

Becerra-Jimenez, J.; Kuschak, M.; Roeder, E.; Wiedenfeld, H. Toxic pyrrolizidinalkaloids as undesired contaminants in food and feed. Degradation of the PAs from *Senecio jacobaea* in silage. *Pharmazie* **2013**, *68*, 636–639.