

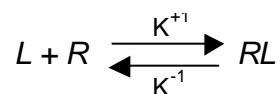
4. Quantitative Analyse der Ligand-Bindungsstudien

Im folgenden Kapitel sollen die grundlegenden analytischen Methoden zur Interpretation der experimentell gewonnenen Bindungsdaten vorgestellt werden. Die klassischen, graphischen Lösungsverfahren wurden zur Ermittlung der Bindungsparameter [z.B. Dissoziationskonstante (K_d), maximale Rezeptoranzahl (B_{max}), maximale Antwort (E_{max}) und effektive Konzentration 50 (EC_{50})] herangezogen. Sie liefern Näherungswerte, die jedoch für viele Fragestellungen eine zunächst ausreichende Information beinhalten.

4.1. Sättigungsexperimente:

4.1.1. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_d) und der Rezeptorenanzahl (B_{max})

Die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand kann durch die Bestimmung der Bindungsparameter K_d und B_{max} näher definiert und quantifiziert werden. Hierbei stellt die Dissoziationskonstante (K_d) ein Maß für die Affinität der Bindungsstelle des Liganden



zum betreffenden Rezeptor dar, die B_{max} steht für die maximale Bindungskapazität, d.h. für die Menge an exprimierten Rezeptoren. Die Messgröße $[RL]$ wird bei konstanter Rezeptorkonzentration $[R]$ als Funktion von $[L]$ ermittelt. Die Interaktion eines Liganden mit einer Bindungsstelle kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_d) folgendermaßen definiert:

$$K_D = \frac{K^{-1}}{K^{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]}$$

Die totale Rezeptorkonzentration $[R_T]$ ergibt sich hierbei aus der freien Rezeptorkonzentration und der Konzentration der im Komplex $[R_T]$ gebundenen Rezeptoren.

Hieraus folgt:

$$[R_T] = [R] + [RL]$$

Durch die Kombination beider Gleichungen und der Auflösung nach RL ergibt sich

$$[RL] = \frac{[R_T] * [L]}{K_D + [L]}$$

Zur Ermittlung von K_D und $[RL]$ durch eine lineare Regression muss die Bindungskurve in eine lineare Form gebracht werden.

Die Linearisierung der Bindungsdaten basiert hierbei auf den Verfahren von SCATCHARD (Scatchard, 1949) für die Interaktion von Proteinen mit kleinen Molekülen. Die Scatchardgleichung lässt sich aus den vorhergehenden Gleichungen folgendermaßen ableiten:

Daraus ergibt sich:

$$\frac{[RL]}{L} = -\frac{1}{K_D} * [RL] + \frac{1}{K_D} * [R_T]$$

R_T =Gesamtkonzentration an Rezeptor

L =Konzentration an freiem Radioliganden

RL =Konzentration an Rezeptor-Liganden-Komplex

K_D =Dissoziationskonstante

In der Literatur hat sich dafür eine andere Nomenklatur eingebürgert:

$[RL]$ =B (bound)

$[L]$ =F (free)

$[R_T]$ = B_{max} (maximal number of binding sites)

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_D} * B + \frac{1}{K_D} * B_{max}$$

Der Scatchard-Plot ergibt sich aus der Auftragung der Konzentration des gebundenen Radioliganden (B) gegen den Quotienten aus gebundenem und freiem Radioliganden (B/F).

Die Neigung der Geraden ergibt den negativ reziproken Wert der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ($-1/K_D$). Der Schnittpunkt mit der Abszisse ergibt die Menge der Bindungsstellen (B_{max}).

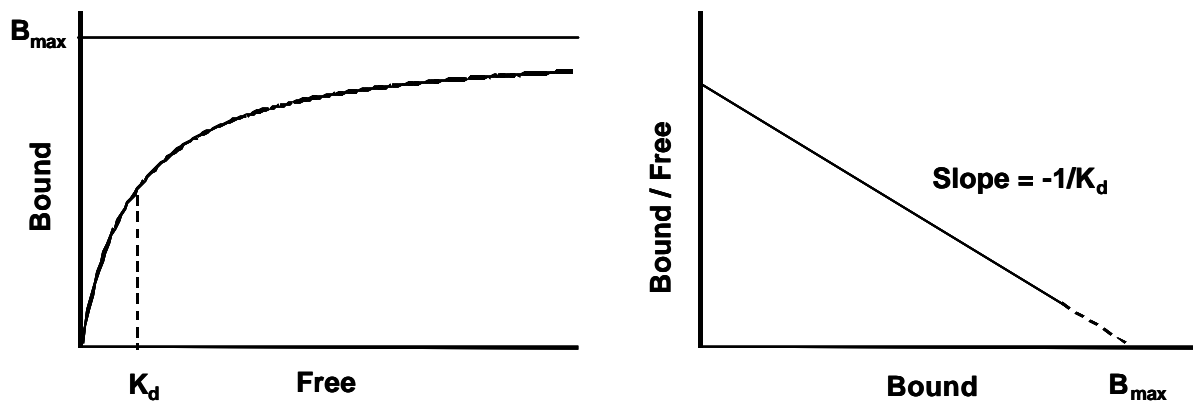


Abbildung 5. Darstellung von Sättigungskurve durch Auftragung der Menge des spezifisch gebundenen Radioliganden (Bound) gegen die Konzentration des freien Radioliganden (Free) (links). Der Scatchard-Plot ergibt sich aus der Auftragung der Konzentration des gebundenen Radioliganden (Bound) gegen den Quotienten aus gebundenem und freiem Radioliganden (Bound/Free)(rechts).

Für die Ermittlung der Bindungsparameter (B_{max} , K_d) der Sättigungskurve wurde die Software GraphPad Prism (GraphPad Prism Software Inc9., San Diego, USA) verwendet.

4.1.2. Spezifische und unspezifische Bindung

Die spezifische Bindung eines Radioliganden ist eine auf direktem Wege nicht messbare Größe; es wird im Experiment die Gesamtbindung bestimmt. Die Gesamtbindung setzt sich aus der spezifischen und der unspezifischen Bindung zusammen (Abb 6).

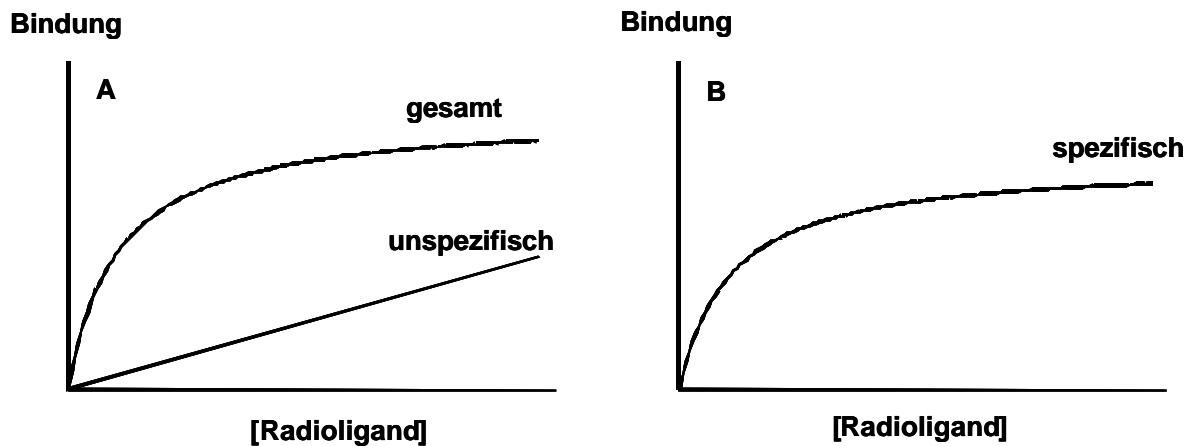


Abbildung 6. A: Im Gegensatz zur unspezifischen Bindung zeigt die gesamte Bindung eine Sättigungskinetik. B: Nach Subtraktion der unspezifischen Bindung von der gesamten Bindung ergibt sich die spezifische Bindung.

Spezifische Bindung bedeutet, dass der Radioligand an eine bestimmte Klasse von Rezeptoren bindet. Die Affinität zu weiteren Bindungsstellen sollte möglichst gering sein. Eine hohe Selektivität muss nicht gleichzeitig eine hohe Affinität am Rezeptor bedeuten. Jeder Ligand bindet in gewissem Maße unspezifisch an biologisches oder künstliches Material. Liganden, die H-Brücken eingehen, treten mit in Gewebepreparationen enthaltenen Proteinen in schwache Wechselwirkung; lipophile Liganden binden an Lipide, die in einer Membranpreparation immer anwesend sind.

Auch das eingesetzte Material (Röhrchen, Filter, usw.) stellt für Radioliganden potentielle Haftstellen dar.

Die unspezifische Bindung wird folgendermaßen bestimmt: Zum Radioligand und der Gewebepreparation wird ein nicht markierter Ligand mit bekannter Pharmakologie und Bindungsverhalten in 100 bis 1000-fachem Überschuss hinzugegeben. Der „kalte“ Ligand besetzt, aufgrund des hohen Überschusses, hauptsächlich die spezifischen Bindungsstellen, während der markierte Ligand vorwiegend die in großer Anzahl vorliegenden unspezifischen Bindungsstellen besetzen kann.

Die spezifische Bindung unterliegt einer Sättigungskinetik. Sie erreicht bei zunehmender Konzentration des Radioliganden einen Maximalwert. Die unspezifische Bindung ist dagegen nicht sättigbar.

4.2. Hemmungsexperiment

4.2.1. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Inhibitors (K_i) und der (IC_{50})

In den Hemmungs-Experimenten wird die Gewebepräparation jeweils mit der gleichen Konzentration des Radioliganden und unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert (Abb. 7). Der Konzentrationsbereich sollte dabei mehrere Zehnerpotenzen überschreiten. Die Dauer der Inkubation muss wiederum eine Gleichgewichtseinstellung ermöglichen.

$$B_L = \text{unspez} + \frac{\text{gesamt} + \text{unspez}}{1 + 10^{\log [L] - \log [IC_{50}]}}$$

B_L	=Konzentration an gebundenem Radioliganden
unspez.	=unspezifische Bindung
gesamt	=Gesamtbindung
L	=Konzentration des freien Liganden
IC_{50}	=Konzentration, bei der 50% der Radioligandenbindung durch die Testsubstanz inhibiert wird

Dabei ist es unerheblich, ob als Einheit für die spezifische Bindung CPM oder % der Gesamtbindung verwendet wird. Der Wendepunkt der Kurve gibt die Konzentration an, bei der 50% der Bindung des Radioliganden zum Rezeptor durch die Testsubstanz inhibiert wird. Sie wird als IC_{50} oder EC_{50} bezeichnet. Die mit minus eins multiplizierte Steigung der Kurve ist der Hill-Koeffizient n.

Der IC_{50} -Wert aus dem Hemmungs-Experiment und der K_D -Wert aus dem Sättigungs-Experiment gehen in die Gleichung von Cheng und Prusoff (Cheng and Prusoff, 1973) ein, mit der der K_i -Wert berechnet wird:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{L}{K_D}\right)}$$

Der K_i -Wert ist die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Inhibitors. Je niedriger er ist, desto stärker bindet die untersuchte Substanz an den Rezeptor.

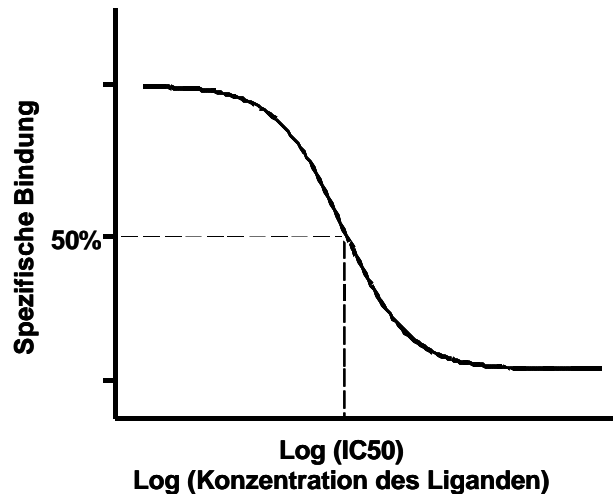
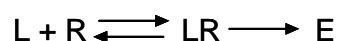


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt den Verlauf der Hemmungskurve bei logarithmischer Auftragung der Konzentration der Testsubstanz sowie des dazu gehörigen Hofstee-Plots.

Für die Ermittlung der Bindungsparameter (K_i , IC_{50}) der Hemmungskurve wurde die Software GraphPad Prism (GraphPad Prism Software Inc9., San Diego, USA) verwendet.

4.2.2. Bestimmung von (E_{max}) und (EC_{50})

Nach der grundlegenden Vorstellung der Okkupationstheorie ist ein Effekt (E), der durch einen Agonist ausgelöst wird, von der Zahl der durch diesen Agonisten aktivierten Rezeptoren abhängig ist Dies bedeutet, der Ligand (L) reagiert mit dem Rezeptor (R) entsprechend der Assoziationskonstanten (K_A) unter Ausbildung des Liganden-Rezeptor-Komplexes (RL), der zur Aktivierung der nachgeschalteten Effektorsysteme und somit zur Auslösung des Effekts befähigt ist.



Der biologische Effekt des Liganden muss also direkt der Zahl der Rezeptor-Liganden-Komplexe proportional sein:

$$E = \alpha \cdot [RL],$$

wobei die Belegung aller Rezeptoren den biologischen Maximizeffekt hervorruft

$$E_{\max} = \alpha \cdot [RT],$$

Somit ergibt sich für den Belegungsgrad der Rezeptoren (y)

$$\frac{E}{E_{\max}} = \frac{[RL]}{[RT]} = y.$$

Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz gilt

$$\frac{[RL]}{[RT]} = \frac{[L]}{([L] + K_D)}.$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich die hyperbole Form der Dosis-Wirkungsbeziehung

$$\frac{E}{E_{\max}} = \frac{[L]}{([L] + K_D)} = y$$

Für die Quantifizierung eines Ligandeneffekts kann die Dosis-Antwortkurve verwendet werden. Der X-Achse stellt die Konzentration eines Liganden und die Y-Achse den Effekt des Liganden dar. Es gilt,

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{\text{Log } EC_{50} - X}}$$

Dieses ist eine allgemeine Gleichung für eine Dosis-Antwortkurve. Es zeigt Antwort als Funktion des Logarithmus der Konzentration. X ist der Logarithmus der Agonistkonzentration und Y ist die Antwort.

Eine Standard Dosis-Antwortkurve wird durch drei Parameter definiert: die basale Antwort (Bottom), die maximale Antwort (Top)(E_{\max}) und die Konzentration eines Agonisten, bei der die halbmaximale Wirkung (EC_{50}) erreicht ist (Abb. 8).

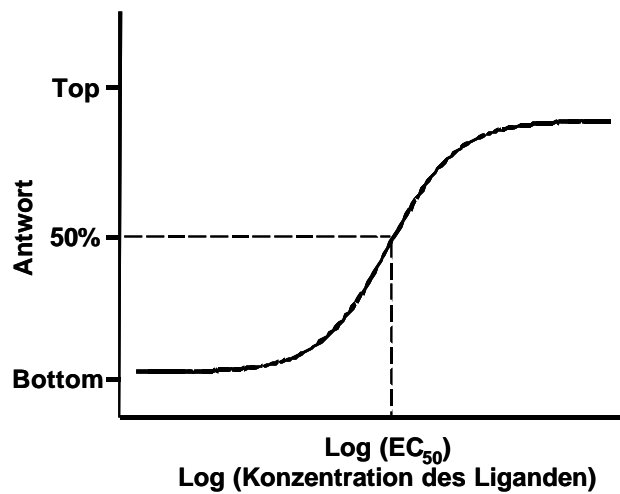


Abbildung 8: Eine sigmoide Dosis-Antwortkurve. Schematisch dargestellt zeigt sich, die basale Antwort (Bottom), die maximale Antwort (Top)(E_{max}), und die Konzentration eines Agonisten, die bei der die halbmaximale Wirkung erreicht ist.

Für die Ermittlung der Bindungsparameter (E_{max} , EC_{50}) der sigmoiden Dosis-Antwortkurve wurde die Software GraphPad Prism (GraphPad Prism Software Inc9., San Diego, USA) verwendet.