

Entwicklung fluorimetrischer Methoden zur Bestimmung der Affinität und Aktivität von Liganden G-Protein- gekoppelter Rezeptoren an intakten Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
– Chemie und Pharmazie –
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Matthias Mayer
aus Schwäbisch Gmünd
2002

Die Arbeit wurde angeleitet von:	Prof. Dr. A. Buschauer
Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:	1. März 2002
Tag der mündlichen Prüfung:	22. April 2002
Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. S. Elz (Vorsitzender) Prof. Dr. A. Buschauer (Erstgutachter) Prof. Dr. A. Göpferich (Zweitgutachter) Prof. Dr. G. Franz (3. Prüfer)

Abstracts und Publikationen

- [1] Mayer, M., Li, L., Kracht, J., Bernhardt, G., Buschauer, A.
Determination of Receptor (GPCR) binding constants by flow cytometry under equilibrium conditions.
Poster, DPhG Jahrestagung in Münster (4. -7. Oktober 2000);
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 333, Suppl. 2, 51 (2000).
- [2] Pampaloni, F., Böhmer, M., Mayer, M., Raab, D., Enderlein, J.
Photonic Force microscope with backscattered light feedback control and simultaneous fluorescence detection
Poster 3th Annual Linz Winter Workshop – Single Molecule Techniques in Biophysics and Drug Discovery – University of Linz (2.-5. Februar 2001).
- [3] A Rapid Flow Cytometry Method for the Determination of Equilibrium Binding Constants of Neuropeptide Y Receptors
Mayer, M., Li, L., Hutzler, C., Bernhardt, G., Buschauer, A.
Poster, Anwendung der Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik - XIV. Arbeitstagung – Universität Regensburg (5./6. April 2001).
- [4] Mayer, M., Li, L., Hutzler, C., Bernhardt, G., Buschauer, A.
Determination of Neuropeptide Y Receptor Binding Constants by Flow Cytometry under Equilibrium Conditions
Poster, 6th International NPY Conference in Sydney- Australien (22. -26. April, 2001).
- [5] Hutzler, C., Kracht, J., Mayer, M., Graichen, F., Bauer, B., Schreiber, E., Bollwein, S., Bernhardt, G., Dove, S., Fricker, G., Buschauer, A.
N^G-acylated argininamides: Highly Potent selective NPY Y₁ receptor antagonists with special properties
DPhG Jahrestagung in Halle (10.-13. Oktober 2001), Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 334, Suppl., (2001).

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 1998 bis Februar 2002 unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Buschauer am Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II der Universität Regensburg.

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. A. Buschauer für die interessante Themenstellung, seine wissenschaftlichen Anregungen und für die konstruktive Kritik bei der Durchsicht der Arbeit.

Herrn PD Dr. G. Bernhardt für die fachliche Anleitung sowie die breite Unterstützung und Diskussion der Arbeit.

Meinen Laborkollegen Dr. A. Meister, Dr. C. Moser und Dr. J. Kracht für ihre Geduld und fachliche Unterstützung, Frau E. Schreiber für die Unterstützung und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. C. Hutzler für die Bereitstellung der untersuchten Argininamidderivate.

Herrn Dr. L. Li für die Bereitstellung der untersuchten fluoreszenten Liganden.

Frau S. Bollwein für die Unterstützung bei der HPLC und Herrn P. Richthammer für seine Hilfsbereitschaft.

Dr. R. Apfel und seinen Kollegen für die konfokale Lasermikroskopie in der Neurologie des Regensburger Universitätsklinikums.

Frau G. Bollwein, Herrn Dr. M. Gruber und Dr. K. Öttler von der Anästhesie des Regensburger Universitätsklinikums für die Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Messungen.

Herrn Prof. Dr. S. Seeger und seinen Mitarbeitern am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik für die Einzelmolekülspektroskopie.

Den Mitarbeitern von Prof. Dr. O. S. Wolfbeis am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik insbesondere Herrn Dr. F. Lehmann, Herrn Dr. M. Böhmer und Dr. B. Oswald für die instrumentelle Unterstützung bzw. die zeitaufgelösten mikroskopischen Messungen.

Allen übrigen Kollegen des Arbeitskreises, insbesondere meinen Laborkollegen J. Kracht, G. Walter und C. Lottner, für die angenehme Atmosphäre und die vielseitigen Erlebnisse im Laufe der gemeinsamen Zeit.

Mein besonderer Dank gilt Karin, meiner Familie und all meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während der letzten Jahre.

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylzyklase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
Bodipy	4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
BP	Beladungspuffer
BSA	bovines Serumalbumin
c	Stoffmengenkonzentration in mol/l
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CCD	(cooled) charge-coupled device
Cy5	Cyanin-5
Φ	Quantenausbeute
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum
FSC(-H)	Forward scattering (height), (Intensität der) Vorwärtsstreuung
G418	Geneticinsulfat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
K_D	Dissoziationskonstante eines Ligand-Rezeptor-Komplexes
K_i	Inhibitor konstante
[L]	Konzentration des freien markierten Liganden (während der Inkubation)
log P	Dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
MeOH	Methanol
MM	Molmasse
MW	Mittelwert
NBD	Nitrobenzoxadiazol
(p)NPY	(porcine) Neuropeptid Y
NTS	Nucleus tractus solitarii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	Photomultipliertube
PI	Propidiumiodid
PP	pankreatisches Polypeptid
PYY	Peptid YY
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SPA	Scintillation proximity assay
SSC(-H)	Sideward scattering (height), (Intensität der) Seitwärtsstreuung
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
t_R	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Konventionelle Methoden zur pharmakologischen Testung mit Hilfe von Zellkulturen.....	3
1.1.1	Ligand-Rezeptor-Bindungsstudien.....	3
1.1.2	Funktionelle Untersuchungen an intakten Zellen.....	5
1.2	Neuropeptid Y und NPY-Rezeptorsubtypen.....	6
1.2.1	Neuropeptid Y.....	6
1.2.2	Neuropeptid Y-Rezeptoren.....	6
1.2.2.1	NPY Y ₁ -Rezeptor.....	7
1.2.2.2	NPY Y ₂ -Rezeptor.....	8
1.2.2.3	NPY Y ₃ -Rezeptor.....	9
1.2.2.4	NPY Y ₄ -Rezeptor.....	9
1.2.2.5	NPY Y ₅ -Rezeptor.....	9
1.2.2.6	NPY y ₆ -Rezeptor.....	10
1.2.3	Mögliche therapeutische Indikationen für NPY-Rezeptorliganden.....	10
1.3	Histamin und Histaminrezeptorsubtypen.....	11
1.4	Fluorimetrische Methoden zur Bestimmung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen.....	12
1.4.1	Theorie.....	12
1.4.2	Messung der zellassozierten Fluoreszenz.....	14
1.4.2.1	Spezielle Probleme bei Küvettenmessungen.....	14
1.4.2.2	Durchflusszytometrie.....	16
1.4.3	Einzelmoleküldetektion und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.....	17
1.4.4	Fluoreszenzpolarisation.....	19
1.4.5	Zeitaufgelöste Messungen und Energietransfer.....	22
1.4.6	Bestimmung von intrazellulärem Ca ²⁺ mittels Fluoreszenz oder Lumineszenz.....	23
2	PROBLEMSTELLUNG.....	25
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	27

3.1	Synthese, Trennung und Charakterisierung der NPY-Derivate und verwendeten Fluorophore	28
3.1.1	Auswahl der Fluorophore	28
3.1.2	Synthese der NPY-Derivate.....	32
3.1.3	Trennung und pharmakologische Charakterisierung der fluoreszenten NPY-Derivate	33
3.1.4	Bestimmung der Quantenausbeute Φ des Carboxyfluorescein-markierten NPY ...	39
3.1.5	Änderung der Fluoreszenzintensität von Cyanin-5-Derivaten bei der Bindung an Serumalbumin.....	41
3.1.6	Autofluoreszenz von Zellen als limitierender Faktor für die Sensitivität fluorimetrischer Tests	42
3.2	Fluoreszenzmessungen am konventionellen Spektrofluorimeter	45
3.2.1	Spektraler Shift und Intensitätsmessungen.....	45
3.2.1.1	NPY-Rezeptorliganden.....	45
3.2.1.2	Versuche zur indirekten Detektion von spezifisch gebundenem Carboxyfluorescein-NPY	51
3.2.1.3	Fluoreszente Argininamid-Derivate als NPY Y ₁ -Antagonisten	52
3.2.1.4	Fluoreszente Chinazolin-Derivate als NPY Y ₅ -Antagonisten.....	53
3.2.1.5	Fluoreszente Histamin H ₁ -Antagonisten	55
3.2.2	Fluoreszenzpolarisation/-anisotropie.....	58
3.2.3	Ca ²⁺ -Assay in der Küvette	60
3.3	Fluorimetrische Bestimmungen in der Mikrotiterplatte	63
3.3.1	Ca ²⁺ -Assay im 96-well-Format.....	63
3.3.2	Einzelmoleküldetektion des Cy5-NPY	66
3.4	Untersuchung der Rezeptorbindung auf subzellulärer Ebene mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.....	68
3.5	Durchflusszytometrie.....	76
3.5.1	Untersuchungen an HEL-Zellen	78
3.5.1.1	Kompetitive Bindung des fluoreszenten Liganden Cy5-NPY.....	78
3.5.1.2	Auswertung der Messdaten in der Durchflusszytometrie.....	80
3.5.1.3	Färbung der HEL-Zellen mit Propidiumiodid	81
3.5.1.4	Vergleich der unterschiedlichen Messbedingungen und der fluoreszenten NPY-Derivate	88

3.5.1.5	Bestimmung der Dissoziationskonstante von [³ H]-Propionyl-NPY und der Y ₁ -Rezeptordichte von HEL-Zellen	83
3.5.1.6	Assoziationskinetik und Sättigungsexperimente	84
3.5.1.7	Bestimmung von Bindungsdaten unter Gleichgewichtsbedingungen	86
3.5.2	Bestimmung von Bindungsdaten an Y ₂ -Rezeptor-transfizierten SMS-KAN-Zellen	91
3.5.3	Kompetitive Bindung an Y ₅ -Rezeptor-transfizierten HEC-1B-Zellen	94
3.5.4	Untersuchungen zur NPY-Rezeptorexpression weiterer Zelllinien	96
3.5.5	Vergleich fluoreszenter Cyanin-Derivate von NPY	97
3.5.6	Validierung der fluorimetrischen Testsysteme mit der Radioligandbindung	99
3.5.7	Korrelation der Testergebnisse	102
4	ZUSAMMENFASSUNG	103
5	EXPERIMENTELLER TEIL	107
5.1	Allgemeines	107
5.1.1	Testsubstanzen	107
5.1.2	Geräte	107
5.1.3	Strukturanalytik	108
5.1.4	Verbrauchsmaterial und Chemikalien	108
5.2	Zellkultur	109
5.2.1	Reagenzien	109
5.2.2	Zelllinien	110
5.2.3	Kulturbedingungen	112
5.3	Synthese von fluoreszierenden NPY-Derivaten	112
5.3.1	Synthesevorschriften	112
5.3.2	HPLC-Reinigung der derivatisierten Peptide	114
5.3.3	Gehaltsbestimmung der Peptide	115
5.3.4	Spektren der NPY-Derivate	116
5.3.5	Bestimmung der Quantenausbeute	120
5.3.6	Messung der Fluoreszenzpolarisation	121
5.3.7	Quenching mit Antifluorescein-Antikörper	121
5.3.8	Ca ²⁺ -Assay in der Mikrotiterplatte	121
5.3.9	Einzelmoleküldetektion	122

5.3.10	Konfokale Mikroskopie.....	123
5.4	Radioligand-Bindungsassays an NPY Y ₁ -, Y ₂ - und Y ₅ -Rezeptoren	124
5.4.1	Reagenzien.....	124
5.4.2	Membranpräparation von SMS-KAN- und HEL-Zellmembranen für Radio- ligandbindung und Versuche zur Polarisation.....	126
5.4.3	Y ₁ -Rezeptor-Bindungsassay mit intakten SK-N-MC-Zellen	127
5.4.4	Y ₁ - Rezeptor-Bindungsassay mit intakten HEL-Zellen.....	127
5.4.5	Y ₂ - Rezeptor-Bindungsassay an SMS-KAN-Zellmembranen.....	128
5.4.6	Y ₅ - Rezeptor-Bindungsassay an HEC-1B-Y5-Zellen.....	129
5.5	Bestimmung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration an HEL-Zellen	129
5.5.1	Reagenzien.....	129
5.5.2	Geräteeinstellung	131
5.5.3	Vorbereitung der Zellen.....	131
5.5.4	Kalibrierung und Berechnung des [Ca ²⁺] _i -Anstiegs	132
5.6	Bestimmung der Rezeptorbindungskonstanten mit der Durchflusszytometrie	133
5.6.1	Messanordnung.....	133
5.6.2	Vorbereitung der Zellen.....	133
5.6.3	Geräteeinstellung am FACS-Calibur™	134
5.7	Berechnung der pharmakologischen Kenngrößen	135
5.7.1	Abkürzungen und Definitionen	135
5.7.2	Berechnung von K _D -Werten aus Sättigungsexperimenten (Radioligandbindung).....	135
5.7.3	Berechnung von IC ₅₀ -Werten aus Kompetitionskurven im Radioligand- bindungsassay	136
5.7.4	Berechnung von EC ₅₀ -Werten aus Konzentrations-Wirkungs-Kurven.....	136
5.7.5	Berechnung von IC ₅₀ -Werten für die antagonistische Wirkung im Ca ²⁺ -Assay und in der Durchflusszytometrie	136
6	LITERATURVERZEICHNIS	139

1 Einleitung

Die Untersuchung der biologischen Aktivität neuer chemischer Verbindungen ist als Bestandteil (bio-)medizinischer Wirkstoffforschung seit einigen Jahren einem gewaltigen Wandel unterworfen. Das pharmakologische Screening hat in Form der automatisierten Suche nach neuen Wirkstoffen in den letzten Jahren aus mehreren Gründen immer mehr an Bedeutung gewonnen:

Einerseits hat die Entschlüsselung der Sequenz des menschlichen Genoms das Interesse an schnellen Untersuchungsmethoden mit hohem Probendurchsatz geweckt, da man sich die Identifizierung zahlreicher, für die Arzneistoffforschung interessanter Targets verspricht. Auch für die Identifizierung der Targets selbst kommen Screeningmethoden zum Einsatz (Nolan et al., 1999). Andererseits hat die kombinatorische Wirkstoffsynthese, die zur Erstellung sehr großer Substanzbibliotheken geführt hat, die Automatisierung vorangetrieben. Dabei dient diese als Hochdurchsatz-Screening (HTS: **H**igh **t**hroughput **s**creening) bezeichnete Vorgehensweise nicht nur der Leitstrukturfindung, sondern auch der Optimierung bereits vorhandener Strukturen (Abb. 1).

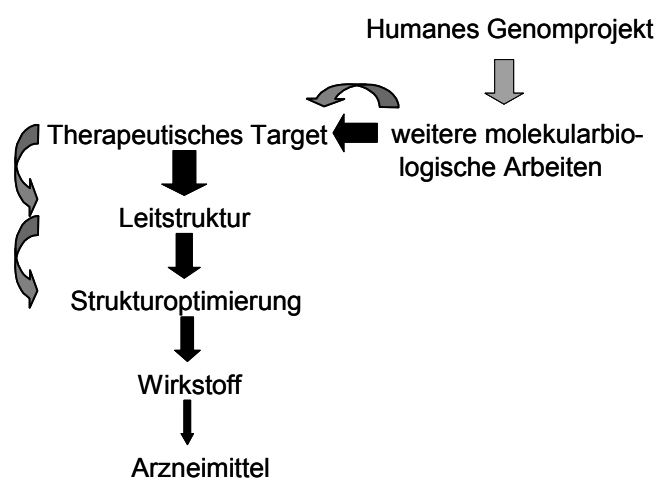


Abb. 1: Flussdiagramm für die „rationale Arzneistoffentwicklung“, bei welcher Screeningmethoden (abgerundete Pfeile) zum Einsatz gelangen.

Die Anzahl der im HTS gefundenen ersten Leitstrukturen ist in der Regel so groß, dass entsprechende Screeningmethoden auch für die differenzierte pharmakologische Bewertung und zur Ermittlung von orientierenden Daten zur Wirkstoffabsorption, -verteilung, -metabolisierung und -toxikologie entwickelt werden müssen (Harvey, 1998).

Für die Wirkstoffsynthese und -optimierung ist von Lipinski et al., 1997, die „Rule of Five“ als Faustregel zur Ausgrenzung von Substanzen mit folgenden physikochemischen Eigenschaften aufgestellt worden:

1. Das Molekül weist mehr als 5 Wasserstoffbindungsdonoren auf (ausgedrückt als Summe von OH und NH).
2. Das Molmasse ist größer als 500 Dalton.
3. Der log P-Wert ist größer als 5.
4. Das hydratisierte Molekül weist mehr als 10 Wasserstoffbindungsakzeptoren auf (ausgedrückt als Summe von O- und N-Atomen).
5. Verbindungsklassen, die biologische Transporter ausnutzen, stellen Ausnahmen dar.

Für eine Substanz, die mehr als eines dieser Kriterien erfüllt, ist die Absorption wahrscheinlich unzureichend.

Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren repräsentiert die größte Gruppe der Targets für die derzeit gebräuchlichen Arzneistoffe. Ungefähr 60% aller erprobten Arzneistoffe greifen an solchen Zielstrukturen an (Müller, 2000). Während Untersuchungen von Substanzen am isolierten Organ oder am Gantztier auf vertiefte pharmakologische Studien mit wenigen ausgesuchten Verbindungen oder kleineren Wirkstoffserien beschränkt sind, bieten sich zur Testung größerer Substanzreihen zelluläre Modelle an.

In zunehmendem Maße werden klonierte, in geeigneten Zelllinien exprimierte Rezeptoren verwendet. Die Untersuchung umfangreicher Substanzbibliotheken bereitet gerade im Falle der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren häufig Probleme, insbesondere weil die Funktionalität der Rezeptoren an deren Integration in die Zellmembran und an das Vorhandensein der richtigen Proteine der Signaltransduktionskaskade gebunden ist. Die Rezeptoraffinität wird üblicherweise mittels Radioligandbindungsassay an Zellen oder Membranpräparationen bestimmt. Die Bindungskonstante lässt jedoch keine Aussage über die Wirkqualität des Liganden zu. Die Zahl der ersten „Hits“ ist bedingt durch den beachtlichen Umfang der Substanzbibliotheken meist relativ groß. Deshalb werden zur Eingrenzung der interessantesten Verbindungen über orientierende Aussagen hinaus verlässliche Daten zu Affinität, Wirkqualität (Agonismus/Antagonismus) und Wirkstärke sowohl an dem primär interessanten Target als auch - zur Klärung der Spezifität und der Selektivität – an anderen biologischen Zielstrukturen benötigt.

Zur Bestimmung der Aktivität von Rezeptoragonisten und –antagonisten eignen sich u. a. Effekte auf die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade wie die Beeinflussung des zyttoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels, der z. B. nach Bindung eines Agonisten durch Öffnung von Ionenkanälen oder Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern transient erhöht sein kann.

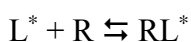
Basierend auf einschlägigen Vorarbeiten am Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II der Universität Regensburg werden zur Bestimmung der Affinität und der Funktion von Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren fluoreszente, bioanalytische Methoden entwickelt, die sich zu potentiell hochdurchsatzfähigen Verfahren ausbauen lassen.

1.1 Konventionelle Methoden zur pharmakologischen Testung mit Hilfe von Zellkulturen

1.1.1 Ligand-Rezeptor-Bindungsstudien

Radioligandbindungsstudien dienen zur Bestimmung der Affinitäten von Rezeptorliganden und stellen oft die erste Stufe der pharmakologischen Charakterisierung neuer Wirkstoffe dar. Auch beim Screening von Substanzbibliotheken an neuen biologischen Targets werden Verdrängungsexperimente mit Radioliganden durchgeführt. Je nach verwendetem Radioliganden verursacht das Ausmaß der unspezifischen Bindung ein mehr oder weniger ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis. Um das Messsignal zu verstärken, werden sowohl transfizierte Zellen mit hoher Expressionsrate als auch Membranpräparationen eingesetzt. Letzteres verhindert zugleich die Internalisierung des Radioliganden.

Die Wechselwirkung zwischen einem markierten Liganden L^* und einem Rezeptor R unter Bildung des Ligandrezeptorkomplexes L^*R kann folgendermaßen beschrieben werden:



Dieses Gleichgewicht gehorcht dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_D = \frac{[L^*] \cdot [R]}{[RL^*]} \quad (\text{I}).$$

Wobei die Dissoziationskonstante K_D als Maß für die Affinität des Liganden L^* zum Rezeptor dient. Die Gesamtmenge des Rezeptorproteins B_{\max} lässt sich aus Gleichung I durch Umformung mit dem Term $B_{\max} = [RL^*] + [R]$ berechnen ($[R]$ -Konzentration des freien Rezeptors):

$$[RL^*] = \frac{[L^*] \cdot B_{\max}}{K_D + [L^*]} \quad (\text{II}).$$

Wird nun ein zweiter Ligand, ein Agonist, Antagonist oder allgemein Analyt A hinzugefügt, so ergibt sich folgendes Gleichgewicht (Modell ohne Bildung eines ternären Komplexes):

$$A + L^* + R \rightleftharpoons RA + RL^* \text{ und } [RL^*] = \frac{B_{\max} \cdot \frac{1}{K_D} \cdot [L^*]}{\left(1 + \frac{1}{K_D} \cdot [L^*] + \frac{1}{K_i} \cdot [A]\right)} \quad (\text{III}).$$

D. h. mit einem Liganden L^* bekannter Affinität lässt sich über die Messung von RL^* indirekt auch die Affinität des (Ant-)agonisten oder Analyten (K_i -Wert) zum Rezeptor ermitteln. Dafür ist eine Trennung von freiem Liganden L^* und RL^* erforderlich, da der Ligand im Überschuss zugesetzt wird. Bei adhärennten Zellen als Rezeptorquelle erfolgt dies üblicherweise durch Aspiration des Überstands mit mehreren Waschschriffen.

Für Suspensionszellen und Membranpräparationen sind je nach Affinität des Liganden L^* Zentrifugation oder Filtration ($K_D < 10 \text{ nM}$) bewährte Techniken (Hulme und Birdsall, 1992). Diese Notwendigkeit der Trennung oder auch des Waschens kann zu einem physikalischen Verlust an RL^* oder zur Dissoziation von RL^* führen, was Auswirkungen auf die berechneten Bindungskonstanten hat. Die Messung von RL^* erfolgt in der Regel unter Verwendung von Radioliganden, welche mit schwachen β -Strahlern [^3H] oder [^{14}C] markiert sind, über Flüssigszintillationsverfahren. Dazu dienen organische Moleküle wie Diphenyloxazol (PPO), welche innerhalb der Proben homogen verteilt werden und durch die β -Strahlung (schnellbewegte Elektronen) angeregt, Lichtblitze emittieren, die letztendlich gezählt werden.

Eine Messung ohne Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden ist seit jüngster Zeit nur mit dem teuren „Scintillation Proximity Assay“ (SPA) möglich, bei welchem überwiegend die spezifisch gebundenen Moleküle ein Signal liefern (Abb. 2).

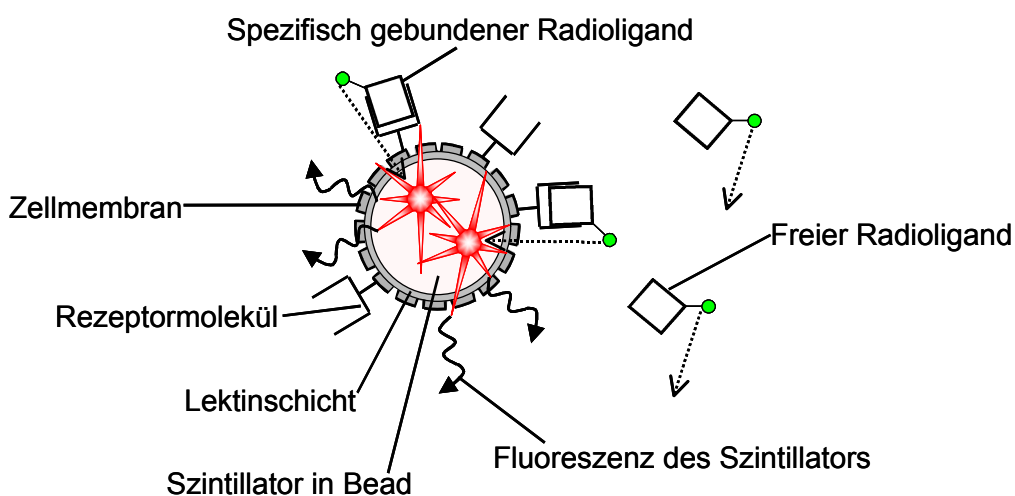


Abb. 2: Prinzip des „scintillation proximity assays“ für einen transmembranären Rezeptor, die Membranpräparation ist über Weizenkeimlektin an Beads immobilisiert. Die β -Strahlung rezeptorgebundener Radioligandmoleküle führt zur Anregung des Szintillators, die β -Strahlung freier Radioligandmoleküle dagegen wird im wässrigen Medium absorbiert.

Dazu befindet sich der Szintillator in Beads, die kovalent mit Targetmolekülen/Zellmembranen verknüpft sind, sodass nur die Strahlung gebundener Radioligandmoleküle aufgrund der Nähe ausreicht, den Szintillator anzuregen. Ungeachtet dieses interessanten neueren Ansatzes, der Probleme mit unspezifischer Bindung bereiten kann (Alpha-Bazin et al., 2001), sind Radioligandbindungsstudien generell mit einer Fülle gesetzlicher Auflagen wie einer strengen Dokumentationspflicht sowie einer teuren Abfallentsorgung verbunden.

1.1.2 Funktionelle Untersuchungen an intakten Zellen

Bei funktionellen Tests von Membranrezeptoren an einzelnen Zellen oder an Zellkulturen wird die Kopplung an Signaltransduktionsmechanismen, die eine Signalverstärkung ermöglichen, ausgenutzt. Beispielsweise kann nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren die Konzentration eines second messengers wie Ca^{2+} (Abb. 3) oder cAMP gemessen werden. Es ist möglich, Antagonisten, partielle Agonisten und volle Agonisten zu unterscheiden. Die Ca^{2+} -Messung eignet sich gut für den Aufbau miniaturisierter Testsysteme. Die Vorteile bestehen in geringem Substanzverbrauch, hohem Probendurchsatz und Automatisierbarkeit. Auch hier ergeben sich durch die Verwendung klonierter Rezeptoren neue Möglichkeiten, aber das notwendige enge Zusammenwirken des Rezeptors mit den vielfältigen vorhandenen Effektorsystemen führt oft zu Systemen, deren Aufbau und Funktion nicht mehr mit natürlichen Systemen vergleichbar sind (Kenakin, 1997).

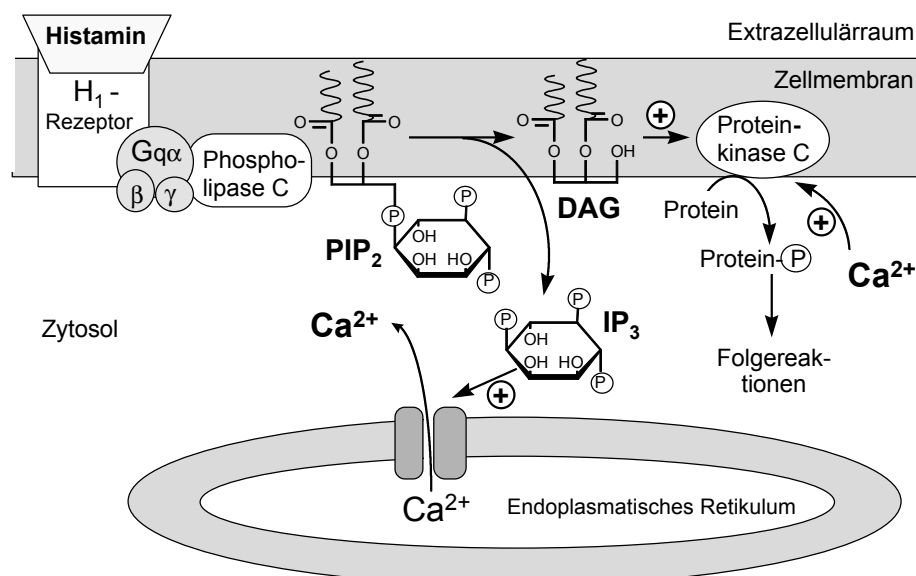


Abb. 3: Vereinfachtes Schema der Signaltransduktion über den Histamin H₁-Rezeptor.

1.2 Neuropeptid Y und NPY-Rezeptorsubtypen

1.2.1 Neuropeptid Y

Neuropeptid Y stellt vermutlich das am häufigsten vorkommende Neuropeptid im zentralen und peripheren Nervensystem von Säugern dar. NPY gehört zusammen mit PYY und PP zu der Familie der Pankreatischen Polypeptide. Das aus 36 Aminosäuren mit einem C-terminalen Tyrosinamid bestehende Peptid (Abb. 4) wurde von Tatemoto 1982 entdeckt und wegen seines Tyrosinreichtums als NPY bezeichnet (Y = Tyrosin). In der Peripherie ist NPY ein Kostransmitter im sympathischen Nervensystem, der ebenso wie Noradrenalin neuronal synthetisiert und in Vesikeln gespeichert wird. Im ZNS ist NPY des Weiteren an zahlreichen Regulationsmechanismen beteiligt und mit verschiedenen Neurotransmittern kolokalisiert. Im Hypothalamus, wo es gemeinsam mit dem Agouti-related Protein (AGRP) in Neuronen vorkommt (Hahn et al., 1998), spielt NPY z. B. eine Rolle bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme.

Aufgrund der Röntgenstruktur des aPP (avian pancreatic polypeptide) wurde für NPY eine haarnadelförmige Struktur, bestehend aus einer N-terminalen Polyprolin-artigen Helix und einer antiparallel angeordneten α -Helix, welche über einen β -turn verknüpft sind, sowie einem flexiblen N-Terminus (Aminosäuren 33-36), abgeleitet (Blundell et al., 1981). Dafür sprechen neben den Homologien in der Primärstruktur auch 2D-NMR-Studien (Arvidsson et al., 1993, Boulanger et al., 1995). Andere NMR-Untersuchungen deuten auf eine amphiphile, α -helikale Struktur des C-Terminus (einschließlich Tyr-36) und einen unstrukturierten N-terminalen Bereich (Saudek et al., 1990) oder auf das Vorliegen eines Dimers in Lösung hin (Cowley et al., 1992).

hNPY	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYNLITRQRY-NH ₂
hPYY	YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
hPP	APLEPVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRY-NH ₂

Abb. 4: Aminosäuresequenzen von humanem Neuropeptid Y (hNPY), humanem Peptid YY (hPYY) und humanem Pankreatischem Polypeptid (hPP).

1.2.2 Neuropeptid Y-Rezeptoren

Derzeit werden 6 NPY-Rezeptorsubtypen unterschieden, die unterschiedliche, teils gegensätzliche biologische Effekte vermitteln.

1.2.2.1 NPY Y₁-Rezeptor

Der NPY Y₁-Rezeptor ist wie alle übrigen Subtypen ein transmembranärer, heptahelikaler G-Protein-gekoppelter Rezeptor (Abb. 5). Sylte et al., 1999, und andere beschreiben, dass die Bindungsstelle für NPY überwiegend extrazellulär liegt. Die dritte intrazelluläre Schleife interagiert vermutlich mit dem G-Protein. Als typischerweise postsynaptischer Rezeptor ist der Subtyp Y₁ im ZNS an der NPY-vermittelten Anxiolyse, Sedation und Regulation der Nahrungsaufnahme sowie peripher an der durch die sympathische Stimulation ausgelösten Vasokonstriktion beteiligt (Übersicht: Franco-Cereceda und Liska, 1998, Malmström und Lundberg, 1997 und Buschauer et al., 2000). Serradeil-Le Gal et al., 2000, haben die Expression des Y₁-Rezeptors in humanen Adipozyten nachgewiesen, in denen er eine antilipolytische Wirkung vermittelt.

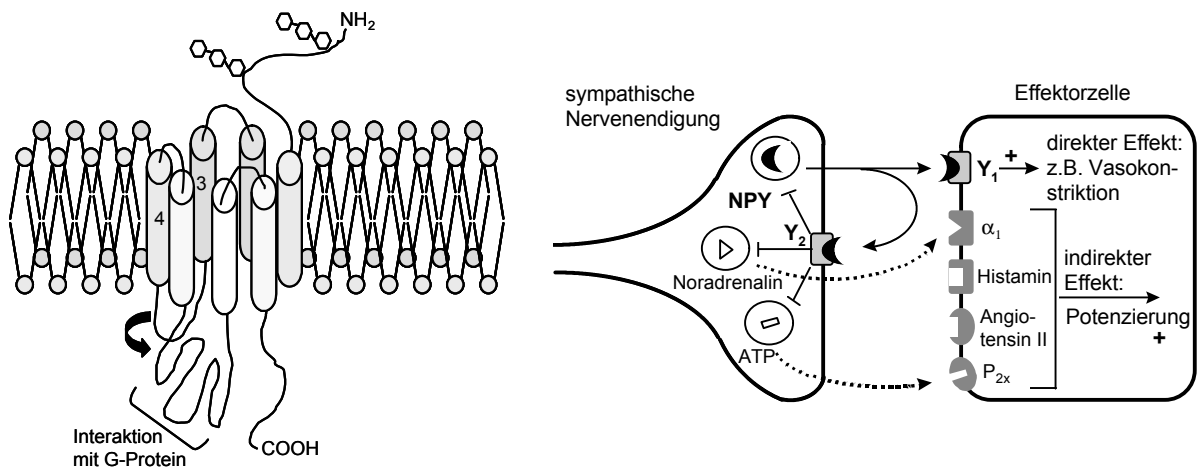
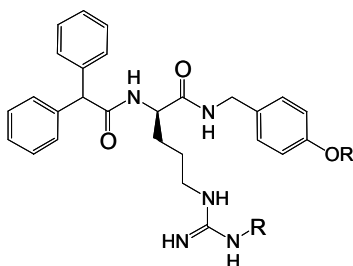


Abb. 5: Links: Allgemeines Modell eines G-Protein-gekoppelten membranständigen Rezeptors (z. B. NPY Y₁-Rezeptor) dessen N-Terminus im extrazellulären Bereich liegt und dessen dritte intrazelluläre Schleife vermutlich mit dem G-Protein interagiert; rechts: NPY als Kotransmitter im sympathischen Nervensystem: Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung (NPY, Noradrenalin, ATP) etc. über präsynaptische NPY Y₂-Rezeptoren, Stimulation der postsynaptischen Y₁-Rezeptoren potenziert dagegen die Wirkung anderer Neurotransmitter oder bewirkt einen direkten Effekt am Erfolgsorgan.



BIBP 3226 R= OH
 BIBO 3304 R= CH₂-NHCONH₂

Ein weiterer über diesen Rezeptorsubtyp vermittelter Effekt ist die Stimulation des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen über die Aktivierung von MAP-Kinasen (Zukowska-Grojec et al., 1993).

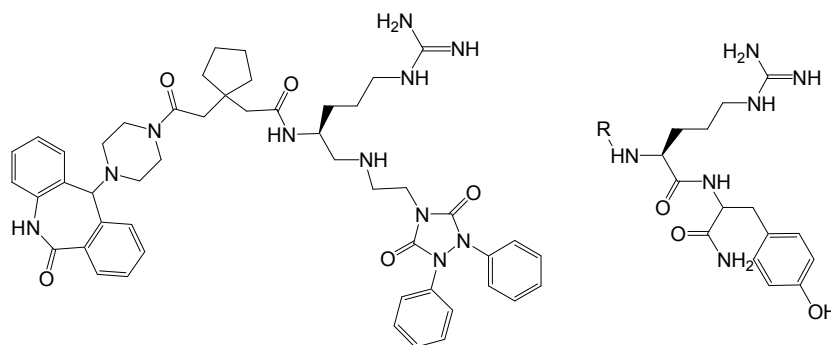
Konstitutiv wird der Y₁-Rezeptor in humanen SK-N-MC- und Erythroleukämie-Zellen (HEL-Zellen) exprimiert, die als Standardmodelle für pharmakologische Untersuchungen verwendet werden. Der am

besten charakterisierte Y_1 -Antagonist ist BIBP 3226 (Boehringer Ingelheim, Biberach). Die Substanz weist einen K_i -Wert von 7,2 nM auf (Rudolf et al., 1994). Der Austausch der 4-Hydroxygruppe führt zu dem deutlich aktiveren BIBO 3304 (Wieland et al., 1998: IC_{50} = 0,37 nM gegen [125 I]-NPY).

Die Y_1 -Rezeptoren von einigen Spezies, einschließlich des Menschen, wurden bereits kloniert. Sie sind wie alle bisher untersuchten NPY-Rezeptoren an Pertussis toxin-sensitive G-Proteine (G_i/G_o) gekoppelt, deren Aktivierung eine Hemmung der Adenylylzyklase bewirkt (Michel et al., 1998).

1.2.2.2 NPY Y_2 -Rezeptor

Die erste Differenzierung der NPY-Rezeptoren in Y_1 - und Y_2 -Rezeptoren basierte auf ihrer Stimulierbarkeit durch NPY selbst und Analoga/NPY-Fragmente. Der Rezeptor, der nur durch das Holopeptid aktiviert werden kann, wurde als Y_1 -Rezeptor bezeichnet, während der sowohl durch das Holopeptid als auch durch C-terminale Bruchstücke aktivierbare Rezeptor Y_2 -Rezeptor genannt wurde. Mittlerweile ist der Y_2 -Rezeptor kloniert worden und die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NPY und seinen Analoga sind durch die Entdeckung weiterer NPY-Rezeptoren wesentlich komplexer geworden. Es gibt Hinweise für eine Heterogenität des Y_2 -Rezeptors.



BIEO 0246

C-Terminus von NPY

Der Y_2 -Rezeptor ist sowohl peripher als auch im ZNS zu finden und typischerweise präsynaptisch lokalisiert. Die Stimulation führt zur Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung wie etwa Glutamat im ZNS, worauf der antikonvulsive Effekt zurückgeführt wird. Konstitutiv wird der Y_2 -Rezeptor von SMS-KAN-Zellen exprimiert. Von der Firma Boehringer Ingelheim wurde BIIE 0246 (Doods et al., 1999) als sehr potenter und selektiver Y_2 -Antagonist entwickelt. Die Substanz weist Strukturanalogien zum C-terminalen Dipeptid von NPY auf.

1.2.2.3 NPY Y₃-Rezeptor

Dieser Rezeptor wurde aufgrund von pharmakologischen Untersuchungen postuliert: Die Injektion von NPY in den NTS hemmt den Barorezeptorreflex, moduliert Glutamateffekte und führt zu Hypotonie und Bradykardie (Grundemar et al., 1991). Da die derzeitigen Belege jedoch noch nicht zur Definition eines neuen Rezeptorsubtyps ausreichen, hat das IUPHAR-Nomenklaturkomitee vorgeschlagen, bei mindestens zehnfacher Affinität von NPY im Vergleich zu PYY von mutmaßlichen („putativen“) Y₃-Rezeptoren zu sprechen (Michel et al., 1998).

1.2.2.4 NPY Y₄-Rezeptor

Der Y₄-Rezeptor ist der einzige NPY-Rezeptor, der für das Pankreatische Polypeptid (PP) eine höhere (pikomolare) Affinität besitzt als für NPY und PYY.

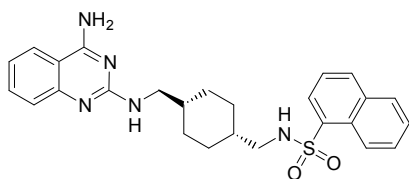
Der Rezeptor ist z. B. an Kolon, Dünndarm, Pankreas und Prostata lokalisiert.

Er vermittelt beispielsweise gastrointestinale Effekte (Cox et al., 1993). Von Raposinho et al., 2000, wurde mit der Freisetzung von Gonadotropin ein zentraler Effekt von Y₄-Rezeptoren beschrieben.

1.2.2.5 NPY Y₅-Rezeptor

Dieser NPY-Rezeptor unterscheidet sich von den übrigen Subtypen in der Länge der dritten intrazellulären Schleife. Die für den Y₅-Rezeptor kodierende humane Sequenz überlappt die des Y₁-Rezeptors und ist umgekehrt orientiert, was eine Koregulation beider Gene vermuten lässt (Nakamura et al., 1997).

Die Klonierung der Y₅-Rezeptoren von Mensch, Maus und Ratte wurde 1996 publiziert (Hu et al., 1996; Gerald et al., 1996). In unserer Arbeitsgruppe gelang die Klonierung des humanen Y₅-Rezeptors und die stabile Transfektion von humanen HEC-1B Endometriumkarzinomzellen, die sich für funktionelle Untersuchungen und Bindungsstudien eignen.



CGP 71683A

Der auch als „feeding receptor“ bezeichnete Subtyp spielt eine Rolle bei der Nahrungsaufnahme. Aus der Substanzklasse der Sulfonamide mit einem zentralen Cyclohexylen-Spacer, stammt der Y₅-Rezeptorantagonist CGP 71683A (Novartis), der sowohl die NPY-induzierte Futteraufnahme

bei gesättigten als auch bei hungernden Ratten inhibiert. Aufgrund der hohen Redundanz der physiologischen Systeme, die an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt sind, hat sich

jedoch die Hoffnung, Y₅-Antagonisten als appetithemmende Wirkstoffe gegen Fettleibigkeit entwickeln zu können, deutlich relativiert.

Woldbye, 1998, konnte an Ratten epileptische Anfälle, die mit Pentetrazol ausgelöst worden waren, durch intrazerebrale Injektion von NPY verhindern. Er führt diesen Effekt auf den Y₅-Rezeptorsubtyp zurück.

1.2.2.6 NPY y₆-Rezeptor

Dieser Rezeptor ist beim Menschen im Gegensatz zu Maus und Kaninchen aufgrund einer Basenpaardeletion, die zu einem verkürzten, nicht funktionsfähigen Protein führt, degeneriert. Dies wird durch das kleingeschriebene „y“ symbolisiert.

1.2.3 Mögliche therapeutische Indikationen für NPY-Rezeptorliganden

Als pharmakologische „tools“ um (patho-)physiologische Fragestellungen zu klären oder auch als potenzielle Arzneistoffe, werden NPY-Rezeptorliganden benötigt. Diese Substanzen sollten wegen der zahlreichen ZNS-vermittelten Effekte und aus pharmakokinetischen Gründen nichtpeptidische Verbindungen darstellen. V. a. von Interesse sind zentral wirksame Y₁- und Y₅-Liganden (Tabelle 1), die gegen Fettleibigkeit und Epilepsie oder zur Anxiolyse eingesetzt werden könnten.

Tabelle 1: Indikationen für NPY-Liganden (Buschauer et al., 2000).

Mögliche Anwendung	NPY-Ligand
Antagonisten	
Hypertension	Y ₁ , peripher
Herzinsuffizienz	Y ₁ /Y ₃ , peripher
Adipositas	Y ₅ und/oder Y ₁ , zentral
Agonisten	
Anxiolyse, Sedation	Y ₁ , zentral
Analgesie	Y ₂ , zentral
Epilepsie	Y ₂ oder Y ₅ , zentral
Kognitive Dysfunktion	Y ₂ , zentral

1.3 Histamin und Histaminrezeptorsubtypen

Das biogene Amin Histamin ist an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Effekten (z. B. Inflammation, Salzsäuresekretion im Magen und Neurotransmission) beteiligt. Die Entwicklung selektiver Wirkstoffe ermöglichte die Entdeckung und Charakterisierung der drei Rezeptorsubtypen H₁, H₂ und H₃. Diese Subtypen wurden mittlerweile kloniert und ihre Existenz damit abgesichert. Sie sind alle an G-Proteine vom Typ G_q, G_s und G_{i/o} gekoppelt. Zudem wurde über die molekulare Identität weiterer pharmakologischer Bindungsstellen spekuliert, bis im Rahmen von Untersuchungen zur Sequenzhomologie auch die Entdeckung des Histamin H₄-Rezeptors gelang (Oda et al., 2000 und Morse et al., 2001). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Histamin-Rezeptorsubtypen und die über den jeweiligen Rezeptor vermittelten Effekte (Hill et al., 1997).

Tabelle 2: Charakteristika der Histamin-Rezeptorsubtypen H₁, H₂, H₃ und H₄ und deren vermittelten Effekte (vgl. Hill et al., 1997).

Rezeptor-subtyp	Lokalisation	Effekt	Selektiver Ligand
H ₁	Glatte Muskulatur Endothelzellen Nebennierenmark ZNS Herz	Kontraktion glatter Muskulatur Anstieg vaskulärer Permeabilität Stimulation endokriner Aktivität Verstärkte neuronale Aktivität negative Inotropie.	Mepyramin
H ₂	Parietalzellen glatte Gefäßmuskulatur Herz ZNS Suppressor T-Zellen, Neutrophile	Stimulation der Magensäuresekretion Relaxation der glatten Muskulatur positive Chronotropie und Inotropie Verminderte neuronale Aktivität Hemmung der Antiköpersynthese und der T-Zell-Proliferation sowie Zytokinproduktion durch Lymphozyten	Iodaminopotentin
H ₃	ZNS, periphere Nerven (Herz, Lunge, Gastrointestinaltrakt)	Hemmung der Synthese und Freisetzung von Histamin und anderen Neurotransmittern	R-(α)-Methylhistamin, Thioperamid
H ₄	Periphere mononukleäre Blutzellen, Knochenmark Thymus, Milz und Kolon	Immunmodulation? Ca ²⁺ -Mobilisierung	-

1.4 Fluorimetrische Methoden zur Bestimmung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen

1.4.1 Theorie

Fluoreszente „Sonden“ ermöglichen die Detektion komplexer biomolekularer Wechselwirkungen - auch in lebenden Zellen - mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität. Fluoreszenz ist das Ergebnis eines dreistufigen Prozesses, der bei manchen Molekülen (bevorzugt polyaromatischen Kohlenwasserstoffen und Heterozyklen) auftritt und in Abb. 6 in einem vereinfachten Jablonskischema, welches die Energiezustände des Fluorophors repräsentiert, dargestellt ist.

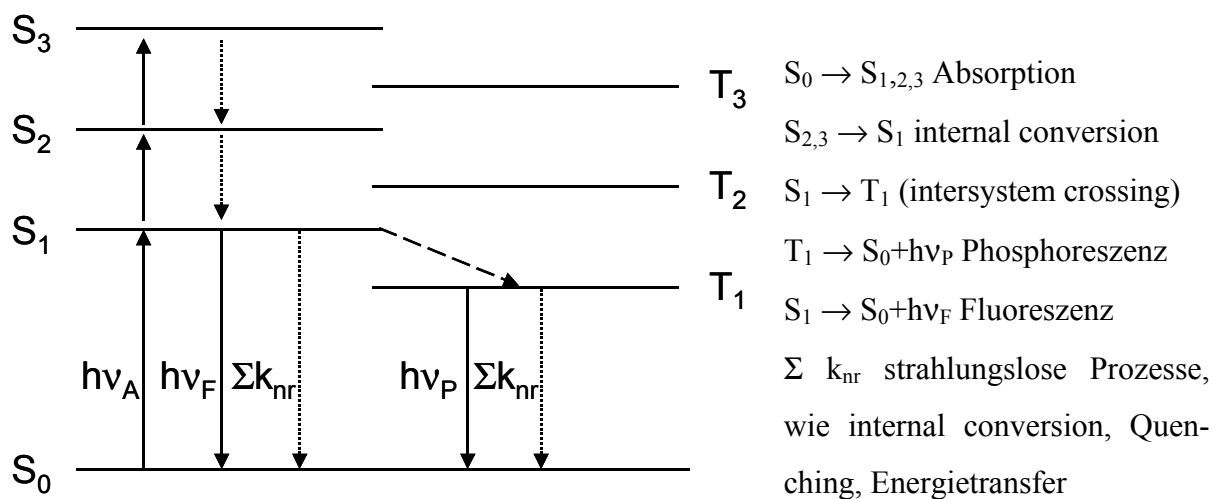


Abb. 6: Vereinfachtes Jablonskischema.

Ein Photon der Energie $h\nu_A$, durch eine externe Quelle wie etwa Halogenlampe oder Laser erzeugt, wird vom Fluorophor absorbiert und dieser wird dabei in einen der angeregten Singulettzustände versetzt ($S_0 \rightarrow S_{1,2,3}$). Jedem Singulettzustand lassen sich eine Anzahl an Schwingungszuständen zuordnen, welche weiterhin in feinere Rotationsniveaus unterteilt sind, die in Abb. 6 vernachlässigt werden.

Von den energiereicheren Singulettzuständen findet innerhalb von weniger als 0,1 ns durch Molekülstöße eine strahlungslose Rückkehr (internal conversion) zum niedrigsten Energieniveau des angeregten Zustandes statt ($S_{2,3} \rightarrow S_1$). Die Lebensdauer eines Moleküls im Singulettzustand S_1 dauert typischerweise 1-10 ns. Während dieses Zeitraums unterliegt der Fluorophor Konformationsänderungen, Rotationsvorgängen, Umorientierungen der Solvenshülle, Komplexbildung, Protonenaustausch, Energieübertragungen (Kanaoka, 1977). Diese Prozesse

se, die vom S_1 -Zustand aus stattfinden, bestimmen sowohl das Fluoreszenzspektrum als auch die Quantenausbeute und die Fluoreszenzlebensdauer. Durchlaufen alle Moleküle den Übergang $S_1 \rightarrow S_0$ unter Abgabe von $h\nu_F$, so beträgt die Quantenausbeute 1. Andere mögliche Übergänge von $S_1 \rightarrow S_0$ sind internal conversion, Quenching und Energietransfer.

Die Differenz ($h\nu_A - h\nu_F$) wird als Stokes' Shift bezeichnet. Dessen Ausmaß ist entscheidend für die Detektion der emittierten Photonen gegenüber dem Hintergrund, wobei die anregenden Photonen durch Einsatz geeigneter Gitter/Filter abgetrennt werden. Damit wird die Sensitivität des Fluoreszenzsignals durch den Stokes' Shift bestimmt.

Der gesamte Vorgang der Absorption, internal conversion und Fluoreszenz ist zyklisch. Außer wenn der Fluorophor irreversibel während des angeregten Zustands zerstört wird (ein Phänomen, das als photobleaching bekannt ist), kann derselbe Fluorophor wiederholt angeregt und detektiert werden.

Einfluss von Lösungsmittel, pH, Temperatur und Quencheffekte

Lösungsmittel beeinflussen die Fluoreszenz abhängig von ihrer Polarität, da das Dipolmoment des Fluorophors im angeregten Zustand gewöhnlich größer als im Grundzustand ist. Außerdem kann es zu spezifischen Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Fluorophor kommen: Wasserstoffbrückenbindungen beispielsweise führen zur Zu- oder Abnahme der Fluoreszenzintensität. Wenn die Wasserstoffbrückenbindung in Verbindung mit dem π -Elektronensystem des Protonendonors steht und beide π -Elektronensysteme von Donor und Akzeptor konjugiert sind, ist mit einer Schwächung der Fluoreszenz zu rechnen. Tritt die Wasserstoffbrücke dagegen isoliert vom π -Elektronensystem des Protonendonors als π -Bindung auf, so ist die Fluoreszenzintensität erhöht (Schwedt, 1981).

Der pH-Wert des Lösungsmittels kann entsprechend dem Säure-Base-Charakters des Fluorophors einen deutlichen Effekt auf dessen Polarisierbarkeit und damit dessen Fluoreszenzeigenschaften ausüben (vgl. van Duuren, 1963).

Die Fluoreszenz sinkt bei steigender Temperatur, da eine zunehmende Umwandlung in Stoßenergie stattfindet.

Quencheffekte: Diese kommen durch Oxidation (Sauerstoff), Verunreinigungen in Lösungsmitteln, Energie-Transfer, Selbstabsorption, Schweratom-Effekt oder Charge-Transferbildung zustande. Es wird in diesem Zusammenhang auch zwischen statischem (z. B. Charge-Transfer zwischen Fluorophor und Quencher) und dynamischem Quenchen (z. B. durch Kollision) unterschieden.

Die gemessene Fluoreszenzintensität $I = 2,3 \cdot \Phi \cdot I_0 \cdot e \cdot c \cdot d$ ist in verdünnten Lösungen proportional dem Extinktionskoeffizienten sowie der Konzentration und der Schichtdicke der Lösung (Lambert-Beersches Gesetz). Hinzu kommen die Quantenausbeute Φ sowie geräteabhängige Parameter wie die Anregungseffizienz (ist in I_0 enthalten) und die Fluoreszenzsammleffizienz (ist nicht in der Gleichung berücksichtigt).

Das Signal liefert je nach Messmethodik eine Fülle von Informationen:

Fluoreszenzintensität, Spektraler Shift, Fluoreszenzpolarisation, Fluoreszenzkorrelation, Fluoreszenzlebensdauer, Fluoreszenz-Energie-Transfer.

1.4.2 Messung der zellassozierten Fluoreszenz

1.4.2.1 Spezielle Probleme bei Küvettenmessungen

Das Untersuchungsvolumen beträgt hier etwa 1-2 ml. Zwei Faktoren sind dabei ganz entscheidend: Das Streulicht und Absorption der Zellen.

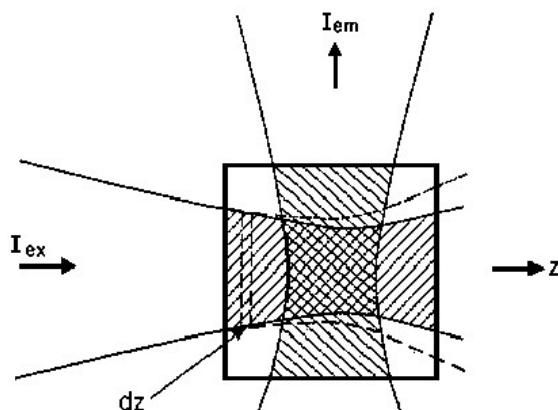


Abb. 7: Schichtdicke dz , entlang welcher die Schwächung der Lichtintensität in der Küvette stattfindet (Eisinger et al., 1985).

Der differentielle Intensitätsverlust von Licht, das entlang einer z -Achse durch eine infinitesimale Platte (der Dicke dz) einer Probe gelangt, welche absorbierende und streuende Partikel enthält, ist proportional der Konzentration des Streuers h und proportional dz (Abb. 7):

$$dI/I = -(\alpha_a + \alpha_s) h dz$$

α_a : Schwächungskoeffizient durch (Re-)absorption

α_s : Schwächungskoeffizient durch Streuung

Beide sind von der Wellenlänge abhängig.

h : Konzentration an streuenden Partikeln

Die Integration führt zu folgender Exponentialgleichung:

$$I(z) = I_{\text{ex}} \exp[-(\alpha_a + \alpha_s) h z]$$

Die Schwächungskoeffizienten α_s und α_a sind Funktionen der Anregungs- und Emissionswellenlänge und der effektiven Weglängen des Anregungs- und Fluoreszenzstrahls.

Die Gültigkeit dieser Gleichung ist begrenzt und am besten empirisch zu überprüfen. Sie ist am besten für kleine Schwächungskoeffizienten erfüllt und wenn das Licht stark in Vorwärtsrichtung gestreut wird (Eisinger et al., 1985). Die Streuung kann in Form der Rayleigh-/Tyndallstreuung an einzelnen Molekülen bzw. Kolloiden erfolgen. Als weiterer Streueffekt ist vor allem bei Messungen geringer Fluoreszenzintensitäten (d. h. bei niedrigen Substanzkonzentrationen) die Ramanstreuung zu berücksichtigen, die infolge von Valenz- und Rotationschwingungen der Lösungsmittelmoleküle auftritt. Hierbei entsteht eine Strahlung, die langwelliger ist als die Anregungsstrahlung und somit zu Überlagerungen und Störungen der Fluoreszenzemission führen kann (Schwedt, 1981). Dabei tritt die Ramanbande immer in einer abhängig vom Lösungsmittel aber unabhängig von der Anregungswellenlänge konstanten Energiedifferenz auf.

Die obige Gleichung beschreibt plausibel die Schwächung des Fluoreszenzsignals bei Küvettenmessungen mit konventionellen Spektrofluorimetern. Ein stärkeres Fluoreszenzsignal ergibt sich durch Senkung der „Streuerkonzentration“, z. B. durch Verwendung von Zellen mit hoher Rezeptorexpression (z. B. Tota et al., 1995, Emmerson et al., 1997) oder von reinem Rezeptormolekül (sofern dies möglich ist) sowie durch alternative Messanordnungen, bei denen die Strecke dz möglichst kurz ist (z. B. konfokale Detektion). Der Einsatz fluoreszenter Liganden mit höherer Quantenausbeute würde das Signal ebenfalls verstärken, dieser Beitrag ist allerdings schnell ausgeschöpft. Fluorophore, die bei höheren Wellenlängen angeregt werden, vermindern auftretendes Streulicht (die Streulichtintensität ist der 4. Potenz der Anregungsfrequenz proportional) und weisen ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis auf (s. nachfolgend: Autofluoreszenz).

Ungeachtet der angesprochenen Probleme und Limitationen haben fluorimetrische Methoden als Alternative zum Radioligandbindungsassay in den letzten Jahren zunehmend an Interesse gewonnen. Fluoreszenzfarbstoffe sind im Vergleich zu radioaktiv markierten Verbindungen relativ billig und sicher zu handhaben. Außerdem sind sie aufgrund der variablen Messmöglichkeiten flexibler für eine Vielzahl unterschiedlicher Targets einsetzbar und gestatten die einfache und schnelle Visualisierung entsprechend markierter Strukturen.

Baindur und Triggler, 1994, haben eine Übersicht über rezeptorspezifische, fluoreszente Liganden gegeben.

Die Lesezeiten für 10 fmol Fluorescein in Mikrotiterplatten beträgt im Idealfall wenige Sekunden pro well, während ein Szintillationszähler für die äquimolare Menge an [^3H] oder auch [^{125}I] dafür wesentlich länger benötigt (Park et al., 1999, Sportsman und Leytes, 2000). Versuche, mittels Fluoreszenz direkt die Bindungsaffinität von Wirkstoffen an G-Proteingekoppelten Rezeptoren zu bestimmen, sind in der Literatur v. a. seit 1999 bereits mehrfach beschrieben (s. Abschnitt 3.2.1.2).

Durch den Einsatz von Fluorophoren, deren Fluoreszenz an der Bindungsstelle drastisch zunimmt (z. B. Propidiumiodid bei der Bindung an DNA), könnte man im Prinzip unter Gleichgewichtsbedingungen messen. Andere Möglichkeiten, die Fluoreszenz spezifisch gebundener „Sonden“ zu messen, könnte die Verwendung konfokaler Methoden oder spezieller Dekonvolutionsmethoden bieten (McGrath et al., 1996).

1.4.2.2 Durchflusszytometrie

Eine Methode, die zur mehrparametrischen Untersuchung individueller Zellen bei hoher Geschwindigkeit (bis 1000/s) herangezogen werden kann, ist die Durchflusszytometrie (Gilman-Sachs, 1994). Abb. 8 zeigt das Messprinzip, das Resultat der Messung ist in diesem Beispiel als Histogramm dargestellt.

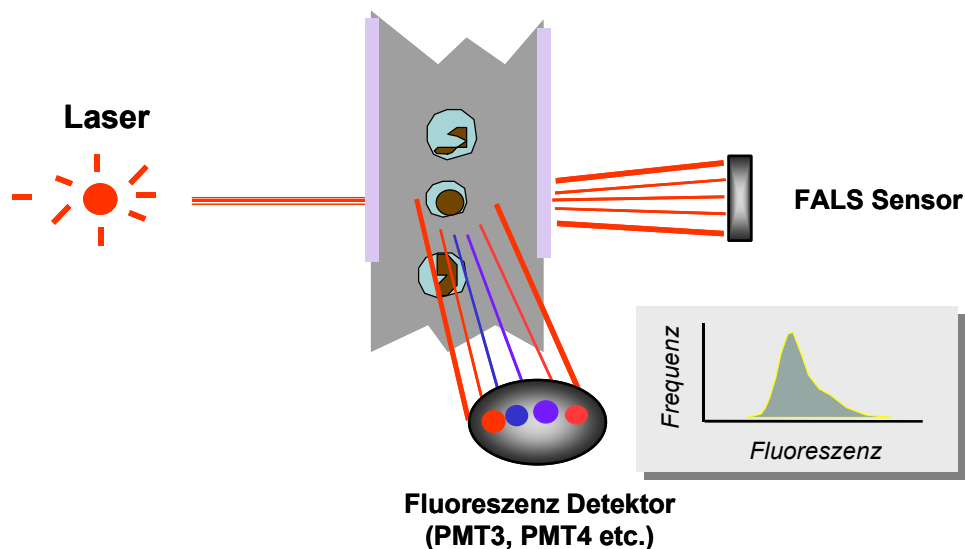


Abb. 8: Prinzip der Durchflusszytometrie: Fluoreszenz und Streulicht individueller Zellen werden erfasst (FALS Sensor: Photodiode zur Detektion des Vorwärtstreulicht).

Der Nutzen der Durchflusszytometrie für die quantitative Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen unter Gleichgewichtsbedingungen wurde zuerst von Bohn, 1980, sowie Sklar et al., 1982, demonstriert. Eine detaillierte Bestimmung von Bindungskonstanten entsprechender Antagonisten durch Konkurrenzexperimente wurde hingegen mittels Flow Cytometry bisher nur ansatzweise unternommen.

1.4.3 Einzelmoleküldetektion und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Für eine erfolgreiche Detektion individueller fluoreszenter Moleküle müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Zum einen muss sichergestellt sein, dass sich im Detektionsvolumen nur wenige oder idealerweise nur ein einziger Fluorophor befinden, zum anderen muss das von ihm generierte Fluoreszenzsignal größer sein als das Hintergrundsignal (Buehler et al., 2001).

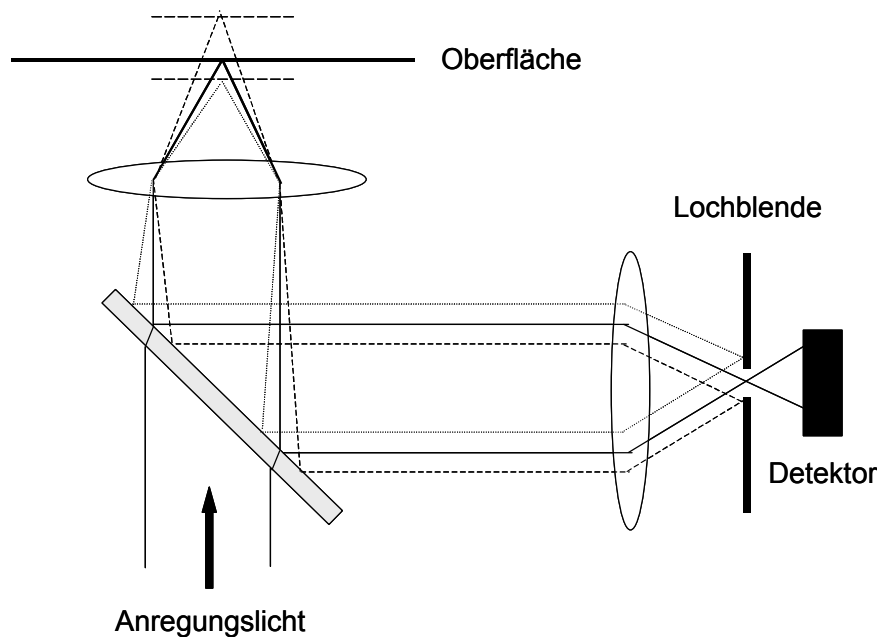


Abb. 9: Strahlengang bei der konfokalen Detektion, diese Messanordnung eliminiert Licht oberhalb und unterhalb des Detektionsvolumens.

Das Hintergrundsignal wird durch lumineszente Verunreinigungen, Reflexionen sowie v. a. durch Raman- und die in diesem Zusammenhang weniger bedeutende Rayleighstreuung verursacht. Die Ramanstreuung macht sich besonders bei der Detektion an Oberflächen (Boden einer Mikrotiterplatte), die optisch wesentlich dichter ist, bemerkbar.

Die spektroskopische Detektion einzelner Moleküle mittels laserinduzierter Fluoreszenz erfordert folglich die konsequente Verkleinerung des Messvolumens, um den störenden Hintergrund so gut wie möglich zu eliminieren. Dies wird durch Verwendung eines Lasers, der mittels Anregungsfilter von störenden Nebenmoden befreit wird, durch verschiedene Filter im Emissionsstrahlengang und v. a. eine Lochblende (engl. pinhole) erreicht. Zugleich bietet sich dadurch aber auch die Möglichkeit zur Miniaturisierung für hochdurchsatzfähige Verfahren. In Abb. 9 ist der Strahlengang für eine konfokale Detektion demonstriert.

Eine Verfeinerung dieser Technik stellt die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie dar. Sie kann zur Bestimmung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen unter Gleichgewichtsbedingungen herangezogen werden. Dabei werden die thermodynamisch bedingten Fluktuationen der Fluoreszenzintensität von Liganden verfolgt. Aus der zeitlichen Autokorrelation dieser Fluktuationen kann sowohl die durchschnittliche Anzahl von Molekülen innerhalb des Mess-

volumens als auch die durchschnittliche Durchgangszeit durch das Messvolumen ($\approx 10^{-15}$ l) berechnet werden (s. Abb. 10). Deswegen sollte die Zielstruktur löslich oder suspendiert sein. Sowohl die Bestimmung von Bindungskonstanten als auch Messungen zur Stöchiometrie der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung sind damit möglich, was z. B. für die Bindung von Kavain an neuronale Strukturen (Boonen et al., 2000) und die Bindung eines Antagonisten an $5HT_{3As}$ -Ionenkanälen (Wohland et al., 1999) gezeigt wurde.

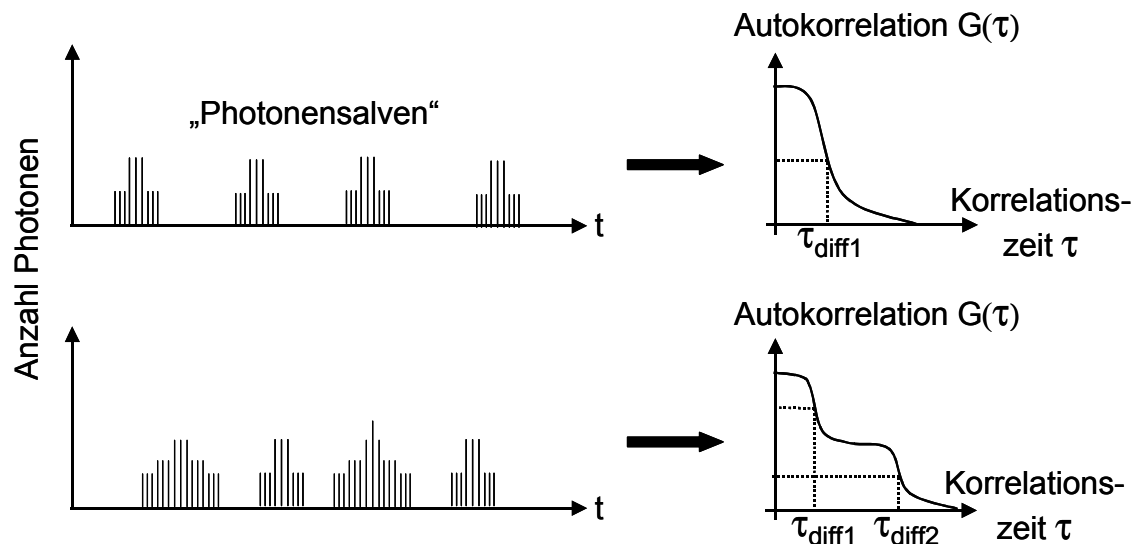


Abb. 10: Konzept der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie: einzelne fluoreszente Moleküle emittieren bei der Passage durch das Messvolumen „Photonensalven“. Aus deren Detektion in Zeitfenstern (links) kann über die Autokorrelationsfunktion $G(t)$ die Diffusionszeit t_{diff} ermittelt werden. Oben rechts: Schnelle Diffusionszeit t_{diff1} (freies fluoreszentes Molekül); unten rechts: Zusätzlich langsame Diffusionszeit t_{diff2} (Komplex der Reaktionspartner) nach Buehler et al., 2001 sowie Boonen et al., 1999.

Wechselwirkungen können jedoch nur verfolgt werden, wenn sich die Diffusionszeit der Reaktionspartner deutlich unterscheidet. Überdies sind (sub-)nanomolare Konzentrationen und Dissoziationskonstanten des Analyten erforderlich, sodass der Hintergrund sorgfältig korrigiert werden muss.

Geräte zur Einzelmoleküldetektion für die Wirkstoffforschung werden beispielsweise von den Firmen Evotec Biosystems, Hamburg, in Zusammenarbeit mit Carl Zeiss, Jena, angeboten.

1.4.4 Fluoreszenzpolarisierung

Die Intensität von polarisiertem Licht, welches durch einen Polarisator hindurchtritt, hängt von der Orientierung des Polarisators ab. Die Transmission ist maximal, wenn die Polarisationssebene senkrecht zur Achse des Polarisationsfilters steht. Für einen parallel polarisierten Lichtstrahl wird die Polarisation p definiert als

$$p = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}$$

wobei $I_{||}$ und I_{\perp} die Intensitäten sind, welche parallel bzw. senkrecht zu einer willkürlich gewählten Achse gemessen werden. Die Polarisation p kann zwischen -1 und $+1$ variieren. $p = 0$, wenn das Licht nicht polarisiert ist, andernfalls spricht man von partieller Polarisation.

Fluoreszenzpolarisierung kann in einem herkömmlichen Fluoreszenzspektrometer gemessen werden, wenn ein Polarisator im Anregungslichtstrahl und ein Analysator in Emissionslichtstrahl positioniert werden. In der Praxis wird dabei der Polarisator in vertikaler Stellung fixiert und die Ausrichtung des Analysators zwischen horizontaler und vertikaler Stellung variiert (Abb. 11).

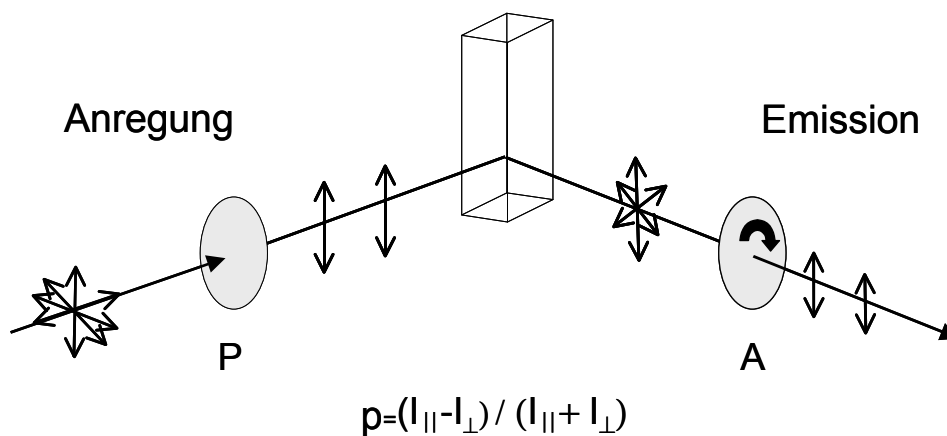


Abb. 11: Messprinzip der Fluoreszenzpolarisierung p mit P : Polarisator, A : Analysator und Gleichung für zur Messung von p : I_{\parallel} , I_{\perp} - Intensität in horizontaler bzw. vertikaler Richtung.

Ist das Anregungslicht parallel polarisiert, beobachtet man üblicherweise, dass das Fluoreszenzlicht entweder *partiell polarisiert* oder vollständig *unpolarisiert* ist.

Um diesen Polarisationsverlust, dessen Änderung und Betrag Informationen über den physikalischen Zustand des emittierenden Moleküls liefern, zu veranschaulichen, muss man sich vergegenwärtigen, dass die Absorption von polarisiertem Licht durch einen Chromophor dann maximal ist, wenn die Polarisationssebene parallel zu einer speziellen Achse des Chromophors, dem sog. elektrischen Dipolmoment, angeordnet ist.

Die Lichtabsorption und -emission von Fluorophoren erfolgt über ein molekülfestes elektrisches Übergangsdipolmoment. Werden Fluorophore mit linear polarisiertem Licht angeregt, so werden diejenigen Moleküle, die zum elektrischen Feldvektor des anregenden Lichts paralleles Übergangsdipolmoment aufweisen, bevorzugt. Die Übergangswahrscheinlichkeit ist proportional $\cos^2 \alpha$, wenn α der Winkel zwischen diesem Übergangsdipolmoment und dem elektrischen Feldvektor der anregenden Lichtwelle ist. Die Fluoreszenz dieser in Lösung statistisch verteilten Fluorophore ist ebenfalls polarisiert, solange sie die Orientierung beibehalten. Aus der Mittelung über alle Molekülorientierungen folgt für schwache Anregung

$$p = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{\cos^2 \beta + 3},$$

wobei β der Winkel zwischen absorbierendem und emittierendem Übergangsdipolmoment im einzelnen Molekül ist.

Die Grenzwerte der Fluoreszenzpolarisation p sind damit $p = 0,5$ für $\beta = 0^\circ$ und $p = -0,333$ für $\beta = 90^\circ$. Verschiedene Mechanismen erniedrigen den Betrag von p . Sieht man von der Überlagerung mehrerer Übergänge, von Schwingungskopplung und Energie-Transfer ab, die durch geeignete Wahl der Spektralbereiche und der Konzentration weitgehend eliminiert werden können, so ist es v. a. die Rotation der Fluorophore während der Lebensdauer des angeregten Zustands, die zu einer Depolarisation der Fluoreszenz führen (Hoppe, Lohmann, Markl und Ziegler, 1978).

Der Wert der Fluoreszenzpolarisation p eines Moleküls ist daher proportional seiner Rotationsrelaxationszeit τ (die Zeit, die Moleküle benötigen, sich um einen bestimmten Winkel zu drehen). Die Rotationsrelaxationszeit τ hängt von der Viskosität η , der absoluten Temperatur T , dem Molekularvolumen V sowie der idealen Gaskonstante R ab:

$$p \sim \tau = \frac{3 \cdot h \cdot V}{R \cdot T}.$$

Werden T und η konstant gehalten, ist die Polarisation direkt vom Molekularvolumen V abhängig. Dieses ändert sich bei der Assoziation oder Dissoziation zweier Moleküle, bei Fragmentierung oder bei Konformationsänderungen.

Der Polarisationsgrad, der als ein Verhältnis von Lichtintensitäten gemessen wird (Abb. 11), ist eine dimensionslose Größe und wird oft in mP (= Millipolarisationseinheiten) ausgedrückt. Vorteilhaft ist bei dieser ratiometrischen Methode, dass experimentell bedingte Fluktuationen der Fluoreszenz automatisch korrigiert werden und dass die Messung unter Gleichgewichtsbedingungen durchführbar ist.

Der Polarisationsgrad wird häufig als Anisotropie r angegeben und hängt mit der Polarisation über folgende Gleichung zusammen:

$$p = \frac{3r}{2+r}$$

Vielfache Anwendung hat die Fluoreszenzpolarisation bei Untersuchung von Membranviskositäten gefunden. Darüberhinaus hat sich diese Methodik zunehmend auch zur Untersuchung molekularer Wechselwirkungen bewährt. Tota et al., 1994, haben an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren entsprechende Messungen durchgeführt. Banks et al., 2000, beschreiben die Anwendbarkeit dieser Methode speziell für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Wesentlich ist hierbei die konfokale Detektion sowie ausreichende Präzision und Empfindlichkeit der verwendeten Geräte, da sonst Streulicht und Hintergrundfluoreszenz zu unüberwindlichen Hindernissen werden. Entsprechende Geräte stehen seit wenigen Jahren für den Hochdurchsatz zur Verfügung. Allerdings verlangt diese Methode den Einsatz von Zellmembranen mit ausreichend hoher Rezeptordichte, für die Untersuchung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren an ganzen Zellen ist sie nicht geeignet.

1.4.5 Zeitaufgelöste Messungen und Energietransfer

Während Fluoreszenzmessungen bei zeitlich konstanter Anregung und Detektion nur ein gemittelt Signal der Intensität ergeben, ist durch eine gepulste und mit einer raschen Detektion koordinierten Anregung auch der zeitliche Verlauf (exponentieller Abfall) der Intensität während der Abklingzeit, die üblicherweise im Nanosekundenbereich liegt, zugänglich. Zeitaufgelöste Messungen sind zwar relativ aufwendig, ermöglichen aber eine hohe Empfindlichkeit durch Elimination des Hintergrunds, der mit etwa 1-20 ns (Soini und Kojola, 1983) relativ kurzlebige Fluoreszenz aufweist (Abb. 12). Für diesen Zweck kommen unter anderem langlebige Fluorophore, z. B. Europium (Abklingzeit: 200-400 μs) als Kryptat oder Übergangsmetalle als Rutheniumkomplexe zum Einsatz. Dabei wird jeweils innerhalb eines kurzen Zeitfensters nach Abklingen der Hintergrundfluoreszenz gemessen.

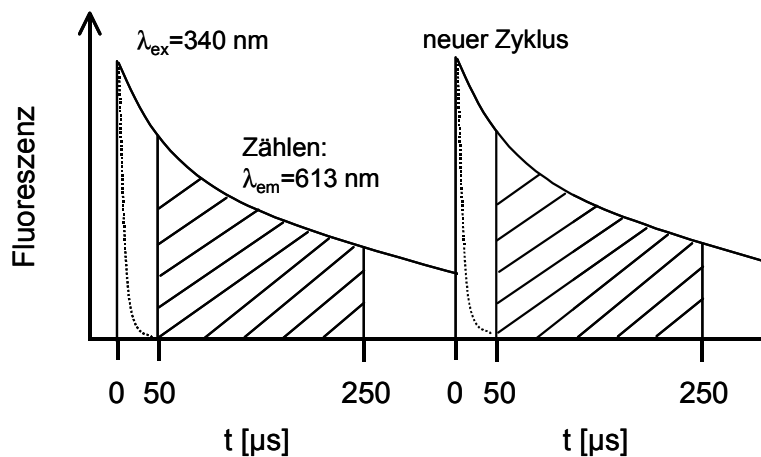


Abb. 12: Messprinzip der zeitaufgelösten Fluoreszenz: Die Detektion erfolgt im gewählten Beispiel 50-250 μs nach gepulster Anregung eines Europiumchelats, Abklingen der Hintergrundfluoreszenz (gepunktete Kurve). 1 Sekunde Messzeit (1000 Messzyklen) sind in der Regel ausreichend (Soini und Kojola, 1983).

Der als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnete Prozess ist eine stark distanzabhängige (proportional $1/r^6$) strahlungslose Wechselwirkung zwischen zwei Fluorophoren, einem Donor und einem Akzeptor. Der als Försterradius bezeichnete Abstand r , bei welchem die Effizienz des Transfers 50 % beträgt, liegt meist bei 1-10 Nanometern. Außerdem ist der Transfer direkt der Schnittfläche zwischen Emissionsspektrum des Donors, dessen Quantenausbeute hoch sein sollte, und Exzitationsspektrum des Akzeptors proportional. Unter diesen Voraussetzungen und eventuell kombiniert mit zeitaufgelöster Messung kann der Energie-Transfer auch zur Detektion spezifischer Bindung (z. B. bei Immunoassays) genutzt werden.

Ein Beispiel eines zeitaufgelösten FRET-basierten Assays wurde von Stenroos et al., 1998, für den Interleukin-2-Rezeptor veröffentlicht. Der mit einem fluoreszenten Antikörper markierte Rezeptor (Membranpräparation) dient als Akzeptor, der mit einem Europiumchelat markierte Ligand als Donor (Abb. 13). Auch für den EGFR-Rezeptor ist ein entsprechender Assay mit

einem Allophycocyanin-Derivat XL665 als Akzeptor und ratiometrischer Messmethodik (bei der spezifischen Bindung nimmt die Fluoreszenz von XL665 bei 665 nm zu, die des Donors bei 620 nm ab) beschrieben (Alpha-Bazin et al., 2001).

Für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erweist sich diese Methodik aber als wenig praktikabel, da entweder der Rezeptor oder ein Membranbestandteil mit dem Donor/Akzeptor markiert werden muss.

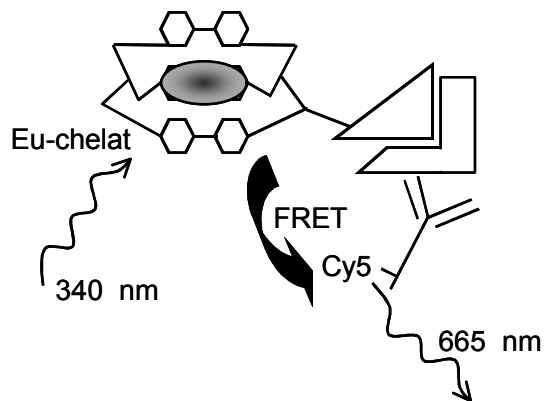


Abb. 13: Prinzip eines FRET-Assays nach Stenroos et al., 1998: Als Messsignal dient die Fluoreszenzintensität des Akzeptors (Energie-Transfer auf Cy5) bei 665 nm, die Detektion erfolgt 50 μ s nach der gepulsten Anregung.

1.4.6 Bestimmung von intrazellulärem Ca^{2+} mittels Fluoreszenz oder Lumineszenz

Zur Bestimmung zytoplasmatischer Ca^{2+} -Konzentrationen finden selektive Ca^{2+} -komplexierende Indikatoren, die z. T. strukturell von dem starken Komplexbildner EGTA abgeleitet sind, Anwendung. Man unterscheidet im wesentlichen zwischen Fluorophoren, die nach Ca^{2+} -Komplexierung einen Shift in der Absorptionswellenlänge aufweisen (z. B. Fura-2) und solchen Substanzen, deren Fluoreszenzintensität sich erhöht (z. B. Oregon Green, Fluo-3). Vorteilhaft bei Fura-2 und verwandten Fluorophoren ist die Möglichkeit der referentiellen Messung. Dabei werden bei zwei Wellenlängen Exzitations-/Emissionsintensitäten zueinander ins Verhältnis gesetzt („Ratio-Methode“). Dadurch wird die Messung von der Konzentration des Indikators unabhängig. Somit fallen Schwankungen in der Zellzahl und der Farbstoffkonzentration sowie eine ungleichmäßige Farbstoffverteilung in den Zellen aufgrund der Kompartimentierung nicht mehr ins Gewicht.

Die skizzierte Vorgehensweise funktioniert sehr gut bei Verwendung von Küvetten mit einem Volumen von 1-2 ml in konventionellen Fluoreszenzspektrometern. Um die Ca^{2+} -Messung auf Mikrotiterplatten zu übertragen, wird üblicherweise im Einwellenlängenmodus im VIS gemessen, da die Anregung v. a. im UV-Bereich zu Problemen mit Hintergrundfluoreszenz und Absorption führt. Ein bereits für den Einsatz erprobtes Gerät (FLIPR™, Molecular Devices) ist mit einem Argon Laser (488 nm) ausgerüstet und erlaubt die Temperatur- und Feuch-

tigkeitskontrolle der Platten sowie die konfokale, simultane Detektion aller 96 Lochböden über eine gekühlte CCD Kamera (Abb. 14). Überdies wären Messgeräte für die ratiometrische Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts in Mikrotiterplatten sehr aufwendig und sind bisher nicht erhältlich.

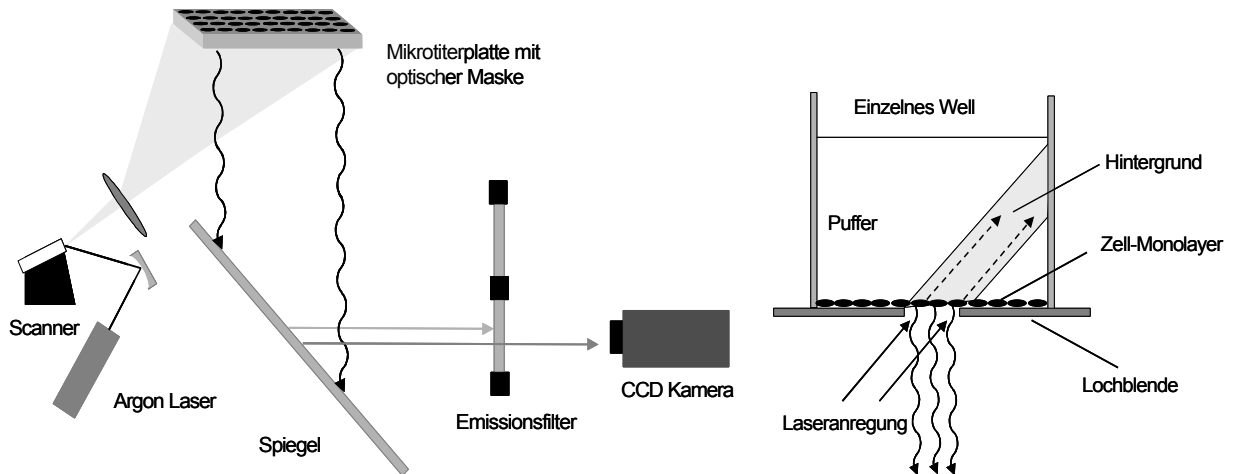


Abb. 14: Schema des Fluorometric Imaging Plate Reader $\hat{\text{O}}$ mit Elimination des Hintergrunds (Broschüre von Molecular Devices, München).

Andere Möglichkeiten einen zytoplasmatischen Ca^{2+} -Anstieg zu messen, bietet die direkte Mikroinjektion des Aequorinkomplexes in die Zellen oder die Transfektion der Zellen mit einem geeigneten Vektor für diesen biolumineszenten Ca^{2+} -Sensor. Diese aufwendige Methodik erfordert aber auch den Einsatz hochempfindlicher CCD-Kameras für die Automatisierung und soll einige Schwierigkeiten aufweisen (Matheakis und Ohler, 2000).

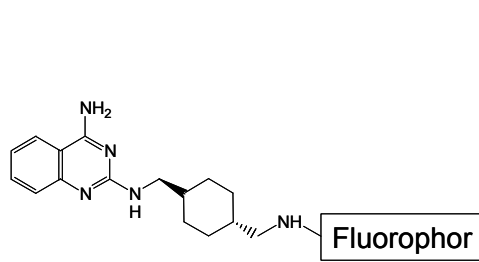
Auch die Expression eines Fusionsproteins, das aus Calmodulin, einem Ca^{2+} -bindenden Protein, besteht und mit zwei Mutanten des GFP („green fluorescent protein“) an den jeweiligen Enden fusioniert ist, könnte für intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen nützlich sein. Die bei der Bindung von Ca^{2+} resultierende Konformationsänderung kann über einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen BFP („blue fluorescent protein“) und GFP detektiert werden (Finney, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Indikator Oregon GreenTM der Versuch unternommen, Ca^{2+} im 96-Well-Format zu messen.

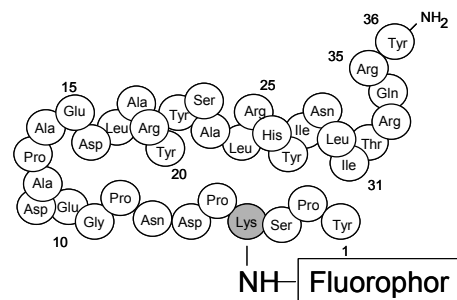
2 Problemstellung

Basierend auf einschlägigen Vorarbeiten am Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II der Universität Regensburg sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Affinität und der Funktion von Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren fluoreszente bioanalytische Methoden entwickelt werden, die sich potentiell zu hochdurchsatzfähigen Verfahren ausbauen lassen. Als Modellverbindungen wurden in der Arbeitsgruppe synthetisierte subtypelektive Histamin- und NPY-Rezeptorliganden verwendet.

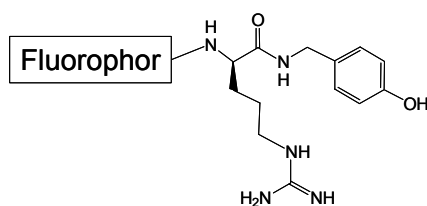
Zur Charakterisierung von Agonisten und Antagonisten kann u. a. die Wirkung auf intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden herangezogen werden wie die Beeinflussung des zytosmatischen Ca^{2+} -Spiegels, der z. B. nach Bindung eines Agonisten durch Öffnung von Ionenkanälen oder Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern transient erhöht sein kann. Bei klonierten, in geeigneten Zelllinien exprimierten Rezeptoren, die zunehmend für die Testung eingesetzt werden, ist eine intakte Signaltransduktion oft nicht gegeben, sodass nur die Möglichkeit besteht, die Rezeptorbindung direkt zu messen. Dazu werden üblicherweise Konkurrenzexperimente mit Radioliganden durchgeführt. Ein neuer Ansatzpunkt zur Bestimmung der Affinitäten von Liganden ist die Nutzung fluoreszenter Proben. Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind jedoch eine Fülle von Schwierigkeiten zu überwinden. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit stand dazu kein geeignetes fluoreszenzbasiertes Verfahren zur Verfügung.



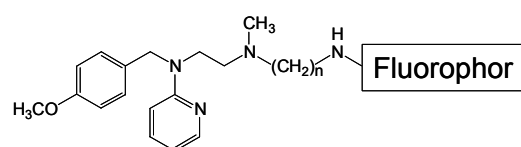
NPY Y_5 -Antagonisten



Markiertes NPY: Ligand für alle NPY-Rezeptoren



NPY Y_1 -Antagonisten



Histamin- H_1 -Antagonisten

Zunächst war die Synthese von fluoreszenten Rezeptorliganden gefordert, die trotz der Markierung eine ausreichende Affinität und Selektivität zum Rezeptor aufweisen und zusätzlich ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis ermöglichen. Dazu wurden von Herrn Li (Li, 2001) u. a. Liganden als Varianten obiger Strukturen mit jeweils unterschiedlichen Spacerlängen synthetisiert.

Um nur die Anzahl an Bindungsstellen zu bestimmen, genügen Antirezeptor-Antikörper, für die Bestimmung von Bindungskonstanten jedoch benötigt man Substanzen, die um die gleiche Bindungsstelle wie die endogenen Liganden konkurrieren. Zudem sollten subnanomolare Konzentrationen des fluoreszenten Liganden rasch an einer repräsentativen Zahl von Zellen möglichst im rezeptorgebundenen Zustand gemessen werden können. Der „ideale“ fluoreszente Ligand sollte folgende Eigenschaften aufweisen (vgl. Baidur und Triggler, 1994):

- Hohe Rezeptoraffinität und -selektivität.
- Einen hohen Extinktionskoeffizienten im Bereich der Anregung (nach Möglichkeit 488 nm/633 nm für die gängigen Laser), um eine Detektion mit hoher Empfindlichkeit zu ermöglichen.
- Er sollte eine hohe Quantenausbeute ($> 0,3$) im rezeptorgebundenen Zustand besitzen.
- Die Probe sollte in einem spektralen Bereich anregbar sein, in welchem keine Anregung zelleigener Fluorophore stattfindet.
- Für die Fluoreszenzmikroskopie ist zusätzlich eine ausreichende Photostabilität erforderlich.
- Je nach Messmethodik eine geeignete Fluoreszenzlebensdauer - eine kurze Lebensdauer für die Durchflusszytometrie, für zeitaufgelöste oder hochempfindliche Messungen dagegen eine lange Lebensdauer.
- Fluoreszenzmarkierte endogene Agonisten haben meistens den Vorteil, dass sie nicht nur für einen einzigen Rezeptorsubtyp, sondern als Tool an allen weiteren Rezeptoren eingesetzt werden können, an welche auch der endogene Ligand bindet. Auf diese Weise umgeht man die bei der Verwendung von Antagonisten nötige Herstellung einer Vielzahl subtypselektiver fluoreszenter Rezeptorliganden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Am Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II waren bereits eine Reihe zellulärer Testsysteme etabliert. Für NPY-Liganden wurden neben cAMP-Assays der Ca^{2+} -Assay an HEL-Zellen und die Radioligandbindungstests an SK-N-MC-Zellen (Y_1 -Bindung), an SMS-KAN-Membranen (Y_2 -Bindung), Gebele, 1998, sowie an Y_5 -transfizierten HEC-1B-Zellen eingesetzt (Y_5 -Bindung; Moser, 1999). Zudem wurden für Histamin-Rezeptorliganden organpharmakologische Modelle wie das Meerschweinchenileum (Histamin H_1 -Liganden) oder der Meerschweinchen-Vorhof (Histamin H_2 -Liganden) herangezogen. Diese Testsysteme und die Vorarbeiten von Li und Kracht dienten als Basis der vorliegenden Arbeit, Testmodelle fluoreszenter Methodik zu entwickeln (Li, 2001 und Kracht, 2001). Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die potentielle Hochdurchsatzfähigkeit der Assay-Methode gelegt.

Die Verwendung intakter Zellen für Ligand-Bindungsstudien gegenüber Membranpräparationen hat mehrere Vorteile. Die physiologische Situation wird eher wiedergespiegelt, da der Rezeptor sich in seiner natürlichen Umgebung befindet und die Kopplung an die Signaltransduktion sowie weitere zelleigene Regulationsmechanismen erhalten bleiben.

Zusätzliche Einflüsse können bei einem Bindungsassay an intakten Zellen jedoch ins Gewicht fallen:

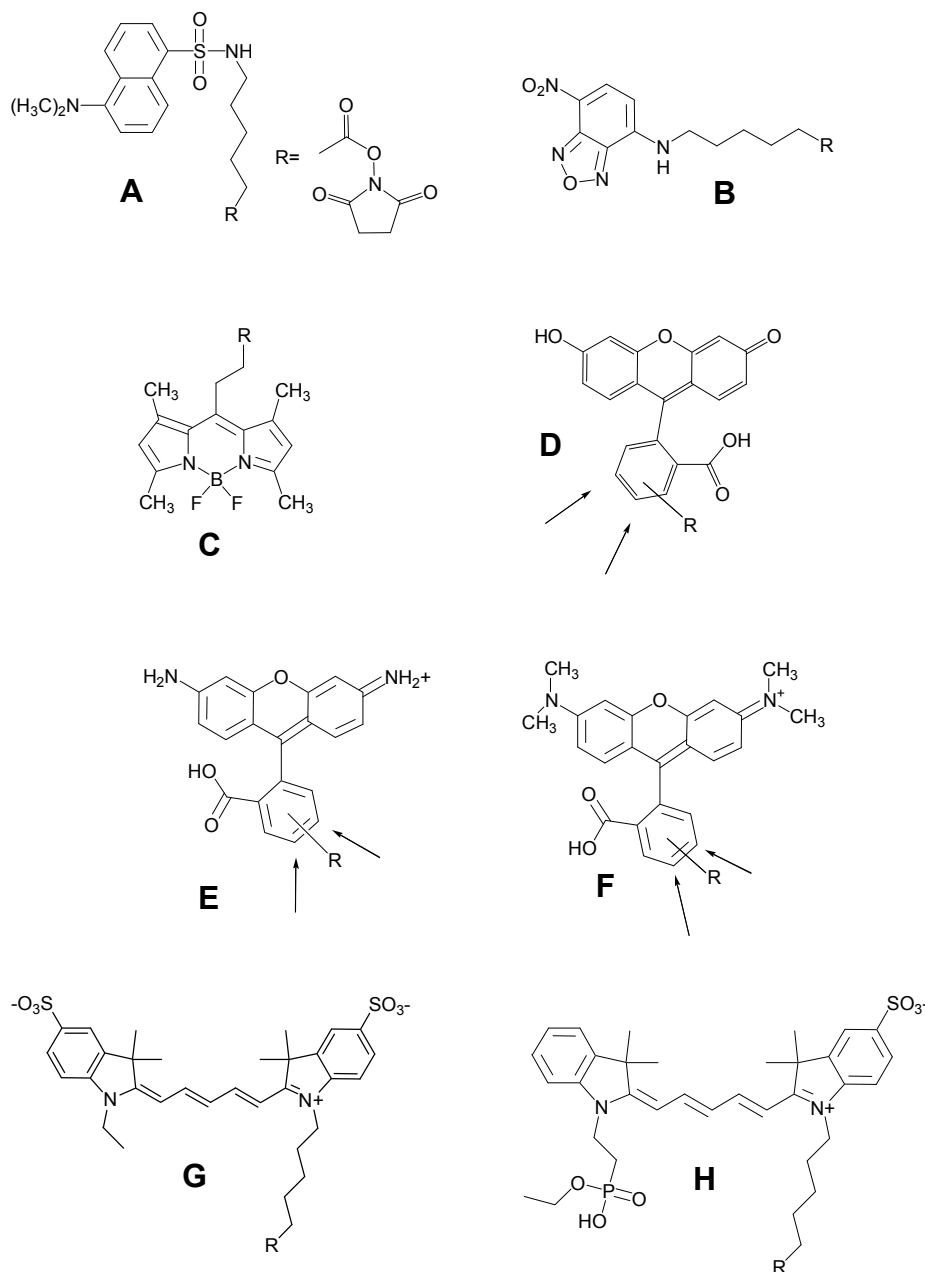
- Effekte anorganischer Ionen wie Ca^{2+} , deren Konzentration kaum verändert werden kann, auf die Bindungsaffinität,
- Konzentration von GTP in der Zelle, die zu niedrig affinem Rezeptorstatus führt,
- lipophile Eigenschaften des Tracerliganden (passive Diffusion in die Zellen) und
- subzelluläre Lokalisierung der Rezeptoren sowie agonist-induzierte Internalisation und Recycling der Rezeptoren.

Viele dieser Faktoren variieren zwischen den Rezeptoren und sogar deren Subtypen. Deswegen ist es erforderlich, die Testbedingungen in jedem Einzelfall zu untersuchen und zu optimieren.

3.1 Synthese, Trennung und Charakterisierung der NPY-Derivate und verwendeten Fluorophore

3.1.1 Auswahl der Fluorophore

Der Auswahl des geeigneten Fluorophors zur Markierung kommt entscheidende Bedeutung zu: Von den Radioliganden [^3H]-Propionyl-NPY und [^{125}I]-NPY war bekannt, dass die ϵ -Aminogruppe des Lys-4 eine geeignete Position zur Markierung mit kleineren Gruppen darstellt. Im Falle der fluoreszenten Liganden sind die eingeführten Gruppen jedoch sperrig. Deswegen sind Kompromisse zwischen Größe und Ladung, Quantenausbeute bzw. spektralen Eigenschaften bei der Wahl des Fluoreszenzfarbstoffs für die Markierung erforderlich.



*Tabelle 3:
Strukturen der zur
Fluoreszenzmar-
kierung (als
Succinimidylester)
eingesetzten
Farbstoffe.*

Tabelle 4: Charakteristika der eingesetzten Fluorophore

Fluorophor	λ_{Ex} [nm]	λ_{Em} [nm]	MM [g/mol]	ϵ^1	Φ	Charakteristika
A Dansyl	335	518	347	4,2 ¹	<0,3	Fluoreszenzänderung je nach Polarität der Umgebung, geringe Quantenausbeute
B Nitrobenzoxadiazol (NBD)	466	535	277	22 ¹	<0,1	Fluoreszenzänderung je nach Polarität der Umgebung, geringe Quantenausbeute
C BodipyFL™(4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-propionsäure	500	509	303	79 ³	>0,8 ³	unpolar, schmale Exzitations-/Emissionsbande, Quenching durch Proteine
D 5-/6-Carboxyfluorescein, Isomerengemisch	495	519	359	55 ^{3a}	0,81 ⁵	pH-Abhängigkeit, Quenching durch Proteine
E 5-/6-Carboxyrhodamin, Isomerengemisch	504	532	358	78 ²	-	Quenching durch Proteine, geringe Quantenausbeute
F 5-/6-Carboxytetramethyl-rhodamin, Isomerengemisch	546	576	414	95 ²	0,35 ⁵	geringe Quantenausbeute
G Cy5 (Amersham)	649	670	638	250 ³	0,28	Emission im roten Wellenlängenbereich, hoher Extinktionskoeffizient
H Cy5-P (LS Wolfbeis)	649	670	768	180 ³	-	Emission im roten Wellenlängenbereich, hoher Extinktionskoeffizient

¹[$\cdot 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], ²in MeOH, ³in PBS, ^{3a}in PBS nach Tota et al., 1994, ⁴Karolin et al., 1994, ⁵Whitaker et al., 1992: 50 mM Phosphatpuffer, pH= 8,0-9,0.

Die Tabellen 3 und 4 zeigen die Strukturen und Charakteristika der für die Markierung von NPY verwendeten Fluorophore. Fluorescein ist ein breit eingesetzter Farbstoff, der eine hohe Quantenausbeute und eine relativ kompakte Struktur besitzt. Von Nachteil sind jedoch das Fluoreszenzspektrum, das mit dem der Flavine zusammenfällt, mäßige Photostabilität, pH-

Abhängigkeit der Intensität - sie nimmt mit fallendem pH-Wert ab - und Quenching in der Gegenwart von Proteinen, was auf Charge-Transfer-Wechselwirkungen (Exiplex) mit aromatischen Aminosäureresten zurückgeführt wird.

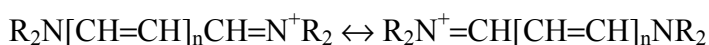
Quenching wird auch bei NBD (Futamura et al., 2001) und BodipyFL beobachtet (Karolin et al., 1994). Der Prototyp der Bordifluorpyrromethene hat ähnliche spektrale Eigenschaften wie Fluorescein, die Banden sind jedoch schmaler. Der Fluorophor hat eine höhere Photostabilität sowie geringere Abhängigkeit von pH und Polarität der Umgebung und ist im Gegensatz zu den meisten Fluorophoren ungeladen, was für die Rezeptorbindung unter Umständen von Vorteil ist.

Die Rhodamine sind photostabiler als Fluorescein, im physiologischen Bereich kaum pH-empfindlich und oberhalb von 500 nm anregbar (Whitaker et al., 1992), was die Autofluoreszenz reduziert. Ein Nachteil besteht jedoch in der geringeren Quantenausbeute im Vergleich zu Fluorescein.

Für NBD spricht die höhere Photostabilität, ein relativ großer Stokes' Shift sowie eine starke Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Polarität der Umgebung. Die Intensität ist jedoch aufgrund des mäßigen Extinktionskoeffizienten und einer geringen Quantenausbeute schwach.

Dansyl-Derivate haben den Vorteil, dass sie relativ kleine Fluorophore darstellen und einen beachtlichen Stokes' Shift aufweisen. Ihr kleiner Extinktionskoeffizient und die je nach Umgebung variable Quantenausbeute verursachen jedoch deutliche Probleme hinsichtlich Detektion und Empfindlichkeit.

Die Cyaninfarbstoffe sind für vielfältige Anwendungen einsetzbar. Ursprünglich wurden sie von Kodak als Sensitizer für fotografische Filme entwickelt. Gemeinsam sind ihnen zwei Heterozyklen, die über eine konjugierte Polymethin-Kette verbunden sind. So werden SYTO[®] und TOTO[®] für DNA-Quantifizierung eingesetzt, da sich ihre Fluoreszenz bei der Bindung an Nucleinsäuren drastisch verstärkt. Sie weisen sogar eine Basenpräferenz auf. Die allgemeine Formel lautet:



Die Klasse der Indocarbocyanine eignet sich für die Markierung von Liganden aufgrund ihrer langwelligen Anregung und Emission sowie ihrer relativen pH-Unempfindlichkeit. Die Fluorophore unterscheiden sich in der Länge der Kette, welche die beiden basischen Heterozyklen verbindet, die spektralen Eigenschaften beeinflusst, aber auch für die Stabilität entscheidend ist. Die Einführung hydrophiler Gruppen (Carboxymethyl: Southwick et al., 1990; Sulfonsäuren: Mujumdar et al., 1993) hat ihren Einsatz erst ermöglicht, da die Affinität der Grundstruk-

turen zu Membranen sehr hoch ist, was für die unspezifische Bindung entscheidend ist. Überdies verhindern die sauren funktionellen Gruppen Wechselwirkungen wie „Selfquenching“ durch Ladungsabstoßung. Der Extinktionskoeffizient für Cyanin-5 liegt bei $250000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in wässrigem Medium bei pH-Wert 7,4. Im Abschnitt 3.1.5 ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei der Bindung an BSA dokumentiert.

Die Phycobiliproteine aus Cyanobakterien und Algen, die als akzessorische Pigmente bei der Photosynthese fungieren, sind Makromoleküle. Deren Einsatz als Fluorophore mit sehr hoher Quantenausbeute ist wegen ihrer hohen Molmasse für niedermolekulare Liganden nicht möglich. So ist beispielweise APC (=Allophycocyanin) wie Cy5 von einem roten Diodenlaser (633 nm) anregbar und hat eine deutlich höhere Quantenausbeute (0,68 bei $\lambda_{\text{EX}} = 650 \text{ nm}$) sowie bessere Photostabilität als Cy5. Die Molmasse beträgt aber 104.000 g/mol. Die Fluoreszenzspektren der NPY-Derivate, für die in Tabelle 5 eine Bezifferung eingeführt wird, sind mit Ausnahme des Dansyl-Derivats dem experimentellen Teil zu entnehmen. Die Spektren entsprechen den jeweiligen Fluorophoren.

3.1.2 Synthese der NPY-Derivate

NPY verfügt über zwei primäre Aminogruppen: Am N-terminalen Tyrosin (Tyr-1) und am Lysin der Position vier (Lys-4). Aufgrund der benachbarten Carbonyl-Gruppe ist die α -Aminogruppe des Tyr-1 weniger reaktiv als die ϵ -Aminogruppe des Lys-4. Es ist daher möglich, NPY selektiv am Lys-4 zu markieren, zumal diese Position stärker exponiert ist und daher für sperrige Fluorophore (Tabelle 3) besser zugänglich ist. Hinzu kommt, dass diese ϵ -Aminogruppe zwar zur NPY Y_1 -Rezeptoraffinität beiträgt, aber nicht essentiell ist, so dass im Gegensatz zum N-Terminus eine Markierung ohne wesentliche Wirkungsabnahme toleriert

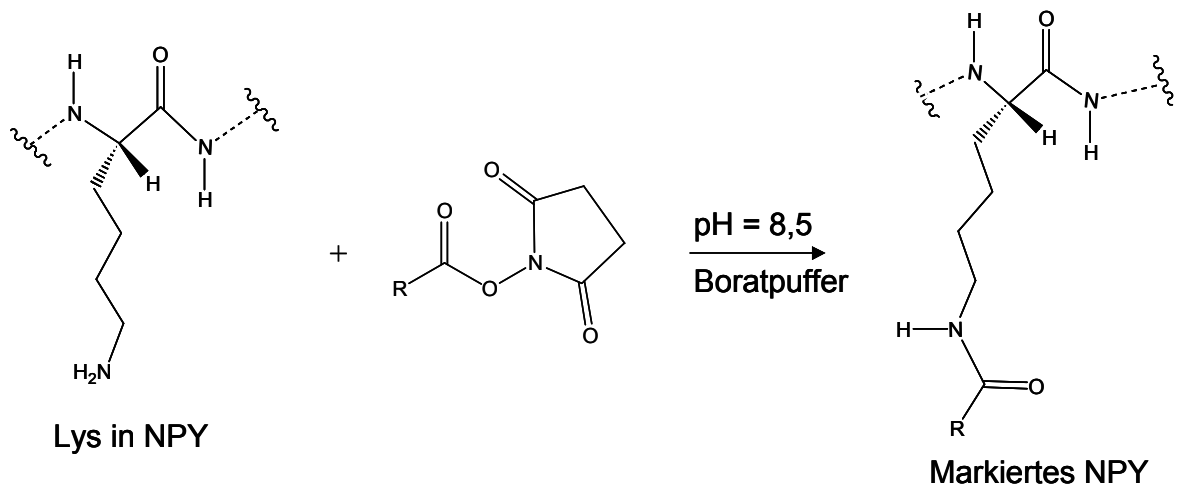


Abb. 15: Schema der Fluoreszenzmarkierung von NPY, $R = A-H$ (Tabelle 4).

wird (Seikh et al., 1990). Dessen ungeachtet wurde von Fabry et al., 2000, ein N-terminal markiertes Carboxyfluorescein-NPY beschrieben (s. Abschnitt 3.1.3).

Die für die Markierung verwendeten Succinimidylester sollten besser geeignet sein als Isothiocyanate, da die erhaltenen Amide in ihrer Stabilität den Peptidbindungen vergleichbar sind. Die aus Aminen und Isothiocyanaten gebildeten Thioharnstoffgruppen sind demgegenüber weniger stabil (Slavik, 1994).

Die für die Markierung verwendeten Fluorophore sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt und die Bezifferung der markierten NPY-Liganden in Tabelle 5 und 6.

3.1.3 Trennung und pharmakologische Charakterisierung der fluoreszenten NPY-Derivate

Da die Fluoreszenzmarkierung nur geringe Reaktionsausbeuten sowie Produktgemische lieferte (s. auch experimenteller Teil) und für die weiteren (kompetitiven) Experimente eine hohe Reinheit entscheidend war, wurden die Reaktionsprodukte mittels HPLC unter jeweils leicht modifizierten Bedingungen getrennt. Überdies sind einige kommerzielle aktivierte Farbstoffe nur als Isomerengemische erhältlich (Tabelle 3). Am Beispiel des Cy5-NPY **1** (Tabelle 5) soll die Trennung ausführlicher dargestellt werden.

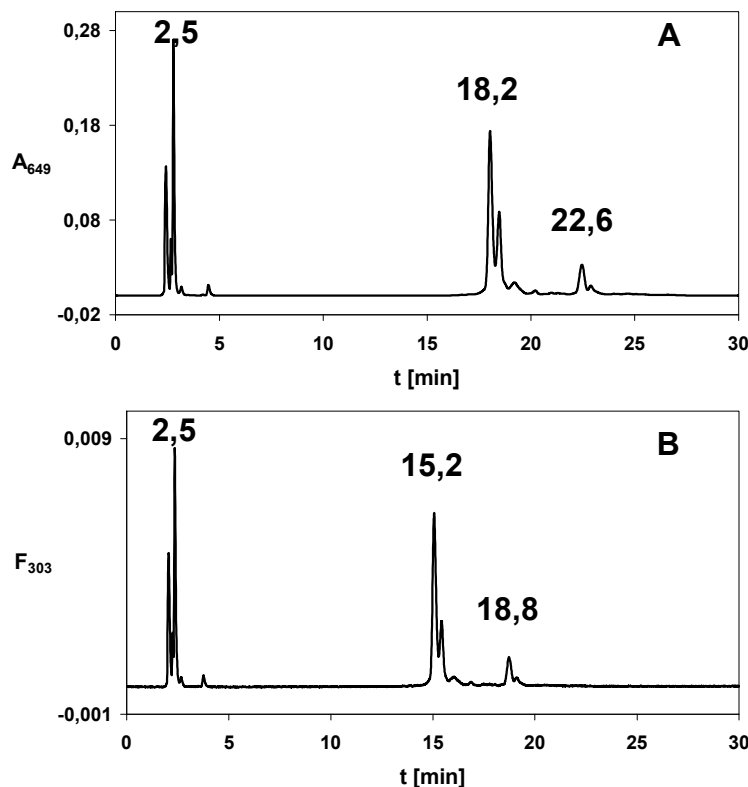


Abb. 16: Repräsentative Chromatogramme für die Trennung des NPY/Cyaninfarbstoffgemisches (Amersham) nach 22 h Reaktionsdauer, **A**: Absorption des Fluorophors bei 649 nm **B**: Tyrosinfluoreszenz bei 276/303 nm. Trennbedingungen: Nucleosil 300-5C-18 Trennsäule; Gradient: 0 min: 30 % Acetonitril, 40 min: 48 % Acetonitril; Injektionsvolumen 25 μ l, RT, 0,7 ml/min. $t_R = 2,5$ min: Cyaninfarbstoffe $t_R = 15,2$ min: pNPY $t_R = 18,2/18,8$ min: an Lys-4 markiertes Cy5-NPY **1** $t_R = 22,6$ min: an Tyr-1 markiertes Cy5-NPY **2**.

Der UV/VIS-Detektor war dem Fluoreszenzdetektor vorgeschaltet, die zeitliche Differenz betrug ca. 4 s. Durch Spikes der Lösung mit NPY und aufgrund der Tyrosinfluoreszenz wurde der Peak mit der Retentionszeit (t_R) von 15,2 min als nichtumgesetztes pNPY identifiziert. Der Peak mit $t_R = 18,2/18,8$ min, VIS-/Fluoreszenzdetektion, erwies sich nach massenspektrometrischer Analyse und Ansequenzierung als am Lys-4 einfach markiertes Cy5-NPY **1** (Tabelle 5). Der am VIS-Detektor bei 22,6 min erscheinende Peak lieferte hingegen kein Fluoreszenzsignal bei 275/303 nm. Eine Masse war für diesen Peak nicht zu bestimmen. Die spektralen und die pharmakologischen Daten sprechen jedoch dafür, dass es sich um N-terminal markiertes Cy5-NPY **2** handelt (Tabelle 6). **2** hat eine stark verminderte Affinität auch am Y_1 -Rezeptor, für die der N-Terminus des NPY entscheidend ist (Seikh et al., 1990).

Die Peaks bei einer Retentionszeit von 2,5 min sind auf das uneinheitliche Edukt (Cy5™-Succinimidylester von Amersham) zurückzuführen. Der aktivierte Farbstoff **G** (Amersham) wurde daraufhin genauer untersucht. Abb. 17 A und B zeigen die entsprechenden Chromatogramme nach einer 22-stündigen Hydrolyse in Hydrogencarbonatpuffer bei pH 9,1. Man kann erkennen, dass das aus mehreren Komponenten bestehende Edukt nach der Hydrolyse noch Fluoreszenz wie Farbstoff **G** aufweist. Das bedeutet, dass das Eduktgemisch nach der Hydrolyse nicht an den konjugierten Doppelbindungen fragmentiert wurde und v. a., dass es sich bei dem Eduktgemisch nicht um teilweise aktivierten Farbstoff, sondern um Isomere oder ähnliche Farbstoffe handeln muss. Das von der Arbeitsgruppe Wolfbeis erhaltene aktivierte Cyanin-Derivat **H** (Phosphonester) war dagegen zu 97-99 % rein (Abb. 17 C, D).

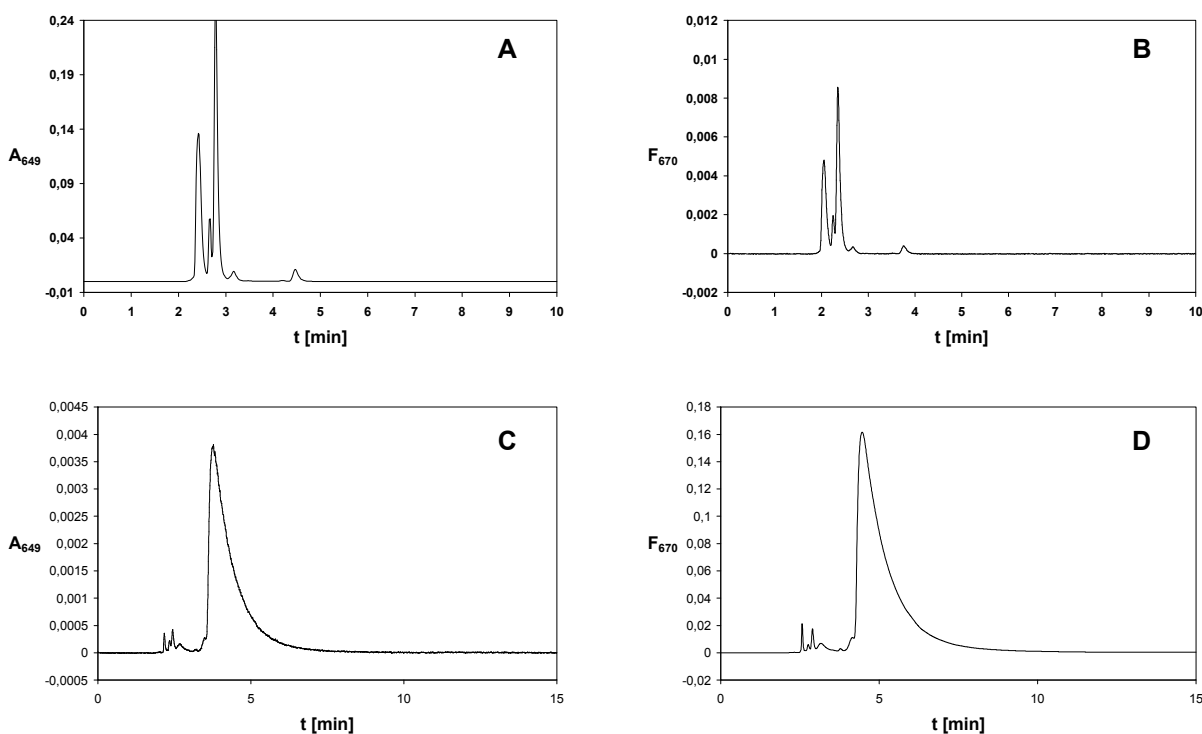


Abb. 17: Chromatogramme (Absorption bei 649 nm bzw. Fluoreszenz bei 640/670 nm) von **A,B**: Cy5-Carbonsäuren (Amersham), nach Hydrolyse in Hydrogencarbonatpuffer (pH = 9,1; 22h) **C,D**: Cy5-P-Succinimidylester. Trennbedingungen s. Abb. 16.

Die HPLC unter den in Abb. 16 beschriebenen Bedingungen war ebenfalls für die Untersuchung der Stabilität gelagerter Chargen von Cy5-NPY **1** erforderlich. Eine optimale Stabilität der fluoreszenten NPY-Liganden ist nur gewährleistet, wenn die benötigten Mengen des fluoreszenten Liganden, die in Portionen lyophilisiert wurden, erst vor der Testung in 10 mM HCl gelöst werden. Ab einer Lagerung von ca. einem Jahr (lyophilisiert und bei -30°C aufbewahrt) ist aber dennoch von einem beträchtlichen Stabilitätsverlust auszugehen.

Von NPY ist bekannt, dass es an Wänden von Reaktionsgefäßen und Pipetten adhärirt. Dieses Verhalten ist besonders bei niedrigen Konzentrationen relevant. Um die Adhersion zu minimieren, wurde, wenn möglich 0,1 % BSA zugesetzt. Außerdem wurden silikonisierte Gefäße verwendet.

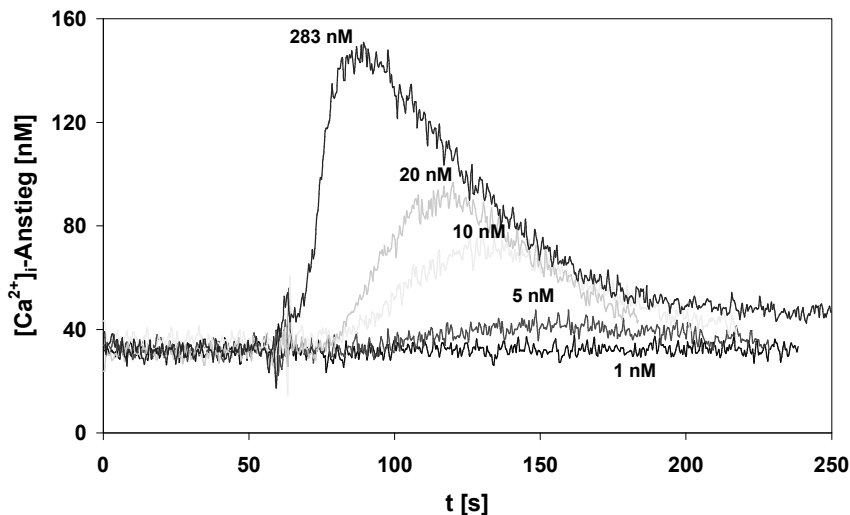
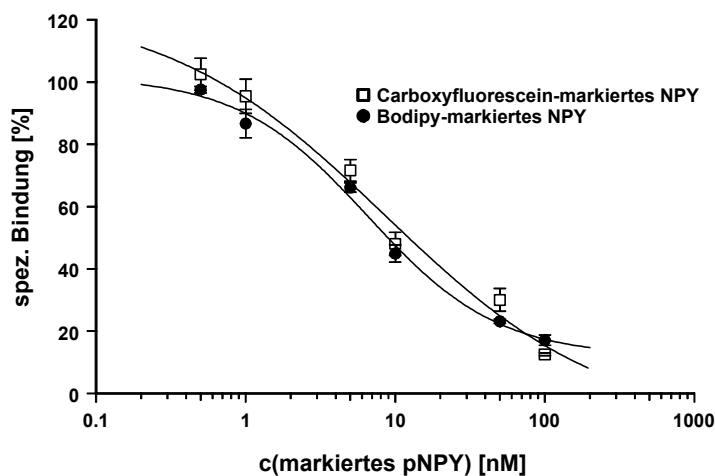


Abb. 18: Ca^{2+} -Anstieg in HEL-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Carboxyfluorescein-pNPY 5 (Küvettenmessung mit Spektrofluorimeter PE LS50B).

Nach der Konzentrationsbestimmung (s. experimenteller Teil) wurden die fluoreszenten NPY-Derivate zuerst im Ca^{2+} -Assay an HEL-Zellen auf Y_1 -Rezeptoragonismus getestet. Abb. 19 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit des Ca^{2+} -Anstiegs für das Carboxyfluorescein-Derivat 5. Dieser Assay, bei dem die Fluoreszenz des Ca^{2+} -komplexierenden Indikators Fura-2 gemessen wird, wurde durch die fluoreszenten NPY-Derivate bis auf eine Ausnahme nicht beeinträchtigt. Nur im Falle des BodipyFL-markierten NPY wurde die Detektion des Ca^{2+} -Signals gestört (nicht gezeigt). Verantwortlich ist dafür eine Absorption der Fura-Fluoreszenz durch diesen Fluorophor (sekundärer innerer Filtereffekt). Auch die Ergebnisse im Y_1 -Bindungstest



an SK-N-MC-Zellen bestätigten eine im Vergleich zu NPY $K_i = (0,68 \pm 0,2)$ nM zwar verminderte Affinität von 5 und 6, die aber mit $K_i = (3,47 \pm 3,0)$ nM bzw. $K_i = (2,66 \pm 0,64)$ nM tolerierbar ist (Abb. 19).

Abb. 19: Konkurrenzkurven (Radioligandbindung) der beiden fluoreszenten Liganden 5, 6 an SK-N-MC-Zellen; $n = 3$, $MW \pm SEM$.

Tabelle 5 zeigt, dass alle am Lys-4 modifizierten Peptide eine im Vergleich zu pNPY verringerte Affinität aufweisen. Außerdem ist ersichtlich, dass die Affinität von der Größe des Fluorophors und der Länge des Spacers bestimmt wird. Das Carboxyfluorescein- und auch das Tetramethylrhodaminderivat **5** bzw. **11** weisen keinen, das BodipyFL-markierte **6** dagegen einen Ethylen-Spacer auf. Das Dansyl-Derivat **7** und das NBD-Derivat **9** sowie **1** haben sogar Pentamethylen-Spacer. Die Derivate **7** und **9** mit sehr kleinen Fluorophoren zeigen dementsprechend die größte Affinität.

Tabelle 5: NPY Y₁-Agonismus von pNPY und fluoreszenten Derivaten

Fluorophor	Substanz Nr.	Derivat ^e	Rel. [Ca ²⁺] _i -Anstieg in % ^a
G	1	Cy5-NPY	40
G	2	Cy5-NPY ^d	-
-	4	pNPY	100
D	5	Carboxyfluorescein-NPY	30
C	6	BodipyFL-NPY	37
A	7	Dansyl-NPY	80
A	8	(Dansyl) ₂ -NPY ^b	61
B	9	NBD-NPY	86
B	10	(NBD) ₂ -NPY ^b	66
F	11	Tetramethylrhodamin-NPY	29

^ainduziert durch 10 nM Verbindung, bezogen auf NPY=100%, MW ± SEM (15%) und n = 3, ^bvermutlich waren die beiden doppelt markierten NPY-Derivate zusätzlich am N-Terminus markiert, ^cLys-4-markiert, ^dvermutlich am Tyr-1-markiert, ^efür alle Liganden wurde pNPY eingesetzt.

Eine weitere Markierung am N-Terminus reduzierte die Affinität der Dansyl- und NBD-Derivate **8**, **10** nicht drastisch. Fabry et al., 2000, berichteten von einem Carboxyfluorescein-NPY, das am N-terminalen Tyrosin markiert wurde. Dieser Ligand hat einen K_i-Wert von 2,75 nM, der gegen [³H]-Propionyl-NPY an SK-N-MC-Zellen bestimmt wurde.

Für diejenigen Peptide, die in ausreichender Menge vorhanden waren, wurden auch detailliertere pharmakologische Daten bestimmt (Tabelle 6). Abb. 20 zeigt die Konzentration-Wirkungskurven dieser Derivate. Das Carboxyfluorescein-NPY ist ein partieller Agonist, da es im Ca²⁺-Assay (HEL-Zellen) nicht den Maximaleffekt des unmarkierten NPY erreicht. (Für

das Carboxyfluorescein-markierte NPY beträgt die maximale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ca. 115 nM, für pNPY ca. 200 nM und darüber). Die Cyanin-Derivate mit dem Pentamethylen-Spacer zeigen dagegen vermutlich einen mit pNPY vergleichbaren Maximaleffekt.

Tabelle 6: Pharmakologische Daten einiger fluoreszenter NPY-Derivate.

Substanz Nr.	Ligand	Y_1 -Agonismus ¹ EC ₅₀ [nM]	Y_1 -Bindung ² K _i [nM]	Y_1 -Bindung ³ K _i [nM]	Y_5 -Bindung ⁴ K _i [nM]
5	Carboxyfluorescein-NPY	17	3,47 ± 3,0	-	-
6	BodipyFL-NPY	4,8	2,66 ± 0,64	-	-
1	Cy5-NPY (t _R ~ 18 min)	33,3	-	5,5 ± 1,99	4,44 ± 0,84
2	Cy5-NPY (t _R ~ 22 min)	>>100	-	148,8 ± 16,4	131,9 ± 29,3
12	Cy5-P-NPY	42,8	-	41,38 ± 8,31	24,67 ± 9,10

¹ Ca^{2+} -Assay (HEL-Zellen), ² Radioligandbindung an SK-N-MC-Zellen), [³H]-Propionyl-NPY, ³ HEL-Zellen, ⁴ Y_5 -transfizierte HEC-1B-Zellen, n = 3-6, MW ± SEM.

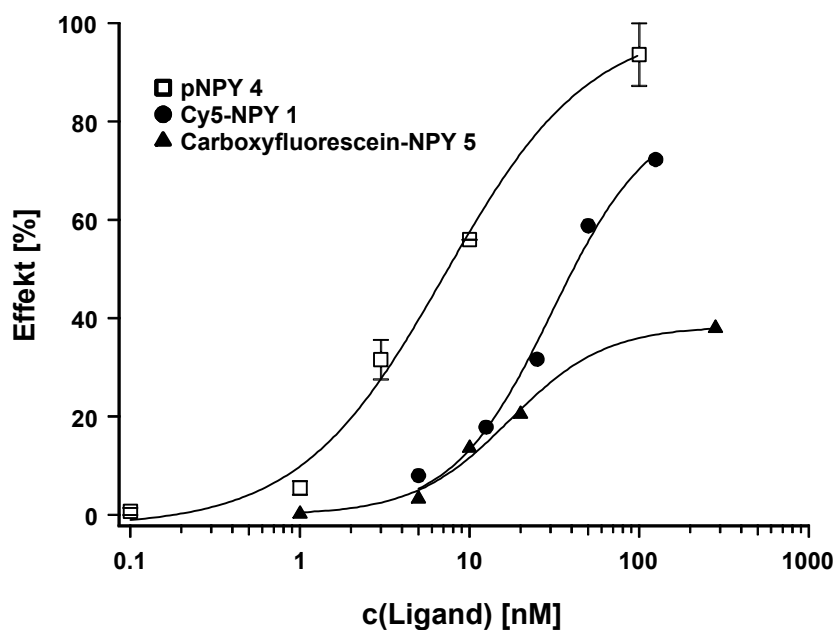


Abb. 20:
Konzentrations-
Wirkungs-Kurven von
pNPY 4 (= 100 %),
Cy5-NPY 1 und
Carboxyfluorescein-
NPY 5 im Ca^{2+} -assay
(HEL-Zellen); n = 1-2.

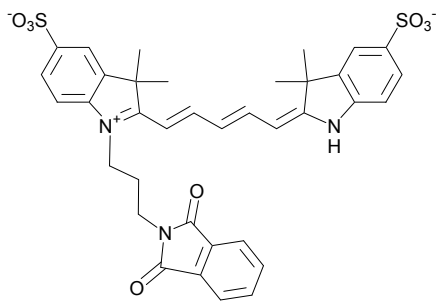


Abb. 21: Phthalimid-Derivat 3.

Um auszuschließen, dass die Struktur der Cyanine rezeptorunabhängig für den Ca^{2+} -Anstieg verantwortlich ist, wurde das Phthalimid-Derivat **3** (Abb. 21) im Ca^{2+} -Assay (HEL) getestet. Dieser Fluorophor alleine zeigte weder bei 30 nM noch bei 3 μM einen Einfluß auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

3.1.4 Bestimmung der Quantenausbeute F des Carboxyfluorescein-markierten NPY

Die Quantenausbeute ist das Verhältnis von absorbierten zu emittierten Photonen. Sie kann daher maximal 1 betragen. In der Praxis sind die Werte < 1 , da der Anregung folgende alternative Prozesse dieses Verhältnis reduzieren.

Für den Liganden Carboxyfluorescein-NPY **5** wurde die Quantenausbeute bestimmt. Als Standard diente Fluorescein, für das eine Quantenausbeute von 0,93 in 0,01 N wässriger NaOH (Hercules und Frankel, 1960) bekannt ist.

Es ergab sich für **5** eine Quantenausbeute von $\Phi = 0,37$ in BP ($\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{EX}} = 491 \text{ nm}$). Die Referenzwerte für die Quantenausbeute von Carboxyfluorescein sind bei einem pH-Wert von 8-9 gemessen ($\Phi = 0,81$, Whitaker et al., 1992). Deswegen soll hier Fluorescein als Vergleich herangezogen werden, für das komplettere Daten verfügbar sind und dessen Quantenausbeute etwa der des Carboxyfluorescein entspricht.

Die Quantenausbeute beträgt für das Dianion des Fluoresceins 0,93 und für das Monoanion 0,37 (Abb. 22 A). Das Kation und die neutrale Form, die praktisch nicht fluoreszieren, gehen im angeregten Zustand in das Monoanion über (Nygren, 1999).

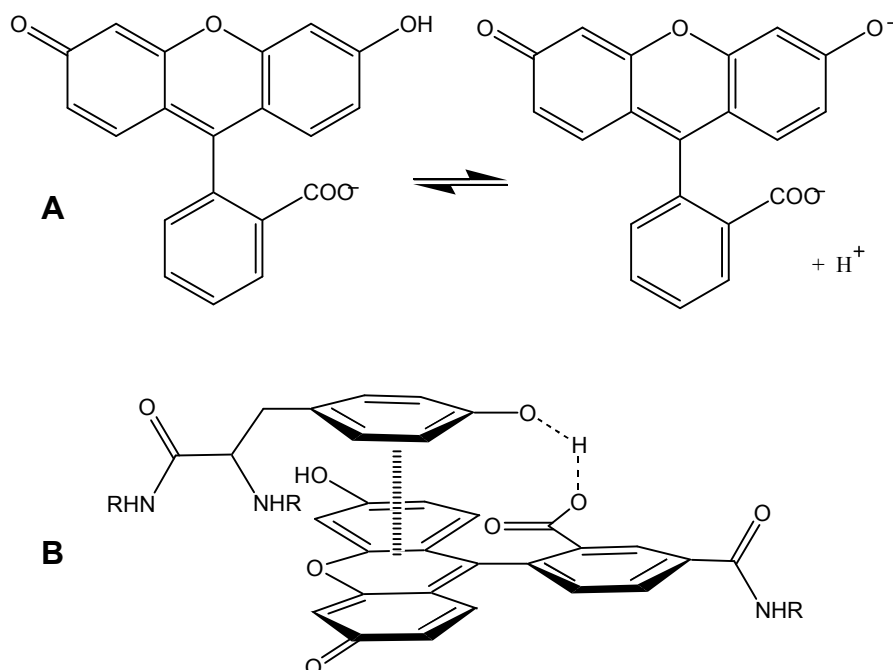


Abb. 22 A: Protolysegleichgewicht zwischen dem Monoanion und Dianion des Fluoresceins, B: mögliches Addukt zwischen angeregtem Fluorescein-Derivat und Tyrosinrest eines Peptids oder Proteins (Denzin et al., 1991).

Bei $\text{pH} = 7,4$ errechnet sich über die Henderson-Haselbalch-Gleichung

$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{Dianion}]}{[\text{Monoanion}]}$ ein Verhältnis Dianion zu Monoanion von 9,33 und daraus

eine Quantenausbeute von ca. 0,88 (für pK_a des Monoanions = 6,43, das Vorliegen des Kations und der neutralen Form ist bei diesem pH-Wert vernachlässigbar). Die Reduktion der Quantenausbeute des kovalent an NPY gebundenen Carboxyfluoresceins, gegenüber dem freien Fluorophor könnte auf bereits erwähnte Charge-Transfer-Wechselwirkungen zwischen dem Fluorophor und Tyrosin zurückzuführen sein (vgl. Denzin et al., 1991). Diese Arbeitsgruppe beschreibt die Wasserstoffbrückenbindung und die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Tyrosin und der Carboxylgruppe bzw. des Xanthynteils des Fluoresceins in der Bindungstasche eines Fluorescein-Antikörpers (Abb. 22 B). Wasserstoffbrückenbindungen wird sowohl ein Anteil an Dipol-Dipol-Wechselwirkungen als auch Charge-Transfer-Wechselwirkungen zugeschrieben (Repke und Liebmann, 1987). Andere Aminosäuren wie Arginin und Histidin interagieren dabei ebenfalls mit dem Xanthyling des Fluoresceins bei der Antigen-Antikörperwechselwirkung, sind aber eher für die Bindung entscheidend. Die Quantenausbeuten der weiteren fluoreszenten NPY-Derivate wurde außer für die Cyanin-Derivate wegen Substanzmangels nicht bestimmt.

3.1.5 Änderung der Fluoreszenzintensität von Cyanin-5-Derivaten bei der Bindung an Serumalbumin

Für die Indocarbocyanine wurde z. B. von Mujumdar et al., 1993 und Terpetschnig et al., 1994, eine schwache Zunahme der Fluoreszenzintensität bei der kovalenten Bindung bzw. Adsorption an Protein beschrieben. Dies konnte für das Phthalimid **3** bei der Bindung an BSA bestätigt werden (Abb. 23 A). Auch der fluoreszente Ligand Cy5-NPY weist eine etwas höhere Quantenausbeute als der Fluorophor selbst auf (0,33 gegenüber 0,28). Dabei ist gleichzeitig eine sehr geringfügige Rotverschiebung des Absorption- und Emissionsmaximums (≈ 2 nm) zu beobachten. Verantwortlich für den Einfluss von BSA sind unterschiedliche hydrophobe Taschen dieses Makromoleküls. Dieses Verhalten ist von anderen amphiphilen Farbstoffen wie 1-Anilinnaphthalen-8-sulfonsäure (ANS) bekannt.

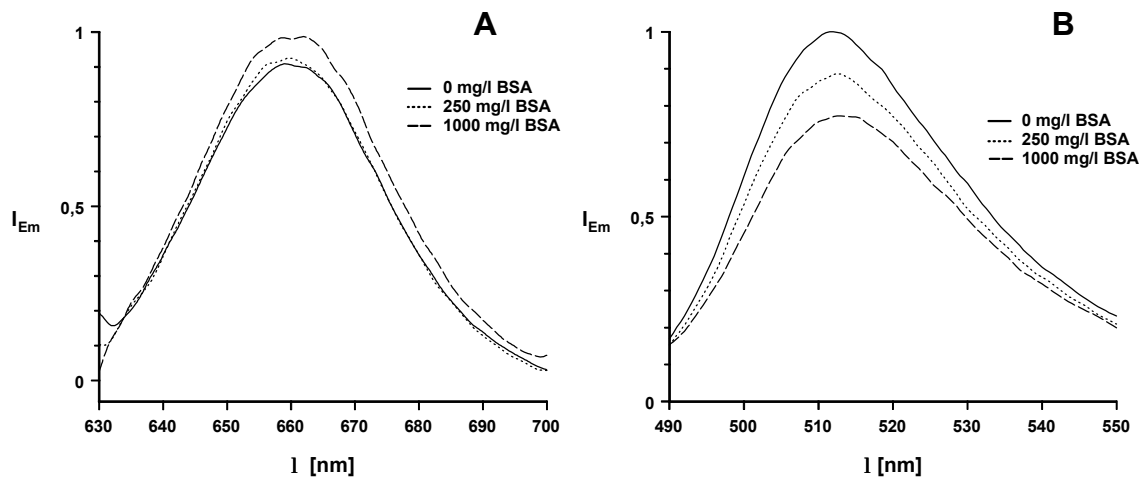


Abb. 23 A: Zunahme der Fluoreszenzintensität des Cyanin-Derivats **3** (ca. 100 nM) in BP bei zunehmenden Konzentrationen an BSA (Adsorption); B: Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluoresceins (10 nM) in BP in Gegenwart zunehmender Konzentrationen an BSA (Spektrofluorimeter PE LS50B); die Spektren wurden jeweils um die Hintergrundfluoreszenz korrigiert.

Hierbei ist bei steigender Konzentration von ANS für die Bindung der ersten beiden fluoreszenten Moleküle an BSA die stärkste Zunahme der Fluoreszenzintensität und der Lebensdauer gefunden worden (Lakowicz, 1999). Anders sieht es für den Fluorophor Fluorescein aus: Penniston et al., 1982, geben ein maximales Verhältnis der Fluoreszenzintensität von an Albumin (Überschuß) gebundenem zu freiem Fluorescein von 0,26 an. Abb. 23 B zeigt die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluoresceins (10 nM) bei der Adsorption an BSA. Dieses Verhalten ist auch bei der Bindung an ein Rezeptorprotein zu erwarten.

3.1.6 Autofluoreszenz von Zellen als limitierender Faktor für die Sensitivität fluorimetrischer Tests

Das Ausmaß und die Eigenschaften der Autofluoreszenz hängt von der zu untersuchenden Zellart sowie den experimentellen Bedingungen (z. B. Fixierung mit Formaldehyd) ab. So ist beispielsweise geschätzt worden, dass die durchschnittliche Autofluoreszenz eines kultivierten NIH 3T3 Fibroblasten bei einer Anregung von 488 nm in der Durchflusszytometrie etwa der Fluoreszenz von 34000 Fluoresceinmolekülen entspricht (Roederer et al., 1986). Daraus ergibt sich, dass Expressionsraten von weniger als 70000 Rezeptoren pro Zelle im spektralen Bereich des Fluoresceins zu mangelhaften Signal-Rausch-Verhältnissen führen.

Tabelle 7: In tierischen Zellen natürlicherweise vorkommende fluoreszierende Moleküle.

Bestandteil	Lokalisation	Exzitation Wellenlängenbereich	Emission Wellenlängenbereich
aromatische Aminosäurereste [Demchenko, 1981]	in den meisten Proteinen	200-310 nm	280-370 nm
Elastin [Lakowicz, 1999]	Fibroblasten/-zyten	333 nm	405 nm
Reduzierte Pyridinucleotide NADH, NADPH: Kofaktoren im Stoffwechsel [Aubin, 1979]	konzentriert in Mitochondrien, auch vorhanden im Zytoplasma	max. bei 360 nm	max. bei 460 nm
Flavine and Flavin-nucleotide [Benson, 1979]	Riboflavin, FMN and FAD, häufig an Enzyme gebunden als Koenzyme von Flavoproteinen	445-470 nm (Bande um 360 nm)	max. bei 520 nm (max. bei 440 nm)
Zink-Protoporphyrin [Shapiro, 1995]	in erythroiden Zellen	ca. 425 nm	max. bei 580 nm
Lipofuscin [Jongkind, 1982]	Pigment, akkumuliert mit Zellalter	UV, (um 490 nm)	max. bei 450 nm, (max. bei 545 nm)

Auch wenn in den letzten Jahren Verbesserungen der Optik von Durchflusszytometern erreicht worden sind, gibt es erhebliche Probleme, will man Rezeptorbindungsgleichgewichte an Zellen konstitutiv geringer Rezeptorexpression ausreichend genau quantitativ bestimmen und damit auch noch Fluoreszenz von überwiegend verdrängtem Liganden messen. So errechnet sich nach Gleichung III (Abschnitt 1.1.1) für $[L^*] = K_D = 30 \text{ nM}$, einem $K_i = 7,2 \text{ nM}$ und einer

Antagonistenkonzentration $[A] = 50 \text{ nM}$ und $B_{\text{max}} = 50000$ Rezeptormoleküle pro Zelle (das Zellvolumen sei konstant) eine $[RL^*] \approx 5590$ Moleküle pro Zelle.

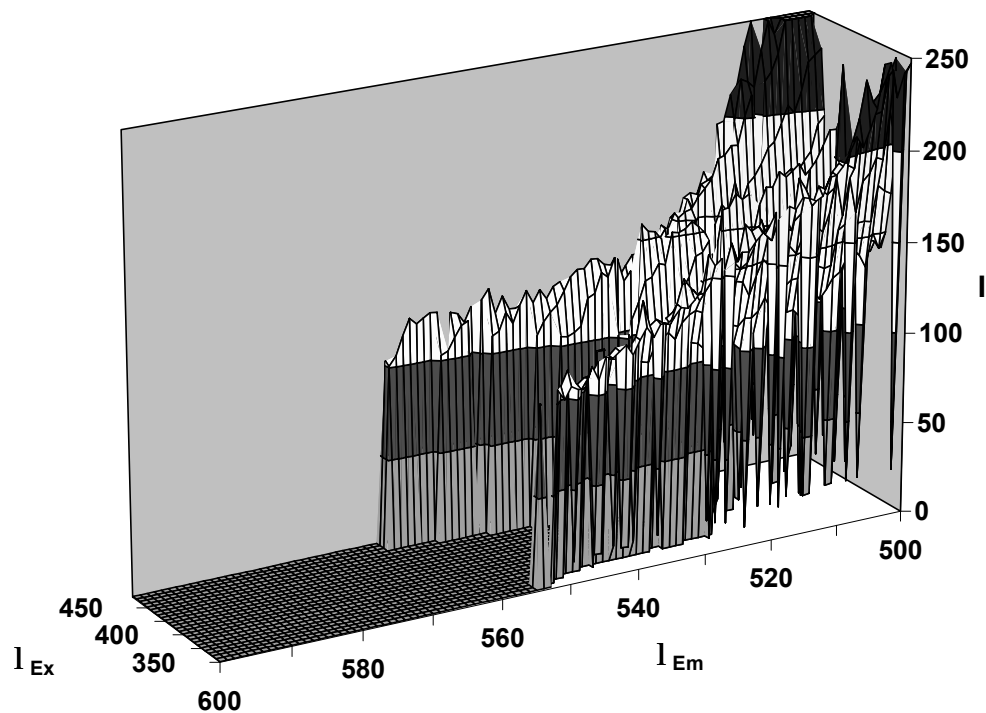


Abb. 24: Abhängigkeit der Autofluoreszenz von HEC-1B-Y5 Zellen von der Anregungs- (5 nm-Schritte) und der Detektionswellenlänge (1 nm-Schritte); Aminco-Bowman Spektrofluorimeter.

Abb. 24 zeigt ein dreidimensionales Spektrum der Autofluoreszenz von HEC-1B-Zellen. Die Anregung erfolgte von 350-470 nm, d. h. in einem Bereich, der die Anregung der Autofluoreszenz, NADH und Flavine, einschließt (Tabelle 7). Erkennbar ist, dass die beiden Hauptbestandteile der Autofluoreszenz (NADH und Flavine) im Bereich um 350 bzw. 450 nm angeregt werden. Es ist ein optisches Fenster bei einer Anregung um 400 nm und Detektion um ca. 540 nm gegeben. Dies würde die Verwendung von Fluorophoren mit sehr großem Stokes' Shift wie z. B. Rutheniumkomplexe, erfordern. Um die Autofluoreszenz mit herkömmlichen Fluorophoren effektiv reduzieren zu können, empfiehlt es sich aber, in den spektralen Bereich oberhalb von 600 nm auszuweichen.

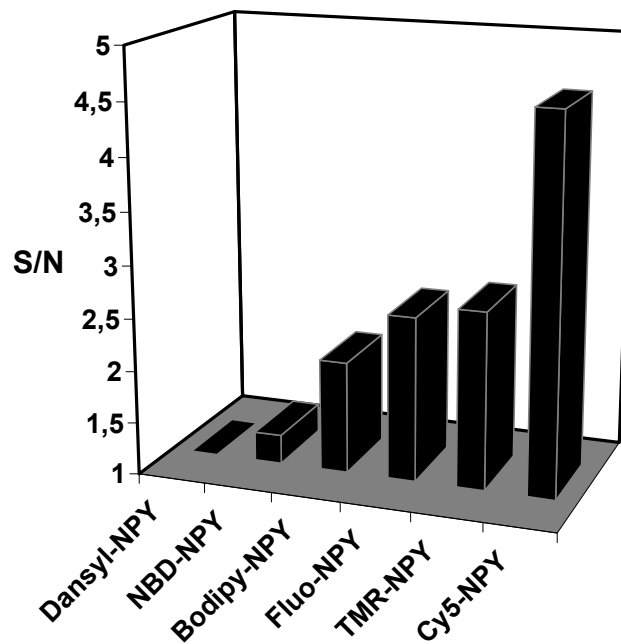


Abb. 25: Signal-Rausch-Verhältnis für die fluoreszenten NPY-Derivate (10 nM) gegenüber HEL-Zellen (1×10^6 Zellen/ml, gemessen am Spektrofluorimeter Perkin Elmer LS50B).

Für die fluoreszenten Liganden heißt das, dass sich ein unterschiedliches Signal-Rausch-Verhältnis ergibt, das aber auch durch deren Quantenausbeuten und Gerätekonstanten (z. B. Gitter) bestimmt wird. Die Verwendung von Zellmembranen gegenüber Zellen senkt die Autofluoreszenz, im Gegenzug aber nimmt die Tyndallstreuung zu. Abb. 25 zeigt diesen Quotienten, am besten schneidet das Cy5-NPY 1 ab. Das verwendete Spektrofluorimeter (Perkin Elmer LS50B) zeigt aufgrund der PMT-Charakteristik die größte Empfindlichkeit im spektralen Bereich des Fluoresceins, oberhalb von 600 nm ist die Empfindlichkeit des PMT kleiner als 15 %. Deshalb waren direkte Messungen an diesem Gerät für nanomolare Konzentrationen der Cyaninfarbstoffe und ihrer Derivate in biologischer Umgebung nicht durchführbar. Durch die Ermittlung des Quotienten aus Fluoreszenzsignal des Liganden zu Hintergrundsignal der Zellen aus separaten Messungen wird jedoch eine Vergleichbarkeit gewährleistet.

3.2 Fluoreszenzmessungen am konventionellen Spektrofluorimeter

3.2.1 Spektraler Shift und Intensitätsmessungen

3.2.1.1 NPY-Rezeptorliganden

Ausgehend von der Veröffentlichung von McGrath et al., 1996, wurde untersucht, ob die fluoreszenten Liganden, besonders das BodipyFL-NPY, bei der Bindung an den Rezeptor einen Shift oder Intensitätsänderung ihrer Fluoreszenz erfahren. Während McGrath et al., 1996, die homogene Bestimmung von Bindungsgleichgewichten mittels konfokaler Detektion beschreibt und den Fluorophor BodipyFL™ favorisiert, konnten Turcatti et al., 1995, unter Verwendung von transfizierten CHO-Zellen hoher Expressionsrate die Assoziation und Dissoziation von NBD-markierten peptidischer Antagonisten kurzer Spacerlänge (< 1 nm) mit einem herkömmlichen Spektrofluorimeter verfolgen. Sie gehen von einer hydrophoben Bindungstasche aus, die zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität der Antagonisten, nicht jedoch des Agonisten führt, was auf unterschiedliche Bindungsstellen zurückgeführt wird.

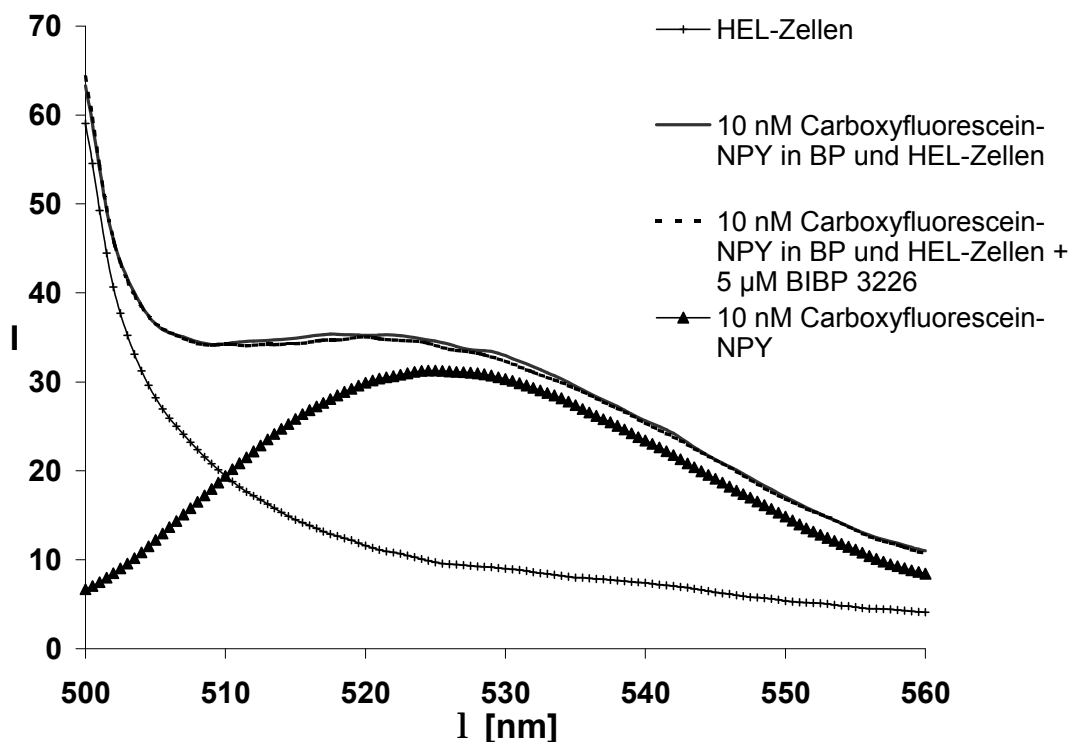


Abb. 26: Unkorrigierte Fluoreszenzspektren des Carboxyfluorescein-NPY 5 in An- und Abwesenheit von HEL-Zellen bzw. einem Überschuss des Y_1 -Antagonisten BIBP 3226; ($\lambda_{EX}=488$ nm, Spalte 10/10).

Entsprechende Untersuchungen wurden auch mit den fluoreszenten NPY-Liganden durchgeführt. In Abb. 26 sind die Fluoreszenzspektren von Carboxyfluorescein-NPY **5** dargestellt. Dieser Versuch wurde mehrmals wiederholt, da eine Passage der Zellen am Vortag für den Versuch entscheidend ist (3.5.2.3). Bei der genaueren Auswertung wurden die jeweiligen Hintergrundspektren subtrahiert (Abb. 27).

Das Signal wird insgesamt durch Streulicht und Absorption durch die Zellen geschwächt. Es ist weder ein spektraler Shift noch eine Intensitätsänderung bei der Bindung des fluoreszenten Liganden **5** an den Rezeptor festzustellen. Weitere Versuche mit HEC-1B-Y5-Zellen, die etwa 10^6 Bindungsstellen (Y_5 -Rezeptoren) pro Zelle aufweisen (Moser, 1999) sowie Membranen von HEL-Zellen (Y_1 -Rezeptoren) bzw. P388D1-Zellen als Negativkontrolle (diese Zellen zeigten keinen NPY-induzierten Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ im Ca^{2+} -Assay) mit den beiden Liganden Carboxyfluorescein-NPY **5** und BodipyFL-NPY **6**, bestätigten die Ergebnisse.

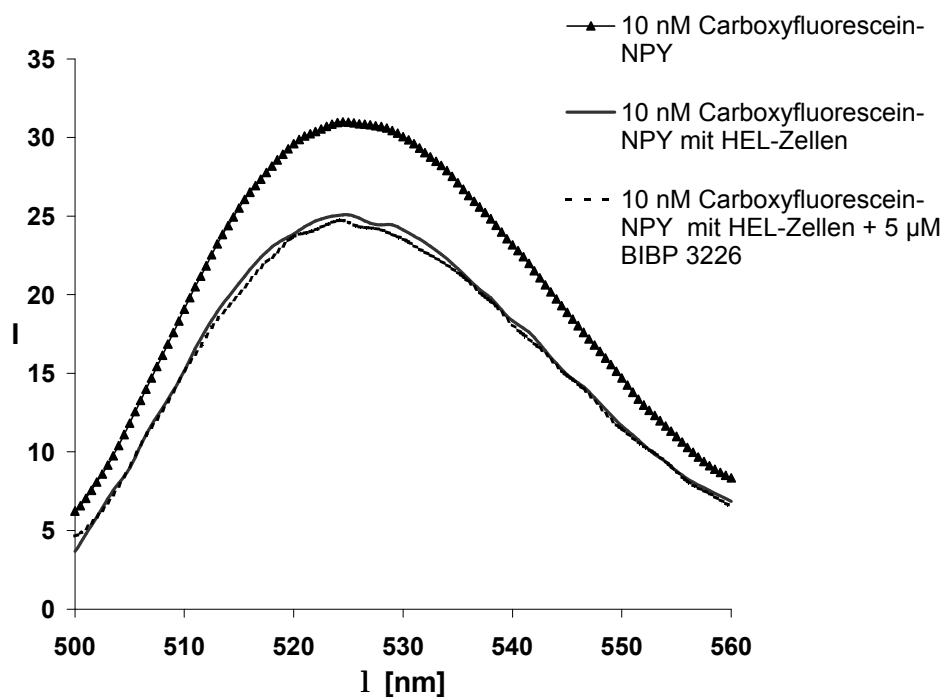
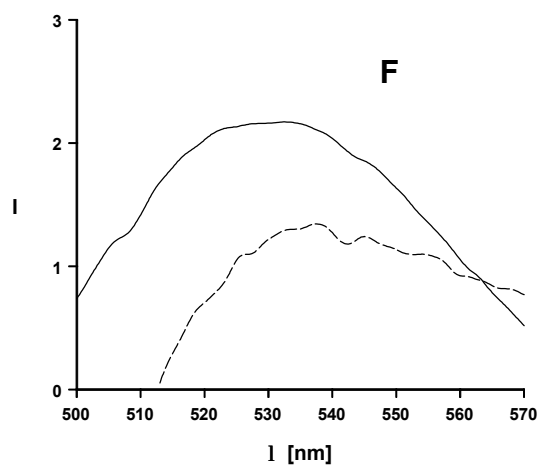
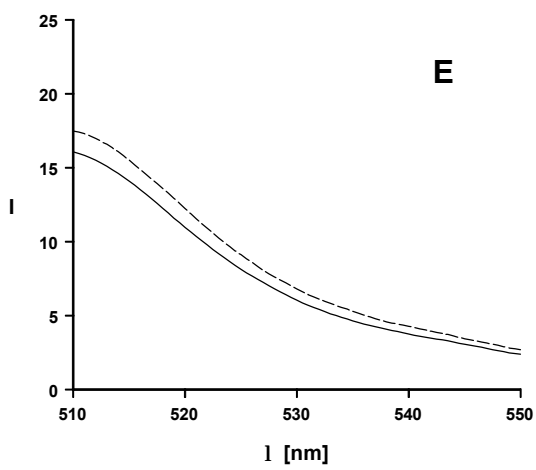
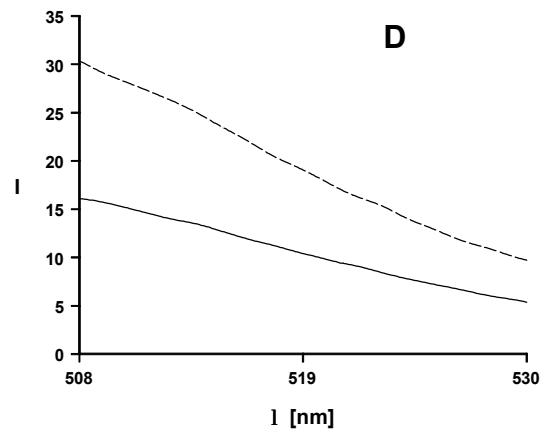
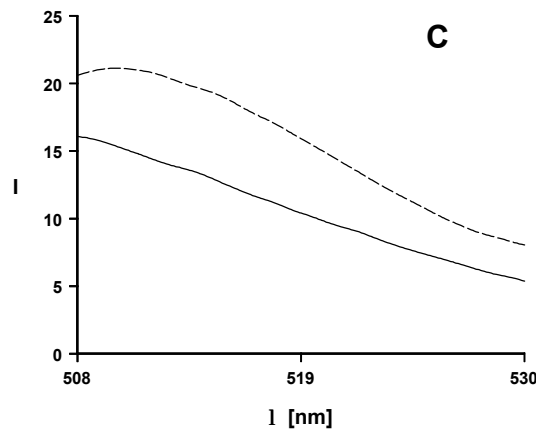
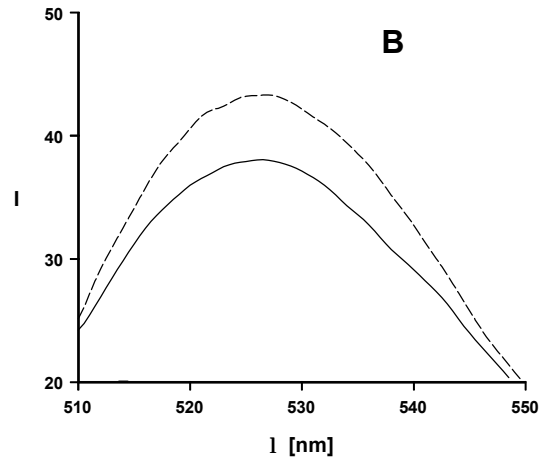
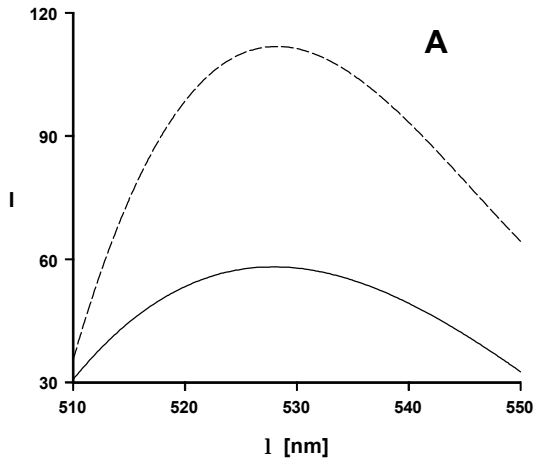


Abb. 27: Unkorrigierte Emissionsspektren des Carboxyfluorescein-NPY **5**, die nach Subtraktion der jeweiligen Hintergrundspektren (Puffer, Zellsuspension bzw. $5 \mu\text{M}$ BIBP 3226) erhalten wurden ($I_{EX} = 488 \text{ nm}$, Spalte 10/10).

Dabei erwiesen sich die beiden kurzwelligen Derivate, Dansyl-NPY **7** sowie NBD-NPY **9**, als ungeeignet aufgrund der geringen Quantenausbeute sowie des höheren Hintergrundsignals (s. Signal-Rausch-Verhältnis). Der Fluorophor BodipyFL **C** erwies sich trotz der ungeladenen Struktur, was für die Affinität günstig ist, als wenig geeignet. Der kleine Stokes' Shift (Überlappung von Anregungs- und Emissionsspektren) machte Untersuchungen in der Küvette aufgrund des Streulichts problematisch. So war im Vergleich zur Kontrolle keine merkliche Änderung der Fluoreszenzintensität am Rezeptor messbar. Um das Signal des rezeptorgebundenen Liganden besser verfolgen zu können, wurden Zellmembranen präpariert.



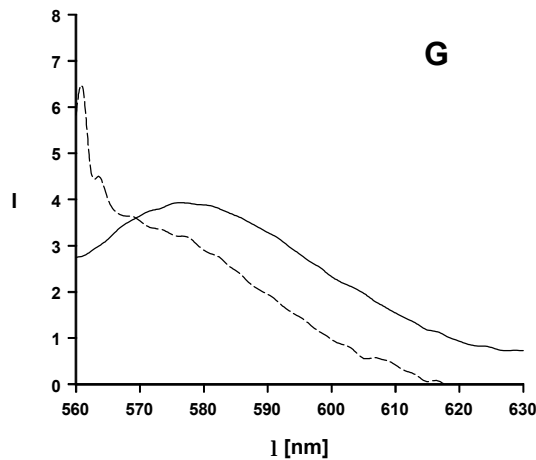


Abb. 28: Um die jeweilige Hintergrundfluoreszenz korrigierte und geglättete Spektren von fluoreszenten Liganden in Abwesenheit $\frac{3}{4}$ und Anwesenheit von Zellmembranen - - :

A: Carboxyfluorescein-NPY 5 (3 nM)/HEL (200 μ g Protein/0,75 ml) Spalte 5/15

B: Carboxyfluorescein-NPY 5 (3 nM)/HEC-1B-Y5 (100 μ g Protein /0,75 ml) Spalte 5/5

C: BodipyFL-NPY 6 (16 nM)/HEL(100 μ g Protein/0,75 ml) Spalte 5/5

D: BodipyFL-NPY 6 (16 nM)/P388D1(100 μ g Protein/0,75 ml) Spalte 5/5

E: BodipyFL-NPY 6 (3nM)/HEC-1B-Y5 (100 μ g Protein/0,75 ml) Spalte 5/5

F: NBD-pNPY 9 (3nM)/ HEC-1B-Y5 (50 μ g Protein/0,75 ml) Spalte 15/15 G: TMR-NPY 11

(3nM)/HEC-1B-Y5 (50 μ g/0,75 ml) Spalte 10/10. Inkubation über 2-3 Minuten.

In Abb. 28 sind die Spektren der NPY-Liganden in An- und Abwesenheit von Membranen von HEL-Zellen, Y₅-transfizierten HEC-1B-Zellen und P388D1-Zellen als Negativkontrolle dargestellt. Es ist überwiegend eine Zunahme der Fluoreszenz des Carboxyfluorescein- und BodipyFL-Derivats durch unspezifische Bindung an den Membranen in Vergleich zum freien Fluorophor zu beobachten. Der Intensitätsunterschied tritt sowohl bei den Membranen der HEL-Zellen als auch bei der Negativkontrolle auf (Abb. 28 C, D). Die Fluoreszenzspektren werden durch selektive NPY-Antagonisten nicht beeinflusst (Spektren zusätzlich mit Antagonisten nicht gezeigt). Die beiden Derivate Tetramethylrhodamin-pNPY 11 und NBD-pNPY 9 werden dagegen deutlich gequench (Abb. 28 F, G). Für das Dansyl-Derivat sind keine Spektren gezeigt, da das Signal-Rausch-Verhältnis in diesem Konzentrationsbereich nicht ausreichend (≈ 1) war.

Um das Verhalten des rezeptorgebundenen Liganden näher zu untersuchen, wurden Experimente mit einem Antifluorescein-Antikörper durchgeführt. Der Antikörper quencht die Fluoreszenz des freien Carboxyfluorescein-NPY bei der Verdünnung von 1:300.000 zu knapp 90% (Abb. 29). Nach Klonis et al., 1998, kommt das Quenching vermutlich dadurch zustande, dass im Gegensatz zum Lösungsmittel keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Antikörper und Fluorophor ausgebildet werden. Sie gehen von einer hydrophoben Bindungstasche ohne Hydratation des Fluorophors aus.

Andere Arbeitsgruppen wie Denzin et al., 1991, machen dafür spezifische Wechselwirkungen des Fluoresceins mit den Aminosäuren Tyrosin, Arginin etc. verantwortlich (s. auch Abb. 22 B).

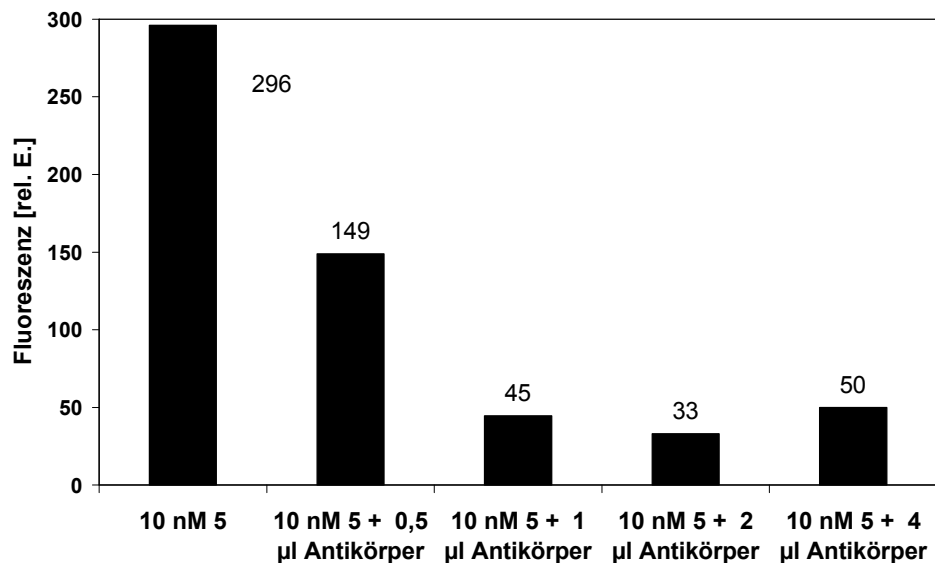


Abb. 29: Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration zum Quenchen des fluoreszenten Liganden 5 durch Antifluorescein-Antikörper (Stammlösung 1:3000 verdünnt). Dazu wurde jeweils die AUC der um die Hintergrundfluoreszenz korrigierten Spektren ($I_{EM} = 510-550$ nm) bestimmt.

Dieser Versuch legt nahe, dass der Fluorophor des gebundenen Liganden 5 für den Antikörper zugänglich ist, da dessen Fluoreszenz fast vollständig wie in Abwesenheit der Zellen gequencht wird (Abb. 30).

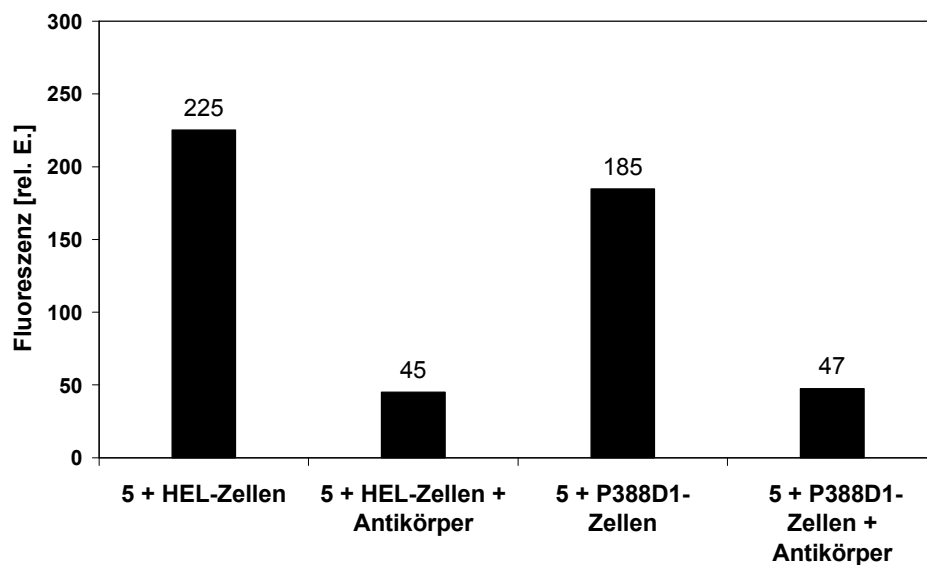
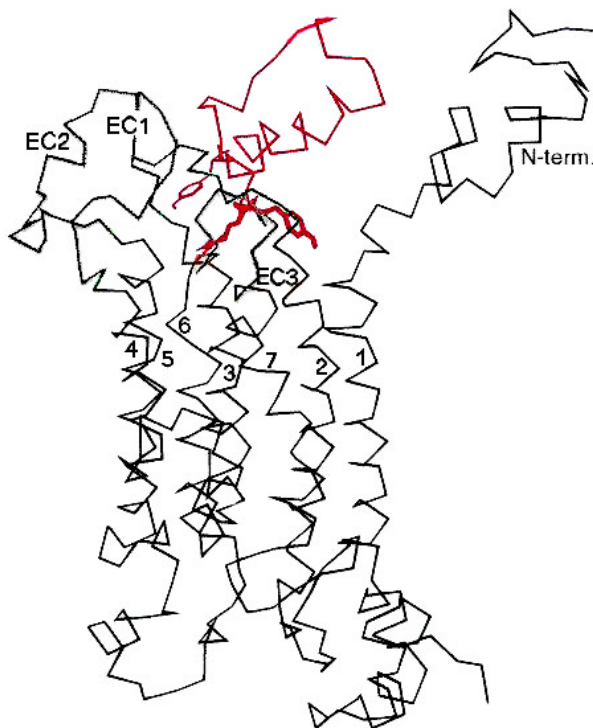


Abb. 30: AUC ($I_{EM} = 510-550$ nm) des fluoreszenten Liganden 5 (je 10 nM) in Anwesenheit der HEL-Zellen bzw. der P388D1-Zellen als Negativkontrolle (jeweils 1 Mio Zellen/ml, um Hintergrundfluoreszenz korrigiert), mit/ohne Antifluorescein-Antikörper.

Das Quenching durch den Antikörper ist vergleichbar mit dem an P388D1-Zellen (Negativkontrolle), bei denen ebenfalls eine geringe unspezifische Bindung des Liganden **5** an die Membran stattfindet. Die Rezeptorkonzentration der HEL-Zellen unter diesen Bedingungen liegt allerdings bei max. 0,1 nM, weswegen ein deutlicher Unterschied kaum zu erwarten ist. Höhere Zellkonzentrationen führen überdies zu verstärkten Problemen mit Autofluoreszenz und Streulicht bei der Messung mit konventionellen Spektrofluorimetern (vgl. Emmerson et al., 1997), sodass eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses auf diese Weise nicht erzielt werden kann.

Eine merkliche Änderung der Fluoreszenzintensität (Shift) bei der Bindung an den Rezeptor, die für die Bestimmung von Bindungsgleichgewichten an Zellen/Membranen analytisch verwertbar wäre, konnte nicht beobachtet werden.

Grundemar und Håkanson, 1994, haben für den Y_1 -Rezeptor ein Bindungsmodell entworfen, bei welchem das 6 N-terminale Hexapeptid sowie ein Teil des C-Terminus von NPY an der Bindung beteiligt sind. Dagegen sprechen die Ergebnisse aus dem Ca^{2+} -Assay sowie die fluo-



reszenzspektrometrischen Untersuchungen mit den fluoreszenten NPY-Liganden eher für das von Sylte et al., 1999, vorgeschlagene Modell, bei dem nur die N-terminalen Aminosäuren 1-4 sowie die drei C-terminalen mit dem Y_1 -Rezeptor interagieren. Der Fluorophor müsste demnach knapp von der Bindungsstelle entfernt sein. Der von dieser Arbeitsgruppe postulierten ionischen Wechselwirkung zwischen dem Lys-4 von NPY und Asp-194 sowie Asp-200 des Rezeptors (Abb. 31) kommt keine entscheidende Bedeutung zu, wie die Aktivität der Liganden **7** und **9** belegen.

Abb. 31: Aus Dynamiksimulationen abgeleitetes Modell des NPY- hY_1 -Rezeptorkomplexes beim Andocken, schwarz: energieminiertes C_α -Atomgerüst (EC1, 2, 3 = extrazelluläre Schleifen 1, 2 und 3; N-term = N-Terminus) des Rezeptors, rot: NPY; (Sylte et al., 1999).

3.2.1.2 Versuche zur indirekten Detektion von spezifisch gebundenem Carboxyfluorescein-NPY

Da sich die Rezeptorbindung der fluoreszenten NPY-Liganden (Dansyl-, NBD-, Carboxyfluorescein-, Tetramethylrhodamin-Derivate) nicht direkt am konventionellen Spektrofluorimeter verfolgen ließ, wurde der Versuch unternommen, nach Zentrifugation der mit Carboxyfluorescein-NPY **5** inkubierten Membranen von HEL-Zellen spezifische Bindung zu messen. Das Ergebnis ist in Abb. 32 zu sehen.

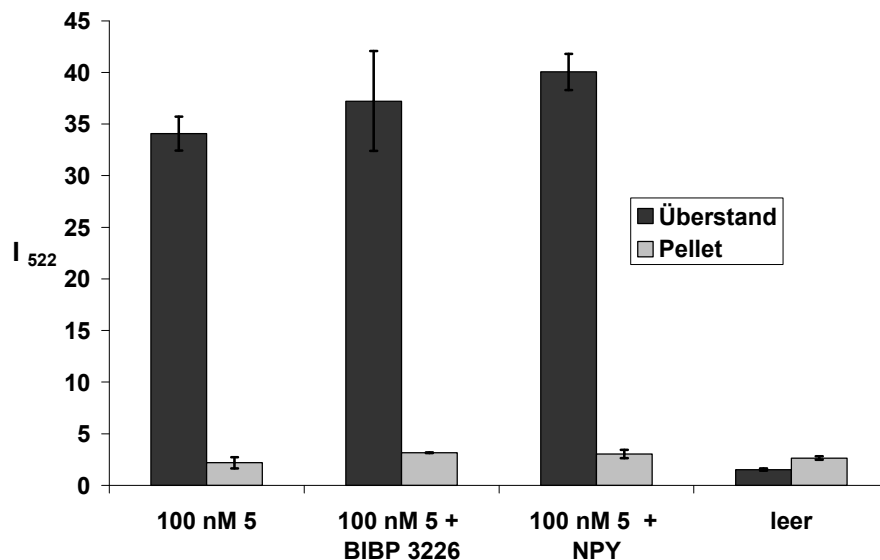


Abb. 32: An Membranen und im Überstand gemessene Fluoreszenzintensität ($I_{ex}=488\text{ nm}$, $I_{em}=522\text{ nm}$) der Proben für totale (100 nM Carboxyfluorescein-NPY **5**) und unspezifische (zusätzlich 20 μM **13** (BIBP 3226) bzw. 20 μM NPY) Bindung sowie der Negativkontrolle nach Zentrifugation und Waschen; $n = 3$, $MW \pm SEM$; je 100 μg Membranprotein pro Probe.

Zwar ist im Überstand der Probe für die totale Bindung schwächere Fluoreszenz als in der für die unspezifische Bindung zu beobachten, aber die Fluoreszenz des Pellets lag bei allen Proben in der gleichen Größenordnung. Dies könnte auf das Quenchen der Fluoreszenz am Rezeptor aber auch auf die Dissoziation des Ligandrezeptorkomplexes beim Zentrifugieren und Waschen des Pellets zurückzuführen sein.

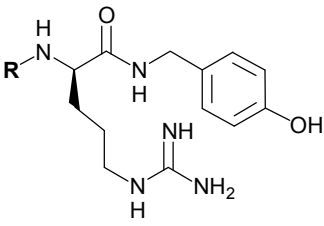
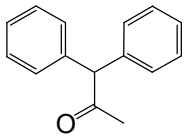
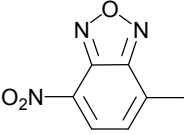
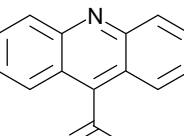
Auch der wiederholte Versuch, das spezifisch gebundene Carboxyfluorescein-NPY mittels eines Antifluorescein-Antikörpers und eines sekundären Peroxidase-Antikörpers histochemisch nachzuweisen, scheiterte (Daten nicht gezeigt). Während dieser Arbeit erschienen einige Veröffentlichungen, welche die weitere Vorgehensweise entscheidend beeinflussen sollte: Martens et al., 1999, haben die Messung der an Beads gebundenen Fluoreszenz, die mit Targetmolekülen dotiert waren, in einem hochdurchsatzfähigen Multiplexassay demonstriert. Andere Arbeitsgruppen berichten von der Bestimmung von Bindungskonstanten an G-

Protein-gekoppelten Rezeptoren ebenfalls über Laser-Scanning-Imaging-Verfahren (Zuck et al., 1999 sowie Mellentin-Michelotti et al., 1999), die ein als FMAT™ (= Fluorometric Microvolume Assay Technology) bezeichnetes, von PE Biosystems entwickeltes Gerät verwenden. Entscheidend ist dabei die Verwendung des längerwelligen Fluorophors Cy5 und ein Bildauswerteverfahren.

3.2.1.3 Fluoreszente Argininamid-Derivate als NPY Y₁-Antagonisten

Die Substanzen **13-15** wurden im Ca²⁺-Assay an HEL-Zellen gegen NPY als Agonist getestet (Tabelle 8). Gegenüber **13**, dem NPY Y₁-Antagonisten BIBP 3226, ist die Substanz **15** etwa 100-fach schwächer wirksam. Die Nitrobenzoxadiazol-Struktur von **14**, die im Gegensatz zu den beiden anderen Substanzen nicht amidartig verknüpft und relativ polar ist, senkt die Y₁-antagonistische Aktivität noch stärker. Dies stimmt mit früheren Struktur-Wirkungs-Betrachtungen überein, wonach eine Zunahme der Lipophilie der Diarylstruktur von BIBP 3226 zu einer Wirkverstärkung führt (Müller et al., 1997).

Tabelle 8: Strukturen und Y₁-antagonistische Aktivität fluoreszierender Argininamide: Hemmung des durch 10 nM pNPY ausgelösten Ca²⁺-Anstieg in HEL-Zellen.

Grundstruktur	Substanz	R	Y ₁ -Antagonismus IC ₅₀ [μM]
	13		0,017
	14		>10
	15		2

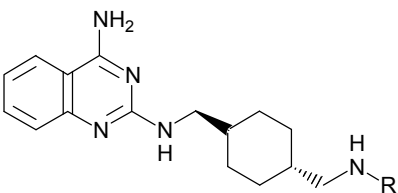
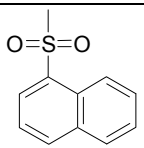
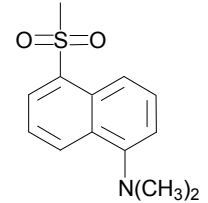
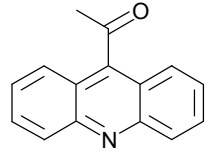
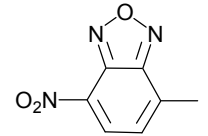
Versuchsbedingungen nach Gebele, 1998, n = 2-3.

Für direkte fluorimetrische Untersuchungen dieser Substanzen war das Signal-Rausch-Verhältnis nicht groß genug.

3.2.1.4 Fluoreszente Chinazolin-Derivate als NPY Y₅-Antagonisten

Rueeger et al., 2000, stellten eine Serie von 2-substituierten 4-Aminochinazolinen als selektive NPY Y₅-Antagonisten vor. Nach den Angaben dieser Arbeitsgruppe hat Substanz **16** (Tabelle 9) einen IC₅₀-Wert von (2,9 ± 0,16) nM im Radioligand-Bindungsassay an hY₅-transfizierten LM(tk-) Zellen.

Tabelle 9: NPY Y₅-Affinität der von **16** (CGP 71683A) abgeleiteten, fluoreszenten Liganden.

Grundstruktur	Nr.	R	Y ₅ -Affinität K _i [nM] ^a
	16		3,39 ± 2,31
	17		42 ± 0,3
	18		385 ± 163
	19		>1000

^aRadioligandbindung an Y₅-transfizierten HEC-1B-Zellen, [³H]-Propionyl-NPY (0,8 nM)
n = 3-6, MW ± SEM.

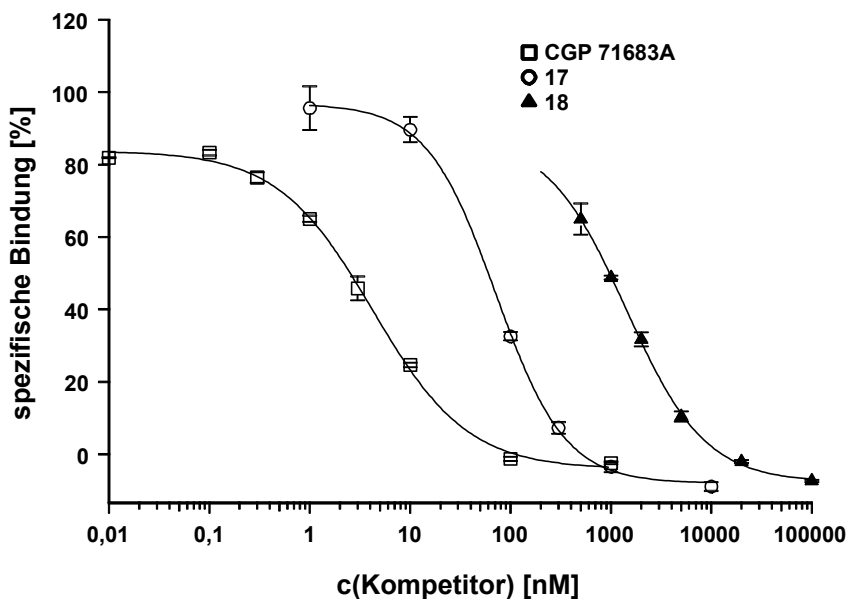


Abb. 33: Radioligandbindungs-Untersuchungen an HEC-1B-Y5-Zellen: Verdrängung von 0,8 nM [^3H]-Propionyl-NPY mit den Verbindungen **16-18**, $n=3$, $MW \pm SEM$.

In guter Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde für **16** an hY₅-transfizierten HEC-1B-Zellen ein K_i -Wert von $(3,39 \pm 2,31)$ nM gegen [^3H]-Propionyl-NPY ermittelt (Abb. 33). Der Arylsulfonamidpartialstruktur kommt eine wichtige Funktion für die Rezeptorbindung zu. Daher ist auch der Affinitätsverlust des NBD-Derivats **19** erklärbar, welches eine für **16** postulierte Wasserstoffbrückenbindung nicht ausbilden kann. Versuche mit den fluoreszenten Derivaten an den HEC-1B-Y5-Zellen ergaben keine Änderung der Fluoreszenzintensität am herkömmlichen Spektrofluorimeter.

3.2.1.5 Fluoreszente Histamin H₁-Antagonisten

Im Rahmen der Dissertation von Kracht (Kracht, 2001), wurden mit dem Radioliganden ³[H]-Mepyramin, einem Histamin H₁-Antagonisten, Versuche zur Etablierung eines Histamin H₁-Bindungsassays durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass dieser lipophile Ligand überwiegend in die Zellen diffundiert und sich daher nicht in der gewünschten Weise verdrängen lässt. Folglich werden Artefakte gemessen. Daher wurde die Möglichkeit untersucht, den Radioliganden durch einen fluoreszenten Liganden zu ersetzen.

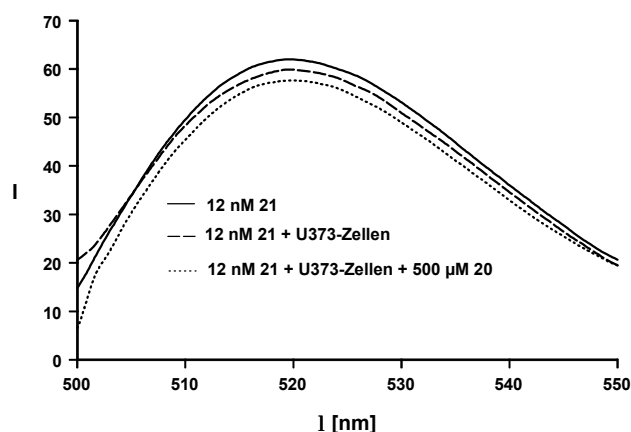
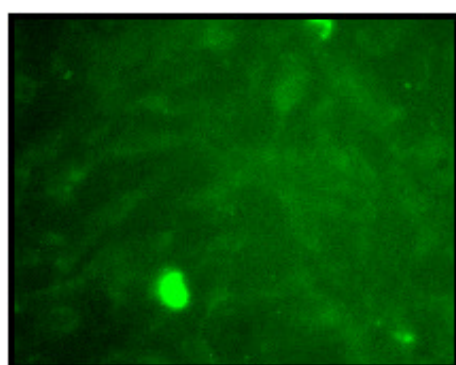


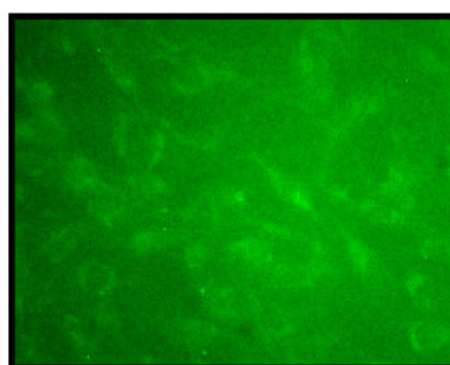
Abb. 34: Geglättete Fluoreszenzspektren des fluoreszenten Antagonisten **21** nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz ($I_{ex}=492$ nm, Spalte 5/5).

Grundkörper	Nr.	Kettenlänge n	R
	20	1	H
	21	6	
	22	8	
	23	6	

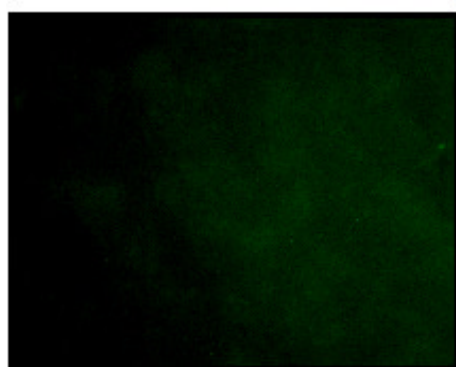
Der von Mepyramin **20** abgeleitete Antagonist **21** hat nach Untersuchung von Kracht im Ca^{2+} -Assay an U-373 MG-Zellen, die den Histamin H_1 -Rezeptor konstitutiv exprimieren (Ohno et al., 1991) einen pK_B -Wert von 7,54 (Kracht, 2001). Auch die Affinität der übrigen Derivate **22**, **23** ist gegenüber Mepyramin **20** ($\text{pK}_B = 9,30$) um ein bis zwei Größenordnungen niedriger. Untersuchungen der Substanzen **21-23** sowie weiterer Derivate am isolierten Meerschweinchenileum, einem organpharmakologischen Modell für Histamin H_1 -Rezeptorliganden, ergaben einen Anstieg der antagonistischen Aktivität mit zunehmender Kettenlänge. Die Ergebnisse im Ca^{2+} -Assay an den U-373 MG-Zellen korrelierten gut mit den Untersuchungen im Organbad, zeigten aber keine Abhängigkeit der Aktivität von der Kettenlänge. An U-373 MG-Zellen war weder am Spektrofluorimeter noch mit Hilfe der Durchflusszytometrie oder der Fluoreszenzmikroskopie die Detektion spezifischer Bindung möglich (Abb. 35 und 36). Eine schwache Abnahme der Fluoreszenzintensität (Abb. 34) des Liganden **21** könnte auf eine passive Diffusion in die Zellen deuten, die sich auch bei der mit einem Überschuss an Mepyramin inkubierten Probe ergab.



Total



Unspezifisch

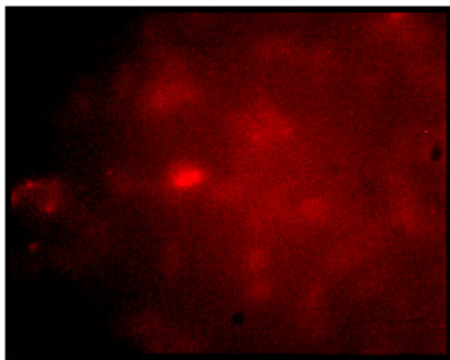


Autofluoreszenz

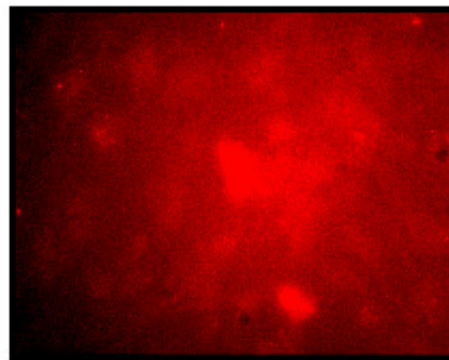
*Abb. 35: U-373 MG-Zellen, 195. Passage; Zellen wurden mit PBS (Autofluoreszenz), 5 μM **22** (Fluoresceinderivat) (Total) bzw. 5 μM **22** + 5 mM Histamin (Unspezifisch) in PBS 3h inkubiert; Intensitäten wurden normiert.*

Ob dabei eine intrazelluläre Anreicherung in sauren Kompartimenten (z. B. Lysosomen), wie von Maloteaux et al., 1983, für $[\text{}^3\text{H}]$ -Mepyramin beschrieben, beteiligt ist, bleibt fraglich. Die

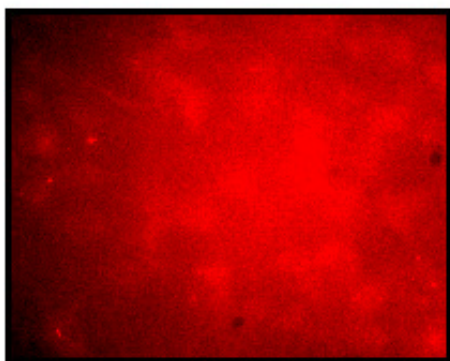
Fluoreszenzintensität von Fluorescein ($pK_a \approx 6,4$) und Carboxyfluorescein ($pK_a \approx 6,5$) ist jedenfalls stark pH-abhängig. Für Histamin und Antagonisten geht man von einer Bindungsdomäne im Membranbereich des Rezeptors aus. Wieland et al., 1999, haben Mutationsexperimente an diesem Rezeptor durchgeführt und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Resten des [3 H]-Mepyramin und Trp-167, Phe-433, und Phe-436 des Rezeptors in der transmembranären Domäne IV and VI postuliert. Möglich wäre daher auch, dass das Carboxyfluorescein des fluoreszenten Histamin H_1 -Antagonisten **22**, der vermutlich anders als im Falle der NPY-Derivate in den membranären Rezeptorbereich eintaucht, gequenchet wird. Auch das längerwellige Rhodamin-Derivat **23** ergab keinen Vorteil gegenüber dem Fluorescein-Derivat, wie aus Abb. 36 ersichtlich ist.



Total



Unspezifisch



Autofluoreszenz

*Abb. 36: U-373 MG-Zellen, 195. Passage; Zellen wurden mit PBS (Autofluoreszenz), 5 μ M **23** (Rhodaminderivat) (Total) bzw. 5 μ M **23** + 5 mM Histamin (Unspezifisch) in PBS 3h inkubiert; Intensitäten wurden normiert.*

3.2.2 Fluoreszenzpolarisation/-anisotropie

Cyanine unterliegen nach Anregung cis-trans-Isomerisierungen und sind deswegen für Polarisationsversuche ungeeignet (Karolin et al., 1994). Die fluoreszenten Liganden sollten eine starre Verknüpfung des Fluorophors mit der Grundstruktur aufweisen. Mit den fluoreszenten Liganden Carboxyfluorescein-NPY **5** und BodipyFL-NPY **6** (Tabelle 5) wurden Untersuchungen zur Fluoreszenzpolarisation durchgeführt. Zuerst wurde mit **5** in Glycerol-Puffer-Mischungen unterschiedlicher Viskosität die Anisotropie r an einem Spektrofluorimeter im T-Format gemessen. Dieses Messformat ermöglicht die direkte ratiometrische Detektion des polarisierten Fluoreszenzlichts über 2 Detektoren, sodass die notwendige Korrektur für die durch die Optik verursachte Polarisation (der G-Faktor) entfällt. Abb. 37 zeigt den Perrinplot für die erhaltenen Messwerte.

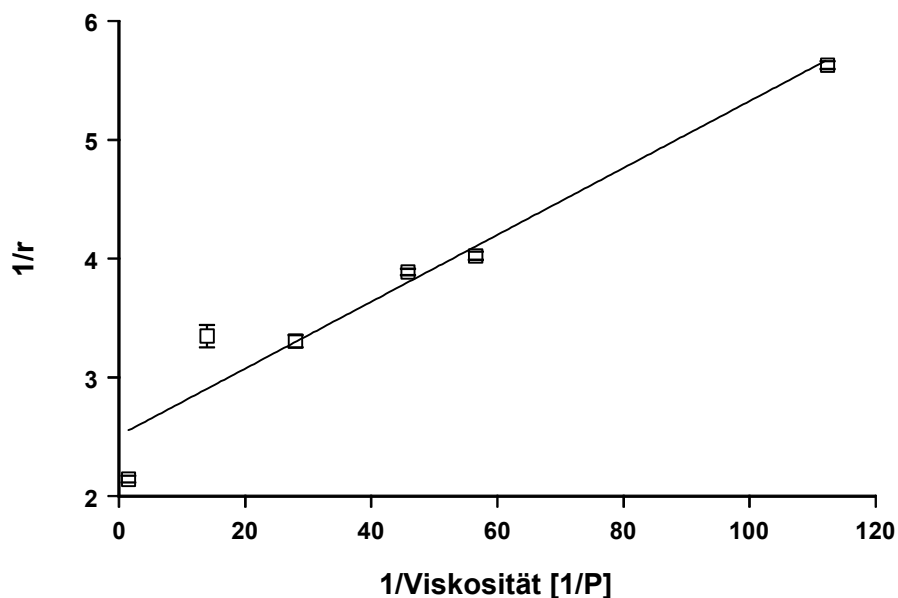


Abb. 37: Perrinplot für das Carboxyfluorescein-markierte NPY **5** in Glycerol-Puffer-Mischungen unterschiedlicher Viskosität [Poise = P]; ISS K2 Fluoreszenzspektrometer; $n = 6$, $T = 20^\circ\text{C}$, $I_{EX} = 488 \text{ nm}$, $I_{EM} = 520 \text{ nm}$.

Dabei werden jeweils die reziproken Größen entsprechend folgender Gleichung aufgetragen:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} + \frac{RT\tau}{h\nu r_0} \eta$$

mit r_0 -Grenzwert der Anisotropie (für $\eta \rightarrow \infty$), τ -Fluoreszenzlebensdauer, η -

Viskosität, V -Volumen des rotierenden Moleküls, R -ideale Gaskonstante und T -absolute Temperatur. Der Grenzwert r_0 ergibt sich aus dem Schnittpunkt mit der Ordinate und stellt den Maximalwert bei kompletter Immobilisierung dar. Der experimentell ermittelte Wert der Anisotropie $r_0 = 0,398$ entspricht einem Polarisationswert von annähernd 0,5. Zum Vergleich: $r_0 = 0,373 \pm 0,002$ liegt für Xanthene, die nicht an ein Peptid gebunden sind, etwas niedriger (Karolin et al., 1994). Es erschien folglich möglich, die Immobilisierung des fluoreszenten Liganden bei der Bindung an den Rezeptor über eine Änderung der Fluoreszenzpolarisation

messen zu können. Da erste Versuche mit intakten HEL-Zellen kein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis lieferten, wurden die weiteren Untersuchungen mit Zellmembranen durchgeführt.

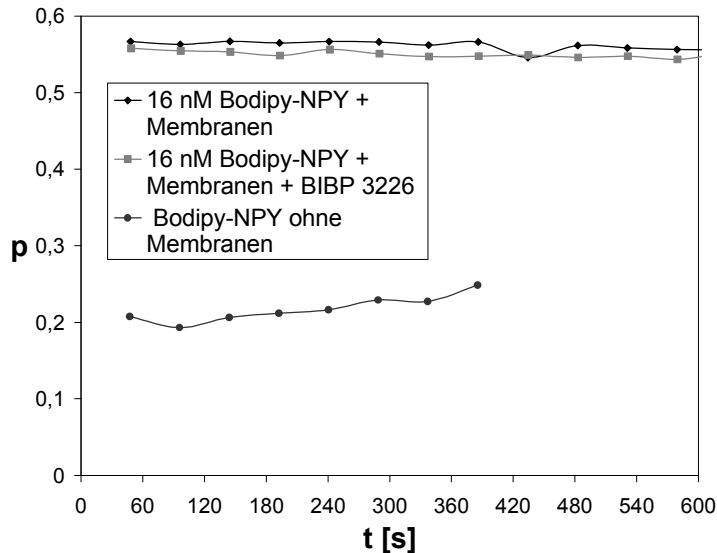


Abb. 38: Kinetik des gemessenen Signals (polarisiertes Fluoreszenz- und Streulicht) von BodipyFL-NPY 6 an isolierten Membranen von HEL-Zellen (100 µg Protein/ml, $I_{ex} = 475$ nm), die Emission wurde mit einem Langpassfilter > 500 nm detektiert und der Antagonist BIBP 3226 wurde im 200-fachen Überschuss zugesetzt, $T = 20^\circ$ C.

Anders die weiteren Versuche mit Membranen von HEL-Zellen: Da die Polarisation p fluoreszenter Moleküle theoretisch nur Werte zwischen $-0,333$ und $0,5$ annehmen kann (s. Abschnitt 1.4.4), muss man folgern, dass Streulicht der Membranen (trotz des verwendeten Langpassfilters) die Messungen verfälschte, obwohl die Anregungswellenlänge mit 475 nm bewusst niedrig gewählt wurde (Abb. 38). Streulicht ist nämlich zu 100% polarisiert ($p = 1,0$). Somit kann auch ein kleiner Anteil an Streulicht, welches den Detektor erreicht, zu scheinbar höheren Werten der Polarisation führen (Lakowicz, 1999). Es ist nur ein sehr geringer Unterschied der Fluoreszenzpolarisation zwischen der Probe mit Membranen und BodipyFL-NPY 6 bzw. Membranen und 6 in Gegenwart eines 200-fachen Überschusses des Antagonisten BIBP 3226 zu sehen. Die Konzentration wurde mit 16 nM Ligand relativ hoch gewählt, was aber aufgrund der Signalschwäche nötig war (Polarisatoren absorbieren Licht!). Da bei höheren Konzentrationen des fluoreszenten Liganden der Anteil des freien Liganden gegenüber dem gebundenen überwiegt, ist ein größeres Messfenster bei niedrigeren Konzentrationen des Liganden 6 zu erwarten. Weitere Versuche an dem empfindlicheren Plattenlesegerät Polarstar und dem TAMRA-NPY 11 (s. a. Versuche mit Membranen, Abschnitt 3.3.1.2) brachten jedoch ebenfalls keine brauchbaren Ergebnisse. Sportsman und Leytes, 2000, gaben für dieses Gerät eine Messgrenze von > 1 nM Fluorescein im Polarisationsmodus an.

Von einer Arbeitsgruppe der Firma Astra Zeneca in Schweden wurde auf der Konferenz der „Society for Biomolecular Screening“ im September 2001 ein robuster Assay in 384-Wellplate-Format für den Neuropeptid Y_2 -Rezeptor vorgestellt. Sie verwenden ein Bodipy-

TMR-markiertes NPY ein, ein längerwellig emittierendes Derivat des hier verwendeten Bodi-pyFL-Fluorophors (Konzentration: 1 nM), und ein Gerät mit konfokaler Messanordnung (Analyst™, LJI/Molecular Devices) sowie Rezeptorsuspensionen. Die ermittelten Bindungsdaten korrelieren sehr gut mit einem Radioligandfiltrationsassay und einem SPA. Als Messfenster gibt die Arbeitsgruppe 100-140 mP bei einem Variationskoeffizienten von 3-7 % an.

Wimalawansa, 1995, hat den Y_2 -Rezeptor isoliert und dessen Bindungseigenschaften charakterisiert. Dabei zeigte der mit Oktyl-Glukosid solubilisierter Rezeptor gegenüber dem membranständigen Rezeptor vergleichbare Aktivität und weitgehend unveränderte Eigenschaften. Dennoch sind mit der Isolierung und Verwendung reiner Membranrezeptoren einige Probleme verbunden: die Lipidmembran muss durch geeignete Detergenzien so substituiert werden, dass die native Konformation des Rezeptors erhalten bleibt, und es müssen hohe Anreicherungs-faktoren (50000-150000) erzielt werden (Repke und Liebmann, 1987).

3.2.3 Ca^{2+} -Assay in der Küvette

Zur funktionellen Charakterisierung von Agonisten und Antagonisten kann die Bestimmung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels dienen, sofern die betreffenden Rezeptoren eine entsprechende Effektorkopplung aufweisen. Dabei verwendete Ca^{2+} -Indikatoren sind Fura-2 und Oregon Green BAPTA-1, die jeweils als membrangängige Vorstufen (Acetoxymethylester, Abb. 39) eingesetzt werden.

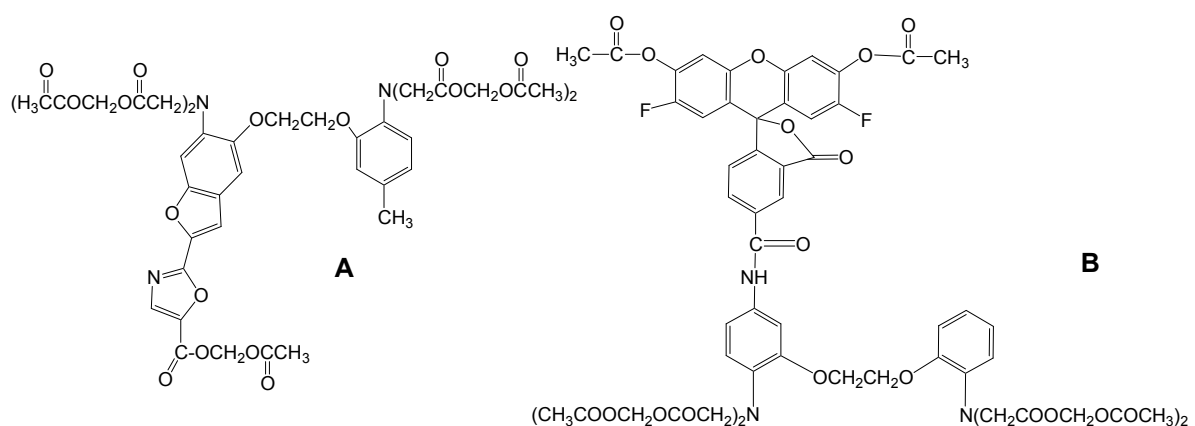


Abb. 39: Strukturen der Acetoxymethylester A: Fura-2/AM \hat{O} und B: Oregon Green BAPTA-1/AM \hat{O} .

Oregon Green ist ein von Fluorescein abgeleitetes Molekül mit gegenüber Fluorescein verbesserter Photostabilität. Beide Substanzen passieren als lipophile Ester die Zellmembran und bleiben nach Spaltung durch zelluläre Esterasen in der Zelle „gefangen“. Durch Chelatisierung der Ca^{2+} -Ionen nimmt die bei 488 nm angeregte Fluoreszenz von Oregon-Green BAPTA-1 zu, während bei Fura-2 ein Shift in der Anregung resultiert, welcher durch das Verhältnis der bei 340 und 380 nm angeregten Fluoreszenzintensität verfolgt wird (Tab. 10).

Tabelle 10: Charakteristika einiger Ca^{2+} -Indikatoren.

	Oregon Green BAPTA-1 $\hat{\text{O}}$	Fura-2 $\hat{\text{O}}$	Fluo-3
Anregungswellenlänge [nm]	492	340 \uparrow /380 \downarrow	506
Detektionswellenlänge [nm]	517 \uparrow	510	526 \uparrow
$K_D(\text{Ca}^{2+})$ [nM]	170	145	390
Φ^a	0,7	0,49	0,18

^aQuantenausbeute des Indikator- Ca^{2+} -Komplexes.

Mit dem Oregon Green BAPTA-1, durch enzymatische Umsetzung mit Schweineesterase aus der Vorstufe erhalten, wurden dann vergleichende Emissionsspektren bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen an einem Spektrofluorimeter aufgenommen (Abb. 40).

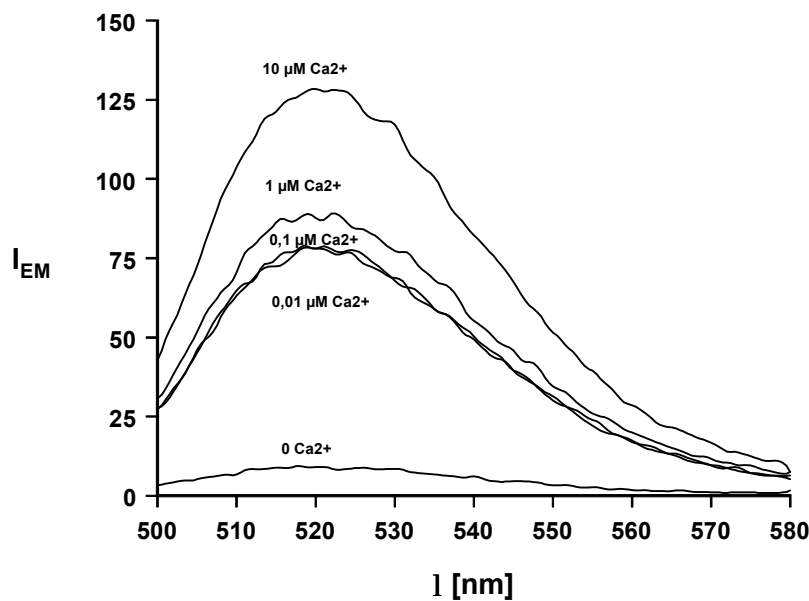


Abb. 40: Kalibrierung des Oregon Green BAPTA-1 in der Küvette für unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentrationen ($I_{EX} = 488 \text{ nm}$).

Dabei war eine Zunahme der Fluoreszenz mit steigender Ca^{2+} -Konzentration zu beobachten. Die Spektren für 0,01 μM Ca^{2+} und 0,1 μM Ca^{2+} unterschieden sich kaum, was möglicherwei-

se an Salz aus dem Hydrolyseansatz zurückzuführen ist. Die Zugabe des Hydrolysats zur Lösung in den Küvetten verändert die Ionenstärke und damit die Fluoreszenzintensität des Ca^{2+} -Indikators geringfügig, was sich aber bei dieser niedrigen Ca^{2+} -Konzentration bemerkbar macht.

Anschließend wurde mit beiden Indikatoren der intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstieg in HEL-Zellen nach Stimulation mit Thrombin verfolgt (Abb. 41).

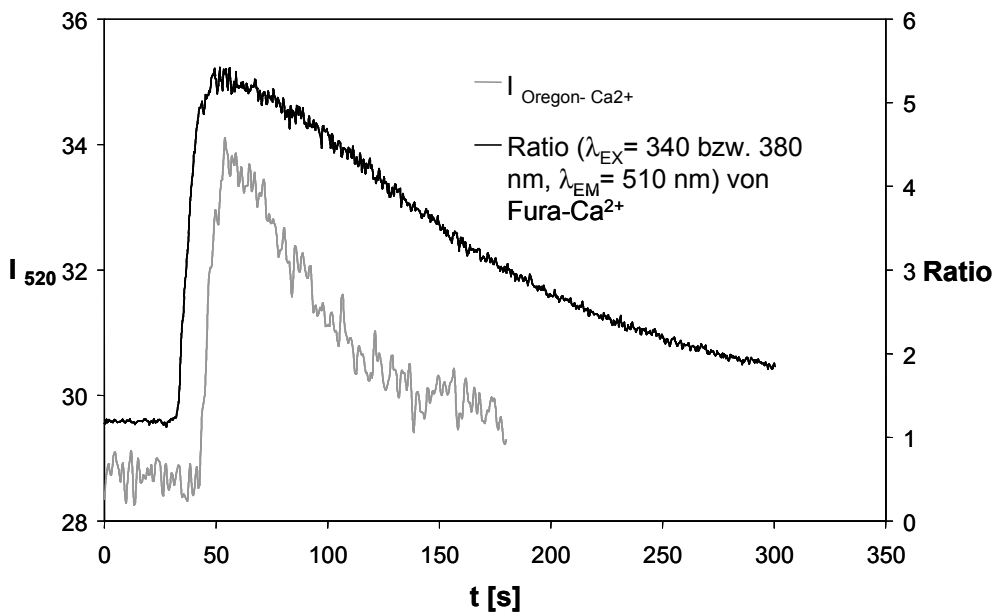


Abb. 41: Fluoreszenz des Oregon Green- Ca^{2+} -Komplexes (linke Y-Achse) und des Fura- Ca^{2+} -Komplexes (ratiometrisch, rechte Y-Achse) in beladenen HEL-Zellen nach Stimulation mit 20 U/ml Thrombin; (Küvettenmessung an PE LS50B).

Das Signal-Rausch-Verhältnis für Oregon-Green BAPTA-1 bzw. Fura-2 beladene Zellen bei maximaler Stimulation mit 20 U/ml Thrombin (Geßele, 1998) an einem konventionellen Spektrofluorimeter beträgt 6,2 bzw. 37,9. Der Stokes' Shift von Fura-2 beträgt etwa das Vierfache desjenigen von Oregon Green, die Quantenausbeute des Fura-2- Ca^{2+} -Komplexes ist dagegen geringer als die des Oregon Green- Ca^{2+} -Komplexes (Tabelle 10).

3.3 Fluorimetrische Bestimmungen in der Mikrotiterplatte

3.3.1 Ca^{2+} -Assay im 96-well-Format

Auf Basis der Küvettenversuche (2 ml) wurden Versuche zur Maßstabsverkleinerung und Automatisierung in 96-Well-Platten (< 200 μl pro well) mit dem Plattenleser Polarstar Galaxy durchgeführt. Dieses Gerät beinhaltet eine Xenon-Blitzlicht-Lampe, ein Filterrad für variable Anregung, sowie einen Bandpassfilter für Fluorescein auf der Emissionsseite.

Zuerst wurde untersucht, welche Mikrotiterplatten (schwarz mit transparenten Boden, komplett transparent oder weiß opak) für die Messung des Ca^{2+} -Signals am besten geeignet sind. Weiterhin wurde untersucht, welche der vier möglichen Messanordnungen am günstigsten ist (Anregung von oben und Detektion von unten, Anregung von oben und Detektion von oben, etc.), da das optimale Format der Küvettenmessung, bei der die Fluoreszenz im 90° -Winkel zur Anregungsrichtung gemessen wird, hier nicht möglich ist. Dabei erwies sich für Platten mit transparentem Boden die Anregung von oben und Detektion von unten am günstigsten. Am besten schnitten jedoch weiße Platten ohne transparenten Boden ab (Anregung von oben/Detektion von oben, Abb. 42).

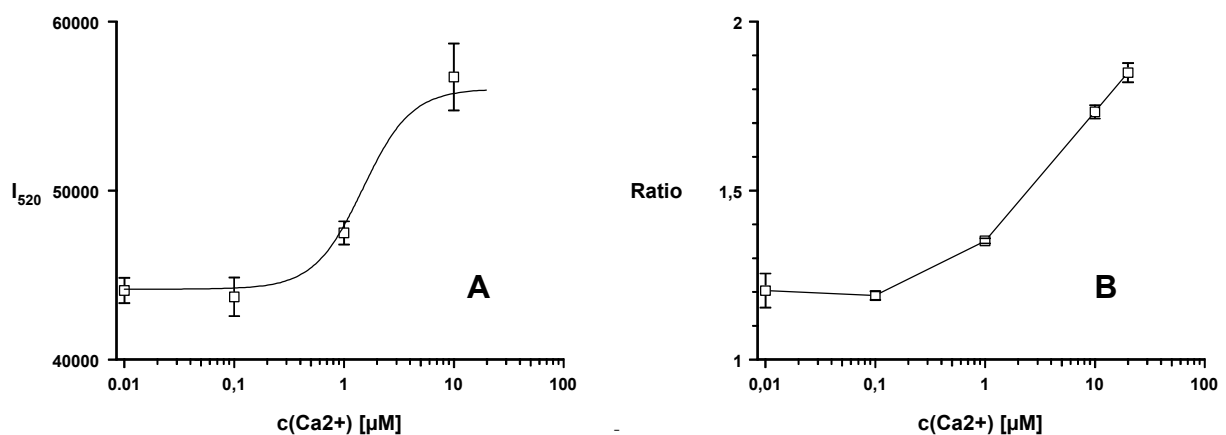


Abb. 42: Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz in Mikrotiterplatten (Costar, weiß), A: Fluoreszenzintensität ($I_{EM=520 \text{ nm}}$) des Oregon Green- Ca^{2+} -Komplexes und B: Fluoreszenz des Fura-2- Ca^{2+} -Komplexes (ratiometrische Messung); $n = 5$, $MW \pm SEM$.

Für die Kalibrierung des Fura-2 (Abb. 42 B) zeigte sich, dass eine Änderung des Quotienten der Fluoreszenz nach Anregung bei 340 und 380 nm für höhere Ca^{2+} -Konzentrationen in der Hauptsache durch eine geringere längerwellige Anregung bedingt war, da das Signal bei 340 nm durch das Plattenmaterial (Absorption durch Polystyrol) geschwächt wird. Zusätzlich macht sich auch Streulicht bemerkbar (s. Abschnitt 1.4.3).

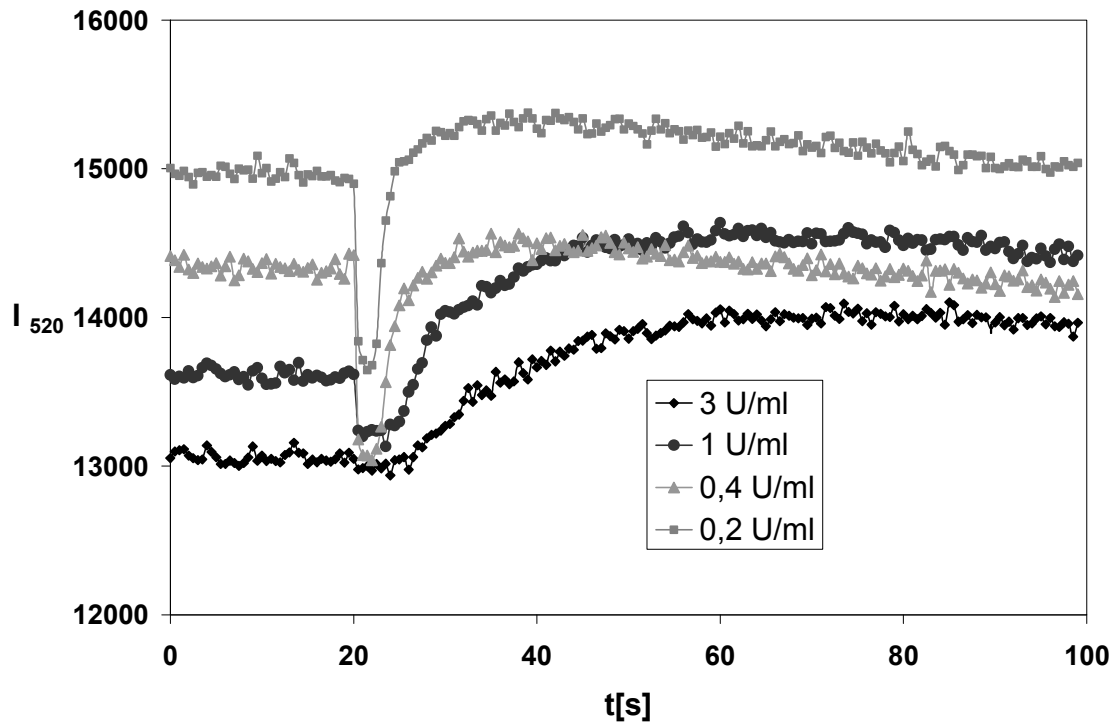


Abb. 43: Zeitlicher Verlauf des unkorrigierten, gemittelten Ca^{2+} -Signals von beladenen HEL-Zellen in 96-Well-Platten für unterschiedliche Konzentrationen an Thrombin, das nach jeweils 20 s automatisch injiziert wurde, pro Konzentration wurden jeweils 5 Wells vermessen.

Die Bedingungen für die Versuche mit HEL-Zellen orientierten sich an den Angaben von Lin et al., 1999: Inkubation mit 3 μM Oregon Green™ 488 BAPTA-1, AM über 30 min.

Dazu wurden je Probe 5 wells vermessen. Der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzsignals ist in Abb. 43 dargestellt. Die Injektion erfolgte nach 20 Sekunden. Als problematisch erwies sich dabei die Tatsache, dass ein Schütteln der Platten nach der Injektion aufgrund des Messmodus nicht möglich war. Deswegen mussten ausreichend große Volumina injiziert werden, um die Durchmischung zu erleichtern. Das durch die Injektion bedingte Aufwirbeln der Zellen führt jedoch zu einem kurzfristigen Signaleinbruch (Abb. 43). Dafür wäre ein Pipettieren der Zellen von Vorteil, was aber aufgrund der begrenzten Hubvolumina der Pumpen nicht möglich war. Zur Anwendung in der Routine wäre stattdessen ein Dispensiersystem erforderlich, welches das variabelere Pipettieren von verschiedenen, auch größeren Volumina ermöglicht. Bei den höheren Thrombinkonzentrationen ist keine ausreichende Durchmischung möglich; zeitabhängig kommt es zu einer Erhöhung der basalen Fluoreszenz durch Auslaufen des Ca^{2+} -Indikators aus den beladenen Zellen. Abb. 44 zeigt nun den zeitlichen Verlauf des nivellierten und korrigierten Ca^{2+} -signals, dabei wurde die durch das gleiche Volumen an Puffer ausgelöste Signaländerung jeweils subtrahiert.

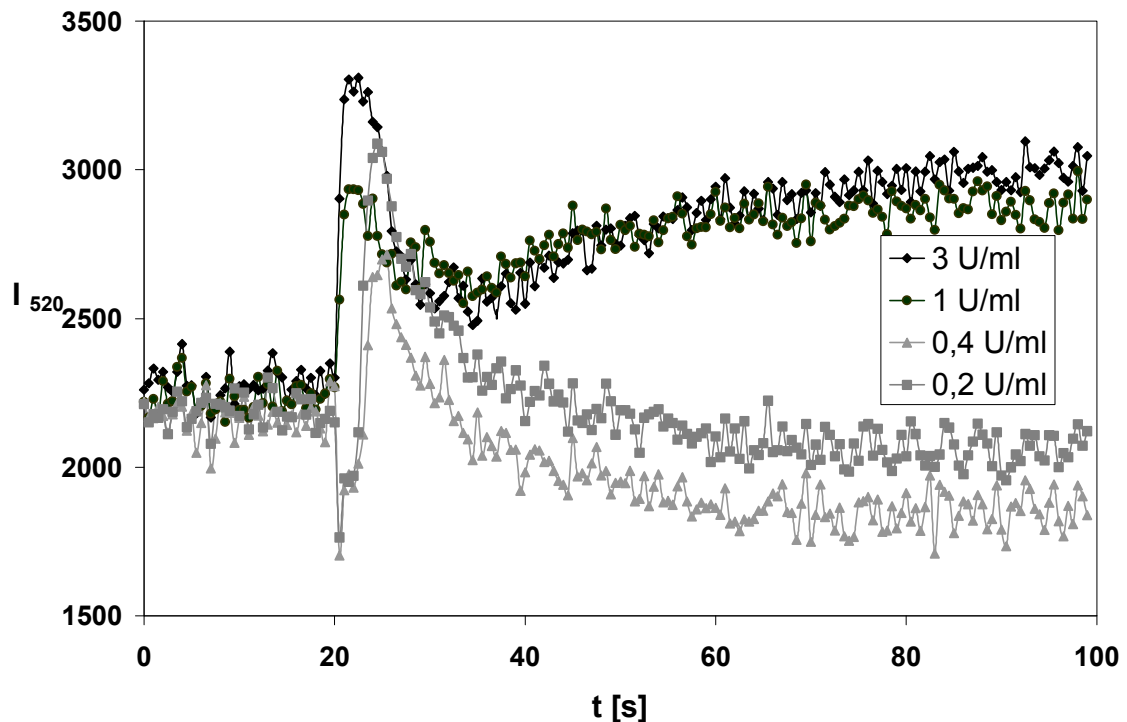


Abb. 44: Korrigiertes Ca^{2+} -Signal in der 96-Well-Platte: Das durch die Injektion von Puffer an der Kontrolle ausgelöste Signal wurde jeweils von den gemittelten Werten (Abb. 43) subtrahiert und anschließend eine Korrektur für den Drift der Basislinie (Auslaufen des Farbstoffs aus den Zellen) durchgeführt.

Das erhaltene Signal war schwach und ließ allenfalls eine semiquantitative Aussage zu. Für das Screening von Rezeptorantagonisten, die den $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstieg hemmen, sodass das Signal entsprechend kleiner ist, ist das unzureichend. Möglicherweise wäre die Messung des $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstiegs dennoch optimierbar gewesen. Lin et al., 1999, haben nämlich mit dem gleichen Plattenlesegerät an HEK293-Zellen, die konstitutiv exprimierten muskarinische und β -adrenerge Rezeptoren exprimieren komplette Konzentrations-Wirkungs-Kurven aufnehmen können. Manning et al., 1999, berichten von Versuchen in 24-Well-Platten. Sie inkubierten 40 min mit 10 μM Fluo-3, AM (einem Analogon des Oregon GreenTM 488 BAPTA-1, AM, Daten in Tabelle 10). In einem Protokoll von Molecular Devices wird empfohlen, die Zellen 1 h lang mit 5 μM Fluo-3, AM zu inkubieren und schwarze Platten mit durchsichtigem Boden zu verwenden (s. Abb. 14). Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Verwendung eines Gemisches von Fura Red, einem längerwellig emittierenden Derivat des Fura-2, und Fluo-3. Dieses Gemisch ermöglichte die ratiometrische Konzentrationsbestimmung des intrazellulären Ca^{2+} auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie, bei welcher die Indikatoren simultan bei 488 nm angeregt werden können (Novak und Rabinovitch, 1994).

3.3.2 Einzelmoleküldetektion des Cy5-NPY

Auf der Anwendung eines Laser-Scanning-Imaging-Verfahrens beruhen zwei in der Literatur beschriebene, erfolgreiche Bestimmungen von Bindungskonstanten an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bei Verwendung des langwelligeren Fluorophors Cy5 (Mellentin-Michelotti et al., 1999, Zuck et al., 1999). Deswegen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Seeger Versuche mit einem konfokalen Rastermikroskop und dem langwelligeren Cy5-NPY **1** durchgeführt. Das als SMD (single molecule detector) bezeichnete Gerät war mit einem Diodenlaser (635 nm) ausgestattet. Der Laserstrahl wurde von einem Mikroskopobjektiv mit hundertfacher Vergrößerung auf die Oberfläche fokussiert. Als Photonendetektor fungierte eine hochempfindliche single-photon avalanche diode (SPAD). Um den Laserfokus exakt einstellen zu können, wurde der Laserspot mit Hilfe eines CCD-Chips auf einem Monitor sichtbar gemacht. Der x,y-Tisch konnte sowohl per Software als auch per Joystick angesteuert werden. Die verwendeten Mikrotiterplatten waren mit einem Glasboden von einer Dicke kleiner als 2/10 mm versehen. Der Boden sollte eine konfokale Detektion von unterhalb der Platte ermöglichen und möglichst plan sein, damit die Messung nicht aus dem Fokus läuft. Nach der Inkubation mit Cy5-NPY (30 nM) wurden die Zellrasen in den Mikrotiterplatten zweimal gewaschen, mit Puffer überschichtet und vermessen (Abb. 45).

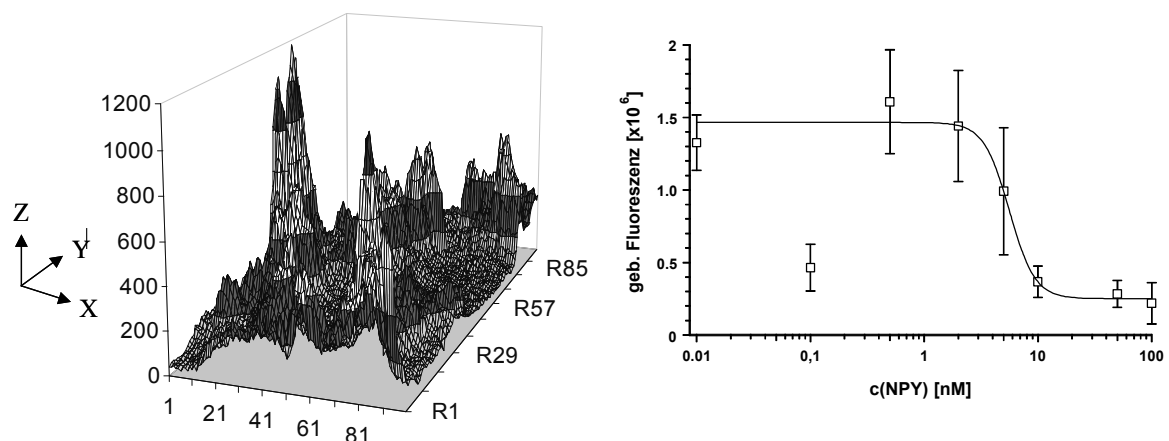


Abb. 45: Links: In z-Richtung dargestellt: Die in der x,y-Ebene ($0,04 \text{ mm}^2$) gescannte Fluoreszenzintensität bei einer Schrittweite von $2 \mu\text{m}$. Diese Fläche beinhaltet durchschnittlich 3-4 Zellen (HEC-1B-Y5); $n = 4$; $MW \pm SEM$. Rechts: Kompetitionskurve von NPY gegen Cy5-NPY (Inkubationskonzentration = 30 nM).

Der Waschvorgang war notwendig, um freien Liganden zu entfernen. Eine während der Messung ablaufende Dissoziation des Cy5-NPY **1** vom Rezeptor musste dabei in Kauf genommen werden.

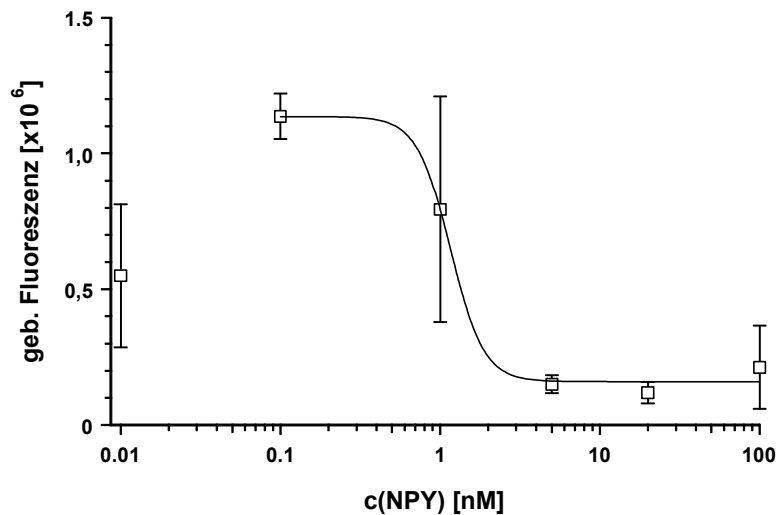


Abb. 46: Verdrängung von Cy5-pNPY 1 (Inkubationskonzentration = 30 nM) mit nichtmarkiertem NPY an HEL-Zellen (Messung am Raster-scannmikroskop); $n = 4$; $MW \pm SEM$.

Da jeweils nur eine sehr kleine Fläche (und damit Zellmenge) vermessen werden konnte, war die Varianz der Messwerte sehr groß. Der für pNPY am Y₅-Rezeptor bestimmte K_i von $(1,53 \pm 0,18)$ nM stimmt dennoch relativ gut mit konventionellen Bindungsdaten überein (Abb. 45 rechts, 1. Charge des Cy5-NPY 1, Tabelle 12 und 13). Weitere Versuche an HEL-Zellen (Y₁-Rezeptor) mit Cy5-NPY 1 ergaben keine besser reproduzierbaren Resultate (Abb. 46).

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die Auflösung und die Empfindlichkeit des verwendeten Geräts für die Untersuchung von kompetitiven Bindungsgleichgewichten, die sich im nanomolaren Konzentrationsbereich liegen, zu hoch war. So war eine homogene Bestimmung nicht möglich, da freier Ligand ein zu starkes Signal bewirkt hätte. Überdies hätte man einen größeren Zellrasen scannen müssen, um repräsentativere Werte zu erhalten, was bei dieser Auflösung zu einer gewaltigen Datenflut geführt hätte. Dies war aber aus diversen Gründen nicht möglich. Beispielsweise gab es keine Autofokussierung an dem Gerät, was bereits bei einer Scanfläche, die bei nur einem Bruchteil des Welldurchmessers lag, zu Schwierigkeiten führte. Da Zellfragmente unspezifische Bindung der Fluoreszenz aufweisen, wäre v. a. für die HEL-Zellen eine morphologische Unterscheidung der Zellen nötig. Dazu wären aber entsprechende Bilderkennungsprogramme nötig.

3.4 Untersuchung der Rezeptorbindung auf subzellulärer Ebene mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie

Untersuchungen der fluoreszenten NPY-Liganden, mittels konfokaler laserinduzierter Mikroskopie, wurden zuerst in der Neurologie, Universität Regensburg durchgeführt. Die mit den kurzwelligen Fluorophoren markierten Liganden **5** und **11** lieferten hierbei kein spezifisches Signal am Rezeptor (Abb. 47).

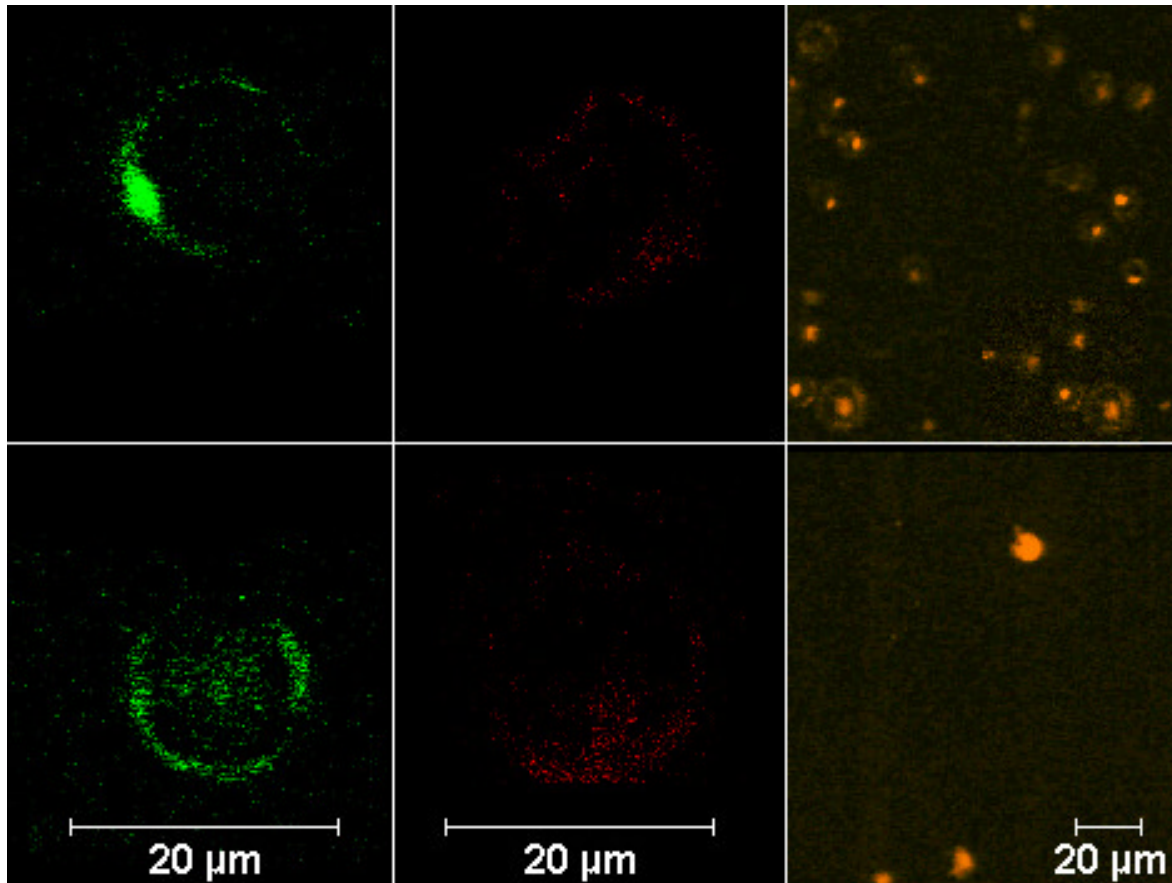


Abb. 47: Konfokale mikroskopische Bilder von HEL-Zellen, links oben :Carboxyfluorescein-NPY **5** (10 nM), links unten: zusätzlich 200-facher Überschuss an NPY; Mitte oben: Tetramethylrhodamin-NPY **11** (10 nM), Mitte unten: zusätzlich 200-facher Überschuss an NPY, rechts oben: Cy5-NPY **1** (100 nM), rechts unten: zusätzlich 200-facher Überschuss an NPY.

Eine Unterscheidung zwischen totaler und unspezifischer Bindung (vgl. 3.5.1) war nicht möglich. Besonders das an den HEL-Zellen gebundene Tetramethylrhodamin-NPY **11** lässt praktisch keine Fluoreszenz erkennen. Dies ist in Übereinstimmung mit den später durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen (3.5.1). Im Falle des Cy5-NPY **1** konnte dagegen mit dem konfokalen Mikroskop (Serienmodell) des Klinikums, wie in der Durchflusszytometrie, eine spezifische Bindung gemessen werden, auch wenn die Anregung nicht mit einem

Rotlichtlaser erfolgte. Bei den wenigen Zellen, die eine deutliche unspezifische Fluoreszenz zeigen, ist von einer Desintegration der Zellmembran auszugehen (Abb. 47 rechts unten).

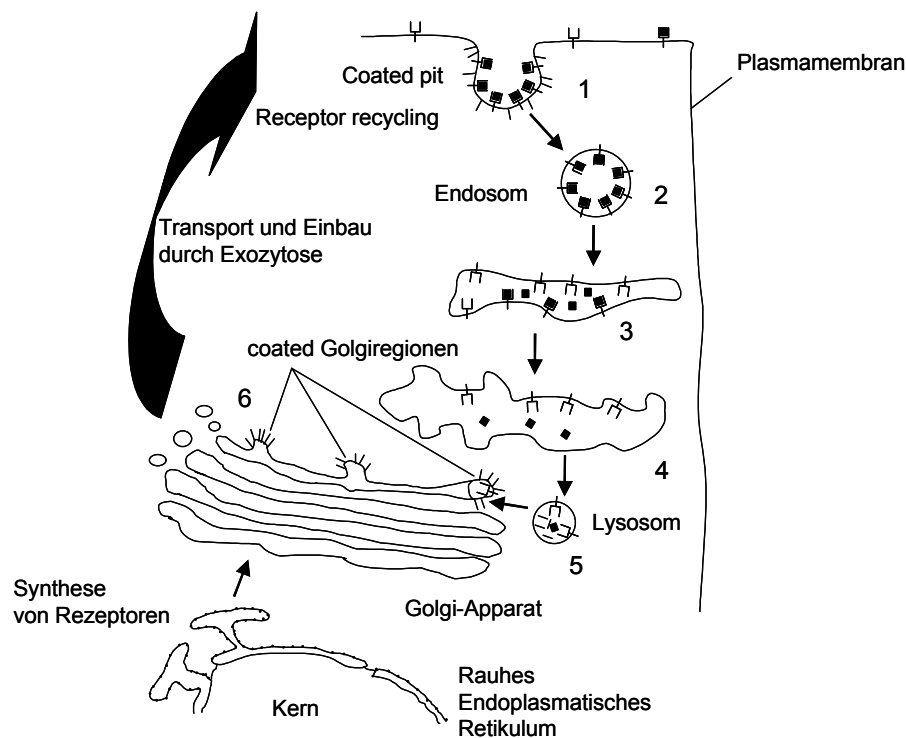
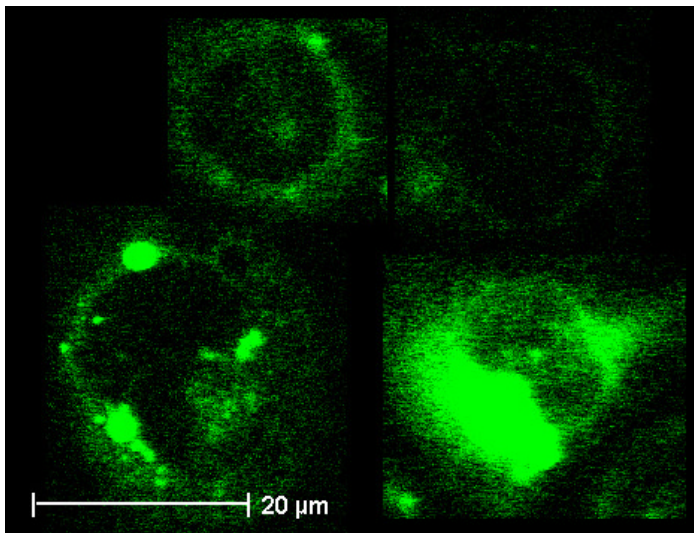


Abb. 48: Vereinfachtes Schema der Rezeptorinternalisation und des "Trafficking" (Repeke und Liebmann, 1981), 1: Rezeptor-Ligand-Komplexe in coated pits 2: Bildung von Endosomen 3: Senkung des pH-Werts 4 führt zur Dissoziation der Rezeptor-Ligand-Komplexe, restliche Komplexe werden in Lysosomen 5 weiter abgebaut. 6: In den coated Golgiregionen werden synthetisierte und zurückgewonnene Rezeptoren verpackt und an die Zellmembran zurückgeführt.

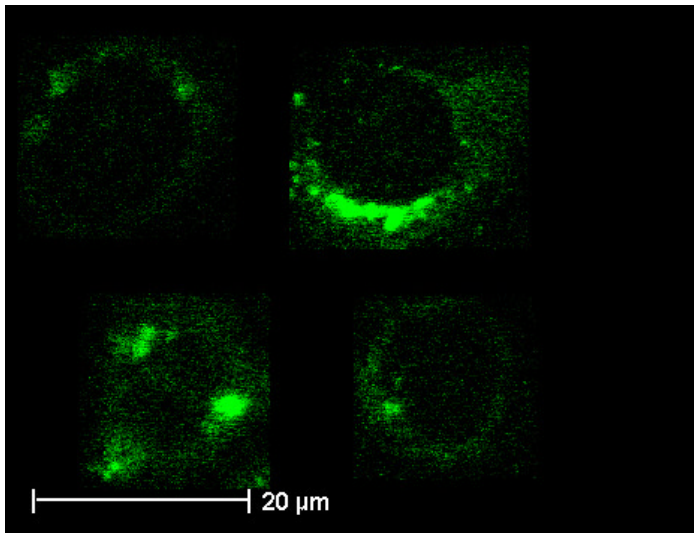
Die Bindung von Agonisten an Rezeptoren intakter Zellen kann zu deren Internalisierung führen (Abb. 48). Für Agonisten, die nicht hochaffin zum Rezeptor sind, wird eher eine Dissoziation als Internalisation vermutet (Koenig, 1999).

Fabry et al., 2000, berichten von der Internalisierung eines N-terminal markierten Carboxyfluorescein-NPY (s. auch Abschnitt 3.1.3) in SK-N-MC-Zellen, die den NPY Y₁-Rezeptor konstitutiv exprimieren und adhärent wachsen. Bindungsversuche mit dem Radioliganden [³H]-Propionyl-NPY (1 nM), wobei die anschließende Trennung zwischen an der Zelloberfläche gebundenem und internalisiertem Liganden durch Waschen mit saurer Lösung (pH nicht beschrieben) erfolgte, ergaben einen Anteil von 20-30 %, der sich nicht auswaschen ließ. Für die konfokalen mikroskopischen Untersuchungen setzte diese Arbeitsgruppe 1 µM des fluoreszenten Liganden ein. Die beobachtete Internalisation ist als zeit- und temperaturabhängig beschrieben. Dies steht im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen mit dem fluoreszenten Liganden 5 (folgende Seiten, Abb. 49 und 50) bei verschiedenen Temperaturen (4°C und 37°C, jeweils über 60 min inkubiert) an Y₅-transfizierten HEC-1B-Zellen. Die Ergebnisse

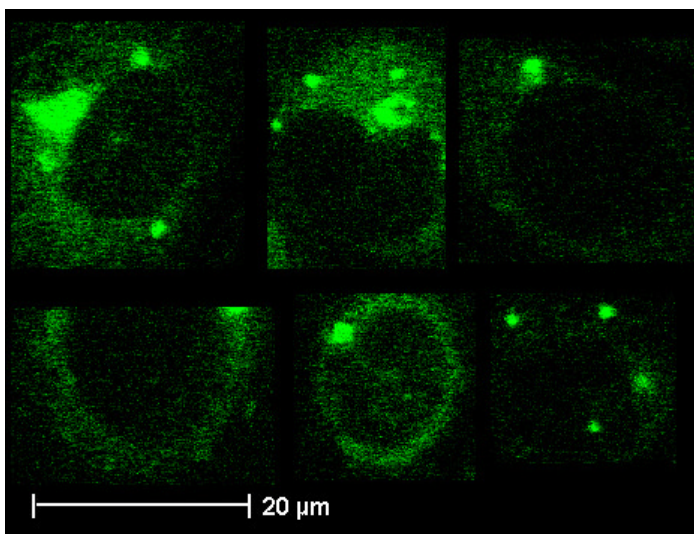
dieser Untersuchungen lassen keine eindeutigen Schlüsse zu. Fixierung der Zellen mit 3 % Paraformaldehyd, wie sie Fabry et al., 2000, ebenfalls durchführten, verstärkte die ohnehin im spektralen Bereich des Fluoresceins starke Autofluoreszenz. Die Detektion von einer spezifischen Bindung von **5** war auch an diesen Zellen nicht möglich. Eine von Fabry et al., 2000, zur Inkubation eingesetzte Konzentration des fluoreszenten Liganden von 1 μM , erscheint in Anbetracht des ca. 1000fach niedrigeren K_i -Wertes „unphysiologisch“ hoch. Zusätzlich ergibt sich das Problem, dass Carboxyfluorescein in sauren endosomalen Kompartimenten eine wesentlich schwächere Fluoreszenz aufweist. Andere Arbeitsgruppen wie Parker et al., 2001, und Gicquiaux et al., 2001, beschreiben jedoch ebenfalls die rasche Internalisation des NPY- Y_1 -Rezeptors über clathrin-coated pits. Beide Arbeitsgruppen verwendeten rekombinante Rezeptorsysteme. Parker et al., 2001, untersuchten die Aufnahme des Ligand-Rezeptor-Komplexes in Y_1 -transfizierte CHO-Zellen; der temperaturabhängige Prozess konnte durch Phenylarsinoxid inhibiert werden. Gicquiaux et al., 2001, wiesen die Internalisation über EGFP („enhanced green fluorescent protein“) nach, das als Fusionsprotein mit dem NPY Y_1 -Rezeptor in HEK293-Zellen exprimiert wurde. Dessen Fluoreszenz wird ebenfalls in den Endosomen geschwächt, die Internalisation kann durch den Y_1 -Antagonisten BIBP 3226 geblockt werden.



10 nM Carboxyfluorescein-NPY 5

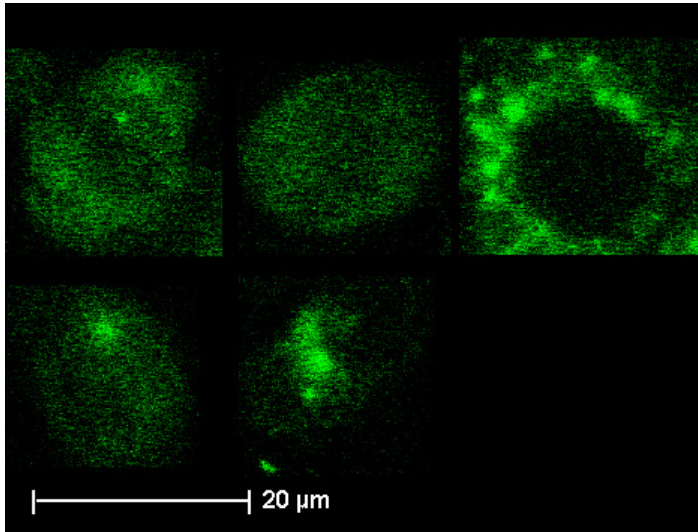


10 nM Carboxyfluorescein-NPY 5 + 2 μM NPY

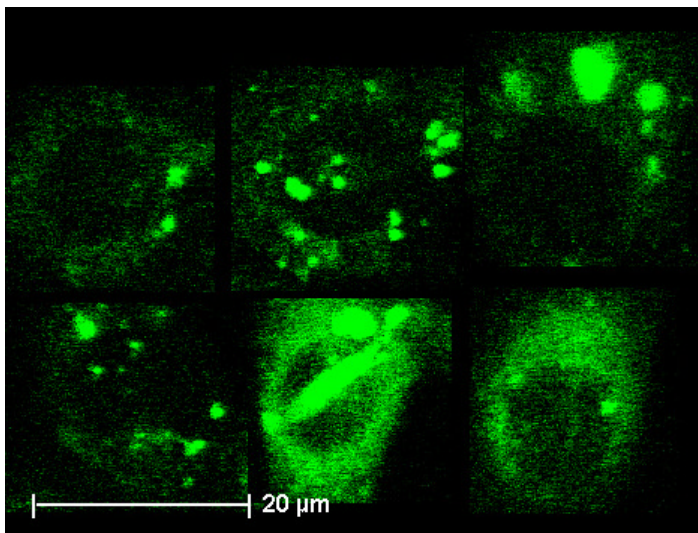


Negativkontrolle (Autofluoreszenz)

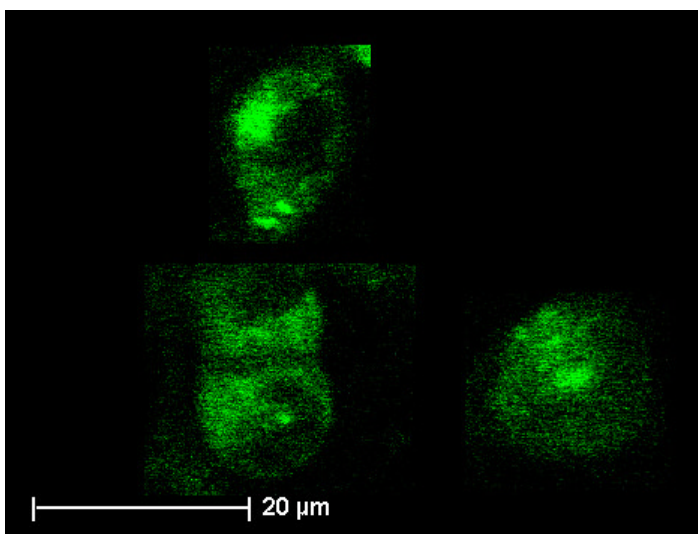
Abb. 49: Konfokale mikroskopische Bilder von Y₅-transfizierten, mit 3% Paraformaldehyd fixierten HEC-1B-Zellen. Inkubation jeweils bei 37°C über 60 min.



10 nM Carboxyfluorescein 5



10 nM Carboxyfluorescein 5 + 2 μM NPY



Negativkontrolle (Autofluoreszenz)

Abb. 50: Konfokale mikroskopische Bilder von Y₅-transfizierten, mit 3% Paraformaldehyd fixierten HEC-1B-Zellen. Inkubation jeweils bei 4°C über 60 min.

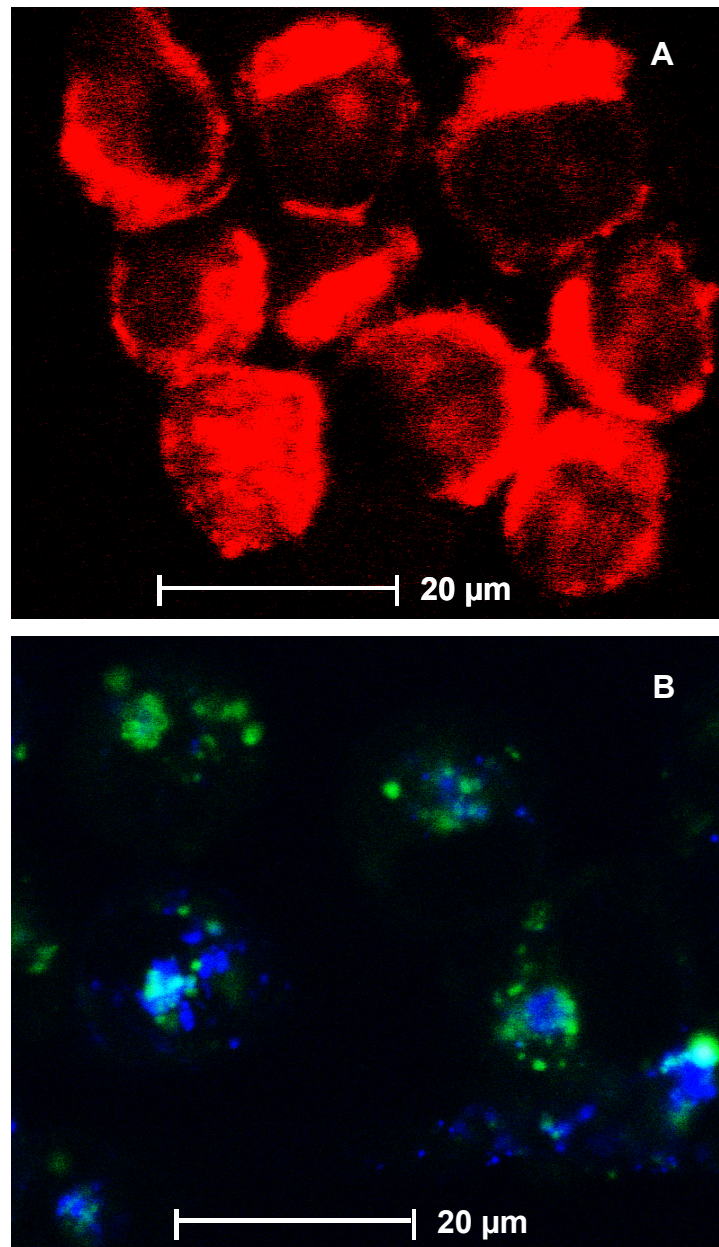


Abb. 51: A: Mit Tetramethylrhodamin-markiertem Weizenkeimlektin ($1 \mu\text{M}$) angefärbte HEL-Zellen B: Überlagerte konfokale Bilder von HEL-Zellen grün: Autofluoreszenz, blau: Fluoreszenz von Cy5-NPY 1 (100 nM), Inkubation über 60 min.

Abb. 51 A zeigt die aggregierten HEL-Zellen, die mit Tetramethylrhodamin-markiertem Weizenkeim-Lektin ($1 \mu\text{M}$) angefärbt wurden. Bei dieser Konzentration erhält man eine sehr deutliche Fluoreszenz. Das Lektin bindet an N-Acetylglucosamine. Sheikh et al., 1990, haben gezeigt, dass dieses Lektin auch mit dem NPY Y_1 -Rezeptor interagiert. Im Ca^{2+} -Assay an HEL-Zellen hemmte das TMR-markierte Lektin teilweise den durch 10 nM pNPY induzierten Ca^{2+} -Anstieg. Abb. 51 B zeigt, dass die Autofluoreszenz zwar auch membranär aber v. a. intrazellulär lokalisiert ist. Zudem spricht Abb. 51 B für ein Clustering der NPY-Rezeptoren.

Kroeger et al., 2001, berichten von einer Homooligomerisierung des Thyrotropin-Releasing-Hormon-Rezeptors, einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor, Angers et al., 2000, über die Dimerisierung des β_2 -Adrenozeptors, beide Rezeptoren sind wie die NPY-Rezeptoren G-Protein-gekoppelt. Die Di- oder Oligomerisierung ist agonistabhängig und wurde in beiden Fällen mit der BRET-Technologie (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) detektiert. Der Versuch eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers, der ebenfalls nur bei ausreichender räumlicher Nähe von Donor und Akzeptor zu beobachten ist, mit den beiden fluoreszenten Liganden Carboxyfluorescein-markiertes NPY 5 (Donor) und TAMRA-NPY 11 (Akzeptor) in der Durchflusszytometrie, der diese Zusammenlagerung aufklären könnte, führte aber zu keinem Ergebnis. Beide Liganden waren dafür ungeeignet (s. auch Abschnitt 3.5.5). Ein hierfür geeignetes Donor-Akzeptor-Paar könnte Cy5/Cy5.5 sein (Schobel et al., 1999). Cy5.5 stellt als längerwelliges Dibenzindodicarbocyanin den Akzeptor für Cy5 dar. In der Folge wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Böhmer (LS Wolfbeis) weitere Untersuchungen an einem konfokalen Mikroskop, das über einen gepulsten roten Diodenlaser verfügt, durchgeführt.

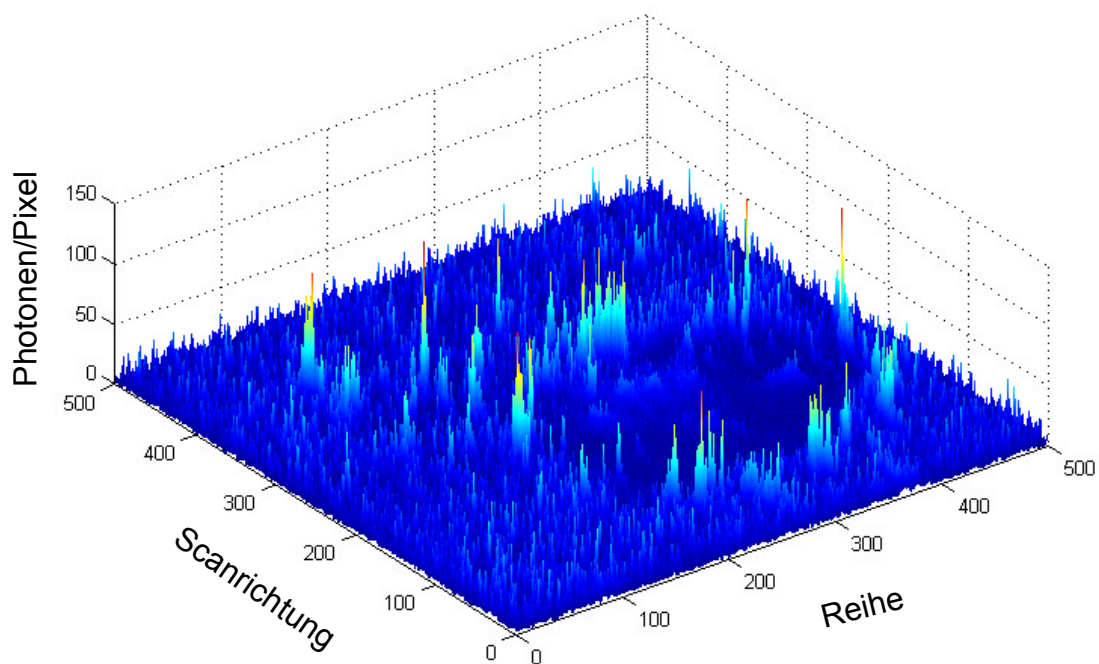


Abb. 52: Konfokale Detektion einer mit Cy5-NPY ($\gg 1$ nM) inkubierten HEC-1B-Y5-Zelle; Schrittweite: $\gg 50$ nm.

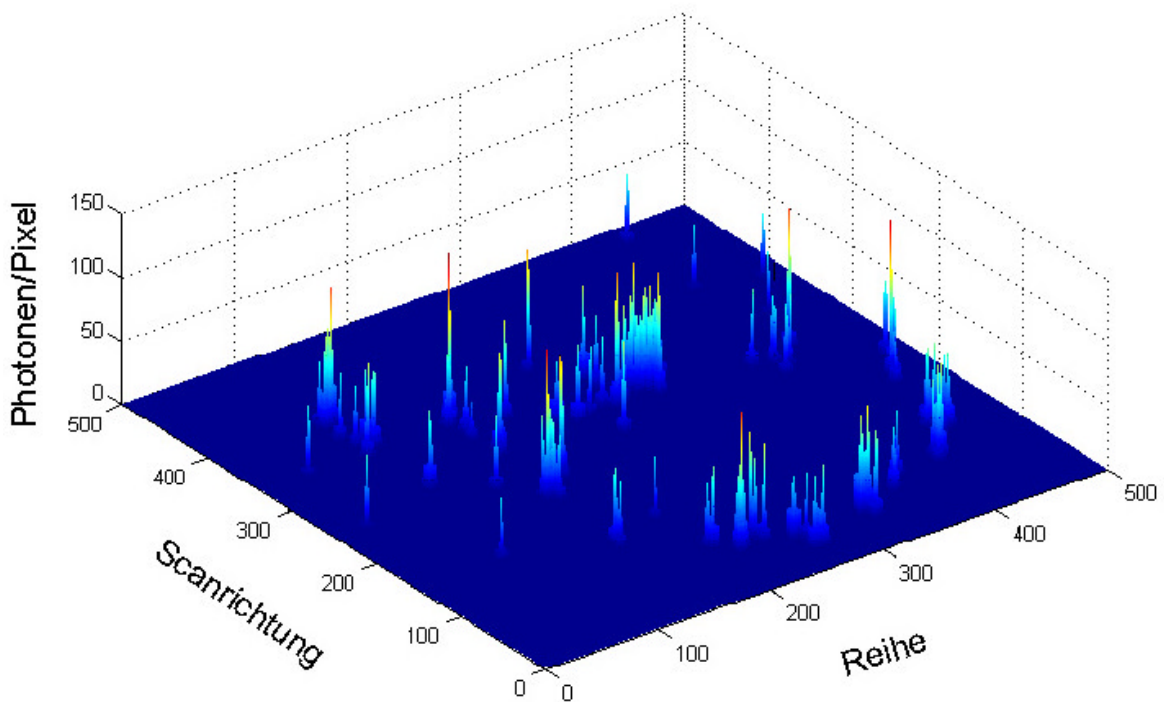


Abb. 53: Konfokale Detektion einer mit Cy5-NPY ($\gg 1$ nM) inkubierten HEC-1B-Y5-Zelle nach Korrektur des Hintergrunds; Schrittweite: $\gg 50$ nm.

Abb. 52 und 53 stammen von Herrn Böhmers Aufbau mit zeitaufgelöster Einzelphotonendetektion. Für die Korrektur des Hintergrunds wurde ein Schwellenwert gesetzt. Aufgrund der Totzeit des Detektors im Einzelphotonenmodus nach der Detektion eines Photons (einige 100 ns) ist die Detektionsrate auf einige Millionen Zählereignisse/s begrenzt. Daher muss die Scangeschwindigkeit ausreichend langsam sein, um eine vernünftige Anzahl (ca. 10 Photonen/Molekül) zählen zu können.

Damit unterscheidet sich der Aufbau stark von konventionellen konfokalen Laser Scanning Mikroskopen (CLSM), bei denen höhere Fluorophorkonzentrationen und Detektoren im Analog-Modus eingesetzt werden. Dafür muss das Scanning mit piezogesteuerten Tischen durchgeführt werden. Die Auflösung beträgt ca. 50 nm.

Diese repräsentative Messung (Abb. 53) deutet auf eine Lokalisation des fluoreszenten Liganden an der Zellmembran hin, eine Aufnahme in die intakte Zelle scheint unter diesen Bedingungen (Inkubationsdauer 5-20 min) nicht zu erfolgen.

Eine Internalisation der fluoreszenten Agonisten **1** bzw. **5** konnte aufgrund der eigenen Ergebnisse weder bestätigt noch widerlegt werden.

3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die mehrparametrische Analyse größerer Zellzahlen. Sie eignet sich für verschiedene Fragestellungen, u. a. zur Untersuchungen von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen mittels Fluoreszenz.

Wie bei der Messung in herkömmlichen Spektrofluorimetern werden die Zellen in Suspension vermessen. Der entscheidende Unterschied jedoch ist, dass die vorgelegte Zellsuspension über eine Düse unter laminaren Bedingungen in den Strom einer Trägerflüssigkeit (isotonische Kochsalzlösung) eingebracht wird. Dies führt zu einer „hydrodynamischen Fokussierung“ (Abb. 54), sodass im Idealfall jede einzelne Zelle ohne die umgebende Lösung bei der Passage durch die Küvette getrennt angeregt und deren Fluoreszenz vermessen werden kann. Das erhaltene Fluoreszenzsignal wird folglich nicht durch (Re-)absorption oder Streuung an anderen Zellen wie im Falle der konventionellen Küvettenmessung geschwächt. Überdies wird dieses von der einzelnen Zelle stammende Signal durch die schnelle Erfassung großer Zellzahlen statistisch repräsentativ. Durch die laminaren Strömungsbedingungen wird eine Durchmischung von Probenlösung und Trägerflüssigkeit verhindert und somit eine Messung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen unter Gleichgewichtsbedingungen gewährleistet.

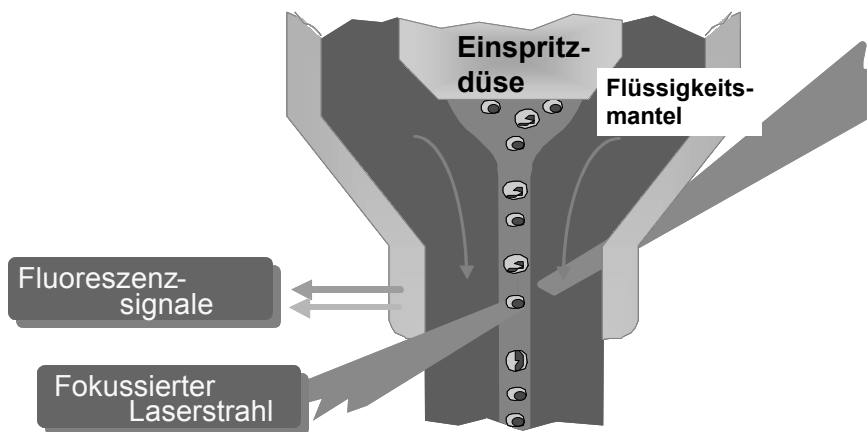


Abb. 54: „Hydrodynamische Fokussierung“ der Zellen an der Einspritzdüse des Durchflusszytometers.

Die Fluoreszenz wird außerdem durch entsprechende Laser induziert, was die Selektivität und Effizienz der Anregung erhöht. Über ein System von dichroitischen Spiegeln, optischen Linsen und Filtern werden gestreutes Licht und Fluoreszenz zu Photodiode bzw. PMT geleitet und detektiert (Abb. 90). Das Vorwärtsstreulicht der Zellen wird im Winkel zwischen $1,5^\circ$ und 10° zur Strahlenrichtung des anregenden Lasers (488 nm) gemessen. Die Vorwärtsstreulichtintensität ist annähernd proportional zur Zellgröße, wobei aber auch die innere Struktur der Zelle zum Tragen kommt. So ist bei reifen polymorphkernigen Granulozyten die Streulichtintensität höher als bei den größeren Monozyten. Die Intensität der Seitwärtsstreuung

(gemessen im 90°-Winkel) hingegen korreliert mit dem Brechungsindex (der Granularität) der Zelle. Durch die gleichzeitige Detektion des Streulichts und - wenn erforderlich – von bis zu vier Fluoreszenzsignalen, die jeweils miteinander korreliert werden können, ist eine Fülle von Informationen enthalten. Das Streulicht lässt z. B. im Falle von Blutzellen die einfache Differenzierung von Monozyten, Granulozyten und Thrombozyten zu. Anhand der Streulichtcharakteristik von Zellen ist eine selektive Auswertung der Fluoreszenzverteilung dieser „Subpopulationen“ über Gates (= eingegrenzte Bereiche im Streulichtdiagramm, s. 3.5.1.1) möglich. Differenzierungen über die Funktionalität von Zellen sind ebenfalls möglich.

Für die graphische Darstellung der Messdaten im „listmode“ bieten sich 2/3D-dotplot, Konturplot und Dichteplot sowie Histogramme an. Beim Dotplot wird ein Ereignis als Punkt dargestellt, beim Konturplot/Dichteplot wird farblich abgestuft die Häufigkeit dargestellt. Das Histogramm stellt die Häufigkeit des gewählten Parameters gegen den gewählten Parameter dar.

Photobleaching ist bei der Durchflusszytometrie im Gegensatz zur Mikroskopie kaum ein Problem, da die Verweilzeit einzelner Zellen im Laserfokus nur gering ist.

Methodische Nachteile der Durchflusszytometrie sind jedoch folgende:

- Die betreffenden Zellen können nur einmal vermessen werden, was bei kinetischen Untersuchungen unter Umständen von Nachteil sein kann.
- Eine räumliche Auflösung bzw. Lokalisation der Fluorophore innerhalb der Zellen ist nicht direkt möglich.
- Das notwendige Ablösen adhärent wachsender Zellen und die Zentrifugation führen zu einem Verlust von Zellen und beeinträchtigen nicht nur deren Vitalität, sondern senken möglicherweise auch die Rezeptorzahl. Heithier et al., 1994, haben z. B. eine Halbierung der Rezeptorzahl von suspendierten gegenüber adhärenen Sf9 Zellen festgestellt.

Die Vor- und Nachteile der Messung von Zellen in Suspension in der Durchflusszytometrie und an Oberflächen mit der Laser-Scanning-Cytometry haben Darzynkiewicz et al., 1999, zusammengefasst.

Die Durchflusszytometrie eignet sich aufgrund ihrer Geschwindigkeit und Empfindlichkeit auch für hochdurchsatzfähige und automatisierte Assays (Nolan et al., 1999). Mittlerweile wird von einigen Firmen die nötige Ausrüstung für die Vermessung von Mikrotiterplatten entwickelt oder bereits angeboten. Mit dem MoFlo[®] HTS[™] Zytometer der Firma Cytomation, Inc., bei welchem bis zu 30000 Zellen/s gemessen werden können, arbeiten bereits einige

pharmazeutische Firmen bei der Wirkstoffsuche. Vorteilhaft ist auch die Sortieroption. Daurty et al., 2000, berichten über den Nutzen der Zellsortierung für die Etablierung und Verbesserung zellulärer durchflusszytometrischer Assays.

3.5.1 Untersuchungen an HEL-Zellen

3.5.1.1 Kompetitive Bindung des fluoreszenten Liganden Cy5-NPY

Die von Martin und Papayannopoulou, 1982, etablierte HEL-Zelllinie besteht aus größeren Proerythroblasten, welche bei der Färbung mit Giemsa-Lösung basophiles und agranuläres Zytoplasma aufweisen und außerdem deutliche Tendenz zur Polyploidie zeigen. Von Motulsky und Michel, 1988, bzw. Feth et al., 1992, wurden HEL-Zellen als NPY Y₁-Modell charakterisiert und im Rahmen dieser Arbeit in der Durchflusszytometrie auch mit dem langwellig anregbaren Cy5-NPY **1** untersucht.

Die Inkubation von Zellen oder Zellmembranen mit markiertem Liganden alleine führt sowohl zur Bindung des Liganden an die Bindungsstelle des Rezeptors (*spezifische Bindung*) als auch an andere Stellen des Rezeptors oder an andere Proteine, Membranen etc. (*unspezifische Bindung*), was als *totale Bindung* bezeichnet wird. Die spezifische Bindung ist aufgrund der begrenzten Bindungsstellen sättigbar und reversibel. D. h. der markierte Ligand kann mit einem Überschuß an nichtmarkiertem Ligand aus der Bindungsstelle am Rezeptor verdrängt werden, während man davon ausgeht, dass die unspezifische Bindung irreversibel ist. Die spezifische Bindung kann folglich nicht direkt ermittelt werden, sondern ergibt sich aus der Differenz von totaler und unspezifischer Bindung.

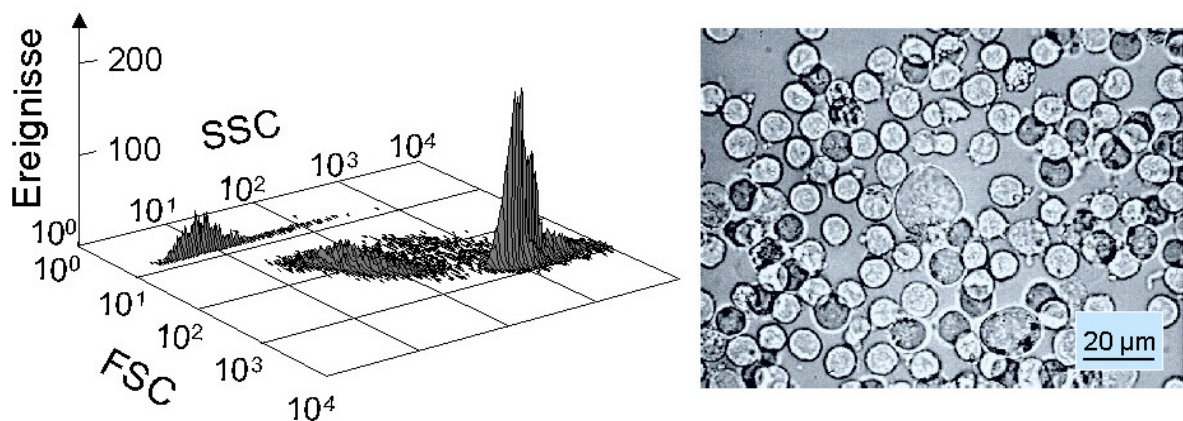


Abb. 55: Links: Dotplot des Streulichts (FSC = Vorwärtsstreuung, SSC = Seitwärtsstreuung, logarithmischer Detektormodus über 4 Dekaden) von HEL-Zellen, rechts: durchlichtmikroskopisches Bild der Zellen.

Erkennbar sind im Streulichtdiagramm (Abb. 55) unterschiedliche Bereiche, die jeweils mit einem Gate eingegrenzt wurden. Das mikroskopische Durchlichtbild daneben zeigt, dass die Zellen deutlich unterschiedliche Größe und Struktur aufweisen. Die Ereignisse mit geringster Vorwärts- und Seitwärtsstreuung sind auf Zelldebris zurückzuführen, in der Mitte werden mittelgroße Zellen detektiert, die praktisch keine Fluoreszenz in Kanal 4 aufweisen (Abb. 55 bzw. 56). Die anderen beiden Subpopulationen, die den größten Anteil der Zellen ausmachen, wurden untersucht. Abb. 56 zeigt die Fluoreszenz verschiedener Proben im Kanal 4. Man kann gegenüber der Autofluoreszenz der Kontrolle eine Fluoreszenz im Kanal 4 für die Zellen mit hoher Vorwärtsstreuung, die mit Cy5-NPY 1 (30 nM) inkubiert wurden, erkennen. Diese Fluoreszenz lässt sich mit 2 nM NPY teilweise verdrängen und mit einem 200-fachen Überschuss an NPY bis auf die nichtspezifische Bindung verdrängen.

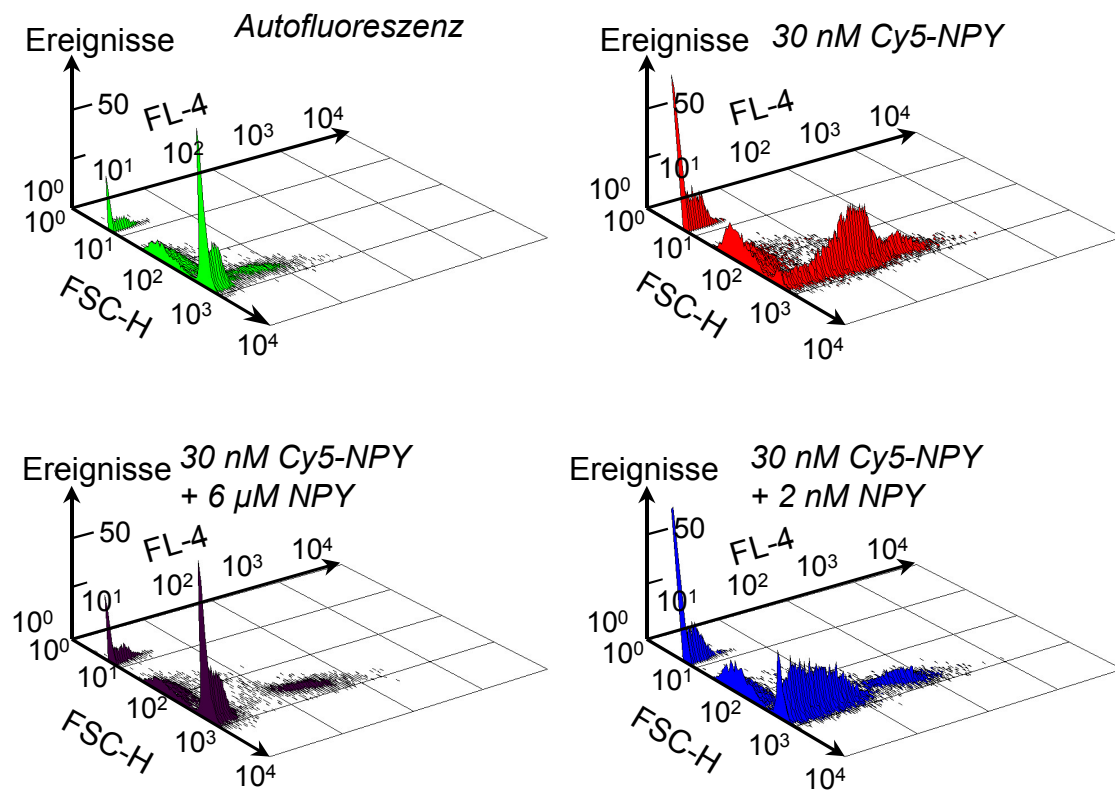


Abb. 56: 3D-Dotplots der HEL-Zellen: die Zellen mit hoher Vorwärtsstreuung (FSC) zeigen eine Fluoreszenz im Kanal 4, die durch die Verdrängung des fluoreszenten Liganden Cy5-NPY 1 je nach Konzentration von pNPY abnimmt.

Da nur bei bestimmten HEL-Zellen mit hoher Vorwärtsstreuung eine spezifische (S. 78) und somit reversible Bindung messbar ist, wurde diese Subpopulation im Folgenden für die Bestimmung von Bindungskonstanten ausgewählt und bei jedem Versuch durch Gates (s. 3.5.1.3 und experimenteller Teil, Abb. 91) aus dem Streulichtdiagramm (Seitwärts- gegen Vorwärtsstreuung) erfasst.

Bei der weiteren Untersuchung der Fluoreszenz der interessanten Zellen bestätigte sich die Abhängigkeit der Fluoreszenz 4 von der Konkretorkonzentration (Abb. 57).

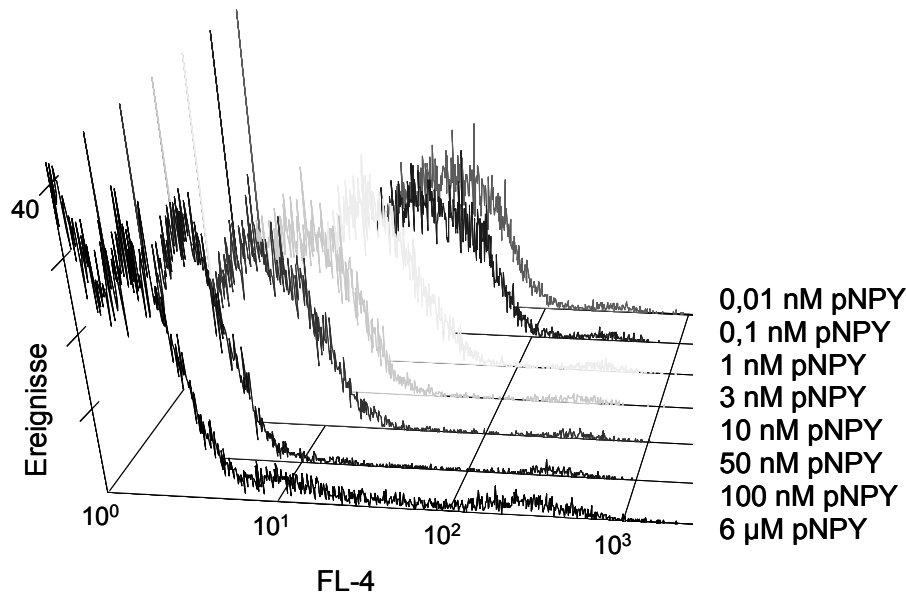


Abb. 57:
Histogramme der Fluoreszenz 4 von Y_1 -rezeptorpositiven Zellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konkretorkonzentrationen.

Die Auftragung der jeweiligen geometrischen Mittel (s. 3.5.1.2) der Fluoreszenz 4 gegen die Konzentration des Konkretors ergibt sigmoidale Konkretionskurven, aus denen der IC_{50} - und der apparente K_i -Wert ermittelt werden kann (Abb. 58).

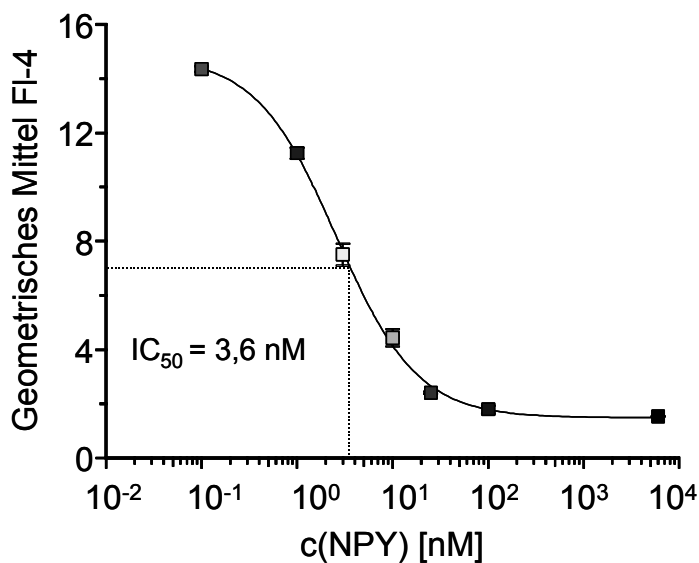


Abb. 58: Auftragung des geometrischen Mittels der Fluoreszenz 4 der Y_1 -rezeptorpositiven Subpopulation von HEL-Zellen gegen die Konzentration des Konkretors NPY, $[L] = 30 \text{ nM}$. Die Umrechnung in den zugehörigen K_i -Wert für NPY ergibt $0,72 \text{ nM}$, ein mit radiometrisch ermittelten Daten vergleichbarer Wert.

3.5.1.2 Auswertung der Messdaten in der Durchflusszytometrie

Für Daten, die mittels logarithmischer Verstärkung erhalten wurden, empfiehlt sich die Auswertung über das geometrische Mittel. Dieses berücksichtigt den Effekt der logarithmischen Transformation (s. 3.5.2) im Gegensatz zum arithmetischen Mittel. Überdies wird das geometrische Mittel durch Extremwerte weniger beeinflusst, so dass Messwerte über

mehrere Zehnerpotenzen wie im vorliegenden Fall besser statistisch erfasst werden. Das geometrische Mittel $\overline{y_G}$ berechnet sich wie folgt:

$$\overline{y_G} = \text{antilog} [1/n (\log y_1 + \log y_2 + \log y_3 + \dots + \log y_n)].$$

3.5.1.3 Färbung der HEL-Zellen mit Propidiumiodid

Da für die Auswertung der spezifischen Bindung von HEL-Zellen (vgl. 3.5.1) immer Gate G1 herangezogen wurde und die in Gate G2 befindlichen Zellen keine spezifische Bindung zeigten, wurde dieser Sachverhalt näher untersucht (Abb. 59).

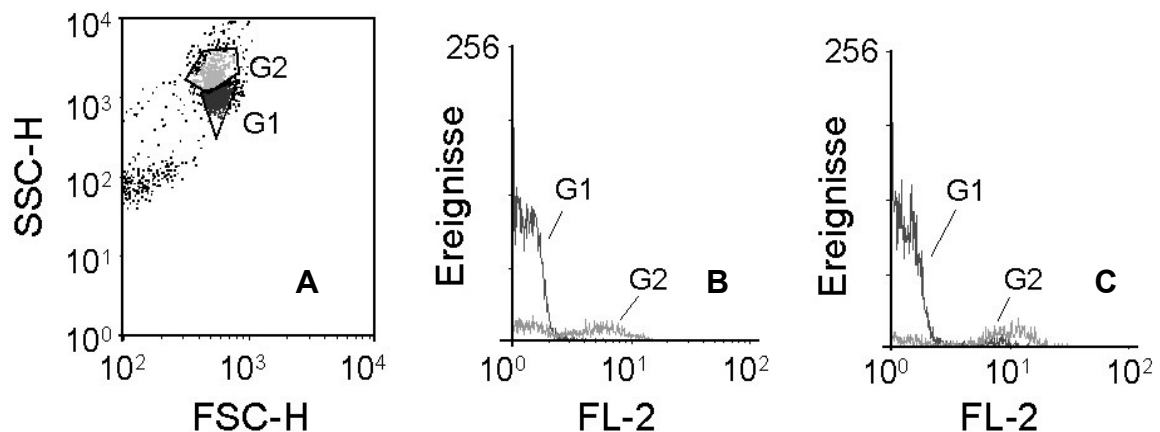


Abb. 59 A: Streulichtdiagramm (FSC-H = Vorwärtsstreuung, SSC-H = Seitwärtsstreuung) mit den Gates G1/G2 B: Histogramme der Fluoreszenz 2 aus G1 (dunkelgrau) und G2 (hellgrau) der Negativkontrolle C: Histogramme der Fluoreszenz 2 aus G1 und G2 der Propidiumiodid-Färbung.

Zellen mit intakter äußerer Membran (nicht notwendigerweise lebende Zellen) werden von Propidiumiodid nicht angefärbt. Wenn die Zellmembran jedoch beschädigt ist, gelangt der kationische Farbstoff in die Zelle und die Interkalation zwischen die DNA führt zu einer drastischen Erhöhung der Fluoreszenz. Die in G1 befindlichen Zellen zeigen praktisch keine Anfärbung mit Propidiumiodid. Die Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid ergab für Gate G2 jedoch eine etwas stärkere Fluoreszenz in Kanal 2, in dem dieser Farbstoff detektiert wird, gegenüber der Kontrolle (Autofluoreszenz der Zellen).

Wahrscheinlich handelt es sich bei der in Gate 2 erfassten Subpopulation um Zellen mit beschädigter Zellmembran, welche die unspezifische Bindung des fluoreszenten Liganden 1, die bei der Untersuchung der spezifischen Bindung beobachtet wurde, verursacht. Man kann darüber spekulieren, ob es in diesem Stadium der Zellauflösung zu einem Abbau der Rezeptoren kommt. Für apoptotische Zellen ist eine Abnahme der Vorwärtsstreuung und eine Zunahme der Seitwärtsstreuung gegenüber intakten Zellen mehrfach dokumentiert (z. B. Darzyn-

kiewicz et al., 1997). Die Chromatinkondensation erhöht den Brechungsindex, während die Schrumpfung der Zellen zu einer Abnahme der Vorwärtsstreuung führt.

3.5.1.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante von [³H]-Propionyl-NPY und der Y₁-Rezeptordichte von HEL-Zellen

Für die vergleichenden Radioligandbindungsexperimente sowie die Ermittlung der Bindungskonstante des fluoreszenten Liganden war die Bestimmung der Dissoziationskonstante des [³H]-Propionyl-NPY an den HEL-Zellen erforderlich. Von der Optimierung des Ca²⁺-Assays (Gebele, 1998) war bekannt, dass die Kulturdichte für die Funktionalität des Rezeptors entscheidend ist. Deswegen lag die Vermutung nahe, dass auch die Rezeptordichte mit der Zellkonzentration in Kultur korreliert.

Für Zellen, die am Vortag mit frischem Medium verdünnt wurden (<100000 Zellen/ml), ergab sich eine Gesamtmenge des Rezeptorproteins B_{max} = (64,4 ± 33,5) fmol/10⁶ Zellen, entsprechend 18611-59000 Rezeptoren/Zelle (Abb. 60 A).

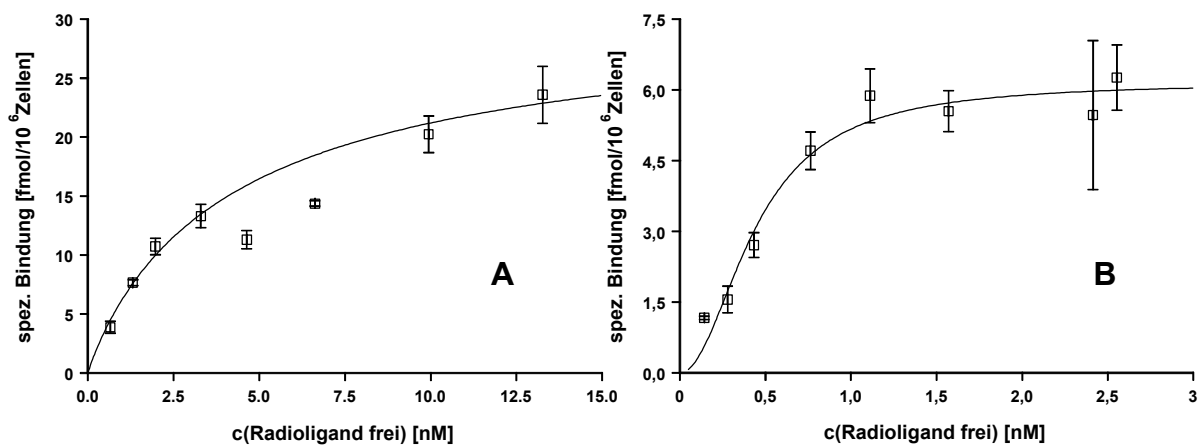


Abb. 60: Repräsentative Sättigungsexperimente der Y₁-Rezeptorbindung von [³H]-Propionyl-NPY an HEL-Zellen. A: Kulturdichte <100000 Zellen/ml, B: Kulturdichte >500000 Zellen/ml.

Als K_d-Wert für [³H]-NPY ergab sich ein Wert von (3,98 ± 0,65) nM (n = 12; 4 unabhängige Versuche). Bei einer Konzentration von > 500000 Zellen/ml in der Kultur ergab sich ein B_{max} von 6,2 fmol/10⁶ Zellen, dies entspricht durchschnittlich 3714 Rezeptoren/Zelle (< 20 % des Maximalwertes, Abb. 60 B). Durchflusszytometrische Untersuchungen an HEL-Zellen zeigten eine um ca. 30 % höhere Rezeptorexpression der nach Zugabe frischen Mediums am Vortag. Der Anteil der Y₁-positiven Zellen von der gesamten Population war nur wenig (≈ 15 %) größer als der von HEL-Zellen in hoher Kulturdichte.

Feth et al., 1992, fanden für Y₁-Rezeptoren an HEL-Zellen einen B_{max}-Wert von (73 ± 18,8) fmol/10⁶ Zellen (entsprechend durchschnittlich 44000 Rezeptoren pro Zelle und einen K_D-Wert von (3,9 ± 1,0) nM für [¹²⁵I]-NPY. Keffel et al., 1999, berichten von einer Stimulation der sogenannten ERK (extracellular signal-regulated kinases) durch NPY an HEL-Zellen.

ERK vermitteln Zellwachstum. Zukowska et al., 1993, beobachteten ebenfalls einen mitogenen Effekt von NPY an glatten Gefäßmuskelzellen, der v.a. über induzierbare Y_1 - und Y_2 -Rezeptoren vermittelt sein soll. Für die Induktion sollen dabei neben NPY selbst vermutlich andere Wachstumsfaktoren verantwortlich sein. Ob ein Zusammenhang zwischen Y_1 -Rezeptorexpression und Wachstumsstimulation besteht, wurde für die HEL-Zellen nicht untersucht.

3.5.1.5 Assoziationskinetik und Sättigungsexperimente

Da die Assoziationskinetik von Tracerliganden für NPY-Rezeptoren an HEL-Zellen im Gegensatz zu den übrigen Zelllinien noch nicht genauer untersucht worden und die Menge an verfügbarem fluoreszenten Liganden **1** aber begrenzt war, wurde für diese Untersuchungen der Radioligand [3 H]-Propionyl-NPY verwendet. Der Verlauf für den Radioliganden zeigt, dass spätestens nach 90 min fast keine weitere Änderung der totalen und unspezifischen Bindung erfolgt (Abb. 61).

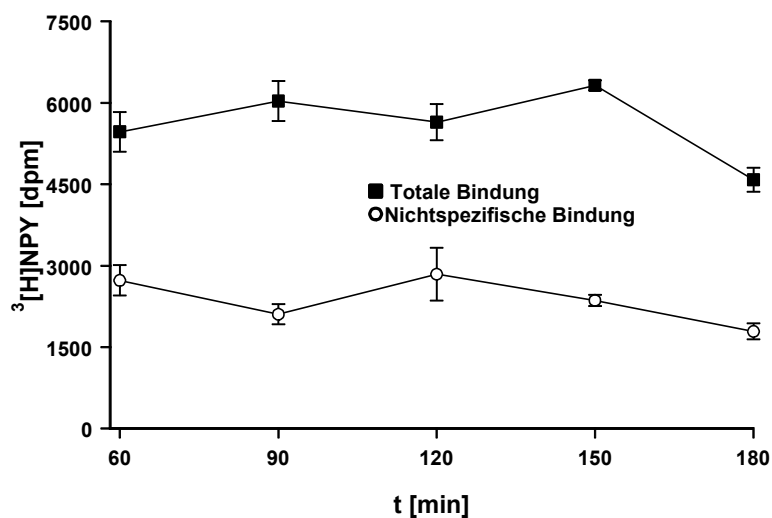


Abb. 61: Kinetik der totalen und der unspezifischen Bindung von [3 H]-Propionyl-NPY (0,2 nM) an HEL-Zellen ($1,5 \times 10^6$ Zellen/Probe) bei RT; $n = 3$, $MW \pm SEM$.

Erst nach ca. 150 min tritt eine Dissoziation ein. Feth et al., 1992, fanden eine Inkubationsdauer von 90 min an HEL-Zellen mit [125 I]-NPY am günstigsten. In der Folge wurden daher ebenfalls Inkubationszeiten von 60-90 min gewählt.

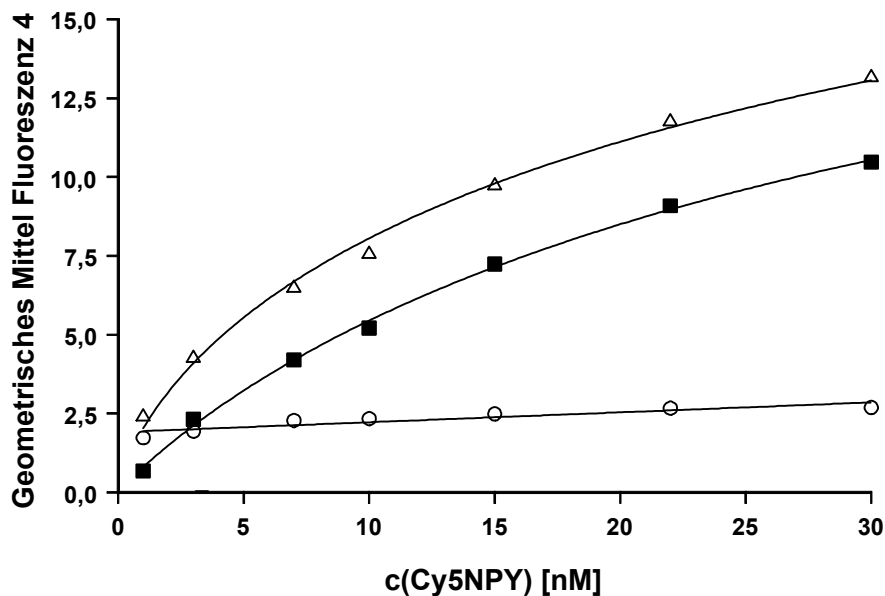


Abb. 62: Sättigungskurven für die Bindung von Cy5-NPY 1 an HEL-Zellen (Y_1 -Rezeptoren), durchflusszytometrisch ermittelt: **D** Totale, **■** spezifische (als Differenz von totaler und unspezifischer Fluoreszenz berechnet) und **O** unspezifische Bindung als zellgebundene Fluoreszenz gegen totale Konzentration von 1 aufgetragen (Gate gesetzt, Auswertung über das geometrische Mittel), Inkubationskonzentration 30 nM, mit Waschschrift, $n = 1$.

Die Sättigbarkeit ist eine notwendige Bedingung für spezifische Bindung (Abb. 62). Sie ist für den fluoreszenten Liganden an HEL-Zellen erfüllt. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, dass die unspezifische Bindung kaum ansteigt. Dies mag an den beiden hydrophilen Sulfonsäuregruppen des Fluorophors **G** liegen. Ab einer Konzentration des Cy5-NPY 1 von ca. 10 nM ist die Forderung erfüllt, dass die unspezifische Bindung < 30 % der totalen Bindung betragen sollte. Wenn man davon ausgeht, dass die totale Konzentration etwa der freien Konzentration des markierten Liganden entspricht ($[\text{Cy5-NPY}] = 30 \text{ nM}$, Rezeptorkonzentration $\ll 1 \text{ nM}$ für $1 \cdot 10^6$ HEL-Zellen/ml), so erhält man einen K_D -Wert von $(32,6 \pm 13,9) \text{ nM}$ (s. Gleichung I, Abschnitt 1.1.1). Dieser Wert liegt höher als der apparente K_i -Wert, der gegen den Radioliganden ermittelt wurde. Letzterer Wert ist jedoch mit dem Fehler des wiederum für diesen Radioliganden bestimmten K_D -wertes behaftet. Eine weitere Unsicherheit stellt außerdem die Konzentrationsbestimmung des fluoreszenten Liganden vor den Versuchen dar (s. experimenteller Teil).

3.5.1.6 Bestimmung von Bindungsdaten unter Gleichgewichtsbedingungen

Eine Bestimmung von Rezeptorbindungsgleichgewichten unter homogenen Bedingungen, d. h. direkt aus dem Inkubationsansatz, macht – sofern dies möglich ist - eine Trennung von Ligandrezeptorkomplex und freiem, überschüssigen Ligand entbehrlich. Mit der Trennung verbundene Probleme, wie physikalischer Verlust und Dissoziation des Ligandrezeptorkomplexes werden somit vermieden und die Testung vereinfacht. Abb. 63 A, nächste Seite, zeigt die mit einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt ermittelten Kurven für die Verdrängung von Cy5-NPY mit BIBP 3226 **13** und den von Hutzler, 2001, synthetisierten Arginina-miden **24** und **25** (s. Tabelle 12). Abb. 63 B zeigt die unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelten Kompetitionskurven. Die zuerst gewählten Parameter (vgl. Abb. 63, Experiment A mit $[L]=30$ nM, Inkubationsdauer ≈ 60 min, 5-7 min Zentrifugation bei 200g und RT, Resuspendierung der Proben unmittelbar vor der Messung in 4°C kaltem Bindungspuffer II, um eine Dissoziation des fluoreszenten Liganden zu verhindern), wurden für die Bestimmung unter Gleichgewichtsbedingungen geändert: Experiment B $[L]=10$ nM, Inkubationsdauer ≈ 90 min. Die unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelten K_i -Werte sind gegenüber denen mit zusätzlichem Zentrifugationsschritt erhaltenen Werten niedriger (Tabelle 12). Hulme und Birdsall, 1992, gehen davon aus, dass bei Zentrifugationsbindungsassays, bei welchen das Pellet nur oberflächlich gewaschen wird, das Bindungsgleichgewicht nicht gestört wird. Das Pellet wurde aber bei den Versuchen in der Durchflusszytometrie mit zusätzlichem Zentrifugationsschritt unmittelbar vor der Messung in zu 4°C temperiertem Puffer resuspendiert. Deswegen ist davon auszugehen, dass nicht nur unspezifisch gebundener, sondern auch spezifisch gebundener markierter Ligand gewegewaschen wird. Die unspezifische Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen ist nämlich höher als mit Zentrifugationsschritt, was vermutlich auf die den Zellen anhaftende Solvatationshülle zurückzuführen ist. Nach Hulme und Birdsall, 1992, kann das Nichterreichen des Bindungsgleichgewichts kompetitive Experimente insofern stören, als dass es zu Fehlern in der Bestimmung von Bindungskonstanten kommt. Je nachdem, ob die Assoziations- und Dissoziationskinetik des markierten Liganden bzw. Kompetitors der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, ist eine Über- oder Unterschätzung der Affinität der Testsubstanz die Folge.

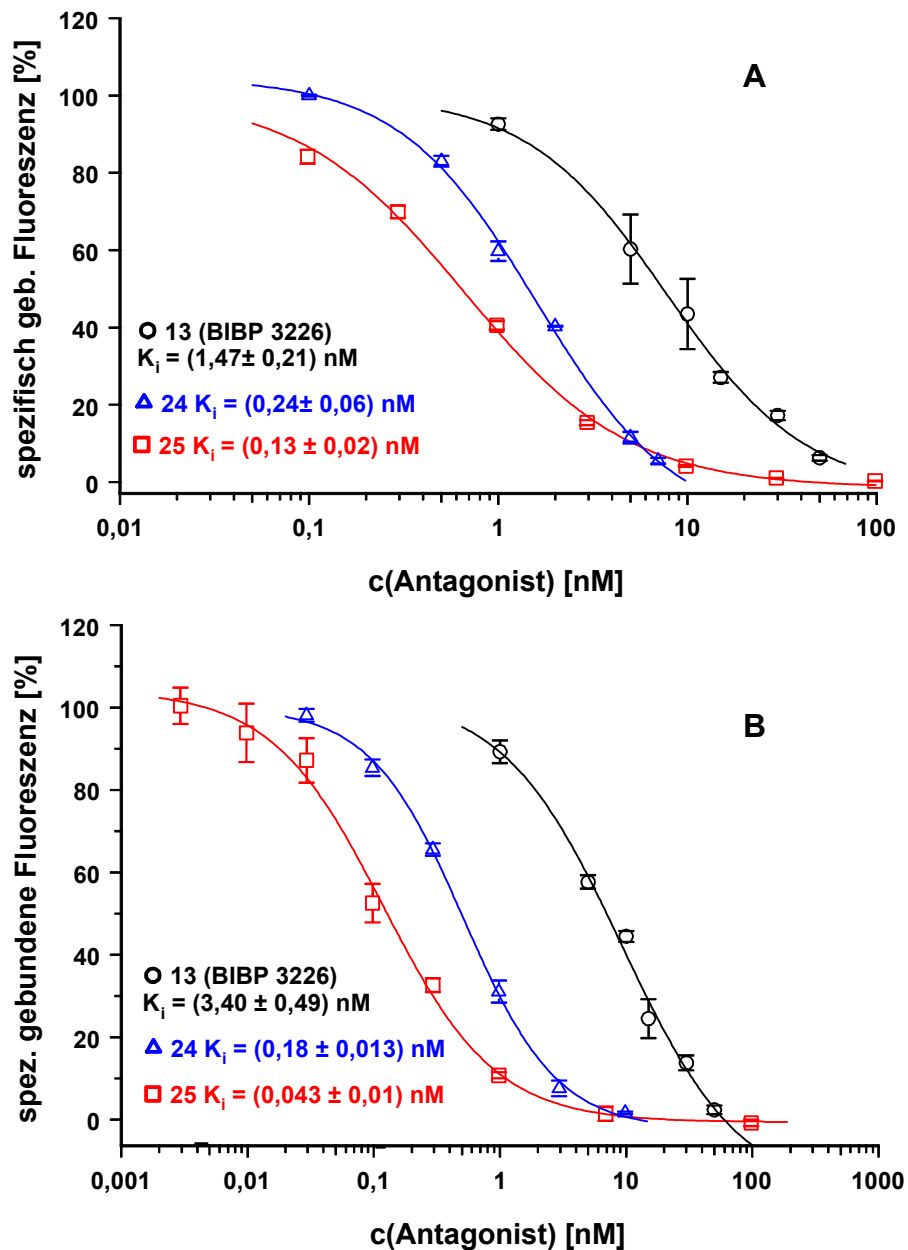


Abb. 63 Bestimmung von Bindungsdaten mit der Durchflusszytometrie: Verdrängung von Cy5-NPY 1 aus der Rezeptorbindung an HEL-Zellen A: Mit zusätzlichem Zentrifugationsschritt bestimmte Kompetitionskurven der Argininamide 25, 24 und 13 (BIBP 3226) gegen Cy5-NPY 1, $[L] = 30$ nM und B: homogen (unter Gleichgewichtsbedingungen ohne Zentrifugation/Waschschritte) bestimmt, $[L] = 10$ nM; jeweils $n = 6-9$, $MW \pm SEM$; jeweils mindestens 2 unabhängige Versuche.

Im Vergleich zu den im herkömmlichen Radioligandbindungstest an SK-N-MC-Zellen von Kracht (Inkubationszeit 150 min; Kracht, 2001) ermittelten K_i -Werte sind die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Affinitäten der Argininamide (vgl. die funktionellen Daten in Tabelle 14) deutlich niedriger. Dies liegt wahrscheinlich zum einen an den unterschiedlichen Zelllinien (SK-N-MC- vs. HEL-Zellen), zum anderen an der kürzeren Inkubationszeit der langsam assoziierenden Verbindungen im durchflusszytometrischen Test.

3.5.2 Vergleich der unterschiedlichen Messbedingungen und der fluoreszenten NPY-Derivate

Um die spezifische Bindung der fluoreszenten Liganden ermitteln zu können, wurde die Spannung des PMT variiert. Der Vergleich unterschiedlicher PMT-Spannungen für den Kanal 4 lieferte vergleichbare Bindungskonstanten für pNPY gegen Cy5-NPY **1** am Y_1 -Rezeptor: ($K_i = 0,93 \pm 0,19$ nM bei 426 V und $1,55 \pm 0,43$ nM bei 600 V). Im Folgenden wurden 500 V gewählt, da diese Spannung ausreicht, die Fluoreszenzverteilung der Probe für die unspezifische Bindung (Zellen + 30 nM Cy5-NPY **1** + 2 μ M NPY) vollständig aufzunehmen. Für quantitative Bestimmungen wird ein linearer Detektormodus empfohlen. Abb. 64 zeigt die Unterschiede zwischen linearer und logarithmischer Verstärkung.

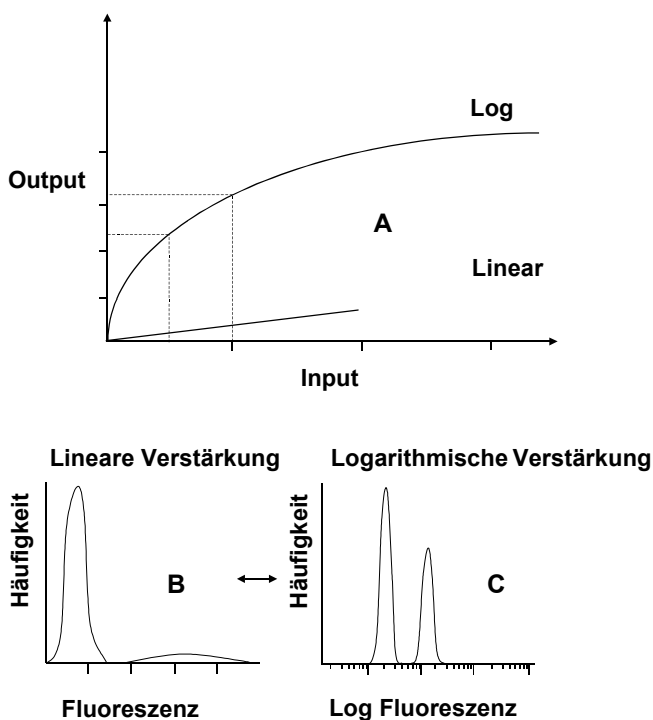


Abb. 64: **A**: Vergleich zwischen linearer und logarithmischer Detektorverstärkung am Durchflusszytometer. Die Abbildungen **B** und **C** zeigen die Histogramme von ein und derselben Zellpopulation bei linearer Verstärkung **B** (ermöglicht nur einen engen Messbereich) und bei logarithmischem Detektormodus **C**. Durch die logarithmische Transformation entsteht eine engere Verteilung des Fluoreszenzsignals.

Dies war aber, wie sich herausstellte, für die Bestimmung von Bindungskonstanten im vorliegenden Fall nicht möglich. Der lineare Messbereich erwies sich als zu eng.

Auch andere NPY-Rezeptorliganden wurden am Durchflusszytometer untersucht (Abb. 65 und 66). Man kann für das Carboxyfluorescein-NPY **5** einen sehr kleinen Unterschied zwischen totaler und unspezifischer Bindung im Falle der mit Gate (s. auch Abb. 91) ausgewerteten Probe von HEL-Zellen (Y_1 -Rezeptor) aber auch der Y_5 -transfizierten HEC-1B-Zellen erkennen.

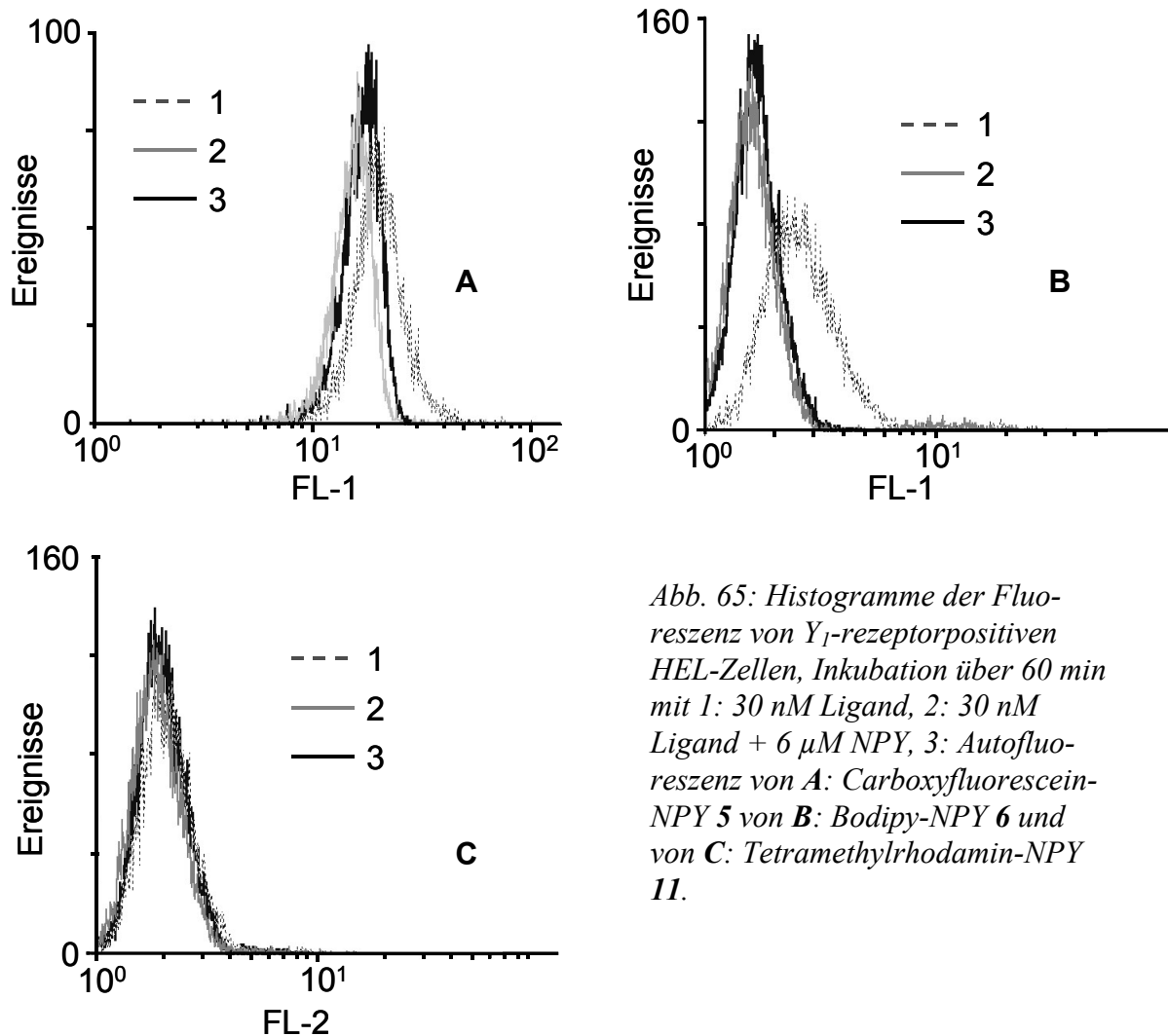


Abb. 65: Histogramme der Fluoreszenz von Y_1 -rezeptorpositiven HEL-Zellen, Inkubation über 60 min mit 1: 30 nM Ligand, 2: 30 nM Ligand + 6 μ M NPY, 3: Autofluoreszenz von **A**: Carboxyfluorescein-NPY 5 von **B**: Bodipy-NPY 6 und von **C**: Tetramethylrhodamin-NPY 11.

Dieser Unterschied ist für das Bodipy-Derivat **6** bereits deutlicher als für **5**, aber noch unzureichend für die Bestimmung von Bindungsgleichgewichten (Abb. 65 B). Heithier et al., 1994, haben an transfizierten Sf9-Zellen (ca. $2-3,5 \cdot 10^5$ β_2 -Rezeptoren pro Zelle) einen deutlicheren Unterschied zwischen totaler und unspezifischer Bindung für einen BodipyFL-markierten β -Adrenozeptorliganden erzielt. Der Fluorescein-Ligand erwies sich bei den Untersuchungen von Heithier et al., 1994, ebenso als weniger günstig wie **5** an HEL-Zellen im Fall der vorliegenden Arbeit, die durchschnittlich nur etwa 40000 Rezeptoren/Zelle exprimieren (Abb. 65; s. a. Abschnitt 3.5.2.3). Dennoch war eine spezifische Bindung (S. 80) auch an den Y_5 -transfizierten HEC-1B-Zellen für das Carboxyfluorescein-NPY **5** kaum bestimmbar (Abb. 66). Tota et al., 1994, haben an transfizierten Sf9-Zellen die Bindung mit Carboxyfluorescein-markierter Substanz P am Durchflusszytometer untersucht, dabei war die spezifische Bindung etwas besser zu bestimmen. Für das Tetramethylrhodamin-markierte NPY **11** konnte keine spezifische Bindung ermittelt werden (Abb. 65 C), obwohl der Ca^{2+} -Assay die Aktivierung

des Y_1 -Rezeptors durch dieses Derivat belegt. Eine Erklärung könnte die niedrige Anregungseffizienz des Fluorophors **F** von **11** bei 488 nm oder ein Quenchen am Rezeptor sein.

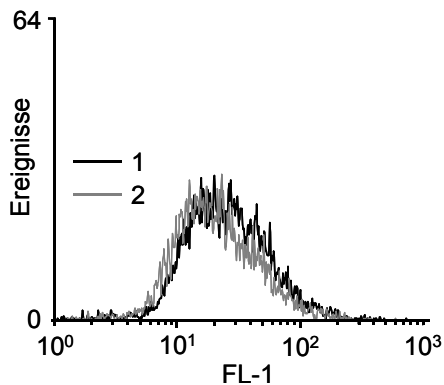


Abb. 66: Histogramm der Fluoreszenz im Kanal 1 von Y_5 -transfizierten HEC-1B-Zellen: mit 30 nM Carboxyfluorescein-NPY 5 inkubiert (1, totale Bindung) und zusätzlich einem 200-fachen Überschuss an NPY inkubiert (2, unspezifische Bindung); die Zellen wurden mit Gate ausgewertet, Inkubation über 60 min.

Während die Bindungsexperimente an vitalen Zellen durchgeführt wurden (s. auch 3.5.2.2) kommt es bei Fixierung zum Absterben der Zellen. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob eine Fixierung der Zellen mit Formaldehyd nach der Inkubation mit Cy5-NPY **1** ebenfalls die Bestimmung spezifischer Bindung (S. 78) zulässt. Dies war tatsächlich der Fall. Offenbar kommt es nicht zu einer Dissoziation des Liganden vom Rezeptor während der Fixierung oder zu störenden Reaktionen des Fluorophors mit dem Fixativ (Histogramme nicht gezeigt).

3.5.3 Bestimmung von Bindungsdaten an Y_2 -Rezeptor-transfizierten SMS-KAN-Zellen

Der Versuch, an intakten Y_2 -Rezeptor exprimierenden Zellen ebenfalls spezifisch gebundenes Cy5-markiertes NPY 1 fluorimetrisch zu bestimmen, gestaltete sich schwierig (Abb. 67).

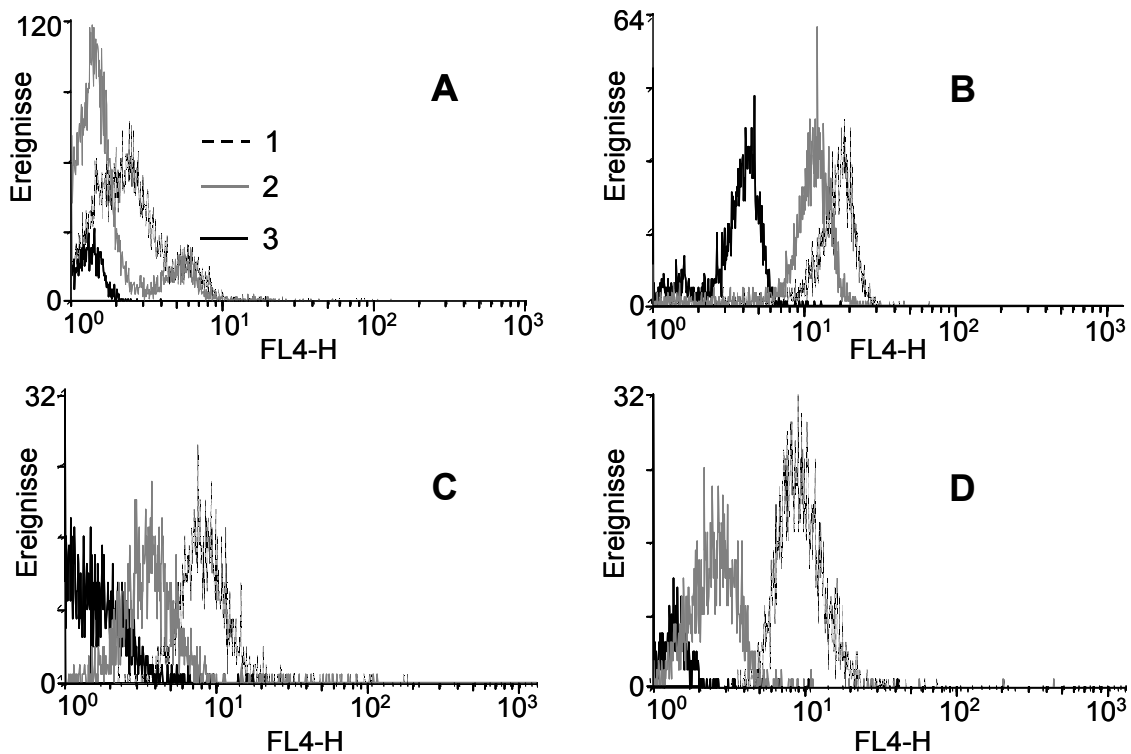


Abb. 67: Histogramme jeweiliger Gates von **A**: LN 319-Zellen **B**: BHK hY_2C -Zellen **C**: SMS-KAN-Zellen (Wildtyp) **D**: Y_2 -transfizierte SMS-KAN-Zellen mit 1: $30 \mu M$ Cy5-NPY 1, 2: $30 \mu M$ Cy5-NPY 1 + $6 \mu M$ NPY und 3: Autofluoreszenz.

Für die radiometrische Testung der NPY Y_2 -Rezeptorbindung werden wegen unzureichender Rezeptordichte Membranen von SMS-KAN-Zellen eingesetzt. Die Radioligandbindung ergab für Y_2 -transfizierte BHK-Zellen, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Beck-Sickinger, Universität Leipzig, gestellt wurden, eine totale Bindung von (755 ± 320) dpm gegenüber der unspezifischen Bindung von $(421 \pm 75,1)$ dpm ($n = 9$; 3 unabhängige Versuche). Die Untersuchung mit der Durchflusszytometrie für diese Zellen ergab ebenfalls kaum eine spezifische Bindung, da die unspezifische Bindung relativ hoch war (Abb. 67 B).

Eine durch Forskolin stimulierte cAMP-Bildung, die Voraussetzung für einen funktionellen Test wäre, konnte an diesen Zellen nicht beobachtet werden (Abb. 68).

Auch bei den LN 319-Astrozytomzellen war weder radiometrisch noch fluorimetrisch eine ausreichende spezifische Bindung nachweisbar. Die Y_2 -transfizierten SMS-KAN-Zellen (Moser, 1999) ermöglichten schließlich eine fluorimetrische Bestimmung von Bindungskonstanten. Dies war allerdings nicht unter Gleichgewichtsbedingungen möglich, da der zur Verfügung stehende Messbereich relativ klein ist.

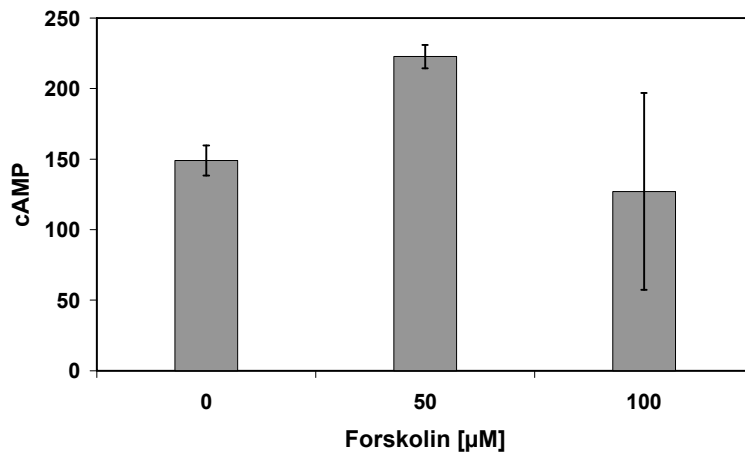


Abb. 68: Stimulation der cAMP-Bildung in hY_2 -transfizierten BHK-Zellen durch Forskolin: Es ist keine Konzentrationsabhängigkeit der cAMP-Bildung festzustellen.

Das Gate musste relativ eng gesetzt werden, da nur 7-15 % der gesamten Zellen ausreichende Rezeptordichte aufweisen (Abb. 69). Dementsprechend wurde die vermessene Zellzahl auf 100.000 pro Probe erhöht.

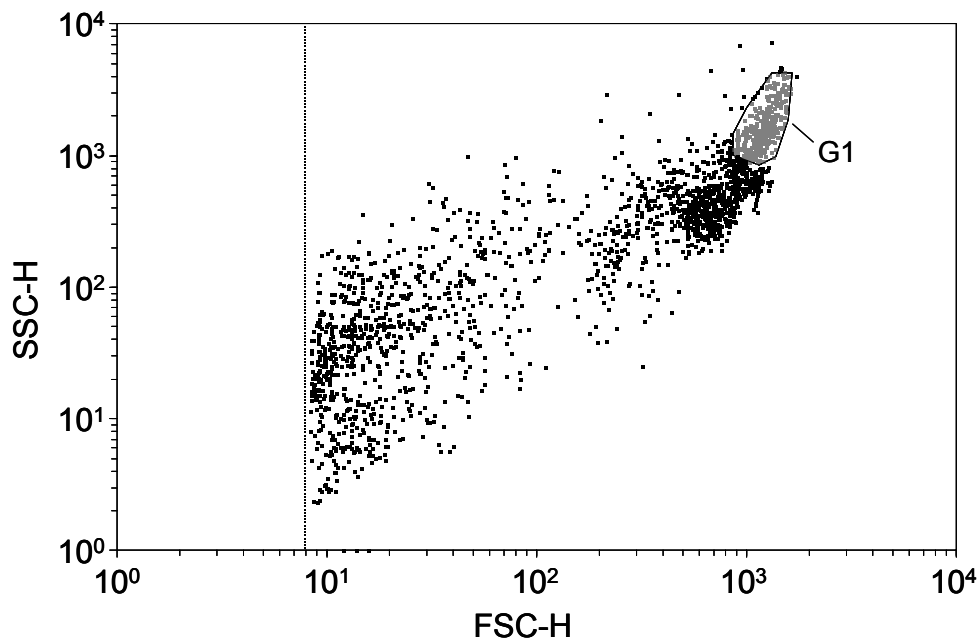


Abb. 69: Streulichtdiagramm der Y_2 -transfizierten SMS-KAN-Zellen mit Schwellenwert für die Vorwärtsstreuung, die grau dargestellten Zellen in G1 wurden für die Bestimmung der Affinität ausgewählt.

Im Vergleich zum Wildtyp war an den Y_2 -transfizierten SMS-KAN-Zellen eine nur unwesentlich stärkere Expression des Rezeptors zu beobachten, was mit den Ergebnissen von Moser übereinstimmt. Eine Sortierung der stark exprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie und anschließende Selektion der Population wäre für die Routine daher sinnvoll, für eine Automatisierung unbedingt notwendig.

Abb. 70 zeigt die Fluoreszenzverteilungen der Subpopulation von SMS-KAN-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des selektiven NPY Y_2 -Antagonisten BIIE 0246, **26** (s. auch Tabelle 12).

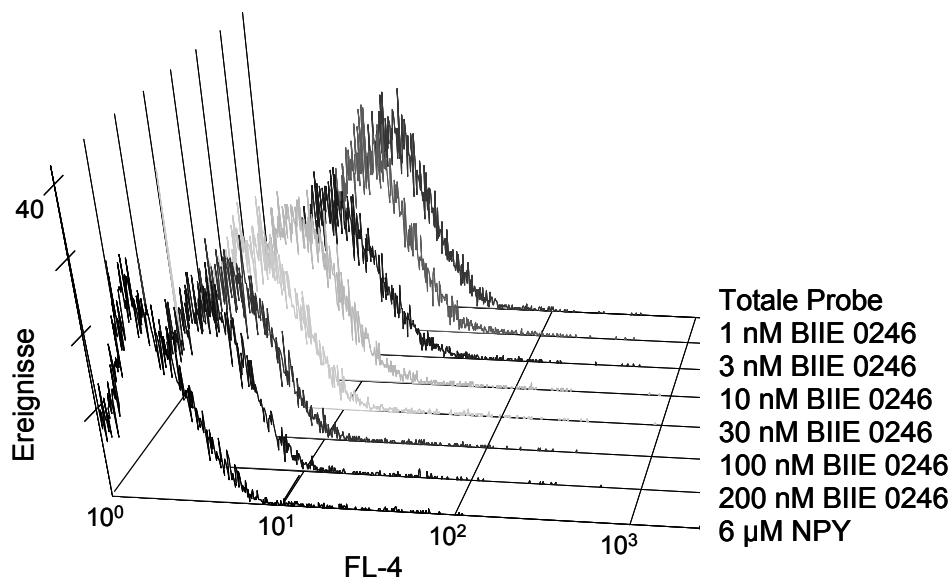


Abb. 70: Verschiebung der Fluoreszenzverteilungen der Subpopulation von Y_2 -transfizierten SMS-KAN-Zellen, die spezifische Bindung zeigen, Skalierung der Fluoreszenz über 4 Dekaden.

Im Vergleich zur Radioligandbindung erweist sich diese Methodik als vorteilhaft, da sie ohne die Präparation von Zellmembranen auskommt und die Trennung von freiem und ungebundenem Liganden bei der Radioligandbindung an Membranen Probleme bereitet.

Abb. 71 zeigt die Kompetitionskurve für BIIE 0246, Substanz **26**.

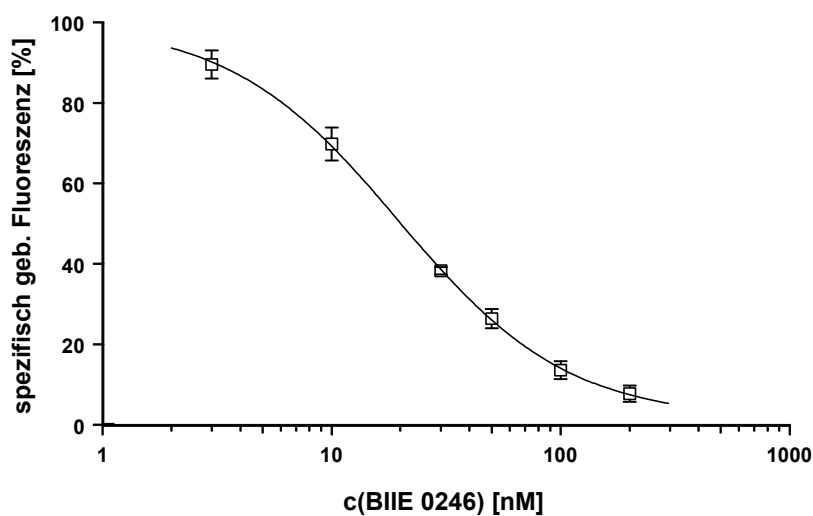


Abb. 71: Konkurrenzexperiment an intakten Y_2 -transfizierten SMS-KAN-Zellen gegen Cy5-NPY **1** ($n=6$, $MW \pm SEM$, 2 unabhängige Versuche).

3.5.4 Kompetitive Bindung an Y_5 -Rezeptor-transfizierten HEC-1B-Zellen

Die Y_5 -Rezeptor-transfizierten HEC-1B-Zellen besitzen, wie von Frau Moser bestimmt, durchschnittlich 10^6 Rezeptoren/Zelle (Moser, 1999). Diese Zellen wurden ebenfalls durchflusszytometrisch mit Cy5-NPY 1 untersucht (Abb. 72).

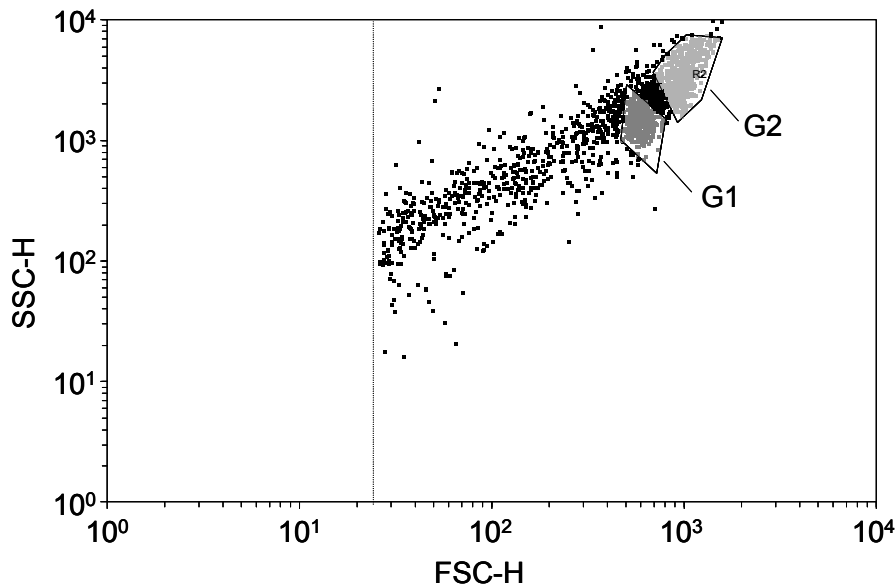


Abb. 72: Streulichtdiagramm der HEC-1B-Y5-Zellen mit Schwellenwert für die Vorwärtsstreuung, die Zellen beider Gates wurden für die Auswertung herangezogen.

Die Zellen beider in Abb. 72 dargestellten Gates ermöglichten die Bestimmung von spezifischer Bindung des Cy5-NPY 1. Dementsprechend liegt das geometrische Mittel der spezifisch gebundenen Fluoreszenz etwa bei 80. Zum Vergleich: bei HEL-Zellen liegt dieses unter homogenen Bedingungen bei ca. 8. Vermutlich treten bei dieser Zelllinie trotz der Verwendung eines speziellen Puffers, der die Zellaggregatbildung verhindern sollte, Zelldupletten auf, wie auch in Abb. 73 ersichtlich.

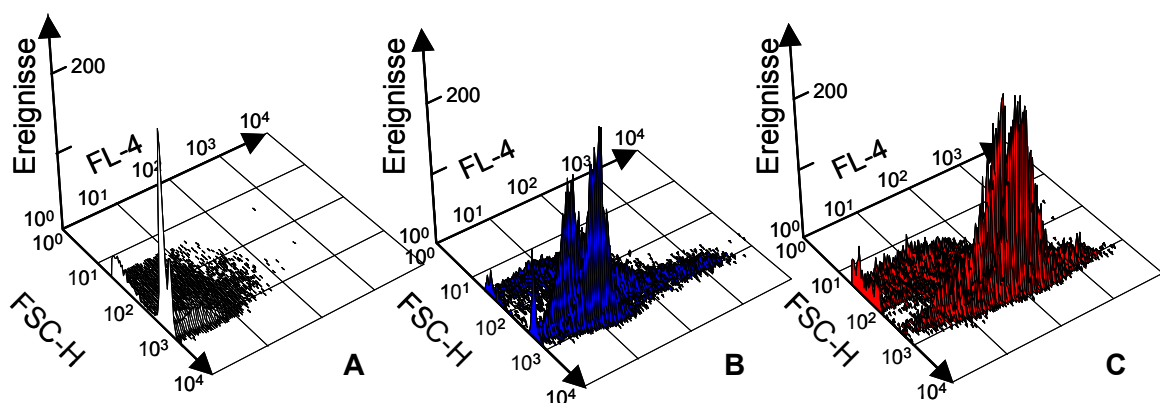


Abb. 73: An Y_5 -transfizierten HEC-1B-Zellen gemessene Fluoreszenz. A: Autofluoreszenz (Kontrolle) B: Unspezifische Bindung (30 nM Cy5-NPY 1 + 6 μ M NPY). C: Totale Bindung (30 nM Cy5-NPY 1); die Peaks in B und C deuten auf einzelne Zellen und Zellaggregate hin.

Die Auswertung beider „Punktwolken“ über Gates (Abb. 72) ergab aber vergleichbare Bindungskonstanten in den Konkurrenzexperimenten (Abb. 74 A).

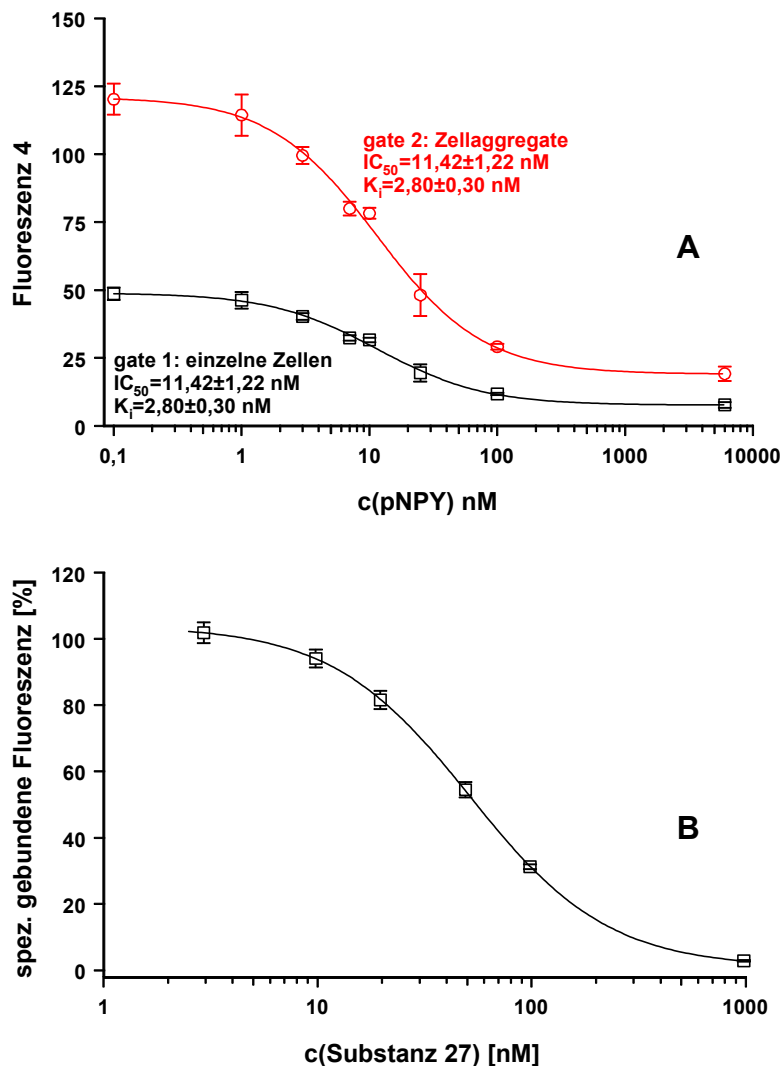


Abb. 74: Konkurrenzexperimente an Y_5 -transfizierten HEC-1B-Zellen gegen Cy5-NPY 1 für **A**: pNPY mit Auswertung aus beiden Gates, geometrisches Mittel der Fluoreszenz 4 gegen Konkurrentkonzentration mit $[L] = 30$ nM; **B**: homogenes Konkurrenzexperiment für das Chinazolin-Derivat 27 (s. Tabelle 11) mit $[L] = 10$ nM; $n = 3$, $MW \pm SEM$.

Abb. 74 B zeigt die Konkurrenzkurve für den Y_5 -Antagonisten 27 gegen Cy5-NPY 1 (Tabelle 12). Die Zellkonzentration wurde gegenüber dem Test an HEL-Zellen auf $0,5 \cdot 10^6$ Zellen pro ml gesenkt (Rezeptorkonzentration knapp 1 nM), um die Aggregation zu verhindern. Diese Konzentration erfüllt außerdem die Forderung, dass weniger als 10 % des eingesetzten Liganden gebunden werden sollte, um für die Auswertung der Bindungsdaten die frei im Gleichgewicht vorliegende Konzentration des markierten Liganden mit der insgesamt eingesetzten Konzentration gleichsetzen zu können (Hulme und Birdsall, 1992). Für Experimente unter Gleichgewichtsbedingungen betrug die Inkubationskonzentration von 1 10 nM.

Um mögliche störende Einflüsse durch Internalisation des fluoreszenten Agonisten **1** während der Inkubation zu verhindern, wurde **1** erst nach Pipettieren aller übrigen Komponenten zugesetzt.

3.5.5 Untersuchungen zur NPY-Rezeptorexpression weiterer Zelllinien

Da für Kolonkarzinom-Zelllinien wie HT-29 (Mannon et al., 1994) und Col-6 (Cox und Tough, 1995) eine Expression von Neuropeptid Y_1 -Rezeptoren beschrieben wurde, wurden auch die kolorektalen CaCo-2 Adenokarzinom-Zellen in der Durchflusszytometrie mit Ligand **1** untersucht. Eine spezifische Bindung war jedoch nicht nachweisbar (Abb. 75 A).

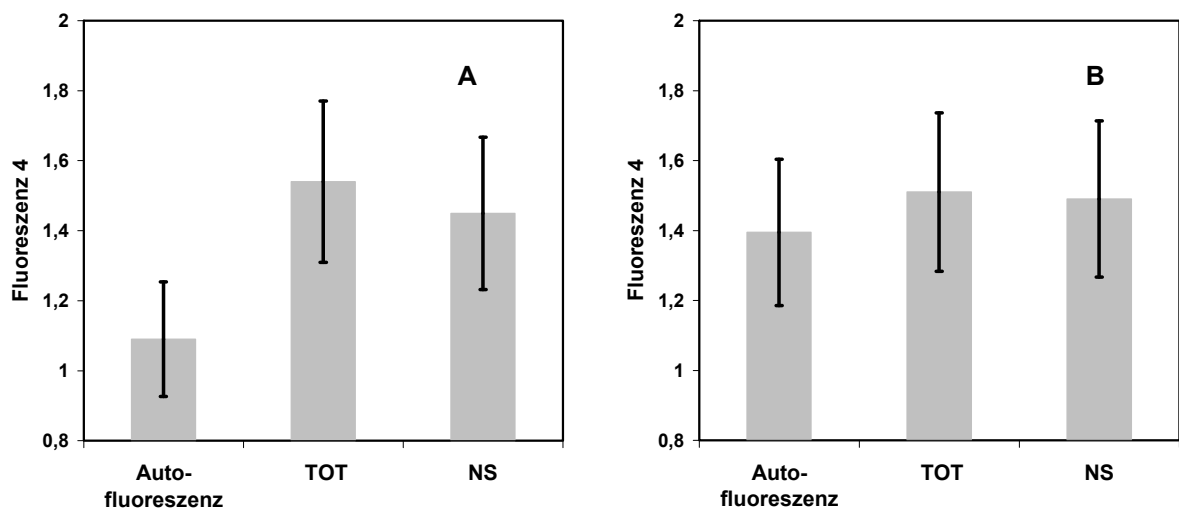


Abb. 75: Zellgebundene Fluoreszenz im Kanal 4 des Durchflusszytometers: Kein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzintensität im Kanal 4 ($MW \pm SEM$ des geometrischen Mittels) der totalen Proben (30 nM Cy5-NPY) und der unspezifischen Proben (zusätzlich 6 μM pNPY) bei A: CaCo-2-Zellen B: mononukleäre Zellen aus peripherem Rattenblut, $n = 2$.

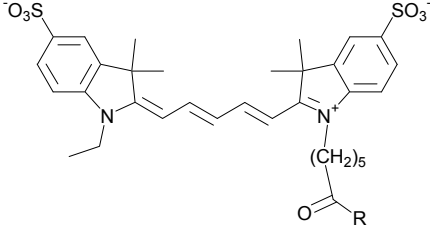
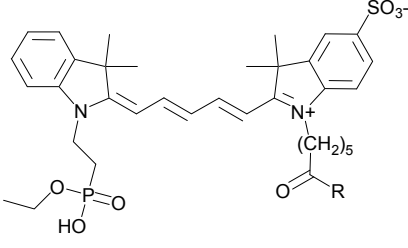
Für Col-24 Kolonkarzinomzellen wurde von Cox und Tough, 1995, jedoch auch eine Expression von Y_4 -Rezeptoren beschrieben, für die der fluoreszente NPY-Ligand **1** (Inkubationskonzentration 30 nM) möglicherweise keine ausreichende Affinität besitzt. Der K_i -Wert von NPY für den hY_4 -Rezeptor beträgt nach Lundell et al., 1996, knapp 10 nM, während PP eine Affinität im pikomolaren Bereich aufweist.

Mononukleäre Zellen aus peripherem Rattenblut, die von Herrn Bedoui (Med. Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt wurden, zeigten weder eine mit Cy5-NPY **1** nachweisbare Expression eines der 3 Rezeptorsubtypen Y_1 , Y_2 oder Y_5 (Abb. 75 B) noch einen durch NPY induzierten Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$.

3.5.6 Vergleich fluoreszenter Cyanin-Derivate von NPY

Der Vergleich der fluoreszenten NPY-Derivate Cy5-NPY **1** und Cy5-P-NPY **12** (Tabelle 11) zeigt die günstigeren spektralen Eigenschaften, wie höhere Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient für **1**. Radioligandbindungsexperimente ergaben eine höhere Affinität von **1** am Y_1 - und am Y_5 -Rezeptor (s. Tabelle 6 und Abb. 76).

Tabelle 11: Spektrale Charakteristika der Cyaninderivate von NPY.

Substanz	Φ	ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$]	Struktur des Cyanins
1 (Cy5-NPY)	0,33	250000	
12 (Cy5-P-NPY)	0,31	180000	

Der Ligand **1** hat am Y_1 -Rezeptor von HEL-Zellen einen K_i -Wert von 5,5 nM, während der K_i -Wert des Ligand **12** nur 41,38 nM beträgt. Möglicherweise führt die sperrige Phosphonestergruppe von **12** zu einer sterischen Hinderung bei der Bindung an den Rezeptor, oder die Fluorophor-Partialstruktur kann aufgrund des Ersatzes einer Sulfonsäuregruppe durch eine (neutrale) Esterfunktion nicht in der gleichen Weise mit einer „zusätzlichen Bindungsstelle“ in Interaktion treten.

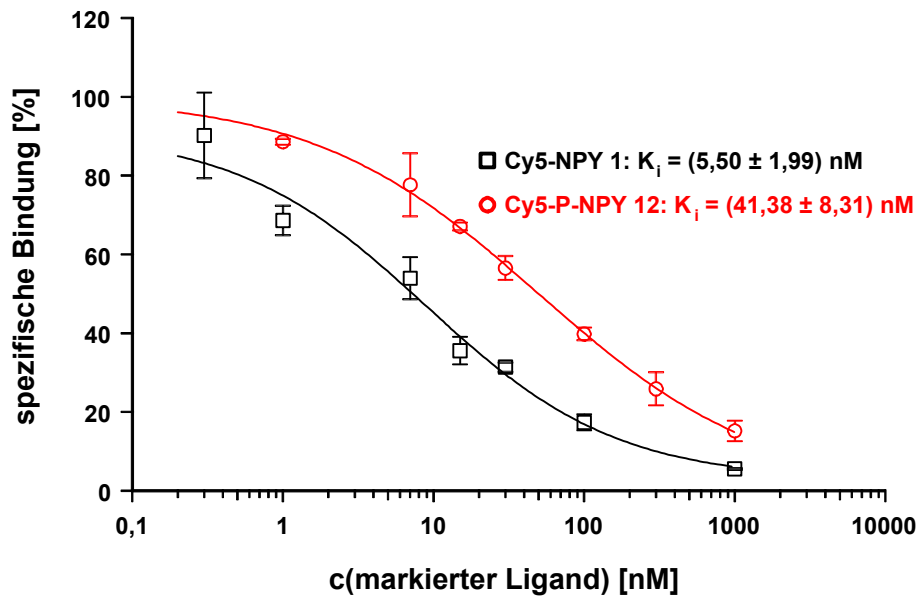


Abb. 76: Vergleich der Radioligandbindungsexperimente an HEL-Zellen: Verdrängung von [^3H]-Propionyl-NPY durch Cy5-NPY 1 und Cy5-P-NPY 12; $n = 3$, $MW \pm SEM$.

In der Folge wurden an HEL-Zellen Konkurrenzexperimente mit den Liganden 1 und 12 gegen pNPY am Durchflusszytometer durchgeführt (Abb. 77).

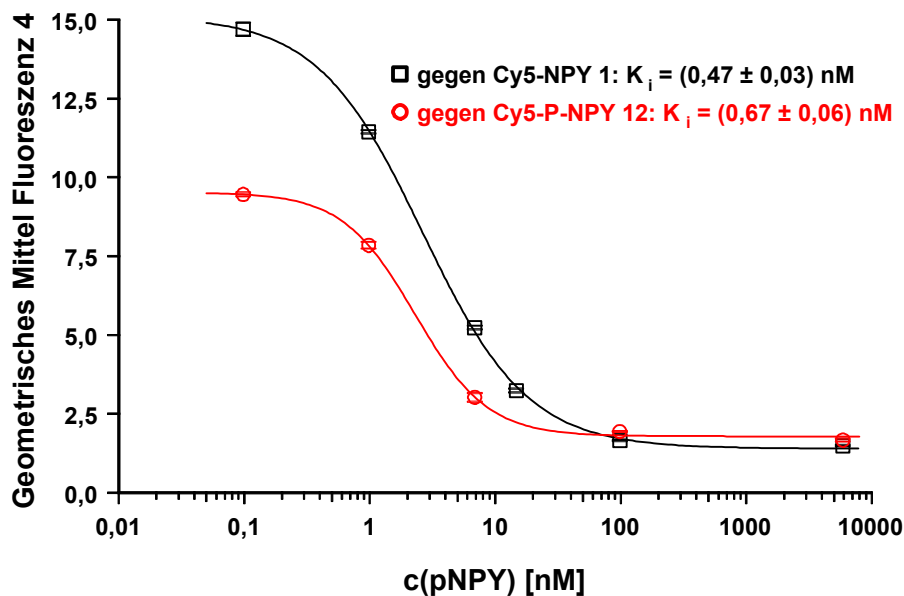


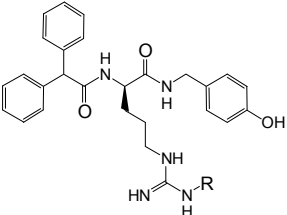
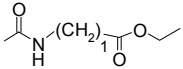
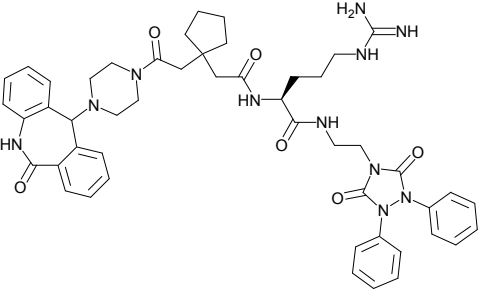
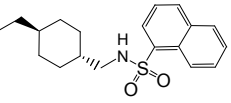
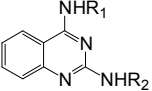
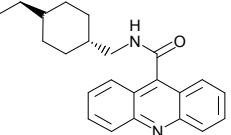

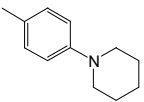
Abb. 77: Vergleich der fluoreszenten Liganden Cy5-pNPY 1 und Cy5-P-NPY 12 im Konkurrenzexperiment gegen pNPY: Geometrisches Mittel der Fluoreszenz 4 gegen Kompetitorkonzentration, Inkubationskonzentrationen von 1: 25 nM und von 12: 100 nM, jeweils $n = 3$, $MW \pm SEM$.

Dabei wurde 12 in einer Konzentration von 100 nM, Cy5-NPY 1 dagegen in einer Konzentration von 25 nM eingesetzt. Das Messfenster für das Phosphonsäureester-Derivat in dem Konkurrenzexperiment ist aufgrund der niedrigeren Affinität und der etwas höheren, unspezifischen Bindung sowie ungünstigeren spektralen Eigenschaften kleiner. Der an HEL-Zellen ermittelte K_i -Wert für pNPY stimmt dennoch gut überein:

($0,47 \pm 0,03$) nM gegen Cy5-NPY 1 bzw. ($0,67 \pm 0,06$) nM gegen Cy5-P-NPY 12.

3.5.7 Validierung der fluorimetrischen Testsysteme mit der Radioligandbindung

Tabelle 12: Übersicht der Bindungsdaten der NPY-Rezeptorliganden, die Werte wurden in 2-3 unabhängigen Versuchen jeweils als Triplikate ($MW \pm SEM$) ermittelt.

Rezeptor-subtyp	Ligand	Nr.	K_i [nM] Radioligandbindung ^a	K_i [nM] Durchflusszytometrie ^{a,b}	
Y ₁	pNPY	4	$0,57 \pm 0,26$	$0,52 \pm 0,16$	
	Grundkörper	R			
		H	13	$1,54 \pm 0,14$	$1,47 \pm 0,21$ $3,40 \pm 0,59$
			24	$0,33 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,06$ $0,18 \pm 0,013$
			25	$0,28 \pm 0,13$	$0,13 \pm 0,02$ $0,043 \pm 0,01$
Y ₂		26	$3,3 \pm 1,5^c$	$0,12 \pm 0,01$	
Y ₅	pNPY	4	$1,5 \pm 0,1^d$	$2,24 \pm 0,80$	
	Grundkörper	R ₁	R ₂		
	H		16	$3,39 \pm 2,31$	$3,12 \pm 1,42^c$
	H		18	385 ± 163	430 ± 42
			27	$33,4 \pm 8,2^d$	$14,06 \pm 1,77$

^aK_i-Werte bestimmt gegen [³H]-Propionyl-NPY bzw. Cy5-NPY **1** an HEL-Zellen, Y₂-transfizierten SMS-KAN-Zellen bzw. Y₅-transfizierten HEC-1B-Zellen.

^bkursive Werte: unter Gleichgewichtsbedingungen bestimmt.

^cIC₅₀ von Doods et al., 1999, gegen [¹²⁵I]-NPY ermittelt.

^dvon Moser, 1999, an Y₅-transfizierten HEC-1B-Zellen bestimmt.

Für die Berechnung der apparenten K_i-Werte dienten die folgenden aus kompetitiven Radioligandbindungsexperimenten stammenden Werte für das Cy5-NPY **1**:

*Tabelle 13: Aus Radioligandbindungsexperimenten mit [³H]-Propionyl-NPY ermittelte K_i-Werte für Cy5-NPY **1**.*

Zelllinie/ Rezeptorsubtyp	K _i [nM]	
	1. Charge ^a	2. Charge ^b
Y ₁ : HEL-Zellen	7,59 ± 0,81	5,50 ± 1,99
Y ₂ : Y ₂ -transfizierte SMS-KAN-Zellen	-	0,20 ± 0,10
Y ₅ : Y ₅ -transfizierte HEC-1B-Zellen	11,27 ± 2,01	4,44 ± 0,84

^an = 6-9, ^bn = 3-6, MW ± SEM.

Eine direkte Bestimmung der K_D-Werte des fluoreszenten Liganden mithilfe der Durchflusszytometrie war nicht möglich, da Cy5-markierte Beads als Standard für die Bestimmung der Konzentration des freien Liganden nicht kommerziell erhältlich waren. Unter der Annahme, dass die frei im Gleichgewicht vorliegende Konzentration des fluoreszenten Liganden der totalen Konzentration des Liganden entspricht, liegt der K_D-Wert für Cy5-NPY **1** höher (s. 3.5.2.5).

Die Werte aus dem Ca²⁺-Assay und der Durchflusszytometrie für die untersuchten Y₁-antagonistischen Argininamide zeigten gute Übereinstimmung:

*Tabelle 14: Ergebnisse aus funktionellem Test und fluorimetrischem Assay gegen Cy5-NPY **1** für die untersuchten Argininamide **13**, **24** und **25**.*

Ligand	IC ₅₀ [nM] Ca ²⁺ -Assay ^a	IC ₅₀ [nM] Durchflusszytometrie ^b
13	17	9,2 ± 3,5
24	1,65	0,51 ± 0,04
25	0,89	0,12 ± 0,03

^aHemmung des durch 10 nM pNPY induzierten [Ca²⁺]-Anstiegs in HEL-Zellen, n = 3, ^bn = 6-9, MW ± SEM, [Cy5-NPY] = 30 nM.

Die Wettbewerbsversuche gegen Cy5-NPY **1** in der Durchflusszytometrie werden durch Farbigkeit oder Fluoreszenz der Testsubstanzen z. B. das Acridinderivat **18** selbst in mikromola-

ren Konzentrationen nicht beeinträchtigt (Tabelle 11, Vergleich mit Radioligandbindung). Bei im Vergleich zu Cy5-NPY **1** kurzweiliger absorbierenden fluoreszenten Liganden (z. B. Fluoresceinderivate) ist diesbezüglich das Risiko störender Einflüsse größer.

3.5.8 Korrelation der Testergebnisse

Die K_i -Werte aus der Durchflusszytometrie wurden parallel dazu in der Radioligandbindung an den gleichen Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.5.8 dargestellt. Die Korrelation der K_i -Werte aus Radioligandbindung und Durchflusszytometrie ist mit $r^2 = 0,999$ sehr gut (Abb. 78).

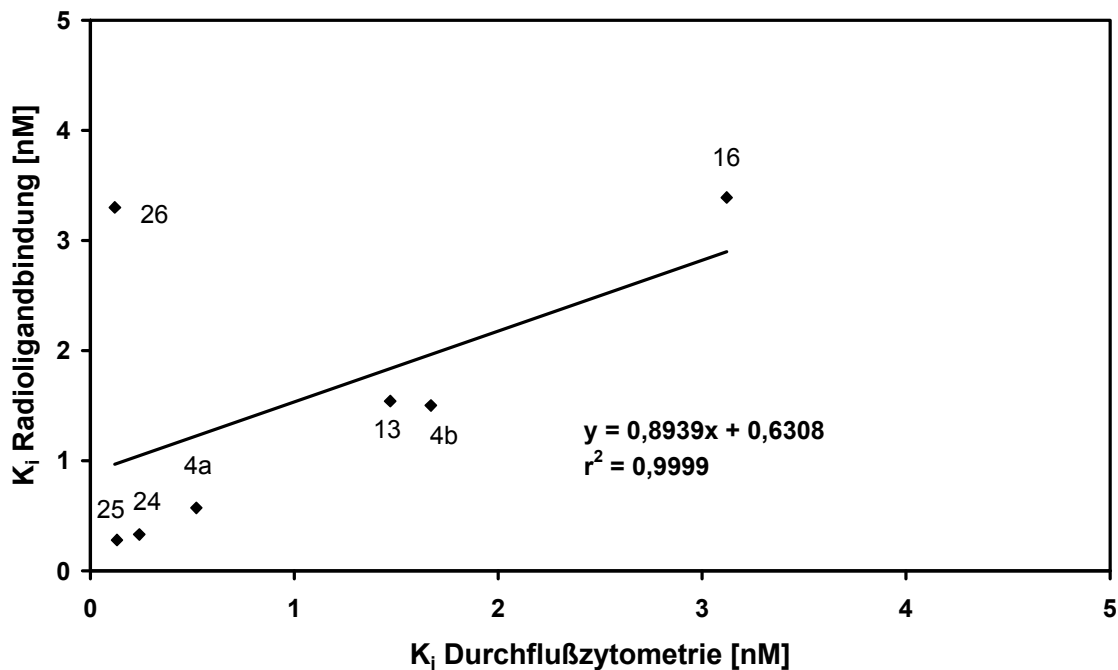


Abb. 78: Durchflusszytometrisch (Cy5-NPY 1) und mittels Radioligandbindungsassay ($[^3\text{H}]$ -Propionyl-NPY) bestimmte Bindungsdaten im Vergleich; 4a: pNPY, Y_1 -Rezeptorbindung, 4b: pNPY, Y_5 -Rezeptorbindung, 26: Y_2 -Rezeptorbindung.

Substanz **27** wurde nicht einbezogen, da die durchflusszytometrische Bestimmung nur unter Gleichgewichtsbedingungen erfolgte. Substanz **26**, der Y_2 -Antagonist BIIE 0246, fällt bei der Korrelation etwas aus dem Rahmen. Der für die Korrelation verwendete IC_{50} -Wert wurde von Doods et al., 1999, angegeben und gegen $[^{125}\text{I}]$ -NPY an SMS-KAN-Zellen ermittelt; eine Angabe des K_i -Wertes war nicht vorhanden. Der für diese Substanz von Moser, 1999, an SMS-KAN-Membranen (Wildtyp) bestimmte K_i -Wert gegen $[^3\text{H}]$ -NPY beträgt 7,3 nM und liegt noch höher als der eigene durchflusszytometrisch bestimmte Wert von 0,12 nM.

Der Fehler der durchflusszytometrisch bestimmten Werte lag bei 2-10 %.

4 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Forschungsprogrammes am Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II der Universität Regensburg zur Entwicklung fluorimetrischer Assays, die sich zur Bestimmung der Aktivität und Affinität von Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren eignen. Insbesondere beschäftigt sich diese Dissertation am Beispiel von Neuropeptid Y (NPY)- und Histamin-Rezeptoren mit der Etablierung eines Fluoreszenz-basierten Verfahrens als Alternative zum Radioligandbindungsassay.

Hintergrund: Die Arzneimittelforschung wird derzeit geprägt durch eine rasche Entwicklung miniaturisierter und automatisierter biologischer Assays, mit denen es möglich ist, große Substanzbibliotheken innerhalb kurzer Zeit zu untersuchen (Hochdurchsatzscreening). Die enorme Steigerung der Leistungsfähigkeit pharmakologischer Screeningverfahren bezüglich Geschwindigkeit und Substanzdurchsatz ist größtenteils auf die Anwendung fluorimetrischer Methoden zurückzuführen. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen die größte Gruppe biologischer Zielstrukturen für die gegenwärtig verfügbaren Arzneistoffe dar. Die Bindung von Agonisten und Antagonisten ist ebenso wie Funktionsfähigkeit dieser Rezeptoren an deren Integration in die Zellmembran und die Expression der "richtigen" Proteine der Signaltransduktionskaskade, z. B. bestimmter G-Protein-Subtypen, gebunden. Klonierte, in Zelllinien wie COS, CHO oder HEK-293 exprimierte Rezeptoren, die sehr häufig im Hochdurchsatz-Screening verwendet werden, zeigen zwar eine Bindung radioaktiv markierter Liganden, aber oft keine funktionell nachweisbare Aktivität. Zur Bestimmung der Affinität potentieller Wirkstoffe an intakten Zellen oder an Zellmembranen kommen vor allem klassische Radioligandbindungsassays oder modifizierte automatisierte Verfahren wie der Scintillation-Proximity-Assay (SPA) zum Einsatz. Es besteht folglich ein großer Bedarf an Alternativen in Form fluorimetrischer Untersuchungsmethoden und fluoreszenzmarkierter hochaffiner Rezeptorliganden.

Problem: Durch die Markierung mit Fluorophoren ist anders als bei der Verwendung von Radioisotopen ein u. U. beträchtlicher Affinitätsverlust des Liganden gegeben. Deswegen wurden zwei unterschiedliche Richtungen verfolgt: die Markierung eines großen Peptids (in diesem Falle NPY) und die Markierung kleiner nichtpeptidischer Antagonisten.

NPY-Rezeptoren und Liganden: Im Rahmen des Dissertationsprojektes wurden in der Arbeitsgruppe hergestellte fluoreszierende Neuropeptid Y-Derivate (an der ϵ -Aminogruppe des Lys-4 Carboxyfluorescein-, Tetramethylrhodamin-, BODIPY-, Dansyl-, Nitrobenzoxadiazol-(NBD-X) and Cyanin 5 (Cy5)-markiertes pNPY), sowie von Y_1 -Rezeptorantagonisten der

Argininamidreihe (BIBP 3226-Analoga) oder dem Y_5 -Antagonisten CGP 71683 abgeleitete Substanzen untersucht. Als Testmodelle dienten Y_1 - (HEL- und SK-N-MC-Zellen), Y_2 - (Membranen nativer SMS-KAN-Zellen und Y_2 -transfizierte SMS-KAN-Zellen) und Y_5 -Rezeptoren (Y_5 -transfizierte HEC-1B-Zellen). Die NPY Derivate wurden wegen der begrenzten verfügbaren Substanzmenge primär in einer Standardkonzentration (10 nM) im Vergleich zu NPY auf Agonismus an Y_1 -Rezeptoren (Ca^{2+} -Assay an HEL-Zellen) getestet. Die mit den kleinen Fluorophoren (Dansyl-, NBD) markierten NPY-Derivate zeigten gegenüber NPY einen geringeren Aktivitätsverlust als die Derivate mit großen Fluorophoren und kurzem Spacer (z. B. Carboxyfluorescein, Tetramethylrhodamin), die bei 10 nM nur etwa 30-40 % des Maximaleffektes von NPY induzierten. Für ausgesuchte Liganden wurden komplette Konzentrations-Wirkungs-Kurven aufgenommen, und die Affinität wurde durch Radioligandbindungsstudien ermittelt. Bei der Verwendung intakter Zellen wird das Signal-Rausch-Verhältnis durch Autofluoreszenz und Lichtstreuung verringert. Dieses Problem wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch langwellig emittierende Cyanin-markierte NPY-Derivate (z. B. Cy5-NPY) gelöst. Die sperrigen Fluorophore sind durch Pentamethylenspacer vom NPY-Molekül getrennt, die fluoreszierenden Substanzen verlieren im Vergleich zum nativen Liganden kaum an Bindungsfähigkeit bezüglich NPY-Rezeptoren (Affinitäten zwischen 5 und 12 nM). Die Cyaninfarbstoffe zeigen keine pH-Empfindlichkeit im physiologischen Bereich, bei der kovalenten und nichtkovalenten Bindung an Protein kommt es im Gegensatz zu Fluorescein, NBD und Tetramethylrhodamin zu einer schwachen Erhöhung der Fluoreszenzintensität sowie eines geringfügigen bathochromen Shifts der Fluoreszenz. Die Affinität der getesteten fluoreszenten nichtpeptidischen Y_1 - und Y_5 -Rezeptorliganden lag im Gegensatz zu den NPY-Derivaten (mit Ausnahme des Dansyl-Analogons von CGP 71683) im mikromolaren Bereich, so dass diese Substanzen nicht als Fluoreszenzliganden für weiterführende Untersuchungen in Frage kamen.

Histamin-Rezeptoren und Liganden: Als Histamin- H_1 - und - H_2 -Rezeptorliganden wurden von Li, 2001, hergestellte Mepyramin- und Roxatidin-Derivate verwendet, deren affinitätsvermittelnde Partialstrukturen über verschieden lange Spacergruppen mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Carboxyfluorescein, Tetramethylrhodamin, Dansyl, Nitrobenzoxadiazol etc. verknüpft sind. Obwohl in früheren Untersuchungen an isolierten Organen (H_1 : Meerschweinchen-Ileum; H_2 : Meerschweinchen-Atrium) für Vertreter beider Substanzreihen sowie an H_1 -Rezeptoren exprimierenden U-373 MG-Zellen (Ca^{2+} -Assay) für die Mepyramin-Derivate histaminantagonistische Aktivitäten im Bereich potenter im Handel befindlicher Arzneistoffe nachgewiesen

wurde (Kracht, 2001), ließ sich weder fluoreszenzmikroskopisch noch durchflusszytometrisch (U-373 MG-Zellen) eine spezifische Bindung nachweisen. Eine Internalisation der fluoreszenten Liganden konnte nicht beobachtet werden. Für weiterführende Arbeiten mit solchen „kleinen Liganden“ ist es aufgrund der Erfahrungen mit NPY-Rezeptoren naheliegend, die langwellig emittierenden Cyaninfarbstoffe als Fluorophore zu erproben, um die Probleme aufgrund der Autofluoreszenz der Zellen zu umgehen.

Untersuchungsmethoden: Um die beim Radioligand-Bindungsassay übliche, zeitaufwendige und das „Bindungsgleichgewicht“ verfälschende Trennung (z. B. durch Zentrifugation, Filtration) von gebundenem und ungebundenem Wirkstoff vermeiden zu können, muss die Bindung eines fluoreszierenden Liganden an ein Biomolekül eine messbare Änderung der physikalischen Eigenschaften induzieren. Zur Bestimmung der Rezeptorbindung wurden daher verschiedene Methoden erprobt, von der Messung der Fluoreszenzintensität, des Fluoreszenzspektrums und der -polarisation in herkömmlichen Küvetten bzw. Mikrotiterplatten über mikroskopische Rasterverfahren bis zur Durchflusszytometrie. Letztere erwies sich unter Einsatz eines Diodenlasers (635 nm) als für das Ziel dieser Arbeit als die am besten geeignete Methodik.

Bestimmung von K_i -Werten mittels Durchflusszytometrie: Unter Verwendung des langwellig emittierenden Cy5-NPY (Anregung mit Diodenlaser bei 635 nm; λ_{em} um 660 nm) konnte am Beispiel von NPY Y_1 -, Y_2 - und Y_5 -Rezeptoren erstmals eine durchflusszytometrische Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten für Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren etabliert werden. Der auf die einzelne Zelle fokussierte Laserstrahl sowie die laminaren Strömungsbedingungen, die eine Vermischung der Probenlösung mit der Trägerlösung verhindern (Dissoziation des Ligandrezeptorkomplexes wird so verhindert), ermöglichen eine empfindliche Detektion der zellassoziierten Fluoreszenz unter Gleichgewichtsbedingungen, d. h. ohne den freien Liganden abtrennen zu müssen. Durch den Verzicht auf Trenn- und Waschschriffe beschleunigt sich die Durchführung von Konkurrenzexperimenten zur Ermittlung von K_i -Werten im Vergleich zu konventionellen Bindungsstudien erheblich (2-3 h statt 2-3 d). Nur die Y_2 -Rezeptorbindung (Y_2 -transfizierte SMS-KAN-Zellen) erforderte aufgrund der niedrigen Rezeptorexpression einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt und längere Messzeiten, was aber dennoch im Vergleich zur Radioligandbindung, die in diesem Fall eine Membranpräparation erfordert, einen erheblichen Fortschritt darstellt. Aus der Gesamtpopulation der verwendeten Zellen werden diejenigen Subpopulationen, die eine spezifische Bindung zeigen, getrennt ausgewertet, was die Empfindlichkeit der Methode erhöht. Eine weitere Verbesserung

ist möglicherweise durch Sortieren und selektive Züchtung entsprechender Rezeptor-positiver Zellen zu erreichen. An HEL-Zellen konnte eine Erhöhung der Rezeptorexpression bei dünner Kulturdichte beobachtet werden. Zur Validierung der Methode mit einer Reihe von Y_1 -, Y_2 - und Y_5 -Rezeptorliganden durchgeführte Radioligandbindungsexperimente ergaben eine sehr gute Übereinstimmung der K_i -Werte mit den durchflusszytometrisch ermittelten Daten.

Ausblick: Ziel weiterführender Arbeiten wird es sein, die entwickelte durchflusszytometrische Methode zur Hochdurchsatzfähigkeit auszubauen. Inzwischen werden die apparativen Voraussetzungen dafür in Form eines Autosamplers und weiterer Komponenten zur Vermessung von 96- und 384-Well-Platten kommerziell angeboten. Die Verwendung von selektierten Zellen mit hoher Rezeptorexpression erscheint als vielversprechender Ansatz zur Optimierung des Verfahrens. Daneben ist die Entwicklung von weiteren fluoreszenten Liganden, z. B. hochaffinen rezeptorsubtypselektiven Substanzen anstelle nichtselektiver Substanzen wie NPY, erforderlich, auch um damit direkt die entsprechenden Rezeptorsubtypen auf zellulärer Ebene nachweisen zu können. Außerdem scheint es möglich, die Durchflusszytometrie als multiparametrische Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Bindungs- und funktionellen Daten (z. B. Ca^{2+} -Assay) auszubauen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines

5.1.1 Testsubstanzen

Alle getesteten Substanzen, mit Ausnahme des von Boehringer Ingelheim zur Verfügung gestellten Y₂ Antagonisten BIIE 0246, wurden am Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II der Universität Regensburg synthetisiert.

5.1.2 Geräte

Waagen/Zentrifugen:

2004 MP	Sartorius, Göttingen
CC 20	Sartorius, Göttingen
L 610 D	Sartorius, Göttingen
Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Minifuge RF	Heraeus, Hanau
Sorvall RC-5B	Du Pont, Wilmington, Delaware, USA
Ultrazentrifuge TGA 45	Kontron Instruments, Eching

Sonstige Geräte:

Aminco-Bowman Spektrofluorimeter	SLM Instruments, Urbana, USA
Autoklav 2540 MK	Tuttnauer, Wettenberg
BioFocus 3000 CE	BioRad, München
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
FACS-Calibur™	Becton Dickinson, Heidelberg
Inkubator Napco 5300	Napco, Portland, Oregon, USA
ISS K2 Fluorescence Spectrometer	ISS Inc., Illinois, USA
Laminar-Air Laborbank	Faster, Ferrara, Italien
Leica TCS NT	Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg
LS 1801 β -Zähler	Beckmann Instruments, München
LS 50 B Lumineszenz Spektrometer	Perkin-Elmer, Überlingen
Milli Q Water System	Millipore, Eschborn
Olympus BH-2 Mikroskop	Olympus Optical, Tokyo, Japan
Panasonic F10 CCD Videokamera	Matsushita, Osaka, Japan
Phasenkontrastmikroskop CK2	Olympus Optical, Tokyo, Japan
pH-Meter	WTW, Weilheim
Polarstar Galaxy	BMG LabTechnologies, Hamburg
Potter	Braun, Melsungen
SMD	SL Microtest, Jena
Sony PVM-1371 QM Videomonitor	Sony, Tokyo, Japan
Sterilfiltrationsgerät SM 16617	Sartorius, Göttingen
TSP HPLC-Anlage	TSP, Egelsbach
UV-Handlampe HL 6 KM	Bachhofer, Reutlingen
Uvikon 930 UV-Spektrophotometer	Kontron Instruments, Eching

5.1.3 Strukturanalytik

Massenspektren (EI-MS, MAT 112S, Fa. Varian), Elementaranalysen und NMR-Spektren (WM 250, Fa. Bruker) wurden in der zentralen Analytik der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV der Universität Regensburg angefertigt.

Die Massenspektren für die Peptide (Elektrospray Massenspektrometrie, MAT SSQ 7000, Fa. Finnigan) und die Sequenzbestimmungen der Peptide durch Edman-Abbau (Procise Protein Sequencing System, Fa. PE Applied Biosystems) wurden am Lehrstuhl für Biochemie, Professor Deutzmann, erstellt.

5.1.4 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

6-Well-, 24-Well-Platten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
96-Well-Platten:	
weiß	Corning Costar, Cambridge, USA
komplett transparent	Greiner, Frickenhausen
schwarz mit transparentem Boden	Corning Costar, Cambridge, USA
schwarz mit transparentem Boden	Packard, Dreieich
schwarz ohne transparenten Boden	Packard, Dreieich
Bottle Top Filter, 0,2 µm	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Chamber Slides	Nunc, Wiesbaden
Cryo Vials für Zellkultur	Greiner, Frickenhausen
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalsterilfilter	Sartorius, Göttingen
FACS-Röhrchen (12 auf 75 mm)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
(Halb-)mikro-Quarzküvetten	Hellma, Müllheim
Kulturflaschen (25 cm ²)	Greiner, Frickenhausen
Kulturflaschen (80 cm ² , 175 cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
sterile Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
sterile Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Alle verwendeten Substanzen, die nicht nachfolgend aufgeführt sind, wurden am Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II der Universität Regensburg synthetisiert. Falls nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von der Firma Merck (Darmstadt) in p. A. Qualität bezogen. Zur Herstellung sämtlicher Lösungen wurde Millipore-Wasser verwendet.

Accumax	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Ampicillin	Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg
Antifluorescein-Antikörper	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Bacitracin	Sigma, Deisenhofen
BIIE 0246	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Biberach
BodipyFL® (4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-propionsäure, succinimidyl ester)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Bradford-Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad, München
BSA (Albumin bovine Fraktion V, pH 7,0)	Serva, Heidelberg
succinimidyl 6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexanoat	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
5-(und-6)-carboxyfluorescein, succinimidyl ester	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
5-/6-Carboxyrhodamin, SE	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
5-/6-Carboxytetramethylrhodamin, SE	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
6-((5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl)amino)hexansäure, succinimidylester	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Cy5 monofunctional dye	Amersham Pharmacia Biotech
Cy5-P monofunctional dye	LS Prof. Dr. Wolfbeis, Universität Regensburg
Digitonin	Sigma, Deisenhofen
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Esterase (Schweineleber)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FACSClean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Fura-2/AM	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Geneticin	Pan Systems, Aidenbach
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Sigma, Deisenhofen
Oregon Green® 488 BAPTA-1, AM	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Pluronic® F-127	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
Puromycin	Sigma, Deisenhofen
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
Sigmacote	Sigma, Deisenhofen
SR 120819A	Sanofi, Toulouse, Frankreich
TMR-WGA	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

5.2 Zellkultur

5.2.1 Reagenzien

RPMI 1640: Pulvermedium (Sigma) mit Zusatz von 2,0 g/l NaHCO₃

EMEM mit NEAA (Eagle`s Minimum Essential Medium mit Non Essential Amino Acids):

Pulvermedium (Sigma) mit Zusatz von 2,2 g/l NaHCO₃ und 110 mg/l Natriumpyruvat

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium): Pulvermedium (Sigma) mit Zusatz von

3,7 g/l NaHCO₃ und 110 mg/l Natriumpyruvat

Ham`s F 12 Nutrient Mixture: Pulvermedium (Sigma) mit Zusatz von 2,5g/l NaHCO₃

Trypsin/EDTA: 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS, hergestellt aus Trypsin-EDTA

Lösung 10-fach (Boehringer Mannheim)

FCS (Fetal Calf Serum): Bio Whittaker

5.2.2 Zelllinien

BHK hY2: (von Prof. Dr. A. Beck-Sickinger, Biochemie, Universität Leipzig)

Ref.: noch keine Veröffentlichung

transfizierte **Baby Hamster Kidney-Zellen** , „Monolayer“-Kultur;

Medium: DMEM, 10 % FCS, 4 µg/ml Puromycin;

Passagiert alle 5/7 Tage nach 1:10/1:20 Verdünnung.

CaCo-2: (von Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg)

Ref.: Fogh et al., J. Natl. Cancer Inst. 58: 209-214 (1977);

Kolorektale Adenokarzinomzellen, „Monolayer“-Kultur;

Medium: DMEM mit 10 % FCS;

Passagiert alle 5/7 Tage nach 1:10 Verdünnung.

HEC-1-B-Y5: (von Christiane Moser, LS Pharm. Chemie II, Universität Regensburg)

Ref.: Moser et al., 1999

Humane Endometrium Carcinom-Zellen, „Monolayer“-Kultur;

Medium: EMEM mit NEAA, 10 % FCS, 400 µg/ml G418;

Mediumwechsel alle 3-4 Tage, wöchentliche Passage nach 1:10 Verdünnung.

HEL: (von Prof. Dr. M.C. Michel, Universitätsklinikum Essen)

Ref.: Martin und Papayannopoulou, 1982;

Humane Erythroleukämie-Zellen, Suspensionszellkultur;

Medium: 95 % RPMI 1640 + 5% FCS;

wöchentliche Passage nach 1:10 Verdünnung.

LN319: (von Dr. Erich Grouzmann, Lausanne)

Ref. Beck-Sickinger et al., 1992;

Humane Astrozytom-Zelllinie, „Monolayer“-Kultur;

Medium: 95 % DMEM + 5 % FCS;

Mediumwechsel alle 3-4 Tage, wöchentliche Passage nach 1:10 Verdünnung.

Mononukleäre Zellen aus peripherem Rattenblut: (von Hr. S. Bedoui, Med. Hochschule Hannover)

Ref.: Bedoui et al., 2001;

Medium: RPMI mit HEPES (200 mM) und 10 % FCS sowie 15-3000 U/ml Interleukin-2 und 2 µg/ml PHA, ohne Glutamin und ohne Phenolrot;
eine Subkultivierung war nicht möglich.

P 388 D1: (von American Type Culture Collection, Rockville, USA)

Ref.: Dawe und Potter, 1957;

Murine Leukämie-Zellen, Suspensionszellkultur;

Medium: DMEM + 10% Pferdeserum wurde gegen RPMI + 5% FCS ausgetauscht.

wöchentliche Passage durch 1:10 Verdünnung.

SK-N-MC: (von American Type Culture Collection, Rockville, USA)

Ref.: Biedler et al., 1973;

Humane Neuroblastom-Zelllinie, „Monolayer“-Kultur;

Medium: 95 % EMEM mit NEAA + 5 % FCS;

alle 4 - 5 Tage 1:10 passagiert.

SMS-KAN: (von Prof. Dr. A.G. Beck-Sickinger, Universität Leipzig)

Ref.: Ross et al., 1981;

Humane Neuroblastom-Zelllinie, „Monolayer“-Kultur;

Medium: 85 % einer 1:1 Mischung aus EMEM mit NEAA und Ham's Nutrient Mixture F 12 + 15 % FCS;

wöchentliche Passage durch Verdünnung 1:6 bis 1:10.

SMS-KAN, hY₂-transfiziert: (von Christiane Moser, LS Pharm. Chemie II, Universität Regensburg)

zusätzlich 550 µg/ml G418 im Medium.

U-373 MG: (von American Type Culture Collection, Rockville, USA)

Ref.: Young et al., 1998;

Humane Astrozytom-Zelllinie;

Medium: EMEM mit NEAA, 5 % FCS;

wöchentliche Passage durch 1:10 Verdünnung.

5.2.3 Kulturbedingungen

Die Nährmedien wurden durch Auflösen der Pulvermedien und der Zusätze in Millipore-Wasser hergestellt, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Medien mit FCS supplementiert.

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte einheitlich im Inkubator in 75 cm²-Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen wurden in einer Laminar-Air Laborbank durchgeführt. Das Passagieren der Suspensionszellen erfolgte durch Überführen eines Teiles der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche, die 25 ml frisches Medium enthielt. Die adhärennten Zellen wurden kurz vor Konfluenz 1-2 min mit Trypsin/EDTA inkubiert. Nach dem Absaugen der Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen mit Medium abgelöst und zum Teil in eine neue Kulturflasche mit 25 ml frischem Medium überführt.

Alle Tumorzelllinien wurden 1-2mal jährlich mit dem „Mycoplasma Detection Kit“ (Boehringer Mannheim) auf Mykoplasmen-Kontamination untersucht.

Suspensions- und abgelöste adhärennte Zellen wurden 10 min bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in sterilfiltriertem Einfriermedium (das jeweilige Kulturmedium mit 10 % DMSO) resuspendiert, so dass eine Zellzahl von 1-2·10⁶ Zellen/ml resultierte. In ein Kryogefäß wurde je 1 ml Zellsuspension überführt, die Vials wurden zunächst 30 min auf Eis, danach 4 h in einem Styropor-Gefäß bei - 80 °C inkubiert und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryo-Vials in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad gebracht und unmittelbar, nachdem kein Eis mehr sichtbar war, 10 min bei 200 g zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in eine Kulturflasche mit 25 ml frischem Medium überführt.

5.3 Synthese von fluoreszierenden NPY-Derivaten

Die Herstellung der fluoreszierenden NPY-Derivate folgte dem von Li, 2001, im Detail beschriebenen Methoden.

5.3.1 Synthesevorschriften

pNPY wurde in 0,1 M Boratpuffer pH = 8,5 bzw. 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Carbonatpuffer pH = 9,1 zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml suspendiert. Zu 500 µl Suspension wurden in der Regel 0,15 µmol aktivierter Farbstoff, der in 50 µl wasserfreiem

DMSO gelöst wurde, hinzugefügt. Ein äquimolares Reaktionsgemisch bis leichter NPY-Überschuss ergab optimale Reaktionsausbeuten. Das Reaktionsgemisch wurde in einem silikonisierten Kolben/Eppendorf-Reaktionsgefäß 1-2 h (auch 22 h) lang bei RT im Dunkeln gerührt und durch Zusatz von 50 µl 0,4 M Glycinlösung gestoppt. In der Folge wurde das Stoppen mit Glycinlösung unterlassen, da dies keine Vorteile erbrachte. Ab einer Reaktionsdauer von 3,5 h war im Falle des Cy5-NPY **1** keine höhere Reaktionsausbeute erhältlich. Der von Amersham gekaufte Succinimidylester des Cy5 erwies sich als Gemisch von 3 Farbstoffen.

NPY-Derivat	Ausbeute [%]	Molmasse [g/mol] detektiert	Molmasse [g/mol] berechnet
Carboxyfluorescein-NPY 5	-	4611,0	4612,0
Cy5-NPY 1	7-30	4892,7	4892,5
Cy5-P-NPY 12	10-15	4918,2	4918,4

Sequenzbestimmung:

Ansequenzieren von Carboxyfluorescein **5** und Cy5-derivatisiertem NPY **1** mittels Edman-Abbau zeigte, dass die beiden Peptide an der ϵ -Aminogruppe des Lys-4 derivatisiert sind.

5.3.2 HPLC-Reinigung der derivatisierten Peptide

Die derivatisierten Peptide wurden mittels HPLC direkt aus den Reaktionsansätzen (Fraktionen zu 200 μ l) isoliert und gereinigt.

Mobile Phase:

A: 60 % Acetonitril, 40 % Trifluoressigsäure (TFA) 0,1 %-ig in Millipore-Wasser

B: 0,1 % TFA in Millipore-Wasser

Trennsäule: Nucleosil 300-5 C-18, 250 x 4 mm (Macherey und Nagel, Düren)

Geräteeinstellungen:

Laufzeit: 30/40 min

Säulentemperatur: RT

Probentemperatur: RT

Injektionsvolumen: 25 μ l bzw. 200 μ l

Flussrate: 0,7 bzw. 1,0 ml/min

Detektionswellenlänge: 276/303 nm-Tyrosinfluoreszenz; Absorption bei λ_{\max} des Fluorophors (s. 5.3.3 Gehaltsbestimmung der Peptide)

Gradientenprogramm:

Stufe	t [min]	% A	% B	%CH ₃ CN
1	0	50	50	0
2	40	80	20	0
3	40,5	0	0	100
4	50	0	0	100

5.3.3 Gehaltsbestimmung der Peptide

Die Absorption der in dem betreffenden Lösungsmittel verdünnten Peptidderivate wurden in Halbmikro-/Mikroquarzküvetten bei der folgenden Wellenlänge (wie bei der HPLC) gemessen.

NPY-Derivat	λ [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
Carboxyfluorescein-NPY 5	495	55000 ^a in BP
BodipyFL-NPY 6	501	79000 in MeOH
Dansyl-NPY 7	335	4200 in MeOH
NBD-NPY 9	466	22000 in MeOH
TAMRA-NPY 11	546	95000 in MeOH
Cy5-NPY 1	649	250000 in BP
Cy5-P-NPY 12	649	180000 in BP

^anach Tota et al., 1994, für 5-/6-Carboxyfluorescein-markiertes Lysin ermittelt.

5.3.4 Spektren der NPY-Derivate

Die Messung der Spektren (in BP) erfolgte an den Spektrometern PE LS 50 B bzw. ISSK2. Für die Emissionsspektren erfolgte eine Korrektur (Division der Intensitätswerte durch die entsprechenden Werte des Korrekturspektrums (Abb. 79) und anschließende Multiplikation mit 100), die Spektren wurden gegebenenfalls geglättet und *normiert*. Die Exzitationspektren, die bereits automatisch korrigiert werden, wurden ebenfalls *normiert*.

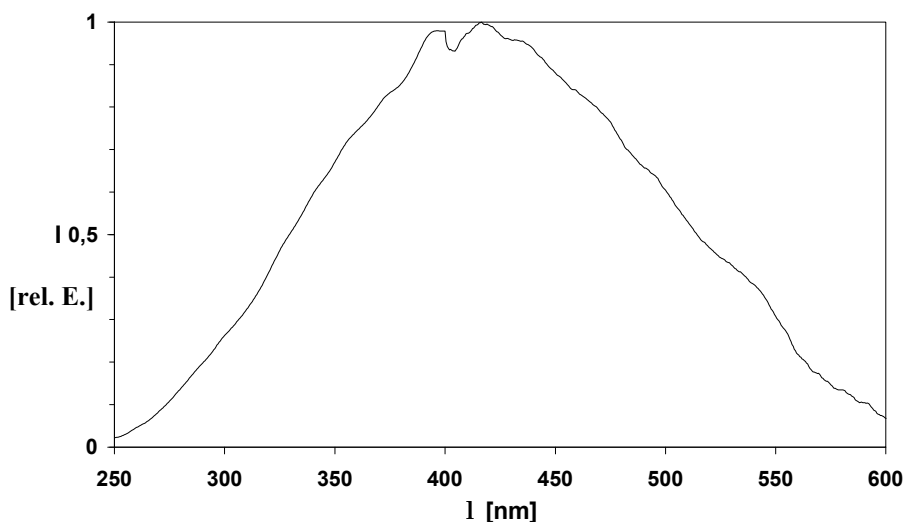


Abb. 79: Korrekturspektrum für PE LS 50B, das mit Chininsulfat, $c = 600 \text{ nM}$ in $0,1 \text{ N HClO}_4$ bzw. dem reinen Lösungsmittel gemäß der im Handbuch beschriebenen Prozedur und Geräte-Software erstellt wurde.

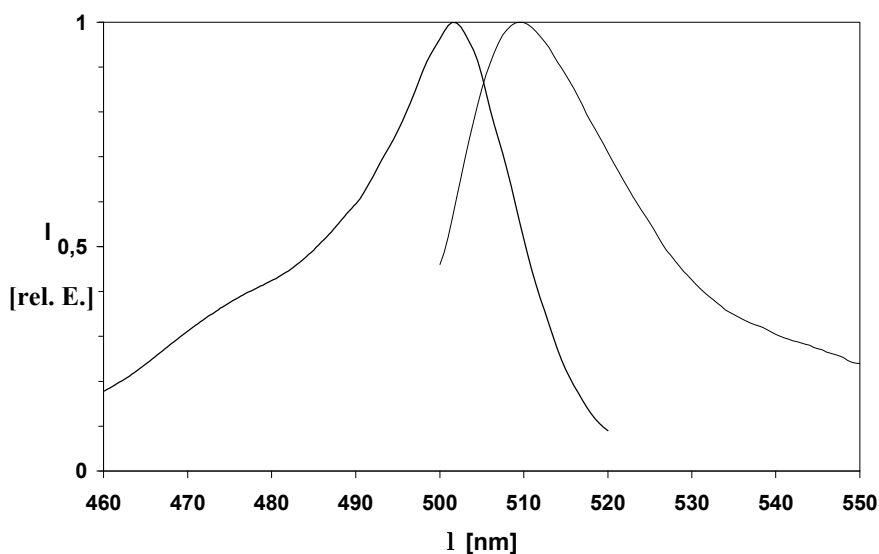


Abb. 80: BodipyFL-NPY 6; $I_{EX} = 488 \text{ nm}$, Spalte 5/5 und $I_{EM} = 550 \text{ nm}$, Spalte 5/5; $c = 10 \text{ nM}$ in BP.

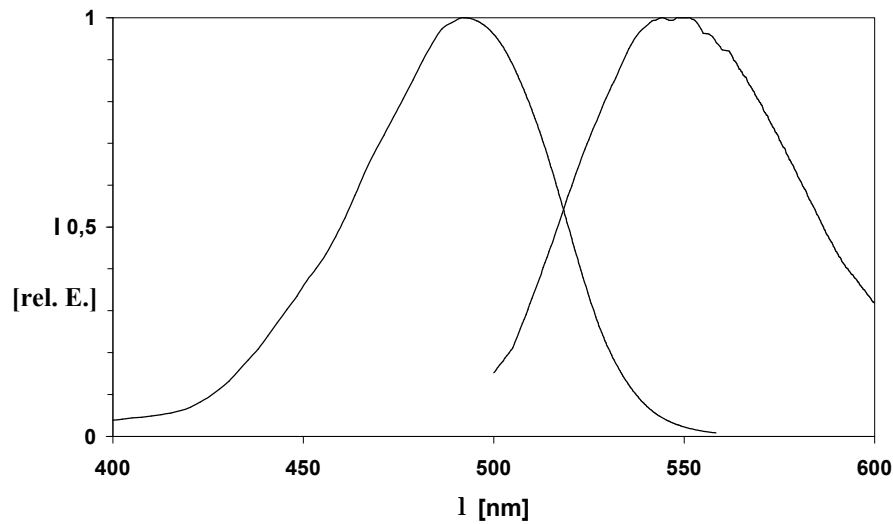


Abb. 81: NBD-NPY 9; $I_{EX} = 488$ nm, Spalte 5/5 und $I_{EM} = 550$ nm, Spalte 5/5; $c = 50$ nM in BP.

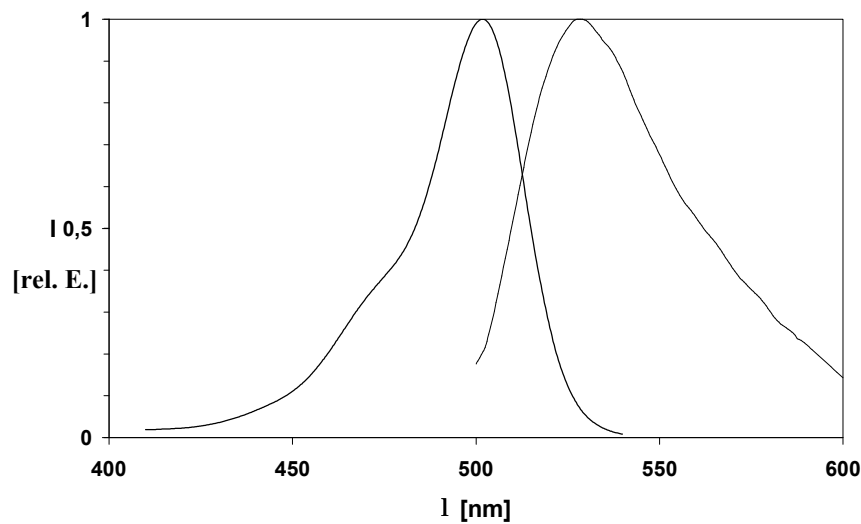


Abb. 82: Carboxyfluorescein-NPY 5; $I_{EX} = 488$ nm, Spalte 10/10 und $I_{EM} = 550$ nm, Spalte 10/10; $c = 20$ nM in BP.

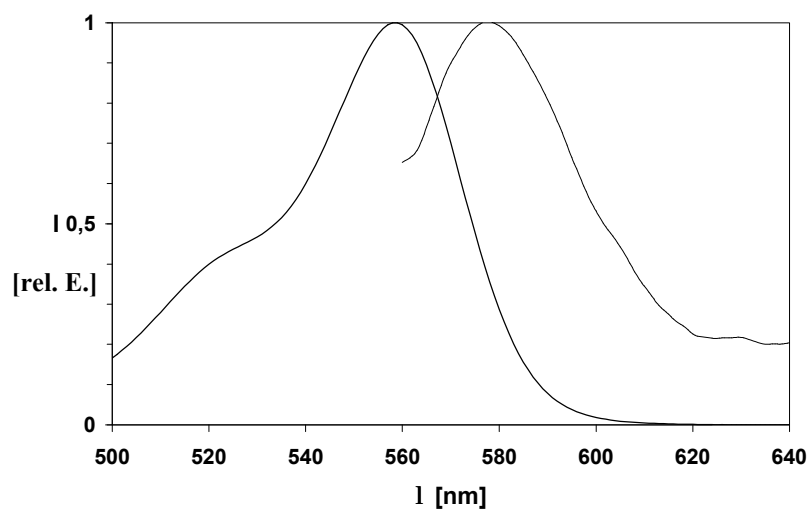


Abb. 83: Tetramethylrhodamin-NPY 11; $I_{EX} = 546$ nm, Spalte 5/5 und $I_{EM} = 590$ nm, Spalte 2/0,5; $c = 10$ nM in BP.

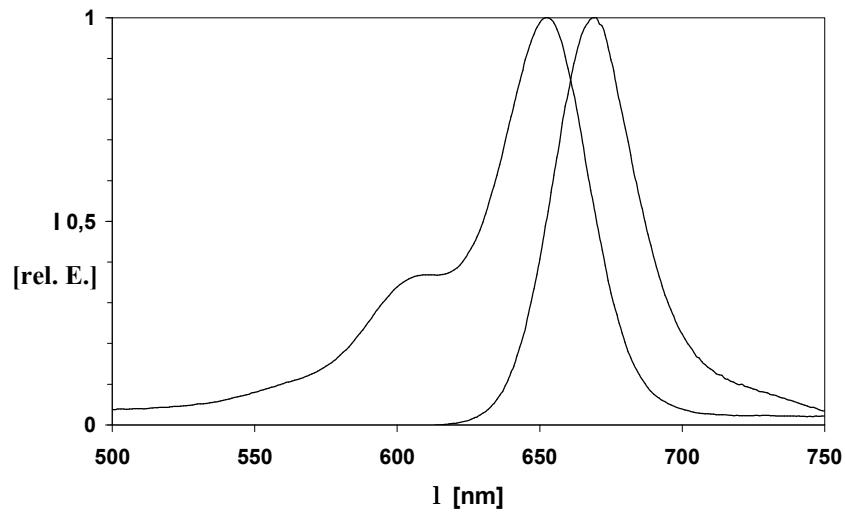


Abb. 84: Cy5-NPY 1 ($t_R \gg 18$ min); $I_{EX} = 600$ nm, Spalte 5/5 und $I_{EM} = 750$ nm, Spalte 5/5; $c = 50$ nM in PBS.

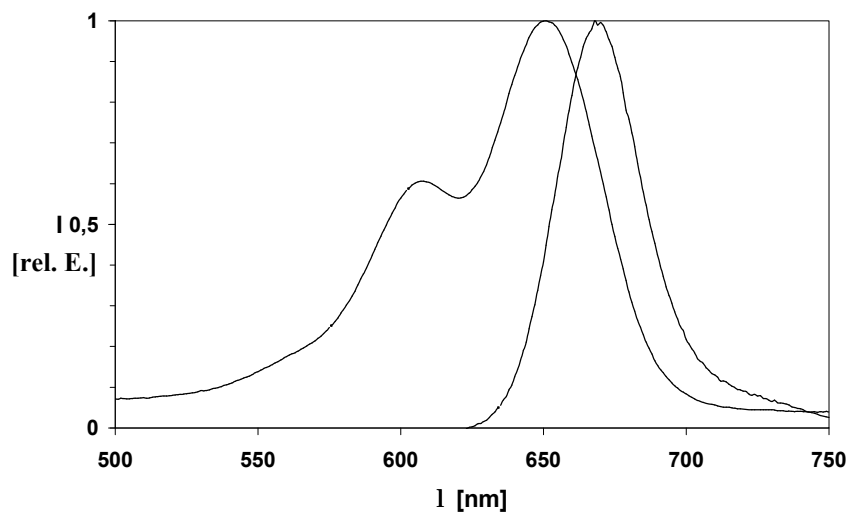


Abb. 85: Cy5-NPY 2 ($t_R \gg 22$ min), $I_{EX} = 600$ nm, Spalte 5/5 und $I_{EM} = 750$ nm, Spalte 5/5; $c = 50$ nM in PBS.

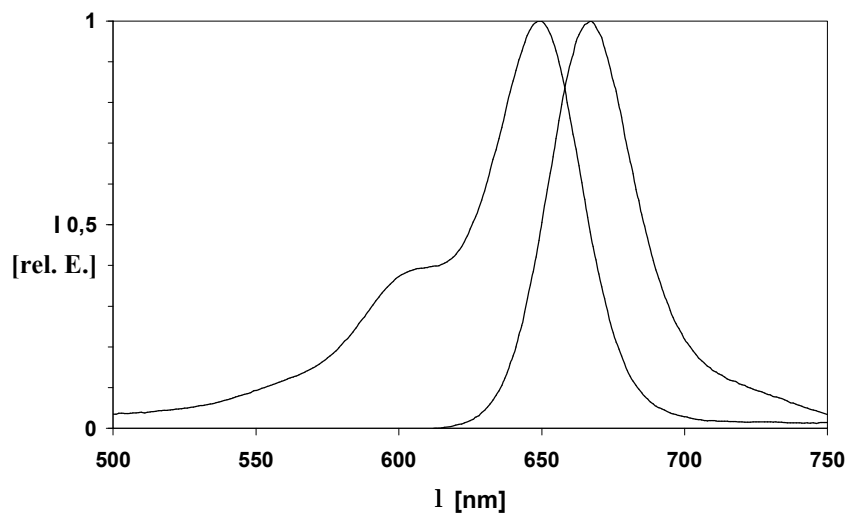


Abb. 86: Cy5-P-NPY 12; $I_{EX} = 600$ nm, Spalte 5/5 und $I_{EM} = 750$ nm, Spalte 5/5; $c = 50$ nM in PBS.

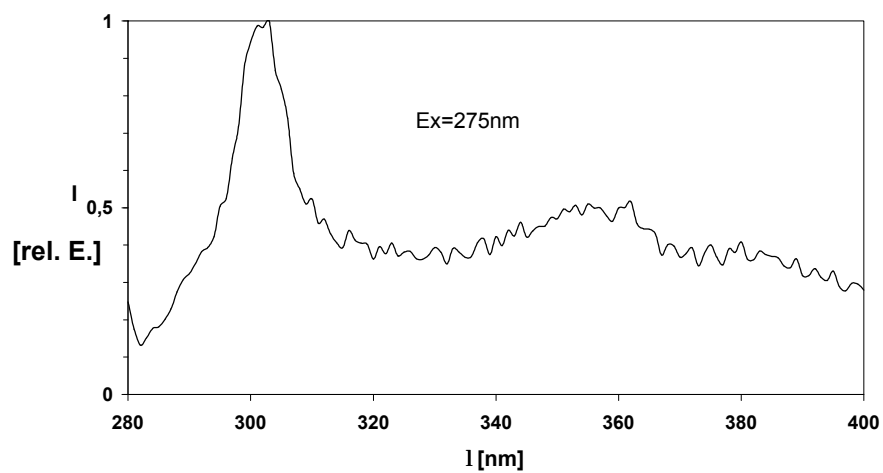


Abb. 87: Tyrosinfluoreszenz der Cyanin-Derivate **1** und **12** $I_{EX} = 275 \text{ nm}$ und Spalte 5/5; $c = 50 \text{ nM}$ in PBS.

5.3.5 Bestimmung der Quantenausbeute

Zur Bestimmung der Quantenausbeute benötigt man neben den Exzitations- und Emissionsspektren der zu untersuchenden Substanz auch die einer Referenzsubstanz.

Für das Carboxyfluorescein-markierte NPY wurden 10 nM Fluorescein in 0,01 N NaOH als Referenz verwendet. Als Lösungsmittel für das NPY-Derivat diente Beladungspuffer. Da die ermittelten Exzitationsspektren bereits durch das Gerät automatisch korrigiert werden, erfolgte nur für die Emissionsspektren eine Korrektur. Die Bestimmung der Quantenausbeute der Cyanin-Derivate wurde von Herrn Oswald (LS Wolfbeis) durchgeführt.

$$\Phi_{I_{ex}}^{Pr} = \Phi_{I_{ex}}^{ST} \cdot \frac{Fläche_{Em}^{Pr}}{Fläche_{Em}^{ST}} \cdot \frac{I_{ex}^{ST}}{I_{ex}^{Pr}} \cdot \frac{Abs_{I_{ex}}^{ST}}{Abs_{I_{ex}}^{Pr}} \cdot \frac{\left(\frac{c_{Em}}{c_{Abs}} \right)_{ST}}{\left(\frac{c_{Em}}{c_{Abs}} \right)_{Pr}}$$

mit:

λ_{Ex} [nm]: Anregungswellenlänge

Φ : Quantenausbeute

ST: Standard

Pr: Probe

Em: Emission

Abs: Absorption

c_{Em} bzw. c_{Abs} [M]: Konzentration der Lösungen, bei denen die Emissions- bzw. Absorptionsspektren aufgezeichnet wurden

Fläche [I·nm]: Fläche unter der Kurve der korrigierten Emissionsspektren

5.3.6 Messung der Fluoreszenzpolarisation

Die Fluoreszenzpolarisation wurde am LS Wolfbeis mit dem ISS K2 Fluoreszenz Spektrometer gemessen. Die grau unterlegten Werte (Tabelle zu Abb. 88) für die Viskosität der Glycerol-Puffer-Mischungen wurden durch Interpolation (Tabellenwerte) ermittelt.

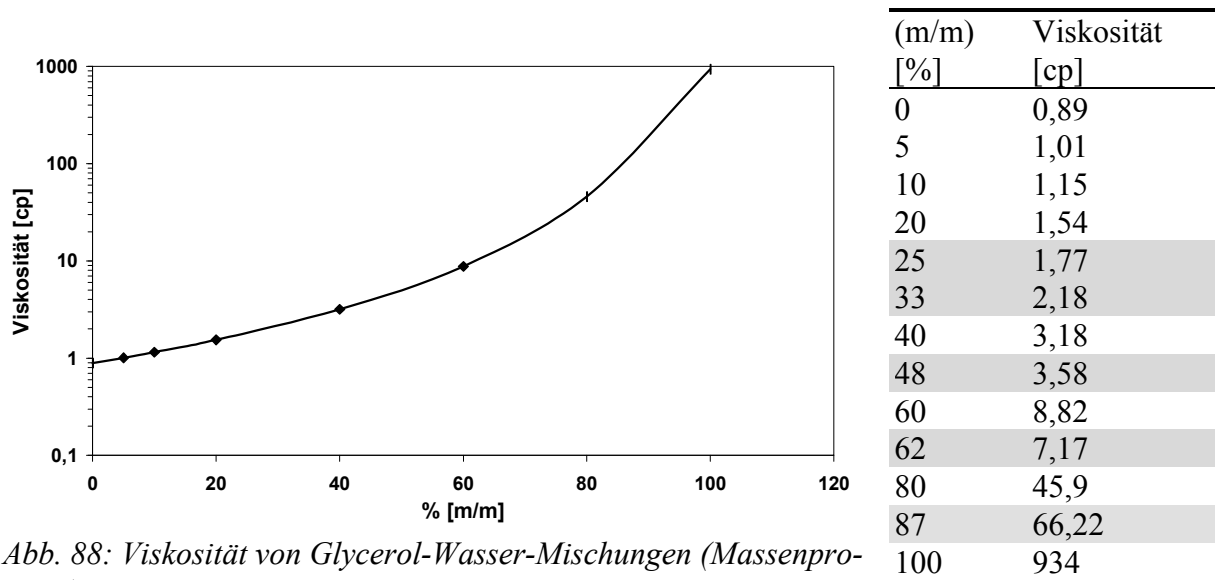


Abb. 88: Viskosität von Glycerol-Wasser-Mischungen (Massenprozent); $T = 25^{\circ}\text{C}$.

Dazu wurde an den Graphen aus Literaturwerten (Lide, 1994) eine polynomische Funktion 3. Grades angepasst, welche die beste Korrelation lieferte. Diese Werte dienten der Auftragung für den Perrin-Plot.

5.3.7 Quenching mit Antifluorescein-Antikörper

Der Antikörper (100 $\mu\text{g/ml}$) wurde als Gebrauchslösung (1:3000) verwendet. Bei der Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration zum Quenchen von 10 nM Carboxyfluorescein-NPY wurden wenige μl dieser Lösung auf 2 ml Endvolumen verdünnt. Bei einer weiteren Verdünnung von 1:100 (2 μl) ergab sich die minimale Fluoreszenz. Für die relativen Fluoreszenzintensitäten wurde die Fläche unter der Kurve berechnet.

5.3.8 Ca^{2+} -Assay in der Mikrotiterplatte

Die Messungen wurden mit dem Fluorimeter Polarstar Galaxy, das die Firma BMG Labtechnologies freundlicherweise zur Verfügung stellte, durchgeführt. HEL-Zellen wurden 30 min mit Oregon Green-BAPTA-1/AM inkubiert und anschließend zweimal mit BP gewaschen. Die Zellkonzentration betrug $1,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Das Pipettieren der Thrombinlösungen erfolgte mit zwei automatischen Pumpen, deren Hubvolumen maximal 50 μl betrug, nachfolgendes Pipettierschema:

Endkonzentration Thrombin [U/ml]	Vorgelegte Zell- suspension	Vorgelegter Beladungspuffer [μ l]	Pumpe 1 Thrombin 12 [U/ml]	Pumpe 2 Thrombin 5 [U/ml]
3	150	-	50	-
1	150	-	-	50
0,375	150	35	-	15
0,125	150	45	-	5

Folgende Geräteeinstellungen wurden gewählt:

Microplate:	Costar 96	No. of Intervals:	200
Layout:	13.10.99	No. of Flashes:	5
Gain:	004	Start Injection 1 [s]:	20
Excitation Filter:	485P	Standard:	-
Emission Filter:	520P	Int. Delay [μ s]:	0000
Test Type:	Well Mode	Int. Time [μ s]:	0012
Measurement Type:	Fluorescence	Interval Time [s]:	0,5
Reading Direction:	vertical	Start Measurement [s]:	0
Number of Multichr.:	1	Start Injection 2 [s]:	20

5.3.9 Einzelmoleküldetektion

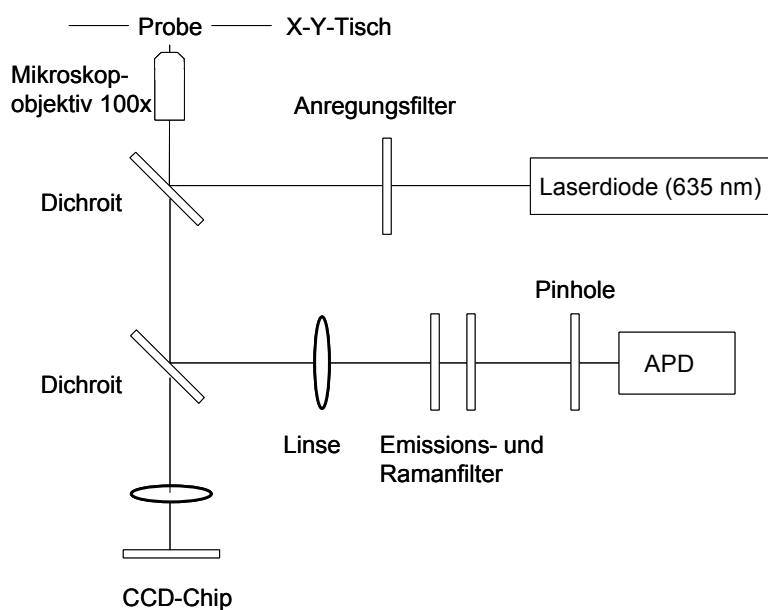


Abb. 89: Schematischer Aufbau des verwendeten Raster-Scan-Mikroskops zur Einzelmoleküldetektion

Die Messungen wurden an einem Gerät der Arbeitsgruppe von Prof. Seeger, Institut für analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg durchgeführt. Das Messgerät SMD mit Diodenlaser (635 nm) stammte von der Firma SL Microtest, Jena. Es

wurden 96-Well-Platten (LB₈TM von Molecular Machines, Heidelberg) mit Glasboden verwendet, die zuvor mit EtOH 70 % desinfiziert und mit sterilisiertem Millipore-Wasser gespült worden waren. Die verwendeten HEC-1B-Y5-Zellen wurden 2-3 Tage vor der Messung ausgesät.

Nach der Inkubation (60-120 min) in Bindungspuffer II wurden die Platten zweimal mit eiskaltem Puffer II gewaschen. Anschließend wurde die Fluoreszenz der wells (8 Konkretorkonzentrationen, n = 4), die mit Puffer II bedeckt wurden, bestimmt. Dabei wurde eine Fläche von 0,04 mm² bei einer Schrittweite von 2 µm vermessen. Während der Messung wurde der Fokus, falls erforderlich, nachgestellt. Die Auswertung erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel. Für die unspezifische Adsorption an den Platten wurde ein Mittelwert der Hintergrundfluoreszenz von jedem einzelnen Messwert (=Fluoreszenzintensität) subtrahiert. Anschließend wurden sämtliche Messwerte innerhalb eines wells summiert. Die weitere Auswertung erfolgte dann in Analogie zur Radioligandbindung.

5.3.10 Konfokale Mikroskopie

Die von Martin Böhmer am LS Wolfbeis durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit dessen eigenem Aufbau. Der Aufbau besteht aus folgenden wesentlichen Bausteinen:

Ein gepulster Diodenlaser (PDL 800, PicoQuant) mit 635 nm Emissionswellenlänge wird als Anregungsquelle eingesetzt.

Eine single-photon avalanche diode (SPAD) (AQR-1X, Perkin Elmer- 60 % Quantenausbeute bei 670 nm).

Zwei Emissionsbandpassfilter (670DF40, Omega Optical), einer direkt nach der Tubuslinse, der andere direkt vor dem Detektor positioniert, unterscheiden Fluoreszenz von Streulicht.

Um eine größere Fläche scannen zu können, ist es wichtig, den Abstand zwischen Ölimmersionsobjektiv (1,4 NA, 100fach) und Probenoberfläche möglichst präzise konstant zu halten.

Dazu wurde eine eigens gefertigte Autofokuskontrolleinheit mit Piezoaktuator eingesetzt.

Scanfläche: 500 mal 500 Pixel bei 50 nm Schrittweite

Konzentration des Cy5-NPY: 1 nM

Weitere Details sind bei Böhmer et al. (in press) zu entnehmen.

5.4 Radioligand-Bindungsassays an NPY Y₁-, Y₂- und Y₅-Rezeptoren

5.4.1 Reagenzien

Bacitracin-Lösung (100 mg/ml): 100 mg Bacitracin (Sigma) wurden in 1,0 ml H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

PMSF-Lösung (100 mM): 17,4 mg PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (Sigma) wurden in 1 ml absolutem EtOH gelöst und bei -20 °C gelagert.

Homogenisierungspuffer (Sheikh und Williams, 1990):

Tris-HCl	50 mM	3,050 g
EDTA, Na-Salz	1 mM	0,186 g
H ₂ O		ad 500,0 ml
der Puffer wurde mit 30 % HCl auf pH 7,4 eingestellt		
Bacitracin-Lösung	100 µg/ml	500 µl
PMSF-Lösung	100 µM	500 µl

Puffer I (Sheikh und Williams, 1990):

HEPES	10 mM	2,380 g
NaCl	150 mM	8,770 g
KCl	5 mM	0,373 g
CaCl ₂ 2 H ₂ O	2,5 mM	0,368 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
Mg ₂ SO ₄ 7 H ₂ O	1,2 mM	0,296 g
NaHCO ₃	25 mM	2,100 g
H ₂ O		ad 1000,0 ml

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und bei RT gelagert.

Bindungspuffer II für Y₁-Test (*):

BSA 1%	100 mg
Bacitracin-Lösung	10 µl
Puffer I	10 ml

Puffer II (Sheikh und Williams, 1990):

HEPES 25 mM	5,96 g
CaCl ₂ 2,5 mM	2,5 ml einer 1 M Stammlsg.
MgCl ₂ 1,0 mM	1,0 ml einer 1 M Stammlsg.
H ₂ O	ad 1000,0 ml

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und bei RT gelagert.

Bindungspuffer I für Y₂-Test (*):

BSA	1 %	100 mg	
Puffer II		10 ml	
Bacitracin-Lsg.		100 µg/ml	10 µl
PMSF-Lsg.		100 µM	10 µl

Lyse-Puffer:

Harnstoff	8 M	240,2 g	
Essigsäure	3 M	85,8 ml	
Triton-X-100	2 %	10,0 g	
H ₂ O		ad 500,0 ml	

NPY: 10⁻⁶ M im entsprechenden Bindungspuffer, Lagerung bei -20 °C

³H-NPY-Stammlösung: [³H]Propionyl-NPY (Amersham)

³H-NPY-Gebrauchslösung (*): 10 nM im entsprechenden Bindungspuffer; die Einstellung erfolgte entsprechend der spezifischen Aktivität. Bei einer spezifischen Aktivität von 3,33 TBq/mmol entspricht das 49950 dmp/25 µl.

Testsubstanzen (*): Von den Substanzen wurden zunächst 10⁻² M Stammlösungen in 50%igem EtOH bzw. DMSO in Millipore-Wasser hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden die Gebrauchslösungen durch Verdünnen mit dem entsprechenden Bindungspuffer hergestellt. Die Gebrauchslösungen wurden 10fach höher konzentriert als die gewünschten finalen Testkonzentrationen. Die Substanzen wurden in mindestens 6 Konzentrationen in einem Bereich über 3 Zehnerpotenzen getestet.

Szintillationsflüssigkeit: Rotiszint eco plus (Roth);

Bradford-Gebrauchslösung: 1 Teil Bradford-Farbstoffkonzentrat (Bio-Rad) wurden mit 4 Teilen H₂O verdünnt und maximal 4 Wochen bei RT gelagert.

Silikonisierungslsg.: Sigmacote (Sigma)

5.4.2 Membranpräparation von SMS-KAN- und HEL-Zellmembranen für Radioligandbindung und Versuche zur Polarisation

Vorbereitung der Zellen: Vier 75-cm² Zellkulturflaschen mit konfluenten SMS-KAN-Zellen (bzw. dichten HEL-Zellen) wurden in sechzehn 175-cm² Flaschen ausgesät. (Die Zellen wachsen in ca. 1 Woche zur Konfluenz)

Durchführung: Die Präparation von Membranen erfolgte aus 16 großen Flaschen mit konfluenten SMS-KAN-Zellen oder dünner HEL-Zellsuspension. Alle Puffer wurden in Eiswasser gekühlt, das Pottern erfolgte ebenfalls unter Eiskühlung.

Die Zellen wurden in 4 Portionen zu 4 Flaschen geerntet: Das Medium wurde abgesaugt, pro Flasche wurde kurz (3 s) mit ca. 10 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer gewaschen. Die Zellen aus einer Flasche wurden mit 6 ml Homogenisierungspuffer abgelöst und alle 4 Flaschen anschließend noch mit 6 ml Puffer nachgespült. Die Zellen wurden mit dem Homogenisator aufgeschlossen (10 x auf und ab, 1500 U/min) und anschließend auf Eis gelagert, bis alle Zellen homogenisiert waren.

Das Zellhomogenat wurde bei 4 °C mit 650 g zentrifugiert (2000 rpm, Heraeus Minifuge RF). Danach enthielt das Pellet die Zellkerne, der Überstand die Membranen. Der Überstand wurde in 2 Ultrazentrifugenröhrchen (91-90223, Kontron) abgefüllt und 30 min bei 40000 g zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Rotor TFT 45, 24000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Pellet mit 30 ml Homogenisierungspuffer gewaschen und nochmals 30 min bei 40000 g zentrifugiert.

Die Pellets wurden in insgesamt 500-1000 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen und zur gleichmäßigen Suspendierung noch mehrmals mit einer Kanüle (G 1¼) aufgezogen. Anschließend wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Proteinbestimmung nach Bradford:

95 µl H₂O + 5 µl Membranfraktion wurden gleichmäßig suspendiert. Von dieser Suspension wurden 10 µl pro Probe eingesetzt. Die Proben wurden als Triplikate vermessen. Für die Kalibriergerade wurden 0,5; 1; 2; 4 und 6 µg humanes Serumalbumin (HSA) pro Probe eingesetzt. Die Proben wurden direkt in Halbmikroküvetten pipettiert und ad 100 µl mit H₂O versetzt. Nach Zugabe von 1,0 ml Bradford-Gebrauchslösung wurde geschüttelt und nach 5 min Inkubation bei RT die Extinktion bei 595 nm gemessen.

Die Membranen wurden in aliquote Teile zu 150 oder 200 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.4.3 Y₁-Rezeptor-Bindungsassay mit intakten SK-N-MC-Zellen

Vorbereitung der Zellen: Die SK-N-MC-Zellen wurden 2-4 Tage vor dem Versuch gleichmäßig in 24-Well-Platten ausgesät. Am Versuchstag sollen die Zellen gerade konfluent sein.

Durchführung: Auf jeder Platte wurde die totale und die unspezifische Bindung bestimmt. Die jeweilige Testsubstanz wurde in mindestens 6 Konzentrationen über einen Bereich von drei Zehnerpotenzen getestet.. Alle Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt.

Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt, jedes Well wurde zweimal mit 0,5 ml Puffer II gewaschen, anschließend wurden die Reagenzien gemäß folgendem Pipettierschema zugegeben:

Pipettierschema: (Volumina in µl)

	Totale Bindung	Unspezif. Bindung	Testsubstanzen
1. Bindungsp. II	225	200	200
2. pNPY 10 ⁻⁶ M	--	25	--
3. Testsubstanzen	--	--	25
4. [³ H]-Propionyl-NPY	25	25	25

Nach 2.5 h Inkubation bei RT unter leichtem Schütteln wurden die Überstände abgesaugt, die Wells 2mal mit je 0,5 ml Puffer I (4 °C) gewaschen und mit 200 µl Lyse-Puffer versetzt. Nach 15 min Schütteln wurde der Lyse-Puffer in Szintillationsgefäße überführt. Die Wells wurden noch einmal mit 200 µl Lyse-Puffer nachgespült. Die vereinigten Lysate wurden mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im β-Zähler vermessen.

5.4.4 Y₁- Rezeptor-Bindungsassay mit intakten HEL-Zellen

Vorbereitung der Zellen: Am Tag vor dem Versuch wurde eine 75-cm²-Kulturflasche konzentrierter HEL-Zellen in eine 175-cm²-Flasche überführt und mit Medium ca. 1:6 verdünnt.

Silikonisieren der Reaktionsgefäße: 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden mit Sigma-cote™ benetzt; nach dem Abtropfen und Trocknen an der Luft wurden die Gefäße einmal mit demineralisiertem Wasser gewaschen.

Durchführung: An jedem Versuchstag wurde die totale und die unspezifische Bindung bestimmt. Die Testsubstanzen wurden in 6 Konzentrationen über einen Bereich von drei Zehnerpotenzen getestet. Alle Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit Puffer II gewaschen und anschließend in Bindungspuffer II auf eine Konzentration von 4·10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die einzelnen Komponenten wurden in

der angegebenen Reihenfolge in silikonisierte Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und vorsichtig geschüttelt:

Pipettierschema: (Volumina in μl)

	Totale Bindung	Unspezif. Bindung	Testsubstanzen
1. Zellsuspension	200	200	200
2. Bindungsp. II	25	--	--
3. pNPY 10^{-6} M	--	25	--
4. Testsubstanzen	--	--	25
5. [^3H]-Propionyl-NPY	25	25	25

Nach 1,5 - 2 h Inkubation bei RT (unter Schütteln) wurde 5 min bei 13000 rpm (Heraeus Minifuge) zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Pellets wurden 2mal mit je 0,5 ml PBS (4 °C) vorsichtig gewaschen, mit 200 μl Lyse-Puffer versetzt und nach 10 min Inkubation bei RT im Lysepuffer und mehrmaligem Aufziehen mit einer Pipette in Szintillationsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße wurden noch einmal mit 200 μl Lyse-Puffer nachgespült. Die vereinigten Lysate wurden mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im β -Zähler vermessen.

5.4.5 Y_2 - Rezeptor-Bindungsassay an SMS-KAN-Zellmembranen

Membranpräparation-Gebrauchs-Lsg.: Die Membranpräparation wurde am Versuchstag aufgetaut und mit Bindungspuffer I auf einen Proteingehalt von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

Durchführung: An jedem Versuchstag wurde die totale und die unspezifische Bindung bestimmt. Die Testsubstanzen wurden in 6 Konzentrationen über einen Bereich von drei Zehnerpotenzen getestet. Alle Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt.

Die einzelnen Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge in silikonisierte Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und mit einem Heidolph-Mixer gründlich geschüttelt.

Pipettierschema: (Volumina in μl)

	Totale Bindung	Unspezif. Bindung	Testsubstanzen
1. Bindungspuffer I	195	170	170
2. pNPY 10^{-6} M	--	25	--
3. Testsubstanzen	--	--	25
4. [^3H]-Propionyl-NPY 10 nM	25	25	25
5. Membranen 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	30	30	30

Nach 1,5 - 2 h Inkubation bei RT (unter Schütteln) wurde 20 min bei 13000 rpm (Heraeus Minifuge) zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Pellets wurden 2mal mit je 0,5 ml PBS (4°C) vorsichtig gewaschen, mit 200 µl Lyse-Puffer versetzt und nach 10 min Inkubation bei RT im Lysepuffer und mehrmaligem Aufziehen mit einer Pipette in Szintillationsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße wurden noch einmal mit 200 µl Lyse-Puffer nachgespült. Die vereinigten Lysate wurden mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im β -Zähler vermessen.

5.4.6 Y₅- Rezeptor-Bindungsassay an HEC-1B-Y5-Zellen

Dieser wurde entsprechend dem Assay an SK-N-MC-Zellen durchgeführt. Die Radioligandkonzentration betrug ca. 0,8 nM.

5.5 Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration an HEL-Zellen

5.5.1 Reagenzien

Die mit (*) gekennzeichneten Reagenzien wurden an jedem Versuchstag frisch hergestellt.

Beladungspuffer:

NaCl	120 mM	7,013 g
KCl	5 mM	0,373 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	2 mM	0,407 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,5 mM	0,221 g
HEPES (Sigma)	25 mM	5,958 g
Glucose, wasserfrei	10 mM	1,802 g
H ₂ O, demin.		ad 1000,0 ml

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und in 500-ml-Portionen im Kühlraum aufbewahrt.

Fura-2/AM (1 mM): 1.00 mg Fura-2/AM (Molecular Probes) wurden in 1,0 ml DMSO, das über einem Molekularsieb getrocknet wurde, gelöst. Aliquote Teile der Lösung wurden lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

Pluronic F-127: 200 mg Pluronic F-127 (Molecular Probes) wurden in 1 ml DMSO unter Erwärmen gelöst. Die Lösung wurde bei RT aufbewahrt.

Digitonin-Lösung : 20 mg Digitonin (Sigma) wurden in 1,0 ml H₂O suspendiert und auf 95-98 °C erhitzt. Die klare Lösung wurde nach Abkühlen auf RT filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

EGTA-Lösung (600 mM): 228,2 mg EGTA (Sigma) wurden in 1,0 ml Tris-Puffer (3 M, pH 8,7) gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

HCl 10 mM / BSA 0.1% zum Lösen von NPY: 10,56 µl HCl suprapur 30 % und 10 mg BSA (Serva) wurden in 10,0 ml H₂O gelöst.

Beladungssuspension (*) (Thomas und Delaville, 1991):

1 ml Beladungspuffer

20 mg BSA

5 µl Pluronic F-127 (20 % in DMSO)

4 µl Fura-2/AM 1 mM in DMSO

(1 ml der Beladungssuspension reicht für $4 \cdot 10^6$ Zellen)

Testsubstanzen (*): von den Antagonisten wurden Stammlösungen in der Konzentration $2 \cdot 10^{-2}$ mol/l in 50 %igem EtOH/DMSO in H₂O hergestellt.

Peptid-Stammlösungen ($2 \cdot 10^{-4}$ M): Falls nicht anders angegeben, wurde NPY vom Schwein verwendet. NPY und NPY-Derivate wurden unter Berücksichtigung des Peptidgehaltes in entsprechenden Volumina einer 10 mM HCl / 0,1 % BSA-Lösung gelöst.

Thrombin-Stammlösung (200 U/ml): 200 U bovines Thrombin (Merck) wurden in 1,0 ml H₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

Aus den Stammlösungen der Testsubstanzen, der Peptide und der Thrombin-Stammlösung wurden die benötigten Verdünnungen (200mal höher konzentriert als die gewünschte Endkonzentration im Assay) durch Verdünnen mit dem entsprechenden Lösungsmittel hergestellt. Zur Testung wurden pro Küvette mit 2 ml Zellsuspension jeweils 10 µl der entsprechenden Lösungen pipettiert.

5.5.2 Geräteeinstellung

Gerät:	Perkin-Elmer Luminescence Spectrometer LS 50 B
Anregungswellenlängen (λ_{Ex}):	340 und 380 nm; Spalt 10 nm
Emissionswellenlänge (λ_{Em}):	510 nm; Spalt 10 nm
Resolution:	0.1
Stirrer:	low
Küvettemperierung:	25°C
Küvetten:	2.5 ml Acryl-Küvetten (Sarstedt)
Time:	300 s
Autofluoreszenzwerte:	bei 340 nm: 10,18 bei 380 nm: 5,80

5.5.3 Vorbereitung der Zellen

24 h vor der Testung wurden 25 ml Zellsuspension mit dichtgewachsenen HEL-Zellen in eine 175-cm² Kulturflasche passagiert (Verdünnung ca. 1:6), sodass am Versuchstag etwa 150 ml Zellsuspension mit einer Dichte von $2 - 4 \cdot 10^5$ Zellen / ml zur Verfügung standen.

Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 10 ml auf RT temperiertem Beladungspuffer aufgenommen, mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und mit Beladungspuffer auf $1.3 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Pro 0,75 ml Zellsuspension wurden 0.25 ml Beladungssuspension hinzugefügt. Dadurch ergaben sich folgende Konzentrationen im Ansatz: $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml, 1 μM Fura-2/AM, 0,2 % DMSO, 0,025 % Pluronic F-127.

Die Zellen wurden 30 min bei RT im Dunklen inkubiert, anschließend abzentrifugiert und in frischem Beladungspuffer aufgenommen. Die Zellen wurden weitere 30 min bei RT im Dunklen zur Nachinkubation stengelassen, zweimal mit Puffer gewaschen und in 10 ml Puffer aufgenommen. Die Zelldichte wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt; die Zellen wurden auf eine Dichte von $1 \cdot 10^6$ / ml eingestellt.

Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT, 200 g, 7 min

Die mit Fura-2/AM beladenen Zellen wurden bis zur Messung noch mindestens 15 min im Dunklen bei 20 °C stengelassen.

In die Küvetten wurden 1 ml auf 30 °C temperierter Beladungspuffer und ein Rührsteinchen vorgelegt. Unmittelbar vor der Messung wurde 1 ml Zellsuspension zugegeben.

Die Antagonisten wurden in mindestens zwei unterschiedlichen Konzentrationen, die eine Hemmung im Bereich zwischen 20 und 80 % bewirkten, getestet. Die Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen an unterschiedlichen Versuchstagen wurden zur Berechnung der IC₅₀-Werte herangezogen.

$$\text{Hemmung}[\%] = 100\% - \frac{[\text{Ca}^{2+}]_i - \text{Anstieg (Antagonist + 10 nM NPY)}[\text{nM}]}{[\text{Ca}^{2+}]_i - \text{Anstieg (Kontrolle)}[\text{nM}]} \cdot 100\%$$

5.5.4 Kalibrierung und Berechnung des [Ca²⁺]_i-Anstiegs

Zur Berechnung der Ca²⁺-Konzentration wird das Verhältnis der beiden Signale ($\lambda_{\text{Em}} = 510$ nm) bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm herangezogen: $R = F_{340} / F_{380}$. Pro Versuchstag wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz (R_{max}) wurde die Zellsuspension mit 10 μl Digitonin-Lösung versetzt. Dadurch lysieren die Zellen, und der Farbstoff kann mit dem Ca²⁺ aus dem Beladungspuffer reagieren. Durch die anschließende Zugabe von 50 μl der EGTA-Lösung wird das gesamte Ca²⁺ komplexiert, und man erhält das minimale Signal (R_{min}). Die Berechnung des Ca²⁺-Anstiegs erfolgte gemäß der Grynkiewicz-Gleichung (Grynkiewicz et al., 1984):

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \cdot \frac{(R - R_{\text{min}})}{(R_{\text{max}} - R)} \cdot \text{SFB}$$

K_D (=224 nM) ist dabei die Dissoziationskonstante des Fura-2-Ca²⁺-Komplexes. Der SFB-Wert wird ebenfalls bei der Kalibrierung bestimmt und stellt den Quotienten der Fluoreszenz von Ca²⁺-freiem und Ca²⁺-gebundenem Fura bei Anregung - Wellenlänge 380 nm dar.

Um Korrekturen des durch den Filtereffekt von BodipyFL-NPY **6** veränderten Ratio durchzuführen, wurde folgende Gleichung in die obige für R eingesetzt:

$$R_{\text{korr}} = \frac{(F_{340} - F_{340\text{Subst}})}{(F_{380} - F_{380\text{Subst}})}$$

Die Werte $F_{340\text{Subst}}/F_{380\text{Subst}}$, wurden für **6** durch Messung des Signals an nichtbeladenen Zellen ermittelt.

5.6 Bestimmung der Rezeptorbindungskonstanten mit der Durchflusszytometrie

5.6.1 Messanordnung

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit dem Gerät FACS-Calibur™ der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Die Messanordnung ist in Abb. 90 schematisch dargestellt.

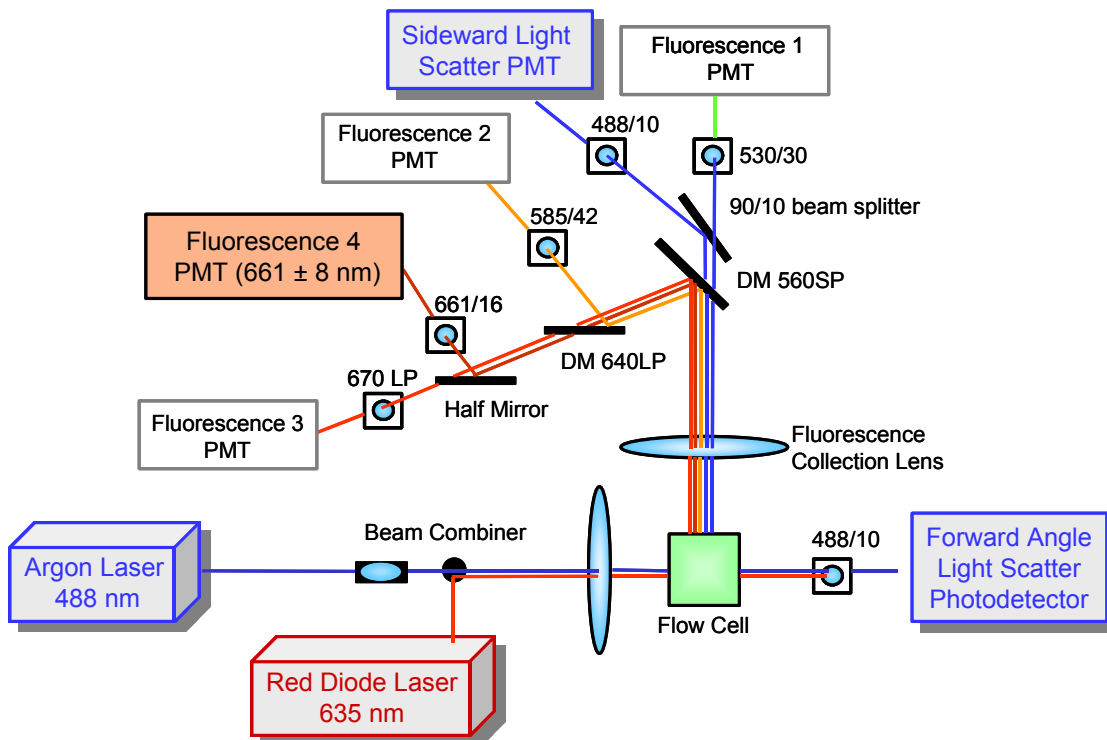


Abb. 90: Schematische Darstellung des optischen Systems des FACS-Calibur[®], LP: Langpassfilter SP: Kurzpassfilter, für die Bandpassfilter ist die maximale Transmission und Bandweithälfte angegeben.

Da das Signal der Vorwärtsstreuung als Trigger für die Fluoreszenz 4 dient, ist die zeitliche Differenz und damit die Flussgeschwindigkeit bzw. Druckdifferenz entscheidend für reproduzierbare Messungen. Hier sind nochmals die Charakteristika der Fluoreszenzkanäle aufgelistet: Fluoreszenz 1: 530 ± 30 nm, Fluoreszenz 2: 585 ± 42 nm, Fluoreszenz 4: 661 ± 16 nm und Fluoreszenz 3: > 670 nm.

5.6.2 Vorbereitung der Zellen

HEL-Zellen wurden entsprechend dem Ca^{2+} -Assay am Tag zuvor mit frischem Medium 1:6 verdünnt. Adhärenz wachsende Zelllinien wurden in 175-cm^2 -Flaschen zur Konfluenz bzw. erforderlichen Dichte wachsen gelassen. Am Versuchstag wurden die Zellen, wenn erforderlich, abtrypsiniert, zentrifugiert, (bei RT, 200 g, 5-7 min) einmal mit Puffer II gewaschen und

in wenig Bindungspuffer II aufgenommen. Das Cy5-NPY wurde im erforderlichen Volumen in 10 mM HCl gelöst, so dass eine Gebrauchskonzentration von 3 bzw. 1 μ M (Gleichgewichtsbedingungen) erreicht wurde. Nach dem Zählen wurden die Zellen mit Bindungspuffer II auf $1 \cdot 10^6$ /ml (HEL-Zellen) bzw. $0,5 \cdot 10^6$ /ml (HEC-1B-Y5-/SMS-KAN-Zellen) eingestellt und nachfolgend in silikonisierte Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert.

Pipettierschema: (Volumina in μ l)

	Totale Bindung	Unspezif. Bindung	Testsubstanzen
1. Zellsuspension	980	980	980
2. Bindungsp. II	10	--	200
3. NPY $6 \cdot 10^{-6}$ M	--	10	--
4. Testsubstanzen	--	--	10
5. Cy5-NPY 1	10	10	10

Anschließend wurden die Proben durch Schwenken vorsichtig geschüttelt. Um das Pipettieren mit der Multipette zu ermöglichen, wurde später das Volumen der Zellsuspension auf 1000 μ l erhöht und bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt.

Die Inkubation erfolgte über 60-90 min unter leichtem Schütteln. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und direkt vor der Messung in eiskaltem Puffer II/Accumax resuspendiert. Wenn unter Gleichgewichtsbedingungen gemessen wurde, erfolgte die direkte Messung der Inkubationsansätze.

5.6.3 Geräteeinstellung am FACS-Calibur[®]

Es wurden generell je Probe 20000 Zellen des betreffenden Gates vermessen, im Falle der SMS-KAN-Zellen 100000 Zellen pro Probe. Für die kompetitiven Bindungsversuche an den HEL-Zellen, Y₂-transfizierte SMS-KAN-Zellen und Y₅-transfizierte HEC-1B-Zellen wurden folgende Parameter eingestellt:

Primärer Messparameter: FSC-H

Zählrate: 300-800 Zellen/s

Parameter	Detektorspannung [V]	Amp. Gain	Modus	Schwellenwert
FSC	E-1	-	log	200-360
SSC	300	-	log	260-352
FL-4	426 ^a /505	-	log	-
FL-2-A	-	1000	lin	-

^aam FACS-Calibur[™] der Anästhesie des Universitätsklinikums.

5.7 Berechnung der pharmakologischen Kenngrößen

5.7.1 Abkürzungen und Definitionen

K_D	Dissoziationskonstante des Ligand-Rezeptor-Komplexes
EC_{50}	die molare Konzentration eines Agonisten, die 50 % seines Maximaleffekts hervorruft (Jenkinson et al., 1995).
IC_{50}	die molare Konzentration einer Testverbindung, welche die spezifische Bindung eines Radioliganden um 50 % reduziert oder: die molare Konzentration eines Antagonisten, die den Effekt eines Agonisten um 50 % reduziert (Jenkinson et al., 1995). IC_{50} -Werte sollten immer größer als die entsprechenden K_B - bzw. K_i -Werte sein (Barlow et al., 1997).
n_H bzw. n	Hill-Koeffizient, gibt Auskunft über die Anzahl gleichartiger Bindungsstellen oder Kooperativität der Ligandbindung (Repke und Liebmann, 1986); $n = 1$: homogene Affinität innerhalb der Rezeptorpopulation $n < 1$: negative Kooperativität, Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität $n > 1$: positive Kooperativität
K_B bzw. pK_B	Dissoziationskonstante bzw. negativ dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten eines Antagonisten; Nomenklatur im funktionellen Test
K_i	Inhibitor konstante einer Substanz oder Dissoziationskonstante eines Enzym-Inhibitor-Komplexes (Cheng und Prusoff, 1973); Nomenklatur in der Enzymkinetik und in der Radioligandbindung (Craig, 1993)

Alle Berechnungen auf Grundlage computergestützter, nichtlinearer Kurvenanpassung wurden mit dem Programm **Fig. P** (Fa. Biosoft, Cambridge, UK) durchgeführt.

5.7.2 Berechnung von K_D -Werten aus Sättigungsexperimenten (Radioligandbindung)

Die Bestimmung des K_D -Wertes des Radioliganden aus Sättigungsexperimenten erfolgte mit der Gleichung für allosterische Hill-Kinetik:

$$y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{x}{x_{50}}\right)^{-P}}$$

wobei gilt: y = spezifische Bindung und x = Konzentration des freien Radioliganden. **Min** wurde als 0 fixiert. Die Parameter **Max** (maximale spezifische Bindung), x_{50} und **P** wurden berechnet. x_{50} entspricht dem K_D -Wert und **P** ist das mathematische Äquivalent des Hill-Koeffizienten n_H .

5.7.3 Berechnung von IC_{50} -Werten aus Kompetitionskurven im Radioligandbindungsassay

Zur Bestimmung der Y_1 -, Y_2 - und der Y_5 -antagonistischen Aktivität von ausgewählten Testsubstanzen wurden im Radioligandbindungsassay Konkurrenzexperimente mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen durchgeführt. Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mit folgender Formel auf der Grundlage der Hill-Gleichung:

$$y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{x}{x_{50}}\right)^{-P}}$$

wobei gilt: y = spezifisch und unspezifisch gebundene Radioaktivität, x = Konzentration der Testsubstanz. Die Parameter **Min** (unspezifische Bindung) und **Max** (totale Bindung) wurden entsprechend den jeweiligen Versuchsdaten festgelegt. x_{50} (Substanzkonzentration, welche die spezifische Bindung um 50 % erniedrigt, entspricht IC_{50}) und **P** (entspricht dem Hill-Koeffizienten n_H) wurden berechnet.

5.7.4 Berechnung von EC_{50} -Werten aus Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Im Ca^{2+} -Assay an HEL-Zellen wurden zur genaueren Charakterisierung der Y_1 -agonistischen Aktivität verschiedener Peptide Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Der durch die jeweilige Peptidkonzentration induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wurde als prozentualer Wert des durch 10 nM NPY induzierten Effektes angegeben.

Aus Kostengründen wurden nur mit einigen Peptiden komplette Dosis-Wirkungskurve erstellt. Die Datenauswertung erfolgte wieder auf Grundlage der Hill-Gleichung analog 5.7.3, wobei gilt:

$y = [Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in %, x = Agonistenkonzentration. Die Parameter **Min** (minimaler Effekt) und **Max** (maximaler Effekt) wurden als 0 % bzw. 100 % festgelegt. Die Parameter x_{50} (Agonistenkonzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft, entspricht EC_{50}) und **P** (entspricht dem Hill-Koeffizienten n_H) wurden berechnet.

5.7.5 Berechnung von IC_{50} -Werten für die antagonistische Wirkung im Ca^{2+} -Assay und in der Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Y_1 -antagonistischen Aktivität wurden die Verbindungen im Ca^{2+} -Assay an HEL-Zellen getestet. Aus Kostengründen und um den experimentellen Aufwand in einem angemessenen Rahmen zu halten, wurde auf die Erstellung kompletter Konzentrations-

Wirkungs-Kurven von NPY in Gegenwart der Testverbindung verzichtet. Zur Bestimmung der Y_1 -antagonistischen Aktivität wurde die Hemmung des durch 10 nM NPY ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bei unterschiedlichen Antagonisten-Konzentrationen [B] bestimmt. Um einen Vergleich der Wirkstärken verschiedener, in unterschiedlichen Konzentrationen getesteter Verbindungen zu ermöglichen, wurde aus den Werten für die prozentuale Hemmung (P) als vergleichbare Größe der IC_{50} -Wert abgeleitet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer linearisierten Form der Hill-Gleichung:

$$\log \frac{P(\%)}{100\% - P(\%)} = n \log [B] - n \log IC_{50}$$

wobei gilt: $\log \frac{P(\%)}{100\% - P(\%)} = \text{logit}(P)$

Die Werte für die prozentuale Hemmung wurden nach logit-Transformation in einem Plot $\text{logit}(P)$ gegen $\log [B]$ aufgetragen und die IC_{50} -Werte ($\text{logit}(P) = 0$) über eine lineare Regression (Fig. P) berechnet. Die Steigung n der so erhaltenen Geraden entspricht dem Hill-Koeffizienten n_H .

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte mit dem hier aufgeführten Verfahren sollten die Werte für die prozentuale Hemmung im Bereich zwischen 20 % und 80 % liegen, da sich außerhalb dieses Bereichs Streuungen aus den Versuchsdaten sehr stark auf die berechneten Werte auswirken.

Für die aus der Durchflusszytometrie gewonnenen Daten: Die Dateien im FCS 2.0-Format (standardisiertes Listenformat) wurden mit dem Programm WinMDI ausgewertet. Dazu wurde bei den jeweiligen Kontrollzellen ein Gate im Streulichtdiagramm (FSC gegen SSC) gesetzt.

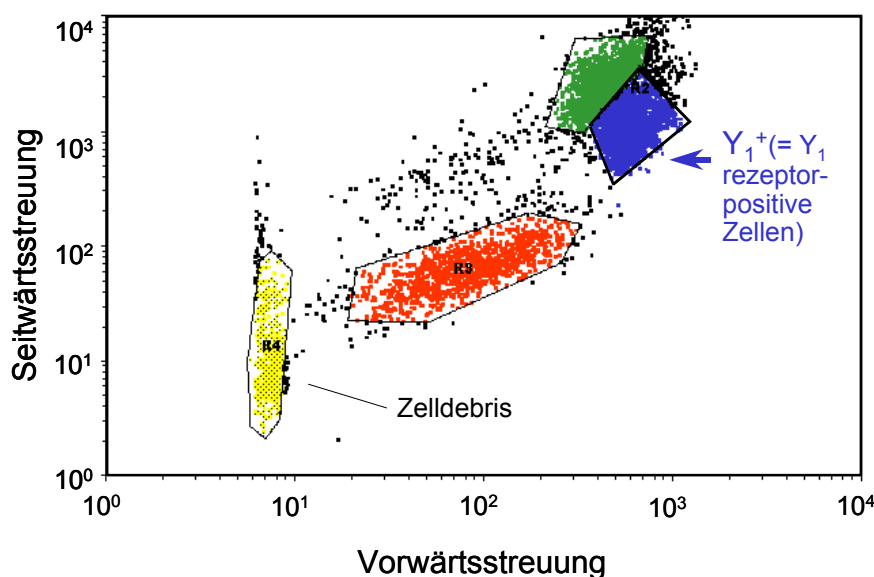


Abb. 91: Streulichtdiagramm am Beispiel der HEL-Zellen, durch das Eingrenzen der rezeptorpositiven Zellen mit einem Gate ist eine selektive Auswertung möglich.

Das geometrische Mittel der Fluoreszenz im entsprechenden Kanal der in diesem konstanten Gate befindlichen Zellen wurde dann für jede Probe ermittelt. Diese Werte dienten dann zur weiteren Auswertung entsprechend der Radioligandbindung (Abschnitt 5.7.2)

6 Literaturverzeichnis

- Alpha-Bazin, B., Bazin, H., Préaudat, M., Trinquet, E., Mathis, G. (2001) Rare earth cryptates and trace technology as tools for probing molecular interactions in biology. *New trends in Fluorescence Spectroscopy, Applications to Chemical and Life Sciences*, Springer Verlag: 439-455.
- Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairret, S., Chelsky, D., Dennis, M., Bouvier, M. (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97(7): 3684-3689.
- Arvidsson, K., Land, T., Langel, U., Bartfai, T., Ehrenberg, A. (1993) Solution structure by 2D ¹H-NMR of a chimeric peptide recognized by galanin and neuropeptide Y receptors. *Biochemistry* 32: 7787-7798.
- Aubin, J. (1979) Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 36-43.
- Baindur, N., Triggler, D.J. (1994) Concepts and progress in the development and utilization of receptor-specific fluorescent ligands. *Med. Res. Rev.* 14(6): 591-664.
- Banks, P., Gosselin, M., Pristay, L. (2000) Fluorescence polarization assays for high throughput screening of G protein-coupled receptors. *J. Biomol. Screen.* 5(3): 159-167.
- Barlow, R.B., Bond, S.M., Bream, E., Macfarlane, L., McQueen, D.S. (1997) Antagonist inhibition curves and the measurement of dissociation constants. *Br. J. Pharmacol.* 120: 13-18.
- Bedoui, S., Kuhlmann, S., Nave, H., Drube, J., Pabst, R., von Horsten, S. (2001) Differential effects of neuropeptide Y (NPY) on leukocyte subsets in the blood: mobilization of B-1-like B-lymphocytes and activated monocytes. *J. Neuroimmunol.* 117: 125-132.
- Benson, R. C., Meyer, R. A., Zaruba, M. E. (1979) Cellular autofluorescence - is it due to flavins? *J. Histochem. Cytochem.* 27: 44-48.
- Biedler, J.L., Helson, L., Spengler, B.A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33: 2643-2652.
- Blundell, T.L., Pitts, J.E., Tickle, I.J., Wood, S.P., Wu, C.W. (1981) X-ray analysis (1.4 Å resolution) of avian pancreatic polypeptide: small globular protein hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4175-4179.
- Böhmer, M., Enderlein, J. *Confocal laser scanning detection of molecules on surfaces, single-molecule detection in solution: Methods and applications.* C. Zander, R. R. Keller and J. Enderlein (ed.). In Press: VCH-Wiley.
- Böhmer, M., Pampaloni, F., Wahl, M., Rahn, H.-J., Erdmann, R., Enderlein, J. Time-resolved confocal scanning device for ultrasensitive fluorescence detection. In Press: *Rev. Sci. Instrum.*
- Bohn, B. (1980) Flow cytometry: a novel approach for the quantitative analysis of receptor-ligand interactions on surfaces of living cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 20: 1-15.
- Boonen, G., Häberlein, H. (1999) Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie – eine neue biophysikalische Analysenmethode. *DAZ* 18: 54-60.
- Boonen, G. et al. (2000) Evidence for specific interactions between kavain and human cortical neurons monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Planta Medica* 66(1): 7-10.

- Boulanger, Y., Chen, Y., Commodari, F., Senecal, L., Laberge, A.M., Fournier, A., St-Pierre, S. (1995) Structural characterizations of neuropeptide tyrosine (NPY) and its agonist analog [Ahx5-17]NPY by NMR and molecular modeling. *Int. J. Pept. Protein Res.* 45: 86-95.
- Buehler, C., Stoeckli, K., Auer, M. (2001) The integration of single molecule detection technologies into miniaturized drug screening: current status and future perspectives. *New trends in fluorescence spectroscopy, applications to chemical and life sciences.* Springer Verlag, Berlin: 331-379.
- Buschauer, A., Bernhardt, G., Dove, S. (2000) NPY-Rezeptoren als Zielstrukturen für neue Arzneistoffe. *Pharm. Ztg.* 24: 1955-1962.
- Cheng, YC., Prusoff, WH. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor, which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108.
- Cowley, D.J., Hoflack, J.M., Pelton, J.T., Saudek, V. (1992) Structure of neuropeptide Y dimer in solution. *Eur. J. Biochem.* 205: 1099-1106.
- Cox, H. (1993) The role of NPY and related peptides in the control of gastrointestinal function. In: Colmers, W. F., Wahlestedt, C. (Herausg.) *The biology of neuropeptide Y and related peptides*, Humana Press, Totowa: 273-313.
- Cox, H.M., Tough, I.R. (1995) Functional characterization of receptors with affinity for PYY, NPY, [Leu31, Pro34]NPY and PP in a human colonic epithelial cell line. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2673-2678.
- Craig, DA. (1993) The Cheng-Prusoff relationship: something lost in the translation. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 89-91.
- Daugerty, P. S., Iverson, B. L., Georgiou, George (2000) Flow cytometric screening of cell-based libraries. *J. Immunol. Methods* 243: 211-227
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, MR. (1999) Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications. *Exp. Cell Res.* 249: 1-12.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytom.* 27: 1-20.
- Dawe, C.J. und Potter, M. (1957) Morphologic and biologic progression of a lymphoid neoplasm of the mouse in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.* 33: 603.
- Demchenko, A. P. (1981) *Ultraviolet spectroscopy of proteins*, Springer-Verlag, New York.
- Denzin, L. K., Whitlow, M., Voss, E. W. (1991) Single-chain site-specific mutations of fluorescein-amino acid contact in high affinity monoclonal antibody 4-4-20. *J. Biol. Chem.* 266: 14095-14103.
- Doods, H., Gaida, W., Wieland, H.A., Dollinger, H., Schnorrenberg, G., Esser, F., Engel, W., Eberlein, W., Rudolf, K. (1999) BIIE 0246: a selective and high affinity neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 384: R3-R5
- Eisinger, J., Flores, J. (1985) Fluorometry of turbid and absorbant samples and the membrane fluidity of intact erythrocytes. *Biophys. J.* 48(1): 77-84.
- Emmerson, P.J., Archer, S., El-Hamouly, W., Mansour, A., Akil, A., Medzihradsky, F. (1997) Synthesis and characterization of 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-Diaza-s-indacene (Bodipy)-labeled fluorescent ligands for the Mu Opioid Receptor. *Biochem. Pharmacol.* 54: 1315-1322.

- Fabry, M., Langer, M., Rothen-Rutishauser, B., Wunderli-Allenspach, H., Höcker, H., Beck-Sickingher, A. G. (2000) Monitoring of the internalization of neuropeptide Y on neuroblastoma cell line SK-N-MC. *Eur. J. Biochem.* 267: 5631-5637.
- Fay, SP., Posner, RG., Swann, WN., Sklar, LA. (1991) Real-time analysis of the assembly of ligand, receptor, and G protein by quantitative fluorescence flow cytometry. *Biochem.* 30: 5066-5075.
- Feth, F., Rascher, W., Michel, MC. (1992) Neuropeptide Y (NPY) receptors in HEL cells. Comparison of binding and functional parameters for full and partial agonists and a non-peptide antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 105 : 71-76.
- Finney, N. S. (1998) Fluorescence assays for screening combinatorial libraries of drug candidates. *Curr. Opin. Drug Discovery. Dev.* 1: 98-105.
- Franco-Cereceda, A., Liska, J. (1998) Neuropeptide Y Y1 receptors in vascular pharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* 349(1):1-14.
- Futamura, A., Beechem, J. M., Gettins, P. G. W. (2001) Conformational Equilibrium of the Reactive Center Loop of Antithrombin Examined by Steady State and Time-Resolved Fluorescence Measurements: Consequences for the Mechanism of Factor Xa Inhibition by Antithrombin-Heparin Complexes. *Biochem.* 40: 6680-6687.
- Gebele, K. (1998) Zelluläre Testsysteme zur pharmakologischen Charakterisierung neuer Neuropeptid Y-Rezeptorantagonisten. Dissertation, Universität Regensburg.
- Gerald, C., Walker, M.W., Criscione, L., Gustafson, E.L., Batzl-Hartmann, C., Smith, K.E., Vaysse, P., Durkin, M.M., Laz, T.M., Linemeyer, D.L., Schaffhauser, A.O., Whitebread, S., Hofbauer, K.G., Taber, R.I., Branchek, T.A., Weinshank, R.L. (1996) A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature (London)* 382: 168-171.
- Gicquiaux, H., Lecat, S., Gaire, M., Dieterlen, A., Mély, Y., Takeda, K., Bucher, B., J.L. Galzi (2001) Rapid internalization and recycling of the human neuropeptide Y Y₁ receptor. *J. Biol. Chem.:* in Druck.
- Gilman-Sachs, A. (1994) Flow Cytometry. *Anal. Chem.* 66: 700-707.
- Grundemar, L., Häkanson, R. (1994) Neuropeptide Y effector systems: perspectives for drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 153-159.
- Grundemar, L., Wahlestedt, C., Reis, D.J. (1991) Long-lasting inhibition of the cardiovascular responses to glutamate and the baroreceptor reflex elicited by neuropeptide Y injected into the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neurosci. Lett.* 122: 135-139.
- Grundemar, L., Wahlestedt, C., Reis, D.J. (1991) Neuropeptide Y acts at an atypical receptor to evoke cardiovascular depression and to inhibit glutamate responsiveness in the brainstem. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 633-638.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-4350.
- Hahn, T. M.; Breininger, J. F.; Baskin, D. G.; Schwartz, M. W (1998) Coexpression of AGRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* 1: 271-272.
- Harvey, A.L. (1998) Sense, nonsense and antisense: Different approaches to drug discovery. *Advances in Drug Discovery Techniques.* Wiley, Chichester.

- Heithier, H., Hallmann, D., Boege, F., Reilander, H., Dees, C., Jaeggi, K.A., Arndt-Jovin, D., Jovin, T.M., Helmreich, E.J. (1994) Synthesis and properties of fluorescent β -adrenoceptor ligands. *Biochemistry* 33: 9126-9134.
- Hercules, D.M., Frankel, H. (1960) Colloidal silica as a standard for measuring absolute fluorescence yield. *Science* 131: 1611-1612.
- Hill, S. J., Ganellin, C. R., Timmerman, H., Schwartz, J. C., Shankley, N. P., Young, J. M., Schunack, W., Levi, R., Haas, H. L. (1997) International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 49: 253-278.
- Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H. (Hrsg.) (1978) *Biophysik: Ein Lehrbuch*. Springer-Verlag, Berlin.
- Hulme, E.C., Birdsall, N. J. M. (1992) Strategy and tactics in receptor-binding studies, in *Receptor-Ligand Interactions, A Practical Approach* (Hulme, E. C., ed.) IRL, Oxford U.K., S. 63-176.
- Hutzler, C., Kracht, J, Mayer, M., Graichen, F., Bauer, B., Schreiber, E., Bollwein, S., Bernhardt, G., Dove, S., Fricker, G., Buschauer, A. (2001) N^G-Acylylated argininamides: highly potent selective NPY Y₁ receptor antagonists with special properties, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Halle, 10.-13. Oktober, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 334 (Suppl. 2): 17 (V1-14).
- Hutzler, C. (2001) *Synthese und pharmakologische Aktivität neuer Neuropeptid Y Rezeptorliganden: Von N,N-disubstituierten Alkanamiden zu hochpotenten Y₁-Antagonisten der Argininamid-Reihe*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., Decarr, L.B., Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Peiling, J., Lewis-Higgins, L. Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velazquez, N., McGaleb, M. (1996) Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J. Biol. Chem.* 271: 26315-26319.
- Ingenhoven, N., Beck-Sickinger, AG. (1997) Fluorescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterization of cells expressing NPY receptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res* 17: 407-18.
- Jenkinson, D.H., Barnard, E.A., Hoyer, D., Humphrey, P.P.A., Leff, P., Shankley, N.P., (1995) International Union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XI. Recommendations on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 47: 255-266.
- Jongkind, JF, Verkerk, A, Visser, WJ, Van Dongen, JM. (1982) Isolation of autofluorescent 'aged' human fibroblasts by flow sorting. *Exp. Cell. Res.* 138: 409-417.
- Kanaoka, Y. (1977) *Organische Fluoreszenzreagentien für die Untersuchung von Enzymen und Proteinen*. *Angew. Chem.* 89: 142-152.
- Karolin, J; Johansson, L. B.-A., Strandberg, L., Ny, T. (1994) Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes, and proteins. *J. Am. Chem. Soc.:* 116: 7801-7806.
- Keffel, S., Schmidt, M., Bischoff, A., Michel, MC. (1999) Neuropeptide-Y stimulation of extracellular signal-regulated kinases in human erythroleukemia cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291(3):1172-1178.
- Kenakin, T. (1997) Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry. *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 456-464.

- Klonis N, Clayton AH, Voss EW Jr, Sawyer WH. (1998) Spectral properties of fluorescein in solvent-water mixtures: applications as a probe of hydrogen bonding environments in biological systems. *Photochem. Photobiol.* 67(5): 500-510.
- Koenig, J.A. (1999) Radioligand binding in intact cells, in: *Methods in Molecular Biology*, 106: Receptor Binding Techniques, Humana Press Inc., Totowa, NJ: 89-98.
- Kracht, J. (2001) Bestimmung der Affinität und Aktivität subtypeselektiver Histamin- und Neuropeptid Y-Rezeptorliganden an konventionellen und neuen pharmakologischen In-vitro-Modellen. Dissertation, Universität Regensburg.
- Kroeger, K.M., Hanyaloglu, A.C., Seebe,r R.M., Miles, L.E., Eidne, K.A. (2001) Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 276(16): 12736-12743.
- Lakowicz, J.R. (Hrsg.) (1999) *Principles in fluorescence spectroscopy*, second edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Li, L. (2001) Synthesis and pharmacological activity of fluorescent ligands for neuropeptide Y, histamine H₁ and H₂ receptors. Dissertation, Universität Peking.
- Lide, D.R. (Hrsg.) (1994) *Handbook of Chemistry and Physics, a ready-reference book of chemical and physical data (75th Edition)*.CRC Press.
- Lin, K., Sadée, W., Quillan, J.M. (1999) Rapid measurements of intracellular calcium using a fluorescence plate reader. *Biotechniques* 26: 318-326.
- Lundell, I., Statnick, M.A., Johnson, D., Schober, D.A., Starback, P., Gehlert, D.R., Larhammer, D. (1996) The cloned rat pancreatic polypeptide receptor exhibits profound differences to the orthologous human receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5111-5115.
- Malmström, R. E., Lundberg J. M. (1997) Neuropeptide Y in sympathetic nerves – evidence for Y1 receptor mediated vascular control. In: Grundemar, L., Bloom, S. R. (Herausg.) *Neuropeptide Y and drug development*, Academic Press, San Diego, S. 41-55.
- Manning Jr., T.J., Sontheimer, H. (1999) Recording of intracellular Ca²⁺, Cl⁻, pH and membrane potential in cultured astrocytes using a fluorescence plate reader. *J. Neurosci. Methods* 91: 73-81.
- Mannon, P.J., Mervin, S.J., Sheriff-Carter, K.D. (1994) Characterization of a Y₁-preferring NPY/PYY receptor in HT-29 cells. *Am. J. Physiol.* 267: G901-907.
- Martens, C., Bakker A., Rodriguez A., Mortensen RB., Barrett RW. (1999) A generic particle-based nonradioactive homogenous multiplex method for high-throughput screening using microvolume fluorimetry. *Anal. Biochem.* 273: 20-31.
- Mattheakis, L. C., Ohler, L. D. (2000) Seeing the light: calcium imaging in cells for drug discovery. *Drug Discov. Today*, HTS suppl. 1(1): 15-19.
- Martin, P., Papayannopoulou, T. (1982) HEL cells, a new erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science* 216: 1233-1235.
- Mayer, M., Li, L., Kracht, J., Bernhardt, G., Buschauer, A. (2000) Determination of receptor binding constants by flow cytometry under equilibrium conditions, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Münster, 4.-7. Oktober. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 333, Suppl. 2: 51 (P 1.53).

- Mayer, M., Li, L., Kracht, J., Bernhardt, G., Buschauer, A. (2001) Determination of neuropeptide Y receptor binding constants by flow cytometry under equilibrium conditions, 6th International Neuropeptide Y Conference, Sydney, 22.-26. April, Abstract, (P.23).
- McGrath, J.C., Arribas, S., Daly, C.J. (1996) Fluorescent ligands for the study of receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 393-399.
- Mellentin-Michelotti, J., Evangelista, L.T., Swartzman, E.E., Miraglia, S.J., Werner, W.E., Yuan, P.-M. (1999) Determination of ligand binding affinities for endogenous seven-transmembrane receptors using fluorometric microvolume assay technology. *Anal. Biochem.* 272: 182-190.
- Michel, M.C. (1998) Concomitant regulation of Ca^{2+} mobilization and G13 expression in human erythroleukemia cells. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 135-141.
- Michel, M.C., Beck-Sickinger, A., Cox, H., Doods, H.N., Herzog, H., Larhammer, D., Quirion, R., Schwartz, T., Westfall, T. (1998) XVI. International Union of Pharmacology. Recommendations for the Nomenclature of Neuropeptide Y, Peptide YY, and Pancreatic Polypeptide Receptors. *Pharmacol. Rev.* 50: 143-150.
- Morse, K. L., Behan, J., Laz, T. M., West, R. E. Jr., Greenfeder, S. A., Anthes, J. C., Umland, S., Y. Wan, Hipkin, R. W., Gonsiorek, W., Shin, N., Gustafson, E. L., Qiao, X., Wang, S., Hedrick, J. A., Greene, J., BAYNE, M., Monsma, F. J. Jr. (2001) Cloning and Characterization of a Novel Human Histamine Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296: 1058-1066.
- Moser, C. (1999) Klonierung und funktionelle Expression des humanen Y_5 -Rezeptors in HEC-1B-Zellen. Dissertation: Universität Regensburg.
- Moser, C., Bernhardt G., Michel J., Schwarz H., Buschauer A. (2000) Cloning and functional Expression of the hNPY Y_5 receptor in human endometrial cancer (HEC-1B) cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78: 134-142.
- Motulsky, H.J., Michel, M.C. (1988) Neuropeptide Y mobilizes Ca^{2+} and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells. *Am. J. Physiol.* 255: E880-885.
- Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Mujumdar, S. R., Lewis, C.J., Waggoner, A. S. (1993) Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconj. Chem.* 4: 105-111.
- Müller, M., Knieps, S., Gessele, K., Dove, S., Bernhard, G., Buschauer, A. (1997) Synthesis and neuropeptide Y Y_1 receptor activity of N,N-disubstituted ω -guanidino- and ω -aminoalkanoic acid amines. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 330: 333-342.
- Müller, G. (2000) Towards 3D structures of G protein-coupled receptors: a multidisciplinary approach. *Curr. Med. Chem.* 7: 861-888.
- Nakamura, M., Yokoyama, M., Watanabe, H., Matsumoto, T. (1997) Molecular cloning, organization and localization of the gene for the mouse neuropeptide Y- Y_5 receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1328: 83-89.
- Nolan, J. P., Lauer, S., Prosnitz, E. R., Sklar, L. A. (1999) Flow cytometry: a versatile tool for all phases of drug discovery. *Drug Discov. Today* 4(4): 173-180.
- Novak, E. J., Rabinovitch, P. S. (1994) Improved sensitivity in flow cytometric intracellular ionized calcium measurements using fluo-3/Fura Red fluorescence ratios. *Cytom.* 17: 135-141.
- Nygren, J. (1999) Characterization of fluorescent dyes for biochemical applications chemometric analysis of spectroscopic data. Dissertation, Chalmers University of Technology, Göteborg.

- Oda, T., Morikawa, N., Saito, Y., Masuho, Y., Matsumoto, S.I. (2000) Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J. Biol. Chem.* 275: 36781-36786.
- Ohno, S., Shirai, A., Ueda, A., Igarashi, T., Ishigatsubo, Y., Tani, K., Okubo, T., Hikawa, N., Kawakami, T., Takenaka, T. (1991) Increase in intracellular calcium induced by stimulating histamine H1 receptors in macrophage-like P388D1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 1156-1163.
- Owicki, JC (2000) Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer. *J. Biomol. Screen.* 5(5): 297-306.
- Park, Y-W., Cummings, R. T, Wu, L., Zheng, S., Cameron, P.M., Woods, A., Zaller, D.M., Marcy, A.I., Hermes, J.D. (1999) Homogeneous proximity tyrosine kinase assays: scintillation proximity assay versus homogeneous time-resolved fluorescence. *Anal. Biochem.* 269: 94-104.
- Parker, D.; Soderberg, C.; Zotova, E.; Shupliakov, O.; Langel, U.; Bartfai, T.; Larhammar, D.; Brodin, L.; Grillner, S. (1999) Co-localized neuropeptide Y and GABA have complementary presynaptic effects on sensory synaptic transmission. *Eur. J. Neurosci.* 10: 2856-2870.
- Parker, S. L., Kane, J. K, Parker, M. S., Berglund, M. M., Lundell, I. A., Li, M. D. (2001) Cloned neuropeptide Y (NPY) Y1 and pancreatic polypeptide Y4 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells show considerable agonist-driven internalization, in contrast to the NPY Y2 receptor. *Eur. J. Biochem.* 268: 877-886
- Penniston, J.T. (1982) Fluorescence polarization measurement of binding of fluorescein to albumin. *Exp. Eye Res.* 34(3): 435-443.
- Raposo, P. D., Broqua P., Hayward, A., Akinsanya, K., Galyean, R., Schteingart, C., Junien, J. L., Aubert, M. L. (2000) Stimulation of the gonadotropic axis by the neuropeptide Y receptor Y1 antagonist/Y4 agonist 1229U91 in the male rat. *Neuroendocrinol.* 71:2-7.
- Repke, H., Liebmann, C. (Hrsg.) (1987) *Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme.* Akademie-Verlag, Berlin.
- Roederer, M, Murphy, R. F. (1986) Cell-by-cell autofluorescence correction for low signal-to-noise systems: application to epidermal growth factor endocytosis by 3T3 fibroblasts. *Cytometry* 7(6):558-565.
- Ross, R. A., Biedler, J. L., Spengler, B. A., Reis, D. J. (1981) Neurotransmitter-synthesizing enzymes in 14 human neuroblastoma cell lines. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1: 301-312.
- Ruegger, H., Rigollier, P., Yamaguchi, Y., Schmidlin, T., Schilling, W., Criscione, L., Whitebread, S., Chiesi, M., Walker, MW., Dhanoa, D., Islam, I., Zhang, J., Gluchowski, C. (2000) Design, synthesis and SAR of a series of 2-substituted 4-amino-quinazoline neuropeptide Y Y5 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 1175-1179.
- Saudek, V., Pelton, J.T. (1990) Sequence-specific ¹H NMR assignment and secondary structure of neuropeptide Y in aqueous solution. *Biochemistry* 29: 4509-4515.
- Schobel, U., Egelhaaf, H.-J., Brecht, A., Oelkrug, D., Gauglitz, G. (1999) New donor-acceptor pair for fluorescent immunoassays by energy transfer. *Bioconj. Chem.* 10: 1107-1114.
- Schütz, G. J., Pastushenko, V.Ph., Gruber, H. J., Knaus, H.-G., Pragl, B., Schindler, H. (2000) 3D Imaging of Individual Ion Channels in Live Cells at 40 nm Resolution. *Single Mol.* 1: 25-31.

- Schwedt, G. (1981) Fluorimetrische Analyse, Methoden und Anwendungen. Verlag Chemie, Weinheim.
- Seethala, R., Menzel, R. (1997) A homogenous fluorescence polarization assay for Src-family tyrosine kinases. *Anal. Biochem.* 253: 210-218.
- Serradeil-Le Gal, C., Lafontan, M., Raufaste, D., Marchand, J., Pouzet, B., Casellas, P., Pascal, M., Maffrand, J.P., Le Fur, G. (2000) Characterization of NPY receptors controlling lipolysis and leptin secretion in human adipocytes. *FEBS Lett.* 475(2):150-156.
- Shapiro, H. M. (1995) *Practical Flow Cytometry*, 3rd Edition Wiley Liss, New York: 238.
- Sheikh, S.P., Williams, J.A. (1990) Structural characterisation of Y1 and Y2 receptors for neuropeptide Y and peptide YY by affinity cross-linking. *J. Biol. Chem.* 265: 8304-8310.
- Sklar, L.A., Finney, D.A. (1982) Analysis of Ligand-Receptor Interactions with the Fluorescence Activated Cell Sorter. *Cytom.* 3(3): 161-165.
- Slavik, J. (Hrsg.) (1994) *Fluorescent probes in cellular and molecular biology*. HCRC Press, Boca Raton, FL.
- Southwick, P.L., Ernst, L.A., Tauriello, E.W., Parker, S.R., Mujumdar, R.B., Mujumdar, S.R., Clever, H.A., Waggoner A.S. (1990) Cyanine dye labeling reagents--carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytom.* 11: 418-430.
- Soini, E., Kojola, H. (1983) Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates - A new generation of nonisotopic immunoassays. *Clin. Chem.* 29: 65-68.
- Sportsman, J.R., Leytes, L.J. (2000) Miniaturization of homogenous assays using fluorescence polarization. *Drug Discov. Today*, HTS suppl. 1(1): 27-32.
- Stenroos, K., Hurskainen, P., Eriksson, S., Hemmilä, I., Blomberg, K., Lindqvist, C. (1998) Homogenous time-resolved IL-2-IL-2R α assay using fluorescence resonance energy transfer. *Cytok.* 10(7): 495-499.
- Sundler, F., Böttcher, G., Ekblad, E., Håkanson, R. (1993) PP, PYY and NPY: Occurrence and distribution in the periphery. In: Colmers, W.F. Wahlestedt, C. (Eds.), *The biology of neuropeptide Y and related peptides*. Humana Press: Totowa, New Jersey. 157-196.
- Sylte, I., Andrianjara, C.R., Calvet, A., Pascal, Y., Dahl, S.G. (1999) Molecular dynamics of NPY Y1 receptor activation. *Bioorgan. Med. Chem.* 7: 2737-2748.
- Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V. (1982) Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature (London)* 296: 659-660.
- Terpetschnig, E., Szmajcinski, H., Ozinskas, A., Lakowicz, J.R. (1994) Synthesis of squaraine-N-hydroxysuccinimide esters and their biological application as long-wavelength fluorescent labels. *Anal. Biochem.* 217: 197-204.
- Tota, M.R. et al. (1994) Characterization of a fluorescent substance P analog. *Biochem.* 33: 13079-13086.
- Tota, M.R. et al. (1995) Interaction of [fluorescein-Trp]glucagon with the human glucagon receptor expressed in *Drosophila Schneider 2* cells. *J. Biol. Chem.* 270: 26466-26472.
- Turcatti, G.; Vogel, H., Chollet, A. (1995) Probing the binding domain of the NK2 receptor with fluorescent ligands: Evidence that heptapeptide agonists and antagonists bind differently. *Biochem.* 34: 3972-3980.

- Van Duuren, B. L. (1963) Effects of the environment of the fluorescence of aromatic compounds in solution. *Chem. Rev.* 63: 325-354.
- Wieland, K., Engel, W., Eberlein, W., Rudolf, K., Doods, H.N. (1998) Subtype selectivity of the novel nonpeptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist BIBO 3304 and its effect on feeding in rodents. *Brit. J. Pharmacol.* 125: 549-555.
- Wieland, K., Ter Laak, A.M., Smit, M. J., Kühne, R., Timmerman, H., Leurs, R. (1999) Mutational Analysis of the Antagonist-binding Site of the Histamine H1 Receptor. *J. Biol. Chem.* 274 (42): 29994–30000.
- Whitaker, J.E, Haugland, R.P., Ryan, D., Hewitt, P.C., Haugland, R.P., Prendergast, F.G. (1992) Fluorescent rhodol derivatives: versatile, photostable labels and tracers. *Anal. Biochem.* 207(2): 267-279.
- Wohland, T., Fruedrich, K., Hovius, R., Vogel, H. (1999) Study of ligand-receptor interactions by fluorescence correlation spectroscopy with different fluorophores: evidence that the homopentameric 5-hydroxytryptamine type 3As receptor binds only one ligand. *Biochem.* 38: 8671-8681.
- Woldbye, D. (1998) Antiepileptic effects of NPY on pentylentetrazole seizures. *Regul. Pep.* 75-76: 279-282.
- Wimalawansa, S.J. (1995) Purification and biochemical characterization of neuropeptide Y2 receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 18523-18530.
- Young, K. W., Pinnock, R. D., Gibson, W. J., Young, J. M., (1998) Dual effects of histamine and substance P on intracellular calcium levels in human U373 MG astrocytoma cells: role of protein kinase C. *Br. J. Pharmacol.* 123: 545-557.
- Zuck, P., Lao, Z., Skwish, S., Glickman, JF., Yuan, K., Burbaum, J., Inglese, J. (1999) Ligand-receptor binding measured by laser-scanning imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96: 11122-11127.
- Zukowska-Grojec, Z., Pruszczyk, P, Colton, C., Yao J., Shen, G.H., Myers A.K., Wahlestedt, C. (1993) Mitogenic effect of neuropeptide Y in rat vascular smooth muscle cells. *Peptides* 14: 263-268.