

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Entwicklung von MS-Bindungsassays für den
Serotonin-Transporter**

Marielle Hess

aus

Bad Nauheim

2011

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Herrn Prof. Dr. Klaus T. Wanner betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 5. Oktober 2011

.....
(Marielle Hess)

Dissertation eingereicht am 13. Oktober 2011

1. Gutachter Prof. Dr. Klaus T. Wanner

2. Gutachter Prof. Dr. Franz Bracher

Mündliche Prüfung am 11. November 2011

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2008 bis Oktober 2011
am Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung – der
Ludwig-Maximilians-Universität München auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Klaus T. Wanner

Für die hervorragende und sehr engagierte Betreuung und Förderung
meiner Arbeit sowie die ausgezeichneten Forschungsbedingungen danke ich
Herrn Prof. Dr. Klaus T. Wanner sehr herzlich.

Herrn Prof. Dr. Franz Bracher danke ich herzlich
für die Übernahme des Korreferats.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Klaus T. Wanner für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Theo Rein (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München), insbesondere Vanessa Ganal, danke ich für die Bereitstellung des Expressionsvektors pcDNA3.1(+)-hSERT und für hilfreiche fachliche Gespräche.

Besonders möchte ich mich bei Ljiljana Galogaza und Silke Duensing-Kropp für ihre Hilfsbereitschaft und für die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und Zellkulturtechniken bedanken.

Den Wahlpflichtfachstudenten Irmgard Stubenvoll, Florian Schmid, Armin Rohbeck und Sebastian Schmid danke ich für ihre engagierte Mitarbeit im Labor. Miyase Gözde Gündüz (Hacettepe Universität Ankara, Türkei) danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung bei zahlreichen Experimenten.

Besonderer Dank gilt Dr. Georg Höfner, der durch seine stete Unterstützung, wertvolle fachliche Diskussionen und zahlreiche Ideen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Dr. Lars Allmendinger danke ich für seine umfangreiche Bibliothek, viele wertvolle Tipps und für die Unterstützung bei der Erstellung des *cover pictures* (ChemMedChem 10/2011). Dr. Jörg Pabel und Dr. Thomas Wein danke ich für lustige Kaffeepausen und für die Hilfe bei Computer-Problemen. Maria Polley danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre in unserem Labor. Miriam Sindelar danke ich sehr für unzählige fachliche und nicht-fachliche Gespräche. Eva Schaffert danke ich für eine schöne gemeinsame Zeit in der WAPo'theke.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich von ganzem Herzen für ihre Förderung, ihr Interesse und ihre allgegenwärtige, bedingungslose Unterstützung. Unschätzbare Dank gilt Florian für den liebevollen Beistand, seine Geduld und dafür, dass er es auch in schwierigen Phasen geschafft hat, mich aufzumuntern.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Serotonin und die serotonerge Neurotransmission	1
1.2	Der Serotonin-Transporter	5
1.3	Inhibitoren des Serotonin-Transporters	10
1.4	Bedeutung von Bindungsstudien in der Wirkstoffentwicklung	14
2	ZIELSETZUNG	17
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	19
3.1	Expression des Serotonin-Transporters in HEK-293 Zellen	19
3.1.1	Hintergrund	19
3.1.2	Expressionsvektoren mit hSERT-cDNA	20
3.1.3	Vermehrung der Plasmide in <i>E.coli</i>	22
3.1.4	Transiente Transfektion von HEK-293 Zellen	25
3.1.4.1	Etablierung eines Testsystems zur Überprüfung der Transporter-Expression	25
3.1.4.2	Optimierung der Transfektionseffizienz	29
3.1.4.3	Sättigungsexperimente mit [³ H]Paroxetin	31
3.1.5	Stabile Transfektion von HEK-293 Zellen	35
3.1.5.1	Screening der Klone mit [³ H]Paroxetin	37
3.1.5.2	Untersuchung der Targetstabilität	41
3.1.5.3	Sättigungsexperimente mit [³ H]Paroxetin	42
3.2	LC-MS/MS Methodenentwicklung und Methodvalidierung zur Markerquantifizierung in MS-Bindungsstudien	47
3.2.1	Hintergrund	47
3.2.2	Massenspektrometrische Analytik	47

3.2.3	Auswahl einer Markerverbindung	50
3.2.4	Anforderungen an eine Methode zur Markerquantifizierung	53
3.2.5	Entwicklung einer LC-MS/MS Methode für Paroxetin	54
3.2.5.1	Methodenentwicklung am Massenspektrometer API 3200	54
3.2.5.2	Erstellung einer Kalibrierfunktion	64
3.2.5.3	Untersuchung des Matrixeffektes	65
3.2.5.4	Die Frage nach dem internen Standard	68
3.2.6	Entwicklung einer LC-MS/MS Methode für Fluoxetin	69
3.2.6.1	Methodenentwicklung am Massenspektrometer API 3200	69
3.2.6.2	Auswahl eines internen Standards	76
3.2.6.3	Transfer der Methode auf das Massenspektrometer API 5000	77
3.2.6.4	Validierung der LC-MS/MS Quantifizierungsmethode für Fluoxetin	80
3.2.6.5	Übertragung der LC-MS/MS Quantifizierungsmethode für Fluoxetin auf andere RP18 Säulen	87
3.2.7	Zusammenfassung der analytischen Ergebnisse	93
3.3	Entwicklung von MS-Bindungsassays für hSERT mit (S)- und (R)-Fluoxetin als nativen Markern	96
3.3.1	Hintergrund	96
3.3.2	Grundprinzipien von Target-Ligand-Interaktionen	97
3.3.3	Experimenttypen in Bindungsstudien	99
3.3.3.1	Sättigungsexperimente	99
3.3.3.2	Kinetische Experimente	101
3.3.3.3	Kompetitive Experimente	103
3.3.4	Etablierung von MS-Bindungsassays für hSERT	104
3.3.4.1	Etablierung von Sättigungsexperimenten mit (S)-Fluoxetin als Marker	104
3.3.4.2	Etablierung kinetischer Experimente mit (S)-Fluoxetin als Marker	118
3.3.4.3	Etablierung kompetitiver Experimente mit (S)-Fluoxetin als Marker	127

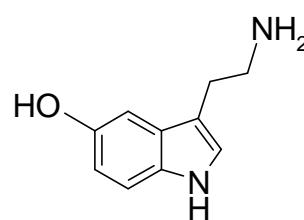
3.3.4.4	Untersuchung der Bindung von (<i>R</i>)-Fluoxetin	134
3.3.4.5	Vergleich von (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-Fluoxetin bezüglich ihrer Bindung an hSERT	138
4	ZUSAMMENFASSUNG	141
5	EXPERIMENTELLER TEIL	150
5.1	Biologische Methoden	150
5.1.1	Geräte und Material	150
5.1.2	Molekularbiologische Arbeiten	155
5.1.3	Zellkulturtechniken	163
5.2	LC-MS/MS Analytik	172
5.2.1	Geräte und Material	172
5.2.2	Allgemeine Methoden	173
5.3	Bindungsassays	183
5.3.1	Geräte und Material	183
5.3.2	Radioligandbindungsassays	184
5.3.3	MS-Bindungsassays	187
5.3.4	Datenanalyse in Bindungsstudien	198
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	200
7	LITERATURVERZEICHNIS	203

1 Einleitung

1.1 Serotonin und die serotonerge Neurotransmission

Psychische Erkrankungen spielen eine zunehmend große Rolle in unserer Gesellschaft.^{1,2,3} Oftmals sind sie auf Ungleichgewichte im Haushalt der Neurotransmitter zurückzuführen. Zu den häufigsten Formen derartiger Erkrankungen gehören Depressionen^{2,4}, welche laut World Health Organization (WHO) weltweit die Hauptursache für Erwerbsunfähigkeit sind.¹ Dadurch stellen sie sowohl ein vorrangiges Problem des Gesundheitssystems als auch eine große ökonomische Belastung für die Gesellschaft dar.^{1,4} Schon früh wurden Depressionen mit einer Fehlfunktion der serotonergen Neurotransmission in Verbindung gebracht, was zur Formulierung der sogenannten Monoamin-Mangelhypothese führte.^{5,6}

Serotonerge Neurone kommen im zentralen und peripheren Nervensystem vor.⁷ Die zentralen Neurone tragen zur Regelung von Stimmung, Schlaf-Wach-Rhythmus, Schmerzwahrnehmung, Nahrungsaufnahme und Körpertemperatur bei.⁸ Neben Depressionen wird eine Beteiligung von Serotonin (1) (siehe Abb. 1) bei weiteren psychischen Erkrankungen, wie Angstzuständen, Sozialphobien, Schizophrenie, Zwangs-, Panik- und Essstörungen und ebenso bei Migräne, Bluthochdruck, Erbrechen und Reizkolon diskutiert.⁷



Serotonin (1)

Abb. 1 Serotonin (1) (5-Hydroxytryptamin, 5-HT)

Aufgrund der hohen pharmakologischen Relevanz der serotonergen Neurotransmission für verschiedene Krankheitsbilder – darunter Depressionen mit ihren schwerwiegenden sozialen und ökonomischen Folgen – gibt es weltweit intensive Forschungsanstrengungen auf diesem Gebiet. Interessante Angriffspunkte bei der Suche nach neuen Wirkstoffen bieten insbesondere die an der serotonergen Neurotransmission beteiligten Rezeptoren, Transporter und metabolischen Enzyme.

Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der synaptischen Übertragung durch Serotonin (1). Die Synthese des Neurotransmitters 1 erfolgt im präsynaptischen Neuron.⁸ Im ersten Schritt wird Tryptophan, eine essentielle Aminosäure, zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) hydroxyliert.⁸ Im zweiten Schritt wird dieses dann durch enzymatische Decarboxylierung zu Serotonin (1) umgewandelt.⁸ Anschließend wird der Neurotransmitter 1 in Speichervesikel aufgenommen, aus denen er bei einem ankommenden Aktionspotential durch Exocytose in den synaptischen Spalt freigesetzt werden kann.

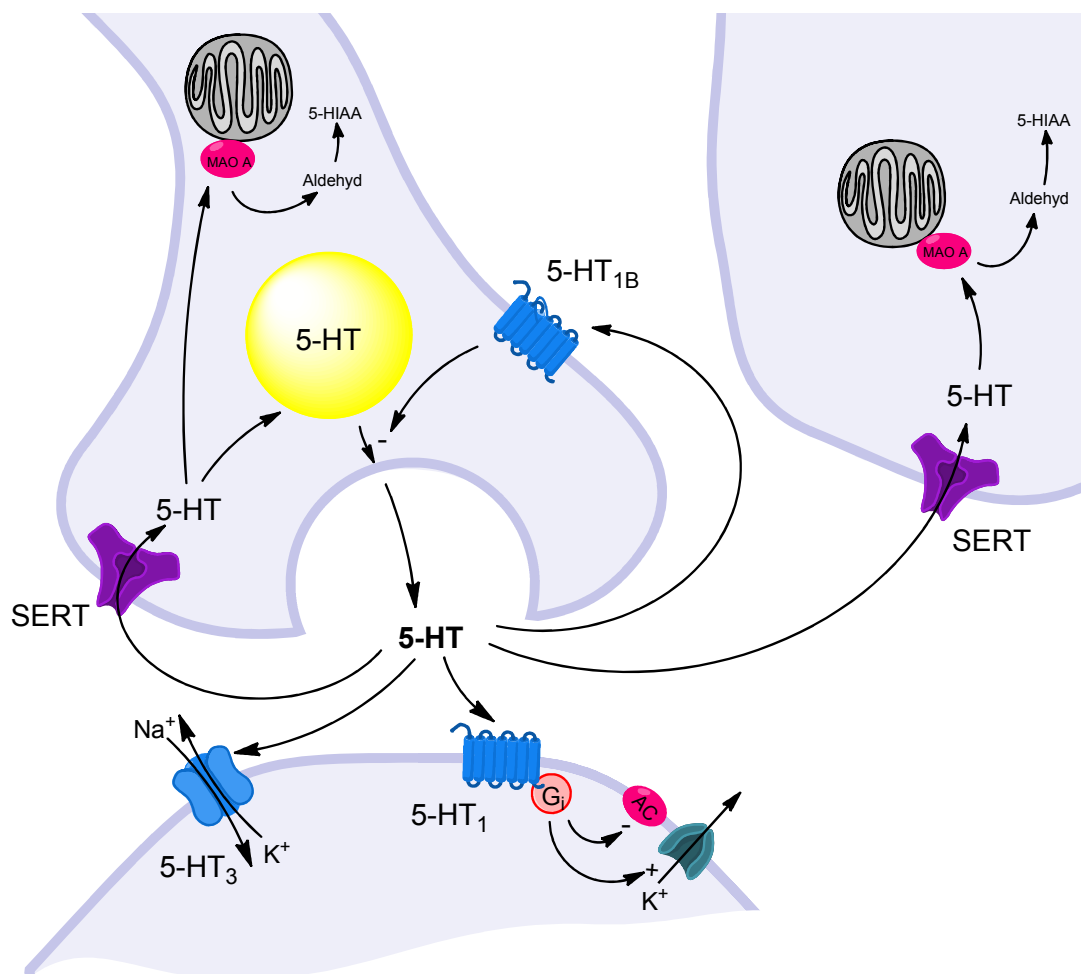


Abb. 2 Schematische Darstellung der serotonergen Neurotransmission

Dort kann Serotonin (1) an 14 verschiedenen spezifischen Rezeptoren aus sieben Subklassen (5-HT₁ – 5-HT₇), welche hauptsächlich postsynaptisch lokalisiert sind, angreifen.⁷ Durch präsynaptisch lokalisierte Autorezeptoren (insbesondere 5-HT_{1B}) kann es außerdem seine eigene Freisetzung regulieren.⁷ Während der 5-HT₃-Rezeptor ein ligandgesteuerter Ionenkanal ist, sind alle anderen G-Protein

gekoppelt.⁷ Letztere können beispielsweise über sekundäre Botenstoffe die Offenwahrscheinlichkeit von Ionenkanälen beeinflussen, was wie im Fall des ligandgesteuerten Ionenkanals bei einer Aktivierung veränderte Membranpotentiale bewirkt. Im Folgenden werden die pharmakologisch bedeutsamsten 5-HT-Rezeptoren kurz vorgestellt.

Vorwiegend inhibitorische Effekte hat eine Aktivierung von 5-HT₁-Rezeptoren.⁹ Sie koppeln über G_i negativ mit der Adenylylcyclase, erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit von K⁺-Kanälen und bewirken so eine Hyperpolarisation der Zellmembran.⁷ Der partielle Agonist am 5-HT_{1A}-Rezeptor Bupropion ist ein Arzneistoff zur Therapie von Depressionen und Angstzuständen.^{10,11} Nichtselektive Agonisten an 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoren sind die in der Migränetherapie eingesetzten Triptane (zum Beispiel Sumatriptan).¹²

5-HT₂-Rezeptoren sind G_q Protein gekoppelt, greifen in den Phosphatidylinositol-Stoffwechsel ein und führen zu einem erhöhten Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle.⁷ Dadurch kommt es zu einem exzitatorischen postsynaptischen Potential.⁹ Die halluzinogene Substanz LSD (Lysergsäurediethylamid) aktiviert den 5-HT_{2A}-Rezeptor.¹³ Nichtselektive Antagonisten dieses Rezeptors sind dagegen die zur Behandlung der Schizophrenie zugelassenen Wirkstoffe Clozapin und Olanzapin.¹⁴

Der 5-HT₃-Rezeptor öffnet bei Aktivierung seinen Ionenkanal für Na⁺ und K⁺ und wirkt deshalb ebenfalls exzitatorisch.⁷ Die Antiemetika Ondansetron und Tropisetron sind selektive Antagonisten dieses Rezeptors.¹⁵

5-HT₄-Rezeptoren sind G_s-gekoppelt, aktivieren die Adenylylcyclase und führen durch eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von Ca²⁺-Kanälen ebenfalls zu einem erregenden Potential.⁷ 5-HT₄-Rezeptoren sind vor allem im Gastrointestinaltrakt lokalisiert, wo der nichtselektive Agonist Metoclopramid als Prokinetikum wirkt.¹⁶

Nach seiner Ausschüttung wird Serotonin (**1**) durch Membranproteine aktiv aus dem synaptischen Spalt in präsynaptische Neurone rücktransportiert oder in Gliazellen aufgenommen. Nach Aufnahme in die Neurone kann der Neurotransmitter **1** entweder wieder in Vesikeln gespeichert oder wie in Gliazellen abgebaut werden. Im Falle seines Abbaus wird 5-HT (**1**) zunächst durch eine Monoaminoxidase (hauptsächlich MAO A¹⁷) zum Aldehyd und anschließend zum

Stoffwechselendprodukt 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) oxidiert. Ein antidepressiver Wirkstoff, der als selektiver Inhibitor der MAO A in den Metabolismus eingreift, ist Moclobemid.¹⁸

Für den genannten aktiven Membrantransport aus dem synaptischen Spalt zurück in Zellen ist der Serotonin-Transporter (SERT) verantwortlich.¹⁹ Da er die Menge von Serotonin (**1**) im extrazellulären Bereich reguliert, nimmt er eine Schlüsselfunktion bei der Beendigung der synaptischen Aktivität des Neurotransmitters **1** ein. Inhibitoren des Serotonin-Transporters verlängern die Wirkung von Serotonin (**1**) bei der synaptischen Übertragung, was als die mechanistische Grundlage der antidepressiven Wirkung tricyclischer Antidepressiva (TCAs) und selektiver Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRIs) gilt. Letztere stellen unverzichtbare Arzneistoffe in der Therapie von Depressionen, Angstzuständen und Zwangsstörungen dar (siehe 1.3).⁸ Der Transporter ist außerdem Angriffspunkt von Suchtmitteln wie Kokain und Amphetamin-Derivaten.^{20,21}

Aufgrund der enormen pharmakologischen Bedeutung des Serotonin-Transporters, vor allem in der Therapie von Depressionen, schien es besonders lohnend, für diesen Transporter einen sogenannten MS-Bindungsassay zu entwickeln, was das Ziel der vorliegenden Arbeit war. In den folgenden Abschnitten (siehe 1.2 und 1.3) wird der Transporter ausführlich vorgestellt.

1.2 Der Serotonin-Transporter

Der Serotonin-Transporter gehört zur SLC6 Transporterfamilie, deren Mitglieder auch als Neurotransmitter:Natrium Symporter (neurotransmitter:sodium symporters, NSS) bezeichnet werden.²² Zu den NSS gehören unter anderem auch der Dopamin- (DAT), der Noradrenalin- (NET), die GABA- (GAT1–GAT4) und die Glycin-Transporter (GlyT1 und GlyT2).²² Da die Konzentration der Neurotransmitter in den Nervenendigungen wesentlich höher als im synaptischen Spalt ist, nutzen die Transporter die Kopplung an einen Na⁺-Cotransport, um gegen den Gradienten transportieren zu können.²² Für membranständige Transporter beschrieb Jardetzky bereits 1966 das sogenannte *alternate access mode*²³, welches eine Öffnung der Transporter entweder zur extra- oder zur intrazellulären Seite der Membran impliziert. Am SERT zeigten Studien, dass der Transport des Neurotransmitters **1** nicht allein an einen Na⁺-Cotransport gekoppelt ist, sondern dass Na⁺ und Cl⁻ zusammen mit dem Transmitter **1** in die Zelle transportiert und in einem zweiten Schritt K⁺ in den Extrazellulärraum freigesetzt wird (Stöchiometrie 1:1:1:1).¹⁹

SERT wurde im Jahr 1991 erstmals molekular kloniert und anschließend exprimiert.²⁴ Für den Transporter wurden 12 transmembranäre Helices (TMs), welche über extra- und intrazelluläre Schleifen verbunden sind, sowie cytoplasmatische N- und C-Termini vorhergesagt.^{24,25} Ohne eine Kristallstruktur war es jedoch schwer, genaue Aussagen zum Transportmechanismus und zur Substratbindung zu machen.

Von großer Bedeutung war daher im Jahr 2005 eine von Yamashita et al.²⁶ publizierte Kristallstruktur des Leucin-Transporters aus *Aquifex aeolicus* (LeuT_{Aa}) – einem prokaryotischen Homolog der NSS. Die Kristallstruktur zeigt LeuT_{Aa} mit gebundenem Substrat sowie zwei gebundenen Na⁺-Ionen in einer zur extra- und zur intrazellulären Seite geschlossenen Konformation. Eine schematische Darstellung der Struktur ist in Abb. 3 wiedergegeben. Wie für SERT und andere verwandte Transporter vorhergesagt, weist LeuT_{Aa} 12 transmembranäre Helices (TMs) auf. Die Helices TM1–TM5 und TM6–TM10 sind dabei in einer Weise angeordnet, dass sie durch Rotation um eine zweizählige Pseudo-Symmetrieachse ineinander überführbar sind. Die Substratbindestelle liegt wie die Pseudo-Symmetrieachse im zentralen Bereich des Proteins. Unmittelbar an der Substratbindestasche beteiligt sind TM1, TM3, TM6 und TM8. TM1 und TM6 sind durch nicht-helicale Bereiche, welche an der

Substratbindung mitwirken, in zwei Teilabschnitte (a und b) untergliedert. Von den beiden cotransportierten Na^+ -Ionen wirkt eines direkt an der Bindung von Leucin mit, während das andere – so die Annahme – zur Stabilität der Struktur beiträgt.²⁶

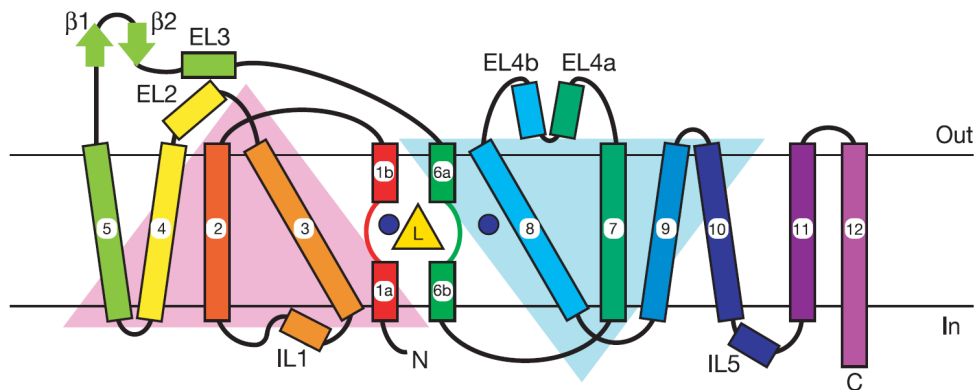


Abb. 3 LeuT_{Aa}-Topologie mit Leucin (gelbes Dreieck) und Na^+ -Ionen (blaue Kreise). Abbildung entnommen aus Yamashita et al.²⁶

Der von Yamashita et al.²⁶ postulierte Transportmechanismus des Leucin-Transporters folgt dem *alternate access mode*²³ und ist in Abb. 4 dargestellt. Die für den Transport erforderlichen Bewegungen werden insbesondere von TM1 und TM6 relativ zu TM3 und TM8 ausgeführt, wobei die nicht-helicalen Bereiche als Gelenkfunktion dienen.

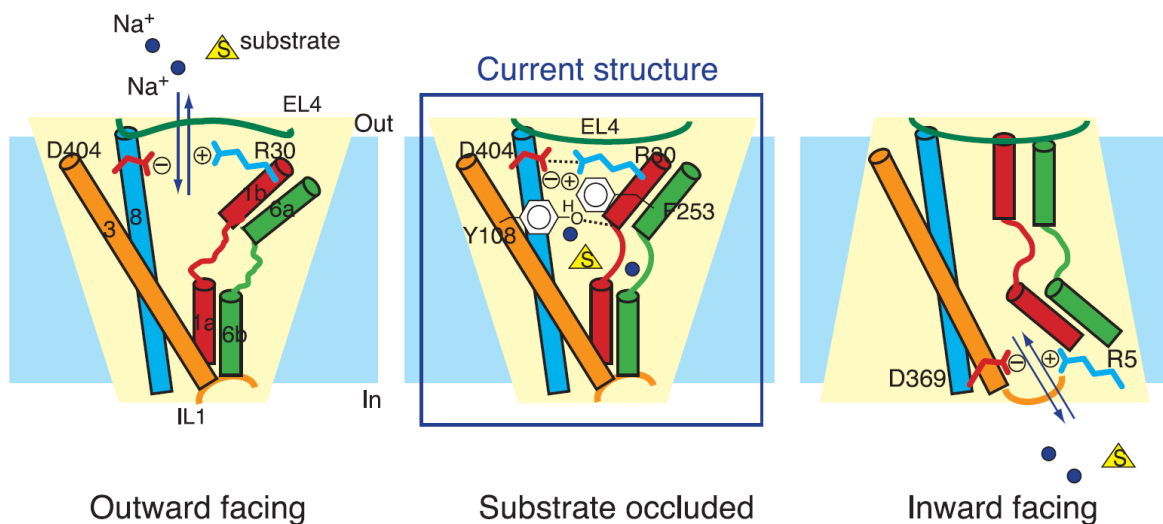


Abb. 4 Schematische Darstellung des angenommenen Transportmechanismus für den LeuT_{Aa}. Abbildung entnommen aus Yamashita et al.²⁶

In der *outward facing* Konformation (Abb. 4 links) sind TM1b und TM6a so angeordnet, dass die Substratbindestelle zum Extrazellulärraum geöffnet ist und

Leucin und Na^+ aufgenommen werden können. In Richtung Cytoplasma ist der Transporter durch eine Salzbrücke aus Arg-5 (TM1) und Asp-369 (TM8) verschlossen.²⁶ Die Bindung von Leucin und Na^+ bewirkt eine Konformationsänderung zur *substrate occluded* Konformation (Abb. 4 Mitte). Das ist jene Form, die der Transporter in der von Yamashita et al.²⁶ gelösten Kristallstruktur einnimmt. In ihr schließen die Phenylreste von Tyr-108 (TM3) und Phe-253 (TM6) und eine darüber liegende Salzbrücke aus Arg-30 (TM1) und Asp-404 (TM10) die Bindungsstelle zum Extrazellulärraum ab.²⁶ Zum Cytoplasma öffnet sich die Substratbindestelle schließlich, indem sich TM1a und TM6b zur Seite bewegen, wodurch Substrat und Na^+ freigesetzt werden können (Abb. 4 rechts, *inward facing* Konformation).

Celik et al.²⁷ zeigten in einem Vergleich der Aminosäuresequenz von LeuT mit der des humanen Serotonin-Transporters (hSERT), dass die Sequenzidentität beider Transporter insgesamt ca. 20 %, in den TMs fast 30 % und im Bereich der Bindetasche sogar 76 % beträgt. Unter Berücksichtigung konservativer Mutationen, was den Austausch einer Aminosäure gegen eine andere Aminosäure mit ähnlichen chemischen Eigenschaften darstellt²⁸, fanden sie eine Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen beider Proteine von 55–56 %.²⁷ Dies ermöglicht es, Homologie-Modelle von hSERT auf Basis der LeuT-Struktur zu erstellen (siehe Abb. 5).^{27,29,30}

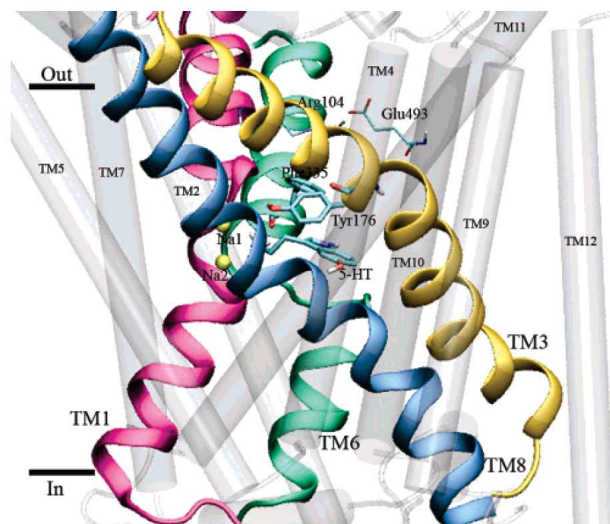


Abb. 5 Homologie-Modell von hSERT in der zum Extrazellulärraum geschlossenen Konformation mit 5-HT (1) und zwei Na^+ in der zentralen Bindetasche. Abbildung entnommen aus Celik et al.²⁷

Die Gruppe um Celik führte mit einem von ihnen erzeugten Homologie-Modell Docking-Studien durch, um die Substratbindung in hSERT genauer zu charakterisieren.²⁷ Zur Untermauerung der Ergebnisse analysierten sie zudem Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (*structure-activity relationships*, SAR), die für mutierte Transporter erstellt worden waren.²⁷ Aufgrund der Homologie des humanen Serotonin-Transporters zum Leucin-Transporter wurde angenommen, dass sich die Substratbindestelle in hSERT an vergleichbarer Stelle wie in LeuT befindet.²⁷ Innerhalb eines Abstands von 5 Å um diese Region unterscheiden sich nur sechs von 25 Aminosäuren in hSERT von denen in LeuT.²⁷ Der größte Unterschied besteht im Austausch von Gly-24 in LeuT gegen Asp-98 in hSERT. Die Mutation zu einer Aminosäure mit einer sauren Seitenkette ist an dieser Position charakteristisch für alle Monoamintransporter. Durch diesen Austausch wird die Carboxylfunktion der von LeuT transportierten Aminosäure in den Monoamintransportern durch die Carboxylfunktion von Asp-98 ersetzt.²⁶ Letztere trägt zum einen zur Koordination eines der beiden Na⁺-Ionen bei. Desweiteren ist die Carboxylfunktion Teil einer Salzbrücke zur protonierten Aminofunktion des Substrates.²⁷ Nach Celik et al. ist die Substratselektivität von hSERT neben der Mutation zu Asp-98 vor allem durch kleinere Aminosäuren im Bereich der Bindetasche – die dem im Vergleich zu Leucin größeren 5-HT (**1**) ausreichend Platz bieten – und durch die Einführung von Tyr-95 bedingt, welches π - π Wechselwirkungen mit dem aromatischen Teil des Substrates **1** ermöglicht.²⁷ Ein Modell, wie 5-HT (**1**) in der Substratbindestasche von hSERT orientiert sein könnte, zeigt Abb. 6.²⁷

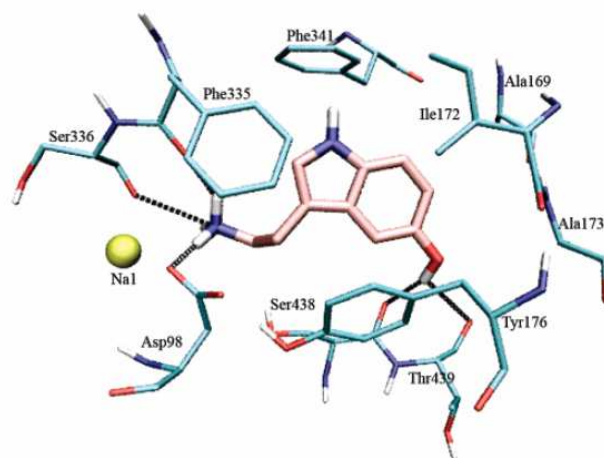


Abb. 6 Darstellung einer möglichen Orientierung von 5-HT (**1**) in der hSERT-Bindetasche. Abbildung entnommen aus Celik et al.²⁷

Die strukturellen Gemeinsamkeiten von LeuT und SERT, vor allem die hohe Übereinstimmung an Aminosäuren in den entsprechenden Transporterbereichen lassen auch auf einen ähnlichen Transportmechanismus beider Proteine schließen. Forrest et al.³¹ konnten diese Annahme sogar durch experimentelle Daten belegen. Ähnlich wie im LeuT schließen Tyr-176 und Phe-335 und eine darüber liegende Salzbrücke aus Arg-104 und Glu-493 die Substratbindestelle zum Extrazellulärraum ab (siehe Abb. 5).²⁷ Zur cytoplasmatischen Seite wird der Serotonin-Transporter wie der LeuT durch eine Salzbrücke zwischen Arg-5 und Asp-369 unzugänglich gemacht.³¹

Bezüglich der cotransportierten Ionen gibt es für SERT folgende Überlegungen: In allen NSS-Transportern sind die Bereiche zur Koordination von Na⁺-Ionen hochkonserviert, weshalb in den SERT-Modellen die gleichen Positionen für die Na⁺-Ionen wie im Leucin-Transporter angenommen werden.²⁷ Wie im LeuT soll dabei dem zweiten Na⁺-Ion vor allem eine stabilisierende Funktion zukommen.^{26,27,31} In Homologie-Modellen konnten im Serotonin-Transporter auch Bereiche gefunden werden, in welchen ein Cl⁻-Ion gut koordiniert werden könnte.^{27,32,33} Literatur zum genauen Mechanismus für die Bindung und den Transport von K⁺-Ionen, die bei der Rückkehr des Transporters von der nach innen in die nach außen geöffnete Konformation von der Intra- auf die Extrazellulärseite geschleust werden, ist dagegen noch nicht bekannt.

1.3 Inhibitoren des Serotonin-Transporters

Inhibitoren des Serotonin-Transporters werden zur Behandlung psychischer Erkrankungen, wie Depressionen, Angstzuständen und Zwangsstörungen, aber auch adjuvant in der Therapie chronischer Schmerzen eingesetzt.⁸ Zu den bekannten Inhibitoren gehören tricyclische Antidepressiva (TCAs, Antidepressiva der ersten Generation), selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRIs) und selektive Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren (SNRIs).

Das vor mehr als 60 Jahren erste therapeutisch bei Depressionen eingesetzte TCA war Imipramin (**2**) (siehe Abb. 7).³⁴ Weitere Mitglieder dieser Substanzklasse sind Desipramin, Clomipramin, Amitriptylin und Nortriptylin. Neben ihrer namensgebenden tricyclische Struktur besitzen alle eine charakteristische Aminoalkylseitenkette.

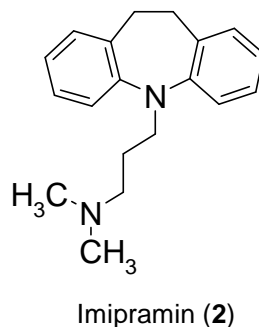


Abb. 7 Struktur des tricyclischen Antidepressivums Imipramin (**2**)

Die TCAs sind nicht-selektive Inhibitoren des Serotonin- und des Noradrenalin-Transporters (NET) und weisen zusätzliche Aktivität an zahlreichen postsynaptischen Rezeptoren (vor allem cholinerge, histaminerge und noradrenerge) auf.³⁵ Diese nicht-spezifischen Effekte sind Ursache vieler Nebenwirkungen, die bei Überdosierung sogar tödlich sein können und dadurch ein großes Problem in der Therapie darstellen.³⁵ Dies führte zur Suche nach selektiveren Arzneistoffen zur Therapie von Depressionen. Da man aber auch vermutete, dass serotonerge Effekte für die stimmungsaufhellende Wirkkomponente der TCAs verantwortlich sind^{6,36}, begann man schon früh nach Wirkstoffen zu suchen, welche selektiv den Serotonin-Transporter inhibieren.

Fluoxetin (**rac-3**) (siehe Abb. 8) war 1974 der erste publizierte selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitor.^{37,38} Weitere SSRIs wie Citalopram (**rac-4**) (siehe Abb. 8),

Fluvoxamin, Paroxetin und Sertralin folgten kurze Zeit später. Strukturell unterscheiden sich die Substanzen innerhalb dieser Klasse stark (siehe Abb. 8) – jedoch besitzen alle eine charakteristische Aminofunktion. Wesentlich ist aber ihr deutlich günstigeres Nebenwirkungsprofil, das als Folge ihrer im Vergleich zu den TCAs höheren Selektivität für SERT gegenüber NET, DAT und postsynaptischen Rezeptoren zu verstehen ist.^{39,40} Dies bedingt ihr wesentlich günstigeres Nebenwirkungsprofil.^{35,41}

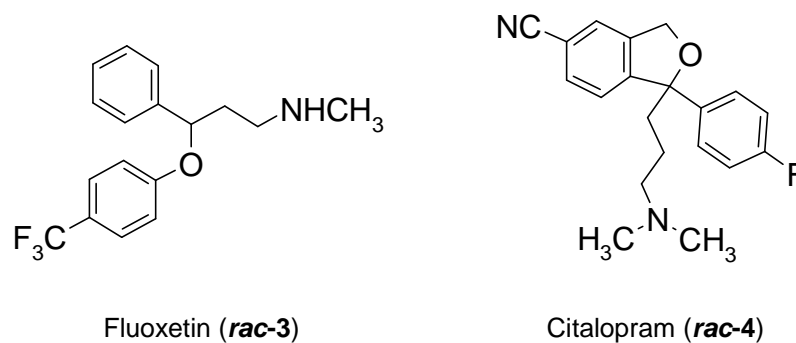


Abb. 8 Struktur selektiver Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRIs)

Die geringeren Nebenwirkungen in der Therapie von Depressionen und das erweiterte Indikationsspektrum für die Behandlung von Panikattacken, Angstzuständen, Zwangsstörungen, posttraumatischen Belastungsstörungen, Sozialphobien, Essstörungen und prämenstruellem Syndrom haben die SSRIs zu den weltweit meistverordneten Arzneistoffen gemacht.^{38,41,42}

Eine neuere Substanzklasse mit inhibitorischer Wirkung am SERT umfasst die selektiven Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren (SNRIs) Venlafaxin, Duloxetin und Milnacipran.⁴²

Mit den beschriebenen Wirkstoffen können Depressionen jedoch noch immer nicht in optimaler Weise therapiert werden.^{42,43,44} Die Suche nach neuen Wirkstoffen für die Therapie ist daher weiterhin von größter Bedeutung. In jüngerer Zeit hat sich die Forschung deshalb auf die Frage, ob es womöglich mehrere Bindestellen der Inhibitoren am SERT gibt, fokussiert. Entsprechende strukturelle und mechanistische Kenntnisse könnten äußerst wichtig für zukünftige medizinisch-chemische Ansätze zur Entwicklung neuer Substanzen sein.

Frühere Uptake- und Bindungsstudien zeigten bereits, dass sowohl TCAs als auch SSRIs und SNRIs den Transporter kompetitiv inhibieren.^{45,46,47} Substrat und Inhibitor konkurrieren im Transporter folglich um die gleiche Bindestelle oder weisen überlappende Bindestellen auf. Von Sinning et al.⁴⁸ durchgeführte Docking-Studien mit *molecular dynamic* (MD) Simulationen im hSERT Homologie-Modell lassen ebenso wie Untersuchungen an mutierten Transportern auf eine hoch affine TCA-Bindestelle schließen, welche mit der Substratbindetasche des Transporters überlappt. Nach Sinning et al. bilden die TCAs – genau wie 5-HT (**1**) – über den Stickstoff ihrer Aminoalkylseitenkette eine Salzbrücke mit Asp-98.⁴⁸ Aufgrund der Größe der TCAs im Vergleich zum eigentlichen Substrat **1**, ist der tricyclische Ring der Inhibitoren mehr zum Extrazellulärraum orientiert.⁴⁸ Dies verhindert, dass die Substratbindestelle nach außen abgeschlossen werden kann, da es zu einer Verschiebung der dafür relevanten Aminosäuren Tyr-176 und Phe-335 kommt.⁴⁸ Konformationsänderungen des Transporters – Grundvoraussetzung für das *alternate access model* – sind so nicht möglich und liefern eine Erklärung, warum die Inhibitoren im Gegensatz zu 5-HT (**1**) nicht transportiert werden.⁴⁸ Auch wenn die genaue Lokalisation des zum Extrazellulärraum orientierten Tricyclus Gegenstand intensiver Diskussion ist, stimmen verschiedenen Studien darin überein, dass sich TCA- und Substrat-Bindestelle überlappen. Denn in allen wird eine Salzbrücke zwischen der Aminofunktion in der Seitenkette (der TCAs) und dem an der Substratbindung beteiligten Asp-98 postuliert.^{48,49} Die Studien bestätigen also das Modell der kompetitiven Inhibition. Bezüglich des SSRI Citalopram (*rac-4*) konnte Andersen et al. zeigen, dass dessen Bindestelle ebenfalls mit der von 5-HT (**1**) überlappt und auch die Aminofunktion in der Seitenkette dieses SSRI mit Asp-98 wechselwirkt.^{50,51} Die Art der Bindung von TCAs und SSRIs in Bezug auf Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren des Transporters scheint sich allerdings zu unterscheiden.⁴⁹

Unlängst gelang es mehreren Forschergruppen von LeuT_{Aa} Cokristallisate zu erhalten, in denen neben Leucin auch ein TCA oder ein SSRI enthalten ist.^{52,53,54} Die in diesem Fall niedrig affinen Inhibitoren waren in den Cokristallstrukturen in einem zum Extrazellulärraum ausgerichteten Vestibül etwas oberhalb der Substratbindetasche gebunden – ihre Bindung erfolgte also in einer zweiten Bindetasche und somit nicht-kompetitiv (siehe Abb. 9).^{52,53,54} Abb. 9 verdeutlicht,

dass die Bindung des TCA Clomipramin den LeuT_{Aa} mit gebundenem Substrat in der sowohl zum Extra- als auch zum Intrazellulärraum geschlossenen Konformation stabilisiert.⁵² Dabei ist der Zugang zur Substratbindungsstelle auf beiden Seiten durch die bereits erwähnten Aminosäuren blockiert.

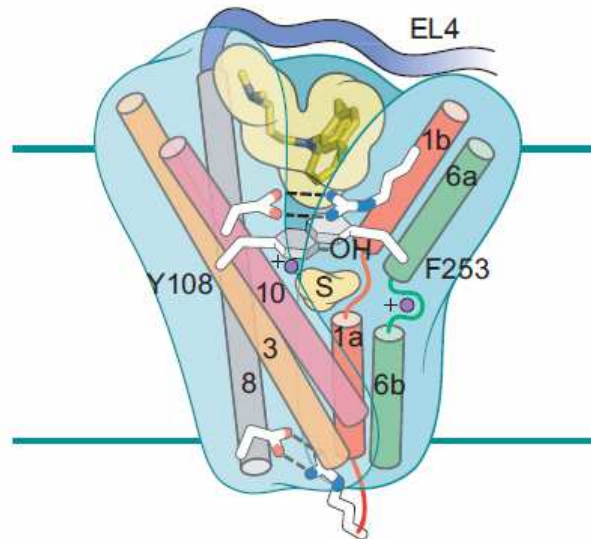


Abb. 9 Schematische Darstellung der nicht-kompetitiven Inhibition des LeuT_{Aa} durch Clomipramin. Abbildung modifiziert nach Singh et al.⁵²

Diese zweite im LeuT_{Aa} beobachtete Bindestelle scheint auch im SERT vorhanden zu sein. Sie wurde im Homologie-Modell und in Mutationsstudien genauer untersucht, wobei MD Simulationen zur Annahme führten, dass es sich wahrscheinlich nur um eine niedrig affine Bindestelle handelt.⁴⁸ Mutationsstudien bestätigten diese Ergebnisse, da Mutationen in der Substratbindetasche zu viel größeren Affinitätsverlusten der TCAs führten als Mutationen im Bereich des extrazellulären Vestibüls, in der die zweite Bindungsstelle enthalten ist.⁴⁸ Für die zweite Bindestelle werden auch allosterische Effekte diskutiert.⁵⁵

Wie aus diesen Ausführungen hervorgeht, werden derzeit erhebliche Anstrengungen unternommen, das Bindevverhalten von Inhibitoren des Serotonin-Transporters besser zu verstehen. Methoden zur Untersuchung von Bindungsereignissen und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen – wie sie im Folgenden dargestellt werden – sind in diesem Zusammenhang wichtige Techniken, die einen tieferen Einblick erlauben.

1.4 Bedeutung von Bindungsstudien in der Wirkstoffentwicklung

Target-Ligand-Interaktionen spielen eine entscheidende Rolle in biologischen Prozessen, da die Bindung eines Liganden an sein Target die Grundlage seiner Wirkung darstellt.^{56,57} Die Untersuchung und Charakterisierung solcher Interaktionen auf molekularer Ebene erfolgt in Bindungsstudien. Diese sind sowohl zur Aufklärung zellulärer Vorgänge als auch bei der Suche nach neuen pharmazeutischen Wirkstoffen unverzichtbar, was zur Entwicklung zahlreicher Messmethoden für diese Aufgabe geführt hat.^{56,58} Grundvoraussetzung ist jeweils eine hohe Sensitivität zur Quantifizierung subnanomolarer Konzentrationen, wie sie auf zellulärer Ebene typisch sind.⁵⁹

Radioligandbindungsassays basieren auf Liganden, die mit Radioisotopen, wie ^3H , ^{125}I oder ^{32}P markiert sind und stellen seit den 1970er Jahren ein Werkzeug zur Untersuchung von Target-Ligand-Interaktionen dar. Entscheidend für ihren Erfolg war, dass sich die Radioliganden mittels Szintillationsmessung mit der notwendigen Sensitivität quantifizieren ließen.^{59,60} Klassische Radioligandbindungsstudien basieren dabei auf der Trennung von gebildetem Target-Ligand-Komplex und freiem Liganden, durch Filtration oder Zentrifugation.⁶¹ Zunächst wurden derartige Untersuchungen in kleineren Testformaten durchgeführt; in ihrer weiteren Entwicklung führte eine automatisierte Durchführung beispielsweise im 96-Well Format zu einem erhöhten Durchsatz und machte sie so noch leistungsfähiger.⁶¹ Ein anderer Schritt war in diesem Zusammenhang die Entwicklung sogenannter „homogener Bindungsstudien“ (ohne Separationsschritt), wie des *Scintillation Proximity Assay* (SPA).^{56,58,62} Radioligandbindungsstudien werden bis heute zur Charakterisierung der Affinität eines Liganden zu einem Target in Screeningprozessen und auch zur Untersuchung der Funktionsweise von Rezeptoren beziehungsweise Transportern eingesetzt.⁶³ Allerdings stellt die Arbeit mit radioaktiven Stoffen eine Gefahr für die Gesundheit dar, erfordert spezielle Laboratorien und eine entsprechende Entsorgung der Abfälle.⁵⁶ Zudem kann die Einführung von Radioisotopen zu veränderten Bindungseigenschaften eines Liganden führen. Diese Nachteile und vor allem die hohen Kosten hat die Entwicklung nicht-radioaktiver Techniken entsprechend forciert.^{56,57,58}

Nur wenige Technologien können jedoch mit der Sensitivität der Szintillationsmessung mithalten.⁵⁸ Neuere Strategien basieren oftmals auf Fluoreszenzmessung, wobei diesbezüglich sowohl auf Separationstechniken beruhende als auch homogene Assays beschrieben sind.⁵⁶ Zu letzteren gehören Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)⁶⁴ und Fluoreszenz-Polarisations (FP)⁶⁵ Methoden.^{56,58} Nachteile bei der Arbeit mit Fluorophor-markierten Liganden sind allerdings der zusätzliche Syntheseschritt zur Einführung des Fluorophors und dadurch bedingte Auswirkungen auf die Affinität des Liganden zum Target. Andere Ansätze zur Durchführung von Bindungsassays arbeiten aufgrund dieser Problematik mit nicht-markierten Liganden. Dazu gehören solche, die auf Biosensoren basieren, wie *Surface Plasmon Resonance* (SPR)^{57,58} und auch Affinitätschromatographiemethoden⁶⁶ – letztere vor allem gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion.⁶⁷ Die Massenspektrometrie (MS) ist insgesamt in den letzten Jahrzehnten besonders durch die Kopplung mit Flüssigchromatographie (LC) zu einem wesentlichen Bestandteil sämtlicher Prozesse der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung geworden.⁶⁸ LC-MS Anwendungen in der pharmazeutischen Industrie umfassen dabei sowohl qualitative als auch quantitative Analysen. Sie werden beispielsweise zur Target-Identifizierung, in der kombinatorischen und medizinischen Chemie sowie in pharmakokinetischen und metabolischen Untersuchungen eingesetzt.⁶⁹ Insbesondere technische Weiterentwicklungen haben ihren Einsatz auch im HTS möglich gemacht.⁷⁰ Durch die hohe Selektivität und Sensitivität sowie den wesentlichen Vorteil, dass kein Labelling notwendig ist und daher affine Verbindungen eines Targets direkt untersucht werden können, erfährt die Massenspektrometrie auch in der Untersuchung von Target-Ligand-Interaktionen eine immer größer werdende Akzeptanz und Anwendung.⁶⁷

Eine Methode, welche die Möglichkeiten der selektiven und sensitiven Quantifizierung mittels LC-MS ausnutzt und dabei in direkter Analogie zu klassischen Radioligandbindungsstudien durchgeführt wird, sind die in unserem Arbeitskreis entwickelten MS-Bindungsstudien.^{59,71} Sie zeichnen sich durch die Verwendung eines nicht-markierten – sogenannten nativen – Markers aus, welcher aus dem gesamten Pool affiner Liganden eines Targets ausgewählt werden kann. Als Separationstechnik zur Trennung von freiem und gebundenem Marker wird Filtration genutzt. Der gebundene, native Marker wird schließlich freigesetzt und über LC-

MS/MS quantifiziert. Die Methode wird im 96-Well Format durchgeführt und durch eine schnelle Chromatographie kann ein sehr guter Probendurchsatz erzielt werden, welcher MS-Bindungsassays zu einer konkurrenzfähigen Screeningtechnik macht.^{71,72}

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, Bindungsstudien, die auf einem nicht-markierten Liganden basieren, für den Serotonin-Transporter zu entwickeln, welcher wegen seines Potentials in der Therapie depressiver Erkrankungen gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen ist.

Bisher in der Literatur beschriebene Techniken, die Target-Ligand-Interaktionen am SERT untersuchen, beruhen meist auf Radioliganden, wie den tritiierten Substanzen [³H]Imipramin⁷³, [³H]Citalopram^{74,75} und [³H]Paroxetin^{76,77} oder dem iodmarkierten Kokain-Analogon [¹²⁵I]RTI-55.⁷⁸ Neben klassischen Radioligandbindungsstudien, in welchen der gebildete Target-Ligand-Komplex durch Filtration von freiem Liganden separiert wird^{73,74,76,77,78}, wird für SERT in der Literatur auch ein „homogener“ *Scintillation Proximity Assay* (SPA) zur Untersuchung der Affinität von Testsubstanzen zum Transporter beschrieben.⁷⁵ Wegen der beim Einsatz von radioaktiv-markierten Verbindungen gegebenen Nachteile, schien es äußerst lohnenswert, für den Serotonin-Transporter Bindungsstudien mit einem nicht-markierten Liganden zu entwickeln, welche als Label-freie Screeningtechnik bei der Suche nach neuen, potenten Inhibitoren eingesetzt werden könnten.

Für die Realisierung dieses Ziels sollte das im Arbeitskreis entwickelte Prinzip der MS-Bindungsstudien zur Anwendung kommen.^{59,71,79} Die von Zepperitz et al.⁷⁹ für den GABA-Transporter mGAT1 entwickelten MS-Bindungsassays, die als Vorbild für meine Arbeit dienen sollten, werden in Analogie zu klassischen Radioligandbindungsstudien durchgeführt. Nach der Separation des Target-Marker-Komplexes durch Filtration wird der Komplex im Unterschied zu Radioligandassays jedoch dissoziiert, wodurch gebundener Marker freigesetzt und anschließend massenspektrometrisch quantifiziert werden kann.

Für die anvisierten Untersuchungen am SERT sollte kloniertes Targetmaterial verwendet werden, da dieses im Vergleich zu nativem Material den Vorteil höherer Expressionsraten bietet und auch die Zahl störender Proteine geringer sein sollte. Deshalb sollte in meiner Arbeit zunächst eine stabil den humanen Serotonin-Transporter (hSERT) exprimierende HEK-293 Zelllinie als heterologes Expressionssystem etabliert werden.

Für den zu entwickelnden Assay galt es zudem, einen nicht-markierten, sogenannten nativen Marker auszuwählen, wobei der gesamte Pool affiner Liganden des Serotonin-Transporters zur Verfügung stand. Um diesen nativen Marker, der möglichst selektiv und mit hoher Affinität an das Target binden sollte, in den bevorstehenden Experimenten massenspektrometrisch quantifizieren zu können, sollte eine LC-MS/MS Analytik entwickelt werden. Aufgrund der typischerweise in Bindungsstudien zu quantifizierenden subnanomolaren Konzentrationen, sollte mit dieser der Marker bis in den niedrigen picomolaren Konzentrationsbereich zu bestimmen sein. Bei MS-Bindungsstudien dient die der massenspektrometrischen Quantifizierung vorgeschaltete Chromatographie in der Regel nur der Abtrennung unerwünschter Matrixbestandteile, welche die massenspektrometrische Detektionsleistung sonst negativ beeinflussen könnten und nicht der Trennung von Analyten. Es schien daher möglich, eine effiziente und sehr schnelle Chromatographie zu entwickeln, die in MS-Bindungsstudien am SERT einen hohen Probendurchsatz erlaubt.

Um zu zeigen, dass die entwickelte LC-MS/MS Analytik zur Markerquantifizierung in Bindungsstudien geeignet ist, war beabsichtigt, diese nach den von der *United States Food and Drug Administration* (U.S. FDA) herausgegebenen Richtlinien zur Validierung bioanalytischer Methoden⁸⁰ hinsichtlich Linearität, Richtigkeit und Präzision zu überprüfen.

In Sättigungs-, Kompetitions- und kinetischen Experimenten sollte schließlich die Bindung des Markers und weiterer Inhibitoren an hSERT mittels des neu entwickelten MS-Bindungsassays untersucht werden. Die erzielten Ergebnisse sollten dann mit Resultaten aus bereits publizierten Radioligandbindungsstudien am Serotonin-Transporter verglichen werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression des Serotonin-Transporters in HEK-293 Zellen

3.1.1 Hintergrund

Ein wichtiger Baustein für die Entwicklung von MS-Bindungsassays für den Serotonin-Transporter war die Bereitstellung einer geeigneten Targetquelle. Wie bereits in der Zielsetzung beschrieben, sollte zu diesem Zweck eine stabil den humanen Serotonin-Transporter (hSERT) exprimierende Zelllinie etabliert werden.

Für die heterologe Targetexpression wurden HEK-293 Zellen (*human embryonic kidney cells* transformiert mit dem Adenovirus Typ 5⁸¹) als Wirtssystem ausgewählt. Diese Zellen werden aufgrund ihrer leichten Kultivierbarkeit in adhärennten Monolayerkulturen, einer hochgradigen Transfektionseffizienz und vor allem wegen ihrer Fähigkeit durch posttranslationale Modifikationsprozesse sämtliche funktionsfähige Proteine eukaryotischen Ursprungs zu synthetisieren, als Expressionssystem für rekombinante Proteine umfangreich eingesetzt.⁸² hSERT exprimierende HEK-293 Zellen sind auch als Expressionssystem in literaturbekannten Radioligandbindungsstudien beschrieben, was für einen späteren Vergleich der Resultate aus MS-Bindungsassays mit solchen aus entsprechenden Radioligandbindungsstudien günstig erschien.^{73,74,76} Ebenfalls vorteilhaft war, dass im Arbeitskreis mit diesem Wirtssystem bereits Erfahrung bestand, da stabil die verschiedenen GABA-Transporter exprimierende HEK-293 Zellen von Kragler etabliert wurden.⁸³

Um ein gewünschtes Target in HEK-293 Zellen exprimieren zu können, muss die für das Protein kodierende cDNA in geeigneten Expressionsvektoren vorliegen. Je nachdem wie diese Vektoren dann in der Zelle genutzt werden, wird das Protein transient oder stabil exprimiert. Bei der transienten Expression wird in die Zelle eingeschleuste fremde DNA weder als Plasmid repliziert noch stabil in das Genom integriert.⁸⁴ Sie liegt nur über einen begrenzten Zeitraum als freie DNA in der Zelle vor und so lange erfolgt die effiziente Transkription und anschließende Bildung des Proteins.⁸⁴ Wird die DNA abgebaut, wird das Protein nicht mehr exprimiert. Da die Transfektionseffizienz bei solchen Versuchen stark schwanken kann und man keine

genetisch einheitliche Zelllinie vorliegen hat, nutzt man die transiente Transfektion vor allem zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit eines Plasmids.⁸⁴ Wird die fremde DNA hingegen stabil in das Genom der Wirtszelle integriert, kann die enthaltene genetische Information nicht mehr verloren gehen und die Zelle exprimiert dauerhaft das gewünschte Protein.⁸⁴

3.1.2 Expressionsvektoren mit hSERT-cDNA

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation standen zwei Vektorsysteme, welche beide die notwendigen Elemente für eine Expression fremder genetischer Information in eukaryotischen Zellen enthielten und in welche bereits die für hSERT kodierende cDNA (1890 bp) integriert war, zur Verfügung. Bei diesen Plasmiden handelte es sich um pCMV6-Entry (OriGene; siehe Abb. 10) und pcDNA3.1(+) (Invitrogen; siehe Abb. 11). Letzteres wurde freundlicherweise von Theo Rein vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München zur Verfügung gestellt. Mit integrierter hSERT-cDNA haben die Plasmide eine Gesamtgröße von ca. 6800 bp (pCMV6-Entry-hSERT) beziehungsweise ca. 7300 bp (pcDNA3.1(+)-hSERT), was für in der Gentechnik eingesetzte Vektoren typisch ist.⁸⁴

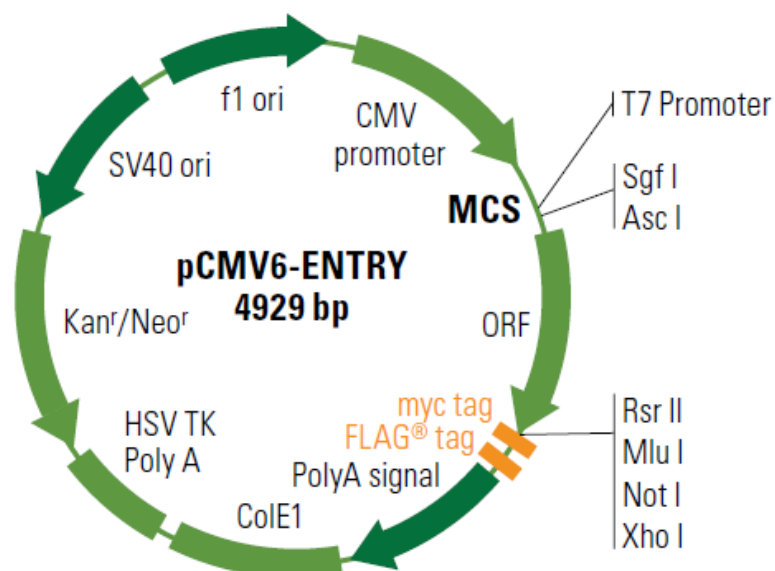


Abb. 10 Expressionsvektor pCMV6-Entry (4929 Basenpaare; Abbildung aus OriGene-Broschüre⁸⁵)

Sowohl pCMV6-Entry als auch pcDNA3.1(+) enthalten neben eukaryotischen Funktionselementen auch solche, die eine Klonierung der Plasmide in *E.coli*

ermöglichen. Dies war für meine Arbeit wichtig, damit für Transfektionsversuche überhaupt ausreichende Mengen des Plasmids bereitgestellt werden konnten. Zu den für die Klonierung in *E.coli* relevanten Elementen gehören der *origin of replication* ColE1 (pCMV6-Entry, siehe Abb. 10) beziehungsweise der pUC origin (pcDNA3.1(+), siehe Abb. 11), welcher von der DNA-Polymerase aus *E.coli* als Initiationspunkt für die Replikation erkannt wird und sicherstellt, dass das Plasmid unabhängig von der genomischen DNA in der Zelle repliziert wird.⁸⁴

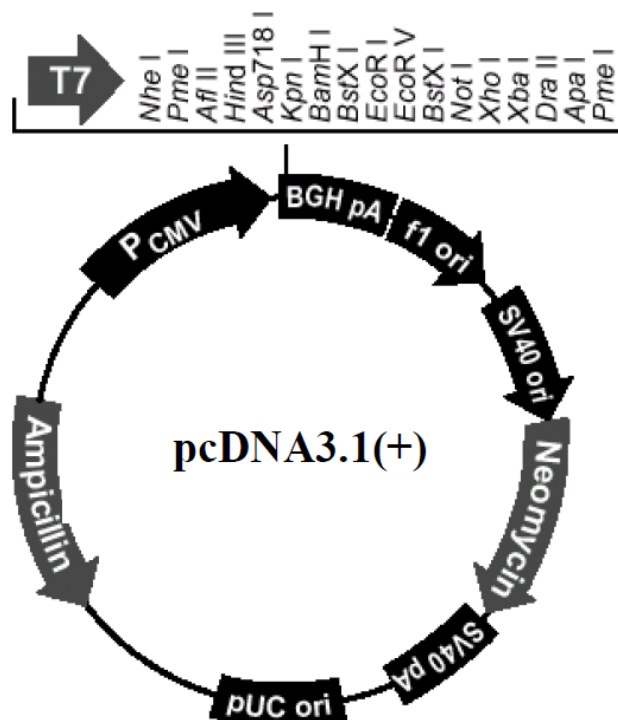


Abb. 11 Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (5428 Basenpaare; Abbildung modifiziert nach Invitrogen *User Manual*⁸⁶)

Beide Plasmide enthalten auch für Antibiotika-Resistenzen kodierende Gene, welche eine Selektion von Transformanten unter Anwesenheit eines bestimmten Antibiotikums ermöglichen. Das β -Lactamase-Gen auf pcDNA3.1(+) verleiht *E.coli*, welche Plasmide aufgenommen haben, die Fähigkeit in Gegenwart von Ampicillin zu wachsen. Auf pCMV6-Entry befindet sich ein Gen, welches für eine Aminoglycosid-Phosphotransferase kodiert und dadurch transformierten Bakterien eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin verleiht.

Zu den Funktionselementen der Plasmide, welche eine Proteinexpression in eukaryotischen Zellen ermöglichen, gehört der CMV-Promotor (siehe Abb. 10 und

Abb. 11), an welchem die Transkription gestartet wird und der außerdem eine hohe Expressionsrate des rekombinanten Proteins bewirkt. Dieser Gensequenz schließt sich die sogenannte *multiple cloning site* (MCS) an, in welcher die für hSERT kodierende cDNA in die Plasmide integriert ist. In pCMV6-Entry folgen direkt auf die Sequenz der cDNA Abschnitte, welche für zwei sogenannte Tags – Myc- und Flag[®]-Tag – am C-terminalen Ende des Proteins kodieren (siehe Abb. 10). Die daraus resultierenden zusätzlichen C-terminalen Polypeptidsequenzen am exprimierten Protein sollten aber keine veränderte Faltung bewirken und auch die Proteinaktivität nicht beeinflussen. Die Tags sind als „Affinitätstags“ für die Detektion und Aufreinigung des Proteins hilfreich, was für die von mir anvisierten Untersuchungen jedoch keine Rolle spielte. Auf die für das Target kodierenden Bereiche folgt in den Plasmiden jeweils eine *Polyadenylation* (PolyA) Sequenz (siehe Abb. 10 und Abb. 11), welche die Transkription beendet. Die Selektion derjenigen Zellen, welche die Plasmid-DNA stabil in ihr Genom integriert haben, kann im Kulturmedium durch Zusatz des Neomycin-Derivates Geneticin (G418) erfolgen, da auf beiden Plasmiden ein Resistenzgen liegt, das für die Neomycin-Phosphotransferase kodiert.

Wie erläutert, eignen sich sowohl pCMV6-Entry-hSERT als auch pcDNA3.1(+)-hSERT zur Targetexpression in HEK-293 Zellen und der Unterschied im exprimierten Target würde nur in den Tags, welche bei Einsatz von pCMV6-Entry-hSERT am C-terminalen Ende an den Transporter angehängt sind, bestehen. Es wurde beabsichtigt, nach einer Klonierung in *E.coli* zunächst mit beiden Plasmiden HEK-293 Zellen transient zu transfizieren, um die Funktionsfähigkeit der Plasmide zu überprüfen und anschließend stabile Zelllinien unter Verwendung beider Plasmide zu etablieren. Erst nach Untersuchung der Targetexpression und der Charakterisierung des Targets sollte entschieden werden, mit welcher der beiden stabilen Zelllinien schließlich in den geplanten MS-Bindungsassays gearbeitet werden sollte.

3.1.3 Vermehrung der Plasmide in *E.coli*

Zur Klonierung wurden zunächst kompetente *E.coli* hergestellt. Diese kompetenten Bakterien wurden dann mit pCMV6-Entry-hSERT beziehungsweise mit pcDNA3.1(+)-hSERT transformiert und anschließend auf Kanamycin- (pCMV6-Entry-hSERT) beziehungsweise Ampicillin-haltigem Selektionsagar (pcDNA3.1(+)-hSERT)

ausplattiert, so dass ausschließlich Kolonien transformierter Bakterien wachsen konnten. Entstandene Bakterienkolonien wurden in Übernachtskulturen weiter vermehrt und durch Minipräparationen wurden daraus kleine Plasmidmengen isoliert und anschließend analysiert. Um zu überprüfen, ob hSERT tatsächlich in die Plasmide integriert war, wurde die gewonnene Plasmid-DNA durch geeignete Restriktionsendonukleasen fragmentiert und die erhaltenen DNA-Bruchstücke definierter Länge anschließend über Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Vergleich mit Basenpaarmarkern (*DNA-Ladder*) identifiziert.

Für das Plasmid pCMV6-Entry-hSERT wurde mit den nach der Minipräparation gewonnenen DNA-Proben ein Verdau mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und NotI durchgeführt. KpnI müsste das Plasmid direkt vor und NotI direkt nach der für hSERT kodierenden cDNA schneiden, so dass das cDNA-Insert aus dem Plasmid herausgeschnitten werden müsste und durch den Restriktionsverdau folglich zwei DNA-Bruchstücke von ca. 4900 bp für das geöffnete Plasmid und von ca. 1900 bp für die cDNA von hSERT entstehen müssten.

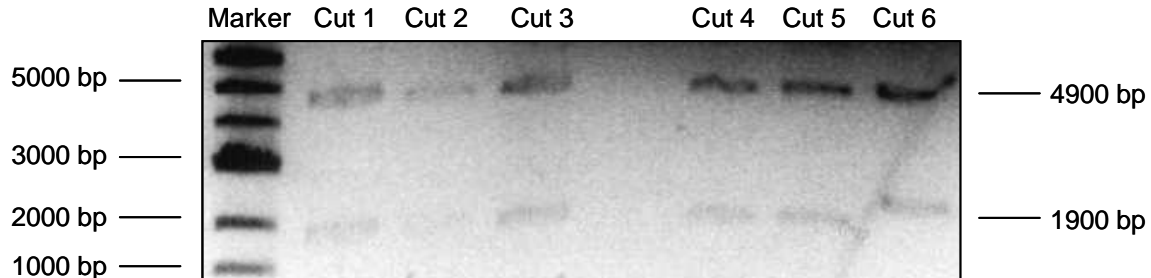


Abb. 12 Cut von pCMV6-Entry-hSERT aus verschiedenen Übernachtskulturen nach Minipräparation mit KpnI und NotI (Spur 1: Basenpaarmarker (*DNA-Ladder*), Spur 2: Cut 1, Spur 3: Cut 2, Spur 4: Cut 3, Spur 5: n. d., Spur 6: Cut 4, Spur 7: Cut 5, Spur 8: Cut 6).

Das Bild der Gelelektrophorese in Abb. 12 zeigt, dass durch den Verdau von pCMV6-Entry-hSERT mittels der Restriktionsendonukleasen KpnI und NotI tatsächlich in allen Fällen zwei DNA-Bruchstücke der erwarteten Größen entstanden sind und bestätigt somit, dass die hSERT-cDNA in pCMV6-Entry integriert ist und das Plasmid in *E.coli* erfolgreich kloniert werden konnte. Cut 6 liefert in der Elektrophorese die intensivsten Banden (siehe Abb. 12), was bedeutet, dass die größte Vermehrung der Plasmid-DNA in dieser Übernachtskultur erfolgte. Die transformierten *E.coli* aus dieser Kultur wurden in einer größeren Übernachtskultur

weiter vermehrt und durch Maxipräparation wurde die stark vermehrte Plasmid-DNA aufgereinigt und isoliert. Ihre Rückgewinnung wurde wiederum durch Verdau mittels der beschriebenen Restriktionsendonukleasen und anschließender analytischer Gelelektrophorese durch die entstandenen Fragmente bestätigt.

Für das Plasmid pcDNA3.1(+)-hSERT wurde nach der Minipräparation einer transformierten *E.coli* Übernachtskultur ein Verdau mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und NheI durchgeführt. XhoI müsste das Plasmid einmal direkt nach der für hSERT codierenden Sequenz schneiden und NheI müsste die DNA zweimal schneiden – vor der für hSERT codierenden Sequenz und innerhalb dieser. Es müssten daher insgesamt drei DNA-Bruchstücke von jeweils ca. 5400 bp für das geöffnete Plasmid und von ca. 1050 bp und ca. 850 bp für die cDNA von hSERT entstehen.

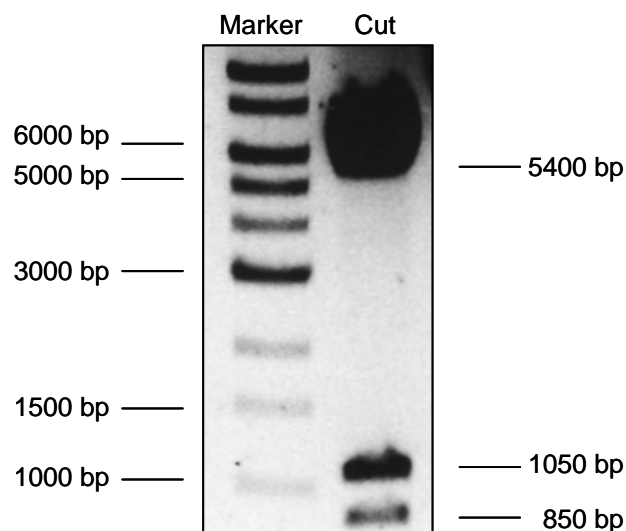


Abb. 13 Cut von pcDNA3.1(+)-hSERT aus einer Übernachtskultur nach Minipräparation mit XhoI und NheI (Spur 1: Basenpaarmarker (*DNA-Ladder*), Spur 2: Cut).

Das Bild der Gelelektrophorese (siehe Abb. 13) bestätigte die Erwartungen bezüglich der nach dem Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente, weshalb auch für pcDNA3.1(+) die Integration der cDNA von hSERT und die korrekte Klonierung in *E.coli* nachgewiesen wurde. Der Cut der Plasmid-DNA lieferte sehr intensive Banden im Elektrophoresegel (siehe Abb. 13), was für eine hohe Klonierungsrate der DNA spricht. Daher wurden die mit pcDNA3.1(+)-hSERT transformierten Bakterien aus der entsprechenden kleinen Übernachtskultur in einer größeren Übernachtskultur weiter

vermehrt und die stark vermehrte Plasmid-DNA wurde anschließend durch eine Midipräparation aufgereinigt und isoliert. Auch hier wurde die Rückgewinnung durch Verdau mittels der beschriebenen Restriktionsendonukleasen und anschließender analytischer Gelelektrophorese der entstandenen Fragmente bestätigt.

Für Transfektionsversuche wurden somit ausreichende Mengen der beiden Expressionsvektoren mit integrierter hSERT-cDNA erhalten. Zur Sicherheit waren zusätzlich von den mit pCMV6-Entry-hSERT beziehungsweise pcDNA3.1(+)-hSERT transformierten *E.coli* Aliquots der Übernachtskulturen als Glycerolstocks bei -80 °C eingefroren worden.

3.1.4 Transiente Transfektion von HEK-293 Zellen

Durch transiente Transfektion von HEK-293 Zellen mit pCMV6-Entry-hSERT und pcDNA3.1(+)-hSERT wurde die Funktionsfähigkeit der beiden Expressionsvektoren überprüft. FuGENE 6[®] wurde als Transfektionsreagenz ausgewählt. Dieses Reagenz basiert nach Angaben des Herstellers Roche auf einer Multikomponenten-Formulierung von Lipiden und anderen nicht weiter spezifizierten Bestandteilen und wird zur Transfektion zahlreicher eukaryotischer Zellen eingesetzt.⁸⁷ Durch eine Komplexierung der DNA mit Bestandteilen des Reagenzes soll ihr Transport in die Zelle ermöglicht werden.⁸⁷

3.1.4.1 Etablierung eines Testsystems zur Überprüfung der Transporter-Expression

Um die Expression von hSERT nach transienter Transfektion von HEK-293 Zellen zu untersuchen, musste ein geeignetes Testsystem etabliert werden. Ausgangspunkt waren in der Literatur beschriebene Radioligandbindungsstudien für den Serotonin-Transporter.^{73,74,76,77} Es schien sinnvoll, die Expression des Transporters durch die Bindung eines geeigneten Radioliganden zu bestimmen. Als Radioligand wurde zu diesem Zweck das kommerziell verfügbare [³H]Paroxetin (**5**) (siehe Abb. 14) ausgewählt.

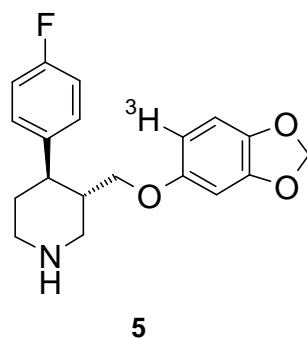


Abb. 14 [³H]Paroxetin (**5**) (spezifische Aktivität: 854.7 GBq/mmol, Perkin-Elmer)

In der Literatur sind einige Radioligandbindungsstudien mit diesem tritiummarkierten selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitor (SSRI) am SERT beschrieben.^{76,77,88,89} Die folgenden Inkubationsbedingungen für das Testsystem mit [³H]Paroxetin (**5**) wurden analog der Literaturbedingungen gewählt.^{77,88}

Inkubationspuffer: 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4

Inkubationstemperatur: 22 °C

Inkubationszeit: 2 h

Affinitätskonstanten (K_d) für die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an SERT sind bis heute ausschließlich für Cortexproben aus humanem oder Rattenhirn publiziert.^{77,88,89} Da in diesen Studien die beschriebenen K_d -Werte für die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an den Transporter zwischen 30 pM und 380 pM liegen, setzte ich im Testsystem zur Überprüfung der Transporter-Expression eine Radioligandkonzentration von 200 pM ein. Neben der Gesamtbindung (GB) von [³H]Paroxetin (**5**) sollte in den Untersuchungen auch dessen nichtspezifische Bindung (NSB) charakterisiert werden. Die Differenz aus beiden stellt die spezifische Radioligandbindung (SB = GB – NSB) an das Target dar. Die nichtspezifische Bindung wurde wie bei Cheetham et al.⁸⁸ als Radioligandbindung unter Anwesenheit von Citalopram (**rac-4**) (1 μM) bestimmt. Wird der selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitor Citalopram (**rac-4**) wie hier in hohem Überschuss eingesetzt, verdrängt er [³H]Paroxetin (**5**) vollständig aus dessen spezifischer Bindung, so dass dieses nur noch andere nichtspezifische Bindestellen belegen kann. Ist die Gesamtbindung in den Untersuchungen höher als die nichtspezifische Bindung, bedeutet dies, dass der Radioligand spezifisch gebunden und somit das Target exprimiert wird. Im Folgenden wird der Unterschied von Gesamt- und nichtspezifischer Bindung als Quotient beider Werte ausgedrückt

(GB/NSB). Je größer dieser Quotient ist, desto höher ist der Anteil an spezifischer Bindung und desto höher ist auch die Targetexpression.

Zur transienten Transfektion wurden HEK-293 Zellen bei einer Konfluenz von etwa 30 % (pCMV6-Entry-hSERT) beziehungsweise von etwa 15 % (pcDNA3.1(+)-hSERT) in einer 145 cm² Kulturschale mit einem Verhältnis von FuGENE 6[®] (μL) zu DNA (μg) von 3:1 – wie es für erste Versuche vom Hersteller des Transfektionsreagenzes empfohlen war⁸⁷ – transfiziert. 48 h nach der transienten Transfektion wurden die Zellen geerntet und in Inkubationspuffer resuspendiert.

In einem Gesamtassayvolumen von 500 μL wurde ein Aliquot der transient transfizierten HEK-293 Zellen mit [³H]Paroxetin (**5**) (200 pM) und zusätzlich zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung in parallel durchgeführten Experimenten noch mit Citalopram (*rac-4*) (1 μM) inkubiert. Die Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden erfolgte nach der Inkubation (2 h) durch Filtration über Glasfaserfilter (Whatman GF/C Filter, vorinkubiert mit 0.05 % PEI-Lösung⁷⁷) unter Verwendung eines Zellharvesters. Die Filter mit darauf haftendem ans Target gebundenem Liganden wurden anschließend mit Inkubationspuffer gewaschen. Die einzeln ausgestanzten Filterstücke wurden danach mit Szintillationscocktail versetzt, so dass der gebundene Radioligand anschließend über Szintillationszählung quantifiziert werden konnte. Als Negativ-Kontrolle wurden nicht-transfizierte, sogenannte „leere“ HEK-293 Zellen auf die gleiche Weise bezüglich der Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) untersucht. So sollte sichergestellt werden, dass die Zellen selbst keine in der Messung störenden Proteine exprimieren. In Abb. 15 sind für ein typisches Beispiel die bei den Experimenten erhaltenen Signalintensitäten der Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) dargestellt.

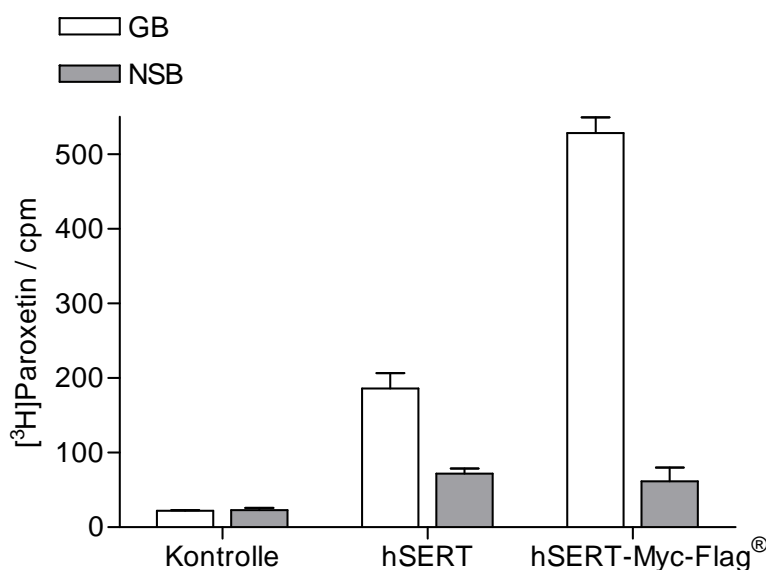


Abb. 15 Darstellung von Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB, unter Anwesenheit von 1 μ M Citalopram (*rac-4*)) des Radioliganden [³H]Paroxetin (**5**) (200 pM) an nicht-transfizierte HEK-293 Zellen (Kontrolle) und transient mit pcDNA3.1(+)-hSERT (hSERT) beziehungsweise mit pCMV6-Entry-hSERT (hSERT-Myc-Flag[®]) transfizierte HEK-293 Zellen (Einsatz von jeweils ca. 40 μ g Protein bestimmt nach Bradford⁹⁰). GB und NSB stellen Mittelwerte (\pm SD) aus Triplikaten dar.

Tab. 1 Vergleich der im Assay mit [³H]Paroxetin (**5**) ermittelten Quotienten aus Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB) des Radioliganden an „leere“ HEK-293 Zellen (Kontrolle) und an solche, die transient hSERT beziehungsweise hSERT-Myc-Flag[®] exprimieren.

Ansatz	Kontrolle	hSERT	hSERT-Myc-Flag [®]
GB/NSB	1.0	2.6	8.6

Die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an „leere“ HEK-293 Zellen zeigt keinen erkennbaren Unterschied zwischen Gesamt- und nichtspezifischer Bindung des Radioliganden (GB/NSB = 1.0, siehe Tab. 1). HEK-293 Zellen exprimieren selbst also keine im Bindungsversuch störenden Proteine und die Bindung des Radioliganden **5** an diese Zellen ist ausschließlich nichtspezifischer Natur. Die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an transient mit pcDNA3.1(+)-hSERT transfizierte Zellen zeigt eine im Vergleich zur nichtspezifischen Bindung um den Faktor 2.6 erhöhte Gesamtbindung (siehe Tab. 1 und Abb. 15, hSERT). Folglich wird eine

spezifische [³H]Paroxetin-Bindung beobachtet und man kann von einer hSERT-Expression ausgehen. Die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an transient mit pCMV6-Entry-hSERT transfizierte Zellen zeigt eine im Vergleich zur nichtspezifischen Bindung sogar um den Faktor 8.6 erhöhte Gesamtbindung (siehe Tab. 1 und Abb. 15, hSERT-Myc-Flag[®]). Die Expression von hSERT-Myc-Flag[®] scheint sich damit ebenfalls zu bestätigen. Auffallend bei der transienten Transfektion mit pCMV6-Entry-hSERT und pcDNA3.1(+)-hSERT ist bei etwa gleicher Signalhöhe der nichtspezifischen [³H]Paroxetin-Bindung, die bei der Expression von hSERT-Myc-Flag[®] deutlich höhere Gesamtbindung des Radioliganden (siehe Abb. 15). Dies stellt eine um den Faktor 4 höhere spezifische Bindung nach der Transfektion mit diesem Plasmid und somit eine wesentlich höhere Targetexpressionsdichte dar. Ursache für diesen großen Unterschied in der spezifischen Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) könnte die Transfektion von Zellen unterschiedlichen Konfluenzgrades gewesen sein; zur Transfektion mit pCMV6-Entry-hSERT wurden nämlich wie oben beschrieben zu 30 % und zur Transfektion mit pcDNA3.1(+)-hSERT nur zu 15 % konfluente Zellen eingesetzt. Der Unterschied in der Zellkonfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion hat eventuell dazu geführt, dass bei einer Konfluenz von nur 15 % deutlich weniger Expressionsvektor aufgenommen wurde und von den Zellen somit auch deutlich weniger Protein exprimiert werden konnte.

Zusammenfassend wurde mit dem [³H]Paroxetin-Bindungsassay ein Testsystem zur Untersuchung der Targetexpression etabliert, mit welchem die Funktionsfähigkeit beider Plasmide bezüglich der SERT-Expression bewiesen werden konnte. Zur definitiven Bestätigung der korrekten Targetexpression sollten jedoch noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

3.1.4.2 Optimierung der Transfektionseffizienz

Der Hersteller des von mir verwendeten Transfektionsreagenzes FuGENE 6[®] gibt an, dass sehr gute Transfektionseffizienzen mit Verhältnissen von Transfektionsreagenz (µL) zu eingesetzter DNA (µg) von 3:2, 3:1 und 6:1 erzielt werden.⁸⁷ In den unter 3.1.4.1 beschriebenen Experimenten war ein Verhältnis von 3:1 zur Transfektion der HEK-293 Zellen eingesetzt worden. Nun war beabsichtigt, verschiedene Verhältnisse bezüglich ihrer Transfektionseffizienz mittels des unter 3.1.4.1 beschriebenen Bindungsassays mit [³H]Paroxetin (**5**) zu untersuchen. Dabei wurde

das Plasmid pCMV6-Entry-hSERT zur Transfektion der Zellen eingesetzt. Auch in diesen Studien wurde sowohl die Gesamt- als auch die nichtspezifische Bindung des Radioliganden **5** untersucht. Das optimale Transfektionsverhältnis sollte durch den höchsten Quotienten aus beiden Werten identifiziert werden.

Für die Untersuchungen wurden zu etwa 15 % konfluente Zellen in einer 6-Well Platte mit fünf verschiedenen FuGENE 6[®]:pCMV6-Entry-hSERT-Verhältnissen transfiziert (siehe Tab. 2). 48 h nach der Transfektion wurde der Radioligandbindungsassay mit [³H]Paroxetin (**5**) wie unter 3.1.4.1 beschrieben, durchgeführt.

Tab. 2 Transiente Transfektionsversuche an HEK-293 Zellen zur Ermittlung des optimalen FuGENE 6[®]: DNA (pCMV6-Entry-hSERT)-Verhältnisses mit Angabe des im Bindungsassay mit [³H]Paroxetin (**5**) ermittelten Quotienten aus Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB) des Radioliganden **5**. Angaben bezogen auf 6-Well Platten.

FuGENE 6 [®] :DNA	3:2	3:1	4:1	5:1	6:1
FuGENE 6 [®] (in μ L)	3	3	4	5	6
DNA (in μ g)	2	1	1	1	1
GB/NSB	6.7	13.2	8.2	3.6	3.2

Die im Experiment ermittelten Signalstärken für die Gesamt- und nichtspezifische Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) sind in Abb. 16 gegenübergestellt. Bereits auf den ersten Blick wird deutlich, dass die FuGENE 6[®]:DNA-Verhältnisse von 5:1 und 6:1 die schlechteste Transfektionseffizienz zur Folge haben (siehe Abb. 16), da sie den geringsten Unterschied zwischen Gesamt- und nichtspezifischer Bindung aufweisen. Der Quotient der beiden Werte beträgt bei diesen Ansätzen nur 3.6 beziehungsweise 3.2 (siehe Tab. 2) – die spezifische Bindung ist folglich relativ gering. Bei einem Transfektionsverhältnis von 3:2 wird die Effizienz bezüglich der Targetexpression gesteigert und es wird ein Quotient von 6.7 erzielt (siehe Abb. 16 und Tab. 2). Die besten Ergebnisse werden durch FuGENE 6[®]:DNA-Verhältnisse von 3:1 und 4:1 erhalten: Die beste Transfektionseffizienz wird dabei vom 3:1 Verhältnis mit einem Quotienten von 13.6 erzielt (siehe Tab. 2). Das Verhältnis 4:1 steht mit einem Quotienten von 8.2 zwar deutlich schlechter dar (siehe Tab. 2), kann aber durch eine

hohe Signalstärke überzeugen (siehe Abb. 16). Das Verhältnis 3:1 (3 μ L FuGENE 6[®] und 1 μ g pCMV6-Entry-hSERT bezogen auf 6-Well Platten, siehe Tab. 2) hat im Vergleich zum Verhältnis 4:1 zusätzlich zum höheren Quotienten aus Gesamt- und nichtspezifischer Bindung, welcher eine höhere spezifische Bindung des Radioliganden an das Target ausdrückt, auch den Vorteil, dass weniger FuGENE 6[®] verbraucht wird (siehe Tab. 2), was eine erhebliche Kostenersparnis darstellt.

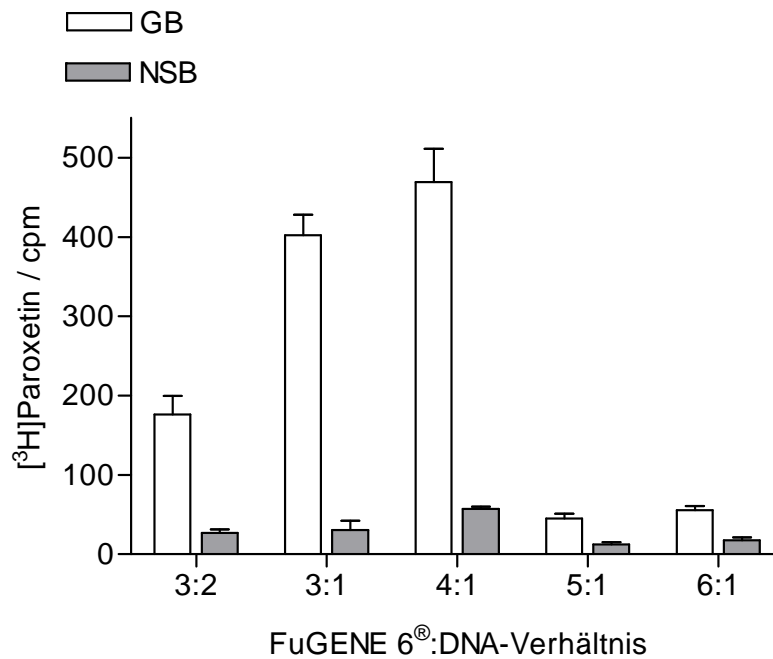


Abb. 16 Untersuchung der Transfektionseffizienz unter Einsatz verschiedener FuGENE 6[®]:DNA (pCMV6-Entry-hSERT)-Verhältnisse nach transienter Transfektion von HEK-293 Zellen: Darstellung von Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB, unter Anwesenheit von 1 μ M Citalopram (*rac-4*)) des Radioliganden [³H]Paroxetin (**5**) (200 pM) an transfizierte Zellen (Einsatz von jeweils ca. 50 μ g Protein bestimmt nach Bradford⁹⁰). GB und NSB stellen Mittelwerte (\pm SD) aus Triplikaten dar.

Das Transfektionsverhältnis von 3:1 wurde aufgrund dieser Ergebnisse als optimal befunden und für alle weiteren transienten und stabilen Transfektionsversuche von HEK-293 Zellen eingesetzt.

3.1.4.3 Sättigungsexperimente mit [³H]Paroxetin

Um absolut sicherzugehen, dass durch den Einsatz der Plasmide in der Transfektion von HEK-293 Zellen tatsächlich hSERT beziehungsweise hSERT-Myc-Flag[®] exprimiert wird, war vor der Etablierung einer stabilen Zelllinie beabsichtigt, eine genauere Charakterisierung des transient exprimierten Proteins durchzuführen.

Da in der Literatur eine sättigbare, hochaffine Bindestelle für [³H]Paroxetin (**5**) am SERT beschrieben ist⁷⁷, wurden Sättigungsexperimente (siehe 3.3.3.1) an transient transfizierten HEK-293 Zellen durchgeführt. Durch die Darstellung der sättigbaren Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an hSERT und hSERT-Myc-Flag[®] und die sich daraus ableitenden Affinitätskonstanten (K_d) für die Bindung des Radioliganden **5** sollte die korrekte Expression des gewünschten Targets bewiesen werden.

Nach transienter Transfektion der Zellen wurden in den Sättigungsexperimenten steigende [³H]Paroxetin-Konzentrationen (10 pM – 2 nM) mit konstanter Targetkonzentration bei 22 °C über 2 h inkubiert. Das Gesamtassayvolumen wurde von zuvor 500 µL auf 3000 µL gesteigert, um trotz der relativ geringen spezifischen Aktivität von [³H]Paroxetin (**5**) (854.7 GBq/mmol) auch für sehr niedrige Radioligandassaykonzentrationen eine ausreichende Signalstärke in der Szintillationszählung zu erhalten. Nach der Inkubation erfolgte die Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden auch hier durch Filtration über Glasfaserfilter. Der gebundene Radioligand wurde schließlich durch Szintillationszählung quantifiziert. Für jede Radioligandkonzentration wurde sowohl die Gesamt- als auch die nichtspezifische Bindung (in Gegenwart von 1 µM Citalopram (*rac-4*)) bestimmt. Die sich daraus ergebende spezifische Bindung des Radioliganden **5** war für die Auswertung des Versuchs wesentlich.

In Abb. 17 ist die erhaltene Sättigungsisotherme für die Bindung [³H]Paroxetin (**5**) an hSERT-Myc-Flag[®] nach transienter Transfektion von HEK-293 Zellen mit pCMV6-Entry-hSERT dargestellt. Dabei ist die spezifische [³H]Paroxetin-Bindung gegen die eingesetzte [³H]Paroxetin-Konzentration aufgetragen. Die Kurve bestätigt die sättigbare spezifische Bindung des Radioliganden **5** an hSERT-Myc-Flag[®] und es kann daraus sowohl die Targetdichte (B_{max}) des verwendeten Materials als auch die Affinität (K_d) des Radioliganden **5** zum Target ermittelt werden. Für die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an hSERT-Myc-Flag[®] ergibt sich daraus ein K_d -Wert von 120 pM und ein B_{max} -Wert von 840 fmol/mg Protein (siehe Tab. 3).

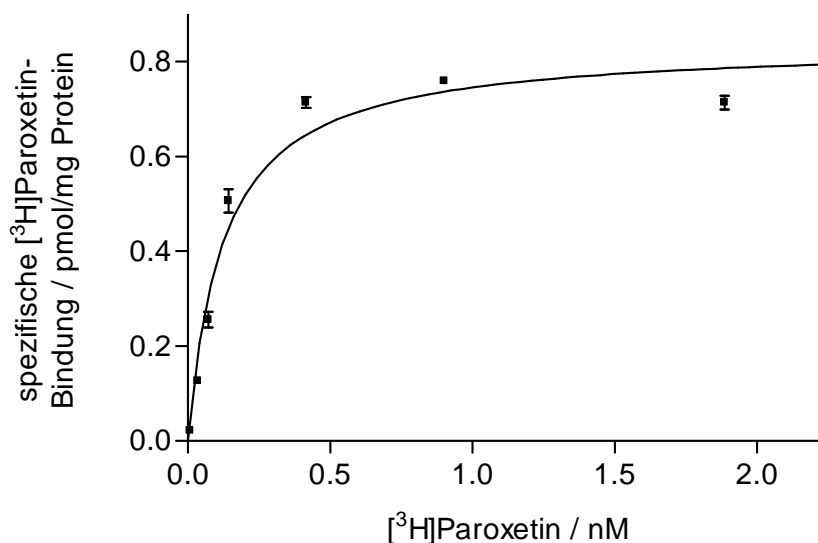


Abb. 17 Sättigungsexperiment mit $[^3\text{H}]$ Paroxetin (**5**): Darstellung der spezifischen Radioligandbindung (in pmol/mg Protein) an transient hSERT-Myc-Flag[®] exprimierende HEK-293 Zellen (Proteinmenge: 53 μg) und daraus resultierende Sättigungsisotherme. Nichtspezifische Bindung wurde als Radioligandbindung in Gegenwart von 1 μM Citalopram (**rac-4**) bestimmt und von der Gesamtbinding zur Ermittlung der spezifischen Bindung subtrahiert. Datenpunkte stellen Mittelwerte (\pm SEM) aus Triplikaten eines Experimentes dar.

Tab. 3 Vergleich der für die Bindung von $[^3\text{H}]$ Paroxetin (**5**) an transient von HEK-293 Zellen exprimierten hSERT-Myc-Flag[®] und hSERT ermittelten K_d - und B_{max} -Werte

	hSERT-Myc-Flag [®]	hSERT
K_d (in μM)	120	55
B_{max} (in fmol/mg Protein)	840	130

In Abb. 18 ist die erhaltene Sättigungsisotherme der $[^3\text{H}]$ Paroxetin-Bindung an hSERT, welcher mittels pcDNA3.1(+)-hSERT transient von HEK-293 Zellen exprimiert wurde, dargestellt. Auch hier kann eine Sättigung der spezifischen Radioligandbindung an das Target verifiziert werden. Der ermittelte K_d -Wert beträgt 55 μM und der B_{max} -Wert 130 fmol/mg Protein (siehe Tab. 3).

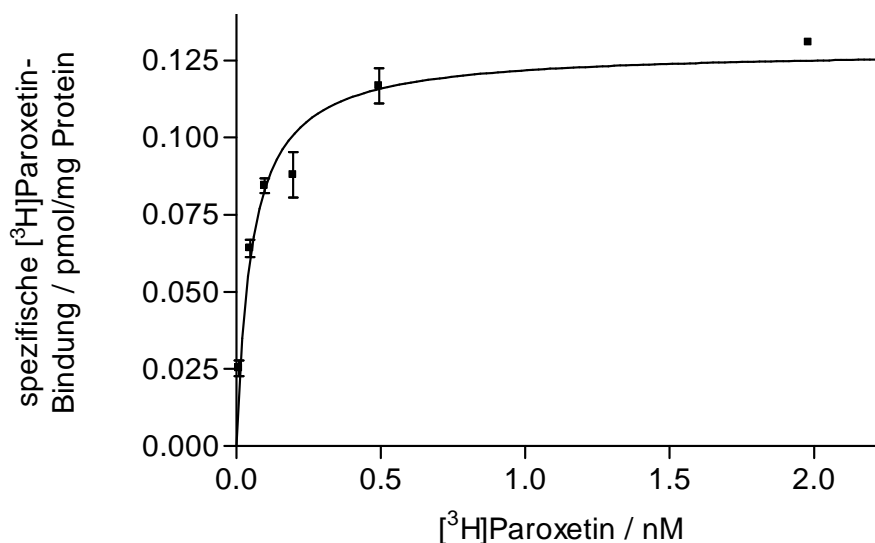


Abb. 18 Sättigungsexperiment mit [³H]Paroxetin (**5**): Darstellung der spezifischen Radioligandbindung (in pmol/mg Protein) an transient hSERT exprimierende HEK-293 Zellen (Proteinmenge: 50 µg) und daraus resultierende Sättigungsisotherme. Nichtspezifische Bindung wurde als Radioligandbindung in Gegenwart von 1 µM Citalopram (*rac-4*) bestimmt und von der Gesamtbinding zur jeweiligen Ermittlung der spezifischen Bindung subtrahiert. Datenpunkte stellen Mittelwerte (± SEM) aus Triplikaten eines Experimentes dar.

In der Literatur sind bisher keine K_d -Werte für die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an heterolog exprimierten hSERT beschrieben. Für die Bindung des Radioliganden **5** an hSERT aus Membranpräparationen humaner Cortexproben publizierte Cupello et al. einen K_d -Wert von 0.100 ± 0.06 nM (Mittelwert ± SD, $n = 3$).⁸⁹ Sowohl der von mir für die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an hSERT-Myc-Flag[®] als auch an hSERT ermittelte K_d -Wert (siehe Tab. 3) stimmt mit dem von Cupello et al. publizierten gut überein. Damit war sowohl für die transiente Transfektion von HEK-293 Zellen mit pCMV6-Entry-hSERT als auch mit pcDNA3.1(+)-hSERT die korrekte Expression des gewünschten Targets nachgewiesen. Die Tatsache, dass sich die für die Radioligandbindung an hSERT-Myc-Flag[®] und hSERT ermittelten K_d -Werte um etwa Faktor 2 unterscheiden (siehe Tab. 3), kann aufgrund des wegen der hohen Kosten des Transfektionsreagenzes FuGENE 6[®] nur einmal durchgeführten Sättigungsexperimentes nicht abschließend beurteilt werden. Es könnte sein, dass sich die Ergebnisse nur zufällig unterscheiden, es könnte aber auch sein, dass die in hSERT-Myc-Flag[®] vorhandenen Tags doch einen Einfluss auf die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an den Transporter ausüben. Spätere Experimente mit stabil das Target exprimierenden Zelllinien könnten diesbezüglich eine Erklärung liefern. Ein Vergleich der in den Sättigungsexperimenten ermittelten B_{max} -Werte (siehe Tab. 3)

mit literaturbekannten Werten zur Targetdichte ist aufgrund der unterschiedlichen Targetquellen leider nicht möglich. Die B_{\max} -Werte beschreiben mit 840 fmol/mg Protein eine höhere Targetdichte von hSERT-Myc-Flag[®] als von hSERT (120 fmol/mg Protein, siehe Tab. 3). Dies bestätigt die nach transienter Transfektion unter 3.1.4.1 erhaltenen Ergebnisse, welche ebenfalls auf eine höhere Expression von hSERT-Myc-Flag[®] als von hSERT hindeuten. Möglicherweise unterstützt das Plasmid pCMV6-Entry eine transiente Expression besser als das Plasmid pcDNA3.1(+), denn die Transfektion in den durchgeführten Sättigungsexperimenten erfolgte an Zellen identischer Konfluenz.

Zusammenfassend konnte durch die ermittelten K_d -Werte für die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) und deren Vergleich mit einem bereits publizierten Wert für dessen Bindung an hSERT bestätigt werden, dass beide verwendeten Plasmide funktionsfähig sind und das gewünschte Target von den transient transfizierten HEK-293 Zellen exprimiert wird.

3.1.5 Stabile Transfektion von HEK-293 Zellen

Zur stabilen Transfektion von HEK-293 Zellen und somit zum Erhalt eines einheitlichen Wirts-Vektor-Systems wurden die Plasmide pCMV6-Entry-hSERT und pcDNA3.1(+)-hSERT linearisiert. Linearisiert vorliegende DNA kann zum einen leichter in das Genom der Wirtszelle integriert werden und zum anderen wird so verhindert, dass die DNA bei der Integration an für die Proteinexpression wichtigen Stellen des Plasmids aufgebrochen wird, wodurch essentielle Information beziehungsweise Funktion verloren gehen könnte.

Um die Plasmide zu linearisieren, wurden Restriktionsendonukleasen ausgewählt, welche die DNA jeweils nur an einer einzigen Position, die keinerlei Einfluss auf die Plasmidaktivität hat, schneiden. pCMV6-Entry-hSERT wurde mit dem Enzym DraIII und pcDNA3.1(+)-hSERT mit Scal linearisiert. Das linearisierte Plasmid wurde jeweils mittels präparativer Gelelektrophorese gereinigt und die gewonnene DNA anschließend bezüglich ihrer Größe in einer analytischen Gelelektrophorese überprüft.

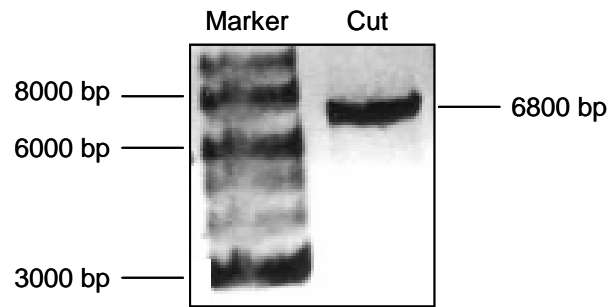


Abb. 19 Analytische Gelelektrophorese von mit DraIII linearisiertem pCMV6-Entry-hSERT (ca. 6800 bp). Spur 1: Basenpaarmarker (*DNA-Ladder*), Spur 2: Cut.

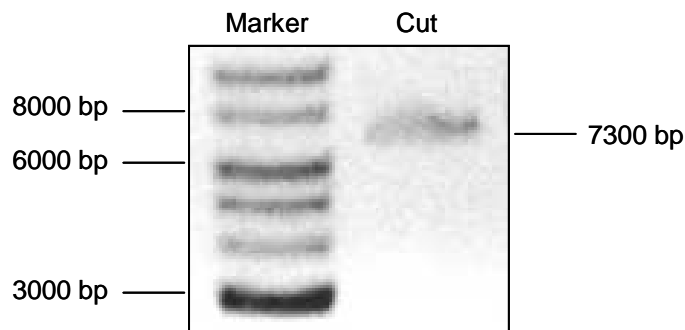


Abb. 20 Analytische Gelelektrophorese von mit Scal linearisiertem pcDNA3.1(+)-hSERT (ca. 7300 bp). Spur 1: Basenpaarmarker (*DNA-Ladder*), Spur 2: Cut.

Die Länge der Wanderungsstrecke in der Gelelektrophorese im Vergleich zu den Basenpaarmarkern bestätigt die Größe der beiden Plasmide und ihr lineares Vorliegen (siehe Abb. 19 und Abb. 20). Ringförmig vorliegende DNA würde entweder in einer superspiralisierten Form vorliegen, welche kompakter ist und daher im Agarosegel schneller läuft oder sie würde als entspanntes Ringsystem vorliegen und dann langsamer laufen als die linearisierte Form.⁸⁴

Die Transfektion der HEK-293 Zellen mit linearisiertem pCMV6-Entry-hSERT und pcDNA3.1(+)-hSERT erfolgte im Verhältnis 3:1 von FuGENE 6[®] zu DNA an zu etwa 15 % konfluenten HEK-293 Zellen. 48 h später wurde das Normalmedium (DMEM, FCS, Penicillin, Streptomycin) gegen Selektionsmedium, welches zusätzlich G418 (Geneticin: 500 µg/mL) beinhaltet, ausgetauscht. Durch dieses Medium konnten solche Zellen selektiert werden, welche die Plasmid-DNA in ihr Genom integriert hatten und deswegen die Neomycin-Phosphotransferase exprimierten, welche ihnen eine Resistenz gegen G418 verlieh. Nach etwa zwei Wochen traten einzelne

Zellklone auf, die mit Hilfe von Kloningzylindern isoliert und anschließend getrennt weiter vermehrt wurden. Nachdem von jedem Klon ausreichend Zellmaterial vorhanden war, wurden sie bezüglich der Transporter-Expression in Radioligandbindungsexperimenten mit [³H]Paroxetin (**5**) untersucht.

3.1.5.1 Screening der Klone mit [³H]Paroxetin

Das Screening der Zellklone erfolgte im Bindungsassay nach der unter 3.1.4.1 beschriebenen Methode mit [³H]Paroxetin (**5**). Durch Bestimmung von Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB) des Radioliganden **5** sollte durch die erhaltenen Signalintensitäten der [³H]Paroxetin-Bindung und den daraus ermittelten Quotienten für GB zu NSB der jeweils leistungsfähigste Klon, welcher eine hohe Expressionsrate des gewünschten Targets aufweist, identifiziert werden. An die Klone wurden folgende Ansprüche gestellt: Der Quotient aus Gesamt- und nichtspezifischer Bindung sollte sehr groß sein, wobei die Signalstärke der Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) ebenfalls möglichst hoch sein sollte.

In den Bindungsassays wurde zur Untersuchung der Zellklone, welche durch die Transfektion mit pCMV6-Entry-hSERT stabil hSERT-Myc-Flag[®] exprimierten, eine Radioligandkonzentration von 200 pM eingesetzt. Die für die acht untersuchten Zellklone erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 21 gegenübergestellt. Der jeweils berechnete Quotient aus Gesamt- und nichtspezifischer Bindung ist in Tab. 4 angegeben. In Abb. 21 ist deutlich zu erkennen, dass sich bei den Klonen 3, 6, 7 und 8 die Gesamtbindung von [³H]Paroxetin (**5**) nicht wesentlich von seiner nichtspezifischen Bindung unterscheidet. Diese Tatsache wird auch durch die ermittelten Quotienten (GB/NSB) von jeweils etwa 1 (siehe Tab. 4) bestätigt. Es bedeutet, dass die Bindung des Radioliganden **5** ausschließlich nichtspezifischer Natur ist und diese Klone das Target nicht exprimieren.

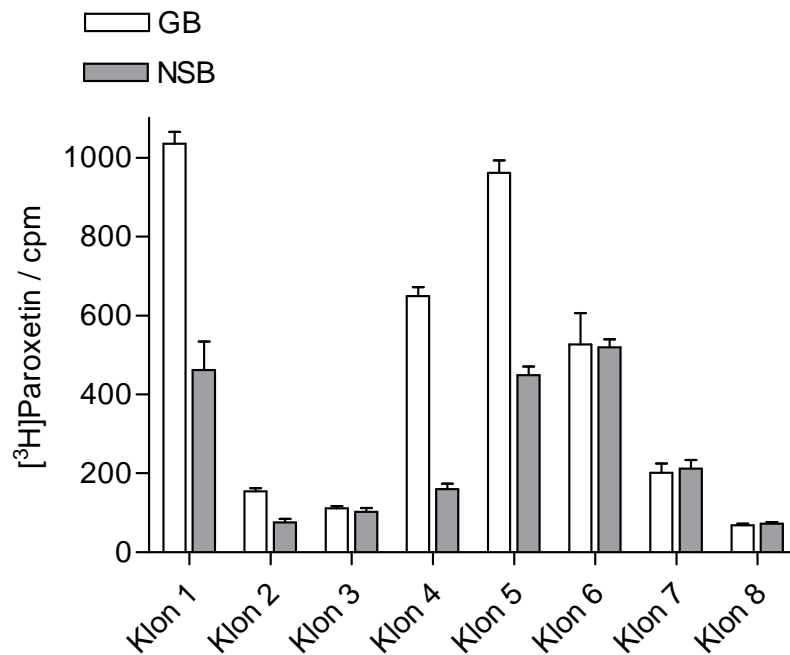


Abb. 21 Screening der hSERT-Myc-Flag[®] Klone: Darstellung von Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB, unter Anwesenheit von 1 μ M Citalopram (*rac-4*)) des Radioliganden [³H]Paroxetin (**5**) (200 pM) an stabil mit linearisiertem pCMV6-Entry-hSERT transfizierte HEK-293 Zellklone (Proteinmenge: Klon 1 – 180 μ g, Klon 2 – 76 μ g, Klon 3 – 136 μ g, Klon 4 – 132 μ g, Klon 5 – 190 μ g, Klon 6 -180 μ g , Klon 7 – 117 μ g, Klon 8 – 82 μ g, jeweils bestimmt nach Bradford⁹⁰). Assayvolumen: 500 μ L. GB und NSB stellen Mittelwerte (\pm SD) aus Triplikaten dar.

Tab. 4 Vergleich der im Screening mit [³H]Paroxetin (**5**) an hSERT-Myc-Flag[®] HEK-293 Klonen (pCMV6-Entry-hSERT) ermittelten Quotienten aus Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB) des Radioliganden **5**.

Klon	1	2	3	4	5	6	7	8
GB/NSB	2.2	2.0	1.1	4.1	2.1	1.0	1.0	0.9

Die Klone 1, 2, 4 und 5 exprimieren hSERT-Myc-Flag[®], da die Gesamtbindung höher als die nichtspezifische Bindung ist und der Radioligand folglich spezifisch bindet (siehe Abb. 21). Für Klon 1, 2 und 5 beträgt der Quotient aus Gesamt- und nichtspezifischer Bindung etwa 2, für Klon 4 beträgt er 4.1 (siehe Tab. 4). Dies bedeutet, dass bei Klon 4 die höchste spezifische Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) und somit die höchste Targetexpression beobachtet wird. Dieser Klon wurde dadurch

eindeutig als der leistungsfähigste Klon, welcher stabil hSERT-Myc-Flag[®] exprimiert, identifiziert.

Zum Screening der Zellklone, die mit pcDNA3.1(+)-hSERT transfiziert wurden, also hSERT ohne Tags stabil exprimierten, wurde aufgrund des in den Sättigungsexperimenten mit transient transfizierten Zellen ermittelten niedrigeren K_D -Wertes (55 pM) für [³H]Paroxetin (5) mit 100 pM eine niedrigere Radioligandkonzentration eingesetzt. Um auch bei dieser niedrigeren Radioligandkonzentration in jedem Fall ausreichende Signalintensitäten zu erhalten, wurde zum Screening dieser Klone das Assayvolumen von 500 µL auf 3000 µL erhöht. In Abb. 22 sind für acht Zellklone die im Screening ermittelten Signalintensitäten von Gesamt- und nichtspezifischer Bindung gegenübergestellt. Die aus der jeweiligen Gesamt- und nichtspezifischen Bindung ermittelten Quotienten sind in Tab. 5 angegeben. Die Darstellung in Abb. 22 und die Quotienten aus Gesamt- und nichtspezifischer Bindung von 1.1 beziehungsweise 1.2 (siehe Tab. 5) zeigen, dass sowohl bei Klon 1 als auch bei Klon 2 kein Unterschied zwischen Gesamt- und nichtspezifischer Bindung besteht. Diese Zellen exprimieren also keinen hSERT. Klon 8 weist mit einem Quotienten von 2.4 nur eine sehr geringe spezifische Bindung des Radioliganden auf (siehe Tab. 5). Die Klone 3 und 7 sind mit Quotienten von 6.3 beziehungsweise 9.0 zwar deutlich besser, allerdings werden sie durch die von den Klonen 4, 5 und 6 erzielten Quotienten von ca. 18 eindeutig übertroffen (siehe Tab. 5), da bei diesen folglich eine wesentlich höhere spezifische Radioligandbindung beobachtet wird. Vergleicht man die erhaltenen Signalstärken der drei leistungsfähigsten Klone (siehe Abb. 22, Klon 4–6), stellt man fest, dass diese bei Klon 4 und 5 etwas höher sind als bei Klon 6. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass bei der Untersuchung von Klon 6 mit 24 µg auch nur eine etwa halb so große Targetmenge (bestimmt als Proteinmenge nach Bradford⁹⁰) als bei Klon 4 und Klon 5 (46 µg beziehungsweise 41 µg, ebenfalls bestimmt als Proteinmenge nach Bradford⁹⁰) im Assay eingesetzt wurde (siehe Abb. 22 Abbildungsunterschrift). Bei gleicher Proteinkonzentration im Assay, wäre die erhaltene Signalstärke von Klon 6 eindeutig am besten. Ich habe Klon 6 daher als leistungsfähigsten Klon identifiziert.

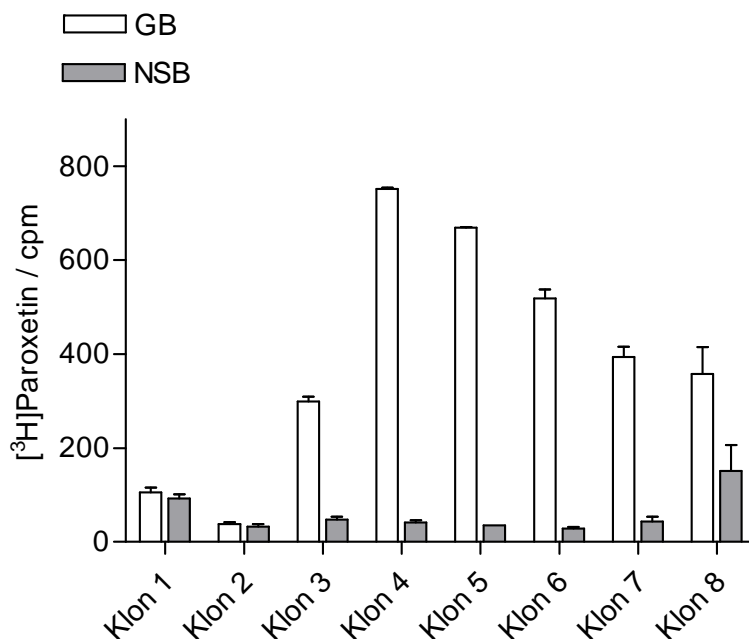


Abb. 22 Screening der hSERT Klone: Darstellung von Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB, unter Anwesenheit von 1 μ M Citalopram (*rac-4*)) des Radioliganden [3 H]Paroxetin (**5**) (200 pM) an stabil mit linearisiertem pcDNA3.1(+)-hSERT transfizierte HEK-293 Zellklone (Proteinmenge: Klon 1 – 87 μ g, Klon 2 – 22 μ g, Klon 3 – 40 μ g, Klon 4 – 46 μ g, Klon 5 – 41 μ g, Klon 6 – 24 μ g, Klon 7 – 11 μ g, Klon 8 – 18 μ g, jeweils bestimmt nach Bradford⁹⁰). Assayvolumen: 3000 μ L. GB und NSB stellen Mittelwerte (\pm SD) aus Triplikaten dar.

Tab. 5 Vergleich der im Screening mit [3 H]Paroxetin (**5**) an hSERT HEK-293 Klonen (pcDNA3.1(+)-hSERT) ermittelten Quotienten aus Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB) des Radioliganden **5**.

Klon	1	2	3	4	5	6	7	8
GB/NSB	1.1	1.2	6.3	18.0	18.9	18.0	9.0	2.4

Im Screening der Zellklone wurde also sowohl ein leistungsfähiger Zellklon, der stabil hSERT-Myc-Flag[®] (siehe Abb. 21, Klon 4), als auch einer, der stabil hSERT (siehe Abb. 22, Klon 6) exprimiert, identifiziert. Letzterer konnte mit einem Quotienten von 18.0 aus Gesamt- und nichtspezifischer Bindung in den Screeningexperimenten bezüglich der Expressionsrate des Transporters jedoch deutlich mehr überzeugen als der stabil hSERT-Myc-Flag[®] exprimierende Klon mit einem Quotienten von 4.1. Beide stabilen Zellklone wurden vermehrt und Aliquote der Zelllinien kryokonserviert.

Bevor eine dieser beiden stabilen Zelllinien endgültig für die Etablierung der MS-Bindungsstudien ausgewählt wurde, sollten die stabil exprimierten Proteine abschließend in einem Sättigungsexperiment mit [³H]Paroxetin (**5**) charakterisiert werden.

3.1.5.2 Untersuchung der Targetstabilität

In literaturbekannten [³H]Paroxetin-Bindungsexperimenten am hSERT wurden Inkubationszeiten von 40 min bis 2 h zur Gleichgewichtseinstellung gewählt.^{76,77,88,89} Wie unter 3.1.4.1 dargestellt, wählte ich für den als Testsystem zur Überprüfung der Targetexpression etablierten [³H]Paroxetin-Bindungsassay eine Inkubationszeit von 2 h. Aufgrund der von Martin et al.⁹¹ für die Bindung von Paroxetin an hSERT publizierten kinetischen Parameter, ist diese Inkubationszeit für die Gleichgewichtseinstellung im Assay ausreichend. Vor der abschließenden Charakterisierung der stabilen Zellklone im Sättigungsexperiment wollte ich absolut sichergehen, dass das Target über diesen Zeitraum unter den Inkubationsbedingungen auch stabil ist.

Zu diesem Zweck wurde in Experimenten eine konstante [³H]Paroxetin-Konzentration mit einer konstanten Targetkonzentration über mindestens 1 h bis maximal 4 h inkubiert. Als Targetquelle wurden in dieser Versuchsreihe HEK-293 Zellen, welche stabil hSERT ohne die Tags am C-terminalen Proteinende exprimieren, eingesetzt (HEK-hSERT Klon 6). Zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung wurde auch hier wieder Citalopram (*rac-4*) zugesetzt. Durch Filtration wurde die Inkubation nach definierten Zeitintervallen beendet und über Szintillationszählung die Gesamt- und die nichtspezifische Bindung des Radioliganden **5** gemessen.

In Abb. 23 sind die für die untersuchten Inkubationszeiten erhaltenen Ergebnisse gegenübergestellt. Die Abbildung macht deutlich, dass sich die Signalstärken sowohl für die Gesamt- als auch für die nichtspezifische Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) innerhalb des untersuchten Zeitfensters nur gering unterscheiden. Diese Tatsache bestätigen auch die ermittelten Quotienten aus Gesamt- und nichtspezifischer Bindung (siehe Tab. 6). Die Targetstabilität ist folglich über mindestens 4 h gegeben. Bei einer zweistündigen Inkubationszeit sollten somit keine Stabilitätsprobleme bezüglich des Targetmaterials auftreten.

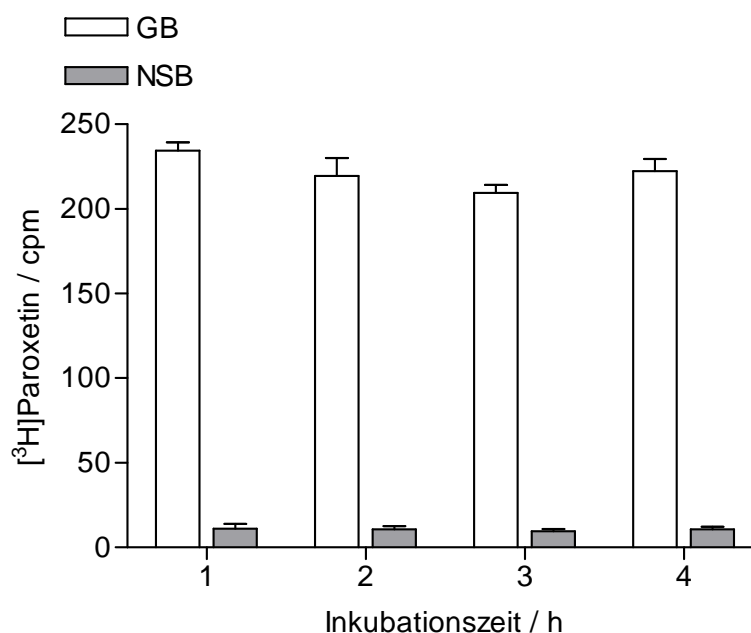


Abb. 23 Untersuchung der Targetstabilität: Darstellung von Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB, unter Anwesenheit von 1 μ M Citalopram (*rac-4*)) des Radioliganden [3 H]Paroxetin (**5**) (10 pM) an stabil hSERT exprimierenden HEK-293 Zellen (Proteinmenge: 90 μ g). Assayvolumen: 7500 μ L. GB und NSB stellen Mittelwerte (\pm SD) aus Triplikaten dar.

Tab. 6 Vergleich der bei der Untersuchung der Targetstabilität im Bindungsassay mit [3 H]Paroxetin (**5**) an hSERT ermittelten Quotienten aus Gesamtbindung (GB) und nichtspezifischer Bindung (NSB) des Radioliganden **5**.

Inkubationszeit (in h)	1	2	3	4
GB/NSB	20.9	20.5	22.1	20.6

3.1.5.3 Sättigungsexperimente mit [3 H]Paroxetin

Abschließend wurden die beiden besten Zellklone, die hSERT (siehe 3.1.5.1, Klon 6) beziehungsweise hSERT-Myc-Flag[®] (siehe 3.1.5.1, Klon 4) stabil exprimieren in einem Sättigungsexperiment mit [3 H]Paroxetin (**5**) untersucht. Die Zellklone wurden dadurch bezüglich der Affinität (K_d) von [3 H]Paroxetin (**5**) für das exprimierte Target und bezüglich der Targetdichte (B_{max}) charakterisiert.

In den Sättigungsexperimenten wurden, wie bereits unter 3.1.4.3 beschrieben, steigende [3 H]Paroxetin-Konzentrationen (10 pM – 2 nM) mit konstanter

Targetkonzentration über 2 h bei 22 °C inkubiert. Auch hier wurde die nichtspezifische Bindung unter Anwesenheit von Citalopram (*rac-4*) (1 µM) bestimmt. Nach nichtlinearer Regression der aus der Differenz von experimentell ermittelter GB und NSB berechneten spezifischen Bindung wurde sowohl für die Bindung des Radioliganden an hSERT-Myc-Flag[®] (siehe Abb. 24) als auch an hSERT (siehe Abb. 25) eine Sättigungsisotherme erhalten.

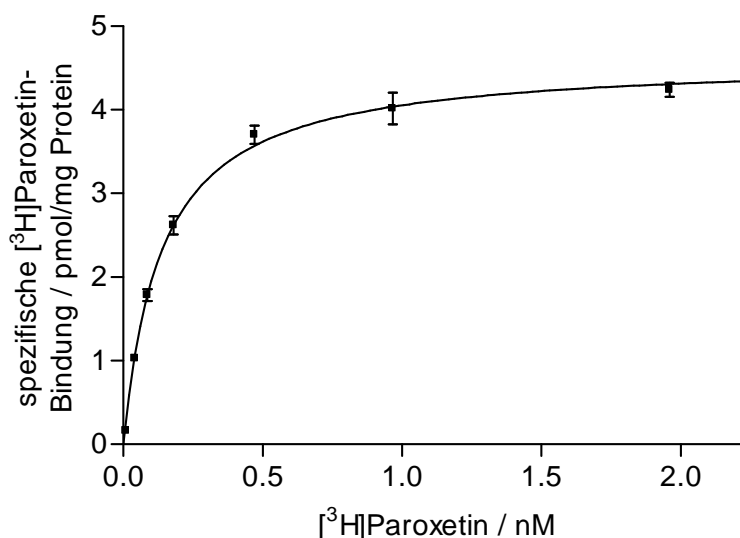


Abb. 24 Sättigungsexperiment mit [³H]Paroxetin (**5**): Darstellung der spezifischen Radioligandbindung (in pmol/mg Protein) an hSERT-Myc-Flag[®] stabil exprimiert von HEK-293 Zellen und daraus resultierende Sättigungsisotherme. Nichtspezifische Bindung wurde als Radioligandbindung in Gegenwart von 1 µM Citalopram (*rac-4*) bestimmt und von der Gesamtbindung zur jeweiligen Ermittlung der spezifischen Bindung subtrahiert. Einsatz von 22 µg Protein als Membranpräparation der stabil hSERT-Myc-Flag[®] exprimierenden HEK-293 Zelllinie bei einem Assayvolumen von 3000 µL. Datenpunkte stellen Mittelwerte (± SEM) aus Triplikaten eines Experimentes dar.

Die Sättigungsisotherme für die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an hSERT-Myc-Flag liefert einen K_d -Wert von 140 pM und einen B_{max} -Wert von 4.6 pmol/mg Protein (siehe Tab. 7).

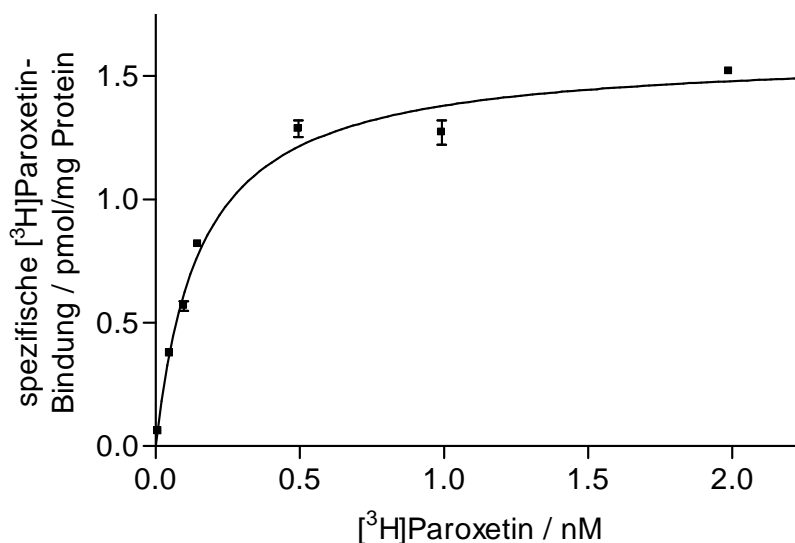


Abb. 25 Sättigungsexperiment mit [³H]Paroxetin (**5**): Darstellung der spezifischen Radioligandbindung (in pmol/mg Protein) an hSERT stabil exprimiert von HEK-293 Zellen und daraus resultierende Sättigungsisotherme. Nichtspezifische Bindung wurde als Radioligandbindung in Gegenwart von 1 μ M Citalopram (*rac-4*) bestimmt und von der Gesamtbindung zur jeweiligen Ermittlung der spezifischen Bindung subtrahiert. Einsatz von 19 μ g Protein als Membranpräparation der stabil hSERT exprimierenden HEK-293 Zelllinie bei einem Assayvolumen von 7500 μ L. Datenpunkte stellen Mittelwerte (\pm SEM) aus Triplikaten eines Experimentes dar.

Im Sättigungsexperiment zur Untersuchung der Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an hSERT wurde ein K_d -Wert von 160 pM und ein B_{max} -Wert von 1.6 pmol/mg Protein ermittelt (siehe Tab. 7).

Tab. 7 Vergleich der für die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an stabil von HEK-293 Zellen exprimierten hSERT-Myc-Flag[®] und hSERT ermittelten K_d - und B_{max} -Werte.

	hSERT-Myc-Flag [®]	hSERT
K_d (in pM)	140	160
B_{max} (in pmol/mg Protein)	4.6	1.6

Sowohl der K_d -Wert für die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an stabil von HEK-293 Zellen exprimierten hSERT-Myc-Flag[®] als auch an stabil exprimierten hSERT liegt im niedrigen picomolaren Bereich (siehe Tab. 7) und beide Werte stimmen gut mit dem entsprechenden von Cupello et al.⁸⁹ publizierten K_d -Wert von 0.100 ± 0.06 nM (Mittelwert \pm SD, n = 3) überein. Die Expression des Serotonin-Transporters in den

etablierten stabilen Zelllinien wurde dadurch bestätigt. Die für die Bindung ermittelten B_{\max} -Werte unterscheiden sich mit 4.6 pmol/mg Protein für hSERT-Myc-Flag[®] und mit 1.6 pmol/mg Protein für hSERT (siehe Tab. 7). Die Expressionsrate von hSERT-Myc-Flag[®] scheint höher zu sein, obwohl im Screening der Klone das Gegenteil beobachtet wurde (siehe 3.1.5.1). Der Unterschied von etwa Faktor 3 bei den beobachteten B_{\max} -Werten ist bei einem einmal durchgeführten Experiment allerdings nicht sehr aussagekräftig und ich würde die stabilen Zelllinien bezüglich der Targetexpressionsrate in diesen Sättigungsexperimenten als gleichwertig ansehen. Aus meiner Erfahrung können noch stärkere Schwankungen der Expressionsrate eines Proteins nämlich selbst bei einer einheitlichen stabilen Zelllinie auftreten. Um solche Schwankungen möglichst zu minimieren, wurde generell darauf geachtet, die stabil transfizierten Zellen immer in etwa der gleichen Wachstumsphase bei einer Konfluenz von ~ 80 % zu ernten. Bei dieser Konfluenz haben die sternchenförmig am Boden der Kulturschalen wachsenden HEK-293 Zellen bereits Kontakt zu Nachbarzellen, es lassen sich aber noch deutliche Zelllücken erkennen (siehe Abb. 26). Von Kragler⁸³ wurde beschrieben, dass die Targetexpression bei stabil transfizierten Zellen in dieser Wachstumsphase optimal ist.

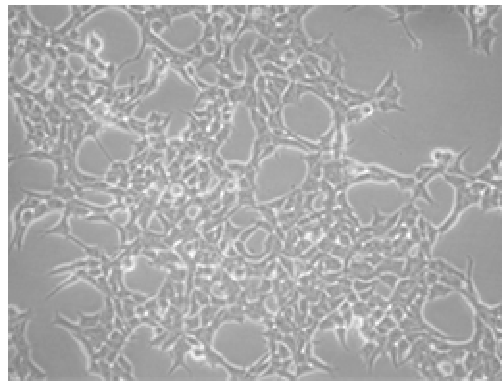


Abb. 26 HEK-293 Zellen in der zur Ernte optimalen Wachstumsphase

Zusammenfassend liefern die Sättigungsexperimente sowohl für die Bindung von [³H]Paroxetin an stabil von HEK-293 Zellen exprimierten hSERT als auch hSERT-Myc-Flag[®] gute Ergebnisse und Myc- und Flag[®]-Tag scheinen den Transporter tatsächlich nicht zu beeinflussen (siehe Tab. 7). Im weiteren Verlauf meiner Arbeit hätte daher mit beiden stabil das Target exprimierenden Zelllinien weiter gearbeitet werden können. Ich entschied mich dafür, die MS-Bindungsstudien unter

Verwendung der stabilen Zelllinie, welche hSERT ohne die Tags exprimiert, zu etablieren, da dieser Zellklon insgesamt sowohl im Screening (siehe 3.1.5.1) als auch im Sättigungsexperiment mit [³H]Paroxetin (**5**) gute Ergebnisse geliefert hatte und es aus meiner Sicht immer die beste Lösung ist, mit dem unveränderten Protein zu arbeiten.

3.2 LC-MS/MS Methodenentwicklung und Methodvalidierung zur Markerquantifizierung in MS-Bindungsstudien

3.2.1 Hintergrund

Essentieller Bestandteil von MS-Bindungsstudien ist die Quantifizierung eines geeigneten Markers mittels LC-MS/MS. Für die geplanten MS-Bindungsstudien am Serotonin-Transporter galt es daher, zunächst einen geeigneten Marker auszuwählen und anschließend eine LC-MS/MS Methode für dessen Quantifizierung zu entwickeln. Letztere sollte abschließend entsprechend der von der *United States Food and Drug Administration (U. S. FDA)* herausgegebenen Richtlinien für bioanalytische Methoden⁸⁰ validiert werden, um ihre Eignung für die anvisierten Studien zu belegen.

3.2.2 Massenspektrometrische Analytik

In der Massenspektrometrie wird der Analyt ionisiert, in die Gasphase überführt, in einem Analysator nach seinem m/z aufgetrennt und anschließend detektiert. Ein Massenspektrometer besteht daher aus verschiedenen Teilen, welche Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor umfassen.

In der vorliegenden Arbeit standen Massenspektrometer zur Verfügung, die mit Triple-Quadrupol (Triple-Quad) Massenanalysatoren ausgestattet sind (siehe Abb. 27). In diesen Analysatoren sind drei Quadrupole (Q1, Q2, Q3) hintereinander angeordnet. Die Quadrupole bestehen aus jeweils vier parallel ausgerichteten hyperbolischen Stäben, wobei sich gegenüberliegende Stäbe auf gleichem Potential befinden und zwischen benachbarten Stäben eine Mischspannung, bestehend aus Gleich- und Wechsellspannungsanteil, anliegt. Ionen werden in diesem oszillierenden elektrischen Feld beschleunigt und nach ihrem m/z aufgetrennt.⁹² Mit solchen sogenannten „Triple-Quad“ Geräten lassen sich unterschiedliche MS-Experimenttypen realisieren. Da in der vorliegenden Arbeit Tandem-MS (MS/MS) Experimente durchgeführt werden sollten, werden nur diese im Folgenden näher erläutert: Im Q1 wird das Mutterion selektiert. Der Q2 wird in MS/MS Experimenten als Kollisionszelle verwendet, in welcher unter Zufuhr eines Kollisionsgases eine Fragmentierung des im Q1 ausgewählten Ions erfolgt. Im Q3 können zu

Strukturaufklärungszwecken alle entstandenen Tochterionen gescannt werden. Alternativ kann auch ein Fragment ausgewählt und der Analyt so äußerst selektiv und empfindlich quantifiziert werden.⁹² Letztere Vorgehensweise bezeichnet man als *Single Reaction Monitoring* (SRM). Die dabei erfolgte Auswahl von Mutter- und Tochterion führt zu einer hohen Selektivität und folglich auch hohen Sensitivität, weshalb die Technik vor allem in Kombination mit einer vorgeschalteten Flüssigchromatographie (LC) zur Quantifizierung in niedrigen Konzentrationsbereichen – wie für MS-Bindungsassays gefordert – eingesetzt wird.

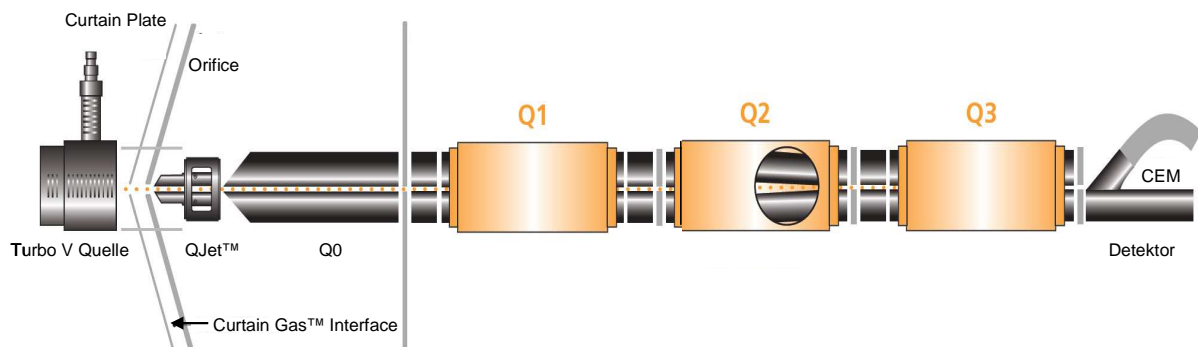


Abb. 27 Schematische Darstellung des Aufbaus eines API 5000 Massenspektrometers mit Turbo V Ionenquelle, Quadrupolen (Q1, Q2, Q3) und CEM (*Channel Electron Multiplier*) Detektor (Abbildung modifiziert nach AB Sciex⁹³)

Als Ionisationstechnik bietet sich für die Markerquantifizierung in MS-Bindungsstudien *Electrospray Ionization* (ESI) an, da mit dieser Technik eine sehr gute Sensitivität in der Analyse kleiner, polarer Moleküle – typisch für einen potentiellen Marker in MS-Bindungsstudien – erhalten wird und außerdem eine gute LC-Kopplung möglich ist.⁹⁴ Die Erzeugung von Ionen findet bei ESI unter Atmosphärendruck statt und stellt daher eine sehr schonende Methode dar. Das Prinzip dieser Technik wird im Folgenden näher erläutert⁹⁵ (siehe Abb. 28): Der von der LC kommende Flüssigkeitsstrom gelangt über eine Metallkapillare in die Ionenquelle. Zwischen dieser Kapillare und einer Gegenelektrode liegt eine hohe Potentialdifferenz an, woraus ein starkes elektrisches Feld resultiert, welches eine partielle Trennung von positiv und negativ geladenen Ionen im aus der Kapillare austretenden Flüssigkeitsstrom bewirkt. Die partielle Ladungstrennung führt auf der Flüssigkeitsoberfläche an der Spitze der Kapillare zur Akkumulierung von Ionen gleicher Ladung. Wird beispielsweise im positiven ESI-Modus gearbeitet, liegt an der Kapillare eine positive Spannung an und negativ geladene Ionen werden von ihr

angezogen. Positiv geladene Ionen reichern sich dagegen an der Spitze der Kapillare auf der Flüssigkeitsoberfläche an. Durch die Abstoßung gleicher Ladungen bei gleichzeitiger Anziehung durch die Gegenelektrode wird die Oberflächenspannung der Flüssigkeit überwunden und es bildet sich ein Kegel (*Taylor cone*, siehe Abb. 28). Die Spitze dieses Kegels verlängert sich zu einem flüssigen Filament, von welchem sich einzelne geladene Tröpfchen abtrennen. Durch Inertgaseinstrom und hohe Temperaturen erfolgt die Verdampfung des Lösungsmittels, wodurch sich der Durchmesser der Tröpfchen verringert und sich somit bei gleichbleibender Gesamtladung ihre Oberflächenladung weiter erhöht. Dies erfolgt bis zum sogenannten Rayleigh-Limit (Ladungsgrenze in Abhängigkeit der Oberflächenspannung), bei dem die abstoßenden Kräfte zwischen den Ladungen die Oberflächenspannung des Lösungsmittels übertreffen, wodurch es im Folgenden zur coulombschen Explosion der Tröpfchen kommt und solche mit noch kleinerem Durchmesser entstehen.

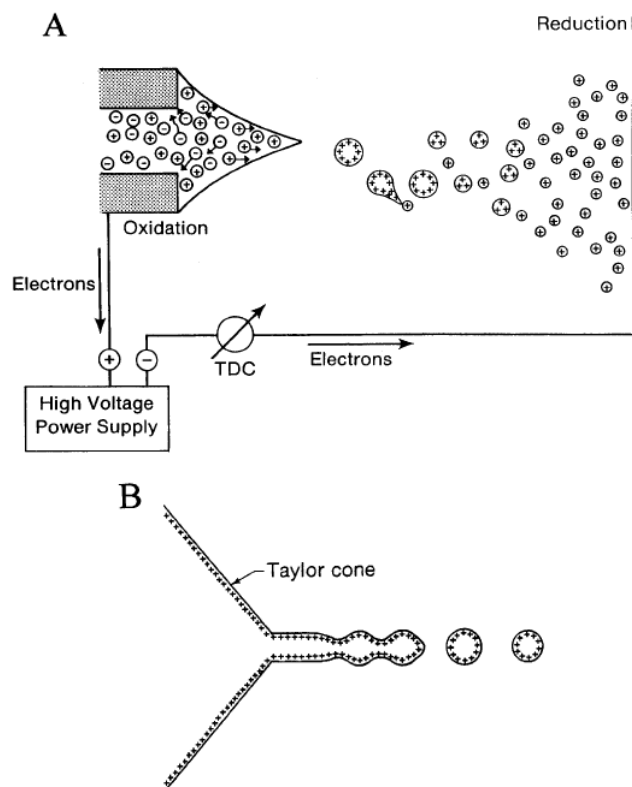


Abb. 28 Schematische Darstellung der Vorgänge in einer ESI-Quelle (Abbildung entnommen aus Kebarle⁹⁵) A) Bildung des ESI-Sprays im elektrischen Feld; B) Darstellung des an der Kapillarspitze befindlichen *Taylor cone* mit Filament, von welchem sich einzelne geladene Tröpfchen abtrennen.

Für die abschließende Bildung freier Ionen in der Gasphase werden zwei Mechanismen diskutiert: Das *Charge Residue Model* (CRM)⁹⁶ impliziert, dass durch Lösungsmittelverdampfung in Kombination mit Coulombexplosionen winzige Tröpfchen verbleiben, welche nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten, das nach vollständiger Lösungsmittelverdampfung in die Gasphase übergeht. Im *Ion Evaporation Model* (IEM)^{97,98} wird angenommen, dass aus mehrfach geladenen Tröpfchen mit einem bestimmten Radius freie Ionen in die Gasphase emittiert werden. Es wird vermutet, dass IEM eher an der Ionisierung kleinerer Moleküle und CRM vor allem bei der Bildung von Gasphasen-Ionen größerer Moleküle beteiligt ist.⁹⁵

Wie beschrieben, handelte es sich bei den im Arbeitskreis vorhandenen Geräten um Triple-Quadrupol Massenspektrometer. Die Geräte der Firma AB Sciex (API 3200 und API 5000, siehe Abb. 27) unterscheiden sich vor allem hinsichtlich der Empfindlichkeit. Die erhöhte Sensitivität des API 5000 im Vergleich zum API 3200 ist dabei auf bauliche Unterschiede zurückzuführen: Bei gleicher ESI-Ionenquelle ist der Skimmer im API 3200 durch einen QJet™ im API 5000 (siehe Abb. 27) ersetzt. Letzterer soll eine verbesserte Fokussierung der Ionen auf dem Weg in den Massenanalysator sicherstellen. Zusätzlich werden im API 5000 stärkere Vakuumpumpen eingesetzt, wodurch eine im Vergleich zum API 3200 vergrößerte Öffnung zum Vakuumbereich ermöglicht wird, welche den Eintritt einer größeren Ionenmenge gewährleistet. Zusammengefasst werden im API 5000 folglich insgesamt mehr Ionen in den Analysator geleitet, was zu einer gesteigerten Empfindlichkeit führt.

Die analytischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit sollten mit dem Massenspektrometer API 3200 gestartet werden und gegebenenfalls sollte bei nicht ausreichender Sensitivität in der Quantifizierung des Markers auf das sensitivere API 5000 gewechselt werden.

3.2.3 Auswahl einer Markerverbindung

Zur Etablierung von MS-Bindungsstudien für den Serotonin-Transporter war es essentiell, eine geeignete Markerverbindung auszuwählen. Wie bereits in der Zielsetzung beschrieben, kann ein Marker für MS-Bindungsstudien generell aus dem

gesamten Pool von Liganden des gewünschten Targets gewählt werden. Dabei sollte der Marker allerdings sowohl eine hohe Selektivität als auch eine hohe Affinität zum Target aufweisen. Unter Berücksichtigung der typischerweise in Bindungsexperimenten auftretenden niedrigen Konzentrationen sollte er außerdem bis hin zu sehr niedrigen Konzentrationen (etwa im unteren picomolaren Bereich) massenspektrometrisch quantifizierbar sein. Bezüglich der Selektivität der Bindung des Markers an das Target ist festzuhalten, dass sie keine wesentliche Rolle spielt, solange wie in meinen Studien Membranpräparationen von stabil hSERT exprimierenden HEK-293 Zellen eingesetzt werden. Denn in diesem Fall sollten keine anderen Transporter zugegen sein, die stören könnten. Trotzdem einen für das zu untersuchende Target selektiven Marker auszuwählen, bietet aber den Vorteil, dass der etablierte SERT-Assay im Bedarfsfall mit nativem Material durchführbar ist. Aufgrund dieser Überlegungen beschränkte ich mich bei der Auswahl eines Markers für die MS-Bindungsstudien auf die Substanzklasse der selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRIs), zu welcher Citalopram (**rac-4**), Fluoxetin (**rac-3**), Fluvoxamin, Paroxetin und Sertralin gehören. Diese Inhibitoren zeichnen sich durch eine hohe Affinität und auch Selektivität für den Serotonin-Transporter aus.^{40,73}

Als potentiellen MS-Marker zog ich aus dieser Substanzklasse zunächst Paroxetin (**6**) (siehe Abb. 29) in die engere Wahl, da ich tritiummarkiertes Paroxetin (**5**) bereits in Radioligandbindungsexperimenten zur Untersuchung der hSERT exprimierenden HEK-293 Zellen verwendet hatte (siehe 3.1). Die Verwendung von Paroxetin (**6**) als Marker hätte deshalb den Vorteil, dass die Ergebnisse aus den MS-Bindungsstudien mit nicht-gelabeltem Paroxetin (**6**) mit solchen aus Radioligandbindungsstudien mit [³H]Paroxetin (**5**) an hSERT direkt vergleichbar wären.

Als sehr vielversprechend für die Entwicklung eines Label-freien Bindungsassays für SERT erschien aber auch der selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitor Fluoxetin (**rac-3**) (siehe Abb. 29). Fluoxetin (**rac-3**) ist einer der meist verschriebenen antidepressiven Wirkstoffe weltweit und daher von enormer pharmakologischer Relevanz.⁴¹ Trotzdem sind in der Literatur nur wenige Beispiele von Bindungsstudien mit diesem SERT-Inhibitor beschrieben, was vermutlich auf die von Wong et al. berichtete Instabilität des Radioliganden [³H]Fluoxetin zurückgeht.⁴¹ Letzteres ist wahrscheinlich auch der Grund, warum der Radioligand kommerziell nicht verfügbar

ist. In den literaturbekannten Untersuchungen wurden bisher nur Sättigungs- und kompetitive Bindungsstudien mit [^3H]Fluoxetin beschrieben. MS-Bindungsstudien für SERT mit Fluoxetin (***rac-3***) als nativem Marker würden neben der Durchführung von Sättigungs- und kompetitiven Experimenten erstmals die Chance bieten, die Bindung dieses Inhibitors auch in kinetischen Untersuchungen direkt zu charakterisieren. Die MS-Bindungsstudien mit Fluoxetin (***rac-3***) als Marker würden zudem noch eine weitere interessante Möglichkeit eröffnen: Fluoxetin (***rac-3***) wird in der Therapie als Racemat eingesetzt. Jedoch ist denkbar, dass sich das (S)-Enantiomer (***S-3***) und das (R)-Enantiomer (***R-3***) bezüglich ihrer Bindemodi am SERT unterscheiden. Hinweise dafür lieferten Zhou et al.⁵⁴, deren gelöste Cokristallstrukturen des mit (S)-[(***S-3***)] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(***R-3***)] kristallisierten Leucin-Transporters (LeuT) – einem bakteriellen Homolog des SERT (siehe 1.2) – auf unterschiedliche Bindemodi der Enantiomere im bakteriellen Transporter schließen lassen. Die Untersuchung der Bindung beider Enantiomere von Fluoxetin (***rac-3***) in MS-Bindungsstudien schien somit äußerst verheißungsvoll. Auch sollten diese Untersuchungen leicht durchführbar sein, da beide Enantiomere kommerziell verfügbar sind und sich der Bindungsassay mit einem der beiden Enantiomere ohne nennenswerten Aufwand auf das andere übertragen ließe.

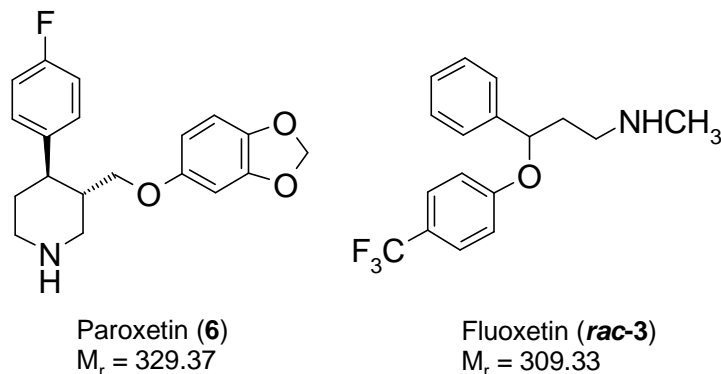


Abb. 29 Die als potentielle Marker für MS-Bindungsstudien für SERT ausgewählten SSRIs Paroxetin (**6**) und Fluoxetin (***rac-3***)

Zusammengefasst zog ich also entsprechend den oben beschriebenen Überlegungen sowohl Paroxetin (**6**) als auch Fluoxetin (***rac-3***) als Marker in Betracht: Paroxetin (**6**) hätte den Vorteil, einen direkten Vergleich der Ergebnisse aus MS-Bindungsstudien mit denen aus den bereits durchgeführten Radioligandexperimenten zu erlauben; Fluoxetin könnte zum einen erstmals direkt in kinetischen

Untersuchungen bezüglich seiner Bindung an den Transporter charakterisiert werden und zum anderen wäre es ein Leichtes beide Enantiomere zu untersuchen. Ich beabsichtige, sowohl für Paroxetin (**6**) als auch für Fluoxetin (**rac-3**) eine empfindliche LC-MS/MS Quantifizierungsmethode zu entwickeln. Nach deren Eignung sollte dann entschieden werden, mit welcher Markerverbindung die Etablierung der MS-Bindungsstudien schließlich erfolgt.

3.2.4 Anforderungen an eine Methode zur Markerquantifizierung

Grundvoraussetzung für die zu entwickelnden LC-MS/MS Methoden zur Markerquantifizierung in MS-Bindungsstudien ist bei zuverlässiger und sensitiver Quantifizierung eine kurze Analysenzeit. Letztere ist besonders wichtig, damit die geplanten MS-Bindungsassays als effektive Label-freie Screeningtechnik auch bezüglich des Probendurchsatzes kokurrenzfähig sind. MS-Bindungsstudien werden in Analogie zu klassischen Radioligandbindungsstudien durchgeführt, weshalb eine mit dieser klassischen Technik vergleichbare Analysenzeit – vorzugsweise von unter zwei Minuten – gefordert ist. Da bei einer LC-MS/MS Analytik die Analysenzeit maßgeblich von der Chromatographiedauer abhängt, sollte letztere möglichst kurz sein. Diese Vorgabe sollte durchaus realisierbar sein, da zur Quantifizierung eines Markers in MS-Bindungsstudien kein anspruchsvolles chromatographisches Trennproblem zu lösen ist, sondern nur Matrixbestandteile vom Analyten abgetrennt werden sollen, um Matrixeffekte zu minimieren. Als Trennsystem bot sich sowohl für Fluoxetin (**rac-3**) als auch für Paroxetin (**6**) aufgrund der Tatsache, dass es sich bei beiden um kleine Moleküle mit polaren und unpolaren Struktureinheiten handelt, eine Umkehrphasenchromatographie an. Nachdem Matrixbestandteile der Proben aus den Bindungsstudien vor allem polar sind (beispielsweise gehören dazu Reste der Inkubationspuffersalze) sollten sie bei Verwendung einer unpolaren stationären Phase unmittelbar nach der Totzeit eluieren. Der Analyt hingegen sollte auf dieser Phase eine ausreichende Retention erfahren, um von den Matrixkomponenten abgetrennt zu werden.

Der Konzentrationsbereich, in welchem ein Marker in MS-Bindungsstudien quantifiziert werden muss, lässt sich leicht anhand der für die Durchführung von Sättigungsexperimenten erforderlichen Bedingungen (siehe 3.3.3.1) abschätzen: In

diesen Experimenten sollen Markerkonzentrationen (M_{tot}) im Bereich zwischen $0.1K_d$ und $10K_d$ untersucht werden. Die eingesetzte Targetkonzentration (R_{tot}) sollte dabei maximal $0.1K_d$ betragen, um zu gewährleisten, dass nur maximal 10 % der nominal eingesetzten Markerkonzentration an das Target gebunden vorliegt und somit eine Depletion des Markers vermieden wird. Nimmt man entsprechend der Untersuchungen von [^3H]Fluoxetin⁹⁹ für die Bindung von Fluoxetin (**rac-3**) an SERT einen K_d -Wert von 6.7 ± 2.1 nM an, so sollte gemäß den Anforderungen an ein Sättigungsexperiment Fluoxetin (**rac-3**) mindestens zwischen 0.5 nM und 80 nM untersucht werden. Da in MS-Bindungsstudien der Anteil des gebundenen Markers quantifiziert wird und dieser, wie beschrieben, nur maximal 10 % der nominal im Assay eingesetzten Markerkonzentration betragen sollte, muss gebundenes Fluoxetin (**rac-3**) folglich durch eine LC-MS/MS Methode mindestens bis zu einer Konzentration von wenigstens 50 pM quantifiziert werden können. Die höchste zu quantifizierende Fluoxetinkonzentration würden entsprechend etwa 8 nM betragen. Wendet man diese Überlegungen auch auf die Analyse der Bindung von Paroxetin (**6**) an, so muss von einem K_d -Wert von etwa 160 pM (siehe 3.1.5.3), für die Bindung dieses Inhibitors an den Transporter ausgegangen werden. Folglich sollten nominale Assaykonzentrationen dieses Markers in Sättigungsexperimenten zwischen 10 pM und 2 nM eingesetzt werden. Entsprechend müsste die Quantifizierung von gebundenem Paroxetin (**6**) durch LC-MS/MS mindestens für Konzentrationen zwischen 1 pM und etwa 200 pM möglich sein.

3.2.5 Entwicklung einer LC-MS/MS Methode für Paroxetin

3.2.5.1 Methodenentwicklung am Massenspektrometer API 3200

Die LC-MS/MS Methodenentwicklung wurde mit der Analytik von Paroxetin (**6**) gestartet. In der Literatur sind bereits einige LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung von Paroxetin (**6**) in humanen Plasmaproben beschrieben.^{100,101,102} Die Sensitivität dieser Methoden ist für eine Anwendung in den zu etablierenden MS-Bindungsstudien allerdings nicht ausreichend. Die bislang sensitivste literaturbekannte Methode weist ein *Lower Limit of Quantification* (LLOQ) von 15 nM auf.¹⁰² Für die durchzuführenden Untersuchungen mit den niedrigsten zu erwartenden Konzentrationen um etwa 1 pM ist dies definitiv nicht ausreichend.

Zudem sind die beschriebenen Methoden aufgrund von Probenaufarbeitungsschritten, wie beispielsweise Flüssig-Flüssig-Extraktionen, sehr zeitaufwändig. Da ich diese Vorgehensweise für die geplanten Untersuchungen vermeiden wollte, war es erforderlich eine neue, sensitivere LC-MS/MS Quantifizierungsmethode für Paroxetin (**6**) zu entwickeln.

Für die Entwicklung einer neuen Methode sollte der Analyt **6** zunächst in einem Spritzenpumpenexperiment massenspektrometrisch untersucht werden. Dabei sollten das Mutterion und ein geeignetes Tochterion zur Realisierung von SRM-Experimenten ausgewählt werden. Zusätzlich sollten über die Spritzenpumpeninfusion auch die im Massenanalysator anliegenden Spannungen für eine optimale Fragmentierung des Analyten eingestellt werden, um bestmögliche Ionenausbeuten für den ausgewählten Massenübergang zu erzielen. Mit den optimierten Substanzspezifischen Parametern sollte es anschließend möglich sein, eine LC-MS/MS Methode zur Analyse von Paroxetin (**6**) zu entwickeln. Die für die Ionisierung des Analyten in ESI einzustellenden LC-abhängigen Parameter sollten darauffolgend ebenfalls optimiert werden.

Entsprechend der Erläuterungen wurde Paroxetin (**6**) zunächst massenspektrometrisch in einem Spritzenpumpenexperiment untersucht. Eine 300 nM Lösung wurde dazu in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Methanol und Ameisensäure (0.1 %; 50 / 50) über eine Spritzenpumpe in das API 3200 Triple-Quadrupol Massenspektrometer infundiert, wobei im positiven ESI-Modus gearbeitet wurde. Durch die Aufnahme eines Q1 Spektrums konnte der Mutterionpeak $[M+H]^+$ mit m/z 330.3 für Paroxetin (**6**) identifiziert werden (siehe Abb. 30).

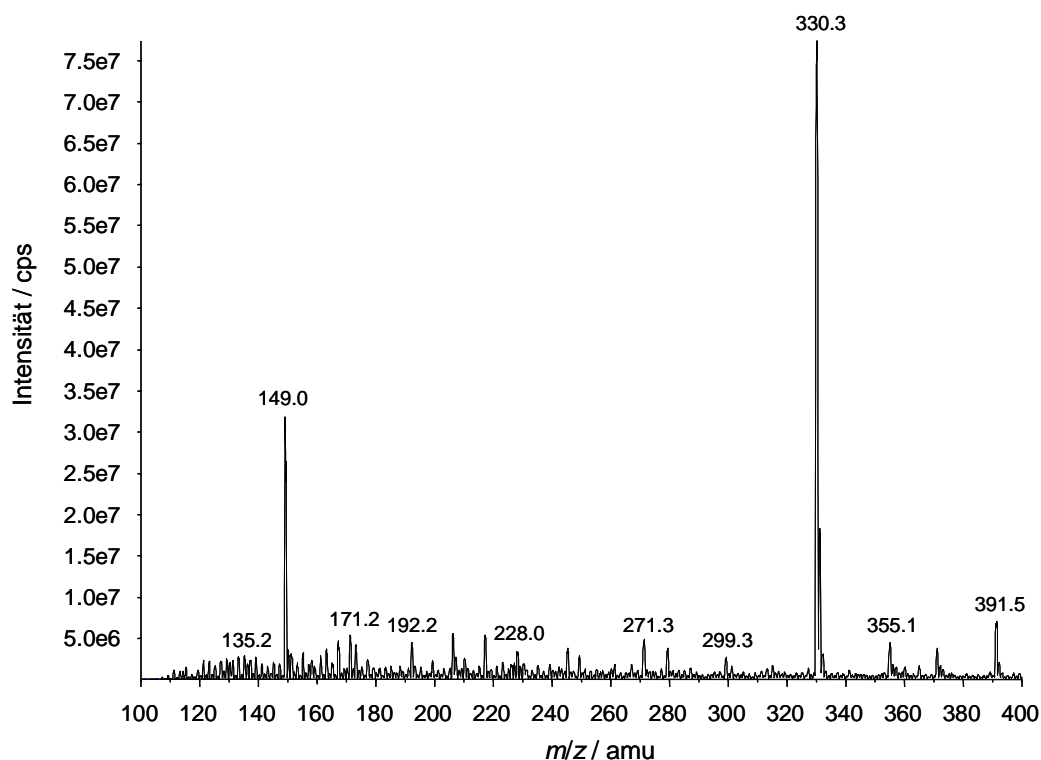


Abb. 30 Q1 Massenspektrum einer 300 nM Lösung von Paroxetin (**6**) nach Spritzenpumpeninfusion am API 3200 (Lösungsmittel: Methanol / 0.1 % Ameisensäure = 50 / 50)

Für die Realisierung von SRM-Experimenten wurde anschließend ebenfalls im Spritzenpumpenexperiment nach der Selektion des Mutterions im Q1 und dessen Fragmentierung im Q2 ein geeignetes Tochterion im Q3 gesucht. Zu diesem Zweck wurde mit dem *Quantitative Optimization Wizard* gearbeitet – einem Optimierungstool der verwendeten Software *Analyst 1.4.2*. Bei der Auswahl eines für die Quantifizierung geeigneten Massenübergangs war es dabei essentiell, ein möglichst intensives Produktion herauszufiltern, welches größer als m/z 100 ist. Bei Ionen mit einer Größe von $m/z \leq 100$ nimmt nämlich die Wahrscheinlichkeit zu, dass sie nicht vom Mutterion stammen, was zu einer erhöhten Basislinie und einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) führt. In den Experimenten konnte für Paroxetin (**6**) ein intensives Tochterion von m/z 192.2¹⁰³ identifiziert werden (siehe Abb. 31). Der Massenübergang m/z 330.3 \rightarrow 192.2 ist auch in der Literatur für LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung von Paroxetin beschrieben.^{100,102} Mittels des Optimierungstools der Software wurden die für diesen Massenübergang im Massenanalysator anliegenden Spannungen (*Compound-Dependent Parameters*) optimal eingestellt (siehe Tab. 8), so dass sowohl im Q1 als auch im Q3 maximale Ionenausbeuten erzielt wurden.

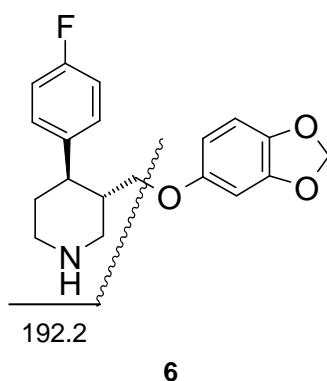


Abb. 31 Fragmentierung von Paroxetin (**6**) (m/z 330.3 $[M+H]^+$)

Tab. 8 Im Spritzenpumpenexperiment optimierte Einstellungen der *Compound-Dependent Parameters* für m/z 330.3 \rightarrow 192.2 von Paroxetin (**6**) am API 3200 im positiven ESI-Modus (Auflösung in Q1 und Q3: „unit“)

Parameter		
<i>Declustering Potential</i>	(DP)	56.0 V
<i>Entrance Potential</i>	(EP)	4.5 V
<i>Collision Energy</i>	(CE)	125 eV
<i>Collision Cell Exit Potential</i>	(CXP)	36 V

Die optimierten Potentiale der *Compound-Dependent Parameters* für den Massenübergang m/z 330.3 \rightarrow 192.2 von Paroxetin (**6**) (siehe Tab. 8) liegen alle im Bereich der im API 3200 *Operator's Manual*¹⁰⁴ empfohlenen Werte für diese Parameter und werden im Folgenden näher erläutert: Das *Declustering Potential* (DP) von 56.0 V ist die Potentialdifferenz, welche zwischen dem *Orifice* (siehe Abb. 27) und einer Erdung anliegt. Das DP soll Lösungsmittelcluster, welche dem ionisierten Molekül anhaften, lösen. Das *Entrance Potential* (EP) von 4.5 V stellt die Potentialdifferenz zwischen der Hochvakuumregion Q0 und einer Erdung dar und leitet die entstandenen Ionen in den Hochvakuumbereich. Gemeinsam tragen DP und EP so zur Fokussierung des Mutterions und zu dessen Weiterleitung in die Hochvakuumregionen des Massenspektrometers bei.

Die weiteren zu den *Compound-Dependent Parameters* zählenden Einstellungen dienen der effektiven Fragmentierung des Mutterions und dem Erzielen einer möglichst hohen Ausbeute an Tochterion. Die *Collision Energy* (CE, 125 eV) ist dabei eine zwischen Q0 und Q2 (Kollisionszelle) anliegende Potentialdifferenz, welche die Energie zur Beschleunigung und somit zur Fragmentierung des Mutterions im Q2 liefert. Das *Collision Cell Exit Potential* (CXP, 36 V) kontrolliert schließlich den Austritt der Ionen aus Q2 und führt somit zu einer hohen Ausbeute des selektierten Tochterions im Q3.

Mit den optimierten *Compound-Dependent Parameters* (siehe Tab. 8) wurde im Anschluss die Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur Analyse von Paroxetin (**6**) gestartet. Zunächst wurde dabei mit Proben von Paroxetin (**6**) in mobiler Phase (Lösungsmittelstandards) gearbeitet. Wie unter 3.2.4 beschrieben, erschien es sinnvoll eine Umkehrphasen-Chromatographie (*Reversed Phase*, RP) durchzuführen, wofür ich eine Luna C8 (50 x 2 mm, 3 μ m, Phenomenex) mit der entsprechenden Vorsäule für den Einsatz als stationäre Phase auswählte. Mobile Phasen, welche typischerweise in der LC-MS/MS Analytik eingesetzt werden, enthalten flüchtige Komponenten. Meist werden dafür Essigsäure und Ameisensäure beziehungsweise die Ammoniumsalze dieser Verbindungen ausgewählt.⁹⁴ Als mobile Phase setzte ich zunächst ein Gemisch aus Ammoniumformiatpuffer (10 mM, pH 7.0) und Acetonitril im Verhältnis 50 / 50 ein. Bei einer Flussrate von 300 μ L/min führte dies zu einer Retentionszeit (t_R) für Paroxetin (**6**) von 1.5 min. Da der Analytpeak Tailing aufwies und daraus eine chromatographische Laufzeit von mehr als zwei Minuten resultierte, entschied ich mich dazu, die Zusammensetzung des Fließmittels zu variieren, um eine symmetrischere Peakform und eine etwas kürzere Retentionszeit für Paroxetin (**6**) zu erzielen. Mit einem Fließmittel bestehend aus Acetonitril, Methanol und Ammoniumformiatpuffer (10 mM, pH 7.0) im Verhältnis 50 / 10 / 40 wurde bei einer Retentionszeit (t_R) von 1.24 min ein sehr gutes Ergebnis bezüglich der Peaksymmetrie erzielt, wobei sich zusätzlich auch die Signalintensität verdreifachte. Eine Erhöhung des Anteils an Methanol auf 20 % bei gleichzeitiger Verminderung des Pufferanteils auf 30 % führte erwartungsgemäß zu noch kürzeren Retentionszeiten ($t_R = 1.0$ min), aber gleichzeitig auch zu einer Reduktion der Signalintensität auf die Hälfte. Daher wurden die Untersuchungen mit der mobilen Phase mit einem 10 %igem methanolischen Anteil fortgeführt.

Die optimierten chromatographischen Parameter für die Analyse von Paroxetin (**6**) sind in Tab. 9 aufgelistet. Mit einem k -Faktor von 1.4 für den Analyten **6** (Berechnung der Totzeit gemäß $t_0 = 0.7r^2\pi L/f_v$ nach Unger et al.¹⁰⁵, Totvolumen des HPLC-Systems durch Fließinjektion bestimmt) sollte auch die Abtrennung der bei der Quantifizierung von Matrixproben eluierenden Matrixbestandteile in ausreichender Weise gewährleistet sein.

Tab. 9 LC-Parameter der entwickelten LC-MS/MS Methode zur Analyse von Paroxetin (**6**)

Parameter	
Säule	Luna C8 (50 x 2 mm, 3 μ m, Phenomenex)
Vorsäule	Security Guard C8 (4 x 2 mm, Phenomenex)
Fließmittel (isokratisch)	Acetonitril / Methanol / 10 mM Ammonium- formiatpuffer pH 7.0 = 50 / 10 / 40
Fluss	300 μ L/min

Für die LC-MS/MS Analyse einer Verbindung ist es essentiell auch die Geräteparameter zu optimieren, welche die Vorgänge in der Ionenquelle steuern (*Source-Dependent Parameters*). Dazu gehören vor allem Gasflüsse, welche direkt an der Erzeugung des ESI-Sprays beteiligt sind. Da sie maßgeblich vom Eluent der LC abhängig sind, sollten sie für jedes Fließmittel individuell optimiert werden. Nur so ist gewährleistet, dass der jeweils von der Säule eluierende Flüssigkeitsstrom an der ESI-Kapillare bestmöglich versprüht und von Lösungsmittel befreit wird. Um die dafür erforderlichen Parameter in optimaler Weise einzustellen, setzte ich ein weiteres, in der Software *Analyst 1.4.2* integriertes Optimierungstool namens *Flow Injection Analysis (FIA)* ein.

In einer *FIA* wird mit einer LC-MS/MS Kopplung gearbeitet und die Optimierung wird mit einer Methode mit den in der Spritzenpumpeninfusion optimierten *Compound-Dependent Parameters* (siehe Tab. 8), den bereits festgelegten Parametern für die Chromatographie (siehe Tab. 9) und Standardeinstellungen für die *Source-Dependent Parameters* gestartet. Über einen Autosampler wurde eine Lösung von Paroxetin (**6**) im verwendeten Fließmittel (Konzentration: 20 nM) injiziert und die

gewünschten Parameter wurden durch die Software schrittweise optimiert. Auf diese Weise wurden nicht nur die Quellenparameter optimiert; sondern auch die *Compound-Dependent Parameters* einer Reoptimierung unterzogen. Letztere Parameter sollten zwar nur von der zu untersuchenden Substanz abhängig sein, allerdings werden im Arbeitskreis die einschlägigen Spritzenpumpen-Optimierungen standardmäßig nur einmal durchgeführt, weil sie aufgrund der notwendigen hohen Substanzkonzentrationen zu einer starken Gerätekontamination führen. Da bei einmalig durchgeführten Experimenten naturgemäß der Fehler relativ hoch sein kann und eine *FIA* eine sehr gute Optimierungsmöglichkeit bei gleichzeitigem Einsatz geringerer Substanzkonzentrationen bietet, war es sinnvoll, in diesem Zusammenhang auch die *Compound-Dependent Parameters* nochmals zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Bezüglich der *Compound-Dependent Parameters* ergaben sich im Verlauf der *FIA* für *Declustering* (DP) und *Entrance Potential* (EP) nur geringfügige Potentialänderungen, wobei das DP von 56 V auf 52 V vermindert und das EP von 4.5 V auf 5.0 V erhöht wurde (siehe Tab. 8 und Tab. 10). Bei der *Collision Energy* (CE) resultierte mit einer Verminderung des Potentials von 126 eV auf 30.5 eV allerdings eine beachtliche Änderung. Gleiches wurde beim *Collision Cell Exit Potential* (CXP) beobachtet, wobei sich der Parameter von 36.0 V auf 5.5 V verminderte (siehe Tab. 8 und Tab. 10). Um sicherzugehen, dass die neu eingestellten Potentiale nun tatsächlich optimal waren, wurde nochmals eine Optimierung mittels *FIA* durchgeführt, wobei die neuen Potentiale bestätigt werden konnten. Natürlich stellt sich die Frage, woher derartige Unterschiede der Parameter bei der Optimierung mit Spritzenpumpeninfusion im Vergleich zu *FIA* rühren. Dabei muss in jedem Fall berücksichtigt werden, dass das Spritzenpumpenexperiment zur ersten Optimierung nur einmalig durchgeführt wurde und dabei vermutlich ein Fehler auftrat. Dieser könnte beispielsweise auf kontaminierte Geräteteile im Inneren des Massenspektrometers zurückzuführen sein, welche zuvor nicht ausreichend gereinigt wurden und es in der Folge zu falschen Potentialeinstellungen kam. Durch die Bestätigung der Ergebnisse für die *Compound-Dependent Parameters* in einer zweiten *FIA* kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die abschließend ermittelten Potentialeinstellungen tatsächlich dem Optimum entsprechen oder

diesem zumindest sehr nahe sind, weshalb ich sie für allen folgenden Untersuchungen beibehielt.

Ein Parameter, der zwar eigentlich zu den *Compound-Dependent Parameters* zählt, aber in den Software-Optimierungstools ausschließlich mittels *FIA* optimiert werden kann, ist die Einstellung des Kollisionsgases (CAD). Der Druck dieses Gases trägt neben der Kollisionsenergie (CE) zur Fragmentierung des Mutterions im Q2 bei. Der für diesen Parameter in der *FIA* Optimierung erhaltene Wert von 5.5 psi ist ebenfalls in Tab. 10 angegeben.

Tab. 10 Mittels *FIA* optimierte Einstellungen der *Compound-Dependent Parameters* für m/z 330.3 \rightarrow 192.2 von Paroxetin (**6**) am API3200 im positiven ESI-Modus (Auflösung in Q1 und Q3: „unit“)

Parameter		
<i>Declustering Potential</i>	(DP)	52.0 V
<i>Entrance Potential</i>	(EP)	5.0 V
<i>Collision Energy</i>	(CE)	30.5 eV
<i>Collision Cell Exit Potential</i>	(CXP)	6.5 V
<i>Collision Gas</i>	(CAD)	5.5 psi

Die in der *FIA* Optimierung erhaltenen *Source-Dependent Parameters* sind in Tab. 11 aufgelistet. Die ermittelten Werte liegen wie die *Compound-Dependent Parameters* im Bereich der im API 3200 *Operator's Manual*¹⁰⁴ für eine LC-MS/MS Analytik im positiven ESI-Modus empfohlenen Werte.

Tab. 11 Mittels *FIA* optimierte Einstellungen der *Source- Dependent Parameters* für Paroxetin (**6**) am API 3200

Parameter		
<i>Nebulizer Gas</i>	(GS1)	55.0 psi
<i>Auxiliary Gas</i>	(GS2)	75.0 psi
<i>Curtain Gas</i>	(CUR)	11.5 psi
<i>Temperature</i>	(TEM)	600.0 °C
<i>Ion Spray Voltage</i>	(IS)	1900.0 V
<i>Interface Heater</i>	(ihe)	on

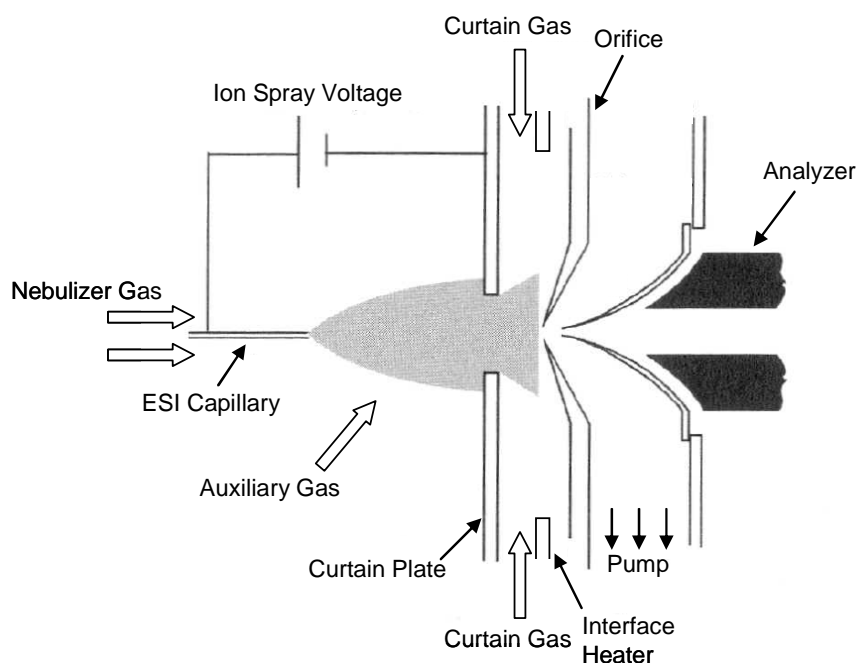


Abb. 32 Schematische Darstellung einer ESI-Quelle mit Gasströmen (Abbildung modifiziert nach de Hoffmann und Stroobant⁹²)

Zum besseren Verständnis werden die Quellenparameter im Folgenden näher erläutert¹⁰⁴ (siehe Abb. 32): Das *Ion Spray Voltage* (IS) von 1900 V entspricht der Spannung an der ESI-Kapillare, welche zur Ionisierung der Probe führt. Das Zerstäubergas (*Nebulizer Gas*, GS1) strömt parallel zur ESI-Kapillare in die Ionenquelle ein und ist für das Versprühen des Eluates zu kleinen Tröpfchen

verantwortlich, so dass ein stabiles Spray generiert wird. Der Einstrom des Hilfsgases (*Auxiliary Gas*, GS2) bei einer Temperatur (TEM) von 600 °C dient der weiteren Verdunstung des Fließmittels und somit der Verkleinerung der Tröpfchen, die schließlich in der Bildung von in der Gasphase frei vorliegenden Ionen mündet. Zwischen *Curtain Plate* und *Orifice* strömt zusätzlich das sogenannte *Curtain Gas* (CUR) ein, welches verhindern soll, dass Flüssigkeit in den Hochvakuumbereich eintritt. Der *Interface Heater* (ihe) trägt zur abschließenden Trocknung des Sprays bei und soll ebenfalls sicherstellen, dass der Massenanalysator nicht mit Lösungsmittel kontaminiert wird. Bei diesem *Heater* kann nur zwischen den Einstellungen „on“ und „off“ gewählt werden, wobei das von mir gewählte „on“ einem Heizen auf 100 °C entspricht.

Ein Chromatogramm eines 2 nM Lösungsmittelstandards von Paroxetin (**6**) unter Einsatz der beschriebenen LC-Parameter und der nach der Optimierung mittels *FIA* gefundenen *Compound- und Source-Dependent Parameters* am Massenspektrometer API 3200 ist in Abb. 33 dargestellt.

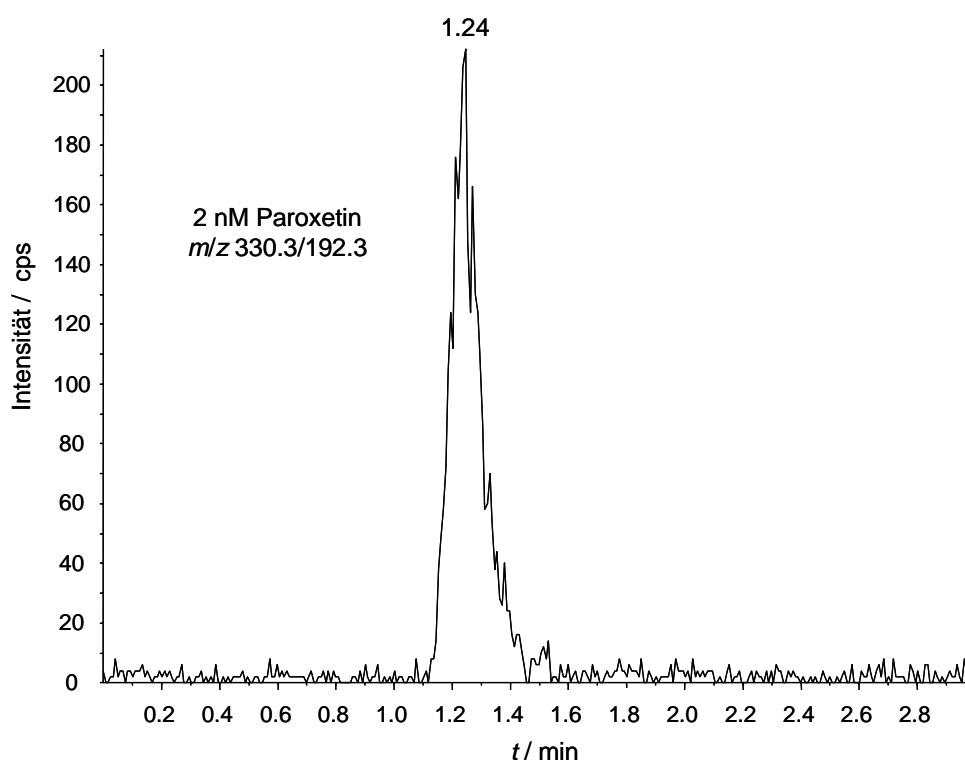


Abb. 33 SRM LC-ESI-MS/MS Chromatogramm eines 2 nM Lösungsmittelstandards von Paroxetin (**6**) in mobiler Phase (Acetonitril / Methanol / 10 mM Ammoniumformiatpuffer pH 7.0 = 50 / 10 / 40) am API 3200; Säule: Luna C8 (50 x 2 mm, 3 µm, Phenomenex); isokratischer Fluss: 300 µL; Injektionsvolumen: 5 µL.

3.2.5.2 Erstellung einer Kalibrierfunktion

Als nächstes galt es zu untersuchen, ob die soweit für die Analyse von Paroxetin (6) ermittelten Parameter das Erstellen einer Kalibrierfunktion – zunächst in Lösungsmittelproben – erlauben. Mit den unter 3.2.5.1 beschriebenen LC-Parametern und den ermittelten optimalen Einstellungen am Massenspektrometer API 3200 wurden Lösungsmittelstandards von Paroxetin (6) im Konzentrationsbereich zwischen 500 pM und 20 nM analysiert. Auftragen der erhaltenen Paroxetin-Peakfläche (y) gegen die jeweils untersuchte Konzentration (x) (siehe Abb. 34) führte zu einer Geraden ($y = 744x + 90$) mit einem linearen Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9996$. Wie aus der die Linearität in diesem Konzentrationsbereich hervorgeht, ist die Methode somit in der Tat für die Quantifizierung von Paroxetin (6) in Lösungsmittelstandards geeignet.

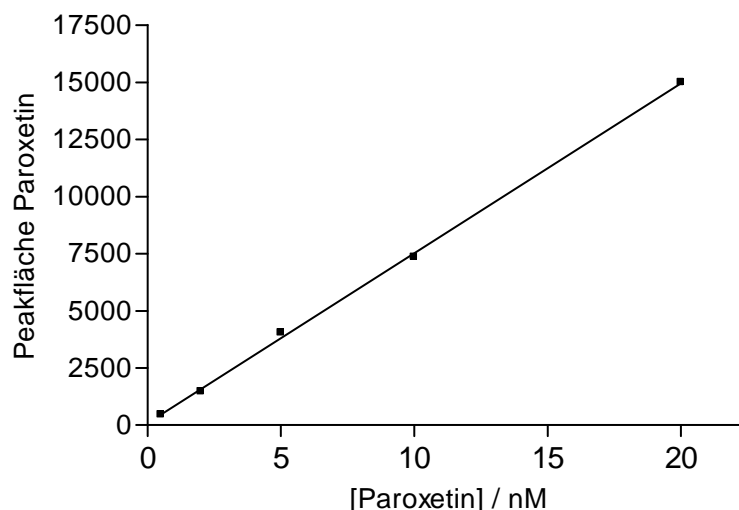


Abb. 34 Kalibrierfunktion ($y = 744x + 90$; $r = 0.9996$) für den Konzentrationsbereich zwischen 500 pM und 20 nM in Paroxetin-Lösungsmittelstandards. Datenpunkte stellen einzelne Messpunkte dar.

In Proben zur Quantifizierung des Markers in Bindungsstudien würde Paroxetin (6) allerdings in einer für die Bindungsexperimente typischen Matrix vorliegen. Wie die Erfahrung lehrt, kann eine solche Matrix einen starken Einfluss auf die LC-ESI-MS/MS Quantifizierung ausüben.¹⁰⁶ Deshalb ist es unabdingbar, diese Effekte zu untersuchen, wenn eine entsprechende Analytik (zur Quantifizierung eines Analyten in einer bestimmten Matrix) etabliert werden soll.

3.2.5.3 Untersuchung des Matrixeffektes

Bei der Quantifizierung eines Analyten durch LC-ESI-MS/MS kann die Ionisierung durch supprimierende oder verstärkende Effekte, die von Matrixbestandteilen ausgehen, erheblich gestört werden.¹⁰⁶ Dieses Phänomen wird allgemein als Matrixeffekt bezeichnet. In Proben aus MS-Bindungsstudien sind als typische Matrixbestandteile Puffersalze und lipophile Komponenten der als Targetquelle verwendeten Membranpräparationen der HEK-293 Zellen zu nennen; aber auch lösliche Bestandteile der verwendeten Kunststoffmaterialien können vorkommen. Die Anwesenheit solcher Substanzen kann, wenn sie mit dem Analyten koeluieren, zu Matrixeffekten, das heißt zu einer veränderten Ionisierungseffizienz des Analyten führen.¹⁰⁷ Sie können dadurch in entscheidender Weise Linearität, Richtigkeit, Präzision, Reproduzierbarkeit und Sensitivität einer Methode negativ beeinflussen, was schließlich zu einer fehlerhaften Quantifizierung führt. Der genaue Mechanismus durch den solche Matrixeffekte zustande kommen, ist bisher nur unvollständig geklärt. King et al.¹⁰⁸ konnten in Untersuchungen zeigen, dass die Effekte aus der Konkurrenz zwischen koeluierenden Matrixbestandteilen und dem Analyten um verfügbare Ladungen und schließlich um Plätze auf der Tröpfchenoberfläche zum Übergang in die Gasphase resultieren.

Zur Untersuchung des Matrixeffektes in der LC-MS/MS Methode am API 3200 zur Analyse von Paroxetin (**6**) wurden Matrixproben mit Paroxetin-Konzentrationen zwischen 500 pM und 20 nM hergestellt. Zur Herstellung dieser Proben wurde das im Arbeitskreis zur LC-MS/MS Methodenentwicklung etablierte Prinzip der Rekonstitution eingetrockneter Matrix angewendet. In diesem Verfahren wird zunächst wie bei der Durchführung eines SERT-Bindungsassays verfahren: Im 96-Well Format wird Target in physiologischem Puffer (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4) inkubiert. Anschließend wird der Inkubationsansatz filtriert, der Filterrückstand gewaschen und danach getrocknet. Schließlich wird mit Methanol eluiert und die erhaltene methanolische Lösung über Nacht im Trockenschrank eingedampft. In den Wells bleibt dabei sogenannte eingetrocknete, leere Matrix zurück, welche dann zu Matrixproben für eine LC-MS/MS Analyse durch Rekonstitution mit dem gewünschten Analyten in mobiler Phase umgewandelt werden kann. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, dass sich so schnell und einfach

Matrixeffekte, wie sie bei der Quantifizierung in späteren Bindungsexperimenten auftreten können, untersuchen lassen.

Nach der LC-MS/MS Analyse dieser Matrixproben mit Paroxetin-Konzentrationen zwischen 500 pM und 20 nM wurden die erhaltenen Peakflächen (B) mit den Peakflächen aus den reinen Lösungsmittelstandards der gleichen Konzentration (A) zur Berechnung des Matrixeffektes (ME) gemäß Matuszewski et al.¹⁰⁹ ins Verhältnis gesetzt ($ME = B/A \times 100$). Dabei wurde ein Matrixeffekt (ME) von durchschnittlich etwa 80 - 90 % ermittelt. Ein Vergleich der Peakflächen von Matrix- und Lösungsmittelstandards bei einer Konzentration von jeweils 2 nM Paroxetin (**6**) ist in Abb. 35 dargestellt. Insgesamt war der erhaltene Matrixeffekt mit 80 – 90 % zwar nicht sehr ausgeprägt, schwankte aber von Probe zu Probe und selbst bei Mehrfachmessungen derselben Probe stark. Entsprechend wies die mit Matrixproben von Paroxetin im Konzentrationsbereich zwischen 500 pM und 20 nM erstellte Kalibriergerade nur einen linearen Korrelationskoeffizienten r von 0.9331 auf. Die für eine verlässliche Quantifizierung erforderliche Güte war damit nicht gewährleistet.

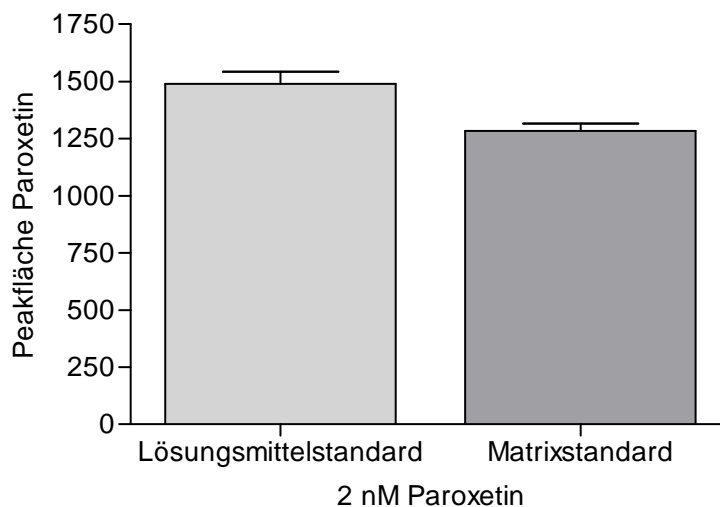


Abb. 35 Darstellung der erhaltenen Peakflächen (Mittelwerte \pm SD, $n = 3$) eines 2 nM Paroxetin-Lösungsmittelstandards und eines 2 nM Matrixstandards nach LC-ESI-MS/MS Analyse am API 3200

Ein weiteres Problem wurde bei der Betrachtung der erhaltenen Chromatogramme deutlich: Abb. 36 zeigt das Chromatogramm eines 500 pM Matrixstandards von Paroxetin (**6**). Mit einer Signalintensität von ca. 65 cps ergibt sich im Vergleich zur Basislinie ein Signal-Rausch-Verhältnis S/N von ~ 5 . Gemäß *FDA Guidance*⁸⁰ zur

Validierung bioanalytischer Methoden ist die Quantifizierung nur bis zu einem $S/N \geq 5$ erlaubt.

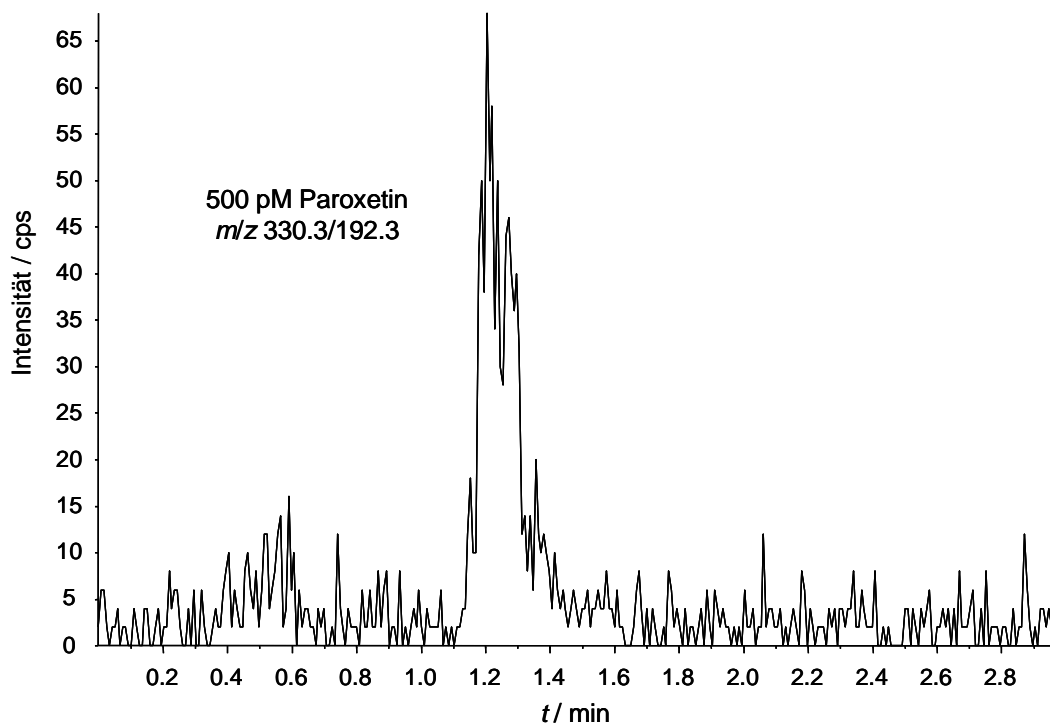


Abb. 36 SRM LC-ESI-MS/MS Chromatogramm eines 500 pM Matrixstandards von Paroxetin (**6**) in mobiler Phase (Acetonitril / Methanol / 10 mM Ammoniumformiatpuffer pH 7.0 = 50 / 10 / 40) am API 3200; Säule: Luna C8 (50 x 2 mm, 3 μ m, Phenomenex); isokratischer Fluss: 300 μ L/min; Injektionsvolumen: 5 μ L.

Wie schon oben ausgeführt (siehe 3.2.4), erfordern MS-Bindungsstudien am SERT mit Paroxetin (**6**) als Marker eine Sensitivität der Analytik, die als unterstes Limit eine Quantifizierung von mindestens 1 pM erlaubt. Diese Konzentration liegt aber um mehr als Faktor 100 niedriger als es für die hier entwickelte Methode der Fall ist. Diese Diskrepanz zwischen tatsächlicher und geforderter Signalintensität erschien viel zu groß, als dass es sich durch ein anderes chromatographisches Verfahren oder durch Erhöhung des Injektionsvolumens wettgemachen ließe. Folglich war davon auszugehen, dass die gewünschte Sensitivität am API 3200 nicht erzielt werden kann.

Im Arbeitskreis bestand aber die Möglichkeit unter Beibehaltung der entwickelten Chromatographie auf das wesentlich empfindlichere Massenspektrometer API 5000 zu wechseln. Erfahrungen im Arbeitskreis deuteten darauf hin, dass damit die in

diesem Fall erforderliche Steigerung an Signalintensität erzielt werden kann. Bevor ein Wechsel stattfinden sollte, musste allerdings eine Strategie zur Lösung der beschriebenen Matrixproblematik entwickelt werden, die eine Quantifizierung von Paroxetin (**6**) über eine verlässliche Kalibrierfunktion auch in Matrixproben erlaubt.

3.2.5.4 Die Frage nach dem internen Standard

Matrixeffekte führen oft zu unvorhersehbaren Schwankungen des Signals innerhalb einer Methode oder sogar einzelner Proben. Zur Lösung dieses Problems sind in der Literatur zahlreiche Strategien beschrieben. Beispielsweise können zusätzliche Probenaufbereitungsschritte oder besonders leistungsfähige chromatographische Methoden in das analytische Verfahren integriert werden, um Einflüsse der Matrix zu minimieren. Bei Probenaufarbeitungsschritten sind jedoch der erhöhte Zeit- und Arbeitsaufwand zu berücksichtigen und zudem die Tatsache, dass oftmals Analyt verloren geht. Bei den anvisierten Bindungsassays wäre ein zusätzlicher Probenaufarbeitungsschritt insbesondere bezüglich des Probendurchsatzes sehr ungünstig.

Eine weit verbreitete Vorgehensweise, um Matrixeffekte zu kompensieren, ist die Verwendung eines internen Standards. Ein geeigneter interner Standard gleicht die Schwankungen des Analytsignals aus, da bei gleicher Retentionszeit und gleichen Ionisierungseigenschaften die Matrixeffekte den Nachweis von Analyt und internem Standard gleichermaßen beeinflussen.¹¹⁰ Als interne Standards sind isotopenmarkierte Verbindungen besonders geeignet. Vor allem mehrfach deuterierte Analoga des Analyten werden zu diesem Zweck vielfach eingesetzt. So verwendete auch Zepperitz⁷⁹ zur Quantifizierung von NO711 in MS-Bindungsstudien an mGAT1 die dem Analyten analoge deuterierte Verbindung [²H₁₀]NO711 als internen Standard. Leider ist deuteriertes Paroxetin, das sich entsprechend für mein Vorhaben als interner Standard angeboten hätte, kommerziell nicht verfügbar. Neben einer Synthese der geforderten Verbindung wurde als Alternative die Entwicklung einer Chromatographie mit Paroxetin (**6**) und einer anderen chemisch ähnlichen Verbindung als internem Standard in Betracht gezogen. Letztere Vorgehensweise führt jedoch aufgrund meist unterschiedlicher Ionisierungseigenschaften mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu Fehlern in der Quantifizierung.

Die Synthese deuterierten Paroxetins für den Einsatz als internen Standard in der Quantifizierung von Paroxetin (**6**) stellte ich noch etwas zurück. Dafür wandte ich mich Fluoxetin (**rac-3**) als Marker für SERT-Bindungsstudien zu. Da deuteriertes [²H₅]Fluoxetin kommerziell verfügbar war und somit leicht als interner Standard in der LC-ESI-MS/MS Quantifizierung von Fluoxetin (**rac-3**) verwendet werden könnte, entschied ich mich, zunächst mit der Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin (**rac-3**) zu beginnen. Falls notwendig, wollte ich auf Paroxetin (**6**) zurückkommen und gegebenenfalls deuteriertes Paroxetin als internen Standard synthetisieren.

3.2.6 Entwicklung einer LC-MS/MS Methode für Fluoxetin

3.2.6.1 Methodenentwicklung am Massenspektrometer API 3200

In der Literatur sind mehrere LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung von Fluoxetin (**rac-3**) in Biomatrices (beispielsweise Serum- oder Plasmaproben) beschrieben.^{111,112,113,114,115} Allerdings ist die Sensitivität all dieser Methoden nicht ausreichend, um die Anforderungen (siehe 3.2.4) an die Quantifizierung von Fluoxetin (**rac-3**) in MS-Bindungsstudien bis hin zu niedrigen picomolaren Konzentrationen zu erfüllen. Desweiteren sind die Methoden aufgrund der enthaltenen Probenvorbereitungsschritte und einer langen Chromatographiedauer sehr zeitintensiv. Die langen Chromatographiezeiten resultieren dabei meist aus der Trennung komplexer Probengemische. Da zur Markerquantifizierung in MS-Bindungsstudien kein solch anspruchsvolles Trennproblem zu lösen ist, war beabsichtigt, eine neue, sensitivere und auch schnellere LC-MS/MS Quantifizierungsmethode für Fluoxetin (**rac-3**) zu entwickeln.

Die Methodenentwicklung wurde mit der racemischen Verbindung begonnen. Fluoxetin (**rac-3**) wurde zunächst am API 3200 mittels Spritzenpumpeninfusion massenspektrometrisch untersucht. Dafür wurde eine 400 nM Lösung der Verbindung in Methanol und Ameisensäure (0.1 %; 50 / 50) in das API 3200 Triple-Quadrupol Massenspektrometer infundiert. Auch hier wurde im positiven ESI-Modus gearbeitet. Durch die Aufnahme eines Q1 Spektrums (siehe Abb. 37) konnte eine Mutterionpeak [M+H]⁺ für Fluoxetin (**rac-3**) von *m/z* 310.7 identifiziert werden.

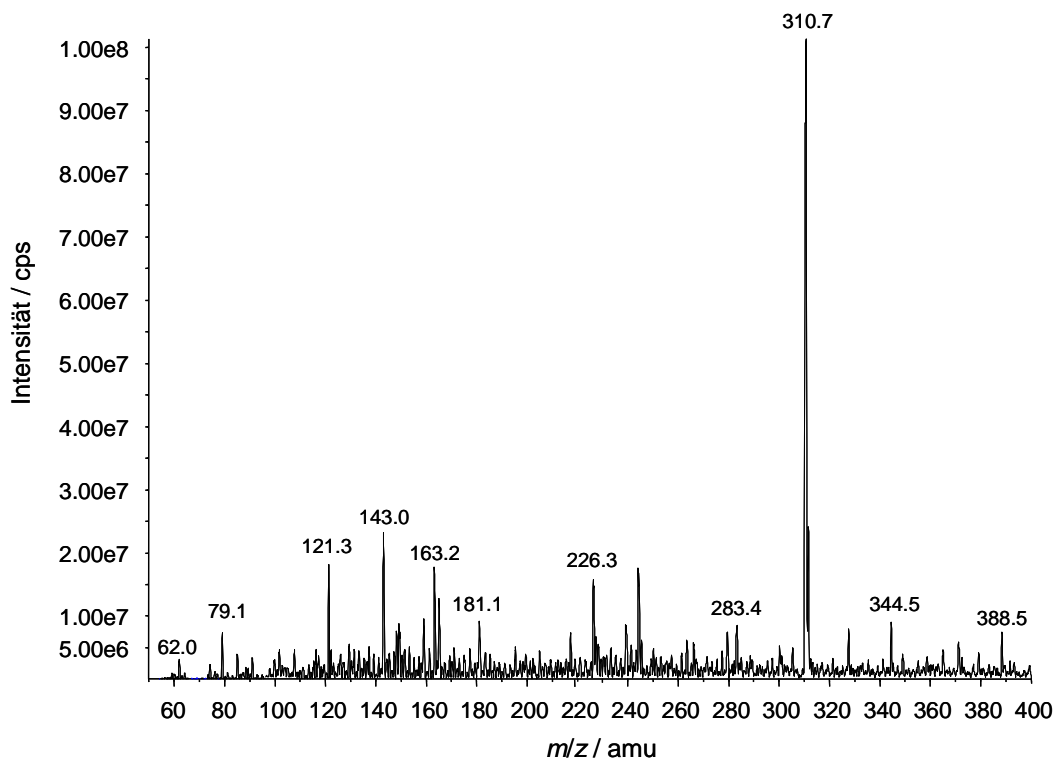


Abb. 37 Q1 Massenspektrum einer 400 nM Lösung von Fluoxetin (**rac-3**) nach Spritzenpumpeninfusion am API 3200 (Lösungsmittel: Methanol / 0.1 % Ameisensäure = 50 / 50)

Auch für Fluoxetin (**rac-3**) wurde in dem Spritzenpumpenexperiment mit dem Optimierungstool der Software *Analyst 1.4.2 (Quantitative Optimization Wizard)* ein für die Realisierung von SRM-Experimenten geeignetes Tochterion im Q3 gesucht. Dabei wurde natürlich wieder bedacht, ein möglichst intensives Tochterion zu wählen, das ein $m/z > 100$ besitzt, um ein erhöhtes Signalrauschen zu vermeiden. Es wurde ein intensives Tochterion mit $m/z 148.2^{103}$ (siehe Abb. 38) identifiziert. Der Massenübergang $m/z 310.2 \rightarrow 148.2$ ist in der Literatur bereits für LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung von Fluoxetin (**rac-3**) beschrieben.^{112,114} Mittels der Software wurden die für diesen Massenübergang im Massenanalysator anliegenden Spannungen optimiert (siehe Tab. 12), so dass sowohl im Q1 als auch im Q3 maximale Ionenausbeuten erhalten wurden.

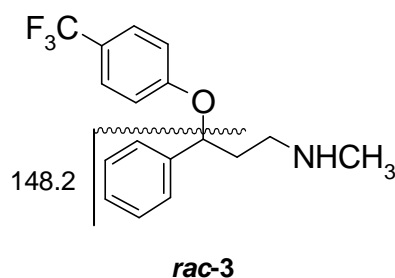


Abb. 38 Fragmentierung von Fluoxetin (**rac-3**) (m/z 310.2 $[M+H]^+$)

Tab. 12 Im Spritzenpumpenexperiment optimierte Einstellungen der *Compound-Dependent Parameters* für m/z 310.2 \rightarrow 148.2 von Fluoxetin (**rac-3**) am API 3200 im positiven ESI-Modus (Auflösung in Q1 und Q3: „unit“)

Parameter		
<i>Declustering Potential</i>	(DP)	21.0 V
<i>Entrance Potential</i>	(EP)	4.5 V
<i>Collision Energy</i>	(CE)	15.0 eV
<i>Collision Cell Exit Potential</i>	(CXP)	4.0 V

Auf Basis des für Fluoxetin (**rac-3**) optimierten Massenübergangs von m/z 310.2 \rightarrow 148.2 wurde anschließend mit der Entwicklung einer LC-MS/MS Methode gestartet. In einer früheren Untersuchung haben Lajeunesse et al.¹¹⁴ gezeigt, dass Ammoniumbicarbonat (pH 7.8) einen für die LC-MS/MS Quantifizierung von Fluoxetin (**rac-3**) geeigneten flüchtigen Puffer darstellt, welcher bessere Ergebnisse bezüglich der erhaltenen Signalintensitäten als Ammoniumacetatpuffer (pH 4.0) liefert. Ich wählte daher den Ammoniumbicarbonatpuffer für meine Untersuchungen. Laut Snyder et al.¹¹⁶ verliert der Ammoniumbicarbonatpuffer jedoch bei einem pH-Wert unter 8.5 unkontrolliert CO_2 , wodurch der pH ansteigt. Unter Berücksichtigung dieses Umstands und der Tatsache, dass beim Ammoniumbicarbonatpuffer die höchste Pufferkapazität zwischen pH 8.2 und pH 11.3 liegt, entschied ich, einen 5 mM Ammoniumbicarbonatpuffer mit pH 9.5 zu verwenden. Dieser pH-Wert bietet den Vorteil, dass herkömmliche Umkehrphasenmaterialien damit kompatibel sind und entsprechend Beobachtungen

in anderen Studien beeinträchtigen höhere pH-Werte in der mobilen Phase auch die Signalintensität basischer Substanzen im positiven ESI-Modus nicht.¹¹⁷

Um eine möglichst kurze Analysenzeit und somit einen hohen Probendurchsatz in den geplanten MS-Bindungsstudien zu ermöglichen, wählte ich für die Analyse von Fluoxetin (**rac-3**) – anders als bei der Methodenentwicklung für Paroxetin (**6**) – eine nur 20 mm lange RP18 Säule. Als solche kam die Luna C18(2) Säule (20 x 2 mm, 3 µm) von Phenomenex mit der entsprechenden Vorsäule zum Einsatz und als mobile Phase entschied ich mich für ein Gemisch aus Acetonitril und Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) im Verhältnis 80 / 20. Bei einem isokratischen Fluss von 800 µL/min wurde eine Retentionszeit von 0.7 min für Fluoxetin (**rac-3**) erreicht. Unter Berücksichtigung der Säulenlänge von nur 20 mm, ist das Ergebnis mit einem erzielten *k*-Faktor von 5.3 (Berechnung der Totzeit gemäß $t_0 = 0.7r^2\pi L/f_v$ nach Unger et al.¹⁰⁵, Totvolumen des HPLC-Systems durch Fließinjektion bestimmt) äußerst beeindruckend und zeigt die sehr gute Retention des Analyten auf der Säule. Dies ließ erwarten, dass es trotz der kurzen Retentionszeit zu einer sehr guten Abtrennung unerwünschter Matrixbestandteile kommen würde. Die ermittelten chromatographischen Parameter für die LC-MS/MS Analyse von Fluoxetin sind im Folgenden tabellarisch angegeben (siehe Tab. 13):

Tab. 13 LC-Parameter der entwickelten LC-MS/MS Methode zur Analyse von Fluoxetin (**rac-3**)

Parameter	
Säule	Luna C18(2) (20 x 2 mm, 3 µm, Phenomenex)
Vorsäule	Security Guard C18 (4 x 2 mm, Phenomenex)
Fließmittel (isokratisch)	Acetonitril / 5 mM Ammoniumbicarbonatpuffer pH 9.5 = 80 / 20
Fluss	800 µL/min

Als nächstes wurden mittels des Software Optimierungstools *FIA* die Quellenparameter optimiert, um in der LC-MS/MS Kopplung eine möglichst hohe Ionenausbeute zu erhalten. Dabei wurden auch nochmals die in der Spritzenpumpeninfusion untersuchten *Compound-Dependent Parameters* überprüft. Bei den

Compound-Dependent Parameters ergaben sich diesmal – anders als bei den Untersuchungen von Paroxetin (**6**) (siehe 3.2.5.1) – nur zum Teil und wenn, nur geringe Veränderungen. So stiegen die Werte für DP und EP etwas an, wohingegen sie für CE und CXP unverändert blieben (siehe Tab. 12 und Tab. 14). Im Verlauf der *FIA* wurde auch für das Kollisionsgas ein optimaler Druck von 3.0 psi ermittelt (siehe Tab. 14). Wie unter 3.2.5.1 beschrieben, zählt dieser Parameter zwar zu den *Compound-Dependent Parameters*, kann aber in den Optimierungstools der Software ausschließlich mit *FIA* optimiert werden.

Tab. 14 Mittels *FIA* optimierte Einstellungen der *Compound-Dependent Parameters* für m/z 310.2 \rightarrow 148.2 von Fluoxetin (**rac-3**) am API 3200 im positiven ESI-Modus (Auflösung in Q1 und Q3: „unit“)

Parameter		
<i>Declustering Potential</i>	(DP)	28.0 V
<i>Entrance Potential</i>	(EP)	4.0 V
<i>Collision Energy</i>	(CE)	15.0 eV
<i>Collision Cell Exit Potential</i>	(CXP)	4.0 V
<i>Collision Gas</i>	(CAD)	3.0 psi

Die in der *FIA* optimierten Einstellungen für die *Source-Dependent Parameters* sind in Tab. 15 aufgeführt.

Tab. 15 Mittels *FIA* optimierte Einstellungen für die *Source-Dependent Parameters* für Fluoxetin (*rac-3*) am API 3200

Parameter		
<i>Nebulizer Gas</i>	(GS1)	40.0 psi
<i>Auxiliary Gas</i>	(GS2)	70.0 psi
<i>Curtain Gas</i>	(CUR)	35.0 psi
<i>Temperature</i>	(TEM)	650.0 °C
<i>Ion Spray Voltage</i>	(IS)	2550.0 V
<i>Interface Heater</i>	(ihe)	on

Ein mit der neu entwickelten LC-MS/MS Methode aufgenommenes Chromatogramm eines 20 nM Lösungsmittelstandards Fluoxetin (*rac-3*) zeigt Abb. 39a. Dabei wurde ein Injektionsvolumen von 5 µL gewählt. Eine Erhöhung dieses Volumens führte aufgrund der nur 20 mm langen Säule zu verbreiterten Peaks und bei einem Injektionsvolumen von 50 µL kam es schließlich sogar zur Peakspaltung und somit zur Bildung eines Doppelpeaks (siehe Abb. 39b).

Neben Lösungsmittelstandards wurden auch Matrixstandards untersucht. Ein Beispiel für die erhaltenen Peakflächen eines Lösungsmittel- und eines Matrixstandards bei einer jeweils untersuchten Fluoxetin-Konzentration von 20 nM ist in Abb. 40 dargestellt. Aus den aus einer Serie von Bestimmungen erhaltenen Peakflächen konnte ein Matrixeffekt von etwa 70 % berechnet werden.¹⁰⁹

Da die Signalintensität eines 20 nM Matrixstandards von Fluoxetin (*rac-3*) bei ca. 1500 cps lag – und somit im gleichen Bereich, wie sie auch für 20 nM Paroxetin (**6**) mit dem API 3200 erzielt worden war – wurde deutlich, dass die für MS-Bindungsstudien geforderte Sensitivität mit dem API 3200 wieder nicht erreicht werden konnte. Die entwickelte LC-MS/MS Methode zur Analyse von Fluoxetin (*rac-3*) sollte daher auf das sensitivere Massenspektrometer API 5000 übertragen werden, um so die für Bindungsstudien geforderte höhere Sensitivität in der Quantifizierung zu erreichen.

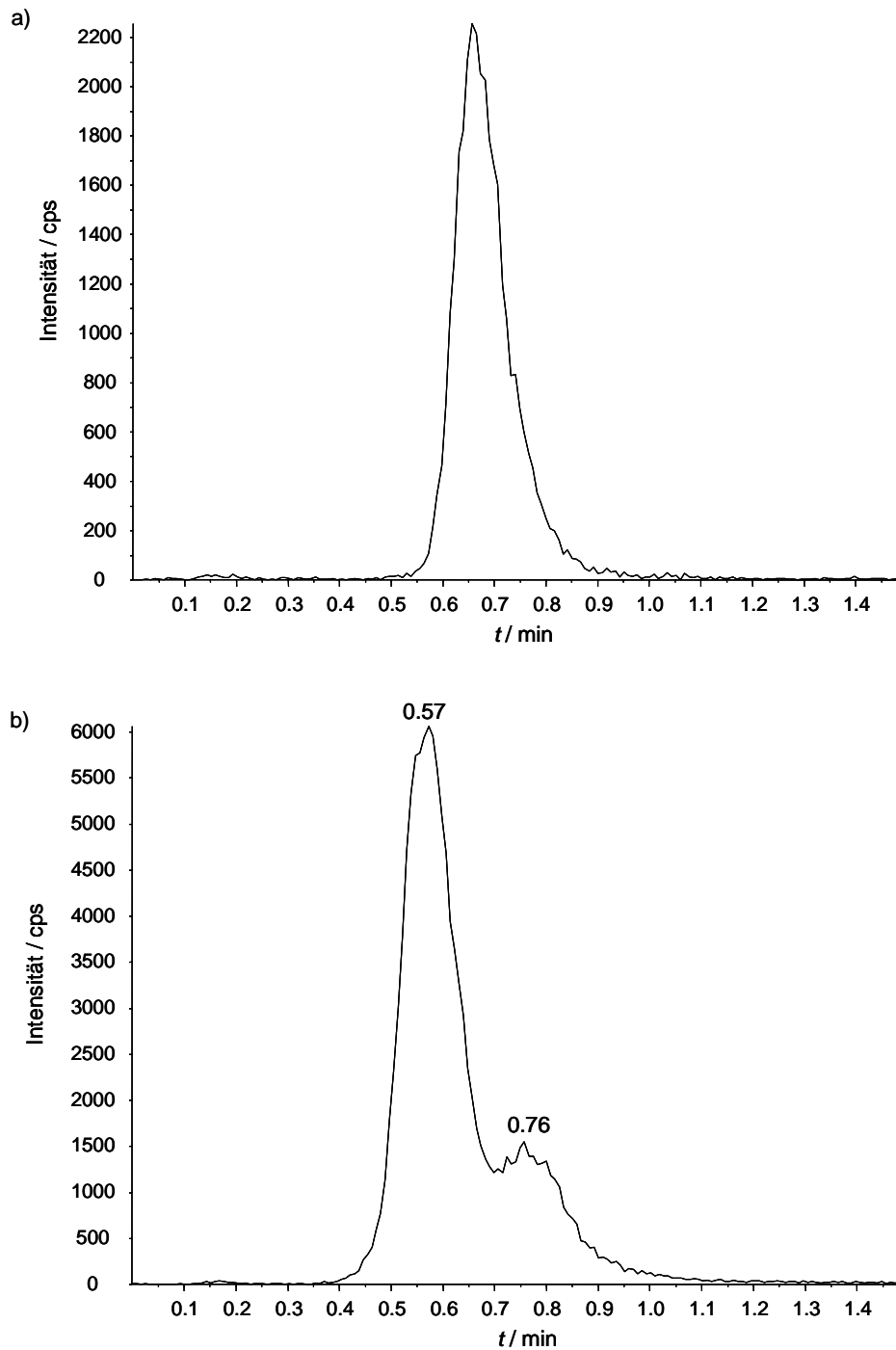


Abb. 39 SRM LC-ESI-MS/MS Chromatogramm eines 20 nM Lösungsmittelstandards von Fluoxetin (*rac-3*) (m/z 310.2 \rightarrow 148.2) in mobiler Phase (Acetonitril / 5 mM Ammoniumbicarbonatpuffer pH 9.5 = 80 / 20) am API 3200 mit stationärer Phase Luna C18(2) (20 x 2 mm, 3 μ m, Phenomenex) und isokratischem Fluss von 800 μ L/min. a) Injektionsvolumen: 5 μ L; b) Injektionsvolumen: 50 μ L.

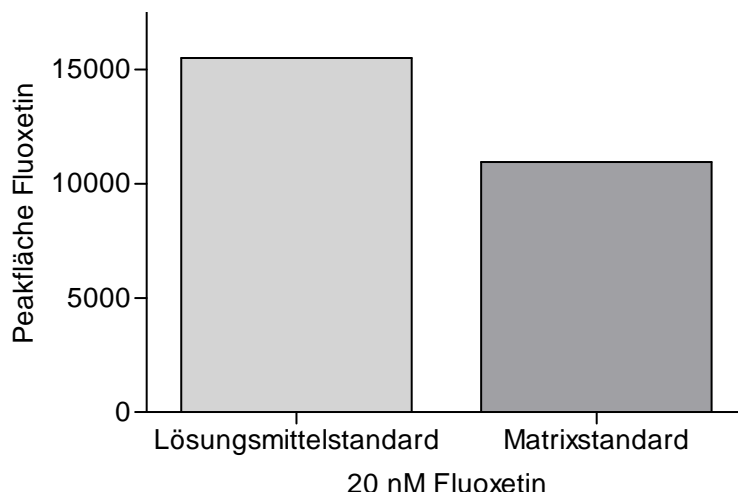


Abb. 40 Darstellung der erhaltenen Peakflächen (Mittelwerte, $n = 2$) eine 20 nM Fluoxetin-Lösungsmittelstandards und eines 20 nM Matrixstandards nach LC-ESI-MS/MS Analyse am API 3200.

3.2.6.2 Auswahl eines internen Standards

Bevor die am API 3200 entwickelte LC-MS/MS Methode auf das empfindlichere API 5000 übertragen wurde, sollte ein interner Standard für die Quantifizierung von Fluoxetin (**rac-3**) ausgewählt und massenspektrometrisch untersucht werden. Wie unter 3.2.5.4 beschrieben, ist die Verwendung des isopenmarkierten Markers als interner Standard die eleganteste Lösung. Ich wählte daher das kommerziell verfügbare [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (**rac-7**) (siehe Abb. 41) aus. Diese Verbindung sollte nahezu identische chromatographische Eigenschaften wie Fluoxetin (**rac-3**) besitzen und daher mit diesem etwa gleichzeitig eluieren. Auch bezüglich der Ionisierungseigenschaften sollten sich beide Verbindungen nicht nennenswert unterscheiden.

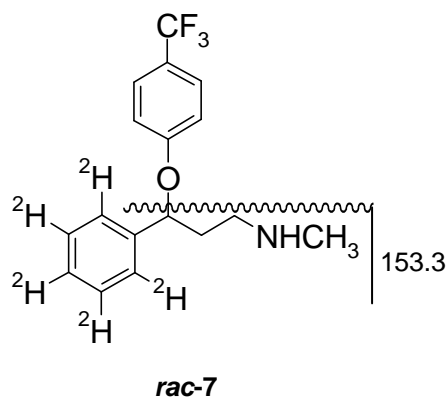


Abb. 41 Fragmentierung von [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (**rac-7**) ($M_r = 314.33$; m/z 315.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$)

In Spritzenpumpenexperimenten am API 3200 sollte zunächst ein geeigneter Massenübergang für [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (**rac-7**) identifiziert werden. Im Q3 Scan im positiven ESI-Modus lieferte der Massenübergang m/z 315.2 \rightarrow 153.3 das günstigste Produktion. Unter Berücksichtigung der eingeführten Deuteriumatome entspricht diese Fragmentierung dem für Fluoxetin (**rac-3**) ausgewählten Massenübergang von m/z 310.2 \rightarrow 148.2. Bei der Optimierung der *Compound-Dependent Parameters* ergaben sich für die deuterierte Verbindung (**rac-7**) die gleichen Werte wie für nicht-deuteriertes Fluoxetin (**rac-3**) (siehe Tab. 12).

3.2.6.3 Transfer der Methode auf das Massenspektrometer API 5000

Da sowohl das Massenspektrometer API 3200 als auch das empfindlichere API 5000 mit einem Agilent 1200 HPLC System verbunden sind, konnte die für Fluoxetin (**rac-3**) entwickelte chromatographische Methode direkt auf das API 5000 System übertragen werden. In den Versuchsreihen am API 5000 erfolgte nun allerdings der Einsatz von (S)-Fluoxetin [(**S**)-3] anstatt der racemischen Verbindung. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen höheren Affinität des (S)-Enantiomers (**S**-3) (im Vergleich zur Affinität von (**R**)-3) zum Serotonin-Transporter^{76,118} sollte nämlich das (S)-Enantiomer (**S**-3) in ersten SERT-Bindungsassays eingesetzt werden. Eine LC-MS/MS Analytik unter Verwendung einer RP-Phase sollte generell unabhängig von der Konfiguration am Stereozentrum sein.

Die Versuche am API 5000 wurden mit einer Optimierung der einzustellenden Parameter mittels *FIA* gestartet, wobei im Verlauf dieses Versuchsaufbaus sowohl die *Compound-* als auch die *Source-Dependent Parameters* für (S)-Fluoxetin [(**S**)-3] (m/z 310.2 \rightarrow 148.2) beziehungsweise [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (**rac-7**) (m/z 315.2 \rightarrow 153.3) optimiert wurden. Als Startpunkt wurden in diesem Versuch die am API 3200 optimierten Einstellungen zur Analyse von Fluoxetin (**rac-3**) (siehe Tab. 14 und Tab. 15) gewählt. Die Optimierung der Parameter am API 5000 resultierte für (S)-Fluoxetin [(**S**)-3] und für [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (**rac-7**) in den gleichen Einstellungen (siehe Tab. 16). Die am API 5000 ermittelten optimalen Parameter für die gewählten Massenübergänge von (S)-Fluoxetin [(**S**)-3] und [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (**rac-7**) unterschieden sich insgesamt nur wenig von den am API 3200 gefundenen. Bei den *Compound-Dependent Parameters* veränderten sich nur das *Declustering Potential* (DP) von 28.0 V auf 25.0 V und die *Collision Energy* (CE) von 15.0 eV auf 12.0 eV. Bei den

Source-Dependent Parameters waren die beiden einzigen Parameter, die sich veränderten, das *Curtain Gas* (CUR), welches sich von 35 psi auf 25 psi verringerte und die Temperatur, wobei letztere von 650 °C auf 700 °C gesteigert wurde.

Tab. 16 Mittels *FIA* optimierte Einstellungen der *Compound-* und *Source-Dependent Parameters* für m/z 310.2 → 148.2 für (S)-Fluoxetin [(S)-3] und für m/z 315.2 → 153.3 für [²H₅]Fluoxetin (**rac-7**) am API 5000 im positiven ESI-Modus (Auflösung in Q1 und Q3: „unit“).

<i>Compound-Dependent Parameters</i>		
<i>Declustering Potential</i>	(DP)	25.0 V
<i>Entrance Potential</i>	(EP)	4.0 V
<i>Collision Energy</i>	(CE)	12.0 eV
<i>Collision Cell Exit Potential</i>	(CXP)	4.0 V
<i>Collision Gas</i>	(CAD)	3.0 psi
<i>Source-Dependent Parameters</i>		
<i>Nebulizer Gas</i>	(GS1)	40.0 psi
<i>Auxiliary Gas</i>	(GS2)	70.0 psi
<i>Curtain Gas</i>	(CUR)	25.0 psi
<i>Temperature</i>	(TEM)	700.0 °C
<i>Ion Spray Voltage</i>	(IS)	2550.0 V
<i>Interface Heater</i>	(ihe)	on

Abb. 42 zeigt ein nach der Parameter-Optimierung aufgenommenes Chromatogramm eines 50 pM Matrixstandards von (S)-Fluoxetin [(S)-3] zusammen mit einer Konzentration von 2 nM an internem Standard **rac-7**. Beide Verbindungen eluieren etwa gleichzeitig bei $t_R \sim 0.7$ min (~ 43 s). Genau wie bereits in der Chromatographie auf einer RP-Phase von NO711 und [²H₁₀]NO711 bei Zepperitz⁷⁹ beobachtet, scheint der deuterierte interne Standard [²H₅]Fluoxetin (**rac-7**) auch in meinen Untersuchungen etwas vor dem Analyten (S)-3 zu eluieren. Dies ist durch den Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium und die daraus resultierende

erhöhte Polarität bedingt.¹¹⁹ In der neu entwickelten Methode wurde bei einer chromatographischen Laufzeit von einer Minute zur Schonung der Ionenquelle und des Massenspektrometers das Eluat durch eine Ventilschaltung nur zwischen 0.4 min und 0.9 min auf die ESI-Quelle geleitet; zwischen 0 min und 0.4 min beziehungsweise zwischen 0.9 min und 1 min wurde es direkt in den Lösungsmittelabfall abgeführt. Aus dem in Abb. 42 gezeigten Chromatogramm wird klar ersichtlich, dass die entwickelte LC-MS/MS Methode am API 5000 eine Analyse von (S)-Fluoxetin [(S)-3] bis in den niedrigen picomolaren Bereich (50 pM: S/N \geq 5) zulässt und daher für die Quantifizierung von Fluoxetin als Marker in MS-Bindungsstudien am SERT geeignet ist. Mit einer chromatographischen Laufzeit von nur einer Minute und zusätzlichen 30 s, welche der verwendete Autosampler für die Aufnahme und Injektion der Probe benötigt, beträgt die Gesamtzeit der Analyse 90 s. Das ermöglicht einen Probendurchsatz von über 600 Proben pro Nacht (ca. 15 h) mittels dieser neu entwickelten LC-MS/MS Methode.

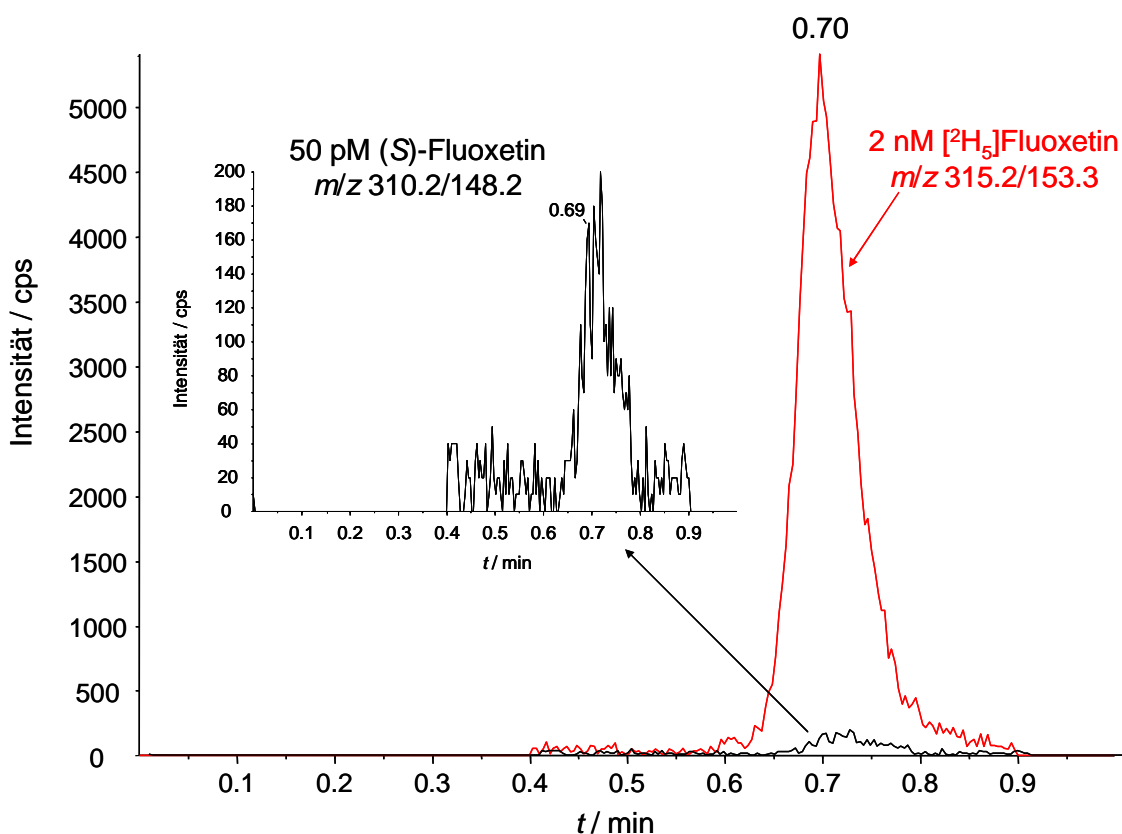


Abb. 42 SRM LC-ESI-MS/MS Chromatogramm eines 50 pM (S)-Fluoxetin [(S)-3] Matrixstandards mit einer Konzentration von 2 nM [²H₅]Fluoxetin (*rac*-7) am API 5000; mobile Phase: Acetonitril / 5 mM Ammoniumbicarbonatpuffer pH 9.5 = 80 / 20; Säule: Luna C18(2) (20 x 2 mm, 3 μ m, Phenomenex); isokratischer Fluss: 800 μ L/min; Injektionsvolumen: 5 μ L.

In den Experimenten am API 5000 musste der Matrixeffekt der Methode nun erneut untersucht werden. Es war jedoch davon auszugehen, dass sich dieser aufgrund gleicher Bedingungen bei der Chromatographie und der gleichen Ionenquelle bei den beiden Geräten nicht besonders von dem am API 3200 beobachteten Matrixeffekt (ME \approx 70 %, siehe 3.2.6.1) unterscheidet. Diese Annahme bestätigte sich. So betrug bei den Experimenten am API 5000 bei einer Konzentration von 2 nM (S)-Fluoxetin [(S)-3] (siehe Abb. 43) der Matrixeffekt ebenfalls etwa 70 % und war damit genauso groß wie der mit dem API 3200 beobachtete.

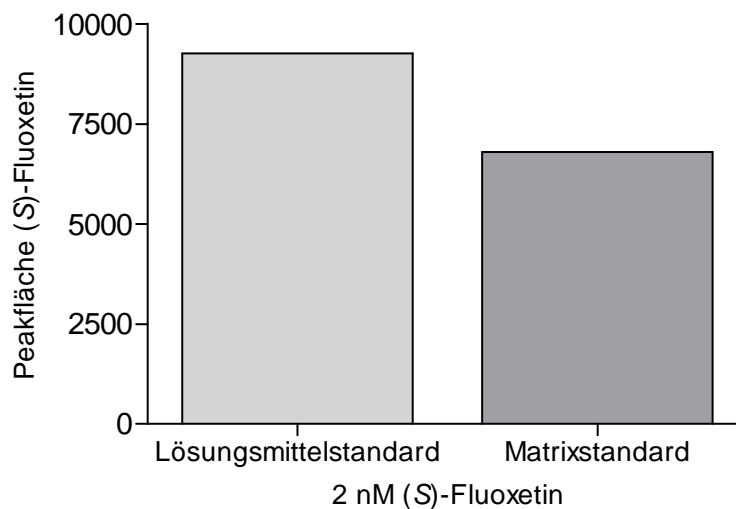


Abb. 43 Darstellung der erhaltenen Peakflächen (Mittelwerte, $n = 2$) eines 2 nM (S)-Fluoxetin-Lösungsmittelstandards und eines 2 nM Matrixstandards nach LC-ESI-MS/MS Analyse am API 5000.

Bevor die Methode schließlich zur Quantifizierung in den Bindungsstudien eingesetzt wurde, sollte durch eine Methodvalidierung sichergestellt werden, dass sie für den geplanten Einsatzzweck auch tatsächlich geeignet ist.

3.2.6.4 Validierung der LC-MS/MS Quantifizierungsmethode für Fluoxetin

Eine Validierung soll den dokumentierten Nachweis liefern, dass eine analytische Methode für ihren Einsatzzweck geeignet ist und die an sie gestellten Anforderungen erfüllt.¹²⁰ Die entwickelte LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin sollte gemäß der von der *United States Food and Drug Administration (U.S. FDA)* herausgegebenen Richtlinien zur Validierung bioanalytischer Methoden⁸⁰ hinsichtlich Linearität, Richtigkeit und Präzision untersucht werden.

Gemäß der *FDA Guidance* sollte die Validierung ausschließlich mit Matrixstandards erfolgen. Für eine Validierung ist es dabei zwingend erforderlich, alle Validierungsproben analog der Vorgehensweise im Bindungsassay herzustellen.⁸⁰ Ansonsten wäre die Methode nämlich nicht für ihren eigentlichen Einsatzzweck validiert.

Während der Methodenentwicklung wurden Matrixproben durch die Rekonstitution eingetrockneter Matrices hergestellt. Letztere wurde – wie unter 3.2.5.3 beschrieben – nach Inkubation, Filtration und methanolischer Elution durch das Eindampfen der eluierten methanolischen Lösung erhalten. Bei Bedarf wurde die eingetrocknete Matrix dann in Fließmittel, welches mit einer gewünschten Menge Analyt und gegebenenfalls internem Standard gespiked war, rekonstituiert. Anschließend wurde die erhaltene Probe über LC-MS/MS quantifiziert. Auf diese Weise konnten zwar sehr schnell und unkompliziert die Einflüsse der Matrix und somit die resultierenden Effekte auf eine LC-MS/MS Methode überprüft werden, allerdings muss dabei bedacht werden, dass sich diese Herstellung für erste Matrixversuche in der Methodenentwicklung aus Gründen der Praktikabilität von der Herstellung der tatsächlichen Proben, wie sie in den MS-Bindungsassays generiert werden, unterscheidet. Der entscheidende Unterschied in den Vorgehensweisen liegt darin, dass bei der Durchführung eines Bindungsassays (siehe 3.3.4.1) die Elution mit methanolischer Lösung, welcher bereits interner Standard in einer entsprechenden Konzentration zugesetzt ist, erfolgt. Nach der Elution wird die erhaltene Lösung hier nicht eingedampft, sondern es wird Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) zugesetzt und die Probe anschließend direkt über LC-MS/MS vermessen.

Die Matrixstandards zur Validierung wurden deshalb wie folgt hergestellt: Entsprechend der Vorgehensweise im Bindungsassay (siehe 3.3.4.1) wurde HEK-hSERT Membranpräparation in physiologischem Puffer (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4) inkubiert. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit wurde der Inkubationsansatz filtriert und die Filter wurden anschließend mit Inkubationspuffer gewaschen. Nach dem Trocknen der Filterplatte bei 50 °C und anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur, wurde schließlich mit 3x 70 µL methanolischer Lösung, welche eine entsprechende Konzentration (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] (67 pM – 4 nM) und 2.67 nM internen Standard [²H₅]Fluoxetin (**rac-7**) enthielt, eluiert.

Anschließende Zugabe von 70 µL Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) zur eluierten methanolischen Lösung führte in den Proben zu einer Konzentration an internem Standard von 2 nM und der für die Validierung erforderlichen Konzentrationen an (S)-Fluoxetin [(S)-3] zwischen 50 pM und 3 nM.

Die Versuchsreihen zur Validierung basierten auf insgesamt fünf Serien, in welchen jeweils Linearität, Richtigkeit und Präzision überprüft wurden. Die Serien wurden an unterschiedlichen Tagen unter Verwendung von Membranpräparationen unterschiedlicher Chargen der stabil hSERT exprimierenden HEK-293 Zelllinie durchgeführt. Dadurch sollten Unterschiede in der Matrix, wie sie natürlicherweise in biologischen Materialien auftreten können, bei der Validierung berücksichtigt werden. Die Linearität im Konzentrationsbereich zwischen 50 pM und 3 nM wurde jeweils mittels acht Kalibrierstandards bewiesen. Diese wurden als Triplikate hergestellt und vermessen, wobei das LLOQ (50 pM (S)-Fluoxetin [(S)-3]) immer in sechsfacher Ausführung hergestellt und überprüft wurde. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde das Peakflächenverhältnis (y) von (S)-Fluoxetin [(S)-3] zum internen Standard [²H₅]Fluoxetin (*rac-7*) gegen das Konzentrationsverhältnis (x) von (S)-Fluoxetin [(S)-3] zu internem Standard *rac-7* aufgetragen. Eine entsprechende Kalibriergerade einer Validierungsserie ist in Abb. 44 dargestellt.

Die Untersuchung von Richtigkeit und Präzision erfolgte in den Validierungsexperimenten sowohl mit den bereits genannten Kalibrierstandards als auch mittels *Quality Control Samples* (QCs) in drei zusätzlichen Konzentrationsstufen von (S)-Fluoxetin [(S)-3] (100 pM, 1 nM und 2 nM). Die QCs wurden dafür jeweils in sechsfacher Ausführung hergestellt und analysiert. Gemäß der *FDA Guidance* sollte durch die QCs sowohl die *Intra-Series* Richtigkeit und die *Intra-Series* Präzision (innerhalb einer Validierungsserie an einem Versuchstag) als auch die *Inter-Series* Richtigkeit und die *Inter-Series* Präzision (innerhalb der gesamten Validierungsreihe bestehend aus fünf Serien) überprüft werden. Als LLOQ wurde entsprechend der *FDA Guidance* die Konzentration von (S)-Fluoxetin [(S)-3] spezifiziert, welche ein mindestens fünfmal so hohes Signal wie das eines Matrixblanks lieferte ($S/N \geq 5$). Wie in Abb. 45 gezeigt, erfüllt eine Konzentration von 50 pM (S)-Fluoxetin [(S)-3] diese Anforderungen und wird in meiner Arbeit daher als LLOQ der neu entwickelten LC-MS/MS Methode definiert. Die Richtigkeit wurde beim LLOQ wie bei allen anderen Kalibrierstandards und QCs als Wiederfindung der

nominalen Konzentration in den hergestellten Matrixstandards berechnet. Von der *FDA Guidance* wird für das LLOQ eine Richtigkeit zwischen 80 % und 120 % und eine Präzision von ≤ 20 % (ausgedrückt als relative Standardabweichung, RSD) gefordert. Für die weiteren Kalibrierstandards und die QCs wird eine Richtigkeit zwischen 85 % und 115 % und eine Präzision – ebenfalls ausgedrückt als RSD – von ≤ 15 % verlangt.

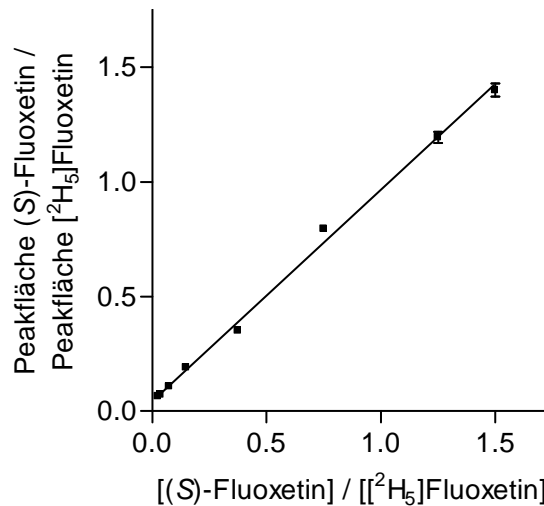


Abb. 44 Kalibrierfunktion ($y = 0.925x + 0.0417$; $r = 0.9986$) für den Konzentrationsbereich zwischen 50 pM und 3 nM von (S)-Fluoxetin [(S)-3] bei einer internen Standardkonzentration von 2 nM [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (rac-7). Daten entstammen der Validierungsserie 1 (siehe Tab. 17). Datenpunkte stellen Mittelwerte \pm SD dar (LLOQ: $n = 6$, alle anderen Datenpunkte: $n = 3$).

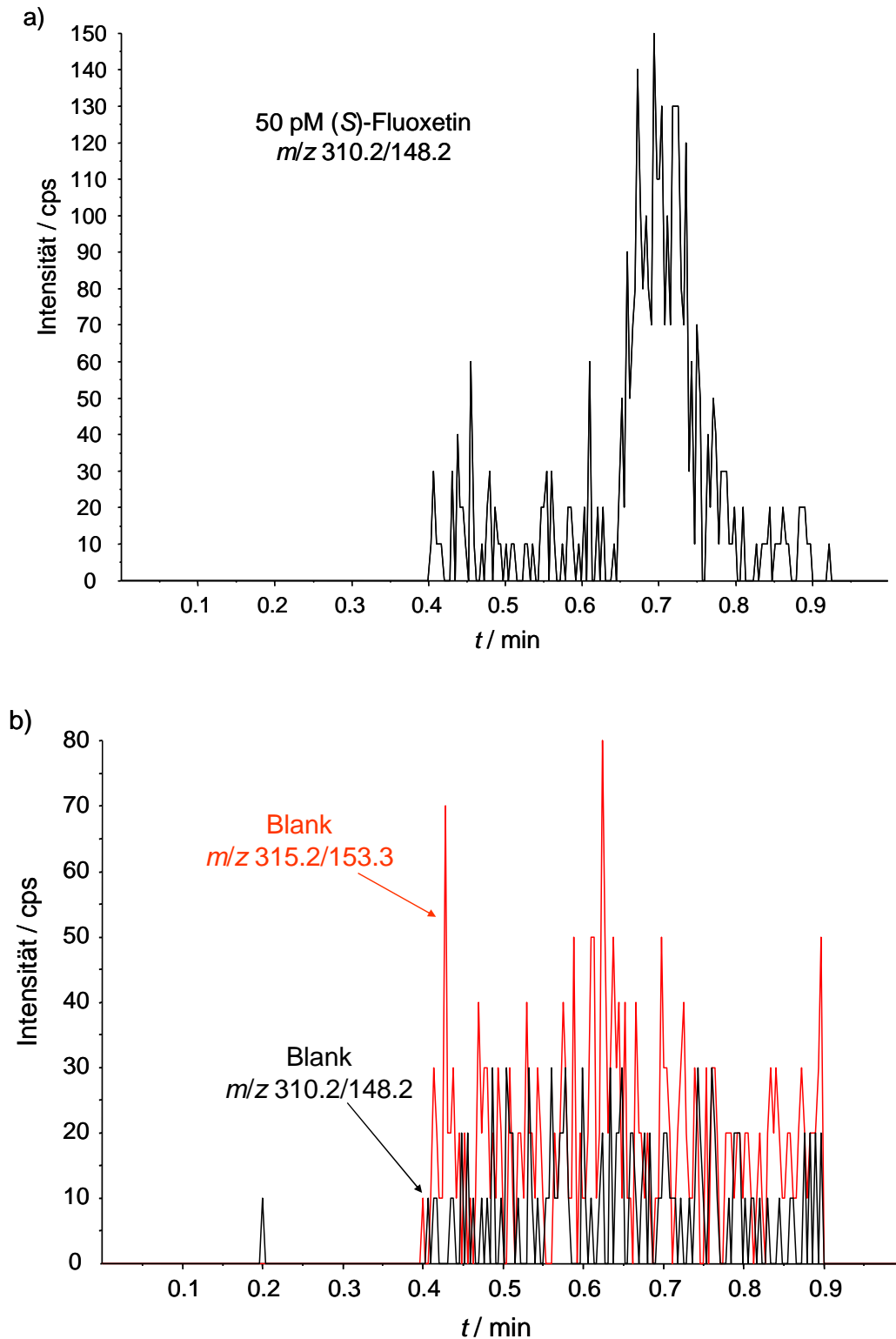


Abb. 45 SRM LC-ESI-MS/MS Chromatogramme von Matrixproben am API 5000 mit der Luna C18(2) (20 x 2 mm, 3 μ m, Phenomenex), mobiler Phase (Acetonitril / 5 mM Ammoniumbicarbonatpuffer pH 9.5 = 80 / 20), isokratischem Fluss (800 μ L/min) und einem Injektionsvolumen von 5 μ L von a) dem LLOQ 50 pM (S)-Fluoxetin [(S)-3] und b) einem Matrixblank.

Die Ergebnisse aus den Validierungsserien sind in Tab. 17 angegeben. Es wird daraus ersichtlich, dass das LLOQ von 50 pM (S)-Fluoxetin [(S)-3] die Validierungskriterien bezüglich der Richtigkeit mit Werten zwischen 95 % und 115 % und bezüglich der Präzision mit relativen Standardabweichungen von unter 10 % erfüllt. Ebenso liegen die weiteren Kalibrierstandards mit Werten zwischen 85 % und 115 % für die Richtigkeit und ≤ 5 % für die Präzision im geforderten Bereich. Auch die für die QCs ermittelten Werte entsprechen mit Ergebnissen für die *Intra-Series* Richtigkeit zwischen 90 % und 115 % und einer *Intra-Series* Präzision von jeweils unter 10 % den Anforderungen der *FDA Guidance*. Die geforderten Kriterien werden mit Werten zwischen 100 % und 110 % auch bezüglich der *Inter-Series* Richtigkeit und mit weniger als 10 % RSD ebenfalls bezüglich der *Inter-Series* Präzision erfüllt.

Zusätzlich zu den bereits genannten Validierungsparametern wurden in den Untersuchungen auch Selektivität und Spezifität der entwickelten LC-MS/MS Methode untersucht. Dazu wurde jede Validierungsserie durch Matrixblanks ergänzt. Ein entsprechendes Chromatogramm eines solchen Matrixblanks ist in Abb. 45b dargestellt. Es bestätigt die Selektivität und die Spezifität der Methode, da es sowohl für (S)-Fluoxetin [(S)-3] (m/z 310.2 \rightarrow 148.2) als auch für [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (*rac-7*) (m/z 315.2 \rightarrow 153.3) nur eine Basislinie liefert und somit den Beweis erbringt, dass durch die Methode keine störenden Komponenten aus der Matrix detektiert werden.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse der Validierung der neu entwickelten LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] bewiesen, dass die Methode zu validen Ergebnissen hinsichtlich Linearität, Richtigkeit und Präzision führt und somit für ihren Einsatzzweck zur Markerquantifizierung in Bindungsstudien geeignet ist.

Tab. 17 Validierung der LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] mit der Luna C18(2) (20 x 2 mm, 3 µm, Phenomenex) am API 5000.

Probe (n) ^a	Intra-Series															Inter-Series		
	Serie 1 ^b			Serie 2 ^b			Serie 3 ^b			Serie 4 ^b			Serie 5 ^b			M	R	P
	M	R	P	M	R	P	M	R	P	M	R	P	M	R	P			
50 pM Kal (6)	49.2	98.6	5.6	48.7	97.4	9.3	57.2	114.3	0.7	49.0	98.0	4.5	51.1	102.4	6.9			
75 pM Kal (3)	65.1	86.8	1.6	76.9	103.0	1.9	85.3	113.7	1.0	68.0	90.6	2.6	69.8	93.1	4.6			
150 pM Kal (3)	142.0	94.7	2.0	140.7	93.8	0.6	169.3	112.7	2.2	132.0	88.0	3.5	134.0	89.5	2.7			
300 pM Kal (3)	321.3	107.3	1.4	262.3	87.4	2.0	336.3	112.3	2.2	310.0	103.3	1.1	310.3	103.3	1.5			
750 pM Kal (3)	666.7	88.9	1.8	779.3	103.7	1.5	702.3	93.7	0.2	814.0	108.7	0.5	772.0	102.9	4.3			
1500 pM Kal (3)	1623.3	108.3	1.4	1436.7	95.6	1.6	1390.0	92.6	1.1	1416.7	94.3	1.7	1470.0	97.9	3.3			
2500 pM Kal (3)	2493.3	99.7	2.3	2823.3	113.0	0.0	2600.0	103.7	3.4	2563.3	102.3	2.0	2553.3	101.9	2.1			
3000 pM Kal (3)	2960.0	98.6	2.0	2756.7	91.9	1.3	2983.3	99.4	2.9	2973.3	99.1	1.9	2963.3	98.9	0.9			
100 pM QC (6)	103.0	103.0	5.0	111.0	111.0	3.3	111.3	111.3	2.2	97.6	97.6	5.0	97.7	97.7	7.2	104.1	104.1	7.4
1000 pM QC (6)	1126.7	112.7	1.1	1101.7	110.2	1.8	1070.0	107.0	3.0	1096.7	109.7	1.9	1101.7	110.2	3.6	1099.3	109.9	2.8
2000 pM QC (6)	1608.2	94.5	0.3	2000.0	100.0	2.4	2091.7	104.6	3.2	2065.0	103.4	3.3	2225.0	111.5	1.9	1998.0	102.8	6.0

M Mittelwerte (in pM), R Richtigkeit (in %), P Präzision (in %), Kal Kalibrierstandard, QC quality control

^an entspricht Anzahl der jeweils hergestellten und gemessenen Proben, ^bresultierende Kalibrierfunktionen: Serie 1 $y = 0.925x + 0.0417$ ($r = 0.9986$), Serie 2 $y = 0.918x + 0.0177$ ($r = 0.9918$), Serie 3 $y = 0.731x - 0.0148$ ($r = 0.9982$), Serie 4 $y = 0.894x + 0.0729$ ($r = 0.9989$), Serie 5 $y = 0.767x + 0.103$ ($r = 0.9995$)

3.2.6.5 Übertragung der LC-MS/MS Quantifizierungsmethode für Fluoxetin auf andere RP18 Säulen

Um zu demonstrieren, dass die entwickelte LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin sehr vielseitig und robust ist, sollte sie unter Einsatz anderer stationärer RP18 Phasen unterschiedlicher Länge überprüft werden. Für diese Versuchsreihen wurde wie zuvor eine Luna C18(2) Säule von Phenomenex verwendet, die aber statt 20 mm nur 10 mm lang war. Zudem wurde eine als Purospher STAR RP18 bezeichnete Säule der Firma Merck mit einer Länge von 30 mm ausgewählt. Die Durchführung der Versuche erfolgte ausschließlich am API 5000 LC-MS/MS System, wobei außer der jeweils verwendeten Säule alle anderen Methoden-Parameter (siehe 3.2.6.3) beibehalten wurden.

Einsatz der Luna C18(2) Säule mit einer Länge von 10 mm

Unter Verwendung der Luna C18(2) Säule (10 x 2 mm, 3 µm, Phenomenex) wurde in der Chromatographie eine Retentionszeit von 0.23 min (14 s) für den Analyten (S)-Fluoxetin [(S)-3] und den internen Standard [²H₅]Fluoxetin (**rac-7**) erzielt ($k = 3.7$; Berechnung der Totzeit gemäß $t_0 = 0.7^2 \pi L / f_v$, nach Unger et al.¹⁰⁵, Totvolumen des HPLC-Systems durch Fließinjektion bestimmt). Im Vergleich zur Chromatographie auf der 20 mm langen Luna C18(2) Säule, stellt dies zwar eine geringere Retentionzeit dar, unter Berücksichtigung der auf 10 mm halbierten Säulenlänge, muss aber festgehalten werden, dass es sich trotz der äußerst kurzen Säule um ein gutes chromatographisches Retentionsverhalten handelt. Ein erhaltenes Chromatogramm eines 2 nM (S)-Fluoxetin [(S)-3] und 2 nM [²H₅]Fluoxetin (**rac-7**) Matrixstandards zeigt Abb. 46. Durch die verkürzte Retentionszeit von Analyt (S)-3 und internem Standard **rac-7** konnte die chromatographische Gesamtlaufzeit der Methode sogar von einer Minute (LC-MS/MS Standardmethode mit der 20 mm langen Luna C18(2) Säule) auf 0.7 min reduziert werden. Dabei war wiederum zur Schonung der Ionenquelle und des Massenspektrometers das Eluat nach der Säule durch eine Ventilschaltung zwischen 0 min und 0.1 min und zwischen 0.6 min und 0.7 min in den Lösungsmittelabfall und nur zwischen 0.1 min und 0.6 min auf die ESI-Quelle geleitet worden.

Auch in dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss der Matrix auf die Peakintensität der Proben untersucht. Dazu wurden wieder gemäß Matuszewski et al.¹⁰⁹ die Peakflächen eines 2 nM (S)-Fluoxetin-Lösungsmittelstandards und eines 2 nM Matrixstandards verglichen (siehe Abb. 47). Aus den erhaltenen Ergebnissen berechnete sich ein Matrixeffekt von etwa 30 %. Dies stellt eine sehr starke Signalsuppression dar. Da die Signalintensität in den Lösungsmittelproben mit der 10 mm langen Säule gleichwohl sehr hoch war, ließ sich (S)-Fluoxetin [(S)-3] trotz der Suppression in den Matrixstandards bis zu einem LLOQ von 50 pM quantifizieren (siehe Tab. 18).

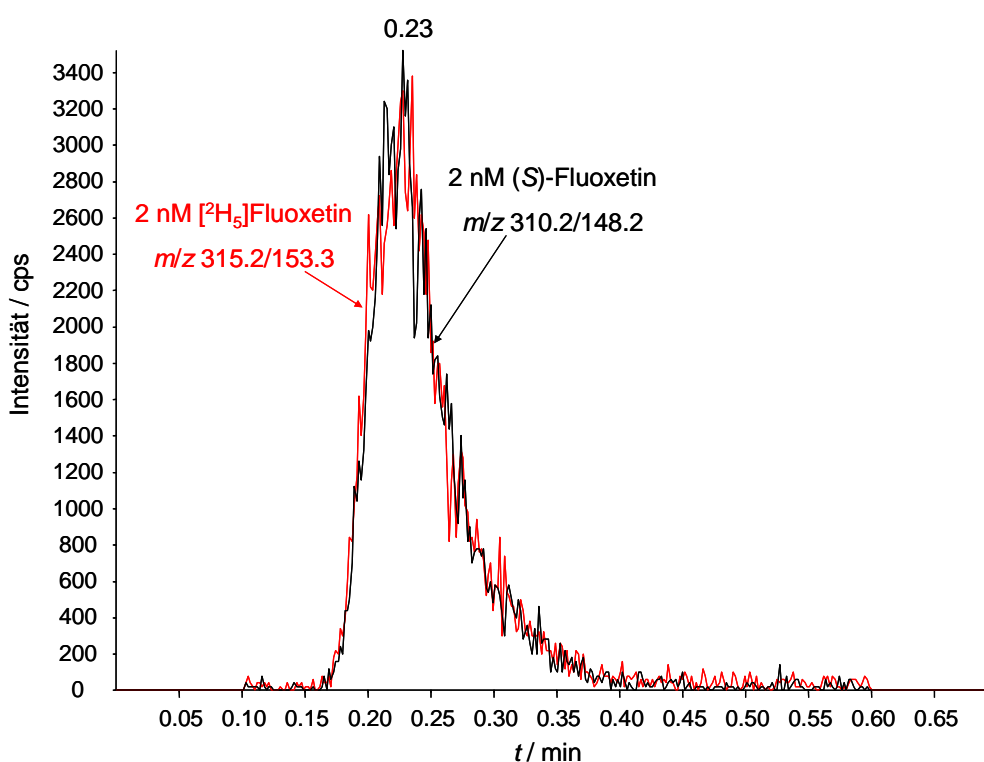


Abb. 46 SRM LC-ESI-MS/MS Chromatogramm eines Matrixstandards mit 2 nM (S)-Fluoxetin [(S)-3] und 2 nM [²H₅]Fluoxetin (*rac-7*) am API 5000; Säule: Luna C18(2) (10 x 2 mm, 3 μm, Phenomenex); mobile Phase: Acetonitril / 5 mM Ammoniumbicarbonatpuffer pH 9.5 = 80 / 20; isokratischer Fluss: 800 μL/min; Injektionsvolumen: 5 μL.

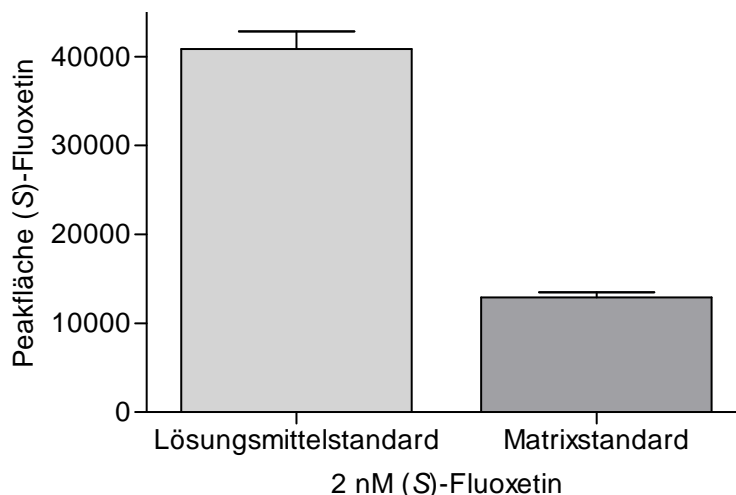


Abb. 47 Darstellung der erhaltenen Peakflächen (Mittelwerte \pm SD, $n \geq 3$) eines 2 nM (S)-Fluoxetin-Lösungsmittelstandards und eines 2 nM Matrixstandards nach LC-ESI-MS/MS Analyse am API 5000 mit der Luna C18(2) Säule (10 x 2 mm, 3 μ m, Phenomenex).

Um auch für die Verwendung dieser Säule die Validität der Methode zu beweisen, wurde eine Validierungsserie wie unter 3.2.6.4 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde sowohl die Linearität im Konzentrationsbereich von (S)-Fluoxetin [(S)-3] zwischen 50 pM und 3 nM als auch die Richtigkeit und Präzision der Methode untersucht. Es erfolgte allerdings keine vollständige Validierung, wie für die Standardmethode mit der Luna C18(2) Säule mit 20 mm Länge (siehe 3.2.6.4), welche aus einer Validierungsreihe aus fünf Validierungsserien bestand. Stattdessen wurde nur eine einzige Validierungsserie erstellt (siehe Tab. 18). Somit konnte zwar keine *Inter-Series* Richtigkeit beziehungsweise *Inter-Series* Präzision, sondern nur die entsprechenden *Intra-Series* Werte ermittelt werden, allerdings sollte dies ausreichend sein, um sowohl die Robustheit als auch die Vielseitigkeit der entwickelten Methode zu belegen.

Tab. 18 Validierung der LC-ESI-MS/MS Methode zur Quantifizierung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] mit der Luna C18(2) Säule (10 x 2 mm, 3 µm, Phenomenex) am API 5000.

Probe (n) ^a	M	R	P
50 pM Kal (6)	51.1	102.3	8.1
75 pM Kal (3)	66.2	88.3	2.3
150 pM Kal (3)	164.3	109.3	3.5
300 pM Kal (3)	291.7	97.3	5.8
750 pM Kal (3)	821.0	109.3	4.5
1500 pM Kal (3)	1513.3	101.2	2.7
2500 pM Kal (3)	2573.3	102.8	7.6
3000 pM Kal (3)	2603.3	86.8	0.6
100 pM QC (6)	107.7	107.7	8.3
1000 pM QC (6)	995.5	99.6	6.0
2000 pM QC (6)	2248.3	112.5	2.2

M Mittelwerte (in pM), *R* Richtigkeit (in %), *P* Präzision (in %), *Kal*/Kalibrierstandard, *QC* quality control
^a*n* entspricht Anzahl der jeweils hergestellten und gemessenen Proben; resultierende Kalibrierfunktion: $y = 0.863x + 0.01$ ($r = 0.9924$)

Die nach Auftragung des Peakflächenverhältnisses (*y*) von (S)-Fluoxetin [(S)-3] zum internen Standard [²H₅]Fluoxetin (*rac-7*) gegen das Konzentrationsverhältnis (*x*) von (S)-Fluoxetin [(S)-3] zu internem Standard *rac-7* erhaltene Kalibriergerade von $y = 0.863x + 0.01$ (Gewichtungsfaktor $1/x^2$) mit einem linearen Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9924$ bestätigt die Linearität der Methode im Konzentrationsbereich zwischen 50 pM und 3 nM (S)-Fluoxetin [(S)-3]. Für das LLOQ von 50 pM wurde dabei ein Ergebnis für die Richtigkeit von 102.3 % mit einer Präzision von 8.1 % (RSD) erzielt. Die weiteren Kalibrierstandards wiesen Werte für die Richtigkeit zwischen 85 % und 110 % und Werte für die Präzision ≤ 10 % auf. Schließlich bestätigten auch alle QCs (100 pM, 1 nM, 2 nM) mit einer Richtigkeit zwischen 85 % und 115 % bei relativen Standardabweichungen von unter 10 % die

Validität der entwickelten Quantifizierungsmethode für (S)-Fluoxetin [(S)-3] auch für das veränderte System mit der kürzeren Luna C18(2) Säule.

Einsatz der Purospher STAR RP18 Säule mit einer Länge von 30 mm

Mit der Purospher STAR RP18 Säule mit einer Länge von 30 mm (30 x 2 mm, 3 μ m, Merck) wurden die Versuche analog zu den für die 10 mm lange Luna C18(2) Säule beschriebenen, durchgeführt. Mit einer Retentionszeit sowohl des Analyten (S)-3 als auch des internen Standards *rac-7* von 0.25 min (15 s) ($k = 0.79$; Berechnung der Totzeit gemäß $t_0 = 0.7r^2\pi L/f_v$ nach Unger et al.¹⁰⁵, Totvolumen des HPLC-Systems durch Fließinjektion bestimmt) wurde unter Verwendung dieser längeren Säule ein überraschend kurzes Retentionsverhalten beobachtet (siehe Abb. 48).

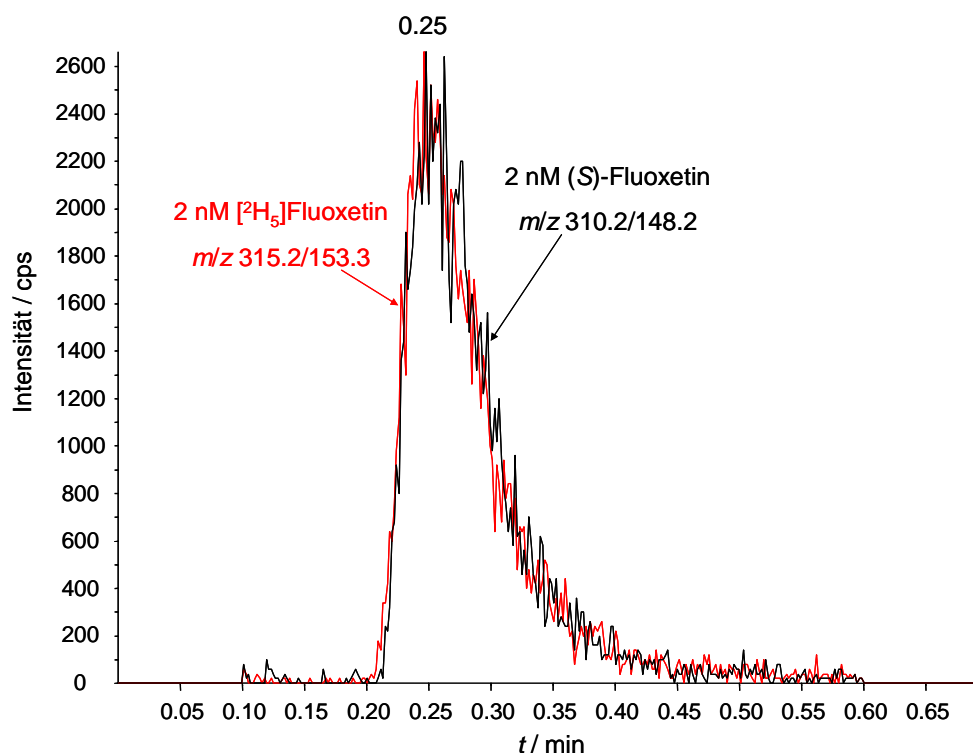


Abb. 48 SRM LC-ESI-MS/MS Chromatogramm einer Matrixstandards mit 2 nM (S)-Fluoxetin [(S)-3] und 2 nM [²H₅]Fluoxetin (*rac-7*) am API 5000; Säule: Purospher STAR RP18 (30 x 2 mm, 3 μ m, Merck); mobile Phase: Acetonitril / 5 mM Ammoniumbicarbonatpuffer pH 9.5 = 80 / 20; isokratischer Fluss: 800 μ L/min; Injektionsvolumen: 5 μ L.

Auch in dieser Versuchsreihe wurden wieder sowohl 2 nM (S)-Fluoxetin [(S)-3] Lösungsmittelstandards als auch 2 nM Matrixstandards zur Bestimmung des Matrixeffektes untersucht (siehe Abb. 49). Aus den Ergebnissen ließ sich ein Matrixeffekt von etwa 30 % ermitteln.¹⁰⁹

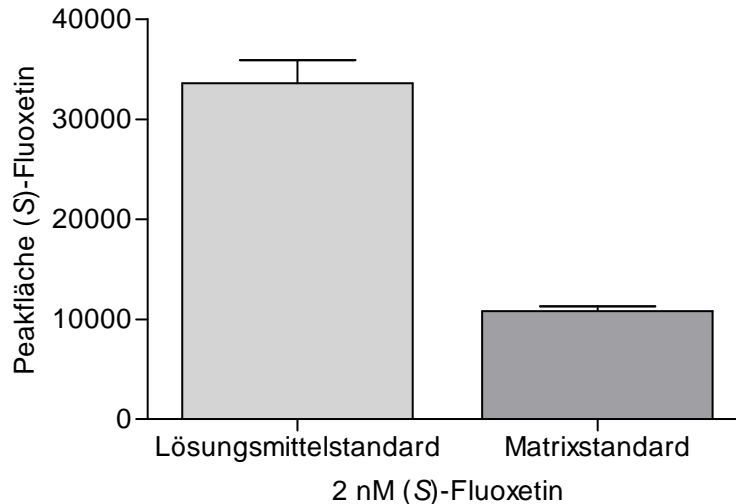


Abb. 49 Darstellung der erhaltenen Peakflächen (Mittelwerte \pm SD, $n = 6$) eines 2 nM (S)-Fluoxetin-Lösungsmittelstandards und eines 2 nM Matrixstandards nach LC-ESI-MS/MS Analyse am API 5000 mit der Purospher STAR RP18 Säule (30 x 2 mm, 3 μ m, Merck).

Trotz der zu beobachtenden starken Signalsuppression lieferte eine durchgeführte Validierungsserie auch mit dieser Säule mit einem für (S)-Fluoxetin [(S)-3] deutlich veränderten Retentionsverhalten sehr gute Ergebnisse bezüglich Linearität, Richtigkeit und Präzision (siehe Tab. 19).

Wie Tab. 19 zu entnehmen ist, liegen die ermittelten Werte für die Richtigkeit und die Präzision der Methode sowohl für das LLOQ von 50 pM als auch für alle anderen Kalibrierstandards und ebenso für die drei QCs im von der FDA geforderten Bereich zwischen 85 % und 115 % mit einer relativen Standardabweichung von weniger als 10 %. Im Konzentrationsbereich zwischen 50 pM und 3 nM (S)-Fluoxetin [(S)-3] konnte zudem die Linearität durch eine Kalibriergerade von $y = 0.841x + 0.0192$ (Gewichtungsfaktor $1/x^2$) mit einem linearen Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9934$ bewiesen werden.

Zusammengefasst belegen die Ergebnisse der verkürzten Validierung der auf die RP18 Säulen mit 10 mm beziehungsweise 30 mm Länge übertragenen LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] deren Vielseitigkeit und Robustheit. So ließen sich selbst bei stark verändertem Retentionsverhalten von (S)-Fluoxetin [(S)-3] auf den untersuchten Säulen noch valide Daten für die Quantifizierung des Analyten (S)-3 erzielen.

Tab. 19 Validierung der LC-ESI-MS/MS Methode zur Quantifizierung von (S)-Fluoxetin [(S)-**3**] mit der Purospher STAR RP18 Säule (30 x 2 mm, 3 µm, Merck) am API 5000.

Probe (n) ^a	M	R	P
50 pM Kal (6)	50.4	100.7	6.1
75 pM Kal (3)	68.9	91.9	0.3
150 pM Kal (3)	167.3	111.7	1.4
300 pM Kal (3)	291.3	97.0	9.8
750 pM Kal (3)	824.0	110.0	4.0
1500 pM Kal (3)	1506.7	100.5	2.3
2500 pM Kal (3)	2500.0	100.0	6.1
3000 pM Kal (3)	2626.7	87.5	1.4
100 pM QC (6)	109.5	109.5	3.4
1000 pM QC (6)	984.2	98.4	3.6
2000 pM QC (6)	2276.7	114.0	0.8

M Mittelwerte (in pM), *R* Richtigkeit (in %), *P* Präzision (in %), *Kal* Kalibrierstandard, *QC* quality control

^an entspricht Anzahl der jeweils hergestellten und gemessenen Proben; resultierende Kalibrierfunktion: $y = 0.841x + 0.0192$ ($r = 0.9934$)

3.2.7 Zusammenfassung der analytischen Ergebnisse

Für die Entwicklung eines MS-Bindungsassays für den Serotonin-Transporter galt es in diesem Teil meiner Arbeit einen geeigneten Marker auszuwählen und für diesen eine LC-MS/MS Methode zu entwickeln, welche eine Quantifizierung mindestens bis zu niedrigen picomolaren Konzentrationen ermöglicht. Als potentielle Marker wurden die beiden SSRIs Paroxetin (**6**) und Fluoxetin (*rac*-**3**) ausgewählt und für beide Verbindungen mit einer Methodenentwicklung begonnen.

Die LC-MS/MS Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Paroxetin (**6**) führte mit einer 50 mm langen RP8 Säule und einer Retentionszeit des Analyten von 1.2 min

zu vielversprechenden Ergebnissen bezüglich des Probendurchsatzes. Ein LLOQ von 500 pM für Matrixproben am Massenspektrometer API 3200 ließ erwarten, dass sich die Empfindlichkeit mit dem leistungsstärkeren Massenspektrometer API 5000 noch um etwa Faktor 20 steigern ließe. Allerdings zeigten sich bei der Quantifizierung der Verbindung aus Matrixproben starke Schwankungen durch Matrixeffekte, weshalb eine erfolgreiche Quantifizierung nur mittels internem Standard möglich zu sein schien. Als interner Standard schien deuteriertes Paroxetin am besten geeignet zu sein. Jedoch hätte die Verbindung synthetisiert werden müssen, da sie kommerziell nicht verfügbar ist.

Im weiteren Verlauf meiner Untersuchungen wandte ich mich deshalb einer LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin zu. Eine solche neu entwickelte Methode mit kommerziell verfügbarem [²H₅]Fluoxetin (**rac-7**) als internem Standard führte dabei in jeder Hinsicht zu hervorragenden Ergebnissen: Mit einer nur 20 mm langen RP18 Säule wurde eine chromatographische Laufzeit von nur einer Minute erzielt, was einen sehr hohen Probendurchsatz in den geplanten MS-Bindungsassays ermöglicht. Die Durchführung der LC-MS/MS Methode unter Verwendung des Massenspektrometers API 5000 erlaubte zudem eine Quantifizierung bis zu einem LLOQ von 50 pM in Matrixproben, was für die anvisierten Untersuchungen ausreichend sein sollte. Die Eignung der Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin in MS-Bindungsstudien konnte schließlich durch eine Validierung gemäß der Richtlinien der *FDA Guidance* zur Validierung bioanalytischer Methoden⁸⁰ belegt werden (die Untersuchungen zur Validierung erfolgten dabei ausschließlich unter Einsatz des (S)-Enantiomers (**S-3**). Vergleicht man diese neue Methode am leistungsfähigen Massenspektrometer API 5000 mit der bisher empfindlichsten in der Literatur publizierten LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin in biologischen Matrices¹¹¹, so sind die Vorteile der von mir entwickelten Methode unverkennbar: Zum einen ist das LLOQ der neuen Methode mit 50 pM um Faktor 20 niedriger als das von Li et al.¹¹¹ beschriebene. Dabei sollte man allerdings berücksichtigen, dass die Gruppe um Li mit Plasmaproben und somit mit einer anderen, möglicherweise komplexeren Matrix arbeitete. Weiterhin benötigt meine Methode im Gegensatz zur Methode von Li keinen zusätzlichen Probenaufarbeitungsschritt, was eine deutliche Zeitersparnis darstellt. Schließlich ist die neue Methode auch durch eine enorm schnelle Chromatographie

gekennzeichnet, was sich in einer Retentionszeit für Fluoxetin von 43 s im Vergleich zu 3.2 min, welche in der literaturbekannten Methode beschrieben ist, ausdrückt. Zusammengefasst übertrifft folglich die in meiner Arbeit entwickelte Quantifizierungsmethode bezüglich Sensitivität und Geschwindigkeit alle bisher publizierten LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung von Fluoxetin in biologischen Matrices deutlich.

Abschließend wurden die Vielseitigkeit und die Robustheit dieser neuen, leistungsfähigen Fluoxetin-Quantifizierungsmethode durch ihre Übertragung auf zwei andere RP18 Säulen unterschiedlicher Länge demonstriert. Auch hier konnten in einer Untersuchungsreihe die von der *FDA* geforderten Kriterien hinsichtlich Linearität, Richtigkeit und Präzision erfüllt werden.

Mittels der validierten LC-MS/MS Quantifizierungsmethode für Fluoxetin war somit die Grundlage für die Durchführung von MS-Bindungsstudien am SERT mit Fluoxetin als Marker geschaffen.

3.3 Entwicklung von MS-Bindungsassays für hSERT mit (*S*)- und (*R*)-Fluoxetin als nativen Markern

3.3.1 Hintergrund

Wie in der Zielsetzung dargestellt, sollten in meiner Dissertation MS-Bindungsstudien für den Serotonin-Transporter entwickelt werden. Nachdem im Verlauf der Arbeit zunächst eine stabil hSERT exprimierende HEK-293 Zelllinie etabliert und auch eine schnelle und sensitive LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin entwickelt werden konnte, wurde schließlich mit der Durchführung der Bindungsassays, in welchen Fluoxetin als gebundener Marker massenspektrometrisch quantifiziert werden sollte, begonnen. Wie bereits unter 3.2.3 dargestellt, sind nur wenige Radioligandbindungsstudien mit [³H]Fluoxetin in der Literatur beschrieben.^{41,99,121} Vermutlich geht dies auf die von Wong et al.⁴¹ berichtete Instabilität radioaktivmarkierten Fluoxetins zurück. In den literaturbekannten Untersuchungen wurden bislang nur Sättigungs- und kompetitive Experimente mit [³H]Fluoxetin als Marker durchgeführt. MS-Bindungsstudien an hSERT mit Fluoxetin als nativem, das heißt nicht-gelabeltem Marker sollten nun erstmals die Möglichkeit eröffnen, dessen Bindung sowohl in Sättigungs- und kompetitiven als auch in kinetischen Untersuchungen direkt zu charakterisieren.

Wie bereits beschrieben (siehe 3.2.3) ist Fluoxetin eine racemische Verbindung (siehe Abb. 50). Im Allgemeinen sind Bindungsstudien jedoch aussagekräftiger, wenn sie mit einer enantiomerenreinen Verbindung durchgeführt werden. Wie schon unter 3.2.6.3 erwähnt, ist das (*S*)-Enantiomer (**S**-3) in der Literatur bezüglich der Bindung an SERT als das affinere Enantiomer beschrieben^{76,118}, weshalb die Untersuchungen in meiner Arbeit mit diesem begonnen werden sollten. Nach der Etablierung von Sättigungs-, kinetischen und kompetitiven Experimenten mit (*S*)-Fluoxetin [(**S**-3)] als nativem Marker, war geplant, in gleicher Weise auch das (*R*)-Enantiomer (**R**-3) bezüglich seiner Bindung an den Transporter zu untersuchen. Möglicherweise könnten so Unterschiede in den Bindemodi beider Enantiomere aufgedeckt werden.

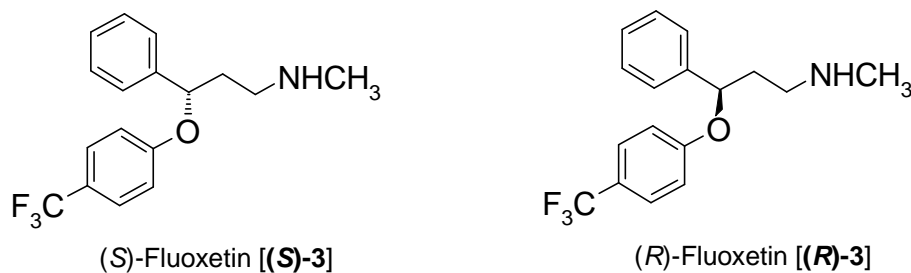


Abb. 50 Als native Marker für MS-Bindungsstudien an hSERT ausgewählte Verbindungen

3.3.2 Grundprinzipien von Target-Ligand-Interaktionen

Im Folgenden werden zunächst die theoretischen Grundlagen von Target-Ligand-Interaktionen erläutert.^{60,122,123} Die Bindung eines Liganden (A) an eine Bindungsstelle an einem Target (R) kann wie folgt beschrieben werden:



Bei dieser Annahme wird die Bindung des Liganden an die Bindestelle des Targets als reversible bimolekulare Reaktion mit der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} ($M^{-1} s^{-1}$) und der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} (s^{-1}) betrachtet. Nach dem Massenwirkungsgesetz ist der Gleichgewichtszustand erreicht, wenn die Bildungsrate des Target-Ligand-Komplexes (AR) seiner Zerfallsrate entspricht (2).

$$k_{+1}[A][R] = k_{-1}[AR] \quad (2)$$

Die Gleichgewichtskonstanten der Reaktion werden als Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d (3) beziehungsweise als davon reziproke Gleichgewichtsassoziationskonstante K_a (4) definiert.

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[A][R]}{[AR]} \quad (3)$$

$$K_a = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[AR]}{[A][R]} \quad (4)$$

K_d - und K_a -Wert charakterisieren die Affinität eines Liganden (A) zum Target (R): Diese ist umso größer je kleiner der K_d - beziehungsweise je größer der K_a -Wert ist.

Der K_d -Wert ist identisch mit der freien Ligandkonzentration bei welcher die Targetbelegung halbmaximal ist. Dies wird deutlich, wenn man $[R]$ und $[AR]$ auf der rechten Seite von Gleichung (3) gleichsetzt:

$$\frac{[A][R]}{[AR]} = [A] = K_d \quad (5)$$

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Target-Ligand-Interaktionen ist, dass die Bindung eines Liganden an das Target sättigbar ist. Die Ursache dafür ist in dem Umstand zu finden, dass die Anzahl der Bindestellen im Targetmaterial beschränkt ist. Die maximale Anzahl der vorhandenen spezifischen Bindestellen wird als B_{\max} -Wert bezeichnet, für den – wie leicht nachzuvollziehen ist – folgende Beziehung gilt:

$$[AR] + [R] = B_{\max} \quad (6)$$

Der Belegungsgrad (p_{AR}) eines Targets durch einen Liganden ist als das Verhältnis von $[AR]$ zu B_{\max} definiert ($[AR]/B_{\max}$). Die Hill-Langmuir-Gleichung gibt den Belegungsgrad von p_{AR} als Funktion der freien Konzentration des Liganden A wieder. Zu ihr gelangt man, indem man $[R]$ gemäß der Beziehung in Gleichung (6) in Gleichung (3) einsetzt. Dies liefert nach Umformung Gleichung (7), aus der unter Verwendung von $p_{AR} = [AR]/B_{\max}$ schließlich die Hill-Langmuir-Gleichung (Gleichung (8)) resultiert.

$$[AR] = \frac{B_{\max} [A]}{[A] + K_d} \quad (7)$$

$$p_{AR} = \frac{[A]}{K_d + [A]} \quad (8)$$

Die Hill-Langmuir-Gleichung als mathematische Beschreibung des Verlaufs von Sättigungskurven bildet die Grundlage von Sättigungsexperimenten. So entspricht die freie Konzentration des Liganden A bei halbmaximaler Targetbelegung dem K_d -Wert. Letzterer kann in Bindungsexperimenten durch nichtlineare Regression über die Hill-Langmuir Gleichung berechnet werden. Aus einer in einem entsprechenden Bindungsexperiment erhaltenen Sättigungsisotherme kann zudem der B_{\max} -Wert ermittelt werden.

3.3.3 Experimenttypen in Bindungsstudien

Im Folgenden werden unterschiedliche Typen von Bindungsexperimenten vorgestellt, wobei jeweils die Durchführung und Auswertung derartiger Untersuchungen näher erläutert wird.¹²⁴ Zunächst sei darauf hingewiesen, dass nachfolgend als Synonym für Reporterligand der Begriff Marker (M) verwendet wird.

Man unterscheidet in Bindungsstudien drei Grundtypen von Experimenten: Zu diesen gehören neben Sättigungs- und kompetitiven Experimenten, welche stets unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt werden, auch kinetische Studien, die in Assoziations- und Dissoziationsexperimente unterteilt werden. In Sättigungsexperimenten ist es möglich, die Affinität (K_d) des Markers zum Target und die maximale Anzahl der Bindestellen (B_{max}) zu bestimmen. In kompetitiven Assays kann indirekt die Affinität eines Kompetitors (K_i), welcher mit dem Marker um die gleiche Bindestelle am Target konkurriert, ermittelt werden. Kinetische Experimente erlauben schließlich den Zugang zu Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten für die Bildung beziehungsweise den Zerfall von Target-Marker-Komplexen. Allen drei Experimenttypen ist dabei gemein, dass nach einer bestimmten Inkubationszeit freier Marker von gebundenem Marker separiert wird. Dies kann durch Filtration – wie in MS-Bindungsstudien⁷⁹ – oder auch durch Zentrifugation erfolgen. Anschließend wird jeweils der an das Target gebundene Marker quantifiziert, wodurch seine Gesamtbindung (GB) erhalten wird. Da sich diese aus spezifischer (SB) und nichtspezifischer Bindung (NSB) – der Markerbindung an andere von der Targetbindestelle unabhängige Bindestellen – zusammensetzt ($GB = SB + NSB$), muss in einem zusätzlichen Experiment die nichtspezifische Bindung bestimmt und zum Erhalt der spezifischen Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert werden.

3.3.3.1 Sättigungsexperimente

Sättigungsexperimente dienen dazu, die maximale Anzahl von Bindestellen (B_{max}) und die Affinität des Markers zum Target (K_d) zu bestimmen. In diesem Experimenttyp wird eine konstante Targetmenge mit steigenden Markerkonzentrationen ($0.1K_d - 10K_d$) bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert. Nach der Trennung von freiem und gebundenem Marker wird der Anteil des

gebundenen Markers, also seine Gesamtbindung, quantifiziert. In parallel durchgeführten Experimenten wird die nichtspezifische Markerbindung (NSB) bestimmt. Dabei wird ebenfalls eine konstante Targetkonzentration mit steigenden Markerkonzentrationen, allerdings unter Zusatz eines Überschusses an Kompetitor, welcher mit dem Marker um die gleiche Bindestelle am Target konkurriert, bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert. Auch in diesen Experimenten erfolgt die Bestimmung des gebundenen Markers nach dessen Separation von freiem Marker.

Die nach Differenzbildung von Gesamt- und nichtspezifischer Bindung erhaltene spezifische Markerbindung wird anschließend gegen die jeweils eingesetzte Markerkonzentration aufgetragen. So erhält man eine Sättigungsisotherme (siehe Abb. 51) aus welcher durch nichtlineare Regression K_d und B_{max} ermittelt werden können. Der B_{max} -Wert stellt das Plateau der erhaltenen Isotherme dar und der K_d diejenige Markerkonzentration bei welcher 50 % der vorhandenen Bindestellen belegt sind (siehe Abb. 51). Typischerweise wird der B_{max} in solchen Experimenten in pM oder in pmol/mg Protein angegeben (im Assay eingesetztes Protein wird dabei meist nach Bradford⁹⁰ bestimmt).

Um für die Charakterisierung von Target-Ligand-Interaktionen die unter 3.3.2 beschriebenen Rechenmodelle anwenden zu können, muss die eingesetzte Targetkonzentration $[R_{tot}] \ll K_d$ ($[R_{tot}] \sim 0.1K_d$) sein. Nur dann ist die an das Target gebundene Menge des Markers vernachlässigbar klein und in die Berechnungen kann die Markernominalkonzentration (Markergesamtkonzentration $[M_{tot}]$) einfließen. Andernfalls würde eine starke Depletion des Markers ($> 10\%$ ^{60,125}) auftreten, was die Menge an freiem Marker vermindern und bei Einsatz der nominalen Markerkonzentration $[M_{tot}]$ für die Berechnungen der Bindungsparameter zu fehlerhaften Ergebnissen führen würde.¹²⁵

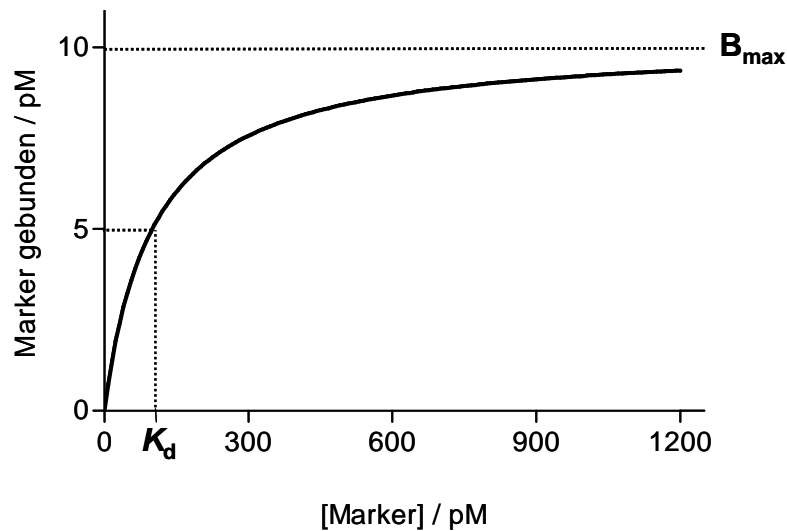


Abb. 51 Sättigungsisotherme der spezifischen Bindung eines Markers in einem Sättigungsexperiment ($B_{max} = 10$ pM, $K_d = 100$ pM).

3.3.3.2 Kinetische Experimente

In kinetischen Experimenten können sowohl die Inkubationszeit, welche zur Einstellung des Bindungsgleichgewichtes erforderlich ist, als auch die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (k_{+1} und k_{-1}) ermittelt werden. Der Quotient der Geschwindigkeitskonstanten bietet schließlich auch die Möglichkeit zur unabhängigen Berechnung des K_d -Wertes (siehe Gleichung (3)), welcher sonst nur in Sättigungsexperimenten zugänglich ist.

In Assoziationsexperimenten wird eine konstante Targetmenge mit einer konstanten Markerkonzentration inkubiert und das Experiment nach unterschiedlichen Zeitintervallen durch Separation des gebundenen von freiem Marker abgebrochen. Auch hier wird jeweils die Gesamt- und die nichtspezifische Bindung des Markers bestimmt. Eine Assoziationskurve wird schließlich erhalten, indem man die resultierende spezifische Markerbindung gegen die Zeit aufträgt (siehe Abb. 52).

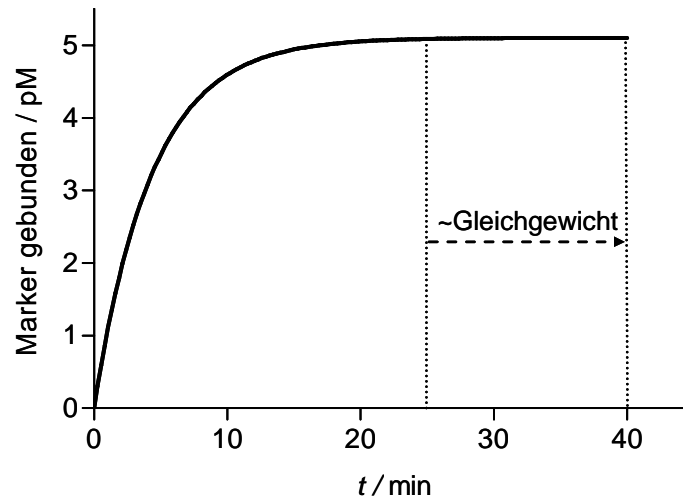


Abb. 52 Bindungskurve eines Assoziationsexperimentes. Gleichgewicht der Bindungsreaktion tritt hier nach etwa 25 min ein.

Im Dissoziationsexperiment wird zunächst eine konstante Targetmenge mit einer konstanten Markerkonzentration bis zur Gleichgewichtseinstellung vorinkubiert. Durch Zugabe eines Überschusses an Kompetitor wird anschließend die Dissoziation des Target-Marker-Komplexes initiiert und nach unterschiedlichen Zeitintervallen durch Separation des freien von dem an das Target gebundenen Marker abgebrochen. Nach Bestimmung von Gesamt- und nichtspezifischer Bindung des Markers wird die daraus ermittelte spezifische Bindung gegen die Zeit aufgetragen, wodurch man die entsprechende Dissoziationskurve erhält (siehe Abb. 53).

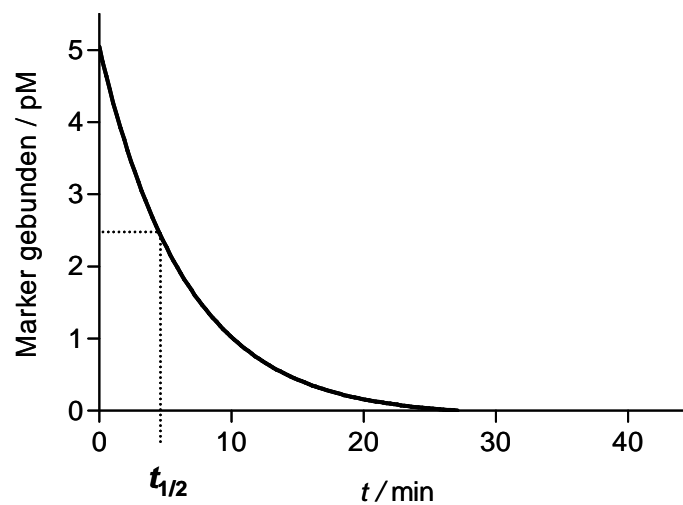


Abb. 53 Bindungskurve eines Dissoziationsexperimentes. Zeitintervall $t_{1/2}$ (Halbwertszeit) nach welchem die spezifische Markerbindung um 50 % reduziert ist, entspricht hier 4 min.

3.3.3.3 Kompetitive Experimente

In Konkurrenzexperimenten kann die Affinität (K_i) einer unbekanntes Verbindung zu einem Target ermittelt werden. Deshalb spielt diese Untersuchungsmethode eine große Rolle in Screeningprozessen auf der Suche nach neuen potenten Wirkstoffen. Konkurrenzexperimente werden durchgeführt, indem man eine konstante Targetmenge mit konstanter Markerkonzentration und variierenden Konzentrationen eines Kompetitors bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert. Konkurriert der Kompetitor mit dem Marker um die gleiche Bindestelle am Target, so verdrängt er mit steigenden Konzentrationen diesen aus seiner Bindung. Ist der Marker vollständig aus der Targetbindung verdrängt, so kann nur noch seine nichtspezifische Bindung gemessen werden.

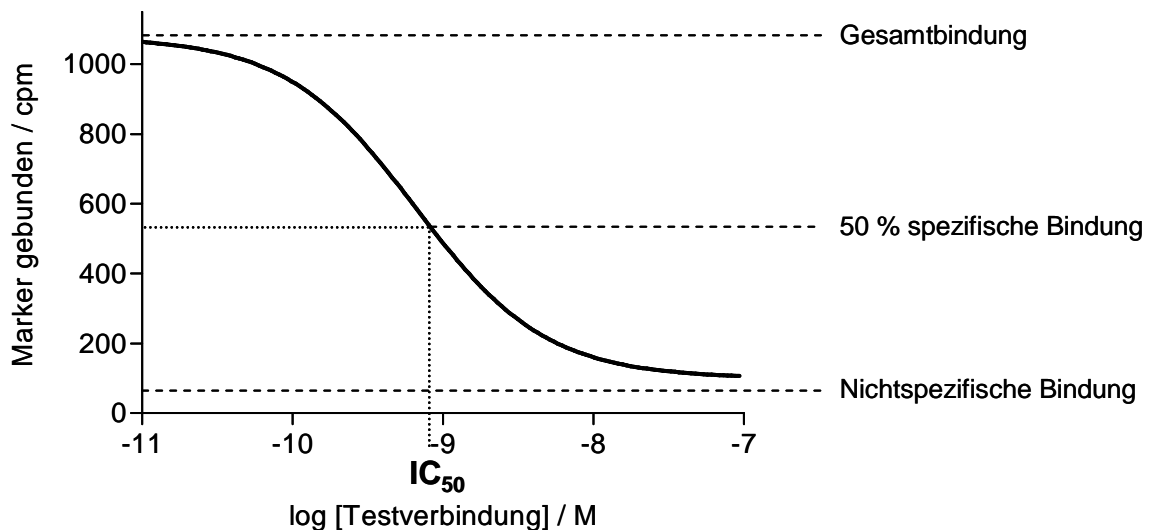


Abb. 54 Bindungskurve eines kompetitiven Experimentes mit IC_{50} -Wert.

Wie in den anderen Experimenten auch, wird nach Ablauf der Inkubationszeit, der freie vom gebundenen Marker getrennt und anschließend die Menge des gebundenen Markers bestimmt. Durch Auftragen der Markerbindung gegen den Logarithmus der nominalen Konkretorkonzentration ergibt sich ein Graph mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf aus welchem der IC_{50} -Wert – die Konzentration des Kompetitors, welche zu einer 50 %igen Reduktion der spezifischen Markerbindung führt – abgeleitet werden kann (siehe Abb. 54). Der IC_{50} -Wert macht allerdings nur eine Aussage über die inhibitorische Potenz der untersuchten Verbindung unter den im Versuch gegebenen Bedingungen und kann vom K_i -Wert mehr oder weniger stark

abweichen. Dieser kann jedoch, sind $[M_{\text{tot}}]$ und K_d bekannt, nach der Cheng-Prusoff-Gleichung¹²⁶ aus dem IC_{50} -Wert berechnet werden:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[M_{\text{tot}}]}{K_d}} \quad (9)$$

Im Allgemeinen wird die Markerkonzentration $[M_{\text{tot}}]$ in Konkurrenzexperimenten im Bereich des K_d -Wertes eingesetzt.¹²⁷ Zudem ist in diesen Experimenten ebenfalls darauf zu achten, dass eine Depletion des Markers vermieden wird, da nur dann anstelle der freien die Markernominalkonzentration $[M_{\text{tot}}]$ für Gleichung (9) verwendet werden darf. Entsprechend muss auch hier $[R_{\text{tot}}] \ll K_d$ ($[R_{\text{tot}}] \sim 0.1K_d$) gelten.

3.3.4 Etablierung von MS-Bindungsassays für hSERT

3.3.4.1 Etablierung von Sättigungsexperimenten mit (S)-Fluoxetin als Marker

Die Etablierung von MS-Bindungsassays für den Serotonin-Transporter mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] als nativem Marker wurde mit der Durchführung von Sättigungsexperimenten begonnen. Ziel dieser Untersuchungen war, sowohl den K_d - als auch den B_{max} -Wert für die Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an den Transporter zu bestimmen.

Die Versuchsbedingungen in den MS-Bindungsassays wurden entsprechend der zur Charakterisierung der stabil hSERT exprimierenden HEK-293 Zellen durchgeführten Radioligandbindungsstudien mit [³H]Paroxetin (5) (siehe 3.1.4.1) und entsprechend literaturbekannter Untersuchungen mit [³H]Fluoxetin¹²¹ gewählt:

Targetquelle:	Membranpräparationen stabil hSERT exprimierender HEK-293 Zellen
Inkubationspuffer:	50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4
Inkubationstemperatur:	22 °C
Inkubationszeit:	2 h

Die Durchführung der geplanten Studien sollte analog der von Zepperitz für MS-Bindungsstudien an mGAT1 etablierten Vorgehensweise erfolgen.⁷⁹ In Abb. 55 ist

diese schematisch wiedergegeben: Für die MS-Bindungsstudien sollten im ersten Schritt Target und Marker für eine definierte Zeit inkubiert werden. Anschließend sollte gebundener und freier Marker durch Filtration voneinander getrennt und der auf dem Filter verbleibende Target-Marker-Komplex zur Entfernung anhaftenden freien Markers gewaschen werden. Durch einen darauffolgenden Trocknungsschritt und die abschließende methanolische Elution sollte das Targetprotein dann denaturiert und der vormals gebundene Marker aus seiner Bindung freigesetzt und schließlich über LC-MS/MS quantifiziert werden.

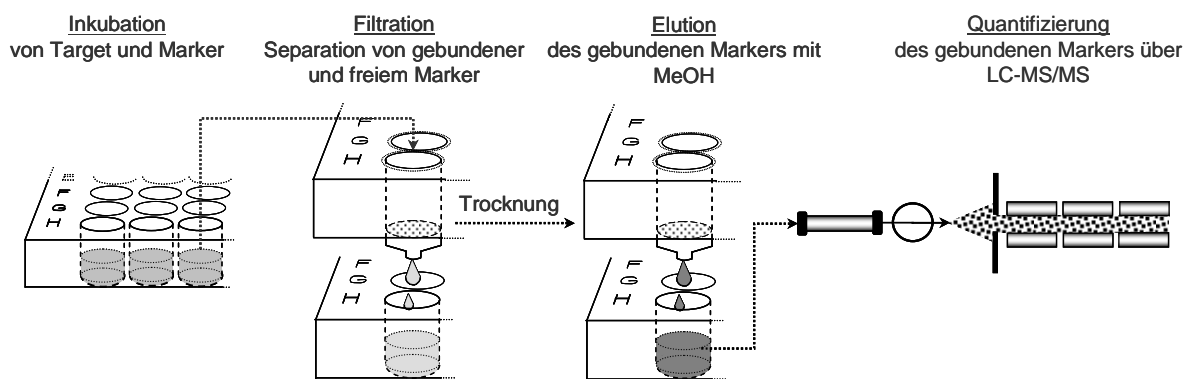


Abb. 55 Schematische Darstellung der Durchführung von MS-Bindungsstudien (Abbildung modifiziert nach Zepperitz⁷⁹).

Gemäß der beschriebenen Vorgehensweise wurde für die zu etablierenden Sättigungsexperimente am Serotonin-Transporter mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] als Marker eine konstante Targetmenge (HEK-hSERT Membranpräparation entsprechend etwa 5–10 µg Protein) mit steigenden Konzentrationen von (S)-Fluoxetin [(S)-3] in 96-Well Microtiterplatten inkubiert. Entsprechend dem für die Bindung von [³H]Fluoxetin publizierten K_d -Wert von 6.7 ± 2.1 nM⁹⁹ und dem mit dem Marker abzudeckenden Konzentrationsbereich (Nominalkonzentrationen) von $0.1K_d$ bis $10K_d$, wurden in den Sättigungsexperimenten Markerkonzentrationen zwischen 0.3 nM und 75 nM eingesetzt. Das Inkubationsvolumen betrug bei den Untersuchungen 250 µL. Nach der Inkubation wurde freier Marker von gebundenem Marker durch reihenweise Übertragung der Inkubationsansätze (je 200 µL) mit einer 12-Kanalpipette auf eine 96-Well Filterplatte (vorinkubiert mit 0.3 % PEI-Lösung) und anschließende Filtration mittels einer Vakuumstation getrennt. Auf den Filtern verbleibender Target-Marker-Komplex wurde 5x mit 150 µL eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen und die Filterplatte wurde danach für 60 min bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet. Die

Filter wurden darauf folgend auf Raumtemperatur abgekühlt und an das Target gebundener Marker wurde anschließend durch Elution mit 3x 100 µL methanolischer Lösung, welche 2.67 nM internen Standard [²H₅]Fluoxetin (**rac-7**) enthielt, extrahiert. Für diesen Schritt wurden mit einer 12-Kanalpipette je 100 µL der methanolischen Lösung auf die Filter gegeben. Letztere wurden dann sofort mit einem PS-Deckel bedeckt und es wurde zur vollständigen Denaturierung des Proteins – wie von Zepperitz etabliert – 30 s inkubiert. Anschließend wurde unter Vakuum in eine im unteren Teil der Vakuumstation stehende 1.2 mL 96-Deepwell Platte eluiert. Der Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Nach abschließender Zugabe von 100 µL Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5; Verhältnis Methanol zu Puffer entsprach folglich 3:1) lag in den Proben der interne Standard **rac-7** in einer Konzentration von 2 nM vor. Das anfänglich an hSERT gebundene (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] wurde schließlich über die entwickelte LC-MS/MS Methode quantifiziert.

Erste Versuche zeigten, dass bei Einsatz nominaler Assaykonzentrationen von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] ≤ 1 nM der Anteil an gebundenem Marker, welcher schließlich freigesetzt wurde und quantifiziert werden sollte, unter dem LLOQ der LC-MS/MS Methode von 50 pM lag und somit nicht quantifiziert werden konnte. Denkt man über mögliche Ursachen nach, so wird schnell klar, dass bei einem filtrierten Inkubationsvolumen von 200 µL und einem finalen Probenvolumen von 400 µL im Verlauf der Versuchsdurchführung eine Verdünnung der im Assay vorliegenden gebundenen Markerkonzentration um Faktor 2 erfolgt. Am Beispiel der niedrigsten im Assay eingesetzten (S)-Fluoxetin-Konzentration von 0.3 nM bedeutet dies, dass bei maximal 10 % gebundenem Markeranteil (unter den zur Vermeidung einer Depletion gewählten Bedingungen können es nicht mehr sein) eine maximale Konzentration von 30 pM an gebundenem (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] in der Bindungsprobe vorliegt. Erfolgt im Versuchsverlauf dann eine Verdünnung um den Faktor 2, so liegt aus der Bindung freigesetztes (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] in der zu quantifizierenden Probe in einer Konzentration von maximal 15 pM vor. Diese Konzentration liegt deutlich unter dem LLOQ von 50 pM der entwickelten LC-MS/MS Methode und kann somit nicht verlässlich quantifiziert werden.

Ich suchte folglich nach einer Lösung, die es erlaubt, in MS-Sättigungsexperimenten auch die niedrigsten gebundenen Markerkonzentrationen zu quantifizieren. In der

Durchführung von MS-Bindungsassays besteht eine Möglichkeit, die Konzentration an vormals gebundenem Marker in der finalen Probe zu erhöhen, darin, das Volumen der zu quantifizierenden Probe zu reduzieren. Wie beschrieben, betrug in den Versuchen das finale Probenvolumen 400 μL (nach Elution mit 3x 100 μL methanolischer Lösung und Zugabe von 100 μL Ammoniumbicarbonatpuffer). Ich beabsichtige zu untersuchen, ob dieses Volumen reduziert werden kann. Dabei sollten jedoch die von Zepperitz⁷⁹ optimierten Parameter bezüglich des Verhältnisses von Methanol zu Puffer von 3:1 und bezüglich der drei methanolischen Elutionsschritte beibehalten werden.

Optimierung der Versuchsdurchführung

Ob eine Reduktion des methanolischen Elutionsvolumens überhaupt möglich ist, wurde in einer Serie von Versuchen überprüft. Die Untersuchungen wurden mit Bindungsproben, welche (S)-Fluoxetin [(S)-3] in einer Konzentration von 5 nM und als Targetquelle HEK-hSERT Membranpräparation enthielten, durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie für das Sättigungsexperiment beschrieben, wobei nach dem Trocknen der Filter gebundenes (S)-Fluoxetin [(S)-3] entweder mit dem von Zepperitz⁷⁹ etablierten Standardvolumen von 3x 100 μL oder mit reduzierten Volumina (3x 50 μL , 3x 60 μL beziehungsweise 3x 70 μL) Methanol eluiert wurde. Anschließend wurde den Proben ein bestimmtes Volumen Ammoniumbicarbonatpuffer (50 μL , 60 μL , 70 μL beziehungsweise 100 μL) zugesetzt, so dass jeweils in der zu quantifizierenden Probe ein Verhältnis 3:1 von Methanol zu Puffer vorlag. Aus der Bindung freigesetztes (S)-Fluoxetin [(S)-3] wurde im Anschluss über LC-MS/MS quantifiziert.

Bereits bei der Versuchsdurchführung fiel auf, dass ein Volumen von 50 μL Methanol sofort vollständig vom Filtermaterial aufgenommen wurde. Dabei schien es, als würde das geringe Volumen die Filter jedoch nicht vollständig benetzen. Somit war anzunehmen, dass die Freisetzung von vormals gebundenem (S)-Fluoxetin [(S)-3] bei einer Elution mit 3x 50 μL Methanol ungleichmäßig erfolgen und es zu fehlerhaften Resultaten kommen würde. Bei einem Volumen von 60 μL schien der Filter eines Wells zwar vollständig benetzt zu sein, allerdings wurde auch hier die Flüssigkeit vollständig vom Filtermaterial aufgenommen. Da sich während des Elutionsprozesses sowohl nach Zugabe von 50 μL als auch nach Zugabe von 60 μL

Methanol kein Überstand auf dem Filter bildete, war es in beiden Fällen schwer zu erkennen, ob auf die Filter überhaupt schon Methanol aufgetragen wurde. Dies führte zu zeitlichen Verzögerungen im Versuchsablauf und machte die Durchführung unpraktikabel. Bei Elution mit 3x 70 µL beziehungsweise 3x 100 µL Methanol konnte bei jedem Elutionsschritt der gesamte Filter mit Methanol bedeckt werden und es bildete sich jeweils auch ein Überstand, welcher vom Filter nicht aufgesaugt wurde. Dadurch war immer sehr gut erkennbar, in welche Wells Methanol bereits hinzu pipettiert worden war, so dass die 96-Well Filterplatte auch schnell mit einem PS-Deckel zur Inkubation abgedeckt werden konnte. Durch den Überstand war auch während des anschließenden Filtrationsvorganges klar ersichtlich, wann die Flüssigkeit vollständig filtriert war. Bereits die Versuchsdurchführung zeigte also, dass eine Elution mit 3x 70 µL beziehungsweise 3x 100 µL Methanol im Vergleich zu den niedrigeren Volumina wesentlich praktikabler war.

Zur analytischen Auswertung der Versuchsreihe wurden die nach der Elution mit den vier genannten Volumina erhaltenen Peakflächen von aus der Bindung freigesetztem (S)-Fluoxetin [(S)-3] verglichen (siehe Abb. 56). Es wurde eine umso größere Peakfläche erwartet, je niedriger das Elutionsvolumen und je höher entsprechend die Analytkonzentration in der zu quantifizierenden Probe zu erwarten war. Folglich sollte in den durchgeführten Untersuchungen die größte Peakfläche bei einem Elutionsvolumen von 3x 50 µL auftreten. Vergleicht man in Abb. 56 die ermittelten Peakflächen für die Elution mit 3x 60 µL, 3x 70 µL und 3x 100 µL, so erkennt man, dass mit reduziertem Elutionsvolumen die Peakfläche des Analyten größer wird, dessen Konzentration in der Probe also erwartungsgemäß steigt. Die Elution mit 3x 50 µL und 3x 60 µL ergab jedoch bezüglich der ermittelten Peakflächen keinen nennenswerten Unterschied, was aufgrund der unterschiedlichen Volumina bei eigentlich gleicher Menge an in den Bindungsproben gebundenem (S)-Fluoxetin [(S)-3] unerwartet war. Dieses Ergebnis deutet somit darauf hin, dass ein Elutionsvolumen von 3x 50 µL für die Durchführung der MS-Bindungsassays nicht geeignet ist.

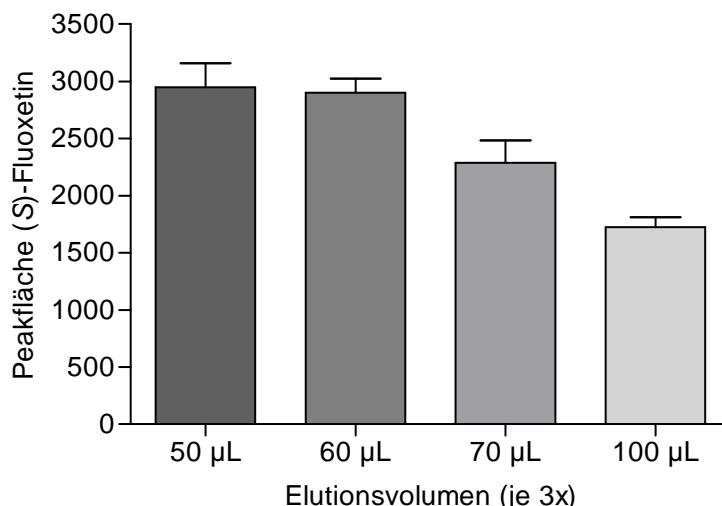


Abb. 56 Darstellung der nach Durchführung eines Bindungsexperimentes erhaltenen Peakflächen (Mittelwerte \pm SD, $n = 3-6$) von an hSERT gebundenem (S)-Fluoxetin [(S)-3] (die nominal im Bindungsassay eingesetzte (S)-Fluoxetin-Konzentration entsprach 5 nM) nach Elution des Markers mit 3x 50 μ L, 3x 60 μ L, 3x 70 μ L beziehungsweise 3x 100 μ L, anschließender Addition von 50 μ L, 60 μ L, 70 μ L beziehungsweise 100 μ L Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) und darauf folgender LC-MS/MS Quantifizierung.

Bedenkt man die Anforderungen an das Signal-Rausch-Verhältnis in der LC-MS/MS Quantifizierung (siehe 3.2.6.4), so kommt der Peakhöhe eine besondere Bedeutung zu. Die in der beschriebenen Versuchsreihe mit unterschiedlichen Elutionsvolumina in der Quantifizierung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] erhaltenen Peakhöhen sind in Abb. 57 dargestellt. In der Regel korrelieren in analytischen Untersuchungen Peakhöhe und Peakfläche eines Analyten; dies konnte auch in den von mir durchgeführten Versuchen beobachtet werden (vergleiche Abb. 56 und Abb. 57). Im Vergleich zur Standardelution mit 3x 100 μ L Methanol konnte die Peakhöhe in der Analyse von (S)-Fluoxetin [(S)-3] bei einer Elution mit 3x 70 μ L und 3x 60 μ L gesteigert werden. Eine Reduktion des Volumens in der zu quantifizierenden Probe führte also in Folge der erhöhten Konzentration auch zu einer gesteigerten Peakhöhe, was aufgrund des verbesserten Signal-Rausch-Verhältnisses für die Analytik günstiger ist. Auch hier zeigte sich jedoch bei der Auswertung der nach Elution mit 3x 50 μ L und 3x 60 μ L Methanol für (S)-Fluoxetin [(S)-3] erhaltenen Ergebnisse kein wesentlicher Unterschied bei den Peakhöhen. Dies bestätigt nochmals die Problematik, die bei der Elution mit so geringen Volumina, wie 50 μ L, besteht.

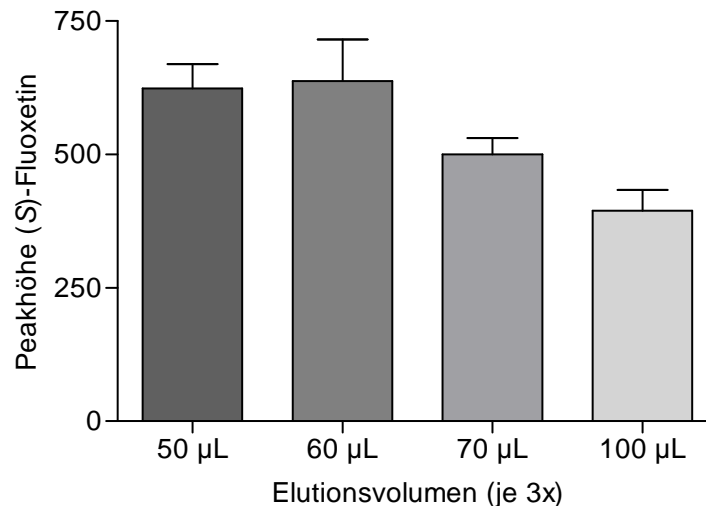


Abb. 57 Darstellung der nach Durchführung eines Bindungsexperimentes erhaltenen Peakhöhen (Mittelwerte \pm SD, $n = 3-6$) von an hSERT gebundenem (S)-Fluoxetin [(S)-3] (nominal im Bindungsassay eingesetzte (S)-Fluoxetin-Konzentration entsprach 5 nM) nach Elution des Markers mit 3x 50 μ L, 3x 60 μ L, 3x 70 μ L beziehungsweise 3x 100 μ L und anschließender Addition von 50 μ L, 60 μ L, 70 μ L beziehungsweise 100 μ L Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) und darauf folgender LC-MS/MS Quantifizierung.

Um abschließend beurteilen zu können, ob sich eines der reduzierten Elutionsvolumina tatsächlich anstelle der standardmäßig eingesetzten 3x 100 μ L Methanol für die Durchführung von MS-Bindungsassays eignet, wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob die freigesetzte Gesamtmenge vormals gebundenen Markers bei allen vier untersuchten Elutionsvolumina gleich ist. Dazu wurde wie im oben beschriebenen Experiment vorgegangen und wieder eine (S)-Fluoxetin-Konzentration von 5 nM mit HEK-hSERT Membranpräparation inkubiert. Nach Filtration, Waschen und Trocknen wurde gebundenes (S)-Fluoxetin [(S)-3] auch hier wieder mit 3x 50 μ L, 3x 60 μ L, 3x 70 μ L beziehungsweise dem Standardvolumen von 3x 100 μ L Methanol eluiert. Anschließend wurde zu den nach Elution mit 3x 50 μ L, 3x 60 μ L und 3x 70 μ L erhaltenen methanolischen Lösungen ein entsprechendes Volumen Methanol pipettiert, so dass in allen Proben ein methanolisches Gesamtvolumen von 300 μ L resultierte. Dieses entsprach dem von Zepperitz⁷⁹ etablierten Standardvolumen nach Elution mit 3x 100 μ L Methanol. Zu den Proben wurden anschließend jeweils 100 μ L Ammoniumbicarbonatpuffer hinzupipettiert und danach wurde das aus der Bindung freigesetzte (S)-Fluoxetin [(S)-3] quantifiziert. Da in allen untersuchten Proben ein Gesamtvolumen von 400 μ L vorlag, sollte die Analytkonzentration in allen Proben gleich sein und

somit zu annähernd gleichen Peakflächen in der LC-MS/MS Quantifizierung führen – unabhängig vom Volumen mit welchem eluiert wurde. Die in diesen Untersuchungen ermittelten Peakflächen für (S)-Fluoxetin [(S)-3] sind in Abb. 58 dargestellt. Die Peakflächen nach Elution mit 3x 70 µL und dem Standardvolumen von 3x 100 µL Methanol stimmen gut überein – folglich liegt trotz unterschiedlicher Elutionsvolumina bei gleichem finalen Probenvolumen auch in etwa die gleiche Konzentration des Analyten (S)-3 vor. Die beobachteten kleineren Abweichungen könnten möglicherweise auf das Targetmaterial zurück gehen, da im Assay eingesetzte Aliquots der HEK-hSERT Membranpräparation leicht schwankende Anteile an Bindungsstellen aufweisen können. Die Peakflächen von (S)-Fluoxetin [(S)-3] in den Proben, die mit 3x 50 µL und 3x 60 µL Methanol eluiert wurden, wiesen bei gleichem Endvolumen der zu quantifizierenden Proben eine im Vergleich zur Elution mit 3x 70 µL beziehungsweise 3x 100 µL Methanol erhöhte Peakfläche auf. Es ist denkbar, dass die trotz gleicher Endvolumina offensichtlich höhere Analytkonzentration in den Proben mit den kleineren Elutionsvolumina auf einer bei diesen Proben stärker ausgeprägten Verdunstung von Methanol während des Elutionsvorgangs zurückgeht, wodurch das finale Probenvolumen im Vergleich zu den anderen untersuchten Proben reduziert wurde. Eine stärkere Verdunstung könnte darauf zurückzuführen sein, dass es bei Elution mit 3x 50 µL und 3x 60 µL Methanol jeweils schlecht erkennbar war, ob bereits Methanol auf die Filter gegeben wurde und es somit aufgrund aufwändigerer visueller Überprüfung länger dauert, bis die Filter zur Inkubation mit einem PS-Deckel abgedeckt wurden, um eine weitere Verdunstung zu vermeiden. Zusätzlich waren die Schwankungen der erhaltenen Peakflächen von mehreren auf die gleiche Weise hergestellten Proben bei einer Elution mit 3x 50 µL beziehungsweise 3x 60 µL Methanol größer (siehe Abb. 58). Dies ist möglicherweise durch eine nicht ausreichende Benetzung der Filter bedingt, was in der Folge zu einer schwankenden Menge an freigesetztem Marker geführt haben könnte.

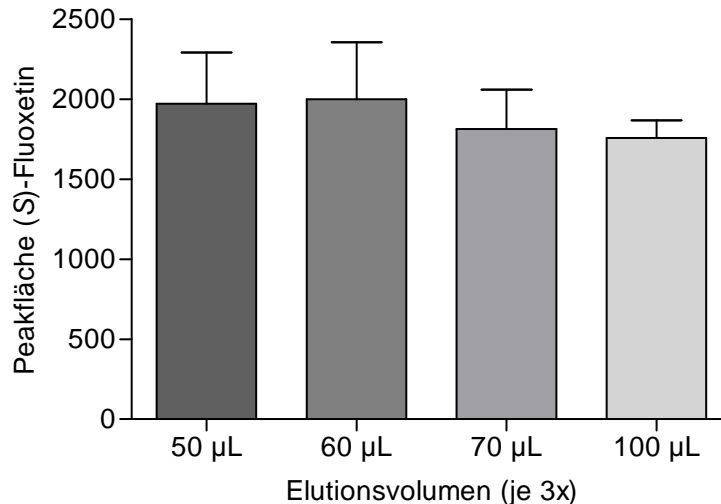


Abb. 58 Darstellung der nach Durchführung eines Bindungsexperimentes erhaltenen Peakflächen (Mittelwerte \pm SD, $n = 3-6$) von an hSERT gebundenem (S)-Fluoxetin [(S)-3] (nominal im Bindungsassay eingesetzte (S)-Fluoxetin-Konzentration entsprach 5 nM) nach Elution des Markers mit 3x 50 μ L, 3x 60 μ L, 3x 70 μ L beziehungsweise 3x 100 μ L, anschließender Addition von 150 μ L, 120 μ L beziehungsweise 90 μ L Methanol zu den mit 3x 50 μ L, 3x 60 μ L beziehungsweise 3x 70 μ L eluierten methanolischen Lösungen (um in allen Proben ein methanolisches Volumen von 300 μ L zu erzielen), Zugabe von je 100 μ L Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) und darauf folgender LC-MS/MS Quantifizierung.

Mit einer Reduktion des Elutionsvolumens war somit nur bei Elution mit 3x 70 μ L Methanol sowohl eine praktikable Versuchsdurchführung als auch bei gleichem Endvolumen das Vorliegen der gleichen Konzentration an gebundenem Marker wie beim Standardvolumen von 3x 100 μ L zu gewährleisten. Im Vergleich zur Elution mit 3x 100 μ L Methanol konnte zudem die Peakhöhe des untersuchten Analyten (S)-Fluoxetin [(S)-3] gesteigert werden (siehe Abb. 57). Letzteres verbesserte im Vergleich zur zuvor in MS-Bindungsassays standardmäßig eingesetzten Elution mit 3x 100 μ L das Signal-Rausch-Verhältnis in der LC-MS/MS Quantifizierung, was die Quantifizierung geringerer Konzentrationen von an vormals an Target gebundenem Marker in Bindungsstudien erlauben sollte. In allen folgenden Versuchen wurde aufgrund der in diesen Untersuchungen erzielten Ergebnisse vormals gebundener Marker immer mit 3x 70 μ L methanolischer Lösung eluiert.

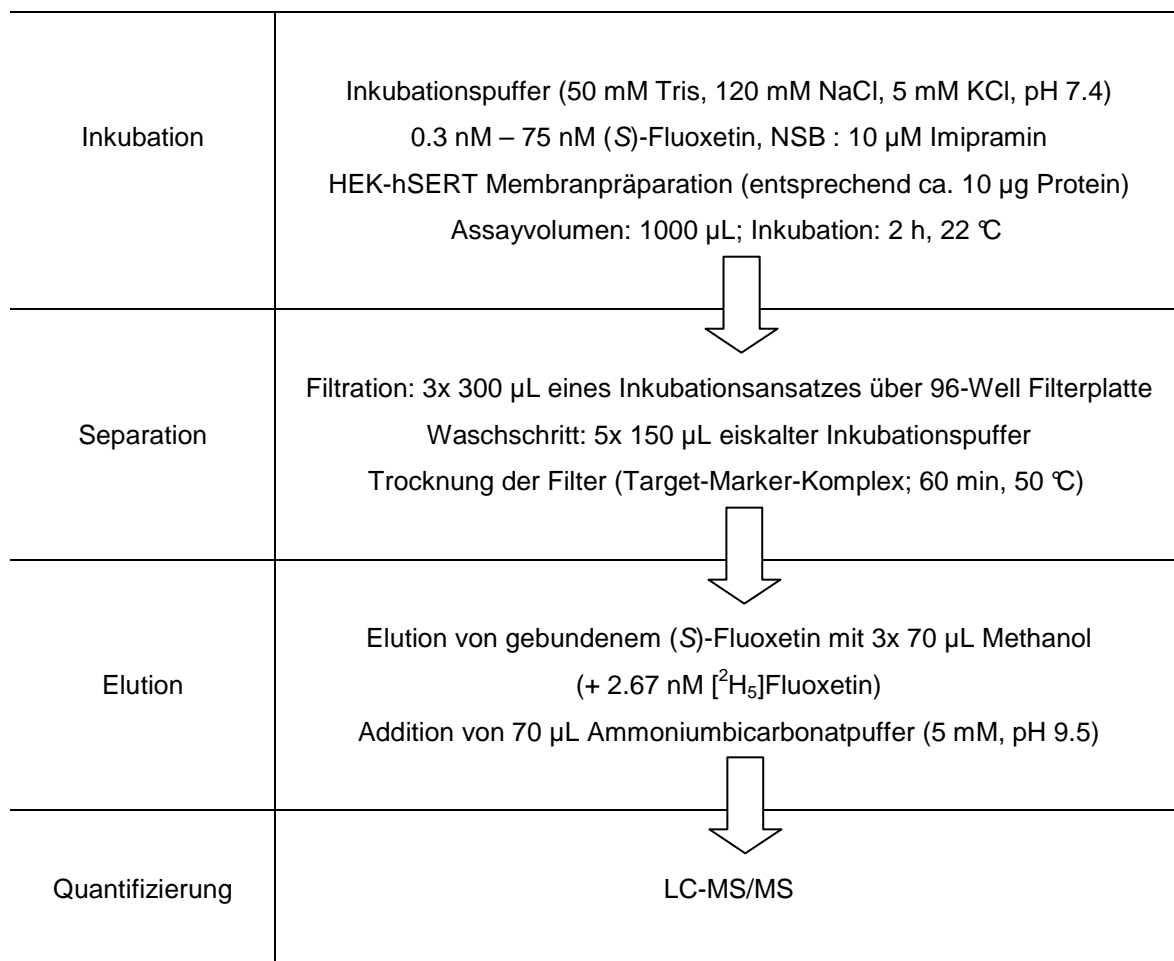
Bei einem im Bindungsassay zur Filtration übertragenen Inkubationsvolumen von 200 μ L und einem nun von 400 μ L (3x 100 μ L methanolische Lösung + 100 μ L Ammoniumbicarbonatpuffer) auf 280 μ L (3x 70 μ L methanolische Lösung + 70 μ L

Ammoniumbicarbonatpuffer) reduzierten Volumen in der zu quantifizierenden Probe, war allerdings klar, dass im Assay vorliegender gebundener Marker bis zur Quantifizierung noch immer einer Verdünnung unterlag. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass unter den zur Vermeidung von Depletion gewählten Bedingungen maximal 10 % des eingesetzten Markers gebunden sind, war offensichtlich, dass die Maßnahmen immer noch nicht ausreichen würden, um den Marker bei nominal im Assay eingesetzten (S)-Fluoxetin-Konzentrationen ≤ 0.5 nM mit ausreichender Sicherheit zu quantifizieren. Um für die abschließende Quantifizierung ausreichend konzentrierten Marker zu erhalten, war eine Möglichkeit, das Assayvolumen der Bindungsproben auf deutlich über 280 μL zu erhöhen. Bei gleicher Vorgehensweise bei beziehungsweise nach der Elution (3x 70 μL methanolische Lösung + 70 μL Ammoniumbicarbonatpuffer) sollten sich so in der zu quantifizierenden Probe höhere Konzentrationen von (S)-Fluoxetin [(S)-3] als in der Bindungsprobe erzielen lassen. Im Idealfall sollten diese über dem LLOQ von 50 pM der Quantifizierungsmethode liegen.

In folgenden Sättigungsexperimenten wurde auf Basis dieser Überlegungen ein Inkubationsvolumen von 1000 μL eingesetzt. Dazu wurden die zuvor verwendeten 96-Well Microtiterplatten gegen 2 mL 96-Deepwell Platten ausgetauscht. Von diesen Inkubationsansätzen wurden jeweils 900 μL unter Vakuum filtriert. Da die im Arbeitskreis vorhandene 12-Kanalpipette nur ein Volumen von 300 μL fasste und auch die Wells der 96-Well Filterplatte nur ein maximales Volumen von 350 μL aufnehmen konnten, wurden die 900 μL in drei Portionen von je 300 μL auf den gleichen Filter übertragen und unter Vakuum filtriert. Nach Waschen und Trocknen der Filter, wurde gebundenes (S)-Fluoxetin [(S)-3] mit 3x 70 μL methanolischer Lösung, welcher 2.67 nM interner Standard *rac-7* zugesetzt war, eluiert. Danach wurden 70 μL Ammoniumbicarbonatpuffer hinzupipettiert, so dass das finale Probenvolumen von 280 μL erhalten wurde. Die finale Konzentration des internen Standards [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (*rac-7*) betrug dann 2 nM. Vergleicht man das filtrierte Volumen der neuen Inkubationsansätze von 900 μL mit dem finalen Probenvolumen von 280 μL , so ergibt sich daraus eine Aufkonzentrierung um den Faktor 3.2. Letzteres sollte bewirken, dass bei einem LLOQ von 50 pM der entwickelten LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] eine im Assay gebundene (S)-Fluoxetin-Konzentration von nur 15.6 pM quantifiziert werden kann.

Letzteres „LLOQ“ sollte ausreichend sein, um in Sättigungsexperimenten gebundenes (S)-Fluoxetin [(S)-3] im gesamten eingesetzten Konzentrationsbereich zu quantifizieren. Dies war dann, wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben, in der Tat auch der Fall.

Entsprechend der oben beschriebenen Ergebnisse wurden die Sättigungsexperimente gemäß folgendem Fließschema durchgeführt:



Schema 1 Fließschema zur Durchführung von MS-Sättigungsexperimenten an hSERT mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] als nativem Marker.

Ergebnisse der Sättigungsexperimente an hSERT mit (S)-Fluoxetin als Marker

Mit der oben beschriebenen optimierten Verfahrensweise zur Aufkonzentrierung der Analytproben gelang es, für alle im Assay eingesetzten nominalen Markerkonzentrationen (0.3 nM – 75 nM) die (S)-Fluoxetin-Gesamtbindung mittels der zur Verfügung stehenden LC-MS/MS Methode zu quantifizieren (siehe Abb. 59a). Auch die nichtspezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] ließ sich bestimmen.

Dazu wurde die (S)-Fluoxetin-Bindung in Anwesenheit von Imipramin (**2**) (10 μ M) untersucht. Die nichtspezifische Bindung konnte allerdings trotz des entwickelten Aufkonzentrierungsschrittes nur bis zu nominalen Markerkonzentrationen von wenigstens 10 nM quantifiziert werden (siehe Abb. 59a). Wie auch durch publizierte Untersuchungen bestätigt wird, sollte die nichtspezifische Markerbindung in der Regel linear mit der Konzentration im Assay ansteigen.^{71,124} Für Nominalkonzentrationen von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] zwischen 10 nM und 75 nM konnte ich dies in meinen Untersuchungen auch so beobachten (siehe Abb. 59a). Somit bestand Grund für die Annahme, dass die nichtspezifische Bindung im gesamten für meine Untersuchungen relevanten Konzentrationsbereich linear verläuft und die nichtspezifische Bindung des Markers (**S**)-**3** für nominale Assaykonzentrationen < 10 nM durch Extrapolation gewonnen werden kann. Um jedoch sicher zu gehen, dass die nichtspezifische Bindung bei nominalen Konzentrationen < 10 nM auch tatsächlich linear ist und nach der beschriebenen Weise zu Recht verfahren werden kann, wurde ein zusätzliches Experiment unter Einsatz einer deutlich höheren Targetmenge durchgeführt. Bei einer sehr hohen Targetmenge im Assay sollte die nichtspezifische Bindung auch bei niedrigen nominalen Markerkonzentrationen über dem LLOQ der LC-MS/MS Methode liegen und somit quantifizierbar sein. Da die nichtspezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] insgesamt sehr niedrig war (siehe Abb. 59a), sollte es in diesem Experiment trotz der hohen Targetmenge zu keiner Depletion des Markers kommen. In der Untersuchung wurde HEK-hSERT Membranpräparation entsprechend etwa 100 μ g Protein (bestimmt nach Bradford⁹⁰) eingesetzt und die nichtspezifische Bindung von (**S**)-**3** wurde für nominale Assaykonzentrationen zwischen 2 nM und 10 nM unter Anwesenheit von 10 μ M Imipramin (**2**) bestimmt. Jedoch führte die große Menge an Targetmaterial zu Problemen bei der Filtration. Filtrations- und Waschvorgang dauerten länger und die Filtration verlief ungleichmäßig. Dies führte zu starken Schwankungen bei Messwerten für die jeweiligen Triplikate (siehe Abb. 60). Trotzdem konnte mittels dieses Experimentes im untersuchten Konzentrationsbereich (2 nM – 10 nM) die Linearität der nichtspezifischen (S)-Fluoxetin-Bindung durch lineare Regression bestätigt werden ($y = 0.026x + 0.023$, $r = 0.8628$; siehe Abb. 60).

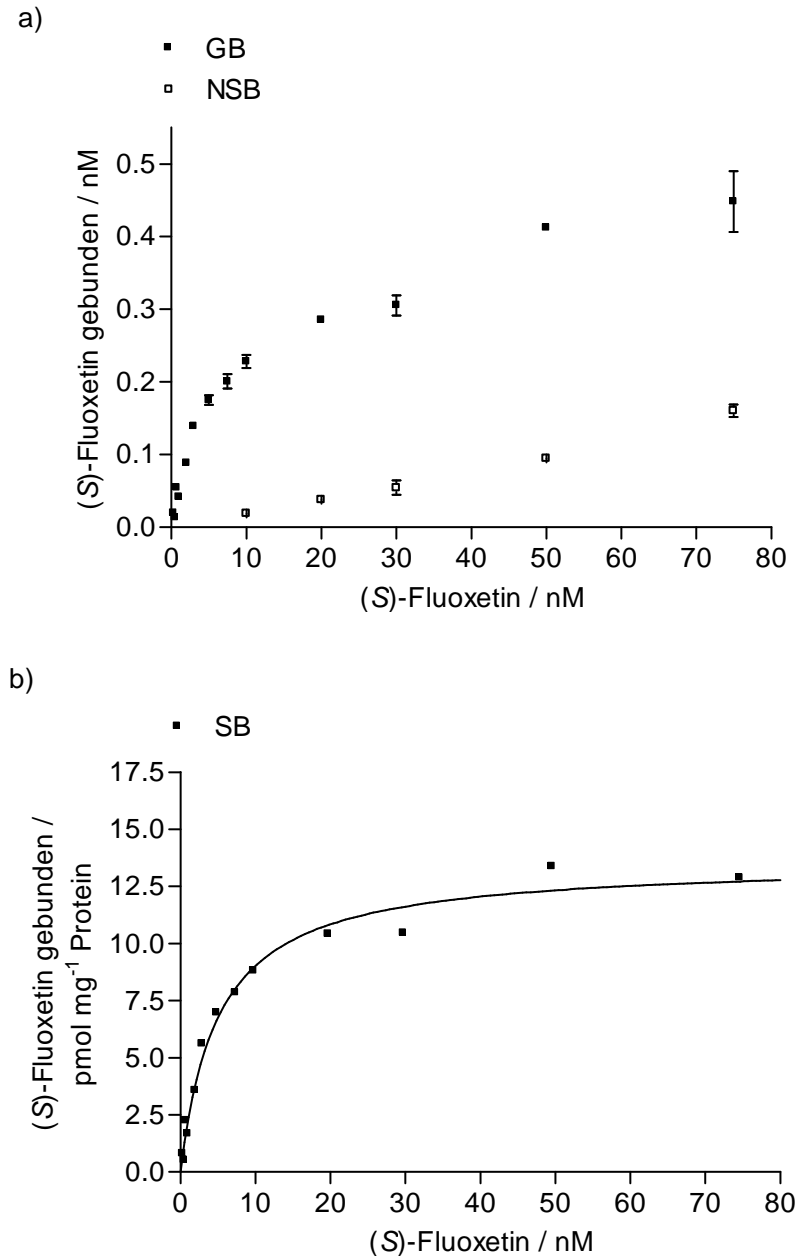


Abb. 59 Sättigungsexperiment mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] als Marker an hSERT a) Mittelwerte \pm SD (berechnet aus Triplikaten) angegeben als Konzentration für Gesamt- (GB) und nichtspezifische Bindung (NSB) von (S)-Fluoxetin [(S)-3] aus über LC-MS/MS vermessenen Proben eines repräsentativen Sättigungsexperimentes. b) Aus den Daten unter a) berechnete spezifische Bindung (SB) von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT angegeben in pmol mg^{-1} Protein und daraus resultierende Sättigungsisotherme. Konzentrationen der nichtspezifische Bindung im Bereich < 15.6 pM (das heißt < 50 pM in der über LC-MS/MS zu analysierenden Probe) wurden durch Extrapolation aus der nach linearer Regression erhaltenen Gerade der experimentell ermittelten nichtspezifischen Bindung bei nominalen (S)-Fluoxetin-Konzentrationen ≥ 10 nM ermittelt.

Damit war Linearität der nichtspezifischen Bindung für den gesamten Konzentrationsbereich belegt, weshalb die nichtspezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] für nominale Assaykonzentration < 10 nM durch lineare Extrapolation aus der für Messwerte bei Assaykonzentrationen ≥ 10 nM erstellten Regressionsgeraden ermittelt werden konnte.

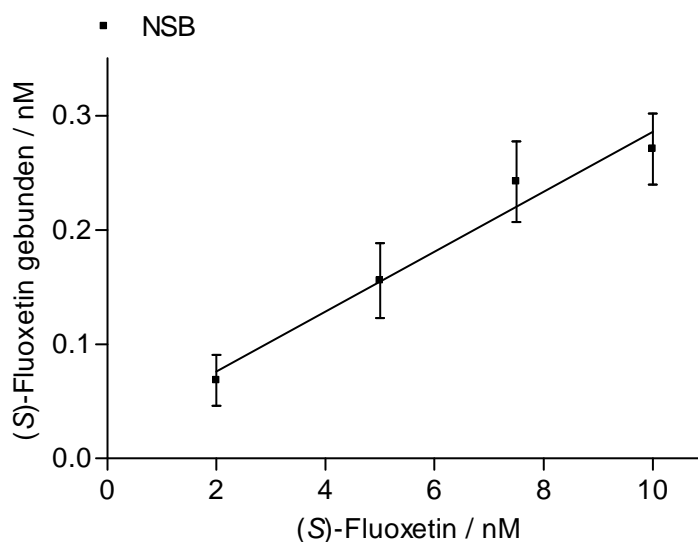


Abb. 60 Ermittelte nichtspezifische Bindung (NSB) von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT im Konzentrationsbereich zwischen 2 nM und 10 nM in einem Bindungsexperiment unter Einsatz von HEK-hSERT Membranpräparation entsprechend etwa 100 μ g Protein (bestimmt nach Bradford⁹⁰, Mittelwerte \pm SD, $n = 3$). NSB wurde als Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] unter Anwesenheit von 10 μ M Imipramin (2) untersucht und über LC-MS/MS quantifiziert. Geradengleichung nach linearer Regression: $y = 0.026x + 0.023$, linearer Korrelationskoeffizient $r = 0.8628$.

Zur Auswertung der Sättigungsexperimente wurde die nichtspezifische Bindung von der Gesamtbindung des Markers subtrahiert, so dass die spezifische Markerbindung erhalten wurde. Die aus den Datenpunkten von Abb. 59a in einem repräsentativen Experiment so ermittelte spezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT ist in Abb. 59b mit daraus resultierender Sättigungsisotherme dargestellt.

In den auf diese Weise durchgeführten Sättigungsexperimenten mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] als nativem Marker wurde ein K_D -Wert von 4.4 ± 0.4 nM und ein B_{max} -Wert von 26.9 ± 5.7 pmol mg^{-1} Protein (Mittelwerte \pm SEM, $n = 13$) erhalten (siehe Tab. 20). Der mit den neu etablierten MS-Sättigungsexperimenten ermittelte K_D -Wert für (S)-Fluoxetin [(S)-3] korreliert gut mit dem K_D -Wert von 6.7 ± 2.1 nM (Mittelwert \pm SD, $n = 3$), welcher für die Bindung von [³H]Fluoxetin an hSERT in

Radioligandbindungsstudien publiziert wurde (siehe Tab. 20).⁹⁹ Das Ergebnis zeigt, dass die entwickelten Bindungsexperimente mit LC-MS/MS Quantifizierung des gebundenen Markers zu zuverlässigen Ergebnissen führen. Aus Radioligandbindungsstudien sind bislang keine B_{\max} -Werte für die Bindung von [³H]Fluoxetin an von HEK-293 Zellen exprimierten hSERT publiziert. In meinen Studien habe ich insgesamt 13 Sättigungsexperimente mit (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] als Marker durchgeführt. Dabei fand ich B_{\max} -Werte zwischen 5.3 pmol mg⁻¹ Protein und 86.3 pmol mg⁻¹ Protein. In Folge der großen Unterschiede war der Mittelwert für B_{\max} von 26.9 pmol mg⁻¹ Protein mit einem relativ großen Standardfehler (SEM) von 5.7 pmol mg⁻¹ behaftet. Es ist anzunehmen, dass dies auf starke Schwankungen der hSERT-Expression in den untersuchten Membranpräparationschargen zurückgeht. Auf die ermittelten K_d -Werte hatte dies erwartungsgemäß aber keinen Einfluss.

Tab. 20 Vergleich der Ergebnisse aus MS- beziehungsweise Radioligand-Sättigungsexperimenten an hSERT mit (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] (Mittelwert \pm SEM, n = 13) beziehungsweise [³H]Fluoxetin (Mittelwert \pm SD, n = 3)⁹⁹ als Marker

	(S)-Fluoxetin [(S)- 3]	[³ H]Fluoxetin ⁹⁹
K_d (in nM)	4.4 \pm 0.4	6.7 \pm 2.1
B_{\max} (in pmol mg ⁻¹ Protein)	26.9 \pm 5.7	-

3.3.4.2 Etablierung kinetischer Experimente mit (S)-Fluoxetin als Marker

In einem weiteren Teil meiner Arbeit sollten kinetische MS-Bindungsstudien mit (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] als nativem Marker für den Serotonin-Transporter etabliert werden. In der Literatur findet man nur wenige Untersuchungen, in welchen die Bindungskinetik von SERT-Inhibitoren untersucht wird.^{91,128} Martin et al.⁹¹ und Tsuruda et al.¹²⁸ führten jeweils kompetitive Dissoziationsexperimente mit [³H]-(S)-Citalopram beziehungsweise [³H]-(RS)-Citalopram als Radioligand durch und konnten so indirekt die kinetischen Parameter für die Bindung einer Serie von SERT-Inhibitoren bestimmen. Die Bindungskinetik von Fluoxetin (**rac**-**3**) wurde mittels der indirekten Vorgehensweise allerdings nur von Martin et al.⁹¹ untersucht. Dabei wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{-1}) experimentell ermittelt und anschließend wurde die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{+1}) gemäß

Gleichung (3) berechnet.⁹¹ Aus den publizierten Ergebnissen geht hervor, dass die Assoziation der Bindung von Fluoxetin (**rac-3**) an hSERT einer schnellen Kinetik folgt.⁹¹

Mittels der MS-Bindungsassays bot sich nun erstmals die Möglichkeit, die Bindung von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] an hSERT sowohl in Assoziations- als auch in Dissoziationsexperimenten direkt zu charakterisieren. Eine direkte Bestimmung der Assoziations- (k_{+1}) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1}) sollte zudem einen unabhängigen Zugang zum K_d -Wert von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] ermöglichen, welcher zuvor schon direkt in Sättigungsexperimenten ermittelt worden war. Als Ausgangspunkt für die kinetischen Untersuchungen dienten die bereits für die Sättigungsexperimente etablierten Versuchsbedingungen, sowie die für die Quantifizierung für (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] entwickelte LC-MS/MS Methode. Bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen wie in den Sättigungsexperimenten, gleicher Versuchsdurchführung und abschließender LC-MS/MS Quantifizierung vormals gebundenen (S)-Fluoxetins [(**S**)-**3**] wurde das Assayvolumen in den kinetischen Experimenten allerdings von 1000 μL auf 300 μL reduziert. Das höhere Volumen war, wie unter 3.3.4.1 geschildert, in Sättigungsexperimenten notwendig, um auch bei Einsatz sehr niedriger Markerkonzentrationen, die Quantifizierung gebundenen Markers gewährleisten zu können. Da der Marker in kinetischen Studien jedoch mindestens im Bereich seines K_d -wertes ($4.4 \pm 0.4 \text{ nM}$) eingesetzt werden sollte, war das niedrigere Assayvolumen von 300 μL für die Untersuchungen ausreichend. Letzteres Volumen hat den Vorteil, dass wie in früheren MS-Bindungsstudien⁷⁹ 96-Well Microtiterplatten verwendet werden können, welche kostengünstiger als 96-Deepwell Platten sind. Zusätzlich kann durch das reduzierte Volumen die Inkubation mittels eines einzigen Filtrationsschrittes beendet werden, indem mit der maximal 300 μL fassenden 12-Kanalpipette auf einmal 280 μL des Inkubationsansatzes auf die Filterplatte übertragen und filtriert werden. Ein einziger Filtrationsschritt ist in kinetischen Untersuchungen essentiell, um den Abbruch der Inkubation zu genau definierten Zeitpunkten gewährleisten zu können. Wegen der erwarteten schnellen Assoziationskinetik war eine solche zeitlich effiziente Vorgehensweise auch zwingend erforderlich, um verlässlich Datenpunkte für sehr kurze Inkubationszeiten und in rascher Folge erheben zu können.

Durchführung von Assoziationsexperimenten

In Bindungsstudien werden Assoziationsexperimente unter Annahme einer Reaktionskinetik pseudo-1. Ordnung durchgeführt.¹²³ Bei einer bimolekularen Reaktion, wie der Bildung des Target-Marker-Komplexes, muss dabei ein Reaktionspartner – in Assoziationsexperimenten ist das der Marker – in deutlichem Überschuss vorliegen. So kann angenommen werden, dass die Kinetik nur von der Konzentration des anderen Reaktionspartners – dem Target – abhängig ist. Um tatsächlich in den anvisierten Assoziationsexperimenten von einer Reaktion pseudo-1. Ordnung ausgehen zu können, wurden Target- und Markerkonzentration so gewählt, dass zur Vermeidung einer Markerdepletion maximal 10 % der nominal eingesetzten Markerkonzentration an das Target gebunden und somit gegenüber dem Target in einem großen Überschuss vorlag.

Anhand folgender Gleichung kann in Assoziationsexperimenten die *observed rate constant* („beobachtete Geschwindigkeitskonstante“, k_{obs}) der Bildung des Target-Marker-Komplexes (MR) berechnet werden¹²³:

$$[\text{MR}]_t = [\text{MR}]_{\text{eq}} (1 - e^{-(k_{\text{obs}})t}) \quad (10)$$

$[\text{MR}]_t$ stellt dabei die Konzentration des Target-Marker-Komplexes zum Zeitpunkt t dar; $[\text{MR}]_{\text{eq}}$ die im Gleichgewicht vorliegende Konzentration. Gemäß der Gleichung steigt der Anteil an gebundenem Marker $[\text{MR}]_t$ von Zeitpunkt $t = 0$ mit $[\text{MR}]_0 = 0$ exponentiell bis zu dem im Gleichgewicht vorliegenden Anteil $[\text{MR}]_{\text{eq}}$ an.¹²⁹

Die experimentell bestimmbare „beobachtete Geschwindigkeitskonstante“ (k_{obs}) der Bildung des Target-Marker-Komplexes setzt sich entsprechend Gleichung (11) aus der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{+1}), der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1}) und der im Experiment eingesetzten Markerkonzentration (c) zusammen.^{123,129}

$$k_{\text{obs}} = k_{+1}c + k_{-1} \quad (11)$$

Aus Gleichung (11) geht entsprechend hervor, dass k_{obs} direkt von der im Experiment eingesetzten Markerkonzentration c abhängig ist, weshalb die Reaktionsgeschwindigkeit mit einer erhöhten Konzentration des Markers steigt. Für die

Durchführung eines Assoziationsexperimentes ist es entsprechend sinnvoll, eine langsamere Assoziationsgeschwindigkeit durch eine geringe Markerkonzentration herbeizuführen, da dies in experimentellen Untersuchungen die Bestimmung von ans Target gebundenem Marker im aufsteigenden Kurventeil der Assoziationskurve erleichtert. Bei der Wahl der Markerkonzentration in Assoziationsstudien musste allerdings auch bedacht werden, dass bei einer sehr niedrigen nominalen Markerkonzentration im Assay die Anforderungen an die Sensitivität in der Quantifizierung von gebundenem Marker steigt. Auch sollte sichergestellt sein, dass zur Gewährleistung einer konstanten freien Markerkonzentration der Marker im Vergleich zum Target in deutlich höherer Konzentration vorliegt. Folglich war es nötig einen Kompromiss zu finden, der im Assoziationsexperiment die Bestimmung von k_{obs} erlaubt, bei dem die freie Markerkonzentration nahezu unverändert bleibt und der zudem einen Anteil an gebundenem Marker liefert, welcher mittels LC-MS/MS quantifizierbar ist.

Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen wurde in den Assoziationsexperimenten an hSERT eine (S)-Fluoxetin-Konzentration von 5 nM eingesetzt. Aus den zuvor durchgeführten Sättigungsexperimenten war bekannt, dass gebundener Marker bei dieser eingesetzten Assaykonzentration sehr gut quantifiziert werden kann. Zudem bestand durch die vorherigen Ergebnisse für diese Nominalkonzentration ebenfalls Grund zur Annahme, dass auch ein geringerer Anteil an gebundenem Marker – wie er vor dem Erreichen des Gleichgewichtszustands vorliegt – ausreichend quantifizierbar sein müsste. In den Experimenten wurde die Assoziation durch Zugabe von HEK-hSERT Membranpräparation (entsprechend etwa 5 μg Protein) zu einer Lösung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] in Inkubationspuffer gestartet. Es wurde bei 22 °C inkubiert. Nach definierten Zeitintervallen (60 s – 60 min) wurde durch Filtration freies von gebundenem (S)-Fluoxetin [(S)-3] separiert. Sofort nach der Filtration wurde der auf dem Filter befindliche Rückstand mit 5x 150 μL eiskaltem Assaypuffer gewaschen. Die darauf folgenden Schritte der Versuchsdurchführung mit abschließender Quantifizierung des gebundenen Markers wurden wie in Sättigungsexperimenten durchgeführt. Die in den Versuchsreihen zur Assoziation eingesetzte (S)-Fluoxetin-Konzentration von 5 nM war allerdings zu gering, um die nichtspezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] unter Anwesenheit von Imipramin (2) (10 μM) direkt bestimmen zu können. Sie lag nämlich unter dem

LLOQ von 50 pM der LC-MS/MS Methode. Entsprechend der Darstellung von Hulme¹²⁹ sollte die nichtspezifische Markerbindung für das in Assoziationsexperimenten untersuchte Zeitintervall konstant sein – sie sollte sich folglich unabhängig von der Dauer der Inkubation nicht verändern. Diese Charakteristik der nichtspezifischen Bindung konnte in kinetischen Untersuchungen von Zepperitz⁷¹ an mGAT1 mit NO711 als Marker bestätigt werden. Somit war berechtigterweise anzunehmen, dass die nichtspezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT in den untersuchten Zeitintervallen ebenfalls nahezu konstant ist. In Assoziationsexperimenten bestimmte ich daher ausschließlich die Gesamtbindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3]. Bei konstanter nichtspezifischer Bindung sollte sich die nach Auftragung der Gesamtbindung gegen die Zeit aus der nichtlinearen Regression resultierende Assoziationskurve nur durch eine Parallelverschiebung von einer solchen Kurve unterscheiden, welche nach Auftragung der spezifischen Markerbindung gegen die Zeit erhalten werden würde. Da dies keinen Einfluss auf die gewünschten Daten hat, lassen sich diese auch daraus ermitteln. Aus den Untersuchungen resultierte eine *observed rate constant* (k_{obs}) von $0.0078 \pm 0.0009 \text{ s}^{-1}$ und eine Assoziationshalbwertszeit von $91 \pm 11 \text{ s}$ (Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$). Eine repräsentative Assoziationskurve zeigt Abb. 61. Die Kurve demonstriert die schnelle Assoziation des (S)-Fluoxetin-hSERT-Komplexes und zeigt, dass das Gleichgewicht der Reaktion nach etwa 1000 s erreicht ist. Die Tatsache, dass die beobachteten Standardabweichungen der gemessenen Triplikate im aufsteigenden Kurventeil teilweise recht groß sind, lässt sich mit der Schwierigkeit erklären, diese Datenpunkte, die wegen der schnellen Assoziationskinetik von (S)-Fluoxetin [(S)-3] kurz hintereinander liegen, zu bestimmen. Die unterschiedlichen Versuchsschritte von der Targetzugabe, dem Transfer des Inkubationsansatzes mit einer 12-Kanalpipette auf die Filterplatte, der Filtration und dem anschließenden Waschen der Filter, stellten eine große Herausforderung hinsichtlich des Zeitmanagements und der Geschicklichkeit des Experimentators dar.

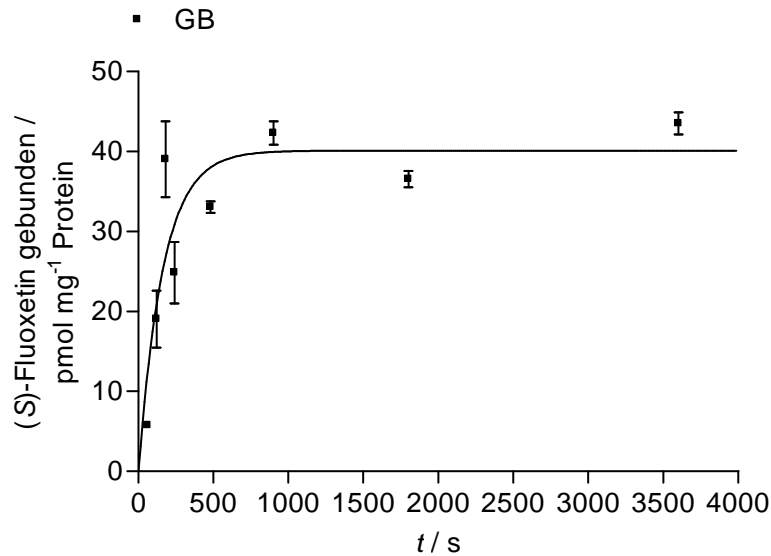


Abb. 61 Assoziationskinetik der Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT bei einer eingesetzten Markerkonzentration von 5 nM. Datenpunkte stellen Mittelwerte \pm SD (berechnet aus Triplikaten) für die Gesamtbinding (GB) eines repräsentativen Assoziationsexperimentes dar.

Durchführung von Dissoziationsexperimenten

Die Dissoziation des Target-Marker-Komplexes (MR) folgt einer Kinetik 1. Ordnung (siehe Gleichung (12)). Der Zerfall ist dabei ausschließlich von der Konzentration des Target-Marker-Komplexes abhängig.^{123,129}

$$[\text{MR}]_t = [\text{MR}]_0 \cdot e^{-k_{-1}t} \quad (12)$$

In Gleichung (12) stellen $[\text{MR}]_0$ und $[\text{MR}]_t$ die Konzentrationen des Komplexes zum Zeitpunkt $t = 0$ und zum Zeitpunkt t dar. Wie aus der Gleichung hervorgeht, nimmt die Konzentration des Target-Marker-Komplexes exponentiell ab dem Zeitpunkt $t = 0$, an welchem die Dissoziation gestartet wird, ab.

In den Dissoziationsexperimenten wurde eine (S)-Fluoxetin-Konzentration von 50 nM eingesetzt. Für die Dissoziationsexperimente wurden zunächst zur Einstellung des Gleichgewichtes (S)-Fluoxetin [(S)-3] und HEK-hSERT Membranpräparation (entsprechend etwa 5 μg Protein) über eine Stunde bei 22 °C in Assaypuffer vorinkubiert. Aufgrund der eingesetzten hohen Markerkonzentration von 50 nM kam es zu einer nahezu vollständigen Targetbelegung, wobei jedoch nie mehr als 10 % des Markers gebunden vorlagen, so dass es zu keiner Depletion kam. Die Dissoziation des Target-Marker-Komplexes wurde anschließend durch Zugabe eines

Überschusses an Kompetitor (10 μ M Imipramin (**2**)) gestartet. Um nach Initiation der Dissoziation den gebundenen Markeranteil nach definierten Zeitintervallen (60 s – 60 min) von freiem Marker zu separieren, wurden jeweils 280 μ L eines Inkubationsansatzes zu bestimmten Zeitpunkten filtriert. Die folgenden Versuchsschritte und die LC-MS/MS Quantifizierung erfolgten nach der beschriebenen Standardvorgehensweise.

Zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] erfolgte im gleichen Versuchsaufbau bereits die Vorinkubation von Marker und Target unter Anwesenheit von Imipramin (**2**) (10 μ M). Alle weiteren Versuchsschritte wurden dann analog zur Bestimmung der Gesamtbindung durchgeführt. Da es wie beschrieben durch den Einsatz von 50 nM (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] im Assay zu einer nahezu vollständigen Targetbelegung kam, lag nach Initiierung der Dissoziation sowohl die Gesamt- als auch die nichtspezifische Bindung für alle untersuchten Zeitintervalle über dem LLOQ der LC-MS/MS Methode von 50 pM. Somit war es in Dissoziationsexperimenten möglich sowohl die Gesamt- als auch nichtspezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] für alle im Dissoziationsexperiment untersuchten Zeitintervalle experimentell zu bestimmen.

Die in einem repräsentativen Dissoziationsexperiment bestimmte Gesamt- und nichtspezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] ist in Abb. 62a dargestellt. Durch Differenzbildung von Gesamt- und nichtspezifischer Bindung wurde daraus die spezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] an hSERT ermittelt. Eine daraus nach nichtlinearer Regression erhaltene Dissoziationskurve zeigt Abb. 62b. Die aus den durchgeführten Experimenten resultierende Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{-1}) hat einen Wert von $0.0032 \pm 0.0002 \text{ s}^{-1}$ bei einer ermittelten Dissoziationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) des (S)-Fluoxetin-hSERT-Komplexes von $220 \pm 10 \text{ s}$ (Mittelwerte \pm SEM, n = 3).

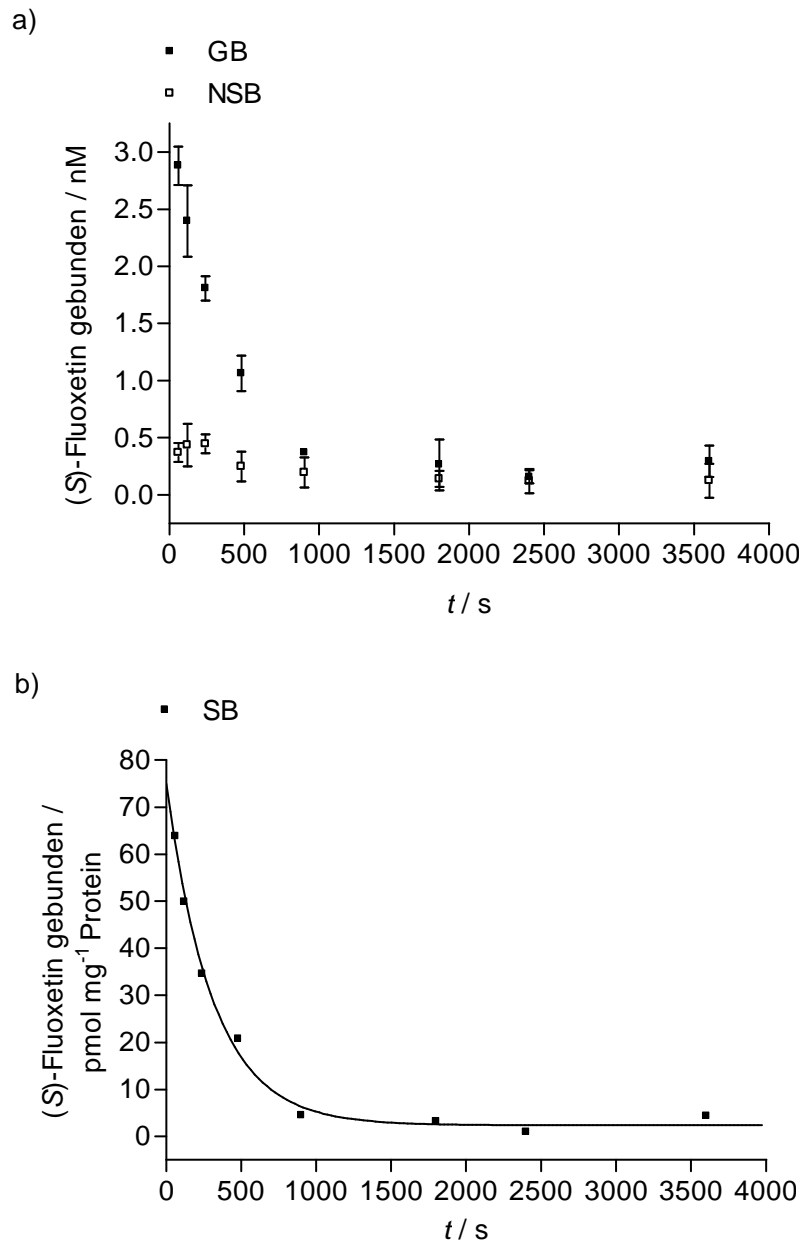


Abb. 62 Dissoziationskinetik der Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT bei einer Markerkonzentration von 50 nM. Zunächst wurde 1 h bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert. Die Initiation der Dissoziation erfolgte durch Zugabe von Imipramin (2) (10 μ M) zum Zeitpunkt $t = 0$. a) Datenpunkte stellen Mittelwerte \pm SD (berechnet aus Triplikaten) für Gesamt- (GB) und nichtspezifische Bindung (NSB) von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT als Konzentration in den Bindungsproben eines repräsentativen Experimentes dar. b) Spezifische Bindung (SB) von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT berechnet aus der Differenz von Gesamt- und nichtspezifischer Bindung ($SB = GB - NSB$) der unter a) angegebenen Daten mit resultierender Dissoziationskurve.

Zusammenfassung der Ergebnisse kinetischer MS-Untersuchungen und Vergleich mit literaturbekannten Daten

Zur Übersicht sind alle in den kinetischen MS-Bindungsstudien ermittelten Parameter für die Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT in Tab. 21 zusammengefasst. Zum Vergleich sind dabei ebenfalls die aus indirekten (kompetitiven) kinetischen Untersuchungen mit [³H]-(S)-Citalopram von Martin et al.⁹¹ publizierte Parameter für die Bindung von racemischem Fluoxetin (*rac*-3) an hSERT angegeben.

Tab. 21 Zusammenfassung der in kinetischen MS-Bindungsstudien mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT ermittelten Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) und Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs} , k_{-1} , k_{+1}) sowie der daraus ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_d , siehe Gleichung (3)) und Vergleich mit den von Martin et al.⁹¹ in kompetitiven Dissoziationsexperimenten mit [³H]-(S)-Citalopram ermittelten Werten für *rac*-3. Ergebnisse aus MS-Bindungsstudien stellen Mittelwerte \pm SEM ($n = 3$) dar. Ergebnisse von Martin et al.⁹¹ sind als Mittelwerte \pm SD ($n = 2-6$) angegeben.

	MS-Bindungsstudien	Martin et al. ⁹¹
k_{obs} (in s^{-1})	0.0078 ± 0.0009	-
k_{-1} (in s^{-1})	0.0032 ± 0.0002	0.003 ± 0.0004
k_{+1} (in $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$0.92 \pm 0.17 \times 10^6$	$0.91 \pm 0.12 \times 10^6$
K_d (in nM)	3.5	3.31
$t_{1/2}$ (Assoziation; in s)	91 ± 11	-
$t_{1/2}$ (Dissoziation; in s)	220 ± 10	221 ± 27

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{+1}) von $0.92 \pm 0.17 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Mittelwert \pm SEM, $n = 3$) wurde gemäß Gleichung (11) aus experimentell in MS-Bindungsstudien erhaltenem k_{obs} und k_{-1} für die Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT berechnet. Sie stimmt sehr gut mit dem von Martin et al.⁹¹ publizierten Wert für racemisches Fluoxetin (*rac*-3) von $0.91 \pm 0.12 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ überein. Auch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1}) von $0.0032 \pm 0.0002 \text{ s}^{-1}$ für (S)-Fluoxetin [(S)-3] (meine Daten) beziehungsweise von $0.003 \pm 0.0004 \text{ s}^{-1}$ für racemisches Fluoxetin (*rac*-3) (Daten von Martin et al.) korrelieren sehr gut. Eine

gute Übereinstimmung beider Studien ist auch bei den erhaltenen Dissoziationshalbwertszeiten ($t_{1/2}$) von 220 ± 10 s (für (S)-Fluoxetin [(S)-3], meine Daten) und 221 ± 27 s (für Fluoxetin (*rac*-3), Daten von Martin et al.) gegeben. Berechnung der Affinität von (S)-Fluoxetin [(S)-3] aus den in den kinetischen MS-Bindungsstudien ermittelten k_{-1} - und k_{+1} -Werten (gemäß Gleichung (3)) führte zu einem K_d -Wert von 3.5 nM. Dies bestätigt den in MS-Sättigungsexperimenten experimentell ermittelten K_d -Wert von 4.4 ± 0.4 nM und stimmt ebenso auch gut mit dem von Martin et al. publizierten Wert von 3.31 nM für die Bindung von Fluoxetin (*rac*-3) an hSERT überein.

Der Vergleich beider Studien zeigt, dass sich Assoziation und Dissoziation von (S)-Fluoxetin [(S)-3] und racemischem Fluoxetin (*rac*-3) an hSERT nicht wesentlich unterscheiden.

Wie unter 3.3.3.2 erwähnt, kann in kinetischen Untersuchungen auch die Inkubationszeit ermittelt werden, welche für eine weitgehende Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes erforderlich ist. Um den Gleichgewichtszustand einer Bindungsreaktion näherungsweise zu erreichen, sollte eine Inkubationszeit gewählt werden, welche dem Vier- bis Fünffachen der Dissoziationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) entspricht.¹²⁷ Mit einer Dissoziationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) von 220 s für den (S)-Fluoxetin-hSERT-Komplex, sollte bei der Bindungsreaktion das Gleichgewicht nach 1100 s (~ 19 min) nahezu erreicht sein. Die in den bisher durchgeführten Sättigungsexperimenten gewählte Inkubationszeit von 2 h war daher für die Gleichgewichtseinstellung absolut ausreichend.

Zusammengefasst konnte mit diesen Studien die Assoziations- und Dissoziationskinetik der Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT erstmals direkt charakterisiert werden, was neuerlich eindrucksvoll die Eignung von MS-Bindungsassays für die Durchführung kinetischer Experimente belegt.

3.3.4.3 Etablierung kompetitiver Experimente mit (S)-Fluoxetin als Marker

Kompetitive Experimente, in welchen die Affinität (K_i) einer Verbindung indirekt durch Konkurrenz mit einem Marker um die gleiche Bindestelle an einem Target bestimmt wird, sind im Wirkstoffscreening auf der Suche nach neuen potenten Inhibitoren von großer Bedeutung. Um die Eignung des in meiner Arbeit entwickelten MS-

Bindungsassays für derartige Untersuchungen zu demonstrieren, sollte in kompetitiven Experimenten eine Serie bekannter SERT-Inhibitoren (siehe Abb. 63) bezüglich ihrer Affinität zum Transporter charakterisiert werden.

Ausgangspunkt für die Etablierung dieser MS-Kompetitionsexperimente waren die Assaybedingungen und die Versuchsdurchführung der bereits etablierten Sättigungs- (siehe 3.3.4.1) und kinetischen Experimente (siehe 3.3.4.2). Um mit den standardmäßig in MS-Bindungsassays verwendeten 96-Well Microtiterplatten arbeiten und den Inkubationsansatz in einem einzigen Schritt filtrieren zu können, wurde wie in den kinetischen Experimenten ein Assayvolumen von 300 μL gewählt. Ein solch niedriges Assayvolumen ist besonders für einen Einsatz der Methode als Screeningverfahren äußerst wichtig, da nur auf diese Weise ein hoher Probendurchsatz erzielt werden kann.

In den kompetitiven Untersuchungen wurde entsprechend des K_d -Wertes von (S)-Fluoxetin [(S)-3], der wie die Bestimmungen ergeben hatten bei 4.4 ± 0.4 nM liegt, eine Markerkonzentration von 5 nM eingesetzt. Für diese Konzentration war in den zuvor durchgeführten Untersuchungen wiederholt gezeigt worden, dass der gebundene Anteil mittels der entwickelten LC-MS/MS Quantifizierungsmethode bestimmt werden kann. In den Kompetitionsexperimenten wurde der jeweilige Kompetitor in sechs verschiedenen Konzentrationsstufen zusammen mit 5 nM (S)-Fluoxetin [(S)-3] und Membranpräparation der stabil hSERT experimentierenden HEK-293 Zelllinie (entsprechend etwa 5 μg Protein) in Assaypuffer über zwei Stunden bei 22 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Um die Inkubation zu beenden, wurden auch hier 280 μL des Inkubationsansatzes filtriert. Die folgenden Schritte der Versuchsdurchführung mit abschließender Quantifizierung von zuvor gebundenem (S)-Fluoxetin [(S)-3] erfolgten analog der Vorgehensweise in Sättigungs- und kinetischen Experimenten.

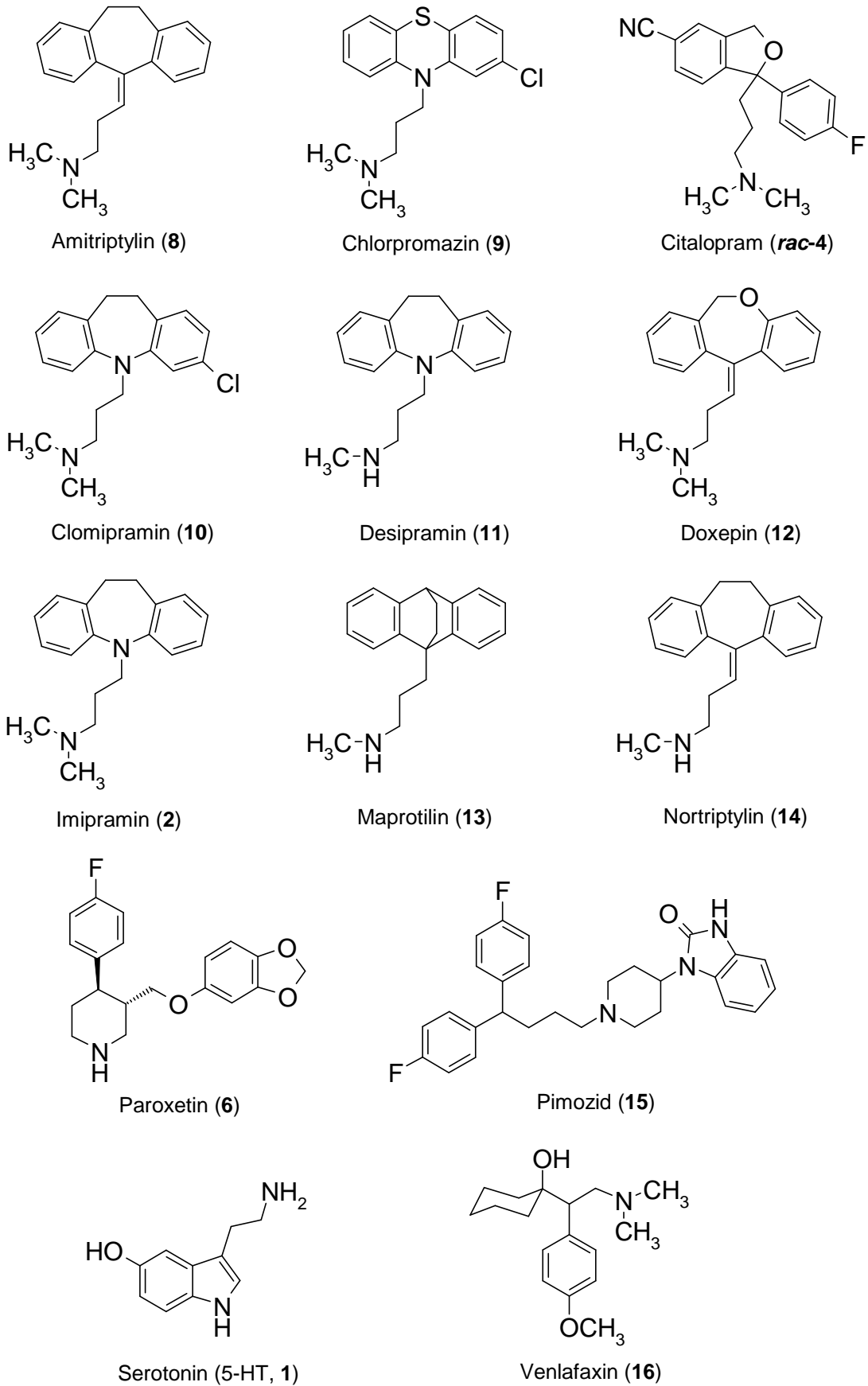


Abb. 63 Strukturformeln der untersuchten SERT-Inhibitoren

Die nichtspezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] lag bei der eingesetzten nominalen Assaykonzentration von 5 nM in den Proben zur LC-MS/MS Quantifizierung unter dem LLOQ der Methode von 50 pM. Folglich konnte sie direkt nicht verlässlich bestimmt werden. Um sie durch Extrapolation zu ermitteln, wurde an jedem Versuchstag eine zusätzliche Versuchsreihe durchgeführt, in welcher die nichtspezifische Bindung für nominale Assaykonzentrationen von (S)-Fluoxetin [(S)-3] zwischen 30 nM und 100 nM unter Anwesenheit von 10 μ M Imipramin (2) bestimmt wurde. Die nichtspezifische Bindung für die im Assay eingesetzte Konzentration von 5 nM konnte daraus durch lineare Extrapolation aus der für die experimentell bestimmten Messwerte erstellten Regressionsgeraden ermittelt werden.

Durch Differenzbildung von Gesamt- und nichtspezifischer Bindung wurde die spezifische Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] erhalten. Aus diesen Werten wurde durch nichtlineare Regression die Kompetitionskurve erstellt, die in allen Fällen die typische sigmoidale Form aufwies. Ein repräsentatives Beispiel, das die Bindung des tricyclischen Antidepressivums Nortriptylin (14) an hSERT wiedergibt, ist in Abb. 64 dargestellt.

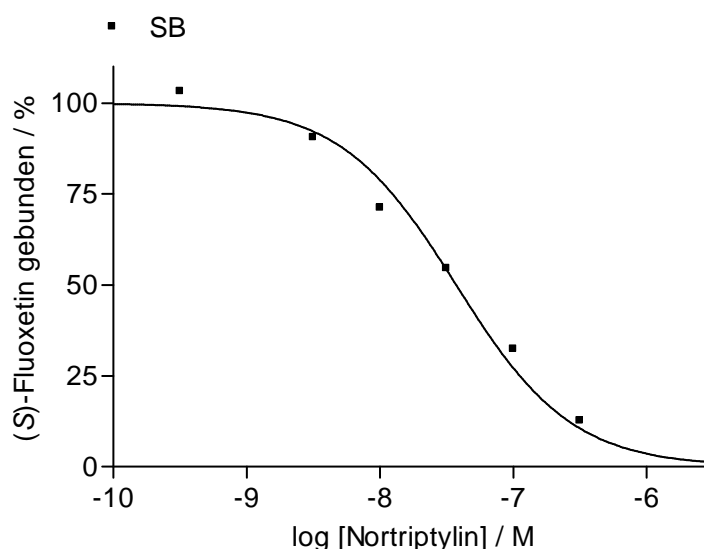


Abb. 64 Kompetitionskurve für Nortriptylin (14) an hSERT aus einem kompetitiven MS-Bindungsassay mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] als Marker (Markerkonzentration: 5 nM). Datenpunkte stellen Mittelwerte ($n = 3$) der spezifischen (S)-Fluoxetin-Bindung (SB) in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Nortriptylin (14) (316 pM – 316 nM) aus einem repräsentativen Experiment dar. Das obere und das untere Plateau der Kurve wurde auf 100 % beziehungsweise 0 % normiert.

Aus den für die untersuchten Verbindungen erhaltenen Kompetitionskurven wurde die jeweilige inhibitorische Potenz (IC_{50} -Wert) – die Konzentration an Kompetitor, welche die spezifische Markerbindung um 50 % vermindert – ermittelt. Über die Cheng-Prusoff-Gleichung¹²⁶ wurden daraus die entsprechenden K_i -Werte berechnet. Die erhaltenen K_i -Werte der untersuchten Substanzen sind in Tab. 22 angegeben.

Bei den in kompetitiven MS-Bindungsexperimenten untersuchten SERT-Inhibitoren handelte es sich um Verbindungen mit unterschiedlichen Affinitäten zum Transporter: Darunter waren tricyclische Antidepressiva (TCAs), wie Amitriptylin (**8**), Clomipramin (**10**), Desipramin (**11**), Doxepin (**12**), Imipramin (**2**) und Nortriptylin (**14**), das tetracyclische Antidepressivum Maprotilin (**13**), selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRIs), wie Paroxetin (**6**) und Citalopram (**rac-4**), der selektive Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitor (SNRI) Venlafaxin (**16**), die antipsychotischen Wirkstoffe Chlorpromazin (**9**) und Pimozid (**15**) und auch das Substrat des Transporters Serotonin (5-HT, **1**). Betrachtet man die in Tab. 22 für die untersuchten Verbindungen erhaltenen K_i -Werte, so ergibt sich folgende Reihenfolge der Affinitäten zu hSERT: Die höchste Affinität zum Transporter wies Paroxetin (**6**) mit einem K_i -Wert von 171 ± 17 pM auf. Zu erwähnen ist, dass dieser Wert sehr gut mit dem zu Beginn meiner Arbeit in Radioligandbindungsstudien ermittelten K_d -Wert von 160 pM für die Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) an hSERT übereinstimmt. Mit geringeren Affinitäten folgen auf Paroxetin (**6**) Clomipramin (**10**), Imipramin (**2**), Citalopram (**rac-4**), Amitriptylin (**8**), Venlafaxin (**16**), Nortriptylin (**14**), Desipramin (**11**), Chlorpromazin (**9**), Doxepin (**12**), Pimozid (**15**), Serotonin (**1**) und schließlich Maprotilin (**13**), für welches ein K_i -Wert von 10.7 ± 0.9 μ M bestimmt wurde.

Tab. 22 Affinitäten (K_i -Werte) der in kompetitiven MS-Bindungsstudien mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] als Marker untersuchten Inhibitoren (Mittelwerte \pm SEM, $n = 3-6$) im Vergleich mit literaturbekannten Werten aus Radioligandbindungsstudien mit [^3H]Imipramin (Mittelwerte \pm SEM, $n \geq 3$)⁷³ an hSERT.

Inhibitor	K_i (in nM)	
	MS-Bindung	Radioligandbindung ⁷³
Amitriptylin (8)	3.57 \pm 0.95	4.30 \pm 0.12
Chlorpromazin (9)	133 \pm 5	-
Citalopram (<i>rac</i> -4)	1.72 \pm 0.33	1.16 \pm 0.01
Clomipramin (10)	0.332 \pm 0.066	0.28 \pm 0.01
Desipramin (11)	34.3 \pm 3.7	17.6 \pm 0.7
Doxepin (12)	135 \pm 12	68 \pm 1
Imipramin (2)	1.65 \pm 0.35	1.40 \pm 0.03
Maprotilin (13)	10700 \pm 900	5800 \pm 200
Nortriptylin (14)	13.6 \pm 1.5	18 \pm 1
Paroxetin (6)	0.171 \pm 0.017	0.13 \pm 0.01
Pimozid (15)	1150 \pm 150	-
Serotonin (5-HT, 1)	2230 \pm 290	-
Venlafaxin (16)	5.28 \pm 0.82	8.9 \pm 0.3

Vergleich der in kompetitiven MS-Bindungsexperimenten für eine Serie von SERT-Inhibitoren erhaltenen K_i -Werte mit Ergebnissen aus literaturbekannten Radioligandbindungsstudien

Die in den kompetitiven MS-Bindungsstudien an hSERT mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] als Marker für eine Serie bekannter SERT-Inhibitoren ermittelten K_i -Werte sollten mit in der Literatur für die untersuchten Verbindungen publizierten Affinitäten verglichen werden, um zu belegen, dass der entwickelte MS-Bindungsassay valide Daten liefert. Bindungsstudien an SERT sind in der Literatur vielfach dargestellt. Wie bereits in der

Zielsetzung beschrieben, wurden in derartigen Untersuchungen meist Radioliganden wie [³H]Citalopram⁷⁴, [³H]Imipramin⁷³ und [³H]Paroxetin⁷⁶ eingesetzt. Ein Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Studien ist aufgrund unterschiedlicher Assaybedingungen meist schwierig. Da Tatsumi et al.⁷³ ihre Untersuchungen ebenfalls mit Membranpräparationen stabil hSERT exprimierender HEK-293 Zellen durchführten und auch den gleichen Inkubationspuffer wie in den MS-Bindungsstudien verwendeten, erschien es sinnvoll, die von dieser Forschergruppe in Radioligandbindungsstudien für SERT-Inhibitoren ermittelten K_i -Werte mit meinen Ergebnissen zu vergleichen.

In Tab. 22 sind die von Tatsumi et al.⁷³ und die in MS-Bindungsassays ermittelten K_i -Werte für die untersuchten Inhibitoren gegenübergestellt. In beiden Studien ist Paroxetin (**6**) die Verbindung mit der höchsten und Maprotilin (**13**) die Verbindung mit der niedrigsten Affinität zu hSERT. Auch bezüglich der Affinitätsabstufung der weiteren untersuchten Inhibitoren ergibt sich in beiden Studien eine gute Übereinstimmung. Jedoch stimmen sowohl die ermittelten K_i -Werte als auch die Reihenfolge der Affinitäten dabei nicht exakt überein. Die Unterschiede können eventuell darauf zurückgeführt werden, dass in den Studien unterschiedliche Markerverbindungen eingesetzt wurden, deren Bindungsstellen am Transporter sich womöglich unterscheiden. Zudem können auch kleine Unterschiede der Assaybedingungen ausschlaggebend sein. Im Großen und Ganzen stimmen die Ergebnisse beider Studien aber dennoch sehr gut überein. Dies ist auch aus Abb. 65 gut ersichtlich, in der die jeweils ermittelten pK_i -Werte der untersuchten Inhibitoren gegeneinander aufgetragen sind. Die aus diesem graphischen Vergleich resultierende Gerade ($y = 0.9393x + 0.5527$) mit einer Steigung nahe 1 und einem linearen Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9920$ bestätigt die gute Korrelation der Werte der beiden Methoden und zeigt, dass der entwickelte kompetitive MS-Assay für hSERT zur Bestimmung der Affinität von Inhibitoren und somit auch als Screeningtechnik auf der Suche nach neuen potentiellen Wirkstoffen geeignet ist.

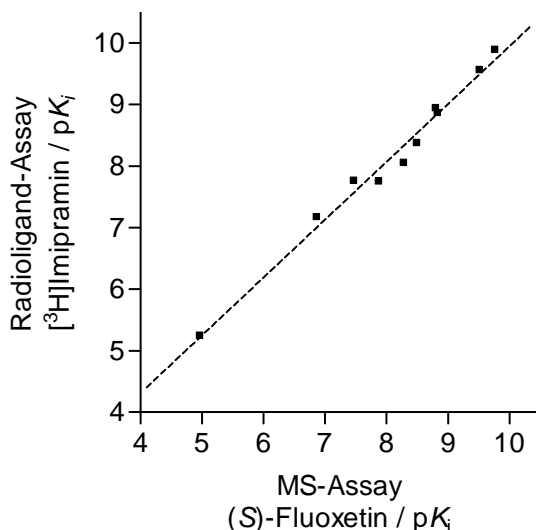


Abb. 65 Graphischer Vergleich der in kompetitiven (S)-Fluoxetin [(S)-3] MS-Bindungsassays (x) und [³H]Imipramin Radioligandbindungsassays⁷³ (y) ermittelten pK_i-Werte für eine Serie von 10 SERT-Inhibitoren. Datenpunkte stellen Mittelwerte aus den MS-Bindungsassays (n = 3–6) und den Radioligandbindungsassays (n ≥ 3) dar. Resultierende Geradengleichung: $y = 0.9393x + 0.5527$ ($r = 0.9920$).

3.3.4.4 Untersuchung der Bindung von (R)-Fluoxetin

Die zur Quantifizierung von Fluoxetin entwickelte und unter Einsatz von (S)-Fluoxetin [(S)-3] validierte LC-MS/MS Methode erlaubt selbstverständlich die Quantifizierung beider Enantiomere, das heißt sowohl von (S)- [(S)-3] als auch von (R)-Fluoxetin [(R)-3]. Da auch das (R)-Enantiomer (R)-3 kommerziell verfügbar war, war es ohne nennenswerten Aufwand möglich, die für das (S)-Enantiomer (S)-3 etablierten Bindungsassays auf das (R)-Enantiomer (R)-3 zu übertragen. In der Literatur sind bislang nur indirekte Untersuchungen der Bindung des (S)- (S)-3 und des (R)-Enantiomers (R)-3 von Fluoxetin an hSERT beschrieben. Wong et al.¹¹⁸ untersuchten unter Verwendung von Rattencortexpräparationen die Enantiomere in [³H]5-HT Uptake-Experimenten und in kompetitiven Bindungsstudien mit [³H]Fluoxetin als Radioligand; in beiden Fällen deutete sich für (S)-Fluoxetin [(S)-3] eine geringfügig höhere Potenz als für (R)-Fluoxetin [(R)-3] an. Koch et al.⁷⁶ untersuchten ebenfalls beide Enantiomere in kompetitiven Bindungsexperimenten – allerdings mit dem Radioliganden [³H]Paroxetin und unter Verwendung von stabil hSERT exprimierenden HEK-293 Zellen. Dabei erzielte die Gruppe vergleichbare Ergebnisse wie Wong et al.

In meinen Studien beabsichtigte ich, mit dem (*R*)-Enantiomer **(*R*)-3** zunächst Sättigungsexperimente durchzuführen. Anschließend sollte das (*R*)-Enantiomer **(*R*)-3** auch als Marker in kompetitiven Untersuchungen an hSERT dienen. Von den Ergebnissen wurde erhofft, dass sie bezüglich der Bindemodi der Enantiomere an hSERT Hinweise liefern, die mit den von Zhou et al.⁵⁴ publizierten Daten aus Cokristallstrukturen von LeuT mit (*S*)- **[(*S*)-3]** beziehungsweise (*R*)-Fluoxetin **[(*R*)-3]** korrelieren, welche für die Fluoxetin-Enantiomere unterschiedliche Bindemodi an LeuT ergaben.

Ergebnisse aus Sättigungsexperimenten mit (*R*)-Fluoxetin als Marker

Die Durchführung der Sättigungsexperimente an hSERT mit (*R*)-Fluoxetin **[(*R*)-3]** als nativem Marker erfolgte analog der Vorgehensweise in Sättigungsexperimenten mit dem (*S*)-Enantiomer **(*S*)-3**. Es wurde folglich ein Inkubationsvolumen von 1000 μL gewählt, um die Markergesamtbindung auch bei den niedrigsten eingesetzten Konzentrationen von (*R*)-Fluoxetin **[(*R*)-3]** im Assay quantifizieren zu können. Die nichtspezifische Markerbindung wurde bei nominalen Assaykonzentrationen von (*R*)-Fluoxetin **[(*R*)-3]** ≥ 15 nM unter Anwesenheit von 10 μM Imipramin (**2**) bestimmt. Die nichtspezifische Bindung bei nominalen Assaykonzentrationen < 15 nM wurde mit Hilfe der durch lineare Regression aus der experimentell ermittelten nichtspezifischen Bindung im Konzentrationsbereich zwischen 15 nM und 75 nM erhaltenen Geraden extrapoliert.

Die in einem repräsentativen Sättigungsexperiment ermittelte Gesamt- und nichtspezifische Bindung von (*R*)-Fluoxetin **[(*R*)-3]** ist in Abb. 66a dargestellt. Eine aus diesen Daten nach Berechnung der spezifischen Markerbindung resultierende Sättigungsisotherme für die Bindung von (*R*)-Fluoxetin **[(*R*)-3]** an hSERT zeigt Abb. 66b.

Mehrfach durchgeführte Sättigungsexperimente an hSERT mit (*R*)-Fluoxetin **[(*R*)-3]** als nativem Marker führten zu einem K_d -Wert von 5.2 ± 0.9 nM und einem B_{max} -Wert von 18.8 ± 3.8 pmol mg^{-1} Protein (Mittelwert \pm SEM, $n = 5$).

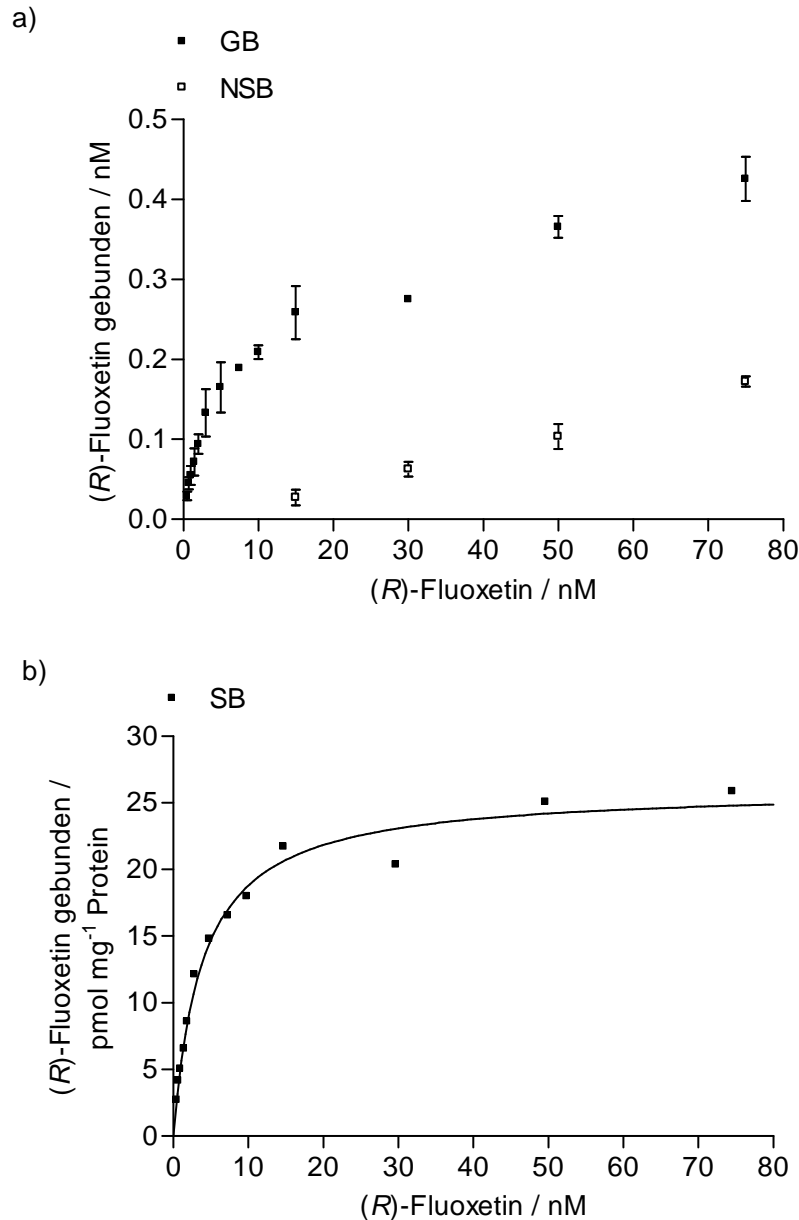


Abb. 66 Sättigungsexperiment mit (R)-Fluoxetin [(R)-3] als Marker an hSERT a) Mittelwerte \pm SD (berechnet aus Triplikaten) angeben als Konzentration für Gesamt- (GB) und nichtspezifische Bindung (NSB) von (R)-Fluoxetin [(R)-3] aus über LC-MS/MS vermessenen Proben eines repräsentativen Sättigungsexperimentes. b) Aus den Daten von a) berechnete spezifische Bindung (SB) von (R)-Fluoxetin [(R)-3] an hSERT angegeben in pmol mg⁻¹ Protein und daraus resultierende Sättigungsisotherme. Konzentrationen der nichtspezifische Bindung < 15.6 pM (das heißt < 50 pM in der über LC-MS/MS zu analysierenden Probe) wurden durch Extrapolation aus der nach linearer Regression erhaltenen Gerade der experimentell ermittelten nichtspezifischen Bindung bei nominalen (R)-Fluoxetin-Konzentrationen \geq 15 nM bestimmt.

Ergebnisse aus Wettbewerbsexperimenten mit (*R*)-Fluoxetin als Marker

Um zu überprüfen, ob sich die K_i -Werte untersuchter SERT-Inhibitoren ändern, wenn als nativer Marker in kompetitiven Bindungsexperimenten (*R*)- [(**R**)-3] statt (*S*)-Fluoxetin [(**S**)-3] eingesetzt wird, sollten auch kompetitive Studien mit dem (*R*)-Enantiomer (**R**)-3 als Marker durchgeführt werden.

Die kompetitiven Untersuchungen mit (*R*)-Fluoxetin [(**R**)-3] als nativem Marker erfolgten in Analogie zu den entsprechenden Studien mit dem (*S*)-Enantiomer (**S**)-3. Allerdings wurde im Assay eine Markerkonzentration von 10 nM eingesetzt. Diese wurde aufgrund der wegen publizierter Daten zunächst angenommenen niedrigeren Affinität dieses Enantiomers zum Transporter gewählt. Da die Markerkonzentration in der Cheng-Prusoff-Gleichung¹²⁶ berücksichtigt wird, hat die Konzentrationsänderung jedoch keinen Einfluss auf die K_i -Werte der untersuchten Verbindungen. In den MS-Kompetitionsexperimenten mit (*R*)-Fluoxetin [(**R**)-3] als Marker wurden die fünf SERT-Inhibitoren Citalopram (**rac-4**), Desipramin (**11**), Doxepin (**12**), Nortriptylin (**14**) und Serotonin (**1**), welche unterschiedliche Strukturen und nach den bisher ermittelten Ergebnissen K_i -Werte zwischen dem niedrigen nanomolaren bis zum micromolaren Konzentrationsbereich aufweisen, untersucht. Die in diesen Experimenten ermittelten K_i -Werte sind in Tab. 23 angegeben.

Tab. 23 Affinitäten (K_i -Werte) der in kompetitiven Bindungsstudien mit den nativen Markern (*R*)-Fluoxetin [(**R**)-3] und (*S*)-Fluoxetin [(**S**)-3] untersuchten Inhibitoren für hSERT. K_i -Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (n = 3–6) angegeben.

Inhibitor	K_i (in nM)	
	(<i>R</i>)-Fluoxetin [(R)-3]	(<i>S</i>)-Fluoxetin [(S)-3]
Citalopram (rac-4)	1.05 \pm 0.07	1.72 \pm 0.33
Desipramin (11)	29.5 \pm 1.0	34.3 \pm 3.7
Doxepin (12)	118 \pm 5	135 \pm 12
Nortriptylin (14)	13.6 \pm 1.3	13.6 \pm 1.5
Serotonin (5-HT, 1)	1910 \pm 120	2230 \pm 290

Mit einem K_i -Wert von 1.05 ± 0.07 nM zeigte Citalopram (**rac-4**) in den Untersuchungen die höchste Affinität zu hSERT, gefolgt von Nortriptylin (**14**) mit 13.6 ± 1.3 nM, Desipramin (**11**) mit 29.5 ± 1.0 nM, Doxepin (**12**) mit 118 ± 5 nM und dem Substrat des Transporters Serotonin (**1**) mit einem K_i -Wert von 1.91 ± 0.12 μ M.

3.3.4.5 Vergleich von (S)- und (R)-Fluoxetin bezüglich ihrer Bindung an hSERT

Eine Gegenüberstellung der in MS-Sättigungsexperimenten erhaltenen K_d - und B_{max} -Werte für die Bindung von (S)- [(**S**)-**3**] und (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] an hSERT ist in Tab. 24 gegeben.

Tab. 24 Ergebnisse aus MS-Sättigungsexperimenten mit (S)- [(**S**)-**3**] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] als Marker (Mittelwerte \pm SEM, n = 5 beziehungsweise n = 13).

	(S)-Fluoxetin [(S)- 3]	(R)-Fluoxetin [(R)- 3]
K_d (in nM)	4.4 ± 0.4	5.2 ± 0.9
B_{max} (in pmol mg ⁻¹ Protein)	26.9 ± 5.7	18.8 ± 3.8

Mit einem K_d -Wert von 4.4 ± 0.4 nM im Vergleich zu einem K_d -Wert von 5.2 ± 0.9 nM scheint das (S)-Enantiomer (**S**)-**3** das potentere der beiden zu sein. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den von Koch et al. publizierten Resultaten aus kompetitiven Bindungsstudien mit [³H]Paroxetin (**5**) überein, welche einen K_i -Wert von 6.1 ± 0.3 nM für (S)- [(**S**)-**3**] und von 7.7 ± 1.0 nM für (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] deklarieren.⁷⁶ Eine statistische Untersuchung meiner Ergebnisse ergab jedoch, dass sich die in MS-Bindungsexperimenten für beide Enantiomere ermittelten K_d -Werte nicht signifikant unterscheiden (t -Test, $\alpha = 0.05$). Daher sind (S)- [(**S**)-**3**] und (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] als equipotent bezüglich ihrer Bindung an hSERT zu betrachten. Aus Tab. 24 gehen mit 26.9 ± 5.7 pmol mg⁻¹ Protein für (S)- [(**S**)-**3**] und 18.8 ± 3.8 pmol mg⁻¹ Protein für (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] unterschiedliche B_{max} -Werte für die Enantiomere hervor. Diesbezüglich muss bedacht werden, dass in den Untersuchungen Membranpräparationen unterschiedlicher Chargen der stabil hSERT exprimierenden HEK-293 Zellen verwendet wurden, welche sich bezüglich der Targetexpression stark unterscheiden können. In Sättigungsexperimenten, in welchen (S)- [(**S**)-**3**] und (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] parallel unter Verwendung der gleichen Membranpräparation untersucht wurden, ergab sich kein Unterschied in den

ermittelten B_{\max} -Werten. Die Ergebnisse lassen folglich darauf schließen, dass sich die Anzahl der Bindestellen im Targetmaterial für beide Enantiomere nicht unterscheiden.

Eine Gegenüberstellung der in kompetitiven MS-Bindungsexperimenten mit (S)-[(S)-3] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(R)-3] als nativen Markern für einer Serie von fünf SERT-Inhibitoren ermittelten K_i -Werte ist in Tab. 23 gegeben. Ein Vergleich der Werte zeigt nur geringfügige Abweichungen und auch die Rangfolge der untersuchten Verbindungen bezüglich ihrer Affinität zu hSERT ist in beiden Versuchsreihen gleich. In Abb. 67 sind zwei repräsentative Kompetitionskurven für die Bindung von Nortriptylin (14) an hSERT, welche in MS-Kompetitionsexperimenten mit (S)-[(S)-3] beziehungsweise mit (R)-Fluoxetin [(R)-3] als Marker erhalten wurden, dargestellt. Aus der Abbildung geht eindeutig hervor, dass sich die für Nortriptylin (14) ermittelten Bindungskurven aus beiden Experimenten trotz unterschiedlicher Marker kaum unterscheiden.

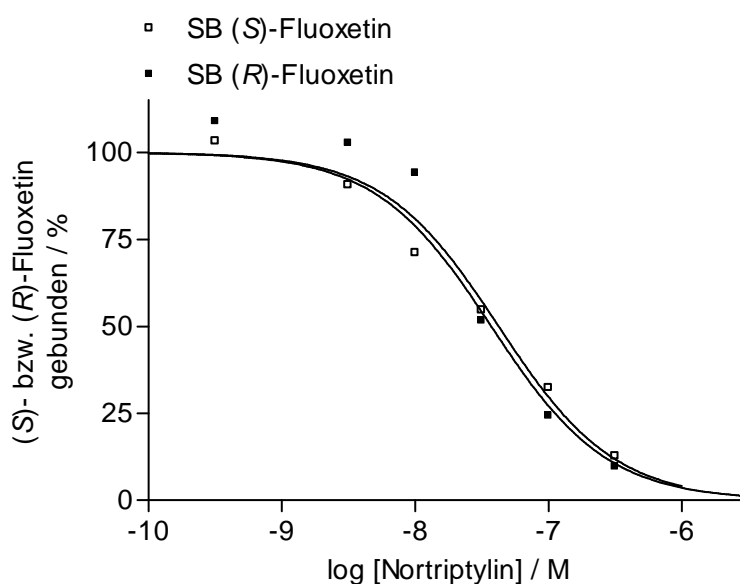


Abb. 67 Kompetitionskurven für Nortriptylin (14) an hSERT aus kompetitiven MS-Bindungsassays mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(R)-3] als Marker (Markerkonzentration: 5 nM). Datenpunkte stellen Mittelwerte ($n = 3$) der spezifischen (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin-Bindung (SB) in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Nortriptylin (14) (316 pM – 316 nM) aus jeweils einem repräsentativen Experiment dar. Das obere und das untere Plateau der Kurve wurde auf 100 % beziehungsweise 0 % normiert.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Versuchsreihen verdeutlicht auch die graphische Darstellung in Abb. 68. Dabei sind die in den kompetitiven Untersuchungen mit (S)- [(S)-3] und (R)-Fluoxetin [(R)-3] als Marker erhaltenen pK_i -Werte für die fünf untersuchten Inhibitoren gegeneinander aufgetragen. Die resultierende Gerade ($y = 1.023x + 0.0985$) mit einer Steigung von 1.023 und einem linearen Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9990$ demonstriert die sehr gute Übereinstimmung der für die untersuchten Verbindungen ermittelten Affinitäten.

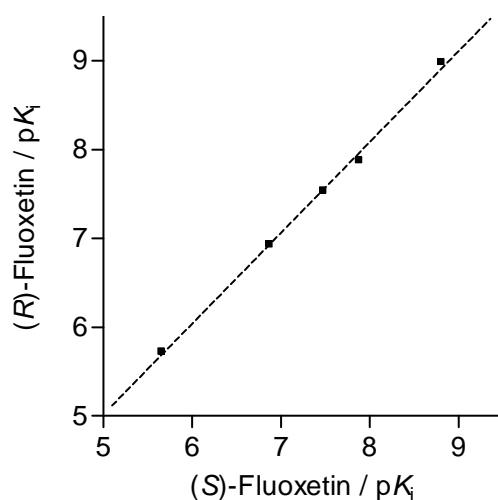


Abb. 68 Graphischer Vergleich der in kompetitiven MS-Bindungsstudien mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] (x) und (R)-Fluoxetin [(R)-3] (y) als Marker ermittelten pK_i -Werte für eine Serie von fünf SERT-Inhibitoren. Datenpunkte stellen Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten ($n = 3-6$) dar. Resultierende Geradengleichung: $y = 1.023x + 0.0985$ ($r = 0.9988$).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Cokristallstrukturen von LeuT mit (S)- [(S)-3] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(R)-3] zwar unterschiedliche Bindemodi der beiden Enantiomere an LeuT aufzeigen⁵⁴, die in meiner Arbeit mittels MS-Sättigungs- und MS-Kompetitionsexperimenten mit (S)- [(S)-3] und (R)-Fluoxetin [(R)-3] als nativen Markern erhaltenen Daten lassen jedoch keine Entscheidung zu, ob dies auch für die Bindung der Fluoxetin-Enantiomere an hSERT gilt.

4 Zusammenfassung

Der Serotonin-Transporter (SERT) ist ein pharmakologisch äußerst wichtiges Target in der Therapie psychischer Erkrankungen wie Depressionen, Angstzuständen und Zwangsneurosen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von MS-Bindungsassays für diesen Neurotransmittertransporter, der gegenwärtig intensiv beforscht wird. In diesen Untersuchungen wird ein gebundener, nativer Marker massenspektrometrisch quantifiziert. Die in Analogie zu klassischen Radioligandbindungsstudien durchgeführten MS-Bindungsstudien können im 96-Well Format als Label-freie Screeningtechnik in der Wirkstoffentwicklung auf der Suche nach neuen, potenten SERT-Inhibitoren eingesetzt werden.

Expression des Serotonin-Transporters in HEK-293 Zellen

Im ersten Teil der Arbeit wurde das für meine Untersuchungen erforderliche Target – der Serotonin-Transporter – heterolog in HEK-293 Zellen exprimiert. Die Arbeit mit kloniertem Material wurde aufgrund höherer Expressionsraten und der Abwesenheit anderer – möglicherweise störender – Transporter als vorteilhafter gegenüber der Verwendung von nativem Material erachtet.

Mit zwei verschiedenen Vektorsystemen (pcDNA3.1(+), pCMV6-Entry), welche bereits die für hSERT kodierende cDNA enthielten und welche beide für eine Expression des Proteins in Säugerzellen geeignet waren, wurden zunächst transiente Transfektionsversuche durchgeführt. Zur Überprüfung der Transporterexpression wurden ausgehend von Literaturbedingungen^{77,88} Radioligandbindungsstudien mit [³H]Paroxetin (**5**) als Testsystem etabliert. Mittels dieses Testsystems konnte in den transienten Transfektionsversuchen die Expression des Transporters in HEK-293 Zellen nachgewiesen und die Funktionsfähigkeit beider Vektoren bestätigt werden.

Da in den anvisierten MS-Bindungsstudien mit einem einheitlichen Wirts-Vektor-System gearbeitet werden sollte, wurden in einem nächsten Schritt HEK-293 Zellen stabil transfiziert. Durch das [³H]Paroxetin-Testsystem konnte der jeweils leistungsfähigste Klon nach Transfektion mit pcDNA3.1(+)-hSERT beziehungsweise pCMV6-Entry-hSERT, welcher stabil hSERT exprimierte, identifiziert werden. Die

erhaltenen stabilen Zelllinien wurden auch in Sättigungsexperimenten mit [³H]Paroxetin (**5**) charakterisiert. Die in den Untersuchungen ermittelten K_d -Werte von 160 pM (Transfektion mit pcDNA3.1(+)-hSERT) beziehungsweise 140 pM (Transfektion mit pCMV6-Entry-hSERT) für die Bindung des Radioliganden **5** an den Transporter stimmen sehr gut mit in der Literatur publizierten Daten⁸⁹ überein und bestätigen damit die Expression von hSERT in den beiden Zelllinien. Für die geplanten MS-Bindungsstudien wurde die Zelllinie, welche mit pcDNA3.1(+)-hSERT stabil transfiziert worden war, ausgewählt. Diese hat den Vorteil, dass sie den unveränderten humanen Transporter exprimiert. Im Unterschied dazu, führte die Transfektion der Zellen mit pCMV6-Entry-hSERT zu einem Transporter mit zusätzlichen Affinitätstags am C-terminalen Proteinende, deren Kodierung im Vektorsystem enthalten war. Auch wenn diese Tags die Transporterfunktion für gewöhnlich nicht beeinflussen, sollte gleichwohl kein Risiko eingegangen werden.

LC-MS/MS Methodenentwicklung und Methodvalidierung zur Markerquantifizierung in MS-Bindungsstudien für hSERT

Im zweiten Teil meiner Arbeit sollte ein geeigneter Marker für die anvisierten Bindungsstudien ausgewählt und im weiteren Verlauf dann eine schnelle und sensitive LC-MS/MS Methode für dessen Quantifizierung entwickelt werden. Die Anforderungen, die an den Marker gestellt wurden, waren eine hohe Affinität und Selektivität für den Serotonin-Transporter und zudem sollte er über LC-MS/MS mindestens bis zu niedrigen picomolaren Konzentrationen quantifiziert werden können. Als Marker wurden entsprechend der Anforderungen die selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren Paroxetin (**6**) und Fluoxetin (*rac-3*) in Betracht gezogen.

Am Massenspektrometer API 3200 (AB Sciex) wurde zunächst für Paroxetin (**6**) eine LC-MS/MS Methode entwickelt. Durch eine Chromatographie auf einer 50 mm langen RP8 Säule mit einem Dreikomponentenfließmittel aus Acetonitril, Methanol und Ammoniumformiatpuffer konnte bei einem isokratischen Fluss von 300 µL/min eine Retentionszeit des Analyten von 1.2 min erzielt werden. Da keine dem Paroxetin (**6**) analoge deuterierte Verbindung als interner Standard zur Verfügung stand, war eine Quantifizierung in Matrixproben mit dieser Methode allerdings nicht

möglich. Zudem konnte auch nicht die für MS-Bindungsstudien geforderte Sensitivität erzielt werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit erfolgte daher die Fokussierung auf Fluoxetin (**rac-3**) als nativen Marker für die MS-Bindungsstudien (siehe Abb. 69). Eine von mir für Fluoxetin neu etablierte LC-MS/MS Quantifizierungsmethode mit [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (**rac-7**) als internem Standard (siehe Abb. 69) am Massenspektrometer API 5000 (AB Sciex) führte durch eine Chromatographie auf einer nur 20 mm langen RP18 Säule mit einem Fließmittel aus Acetonitril und Ammoniumbicarbonatpuffer bei einem isokratischen Fluss von 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ zu einer Retentionszeit des Analyten von nur 43 s. Durch den trotz der kurzen Retentionszeit erzielten hohen k -Faktor von 5.3 war durch die Chromatographie sichergestellt, dass unerwünschte Matrixbestandteile der Proben in ausreichendem Maße vom Analyten abgetrennt wurden. In Matrixproben konnte mit dieser Methode ein LLOQ für Fluoxetin von 50 pM erzielt werden. Mit einer chromatographischen Laufzeit von 60 s und zusätzlichen 30 s, welche der verwendete Autosampler für die Aufnahme und Injektion der Probe benötigte, ist es mit der neuen Quantifizierungsmethode möglich, bis zu 600 Proben über Nacht zu vermessen. Dies stellt ein sehr gutes Ergebnis bezüglich des Probendurchsatzes dar.

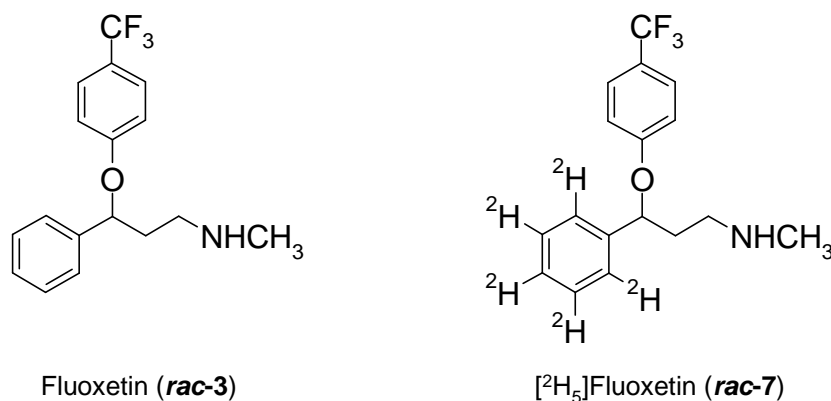


Abb. 69 Fluoxetin (**rac-3**) und [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (**rac-7**)

Die neue Methode wurde gemäß der *FDA Guidance*⁸⁰ zur Validierung bioanalytischer Methoden für Analytkonzentrationen zwischen 50 pM und 3 nM in Matrixproben validiert. Die Validierung zeigte, dass innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches sowohl die von der *FDA Guidance*⁸⁰ geforderten Kriterien

bezüglich der Linearität als auch bezüglich *Intra-Series* und *Inter-Series* Richtigkeit und Präzision erfüllt sind.

Mit Blick auf Sensitivität und Schnelligkeit ist die entwickelte Methode allen bisher publizierten LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung von Fluoxetin in biologischen Matrices überlegen. Durch Übertragung der LC-MS/MS Methode auf andere RP18 Säulen unterschiedlicher Länge und entsprechende Validierungsuntersuchungen konnte in meiner Arbeit zusätzlich die Vielseitigkeit und Robustheit der neuen Methode eindrucksvoll demonstriert werden.

Entwicklung von MS-Bindungsstudien für den Serotonin-Transporter mit (S)- und (R)-Fluoxetin als nativen Markern

Nachdem eine stabil hSERT exprimierende HEK-293 Zelllinie als Targetquelle und eine schnelle und äußerst sensitive LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin etabliert war, konnten schließlich im letzten Teil der Arbeit MS-Bindungsassays für hSERT mit Fluoxetin als nativem Marker entwickelt werden. Die MS-Bindungsstudien machten es erstmals möglich, die Bindung dieses selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitors an hSERT sowohl in Sättigungs- und Kompetitions-experimenten als auch in kinetischen Untersuchungen direkt zu charakterisieren. Da Fluoxetin eine racemische Verbindung ist und Bindungsstudien aussagekräftiger sind, wenn sie mit einer enantiomerenreinen Verbindung durchgeführt werden, wurden in meiner Arbeit die Untersuchungen an hSERT mit dem in der Literatur als potenter beschriebenen (S)-Fluoxetin [(S)-3] als Marker etabliert.

Die Versuchsbedingungen (Inkubationspuffer: 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4, Inkubationstemperatur: 22 °C, Inkubationszeit: 2 h) für MS-Bindungsstudien an hSERT wurden entsprechend der zuvor durchgeführten Radioligand-bindungsstudien mit [³H]Paroxetin und entsprechend literaturbekannter Untersuchungen mit [³H]Fluoxetin¹²¹ gewählt. Die Durchführung der Experimente erfolgte in Analogie zu den von Zepperitz⁷⁹ etablierten MS-Bindungsassays für mGAT1: Nach der Inkubation von Marker und Target (HEK-hSERT Membranpräparation) wurde freier von gebundenem Marker durch Filtration getrennt und der auf dem Filter verbliebene Target-Marker-Komplex mehrfach gewaschen

und anschließend getrocknet. Zur vollständigen Denaturierung wurde darauf folgend das Targetprotein mit Methanol behandelt. Durch anschließendes Absaugen der methanolischen Lösung wurde vormals ans Target gebundener Marker eluiert. Der freigesetzte Marker wurde danach mittels der entwickelten LC-MS/MS Methode quantifiziert.

Der in einer Serie von MS-Sättigungsexperimenten für die Bindung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT ermittelte K_d -Wert von 4.4 ± 0.4 nM stimmt sehr gut mit publizierten Daten für die Bindung von [3 H]Fluoxetin⁹⁹ an den Transporter überein (siehe Tab. 25).

Tab. 25 Vergleich der Ergebnisse aus MS- beziehungsweise Radioligand-Sättigungsexperimenten an hSERT mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] (Mittelwert \pm SEM, n = 13) beziehungsweise [3 H]Fluoxetin (Mittelwert \pm SD, n = 3)⁹⁹ als Marker.

	(S)-Fluoxetin [(S)-3]	[3 H]Fluoxetin ⁹⁹
K_d (in nM)	4.4 ± 0.4	6.7 ± 2.1
B_{max} (in pmol mg ⁻¹ Protein)	26.9 ± 5.7	-

In kinetischen Untersuchungen konnte mittels des neu entwickelten MS-Bindungsassays die Assoziations- und Dissoziationskinetik des (S)-Fluoxetin-hSERT-Komplexes erstmals direkt untersucht werden. In Tab. 26 sind die in den Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse für die Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs} , k_{+1} , k_{-1}) und Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) den literaturbekannten Daten für die Bindung von racemischem Fluoxetin (*rac*-3) an hSERT, welche in indirekten kompetitiven Radioliganddissoziationsexperimenten mit [3 H]-(S)-Citalopram⁹¹ erhalten worden waren, gegenübergestellt. Wie aus dem Vergleich hervor geht, stimmen die Werte sehr gut überein.

Tab. 26 Vergleich der in kinetischen MS-Bindungsstudien mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] an hSERT ermittelten Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) und Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs} , k_1 , k_{+1}) sowie der daraus ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ($K_d = k_{-1}/k_{+1}$) mit den von Martin et al.⁹¹ in kompetitiven Dissoziationsexperimenten mit [³H]-(S)-Citalopram ermittelten Werten für **rac-3**. Ergebnisse aus MS-Bindungsstudien stellen Mittelwerte \pm SEM ($n = 3$) dar. Ergebnisse von Martin et al.⁹¹ sind als Mittelwerte \pm SD ($n = 2-6$) angegeben.

	MS-Bindungsstudien	Martin et al. ⁹¹
k_{obs} (in s^{-1})	0.0078 ± 0.0009	-
k_1 (in s^{-1})	0.0032 ± 0.0002	0.003 ± 0.0004
k_{+1} (in $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$0.92 \pm 0.17 \times 10^6$	$0.91 \pm 0.12 \times 10^6$
K_d (in nM)	3.5	3.31
$t_{1/2}$ (Assoziation; in s)	91 ± 11	-
$t_{1/2}$ (Dissoziation; in s)	220 ± 10	221 ± 27

In kompetitiven Untersuchungen wurde schließlich die Eignung der für hSERT entwickelten MS-Bindungsassays zur Bestimmung der Affinität verschiedener Inhibitoren des Transporters untersucht. Die in den MS-Bindungsstudien für eine Serie von 10 SERT-Inhibitoren ermittelten Affinitäten wurden anschließend mit in der Literatur publizierten Daten aus Radioligandbindungsstudien mit [³H]Imipramin⁷³ verglichen. Die hervorragende Übereinstimmung der von mir erhaltenen Ergebnisse mit Literaturdaten wird in Abb. 70 durch die Korrelation von in MS-Bindungsassays und in Radioligandbindungsassays ermittelten pK_i -Werten für die getesteten Verbindungen demonstriert. Die aus dem Vergleich (pK_i [³H]Imipramin⁷³ (y); pK_i (S)-Fluoxetin (x)) resultierende Gerade ist dabei durch eine Steigung von 0.9393 und einen linearen Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9920$ charakterisiert.

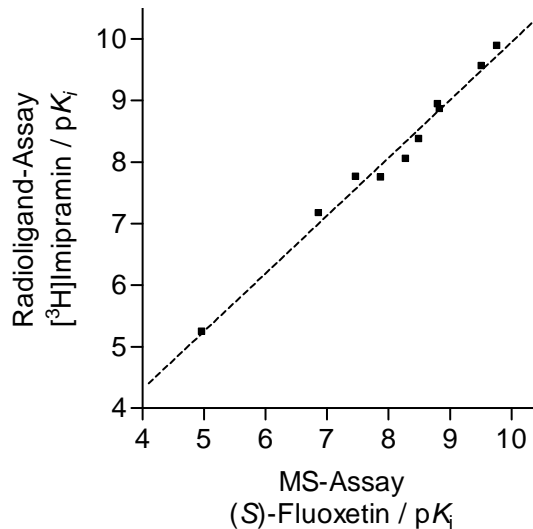


Abb. 70 Graphischer Vergleich der in kompetitiven (S)-Fluoxetin [(S)-3] MS-Bindungsassays (x) und [³H]Imipramin Radioligandbindungsassays⁷³ (y) ermittelten pK_i-Werte für eine Serie von 10 SERT-Inhibitoren. Datenpunkte stellen Mittelwerte aus den MS-Bindungsassays (n = 3 - 6) und den Radioligandbindungsassays (n ≥ 3) dar. Resultierende Geradengleichung: $y = 0.9393x + 0.5527$ ($r = 0.9920$).

Für die mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] als nativem Marker etablierten MS-Bindungsstudien für hSERT konnte folglich in meiner Arbeit gezeigt werden, dass sie sowohl in Sättigungs- und kinetischen als auch in kompetitiven Untersuchungen zu sehr guten Ergebnissen führen. Die gute Korrelation der in kompetitiven MS-Studien ermittelten K_i-Werte für eine Serie untersuchter Inhibitoren mit entsprechenden Ergebnissen aus literaturbekannten Radioligandbindungsstudien belegt die Validität der mit den MS-Bindungsassays erzielten Daten. Als Label-freie Screeningtechnik dürften die für den Serotonin-Transporter entwickelten MS-Bindungsassays auch großes Interesse in der Wirkstoffforschung finden.

Nachdem die LC-MS/MS Methode zunächst für die Quantifizierung von (S)-Fluoxetin [(S)-3] entwickelt worden war, bedeutete es keinen Aufwand, sie auf das (R)-Enantiomer (R)-3 anzuwenden und Bindungsassays analog zum (S)-Enantiomer (S)-3 mit dem (R)-Enantiomer (R)-3 durchzuführen. Mittels dieser MS-Untersuchungen konnten in meiner Arbeit erstmals beide Enantiomere direkt bezüglich ihrer Bindung an den Transporter verglichen werden. Die aus den Untersuchungen resultierenden Daten sollten Aufschluss über möglicherweise unterschiedliche Bindemodi der Enantiomere geben.

Ein Vergleich der für beide Enantiomere in Sättigungsexperimenten ermittelten K_d -Werte (siehe Tab. 27) ergab nach statistischer Auswertung (t -Test, $\alpha = 0.05$), dass sie bezüglich ihrer Bindung an den Serotonin-Transporter equipotent sind. Die in den Versuchsserien erhaltenen B_{max} -Werte (siehe Tab. 27) für die Bindung der Enantiomere unterscheiden sich nur aufgrund der Verwendung verschiedener HEK-hSERT Membranpräparationschargen.

Tab. 27 Vergleich der Ergebnisse aus MS-Sättigungsexperimenten mit (S)- [(S)-3] beziehungsweise mit (R)-Fluoxetin [(R)-3] als nativem Marker (Mittelwerte \pm SEM, $n = 13$ beziehungsweise $n = 5$).

	(S)-Fluoxetin [(S)-3]	(R)-Fluoxetin [(R)-3]
K_d (in nM)	4.4 ± 0.4	5.2 ± 0.9
B_{max} (in pmol mg ⁻¹ Protein)	26.9 ± 5.7	18.8 ± 3.8

In der Durchführung kompetitiver Experimente mit (R)-Fluoxetin [(R)-3] als nativem Marker sollte schließlich untersucht werden, ob sich daraus resultierende K_i -Werte für eine Serie von Inhibitoren von den entsprechenden Werten, welche in Konkurrenzexperimenten mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] als Marker ermittelt wurden, unterscheiden. Die in Abb. 71 gezeigte Korrelation der für fünf verschiedene SERT-Inhibitoren in den kompetitiven Experimenten erhaltenen Affinitäten für hSERT demonstriert nach Auftragen der mit (R)-Fluoxetin [(R)-3] als Marker bestimmten pK_i -Werte gegen die mit (S)-Fluoxetin [(S)-3] bestimmten pK_i -Werte durch eine resultierende Gerade mit einer Steigung von 1.023 mit einem linearen Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9988$ die sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Versuchsreihen.

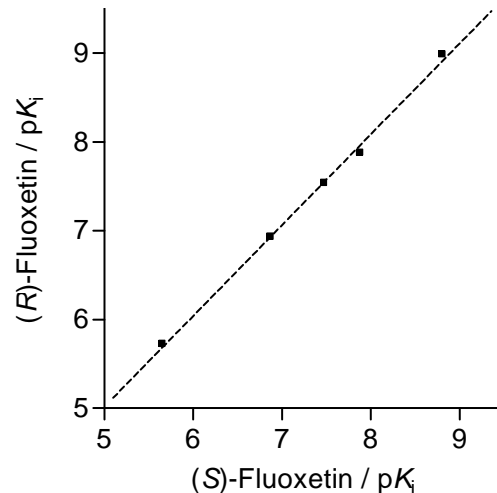


Abb. 71 Graphischer Vergleich der in kompetitiven MS-Bindungsstudien mit (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] (x) und (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] (y) als nativen Markern ermittelten pK_i-Werte für eine Serie von fünf SERT-Inhibitoren. Datenpunkte stellen Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten (n = 3-6) dar. Resultierende Geradengleichung: $y = 1.023x + 0.0985$ ($r = 0.9988$).

Die in Sättigungs- und Konkurrenzexperimenten mittels der neu entwickelten MS-Bindungsassays erhaltenen Daten bezüglich der Bindung von (S)- [(**S**)-**3**] und (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] an den Serotonin-Transporter lieferten in meiner Arbeit folglich keine Hinweise, dass sich die Bindemodi der Enantiomere von Fluoxetin an den Transporter unterscheiden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Bindemodi tatsächlich gleich sind. Möglich wäre, dass die Enantiomere überlappende Bindestellen am Transporter aufweisen, was in kompetitiven Experimenten keine Unterschiede in den für eine Serie von Inhibitoren ermittelten K_i-Werten unter Verwendung des einen oder des anderen Enantiomers als Marker zur Folge hat, wenn auch die Bindestellen dieser Inhibitoren mit den Bindestellen der Marker überlappen. Hinweise, dass sich die Bindemodi der Enantiomere von Fluoxetin am Transporter tatsächlich unterscheiden, ergeben sich aus den von Zhou et al.⁵⁴ gelösten Cokristallstrukturen von LeuT – einem bakteriellen Homolog von SERT – mit (S)- [(**S**)-**3**] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**]; diese Kristallstrukturen lassen nämlich unterschiedliche Bindemodi der Enantiomere am bakteriellen Transporter erkennen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Biologische Methoden

5.1.1 Geräte und Material

Alle verwendeten Salze, Reagenzien und andere Chemikalien waren von handelsüblicher Qualität und wurden – sofern keine weiteren Angaben gemacht sind – von den Firmen Acros, Fluka, Merck, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

Geräte

Sterilbank	Herasafe Klasse 2, Typ H (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Autoklav	VacuLab PL (MMM Medcenter, München, Deutschland)
Brutschrank	HEK-293: Heracell (Heraeus, Hanau, Deutschland) <i>E.coli</i> : Ecocell (MMM Medcenter, München, Deutschland)
Gefrierschränke	-80 °C Gefrierschrank (HFU86, Heraeus, Hanau, Deutschland) -20 °C Gefrierschrank Liebherr Premium (Liebherr, Biberach, Deutschland)
Cryoanlagen (LN ₂)	Cryosystem RS Series (Taylor-Wharton, Theodore, USA) Cryosystem ARPEGE Gas 140 (Air Liquide, München, Deutschland)
Mikrowelle	Moulinex Symbio Grill (Krups, Offenbach, Deutschland)
Elektrophorese	Horizontal Elektrophoresesystem EasyCast (Model B1A) mit Spannungsgerät Consort E385 (Owl Separation Systems, Portsmouth, U.K.)

Geldokumentationsgerät	Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München, Deutschland)
Luminometer	Wallac 1450 MicroBeta TriLux (Perkin-Elmer LAS GmbH, Jügesheim, Deutschland)
Mikroskop	Olympus CK 30 (Olympus Corporation, Hamburg, Deutschland)
Dispergiergerät	Polytron PT A7 (Kinematica Polytron, Littau-Luzern, Schweiz)
UV/VIS-Spektrometer	Ultrospec plus (Schichtdicke b = 1 cm, Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland)
Waagen	Mikrowaage MC21S (max. 21 g, Sartorius, Göttingen, Deutschland) Analysenwaage A210P-OD1 (max. 212 g, Sartorius, Göttingen, Deutschland) Präzisionswaage PG5002-S (max. 5100 g, Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)
Wasserbad	Julabo U3-7A (Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland)
Zentrifugen	Biofuge Stratos (Rotor: #3047, #3331, Heraeus, Hanau, Deutschland) Sorvall Evolution RC (Rotor: SS34, Thermo Electron, Hanau, Deutschland)

E.coli

Stamm XL1-Blue MRF'	$\Delta(\text{mcrA})183$ $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173\text{endA1}$ $\text{supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB}$ $\text{lacIq}\Delta\text{M15 Tn10 (tetr)]}$ (Stratagene, La Jolla, USA)
---------------------	--

Zelllinie

HEK-293 Human embryonic kidney cells, transformiert mit Adenovirus Typ 5 (Ad5) (Prof. Biel, LMU München, Deutschland)

Plasmide

pCMV6-Entry-hSERT OriGene, Rockville, USA

pcDNA3.1(+)-hSERT Dr. Theo Rein (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, Deutschland)

Restriktionsendonukleasen

Dralll, KpnI, NheI, NotI, Scal, XhoI
NEB, Ipswich, USA

DNA-Längenstandard

1 kb Quick-Load™ DNA-Ladder
NEB, Ipswich, USA

Medien, Puffer, Reagenzien

Ampicillin-Stammlösung Ampicillin-Na 50 mg/mL (in H₂O, sterilfiltriert)

Kanamycin-Stammlösung Kanamycin-Monosulfat 50 mg/mL (in H₂O, sterilfiltriert)

Tetracyclin-Stammlösung Tetracyclin-HCl 12 mg/mL (in 70 % Ethanol)

TSS 10 % (v/v) PEG 3350

50 mM MgCl₂

5 % (v/v) DMSO

in LB(+) Medium

autoklaviert

LB-Agarplatten	1 % (m/v) Pepton 0.5 % (m/v) Hefeextrakt 0.05 % (m/v) NaCl 0.1 % (m/v) D-(+)-Glucose 1.5 % (m/v) Agar in H ₂ O autoklaviert; anschließende Antibiotikum-Zugabe bei ca. 50 °C → Endkonzentration 50 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin oder 12 µg/mL Tetracyclin; etwa 0.5 cm dick in Petrischalen gegossen, ausgehärtet; Lagerung mit Deckel, Agarseite nach oben (4 °C)
LB(+) Medium	1 % (m/v) Pepton 0.5 % (m/v) Hefeextrakt 0.5 % (m/v) NaCl 0.1 % (m/v) D-(+)-Glucose in H ₂ O autoklaviert; Lagerung bei 4 °C Antibiotikum-Zugabe: Endkonzentration 50 µg/mL Ampicillin oder 50 µg/mL Kanamycin
LB(-) Medium	LB(+) Medium ohne D-(+)-Glucose
10x TBE	0.89 M Tris 0.89 M Borsäure 0.02 M EDTA in H ₂ O

DNA-Elektrophorese- Probenpuffer	0.25 % (m/v) Bromphenolblau 30 % (m/v) Glycerol in H ₂ O
Transfektionsreagenz	FuGENE [®] 6 (Roche, Indianapolis, USA)
FCS	Fötale Kälberserum Gold (PAA, Pasching, Österreich)
G418	G418-Sulfat (PAA, Pasching, Österreich)
Penicillin-Streptomycin	Penicillin-Streptomycin Lösung (PAA, Pasching, Österreich)
Zellkulturmedium	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4.5 g/L Glucose und L-Glutamin, PAA, Pasching, Österreich)
Normalmedium	DMEM 10 % (v/v) FCS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin
Selektionsmedium	DMEM 10 % (v/v) FCS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 500 µg/mL G418
Einfriermedium	DMEM 10 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO

PBS-Puffer	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ in H ₂ O pH 7.4 (mit HCl eingestellt) autoklaviert
Bradford-Externer Standard	Bovines Serum Albumin (500 µg/mL)
Bradford-Reagenz	Roti-Quant Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Sonstige Materialien

145 cm ² Kulturschalen	Cellstar [®] Tissue Culture Dishes (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
25 cm ² Kulturflaschen	Cellstar [®] Tissue Culture Flasks (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
6-Well Platten	Nunclon [™] Δ Surface Multidishes 6 Well (Nalge [®] Nunc [™] International, Roskilde, Dänemark)
24-Well Platten	Nunclon [™] Δ Surface Multidishes 24 Well (Nalge [®] Nunc [™] International, Roskilde, Dänemark)
96-Well Assay-Platte (weiß) mit transparentem Boden	Corning [®] Clear Bottom White Microplate 96-Well (Corning [®] , Lowell, USA)

5.1.2 Molekularbiologische Arbeiten

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden analog der von Kragler im Arbeitskreis etablierten Vorgehensweise durchgeführt.⁸³

Analytische DNA-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines Gels wurden 0.25 g Agarose in 50 mL 1x TBE-Puffer bis zum Entstehen einer klaren Lösung aufgekocht (Mikrowelle: 800 W, 60 s). Nach dem

Abkühlen auf ca. 50 °C wurden 4 µL Ethidiumbromid (1 %ige Lösung in H₂O) zugegeben und durch Schwenken des Kolbens gemischt (Endkonzentration 0.8 µg/mL). Anschließend wurde die Lösung in den Gelträger der verwendeten Horizontal-Elektrophoresekammer gegossen. Durch sofortiges Einsetzen eines Kunststoffkamms entstanden zehn Geltaschen. Nach dem Aushärten des Gels und dem Herausnehmen des Kamms wurden die im Verhältnis 5:1 mit Elektrophorese-Probenpuffer (2 µL) versetzten DNA-Proben (10 µL) in die zur Verfügung stehenden Geltaschen pipettiert (Gesamtvolumen je Tasche: 12 µL). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 150 V über ca. 60 min in 1x TBE-Puffer. Anschließend wurde das Gel bei 260 nm ausgewertet.

Präparative DNA-Gelelektrophorese

Die Isolierung von DNA-Fragmenten spezifischer Länge erfolgte mittels präparativer DNA-Gelelektrophorese. Dabei wurde wie bei der Herstellung eines analytischen Gels vorgegangen, jedoch ein anderer Kunststoffkamm eingesetzt, so dass sechs größere Geltaschen entstanden. Die DNA-Proben (12.5 µL) wurden wiederum im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer (2.5 µL) versetzt und anschließend auf die Geltaschen verteilt (Gesamtvolumen je Tasche: 15 µL). Nach erfolgter Elektrophorese (siehe *Analytische DNA-Gelelektrophorese*) wurde zunächst bei 260 nm ausgewertet und anschließend wurden die entsprechenden Banden unter längerwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell möglichst schnell aus dem Gel herausgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass überschüssiges Gel möglichst gut abgetrennt wurde.

DNA-Isolierung mittels SpinPrep™ Gel DNA Kit

Die DNA von linearisiertem pCMV6-Entry-hSERT wurde mit Hilfe des SpinPrep™ Gel DNA Kit (Novagen, Darmstadt, Deutschland) aus den ausgeschnittenen Gelteilen extrahiert. Dabei wurde – wie im Folgenden ausführlich dargestellt – nach Herstelleranleitung vorgegangen. Die Gelstücke mit der enthaltenen DNA wurden in tarierte 15 mL Falcon-Röhrchen überführt. Pro 100 mg Gel wurden 300 µL SpinPrep™ *gel melt solution* zugegeben und kurz gevortext. Anschließend wurde der Ansatz bei 50 °C im Wasserbad inkubiert bis die Agarose vollständig geschmolzen war (ca. 10 min, alle 3 min gemischt). Ein SpinPrep™ *filter* wurde in ein SpinPrep™

receiver tube gesteckt und es wurden 700 μL der Gellösung auf den Filter pipettiert und zentrifugiert ($t = 30$ s, 15000 rpm, Rotor #3331 ohne Deckel, da dieser wegen der Tubegröße nicht festgeschraubt werden konnte, RT, Biofuge). Das Eluat wurde danach verworfen und das Prozedere unter Verwendung desselben SpinPrep™ *filters* so lange wiederholt bis die gesamte Gellösung verbraucht war. Dann wurden 400 μL reine SpinPrep™ *gel melt solution* auf den Filter gegeben und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Entfernen des Eluates wurden zum Waschen der Filter 650 μL SpinPrep™ *wash buffer* ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde zur vollständigen Entfernung des Puffers 2 min bei 15000 rpm zentrifugiert (Rotor #3331 ohne Deckel, RT, Biofuge). Die Filtereinheit wurde dann in ein SpinPrep™ *eluate receiver tube* gesteckt und es wurden 50 μL SpinPrep™ *elute buffer* (vorgewärmt auf 50 °C) auf den Filter gegeben. Nach 3 min Inkubation bei 50 °C im Wasserbad wurde 1 min bei 15000 rpm zentrifugiert (Rotor #3331 ohne Deckel, RT, Biofuge). Anschließend wurden weitere 50 μL des Eluierpuffers auf den Filter gegeben und ebenso verfahren. Die auf diese Weise rückgewonnene DNA wurde anschließend einer Ethanolfällung unterzogen. Zur eluierten Lösung wurden 10 μL 5 M NaCl-Lösung und 250 μL eiskalter absoluter, unvergällter Ethanol (-20 °C) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei -80 °C wurde zentrifugiert ($t = 10$ min, 13000 rpm, Rotor #3331, 4 °C, Biofuge). Nach vorsichtigem Abgießen des Überstands und dem Trocknen des DNA-Pellets bei RT unter einem Laborabzug wurde es in 40 μL sterilem Wasser resuspendiert. Die Rückgewinnung der DNA wurde anschließend mittels analytischer Gelelektrophorese überprüft. Durch Vergleich der für die rückgewonnene DNA erhaltenen Bande mit den Banden definierter Größe und Konzentration des DNA-Längenstandards konnte zudem eine Konzentrationsabschätzung vorgenommen werden.

DNA-Isolierung mittels PureLink™ Gel Extraction Kit

Die DNA von linearisiertem pcDNA3.1(+)-hSERT wurde mit Hilfe des PureLink™ Gel Extraction Kit (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) aus den ausgeschnittenen Gelteilen extrahiert. Die Gelstücke mit der enthaltenen DNA wurden in tarierte 15 mL Falcon-Röhrchen überführt. Pro 100 mg Gel wurden 300 μL *gel solubilization buffer* zugegeben und kurz gevortext. Der Ansatz wurde bei 50 °C im Wasserbad inkubiert bis die Agarose vollständig geschmolzen war (ca. 10 min, alle 3 min gemischt). Eine

Quick Gel *extraction column* wurde in ein *wash tube* gesteckt und 700 μL der Gellösung wurden auf den Filter pipettiert und zentrifugiert ($t = 60$ s, 14500 rpm, Rotor #3331 ohne Deckel, RT, Biofuge). Das Eluat wurde danach verworfen und das Prozedere unter Verwendung derselben Quick Gel *extraction column* so lange wiederholt bis die gesamte Gellösung verbraucht war. Zum Waschen des Filters wurde anschließend mit 600 μL *wash buffer* nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Entfernung des Eluates wurde weitere 3 min bei 14500 rpm zentrifugiert, um zurückgebliebenen Puffer zu entfernen. Die Quick Gel *extraction column* wurde danach in ein *recovery tube* gesteckt und nach Zugabe von 50 μL *elution buffer* wurde 1 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation über 1 min bei 14500 rpm lag die rückgewonnene DNA im Elutionspuffer vor. Die Analyse und Charakterisierung der rückgewonnenen DNA erfolgte bezüglich Größe und Konzentration wie oben beschrieben.

Restriktionsverdau von DNA

Zum Restriktionsverdau von pCMV6-Entry-hSERT zu analytischen Zwecken wurden ca. 500 ng der Plasmid-DNA (5 μL) mit 0.5 μL KpnI (10000 U/mL), 0.5 μL NotI (10000 U/mL), 2.5 μL 10x NEB-Puffer 2 und 16.5 μL sterilem Wasser über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zum Restriktionsverdau von pcDNA3.1(+)-hSERT zu analytischen Zwecken wurden ca. 1 μg Plasmid-DNA (10 μL) mit 0.5 μL XhoI (20000 U/mL), 1.0 μL NheI (10000 U/mL), 5 μL 10x NEB-Puffer 4, 0.5 μL BSA (100x, NEB) und 33 μL sterilem Wasser über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur Linearisierung von pCMV6-Entry-hSERT wurden für präparative Zwecke 20 μg Plasmid-DNA (80 μL) mit 3 μL DraIII (20000 U/mL), 10 μL NEB-Puffer 3 und 7 μL sterilem Wasser über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Linearisierung von pcDNA3.1(+)-hSERT wurden für präparative Zwecke 27 μg Plasmid-DNA (4.5 μL) mit 2 μL Scal (10000 U/mL), 5 μL NEB-Puffer 3 und 38.5 μL sterilem Wasser über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Herstellung transformationskompetenter *E.coli*¹³⁰

Vom XL-1-Blue MRF' Bakterien-Stock (Lagerung bei -80 °C) wurde unter sterilen Bedingungen (vor dem Bunsenbrenner) etwas Bakteriensuspension durch Abkratzen mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in 1 mL LB(+)-Medium

resuspendiert. Ein Aliquot (30 μL beziehungsweise 150 μL) davon wurde auf einer LB-Agarplatte (mit 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tetracyclin) vor dem Bunsenbrenner ausplattiert. Die Platte wurde anschließend über Nacht bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. 7 mL LB(+)-Medium (ohne Antibiotikum) wurden am nächsten Tag mit einer gewachsenen Kolonie angeimpft und wiederum über Nacht bei 37 $^{\circ}\text{C}$ – diesmal schüttelnd (225 rpm) – inkubiert. 1 mL dieser Vorkultur wurde danach in 100 mL LB(-)-Medium überführt und inkubiert bis eine OD_{600} von 0.35–0.38 erreicht war (ca. 2 h, Nullabgleich erfolgte mit LB(-)-Medium). Die Bakteriensuspension wurde auf Eis gestellt (5 min), dann in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und schließlich zentrifugiert (4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 1600 rpm, Rotor #3047, Biofuge). Das entstandene Pellet wurde in 15 mL kaltem (4 $^{\circ}\text{C}$) TSS resuspendiert und Aliquots davon bei -80 $^{\circ}\text{C}$ schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 $^{\circ}\text{C}$. Zur Überprüfung der Transformationskompetenz der erhaltenen *E.coli* wurde eine Testtransformation mit dem Plasmid pcDNA3.1(+) wie unter *Transformation TSS kompetenter E.coli* beschrieben, durchgeführt.

Transformation TSS kompetenter E.coli

400 μL von im Eisbad langsam aufgetauten kompetenten *E.coli*-Zellen wurden vorsichtig auf 20 ng Plasmid (in sterilem H_2O) pipettiert. Auf Eis erfolgte eine Inkubation über 30 min. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min im Wasserbad (42 $^{\circ}\text{C}$, ohne Schütteln) erwärmt und danach noch ein mal 5 min auf Eis gestellt. Der komplette Ansatz wurde in ein Glasröhrchen zu 2.6 mL LB(+) Medium (ohne Antibiotikum) pipettiert und eine Stunde bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 145 rpm geschüttelt. Danach wurden zweimal je 150 μL des Ansatzes auf LB-Agarplatten (mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin bei Plasmid pcDNA3.1(+)-hSERT beziehungsweise mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin bei Plasmid pCMV6-Entry-hSERT) vor dem Bunsenbrenner ausplattiert. Der Rest des Ansatzes wurde bei 2500 rpm zentrifugiert ($t = 5$ min, Rotor #3047, RT, Biofuge), das entstandene Pellet in 150 μL LB(+) Medium resuspendiert und anschließend komplett auf einer dritten Platte ausplattiert. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Nach einer auf diese Weise durchgeführten Testtransformation zuvor hergestellter transformationskompetenter *E.coli* mit dem Plasmid pcDNA3.1(+) wurden die Bakterien als kompetent angesehen, wenn über Nacht Kulturen auf einer LB-Agarplatte (mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin) wuchsen.

Cryokonservierung von Bakterien

500 µL autoklaviertes Glycerol wurden in einem Cryoröhrchen vorgelegt und 500 µL einer 100 mL-Übernachtskultur (Bakterien in LB(+) Medium mit Selektionsantibiotikum) vor dem Bunsenbrenner zugegeben. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde die Zellsuspension direkt bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Plasmid DNA-Präparationen

Minipräparation

Eine einzelne erfolgreich transformierte Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze von der LB-Agarplatte vorsichtig abgeschabt, in 7 mL LB(+) Medium, welches mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt war, überführt und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. 1.5 mL dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag in einem Eppendorfcap bei 10000 rpm (Rotor #3331, RT, Biofuge) zentrifugiert ($t = 1$ min). Der Überstand wurde verworfen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte danach mit Hilfe des SpinPrep™ Plasmid Kit (Novagen, Darmstadt, Deutschland). Zur Sicherheit wurde zusätzlich von jeder Vorkultur ein Glycerolstock zur Cryokonservierung angelegt, der bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert wurde.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das entstandene Pellet zunächst in 100 µL *bacterial resuspension buffer* durch Vortexen resuspendiert. Zur Suspension wurden anschließend 200 µL *bacterial lysis buffer* pipettiert und durch mehrmaliges Umdrehen des Caps gemischt. Es wurde 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 400 µL SpinPrep™ *neutralization buffer* hinzugegeben und wiederum schonend gemischt. Im Anschluss wurde bei 13000 rpm 10 min zentrifugiert (Rotor #3331, RT, Biofuge). Ein SpinPrep™ *filter* wurde in ein SpinPrep™ *receiver tube* gesteckt und 650 µL des Überstands wurden auf den Filter pipettiert. Sofort wurde 30 s bei 15000 rpm (Rotor #3331 ohne Deckel, RT, Biofuge) zentrifugiert. Anschließend wurde das Eluat verworfen und zum Waschen 650 µL SpinPrep™ *wash buffer* auf den Filter gegeben und wiederum 30 s unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Eluat wurde danach verworfen und es wurde nochmals 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Rotor #3331 ohne Deckel, RT, Biofuge), um Reste des Puffers vollständig zu entfernen. Die Filtereinheit wurde in ein SpinPrep™ *eluate receiver tube* gesteckt und 50 µL auf 50 °C vorgewärmten SpinPrep™ *elute buffer*

wurden auf den Filter pipettiert. Es folgte eine Inkubation über 3 min bei 50 °C im Wasserbad. Direkt im Anschluss wurde bei 13000 rpm 1 min zentrifugiert (Rotor #3331 ohne Deckel, RT, Biofuge).

Midipräparation

75 µL eines Glycerolstocks von mit pcDNA3.1(+)-hSERT transformierten *E.colis*, welcher zuvor langsam bei RT aufgetaut wurde, wurden morgens in 7 mL LB(+) Medium (mit 50 µg/mL Ampicillin) überführt. Diese Vorkultur wurde bei 37 °C und 225 rpm bis zum Nachmittag inkubiert (ca. 6 h). 1 ml des Ansatzes wurden dann in 100 mL LB(+) Medium (ebenfalls mit 50 µg/mL Ampicillin) überführt und anschließend über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde zu je 50 mL auf zwei 50 mL Falcon-Röhrchen aufgeteilt und bei 5000 rpm 10 min zentrifugiert (Rotor #3047, RT, Biofuge). Der Überstand wurde verworfen und die Gewinnung der Plasmid-DNA aus dem entstandenen Pellet erfolgte mit dem dem PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Dafür wurden die Pellets zunächst in je 6 mL *cell resuspension buffer* vollständig durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden je 6 mL *cell lysis solution* zugegeben und durch Drehen und Wenden des Falcon-Röhrchens wurden die Ansätze gut durchmischt. Bei RT wurde 3 min inkubiert. Nach Zugabe von je 10 mL *neutralization solution* wurde der Ansatz erneut durchmischt. Anschließend wurde bei 11200 rpm 10 min zentrifugiert (Rotor SS34, RT, Sorvall). Eine *clearing column* (blau) wurde auf eine *binding column* (weiß) gesteckt und die Säulenkombination wurde auf ein Luer-Lok® fitting des Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold („Vakuumstation“) aufgebracht. Das Lysat wurde auf die *clearing column* gegeben und es wurde Vakuum (500 mbar) angelegt. Damit über die gesamte Filtrationszeit eine gleichmäßige Tropfgeschwindigkeit erzielt werden konnte, wurde schließlich kontinuierlich auf 200 mbar erniedrigt. Nach vollständiger Filtration des Lysats wurde die *clearing column* verworfen. Wiederum wurde Vakuum angelegt (250 mbar) und 5 mL *endotoxin removal wash* über die *binding column* filtriert. Zum Waschen der Säule wurde schließlich mit 20 mL *column wash solution* gespült (zunächst 250 mbar, dann 150 mbar). Die *binding column* wurde anschließend von der „Vakuumstation“ genommen und ihre Spitze auf Zellstoff gebracht, um den „letzten Tropfen“ des Waschschrtes zu entfernen. Schließlich wurde ein steriles Eppendorfcap in dem nun auf der „Vakuumstation“ aufgebrachten

Eluator[®] positioniert. Die *binding column* wurde aufgesteckt und mit 600 µL Nuklease-freiem Wasser bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde Vakuum angelegt (zunächst 250 mbar, dann 150 mbar). So wurden ca. 500 µL Plasmid-DNA in Nuklease-freiem Wasser in das Eppendorfcap eluiert. Ein Aliquot wurde entnommen und mittels einer analytischen Gelelektrophorese überprüft. Reinheit und Gehalt wurden mit einer 1:100 Verdünnung in Nuklease-freiem Wasser photometrisch bestimmt. Ihre Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Maxipräparation

100 µL eines Glycerolstocks von mit pCMV6-Entry-hSERT transformierten *E.colis* wurden morgens in 7 mL LB(+) Medium (mit 50 µg/mL Kanamycin) überführt. Diese Vorkultur wurde bei 37 °C und 225 rpm bis zum Nachmittag (ca. 6 h) inkubiert. 4 ml des Ansatzes wurden dann in 100 mL LB(+) Medium (ebenfalls mit 50 µg/mL Kanamycin) überführt und anschließend über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde danach zu je 50 mL auf zwei 50 mL Falcon-Röhrchen aufgeteilt und bei 5000 rpm 10 min zentrifugiert (Rotor #3047, RT, Biofuge). Der Überstand wurde verworfen und die Gewinnung der Plasmid-DNA aus dem entstandenen Pellet erfolgte mit dem Mobius™ 1000 Plasmid Kit (Novagen, Darmstadt, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Dazu wurde ein Pellet in 4 mL *bacterial resuspension buffer* durch Vortexen komplett resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde dann unter Nachspülen von weiteren 4 mL *bacterial resuspension buffer* mit dem anderen Pellet vereinigt. Komplette Resuspendierung wurde wiederum durch Vortexen erzielt. Es wurden 8 mL *bacterial lysis buffer* zugesetzt und durch Drehen und Wenden des Röhrchens wurde das Lysat so lange gemischt bis es klar und viskos erschien. Bei RT wurde 5 min inkubiert. Anschließend wurden 8 mL eiskalter Mobius™ *neutralization buffer* hinzugefügt und mit dem Ansatz gemischt bis ein flockiger Niederschlag entstand. Wiederum wurde 5 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde dann bei 5000 rpm 5 min zentrifugiert (Rotor #3047, RT, Biofuge). Anschließend wurde der Überstand auf einen ClearSpin™ *filter*, welcher in einen ClearSpin™ *adapter* gesteckt war, überführt und das System bei 3200 rpm 3 min zentrifugiert (Rotor #3047, RT, Biofuge). Der Filter wurde verworfen und das Eluat auf eine zuvor mit 10 mL Mobius *equilibration buffer* konditionierte Säule – die in ein 50 mL Falcon-Röhrchen gesteckt war – gebracht. Nachdem die Lösung vollständig über die Säule eluiert war, wurde diese mit 20 mL Mobius *wash*

buffer gespült. Die Säule wurde anschließend auf ein 15 mL Falcon-Röhrchen gesteckt und die sich auf der Säule befindende Plasmid-DNA mit 5 mL *Mobius elution buffer* eluiert. Dem Eluat wurde 3.5 mL Isopropanol ($\geq 99\%$) zugesetzt und der Ansatz durch leichtes Schütteln gemischt. Dann wurde bei 5000 rpm für 60 min zentrifugiert (Rotor #3047, RT, Biofuge). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet mit 3 mL 70 %igem Ethanol gewaschen und schließlich bei 5000 rpm 30 min zentrifugiert (Rotor #3047, RT, Biofuge). Nach vorsichtigem Abgießen des Überstands wurde das DNA-Pellet unter dem Abzug durch vorsichtiges Abblasen mit Stickstoff getrocknet und in 500 μ L sterilem Wasser durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer Pipette resuspendiert und in ein steriles Eppendorfcap überführt. Reinheit und Gehalt wurden mit einer 1:50 Verdünnung in sterilem Wasser photometrisch bestimmt. Ein Aliquot wurde entnommen und mittels einer analytischen Gelelektrophorese überprüft. Die Lagerung der DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren¹³¹

Die Bestimmung der DNA-Konzentration nach erfolgter Midi- oder Maxipräparation wurde photometrisch bei 260 nm durchgeführt. Bei doppelsträngig vorliegender DNA wurde bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ eine Absorption von $A_{260} = 1.0$ (Schichtdicke $b = 1\text{ cm}$) angenommen.¹³¹ Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm liegt und das von Proteinen bei 280 nm, wurde zur Reinheitsprüfung der Plasmid-DNA das A_{260}/A_{280} -Verhältnis bestimmt. Bei reiner Plasmid-DNA beträgt das A_{260}/A_{280} -Verhältnis 1.8–2.0.¹³¹

5.1.3 Zellkulturtechniken

Zellkulturarbeiten wurden analog der von Kragler im Arbeitskreis etablierten Vorgehensweise durchgeführt.⁸³ Die Arbeiten erfolgten ausschließlich unter der Sterilbank (mindestens 30 min Vorlaufzeit). Zellkulturmedien und Puffer wurden immer im Wasserbad auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt.

HEK-293 Kultivierung in 145 cm² Kulturschalen

Ein im Stickstoffdampfraum einer Cryoanlage gelagertes Aliquot HEK-293 Zellen (1 mL in Einfriermedium) wurde unter fließendem, kaltem Wasser aufgetaut. 24 mL Normal- beziehungsweise Selektionsmedium wurden in der Kulturschale vorgelegt und die aufgetaute Zellsuspension wurde hinzupipettiert. Die Zellen wurden anschließend durch Schwenken der Schale gleichmäßig verteilt. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank (37 °C, 8 % CO₂). Bei einer Konfluenz von unter 70 % wurde das Medium im 2–3 Tage Rhythmus gewechselt. Dafür wurde es vom Schalenrand mit einer Glaspipette unter Vakuum vorsichtig abgesaugt und anschließend wurden 25 mL frisches Medium langsam am Schalenrand hinzupipettiert. Erst wenn eine Konfluenz von 70–80 % erreicht war, wurden die HEK-293 Zellen weiter passagiert (siehe *Passagieren von HEK-293 Zellen bei Verwendung von 145 cm² Kulturschalen*), eingefroren (siehe *Cryokonservierung von HEK-293 Zellen*) oder zu Versuchszwecken beziehungsweise zur Herstellung einer Membranpräparation geerntet (siehe *Herstellung von Membranpräparationen*).

Passagieren von HEK-293 Zellen bei Verwendung von 145 cm² Kulturschalen

War eine Kulturschale zu 70–80 % bewachsen, wurde das Medium mit einer Glaspipette unter Vakuum abgesaugt. Anschließend wurden 12 mL Normal- beziehungsweise Selektionsmedium hinzugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vom Schalenboden abgelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde anschließend entweder im Verhältnis 1:12 (Aussaat von 12x 1 mL) oder 1:24 (Aussaat von 24x 0.5 mL) gesplittet. Zellen wurden nie über Passage 25 hinaus kultiviert.

Mycoplasmentest

HEK-293 Zellen einer Zellpassage, welche cryokonserviert werden sollte (siehe *Cryokonservierung von HEK-293 Zellen*), wurden zuvor auf Mycoplasmen untersucht. Dazu wurde aus einer Kulturschale mit bereits angewachsenen HEK-293 Zellen 1 mL Medium entnommen und in ein Eppendorfcap überführt. Das entnommene Medium wurde bei 1600 rpm für 5 min (Rotor #3331, RT, Biofuge) zentrifugiert. Mit 100 µL des resultierenden Überstands wurde anschließend ein *Mycoplasma Detection Assay* unter Verwendung des MycoAlert[®] *Mycoplasma*

Detection Kit der Firma Lonza (Rockland, USA) exakt nach der vom Hersteller angegebenen Vorgehensweise durchgeführt. Für den Assay wurden weiße 96-Well Platten mit transparentem Boden verwendet. Die Lumineszenzmessung erfolgte mit dem Wallac 1450 MicroBeta TriLux (Messdauer $t = 1$ s). Die Auswertung der Lumineszenzmessung erfolgte wie vom Hersteller angegeben. HEK-293 Zellen wurden nur cryokonserviert, wenn keine Mycoplasmeninfektion vorlag.

Cryokonservierung von HEK-293 Zellen

Die Zellen einer zu 70–80 % bewachsenen 145 cm² Kulturschale wurden wie unter *Passagieren von HEK-293 Zellen bei Verwendung von 145 cm² Kulturschalen* beschrieben mit 12 mL Normal- beziehungsweise Selektionsmedium vom Boden abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert ($t = 5$ min, 1600 rpm, Rotor #3047, RT, Biofuge). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert (3 mL pro 145 cm² Kulturschale) und zu je 1 mL in Cryoröhrchen aliquotiert. Die Zellsuspension wurde in einer zuvor bei RT aufbewahrten Styroporbox schonend bei -80 °C eingefroren. Nach zwei Wochen wurden sie in eine Cryoanlage zur Aufbewahrung im Stickstoffdampfraum umgelagert.

Transiente Transfektion von HEK-293 Zellen mit FuGENE[®]6

Transiente Transfektion im Verhältnis 3:1 von FuGENE[®]6 zu Plasmid-DNA

Die transiente Transfektion von HEK-293 Zellen mit pCMV6-Entry-hSERT beziehungsweise pcDNA3.1(+)-hSERT erfolgte mit FuGENE[®]6 (Roche, Indianapolis, USA) als Transfektionsreagenz entsprechend der Herstellerangaben. Dazu wurden ca. 2 Millionen HEK-293 Zellen in einer 145 cm² Kulturschale ausgesät. Am übernächsten Tag war eine Konfluenz von etwa 20 % erreicht und verbrauchtes Normalmedium wurde gegen frisches ausgetauscht. Es wurden 2.7 mL FuGENE[®]6-Transfektionsreagenz hergestellt: 2640 µL DMEM abzüglich der benötigten DNA-Menge (in µL) wurden in einem 15 mL Falcon-Röhrchen vorgelegt und 60 µL FuGENE[®]6 hinzu pipettiert ohne dabei die Röhrchen-Wand zu berühren. Anschließend wurde die Plasmid-DNA zugegeben. Es wurde jeweils ein Verhältnis von 20 µg DNA (Konzentration war durch die photometrische Gehaltsbestimmung bekannt) zu 60 µL FuGENE[®]6 gewählt. Der Transfektionsansatz wurde durch

zweimaliges Auf- und Abpipettieren gut durchmischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das hergestellte Reagenz vollständig zu den Zellen in der Kulturschale gegeben. Durch Schwenken der Schale wurden Medium und Reagenz gut vermischt und die Zellen für 48 h im Brutschrank inkubiert (37 °C, 8 % CO₂). Nach 48 h war eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit 12 mL PBS-Puffer durch Auf- und Abpipettieren vom Schalenboden gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 1600 rpm zentrifugiert (Rotor #3047, RT, Biofuge). Der Überstand wurde mit einer Glaspipette unter Vakuum abgesaugt und das Pellet wurde im gleichen Volumen PBS-Puffer gewaschen und erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde anschließend noch ein weiteres Mal wiederholt. Das erhaltene Pellet wurde am Ende in etwa 10 mL kaltem Assaypuffer (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4 eingestellt mit HCl) aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Suspension wurde durch gelegentliches Vortexen homogen gehalten.

Transiente Transfektion mit unterschiedlichen Verhältnissen von FuGENE[®]6 zu Plasmid-DNA

HEK-293 Zellen wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen von FuGENE[®]6 zu Plasmid-DNA mit dem Expressionsvektor pCMV6-Entry-hSERT transient transfiziert. Dazu wurden in jedes Well einer 6-Well Platte jeweils etwa 100000 HEK-293 Zellen ausgesät. Nachdem sie eine Konfluenz von etwa 15 % erreicht hatten, wurde verbrauchtes Normalmedium gegen frisches ausgetauscht. Unter Einsatz unterschiedlicher Verhältnisse von FuGENE[®]6 zu DNA wurden in Eppendorfcaps jeweils 100 µL Transfektionsreagenz nach folgendem Schema hergestellt:

FuGENE 6 [®] : DNA	3:2	3:1	4:1	5:1	6:1
DMEM (in μL)	89	93	92	91	90
FuGENE 6 [®] (in μL)	3	3	4	5	6
DNA (in μg)	2	1	1	1	1
DNA (in μL)	8	4	4	4	4

Schema 2 Pipettierschema zur Untersuchung unterschiedlicher Verhältnisse von FuGENE[®]6 zu DNA in transienten Transfektionsversuchen

Die 100 μL -Ansätze des Transfektionsreagenzes wurden durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren gut durchmischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze vollständig zu den Zellen in die Wells der 6-Well Platte gegeben. Durch Schwenken der Platte wurden Medium und Reagenz gut vermischt und die Zellen für 48 h im Brutschrank inkubiert (37 $^{\circ}\text{C}$, 8 % CO_2). Nach 48 h war eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit 1 mL PBS-Puffer durch Auf- und Abpipettieren vom Schalenboden gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in Eppendorfcaps überführt und 5 min bei 2200 rpm zentrifugiert (Rotor #3331, RT, Biofuge). Der Überstand wurde mit einer Glaspipette unter Vakuum abgesaugt und das Pellet wurde mit 500 μL PBS-Puffer gewaschen und erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde anschließend noch ein weiteres Mal wiederholt. Das erhaltene Pellet wurde am Ende in 650 μL kaltem Assaypuffer (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4 eingestellt mit HCl) aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Suspension wurde durch gelegentliches Vortexen homogen gehalten.

Stabile Transfektion von HEK-293 Zellen mit FuGENE[®]6

Zunächst wurden 20 μg Plasmid-DNA durch eine geeignete Restriktionsendonuklease linearisiert (pCMV6-Entry-hSERT: DraIII, pcDNA3.1(+)-hSERT: Scal; siehe *Restriktionsverdau von DNA* unter 5.1.2). Die linearisierte Plasmid-DNA wurde durch präparative Gelelektrophorese isoliert und gereinigt, so dass sie zur Transfektion eingesetzt werden konnte (siehe *Präparative DNA-Gelelektrophorese* unter 5.1.2). Über eine analytische Gelelektrophorese wurde zuvor noch eine Konzentrationsabschätzung vorgenommen, wobei die erhaltene

DNA-Bande mit Banden definierter Konzentration eines DNA-Längenstandards verglichen wurde. Die Transfektion erfolgte mittels FuGENE[®]6-Transfektionsreagenz. Dazu wurden ca. 2 Millionen HEK-293 Zellen in eine 145 cm² Kulturschale ausgesät. Am übernächsten Tag war eine Konfluenz von ca. 20 % erreicht und verbrauchtes Normalmedium wurde gegen frisches ausgetauscht. Es wurden 2.7 mL FuGENE[®]6-Transfektionsreagenz hergestellt: 2640 µL DMEM abzüglich der benötigten DNA-Menge (in µL) wurden in einem 15 mL Falcon-Röhrchen vorgelegt und 60 µL FuGENE[®]6 dazu pipettiert ohne dabei die Röhrchen-Wand zu berühren. Anschließend wurde die linearisierte DNA zu diesem Ansatz pipettiert. Es wurde jeweils ein Verhältnis von 20 µg DNA (Konzentrationsabschätzung nach analytischer Gelelektrophorese) zu 60 µL FuGENE[®]6 gewählt. Der Ansatz wurde durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren gut durchmischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsreagenz vollständig zu den Zellen in der Kulturschale gegeben. Durch Schwenken der Schale wurden Medium und Reagenz gut vermischt und die Zellen für 48 h im Brutschrank inkubiert (37 °C, 8 % CO₂). Nach 48 h war eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1:5 in Selektionsmedium gesplittet. Das Medium wurde im 2–3 Tage Rhythmus gewechselt.

Im Fall der stabilen Transfektion von HEK-293 Zellen mit pCMV6-Entry-hSERT war in allen fünf Kulturschalen nach genau einer Woche eine Konfluenz von ca. 60 % erreicht. Altes Medium wurde mit einer Glaspipette unter Vakuum abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend mit je 12 mL Selektionsmedium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Schalenboden gelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10000 in Selektionsmedium verdünnt in fünf neue 145 cm² Kulturschalen ausgesät. Der Rest der Zellen wurde als „Zellpool“ cryokonserviert. Das Medium in der verdünnten Zellaussaat wurde im 2–3 Tage Rhythmus gewechselt und auftretende Klone wurden nach zwei Wochen isoliert (siehe *Isolierung einzelner Zellklone nach stabiler Transfektion*).

Im Fall der stabilen Transfektion von HEK-293 Zellen mit pcDNA3.1(+)-hSERT erfolgte nach dem ersten Splitten der Zellen im Verhältnis 1:5 in Selektionsmedium kein starkes Wachstum der Zellen. Allerdings konnte man das Wachstum von einzelnen Zellklonen beobachten, die nach zwei Wochen isoliert wurden. In diesem

Fall wurde folglich die verdünnte Aussaat im Verhältnis 1:10000 zum Wachstum einzelner Klone übersprungen.

Isolierung einzelner Zellklone nach stabiler Transfektion

Zur Herstellung von „Cloning-Cylinders“ wurde der obere (nicht spitze) Teil von einer 1000 µL-Pipettenspitze ca. 0.5 cm breit mit einer Schere abgeschnitten, wodurch Ringe mit einem Durchmesser von ca. 0.6 cm erhalten wurden. Diese wurden in Silikonfett getaucht und in einer Glasschale mit Deckel autoklaviert. Nachdem in den Kulturschalen nach der stabilen Transfektion einzelne Klone aufgetreten waren, wurde das Medium abgesaugt, die hergestellten „Cloning-Cylinder“ um einzelne Zellklone positioniert und fest an den Schalenboden gedrückt. Anschließend wurden mit 100 µL Selektionsmedium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die Klone vom Boden gelöst und in 24-Well Platten, in die je 650 µL Selektionsmedium vorgelegt war, überführt. War eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht, wurden die Zellen in 25 cm² Kulturflaschen überführt (Kultivierung in je 5 mL Selektionsmedium). Wenn auch diese vollständig bewachsen waren, wurden die Zellen schließlich in die standardmäßig verwendeten 145 cm² Kulturschalen überführt. Mediumwechsel erfolgte immer im 2–3 Tage Rhythmus.

War eine 145 cm² Kulturschale zu 70–80 % mit einem stabil hSERT exprimierenden Zellklon bewachsen, wurde das Medium unter Vakuum abgesaugt und die Zellen wurden entweder passagiert oder sie wurden zur Ernte mit 12 mL PBS-Puffer durch Auf- und Abpipettieren vom Schalenboden losgespült. Die Zellsuspension wurde in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und bei 1600 rpm 5 min zentrifugiert (Rotor #3047, RT, Biofuge). Der Überstand wurde mit einer Glaspipette unter Vakuum abgesaugt. Das Pellet wurde im gleichen Volumen PBS-Puffer gewaschen und erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde anschließend nochmals wiederholt. Schließlich wurde das Pellet in etwa 10 mL kaltem Inkubationspuffer (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4 eingestellt mit HCl) resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Suspension wurde durch gelegentliches Vortexen homogen gehalten. Das anschließende Screening der Klone erfolgte wie unter *Screening der HEK-293 Klone nach stabiler Transfektion* unter 5.3.2 beschrieben.

Herstellung von Membranpräparationen

In 145 cm² Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % gewachsene Zellen wurden nach Entfernung des Mediums mit 12 mL PBS-Puffer durch Auf- und Abpipettieren vom Schalenboden gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 1600 rpm zentrifugiert (Rotor #3047, RT, Biofuge). Der Überstand wurde mit einer Glaspipette unter Vakuum abgesaugt, und das Pellet wurde im gleichen Volumen PBS-Puffer gewaschen und erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde anschließend noch ein weiteres Mal wiederholt, wobei vor dem letzten Zentrifugierschritt die Zellzahl bestimmt wurde (siehe *Bestimmung der Zellzahl*). Das erhaltene Pellet wurde am Ende im gewünschten Volumen 0.32 M Saccharose-Lösung aufgenommen und mit dem Polytron (ca. 15 s) homogenisiert. Aliquots (je 2 mL) wurden bei -80 °C eingefroren.

Bestimmung der Zellzahl

Bei der Herstellung einer Membranpräparation (siehe *Herstellung von Membranpräparationen*) beziehungsweise bevor eine definierte Zahl an Zellen ausgesät wurde, wurde die Zellzahl bestimmt. Bei der Herstellung einer Membranpräparation geschah dies vor dem letzten Zentrifugierschritt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in PBS-Puffer beziehungsweise in Medium immer durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:5 mit PBS-Puffer beziehungsweise Medium verdünnt und 20 µL der Verdünnung wurden anschließend in eine Neubauer-Zählkammer (Zeiss) eingebracht. Unter dem Mikroskop erfolgte das Auszählen der vier seitlichen Großquadrate. Aus der Summe der vier ausgezählten seitlichen Großquadrate wurde der Mittelwert gebildet und unter Berücksichtigung des Verdünnungsschrittes und des Kammerfaktors 10000 wurde auf diese Weise die Zellzahl/mL der vorliegenden Zellsuspension bestimmt.

Proteinbestimmung

Von allen hergestellten Membranpräparationen (siehe *Herstellung von Membranpräparationen*) und auch von Zellsuspensionen zu Versuchszwecken (vor der Proteinbestimmung wurden diese mit dem Polytron ca. 15 s homogenisiert)

wurde die enthaltene Proteinmenge bestimmt. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford⁹⁰ unter Verwendung von bovinem Serumalbumin (BSA) als externem Standard. Das Homogenat, dessen Proteingehalt es zu ermitteln galt, wurde zunächst durch Inkubation mit 100 mM NaOH (1 h) vorbehandelt. Ein Aliquot von ca. 500 µg/mL wurde anschließend in einem Eppendorfcap mit einem definierten Volumen Wasser auf 800 µL verdünnt, mit 200 µL Bradford-Reagenz versetzt und gevortext. Zur Herstellung der Standardreihe wurden definierte Volumina der BSA-Stammlösung (5 µL, 10 µL, 15 µL und 20 µL) ebenfalls mit Wasser auf 800 µL verdünnt, mit 200 µL Bradford-Reagenz versetzt und gevortext. Nach einer Inkubation über 15 min bei RT wurden sowohl Standards als auch Proben photometrisch bei 595 nm vermessen und durch externe Standardkalibrierung ausgewertet.

5.2 LC-MS/MS Analytik

5.2.1 Geräte und Material

Für die Chromatographie verwendete Lösungsmittel waren *HPLC grade* (bei Verwendung des Massenspektrometers API 3200) oder *LC-MS grade* (bei Verwendung des Massenspektrometers API 5000). Alle Puffersalze waren von Qualität für LC-MS. Für die Herstellung wässriger Pufferlösungen wurde vollentsalztes Wasser, welches zusätzlich frisch destilliert wurde (API 3200), oder Wasser für LC-MS (API 5000) verwendet. pH-Werte wurden mit Ammoniak-Lösung (25 %, für LC-MS) eingestellt.

Massenspektrometer	API 3200 Triple Quadrupole (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) mit TurboV-Ion Source; Quellenjustierung: waagrecht 5 mm, senkrecht 5 mm; Eingebaute Spritzenpumpe API 5000 Triple Quadrupole (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) mit TurboV-Ion Source; Quellenjustierung: waagrecht 5 mm, senkrecht 5 mm; 10 Port Schaltventil (Vici Valco Instruments Co. Inc., Waterbury, USA)
HPLC	Agilent 1200: vacuum degasser, binary pump and oven (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Autosampler	SIL-HT(A) (Shimadzu, Duisburg, Deutschland; am Massenspektrometer API 3200) HTS-PAL (CTC-Analytix, Zwingen, Schweiz; am Massenspektrometer API 5000)

HPLC-Säulen	Luna C8 (50 mm x 2 mm, 3 µm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) Luna C18(2) (20 mm x 2 mm, 3 µm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) in entsprechender Mercury Kartuschenhalterung Luna C18(2) (10 mm x 2 mm, 3 µm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) in entsprechender Mercury Kartuschenhalterung Purospher STAR RP18 (endcapped, 30 mm x 2 mm, 3 µm; Merck, Darmstadt, Deutschland) in entsprechender Kartuschenhalterung
Vorsäulen	Security Guard C8 oder C18 (4 mm x 2 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Hilfsgase	Stickstoff (Flüssigstickstoff, Reinheit 99.999 %)
Software	<i>Analyst 1.4.2</i> (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)

5.2.2 Allgemeine Methoden

Optimierung eines geeigneten Massenübergangs in Spritzenpumpenexperimenten

Es wurde eine 300 nM oder 400 nM Lösung der zu untersuchenden Verbindung in einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und 0.1 %iger Ameisensäure (50 / 50, (v/v)) hergestellt. Die Herstellung dieser Lösungen erfolgte aus 1 mM wässrigen Stammlösungen (Lagerung bei -20 °C, zu Versuchszwecken bei RT aufgetaut) der entsprechenden Substanzen. Eine Glasspritze (Volumen: 1 mL) wurde zunächst mit dem reinen Lösungsmittelgemisch gespült. Nach Aufziehen der Spritze mit Untersuchungslösung wurde sie in die Spritzenpumpenhalterung des Massenspektrometers API 3200 eingebaut. Die Spritze wurde über ein Kopplungsstück und eine PEEK-Kapillare direkt mit der ESI-Quelle des Gerätes verbunden. Über die Software *Analyst 1.4.2* wurde ein Fluss von 5 µL/min eingestellt und gewartet bis sich ein konstanter TIC einstellte. Im manuellen Tune Modus wurde

im positiven ESI-Modus ein Q1 Scan durchgeführt. Anschließend wurde die quantitative Optimierung der Ionenausbeute mit dem *Quantitative Optimization Wizard* der Software gestartet. Dabei wurde das Mutterion $[M+H]^+$ vorgegeben und es wurde zusätzlich ein m/z Bereich für mögliche Produktionen, auf welchen sich die Software in der Optimierung fokussieren sollte, voreingestellt. In der Optimierung wurde von der Software ein intensives Produktion im Q3 ausgewählt und die *Compound-Dependent Parameters* DP, EP, CE und CXP für den entsprechenden Massenübergang optimal eingestellt.

Optimierung LC-abhängiger Parameter mittels Flow Injection Analysis (FIA)

Es wurde eine Lösung der zu untersuchenden Substanz – gegebenenfalls zusammen mit dem internen Standard – im Fließmittel hergestellt. Die Konzentration in den Proben betrug 20 nM, wenn die Untersuchungen am Massenspektrometer API 3200 und 2 nM, wenn sie am API 5000 durchgeführt wurden. Es wurden entweder reine Lösungsmittelproben oder Matrixproben (siehe *Herstellung von Matrixproben für die LC-MS/MS Methodenentwicklung* unter 5.3.3) untersucht. Lösungsmittelproben wurden zur Analyse entweder in Wells einer 96-Deepwell Platte (1.2 mL, PP) oder in Braunglasvials (2 mL, mit 500 μ L Glasinsert) überführt. Im Fall der Platten wurden die Wells immer mit Aluminiumfolie abgedeckt; die Braunglasvials wurden verbördelt (Aluminiumkappen mit Butylgummi). Matrixproben lagen immer in den 96-Deepwell Platten vor. Die Injektion der Proben in das LC-MS/MS System erfolgte mittels Autosampler. Um über die *Flow Injection Analysis (FIA)* – einem Optimierungstool der *Analyst 1.4.2* Software – die LC-abhängigen Parameter für einen bestimmten Massenübergang eines Analyten zu optimieren, wurde zunächst die gewünschte LC-Säule in das LC-MS/MS System eingebaut und anschließend wurde für mindestens eine Stunde mit dem entsprechenden Fließmittel equilibriert. Im Tune Modus der *Analyst 1.4.2* Software wurde dann durch das *Quantitative Optimization Tool* eine *FIA* gestartet. Grundlage einer *FIA* waren der für den Analyten im Spritzenpumpenexperiment ausgewählte Massenübergang, die ebenfalls mittels Spritzenpumpe optimierten *Compound-Dependent Parameters* für diesen Analyten und Standardeinstellungen der Software für die *Source-Dependent Parameters*. In den Untersuchungen wurde die Injektion von jeweils 5 μ L der zu analysierenden Probe in das LC-MS/MS System durch die Software gestartet. Dann wurden die zur Optimierung vorausgewählten Parameter schrittweise in einem

ebenfalls zuvor in der Software definierten Bereich untersucht, so dass daraus schließlich die optimalen Parametereinstellungen mittels des Softwaretools ermittelt werden konnten. Durch *FIA* wurden so zum einen die *Compound-Dependent Parameters* (DP, EP, CE, CXP), welche im zuvor durchgeführten Spritzenpumpenexperiment gefunden wurden, reoptimiert und zum anderen auch die optimalen Einstellungen für die *Source-Dependent Parameters* (GS1, GS2, CUR, TEM, IS, ihe) erhalten. Zusätzlich wurde in einer *FIA* auch das zu den *Compound-Dependent Parameters* zählende *Collision Gas* (CAD) optimal eingestellt, welches mit dem *Quantitative Optimization Wizard* der Software im Spritzenpumpenexperiment nicht optimiert werden konnte.

Analyse von Paroxetin über LC-ESI-MS/MS am API 3200

Die Analyse von Paroxetin (**6**) in Lösungsmittelstandards oder in Matrixproben erfolgte über LC-ESI-MS/MS am Massenspektrometer API 3200. Die Proben wurden durch den SIL-HT(A) Autosampler aus 96-Deepwell Platten (1.2 mL, PP) oder aus verbördelten Braunglasvials (2 mL, mit 500 µL Glasinsert) entnommen und es wurden jeweils 5 µL in das System injiziert. Bei isokratischer Elution mit einer Flussrate von 300 µL/min wurde mit einer mobilen Phase bestehend aus Acetonitril, Methanol und Ammoniumformiatpuffer (10 mM, pH 7.0) im Verhältnis 50 / 10 / 40 (v/v/v) gearbeitet. Als stationäre Phase wurde die Luna C8 Säule (50 mm x 2 mm, 3 µm) zusammen mit der Vorsäule Security Guard C8 (4 mm x 2 mm) eingesetzt. Der Säulenofen war auf 20 °C temperiert. Die Laufzeit der Chromatographie betrug 3 min.

Für den Analyten Paroxetin (**6**) wurde der Massenübergang m/z 330.3 → 192.2 erfasst. Die für diesen Massenübergang optimierten Einstellungen für die *Compound-Dependent Parameters* und die *Source-Dependent Parameters* sind in Tab. 28 zusammengefasst dargestellt. Die *Dwell Time* wurde in der Methode auf 500 ms gesetzt.

Tab. 28 Einstellungen der *Compound-* und *Source-Dependent Parameters* für m/z 330.3 \rightarrow 192.2 von Paroxetin (**6**) am API 3200 im positiven ESI-Modus (Auflösung in Q1 und Q3: „unit“)

<i>Compound-Dependent Parameters</i>		
<i>Declustering Potential</i>	(DP)	52.0 V
<i>Entrance Potential</i>	(EP)	5.0 V
<i>Collision Energy</i>	(CE)	30.5 eV
<i>Collision Cell Exit Potential</i>	(CXP)	6.5 V
<i>Collision Gas</i>	(CAD)	5.5 psi
<i>Source-Dependent Parameters</i>		
<i>Nebulizer Gas</i>	(GS1)	55.0 psi
<i>Auxiliary Gas</i>	(GS2)	75.0 psi
<i>Curtain Gas</i>	(CUR)	11.5 psi
<i>Temperature</i>	(TEM)	600.0 °C
<i>Ion Spray Voltage</i>	(IS)	1900.0 V
<i>Interface Heater</i>	(ihe)	on

Die Einstellungen des verwendeten SIL-HT(A) Autosamplers wurden in der Methode wie folgt gewählt:

Tab. 29 Einstellungen des SIL-HT(A) Autosamplers in der LC-MS/MS Methode zur Analyse von Paroxetin (**6**) am API 3200

Autosampler-Einstellungen	
Nadel-Spülvolumen	200 μ L
Nadelhub	50 mm
Nadel-Spülgeschwindigkeit	35 μ L/s
Probenaufnahme	5.0 μ L/s
Spülmodus (Acetonitril / Wasser, 80 / 20)	after aspiration
Injektionsvolumen	5 μ L

Analyse von Fluoxetin über LC-ESI-MS/MS am API 3200

Während der Methodenentwicklung erfolgte die Analyse von Fluoxetin (**rac-3**) in Lösungsmittelstandards oder in Matrixproben über LC-ESI-MS/MS am Massenspektrometer API 3200. Die Proben wurden durch den SIL-HT(A) Autosampler aus 96-Deepwell Platten (1.2 mL, PP) oder aus verbördelten Braunglasvials (2 mL, mit 500 μ L Glasinsert) entnommen und es wurden jeweils 5 μ L in das System injiziert. Bei isokratischer Elution mit einer Flussrate von 800 μ L/min wurde mit einer mobilen Phase bestehend aus Acetonitril und Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) im Verhältnis 80 / 20 (v/v) gearbeitet. Als stationäre Phase wurde die Luna C18(2) Säule (20 mm x 2 mm, 3 μ m) zusammen mit der Vorsäule Security Guard C18 (4 mm x 2 mm) im entsprechenden Kartuschensystem eingesetzt. Der Säulenofen war auf 20 $^{\circ}$ C temperiert. Die Laufzeit der Chromatographie betrug 1.5 min.

Für Fluoxetin (**rac-3**) wurde der Massenübergang m/z 310.2 \rightarrow 148.2 erfasst. Die optimierten Einstellungen für die *Compound-Dependent Parameters* und die *Source-Dependent Parameters* sind in Tab. 30 dargestellt. Die *Dwell Time* wurde in der Methode auf 500 ms gesetzt.

Tab. 30 Einstellungen der *Compound-* und *Source-Dependent Parameters* für m/z 310.2 \rightarrow 148.2 von Fluoxetin (**rac-3**) am API 3200 im positiven ESI-Modus (Auflösung in Q1 und Q3: „unit“)

<i>Compound-Dependent parameters</i>		
<i>Declustering Potential</i>	(DP)	28.0 V
<i>Entrance Potential</i>	(EP)	4.0 V
<i>Collision Energy</i>	(CE)	15.0 eV
<i>Collision Cell Exit Potential</i>	(CXP)	4.0 V
<i>Collision Gas</i>	(CAD)	3.0 psi
<i>Source-Dependent Parameters</i>		
<i>Nebulizer Gas</i>	(GS1)	40.0 psi
<i>Auxiliary Gas</i>	(GS2)	70.0 psi
<i>Curtain Gas</i>	(CUR)	35.0 psi
<i>Temperature</i>	(TEM)	650.0 °C
<i>Ion Spray Voltage</i>	(IS)	2550.0 V
<i>Interface Heater</i>	(ihe)	on

Die Einstellungen des verwendeten SIL-HT(A) Autosamplers wurden in der Methode wie folgt gewählt:

Tab. 31 Einstellungen des SIL-HT(A) Autosamplers in der LC-MS/MS Methode zur Analyse von Fluoxetin (*rac-3*) am API 3200

Autosampler-Einstellungen	
Nadel-Spülvolumen	200 μ L
Nadelhub	50 mm
Nadel-Spülgeschwindigkeit	35 μ L/s
Probenaufnahme	5.0 μ L/s
Spülmodus (Acetonitril / Wasser, 80 / 20)	after aspiration
Injektionsvolumen	5 μ L

Quantifizierung von (S)- und (R)-Fluoxetin in Proben aus Bindungsstudien über LC-ESI-MS/MS am API 5000

Die Quantifizierung von (S)- [(**S**)-3] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(**R**)-3] in Proben aus Bindungsstudien erfolgte über LC-ESI-MS/MS am Massenspektrometer API 5000. Dabei wurde [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (*rac-7*) als interner Standard eingesetzt. Die Proben wurden durch den HTS-PAL Autosampler aus 96-Deepwell Platten (1.2 mL, PP) entnommen und es wurden jeweils 5 μ L in das System injiziert. Bei isokratischer Elution mit einer Flussrate von 800 μ L/min wurde mit einer mobilen Phase bestehend aus Acetonitril und Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) im Verhältnis 80 / 20 (v/v) gearbeitet. Als stationäre Phase wurde die Luna C18(2) Säule (20 mm x 2 mm, 3 μ m) zusammen mit der Vorsäule Security Guard C18 (4 mm x 2 mm) im entsprechenden Kartuschensystem verwendet. Der Säulenofen war auf 25 $^{\circ}$ C temperiert. Die Laufzeit der Chromatographie betrug 1 min. Dabei wurde das Eluat durch ein Schaltventil nach der Säule von 0 min bis 0.4 min und nach 0.9 min direkt in den Lösungsmittelabfall geleitet, um die ESI-Quelle und das Massenspektrometer zu schonen.

Für den Analyten **(S)-3** beziehungsweise **(R)-3** wurde der Massenübergang m/z 310.2 \rightarrow 148.2 und für den internen Standard [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (**rac-7**) wurde der Massenübergang m/z 315.2 \rightarrow 153.3 erfasst. Die optimierten Einstellungen für die *Compound-Dependent Parameters* und die *Source-Dependent Parameters* waren für beide Massenübergänge identisch und sind in Tab. 32 zusammengefasst. Die *Dwell Time* wurde in der Methode auf 100 ms gesetzt.

Tab. 32 Einstellungen der *Compound-* und *Source-Dependent Parameters* für m/z 310.2 \rightarrow 148.2 von (S)- [(**S**)-**3**] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] und für m/z 315.2 \rightarrow 153.3 für [$^2\text{H}_5$]Fluoxetin (**rac-7**) am API 5000 im positiven ESI-Modus (Auflösung in Q1 und Q3: „unit“)

<i>Compound-Dependent Parameters</i>		
<i>Declustering Potential</i>	(DP)	25.0 V
<i>Entrance Potential</i>	(EP)	4.0 V
<i>Collision Energy</i>	(CE)	12.0 eV
<i>Collision Cell Exit Potential</i>	(CXP)	4.0 V
<i>Collision Gas</i>	(CAD)	3.0 psi
<i>Source-Dependent Parameters</i>		
<i>Nebulizer Gas</i>	(GS1)	40.0 psi
<i>Auxiliary Gas</i>	(GS2)	70.0 psi
<i>Curtain Gas</i>	(CUR)	25.0 psi
<i>Temperature</i>	(TEM)	700.0 °C
<i>Ion Spray Voltage</i>	(IS)	2550.0 V
<i>Interface Heater</i>	(ihe)	on

Die Einstellungen des verwendeten HTS-PAL Autosamplers wurden in der Methode wie folgt gewählt:

Tab. 33 Einstellungen des HTS-PAL Autosamplers in der LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von (S)- [(S)-3] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(R)-3] am API 5000

Autosampler-Einstellungen	
Probenschleife	20 µL
Injektionsspritze	50 µL
Probenaufnahme	10 µL/s
Injektionsgeschwindigkeit	5.0 µL/s
Spülmodus (Acetonitril/Wasser, 80/20)	post clean
Injektionsvolumen	5 µL

Transfer der entwickelten LC-ESI-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin auf andere RP18 Säulen

Beim Transfer der auf der Luna C18(2) Säule (20 mm x 2 mm, 3 µm) entwickelten LC-ESI-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin (**rac-3**) auf die Luna C18(2) Säule (10 mm x 2 mm, 3 µm) und die Purospher STAR RP18 Säule (30 mm x 2 mm, 3 µm) wurde jeweils die Vorsäule Security Guard C18 (4 mm x 2 mm) verwendet. Fließmittel, Flussrate, Injektionsvolumen und sowohl *Compound-* als auch *Source-Dependent Parameters* waren unter Verwendung des Massenspektrometers API 5000 identisch mit den Parametern der Methode unter Verwendung der Luna C18(2) Säule (20 mm x 2 mm, 3 µm) (siehe *Quantifizierung von (S)- und (R)-Fluoxetin in Proben aus Bindungsstudien über LC-ESI-MS/MS am API 5000*). Allerdings wurde bei Einsatz der Luna C18(2) Säule (10 mm x 2 mm, 3 µm) und der Purospher STAR RP18 Säule (30 mm x 2 mm, 3 µm) die Laufzeit der Chromatographie auf 0.7 min verkürzt. Das Eluat wurde dabei durch ein Schaltventil von 0 min bis 0.1 min und ab 0.6 min zur Schonung der ESI-Quelle und des Massenspektrometers in den Lösungsmittelabfall geleitet. Desweiteren wurde die *Dwell Time* bei Verwendung dieser Säulen auf 50 ms reduziert.

Datenanalyse in der LC-MS/MS Analytik und in der Validierung

Daten aus den LC-MS/MS Analysen wurden mittels der Software *Analyst 1.4.2* (AB Sciex, Darmstadt, Germany) gespeichert und ausgewertet. Vor der Integration der Chromatogramme erfolgte keine Glättung der Rohdaten („Smoothing“). Im Rahmen der Validierung der LC-MS/MS Quantifizierungsmethode für (S)- [(**S**)-**3**] und (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] wurden Kalibrierfunktionen zur Bestimmung der Linearität mit *Analyst 1.4.2* beziehungsweise mit *Prism 4.01* (Graph Pad Software, San Diego, CA) durch lineare Regression erstellt. Dazu wurde das Peakflächenverhältnis (y) von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] zum internen Standard [²H₅]Fluoxetin (*rac-7*) gegen das Konzentrationsverhältnis (x) von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] zum internen Standard *rac-7* aufgetragen. Die Kalibrierfunktionen wurden ohne Gewichtungsfaktor erstellt, wenn die LC-MS/MS Analyse unter Verwendung der Luna C18(2) Säule (20 mm x 2 mm, 3 µm) erfolgte. Bei der Erstellung einer Kalibrierfunktion nach LC-MS/MS Analyse unter Verwendung der Luna C18(2) Säule (10 mm x 2 mm, 3 µm) beziehungsweise der Purospher STAR RP18 Säule (30 mm x 2 mm, 3 µm) wurde mit einem Gewichtungsfaktor von $1/x^2$ gearbeitet. In der Validierung wurde die Richtigkeit als Wiederfindung der nominal in der Probe eingesetzten Analytkonzentration und die Präzision als RSD berechnet. An jedem Versuchstag wurde sowohl eine individuelle Kalibrierfunktion erstellt als auch Richtigkeit und Präzision mittels QCs überprüft. An Versuchstagen, an welchen (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] als Marker eingesetzt und entsprechend quantifiziert wurde, erfolgte die Erstellung einer Kalibrierfunktion und die Bestimmung von Richtigkeit und Präzision wie bereits für (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] beschrieben.

5.3 Bindungsassays

Inkubationspuffer für Bindungsassays wurde immer mit vollentsalztem Wasser hergestellt, welches zusätzlich destilliert wurde. Jeder Versuch wurde, wenn nicht anders angemerkt, mindestens dreimal an unterschiedlichen Tagen und jeweils unter Verwendung frisch hergestellter Puffer durchgeführt. Die Bestimmung von Gesamt- und nichtspezifischer Bindung erfolgte immer in Triplikaten.

5.3.1 Geräte und Material

Alle verwendeten Salze, Reagenzien und andere Chemikalien waren von handelsüblicher Qualität und wurden – sofern keine weiteren Angaben gemacht sind – von den Firmen Acros, Fluka, Merck, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

Geräte

96-Well Filtrationseinheit	Multi-Well Plate Vacuum Manifold (Pall, New York, USA)
Harvester	Brandel M-24R Cell Harvester (Brandel, Gaithersburg, USA)
Szintillationszähler	Canberra Packard triCarb 1600 (Canberra-Packard, Schwadorf, Österreich)
Inkubator	Certomat IS (B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland)
Trockenschrank	WTC Binder Trockenofen (WTC Binder, Tuttlingen, Deutschland)
Vortex	Vortex-2 Genie (Scientific Industries, Bohemia, USA)
Wasserbad	Julabo SW-20C (Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland)

Reagenzien

(S)-Fluoxetin · HCl	≥ 98 % (HPLC) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
(R)-Fluoxetin · HCl	> 98 % (HPLC) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
[² H ₅]Fluoxetin · HCl	(±)-Fluoxetin-d ₅ · HCl (phenyl-d ₅); > 99 % (HPLC); 99.6 % Atom-D (NMR) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland)
[³ H]Paroxetin	Spezifische Aktivität: 854.7 GBq/mmol; Lieferumfang: 9.25 MBq in 250 µL Ethanol (Perkin-Elmer, Waltham, USA)
Szintillationscocktail	Rotiszint eco plus (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Sonstige Materialien

96-Well Platten	PS, 350 µL; PP, 1.2 mL; PP, 2.2 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
96-Well Glasfaserfilterplatte	AcroPrep™ 96 350 µL 1 µm A/B Glass (Pall, New York, USA)
Filter	Glasfaser GF/C (Whatman, Maidstone, U.K.)

5.3.2 Radioligandbindungsassays

Allgemeine Versuchsbeschreibung für Radioligandbindungsassays mit [³H]Paroxetin

Bindungsassays mit dem Radioliganden [³H]Paroxetin (**5**) wurden in Anlehnung an literaturbekannte Methoden von Habert et al.⁷⁷ und Cheetham et al.⁸⁸ durchgeführt. In allen Versuchen wurde die Gesamt- und die nichtspezifische Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) bestimmt. Als Inkubationspuffer wurde 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4 (mit HCl eingestellt) verwendet. Die Bestimmung der nichtspezifischen Bindung von [³H]Paroxetin (**5**) erfolgte immer unter Anwesenheit

von 1 μM Citalopram (**rac-4**). Die Proben wurden bei 22 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Wenn keine ergänzenden Angaben gemacht sind, betrug die Dauer der Inkubation 2 h. Nach der Inkubation erfolgte die Filtration der Inkubationsansätze mittels des Brandel Cell Harvester (M-24R) über Whatman GF/C-Filter, welche zuvor mindestens 1 h in 0.05 % (*m/v*) PEI in Inkubationspuffer eingeweicht wurden. Nach Filtration und anschließendem Waschen der Filter mit kaltem Inkubationspuffer wurden die Filter einzeln mit einer Pinzette vom Harvester gezupft, in Szintillationsvials überführt, mit je 3 mL Szintillationscocktail versetzt und nach ca. 24 h wurden die Proben je 2 min im Szintillationszähler vermessen.

Überprüfung der Expression des Serotonin-Transporters nach transienter Transfektion von HEK-293 Zellen

Inkubationspuffer wurde in 3.5 mL PS-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden 50 μL einer Verdünnung (2 nM) von [^3H]Paroxetin (**5**) hinzu pipettiert (Endkonzentration des Radioliganden **5** im Assay: 200 pM). Die Inkubation wurde durch Zugabe von 100 μL einer Zellsuspension transient transfizierter Zellen gestartet. Das Gesamtassayvolumen betrug 500 μL . Nach Filtration der Proben wurde der Filtrerrückstand mit 3x ca. 500 μL kaltem Inkubationspuffer gewaschen. Die weitere Versuchsdurchführung und die Szintillationszählung erfolgten wie in unter *Allgemeine Versuchsbeschreibung für Radioligandbindungsassays mit [^3H]Paroxetin* detailliert geschildert.

Screening der HEK-293 Klone nach stabiler Transfektion

Für das Screening der Zellklone nach stabiler Transfektion von HEK-293 Zellen mit pCMV6-Entry-hSERT beziehungsweise mit pcDNA3.1(+)-hSERT wurde Inkubationspuffer in 3.5 mL oder 5 mL PS-Röhrchen vorgelegt. Im Fall der mit pCMV6-Entry-hSERT transfizierten Zellen wurden 50 μL einer Verdünnung (2 nM) von [^3H]Paroxetin (**5**) hinzu pipettiert (Endkonzentration des Radioliganden **5** im Assay: 200 pM); das Gesamtassayvolumen betrug in diesen Versuchen 500 μL . Im Fall der mit pcDNA3.1(+)-hSERT transfizierten Zellen wurden 300 μL einer [^3H]Paroxetin-Verdünnung (1 nM) zugesetzt (Endkonzentration im Assay: 100 pM); dabei betrug das Gesamtassayvolumen 3000 μL . Die Inkubation wurde jeweils durch Zugabe von 100 μL einer Suspension des Zellklons gestartet. Nach Inkubation und

Filtration der Proben wurden die Filter mit 3x ca. 500 μL (Zellklone mit pCMV6-Entry-hSERT transfiziert) beziehungsweise mit 3x ca. 3 mL (Zellklone mit pcDNA3.1(+)-hSERT transfiziert) kaltem Inkubationspuffer gewaschen. Die weitere Versuchsdurchführung und die Szintillationszählung erfolgten wie unter *Allgemeine Versuchsbeschreibung für Radioligandbindungsassays mit [³H]Paroxetin* detailliert geschildert.

Radioligand-Sättigungsexperimente mit [³H]Paroxetin

Zunächst wurde Inkubationspuffer in 5 mL oder in 10 mL PS-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden steigende Konzentrationen [³H]Paroxetin (**5**) (je 300 μL , wenn das Gesamtassayvolumen 3000 μL betrug; je 75 μL , wenn das Gesamtassayvolumen 7500 μL betrug) hinzu pipettiert ([³H]Paroxetin-Endkonzentration im Assay: 10 pM – 2 nM). Die Inkubation wurde durch Zugabe von 100 μL einer HEK-hSERT beziehungsweise HEK-hSERT-Myc-Flag[®] Membranpräparation oder von 100 μL einer entsprechenden Zellsuspension gestartet. Nach Inkubation und Filtration wurden die Filter mit kaltem Inkubationspuffer gewaschen (3x ca. 3 mL bei einem Assayvolumen von 3000 μL : 3x ca. 5 mL bei einem Assayvolumen von 7500 μL). Die weitere Versuchsdurchführung und die Szintillationszählung erfolgten wie in unter *Allgemeine Versuchsbeschreibung für Radioligandbindungsassays mit [³H]Paroxetin* detailliert geschildert.

Überprüfung der Targetstabilität

Der Inkubationspuffer wurde in 10 mL-PS-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden 75 μL einer 1 nM [³H]Paroxetin-Lösung (Endkonzentration von [³H]Paroxetin (**5**) im Assay: 10 pM) zugefügt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 100 μL einer Zellsuspension gestartet (HEK-293 Zellen stabil transfiziert mit pcDNA3.1(+)-hSERT). Das Gesamtassayvolumen betrug 7500 μL . Die Inkubation erfolgte bei 22 °C im Schüttelwasserbad. Nach 1 h – 4 h wurde die Inkubation durch Filtration beendet. Anschließend wurden die Filter mit 3x ca. 5 mL kaltem Inkubationspuffer gewaschen. Die weiteren Schritte einschließlich der Szintillationszählung erfolgten wie unter *Allgemeine Versuchsbeschreibung für Radioligandbindungsassays mit [³H]Paroxetin* ausführlich beschrieben.

5.3.3 MS-Bindungsassays

Verwendung von HEK-hSERT Membranpräparationen

Membranpräparationen von stabil hSERT exprimierenden HEK-293 Zellen wurden nach folgendem Protokoll vorbereitet: Ein Aliquot (2 mL) der in 0.32 M Saccharose bei -80 °C eingefrorenen Suspension (siehe *Herstellung von Membranpräparationen* unter 5.1.3) wurde zügig unter fließendem kaltem Wasser aufgetaut und unter Nachspülen mit 0.9 %iger (*m/v*) NaCl-Lösung in ein 40 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde das zehnfache Volumen 0.9 %ige NaCl-Lösung hinzugefügt und direkt im Anschluss 20 min zentrifugiert (20000 rpm, vorgekühlter Rotor SS34, 4 °C, Sorvall). Der Überstand wurde verworfen und das Pellett im gewünschten Volumen kaltem Inkubationspuffer (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4) resuspendiert (Polytron, ca. 20 s). Während der gesamten Versuchszeit wurde die Membranpräparation auf Eis und bei längeren Stehzeiten zusätzlich mittels Magnetrührer und Rührfisch homogen gehalten. Die bei den Versuchen eingesetzte Proteinkonzentration der Suspension lag bei 0.1–0.2 mg/mL.

Stammlösungen und Verdünnungen verwendeter Verbindungen

1 mM wässrige Stammlösungen von (S)- [(**S**)-3] und (R)-Fluoxetin [(**R**)-3] wurden bei -20 °C gelagert. Aus den 1 mM wässrigen Stammlösungen wurden 10 µM wässrige Verdünnungen hergestellt und aliquotiert ebenfalls bei -20 °C eingefroren. An Versuchstagen wurde ein Aliquot einer solchen Verdünnung bei RT aufgetaut und es wurde eine gewünschte Verdünnung von (**S**)-3 beziehungsweise (**R**)-3 in Inkubationspuffer (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4) hergestellt, welche dann im Versuch eingesetzt wurde. Stammlösungen sämtlicher untersuchter Testverbindungen lagen in einer Konzentration von 10 mM oder 1 mM in Wasser oder in DMSO gelöst vor und wurden ebenfalls bei -20 °C gelagert. An Versuchstagen wurden die Stammlösungen bei RT aufgetaut und die für einen Versuch geforderten Verdünnungen in Inkubationspuffer hergestellt. Eine 1 mM wässrige Stammlösung wurde auch vom internen Standard [²H₅]Fluoxetin (**rac-7**) hergestellt und bei -20 °C gelagert. Daraus wurde eine 1 µM wässrige Verdünnung hergestellt, welche aliquotiert ebenfalls bei -20 °C eingefroren und zu Versuchszwecken bei RT aufgetaut und verwendet wurde.

Allgemeine Versuchsbeschreibung für MS-Bindungsassays mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker

Die Assaysbedingungen für MS-Bindungsassays an hSERT wurden in Anlehnung an literaturbekannte Untersuchungen mit [³H]Fluoxetin¹²¹ und in Anlehnung an die zuvor durchgeführten Radioligandbindungsstudien mit [³H]Paroxetin (**5**) (siehe 5.3.2) gewählt. Die Durchführung der MS-Bindungsassays erfolgte in Analogie zu der von Zepperitz etablierten Vorgehensweise in MS-Bindungsassays für mGAT1.⁷⁹

In allen Bindungsversuchen wurde – sofern nicht anders angegeben – sowohl die Gesamt- als auch die nichtspezifische Bindung von (S)- [(**S**)-**3**] beziehungsweise von (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] bestimmt. Die Bestimmung der nichtspezifischen Bindung von (S)- [(**S**)-**3**] beziehungsweise von (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] erfolgte in allen Experimenten unter Anwesenheit von 10 µM Imipramin (**2**). Als Inkubationspuffer wurde 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4 (eingestellt mit HCl) eingesetzt. Die Inkubation der Proben erfolgte entweder in 96-Well Microtiterplatten (350 µL, PS) oder in 2.2 mL 96-Deepwell Platten (PP). Bindungsproben wurden bei 22 °C im Schüttelinkubator inkubiert (100 rpm). Wenn keine ergänzenden Angaben gemacht sind, betrug die Dauer der Inkubation 2 h. Während der Inkubation wurden die verwendeten 96-Well Platten immer mit einem PS-Deckel abgedeckt. Zur Beendigung der Inkubation wurden die Inkubationsansätze über 96-Well Glasfaserfilterplatten unter Vakuum filtriert. Dazu wurden die Proben reihenweise mit einer 12-Kanalpipette von der Inkubations- auf die Filterplatte übertragen und abgesaugt. Die Filter waren zuvor mindestens 1 h mit 100 µL 0.3 % (*m/v*) PEI in Inkubationspuffer bedeckt worden, wobei vor der Filtration der Proben die PEI-Lösung unter Vakuum abgesaugt wurde. Die Vakuumfiltration erfolgte immer mittels einer 96-Well Filtrationseinheit (Pall). Dabei wurde im unteren Teil der Apparatur eine 2.2 mL 96-Deepwell Platte als Auffangplatte für das Filtrat positioniert. Nach der Filtration der Inkubationsansätze wurden die Filter immer mit 5x 150 µL kaltem Inkubationspuffer gewaschen. Danach wurde die Filterplatte 60 min bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Abkühlen der Platte auf RT wurde mit Methanol, welchem 2.67 nM interner Standard [²H₅]Fluoxetin (**rac-7**) zugesetzt war, eluiert (3x 70 µL). Die Elution erfolgte ebenfalls mittels der 96-Well Filtrationseinheit. Nicht verwendete Wells der Filterplatte wurden zur Elution immer luftdicht mit Klebefolie abgeklebt. Zur Elution wurden jeweils 70 µL der methanolischen Elutionslösung auf die Filter pipettiert und es wurde bei RT 30 s

mit aufgelegtem PS-Deckel inkubiert. Danach wurde unter Vakuum abgesaugt. Der Elutionsvorgang wurde noch zwei weitere Male mit je 70 μL der methanolischen Lösung mit internem Standard **rac-7** wiederholt. Das Eluat wurde in einer 96-Deepwell Platte (1.2 mL, PP), welche sich im unteren Teil der verwendeten Filtrationsapparatur befand, aufgefangen. Bei Verwendung dieser 1.2 mL 96-Deepwell Platten wurde in der Apparatur unter der 96-Well Platte immer eine ca. 0.5 cm dicke Plexiglasscheibe als Adapter positioniert. Nach der Elution wurden 70 μL Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) pro Well zugesetzt, wodurch die Endkonzentration des internen Standards **rac-7** in den zu analysierenden Proben 2 nM betrug. Die Platte wurde gevortext, mit Aluminiumfolie abgedeckt und die Proben direkt im Anschluss über die entwickelte LC-MS/MS Methode (siehe *Quantifizierung von (S)- und (R)-Fluoxetin in Proben aus Bindungsstudien über LC-ESI-MS/MS am API 5000* unter 5.2.2) analysiert. Die Chromatographie erfolgte immer mit der Luna C18(2) Säule (20 mm x 2 mm). An jedem Versuchstag, an dem ein MS-Bindungsassay durchgeführt wurde, wurde zur Markerquantifizierung über LC-MS/MS eine Kalibrierfunktion erstellt und mittels *Quality Control Samples (QCs)* wurden zusätzlich auch Richtigkeit und Präzision der Quantifizierungsmethode bestimmt (siehe *Herstellung von Kalibrierstandards und Quality Control Samples (QCs) zur Validierung der LC-ESI-MS/MS Quantifizierungsmethode für (S)-Fluoxetin und Datenanalyse in der LC-MS/MS Analytik und in der Validierung* unter 5.2.2).

MS-Sättigungsexperimente mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker

Inkubationspuffer wurde in einer 96-Deepwell Platte (2.2 mL, PP) vorgelegt. Anschließend wurden steigende Konzentrationen von (S)- [(**S**)-**3**] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] zugesetzt (je 100 μL , Endkonzentrationen des Markers jeweils 0.3 nM – 75 nM). Die Inkubation wurde durch Zugabe von 50 μL HEK-hSERT Membranpräparation gestartet (ca. 10 μg Protein pro Well). Die nichtspezifische Markerbindung wurde bei Markerendkonzentrationen ≥ 10 nM (bei Einsatz von (S)-Fluoxetin [(**S**)-**3**] als Marker) beziehungsweise ≥ 15 nM (bei Einsatz von (R)-Fluoxetin [(**R**)-**3**] als Marker) bestimmt. Das Assaygesamtvolumen betrug in den Sättigungsexperimenten 1000 μL . Die Inkubation wurde durch Filtration von 3x 300 μL eines Inkubationsansatzes über den gleichen Filter beendet. Dabei wurde nach dem Übertragen der ersten 300 μL eines Ansatzes sofort unter Vakuum filtriert; anschließend wurden die zweiten 300 μL eines Ansatzes in das gleiche Well wie die

ersten 300 μL übertragen und es wurde ebenfalls sofort abgesaugt. Der dritte Filtrationsschritt (weitere 300 μL) erfolgte schließlich nach dem gleichen Prinzip. Die weiteren Versuchsschritte einschließlich der Quantifizierung über LC-MS/MS erfolgten wie unter *Allgemeine Versuchsbeschreibung für MS-Bindungsassays mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker* ausführlich beschrieben.

In den MS-Sättigungsexperimenten wurde die nichtspezifische Markerbindung bei nominalen Assaykonzentrationen < 10 nM (bei Einsatz von (S)-Fluoxetin [(S)-3] als Marker) beziehungsweise < 15 nM (bei Einsatz von (R)-Fluoxetin [(R)-3] als Marker) durch Extrapolation nach linearer Regression der experimentell ermittelten Werte für die nichtspezifische Bindung bei nominalen Assaykonzentrationen ≥ 10 nM von (S)-Fluoxetin [(S)-3] beziehungsweise ≥ 15 nM von (R)-Fluoxetin [(R)-3] bestimmt.

Kompetitive MS-Bindungsassays mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker

Der Inkubationspuffer wurde in einer 96-Well Microtiterplatte (350 μL , PS) vorgelegt. Anschließend wurden 30 μL einer Verdünnung des Markers ((S)-Fluoxetin-Endkonzentration im Assay: 5 nM; (R)-Fluoxetin-Endkonzentration im Assay: 10 nM) und danach steigende Konzentrationen der Testsubstanzen (je 30 μL , mindestens 6 verschiedene Konzentrationen pro Testsubstanz) hinzu pipettiert. Zur Realisierung dieser Vorgehensweise waren zuvor immer 10fach konzentrierte Lösungen (in Inkubationspuffer) der gewünschten Testsubstanz-Endkonzentrationen aus 10 mM beziehungsweise 1 mM Stammlösungen der Verbindungen (je nach Löslichkeit in Wasser oder DMSO) hergestellt worden. Die DMSO-Konzentration im Assay betrug maximal 1 %, wobei die DMSO-Konzentration mit steigender Verdünnung geringer wurde. Die Inkubation wurde durch Zugabe von HEK-hSERT Membranpräparation gestartet (50 μL , ca. 5 μg Protein pro Well). Das Gesamtassayvolumen betrug 300 μL . Die Gesamtbindung von (S)- [(S)-3] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(R)-3] wurde ohne Zusatz einer Testverbindung bestimmt.

Da die nichtspezifische Bindung bei der in Konkurrenzexperimenten eingesetzten (S)-Fluoxetin-Konzentration von 5 nM beziehungsweise bei der eingesetzten (R)-Fluoxetin-Konzentration von 10 nM nicht über die LC-MS/MS Methode quantifiziert werden konnte, wurde die nichtspezifische Bindung in zusätzlichen Experimenten für

nominale Markerkonzentrationen zwischen 30 nM und 100 nM im gleichen Versuchsaufbau bestimmt. Nach linearer Regression der in diesen Experimenten ermittelten Werte für die nichtspezifische Markerbindung konnte aus der erhaltenen Geraden schließlich die nichtspezifische Markerbindung für die in den Konkurrenzexperimenten tatsächlich eingesetzte Markerkonzentration extrapoliert werden.

In MS-Konkurrenzexperimenten wurde die Inkubation durch Filtration von 280 µL eines Inkubationsansatzes beendet. Die weiteren Versuchsschritte einschließlich der Quantifizierung über LC-MS/MS erfolgten wie unter *Allgemeine Versuchsbeschreibung für MS-Bindungsassays mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker* ausführlich beschrieben.

Kinetische MS-Bindungsassays mit (S)-Fluoxetin als Marker

Zunächst wurde der Inkubationspuffer in einer 96-Well Microtiterplatte (350 µL, PS) vorgelegt. Es wurden anschließend 30 µL einer Verdünnung des Markers hinzu pipettiert. Die (S)-Fluoxetin-Endkonzentration im Assay betrug 5 nM in Assoziations- und 50 nM in Dissoziationsexperimenten. Das Gesamtassayvolumen betrug in allen Versuchen 300 µL. In Assoziationsexperimenten wurde die Inkubation durch Zugabe von 50 µL HEK-hSERT Membranpräparation (ca. 5 µg Protein) entsprechend dem gezeigten Zeitschema (siehe Schema 3) gestartet. Der Start der Inkubation erfolgte dabei zu genau definierten Zeitpunkten, so dass unter Einhaltung unterschiedlicher Inkubationszeiten zur Beendigung der Inkubation die Übertragung von je 280 µL der Inkubationsansätze auf die Glasfaserfilter reihenweise mittels einer 12-Kanalpipette mit anschließender Vakuumfiltration erfolgen konnte. Unmittelbar darauf wurden die Filter dann gewaschen.

#	Targetzugabe zum Zeitpunkt t (in min)	Inkubationszeit Δt (in s)	Filtration zum Zeitpunkt t (in min)
A1-3	73	60	74
A4-6	72	120	74
A7-9	71	180	74
A10-12	70	240	74
B1-3	52	480	60
B4-6	45	900	60
B7-9	30	1800	60
B10-12	0	3600	60

Schema 3 Zeitschema zur Durchführung von MS-Assoziationsexperimenten (Inkubation bei 22 °C im Schüttelinkubator)

In Dissoziationsexperimenten wurden Marker (50 nM (S)-Fluoxetin [(S)-**3**]) und HEK-hSERT Membranpräparation (ca. 5 µg Protein) zunächst bis zur Gleichgewichtseinstellung vorinkubiert (1 h). Zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung wurden Target und Marker zusätzlich unter Anwesenheit von 10 µM Imipramin (**2**) inkubiert. Die Dissoziation des Target-Marker-Komplexes wurde nach der Vorinkubation in allen Bindungsproben mit Imipramin (**2**) (10 µL, Endkonzentration: 10 µM) initiiert. Auch in diesem Versuchsaufbau wurde ein genau definiertes Zeitschema (siehe Schema 4) eingehalten. Sowohl die Targetzugabe zur Vorinkubation als auch die Zugabe von Inhibitor zum Start der Dissoziation erfolgten zu exakt definierten Zeitpunkten, so dass nach bestimmten Zeitintervallen die Beendigung der Dissoziation durch reihenweises Übertragen von jeweils 280 µL eines Inkubationsansatzes auf die Filterplatte mit anschließender Vakuumfiltration erfolgen konnte. Auch hier wurde der Filtrerrückstand direkt im Anschluss gewaschen.

#	Targetzugabe zum Zeitpunkt t (in min)	Inhibitorzugabe zum Zeitpunkt t (in min)	Inkubationszeit Δt (in s)	Filtration zum Zeitpunkt t (in min)
A1-6	56	116	60	117
A7-12	55	115	120	117
B1-6	54	114	240	118
B7-12	50	110	480	118
C1-6	44	104	900	119
C7-12	29	89	1800	119
D1-6	20	80	2400	120
D6-12	0	60	3600	120

Schema 4 Zeitschema zur Durchführung von MS-Dissoziationsexperimenten (Inkubation bei 22 °C im Schüttelinkubator)

Die weiteren Versuchsschritte einschließlich der Quantifizierung über LC-MS/MS erfolgten wie unter *Allgemeine Versuchsbeschreibung für MS-Bindungsassays mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker* ausführlich beschrieben.

Untersuchung unterschiedlicher Volumina Methanol zur Elution vormals gebundenen Markers

Inkubationspuffer wurde in einer 96-Well Microtiterplatte (350 μL , PS) vorgelegt. Anschließend wurden 25 μL einer 50 nM von (S)-Fluoxetin [(S)-**3**] zugesetzt (Endkonzentration im Assay: 5 nM). Die Inkubation wurde durch Zugabe von 50 μL HEK-hSERT Membranpräparation (5–10 μg Protein pro Well) gestartet. Das Gesamtassayvolumen betrug in den Untersuchungen 250 μL . Inkubation, Filtration (je 200 μL) sowie Waschen und Trocknen der Filter erfolgte wie unter *Allgemeine Versuchsbeschreibung für MS-Bindungsassays mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker* ausführlich beschrieben. Nach dem Abkühlen der verwendeten Filterplatte auf RT wurde mit Methanol eluiert. Nicht verwendete Wells der Filterplatte wurden dabei luftdicht mit Klebefolie abgeklebt. Die Elution erfolgte mit 3x 50 μL , 3x 60 μL , 3x 70 μL oder 3x 100 μL Methanol. Jeweils 50 μL , 60 μL , 70 μL

beziehungsweise 100 μL Methanol wurden dazu auf die Filter gegeben und es wurde bei RT 30 s mit aufgelegtem PS-Deckel inkubiert. Danach wurde unter Vakuum filtriert. Das Eluat wurde wie unter *Allgemeine Versuchsbeschreibung für MS-Bindungsassays* in einer 96-Deepwell Platte (1.2 mL, PP) aufgefangen. Der Elutionsvorgang, welcher die Zugabe des entsprechenden Volumens Methanol auf die Filter, die anschließende Inkubation und die darauf folgende Filtration umfasste, wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Abschließend wurden je nach Elutionsvolumen – also je nachdem ob mit 3x 50 μL , 3x 60 μL , 3x 70 μL oder 3x 100 μL Methanol eluiert wurde – 50 μL , 60 μL , 70 μL beziehungsweise 100 μL Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) pro Well zu den eluierten Proben gegeben. Die weiteren Schritte und die LC-MS/MS Analyse erfolgten wie im Abschnitt *Allgemeine Versuchsbeschreibung für MS-Bindungsassays mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker* beschrieben.

Herstellung von Matrixproben für die LC-MS/MS Methodenentwicklung

Wie in einem Bindungsassay wurde Inkubationspuffer in einer 96-Well Microtiterplatte (350 μL , PS) vorgelegt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 50 μL HEK-hSERT Membranpräparation (entsprechend etwa 5 μg Protein) gestartet. Das Gesamtassayvolumen betrug 250 μL . Inkubation, Filtration (200 μL) sowie Waschen und Trocknen der Filter erfolgte wie unter *Allgemeine Versuchsbeschreibung für MS-Bindungsassays mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker* dargestellt. Nach dem Abkühlen der Filterplatte auf Raumtemperatur wurde mit 3x 100 μL Methanol entsprechend der Standardvorgehensweise eluiert. Die 96-Deepwell Platte (1.2 mL, PP), in welcher die eluierte methanolische Lösung aufgefangen wurde, wurde danach in den Trockenschrank gestellt und bei 50 $^{\circ}\text{C}$ wurde Methanol über Nacht eingedampft. Nach dem Abkühlen der Platte am nächsten Morgen, wurde die erhaltene „eingetrocknete, leere“ Matrix bei Bedarf im entsprechenden Fließmittel, welches mit einer gewünschten Konzentration des Analyten und gegebenenfalls des internen Standards gespiked war, aufgenommen und die erhaltene Probe wurde über LC-MS/MS als sogenannte Matrixprobe analysiert.

Herstellung von Kalibrierstandards und Quality Control Samples (QCs) zur Validierung der LC-ESI-MS/MS Quantifizierungsmethode für (S)-Fluoxetin

Aus wässrigen Stammlösungen von (S)-Fluoxetin [(S)-3] und [²H₅]Fluoxetin (*rac-7*) (Konzentration jeweils 1 mM) wurden eine 100 nM Verdünnung von (S)-3 beziehungsweise eine 1 µM Verdünnung von *rac-7* in H₂O hergestellt. Die Lösungen wurden aliquotiert bei -20 °C eingefroren und gelagert. An jedem Versuchstag wurde ein Aliquot dieser Verdünnungen aufgetaut und es wurden daraus methanolische Lösungen hergestellt, welche definierte Konzentrationen (S)-Fluoxetin [(S)-3] (67 pM – 4 nM) und jeweils 2.67 nM internen Standard [²H₅]Fluoxetin (*rac-7*) enthielten (siehe Schema 5 links).

Sowohl Kalibrierstandards als auch QCs wurden immer als Matrixproben hergestellt und analysiert. Die Herstellung dieser Proben für die Validierung erfolgte in Analogie zur Durchführung von MS-Bindungsassays (siehe *Allgemeine Versuchsbeschreibung für MS-Bindungsassays mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker*). Zunächst wurde HEK-hSERT Membranpräparation (entsprechend ca. 10 µg Protein) in Inkubationspuffer inkubiert (2.2 mL 96-Deepwell Platte, PP). Das Gesamtassayvolumen betrug 1000 µL. Anschließend wurden wie bereits für MS-Sättigungsexperimente (siehe *MS-Sättigungsexperimente mit (S)- beziehungsweise (R)-Fluoxetin als Marker*) beschrieben, 3x 300 µL eines jeden Inkubationsansatzes filtriert. Waschen und Trocknen der Filter erfolgte nach der Standardvorgehensweise. Danach erfolgte die methanolische Elution der Proben mit jeweils 3x 70 µL der zuvor hergestellten methanolischen Lösungen, welche definierte Konzentrationen (S)-Fluoxetin [(S)-3] und jeweils 2.67 nM internen Standard *rac-7* enthielten. Zur Durchführung der Elution wurden die hergestellten methanolischen Lösungen für das LLOQ und die QCs immer in jeweils sechs Wells einer 96-Well Microtiterplatte (350 µL, PS) vorgelegt (pro Well 270 µL). Die methanolischen Lösungen der weiteren Kalibrierstandards wurden ebenfalls in Wells dieser 96-Well Platte pipettiert – allerdings wurden diese nur als Triplikate vorgelegt. Zusätzlich wurden noch drei Wells der Microtiterplatte mit je 270 µL reinem Methanol befüllt. Diese Platte wurde nach den Pipettierschritten sofort mit einem PS-Deckel bedeckt. Zur Elution wurden die in der Microtiterplatte vorgelegten methanolischen Lösungen reihenweise mit einer 12-Kanalpipette auf die nach dem Trocknungsschritt auf Raumtemperatur abgekühlte Filterplatte übertragen. Dafür wurden pro Reihe zunächst 70 µL in jedes

Well übertragen. Nach einer Inkubationszeit von 30 s, wobei die Filterplatte immer mit einem PS-Deckel abgedeckt wurde, wurde unter Vakuum filtriert und das Eluat in einer 1.2 mL 96-Deepwell Platte (PP) aufgefangen. Die Elution mit jeweils 70 μ L der methanolischen Lösungen wurde auf die beschriebene Weise noch zwei Mal wiederholt. Während des Elutionsschrittes wurden immer alle nicht verwendeten Wells der 96-Well Filterplatte luftdicht mit Klebefolie abgeklebt.

	Konzentration (in pM) in der methanolischer Lösung zur Elution		Konzentration (in pM) in der LC-MS/MS Probe zur Quantifizierung	
	(S)-Fluoxetin [(S)-3]	[² H ₅]Fluoxetin (<i>rac-7</i>)	(S)-Fluoxetin [(S)-3]	[² H ₅]Fluoxetin (<i>rac-7</i>)
LLOQ (6)	67	2667	50	2000
Kal (3)	100	2667	75	2000
Kal (3)	200	2667	150	2000
Kal (3)	400	2667	300	2000
Kal (3)	1000	2667	750	2000
Kal (3)	2000	2667	1500	2000
Kal (3)	3333	2667	2500	2000
Kal (3)	4000	2667	3000	2000
QC (6)	133	2667	100	2000
QC (6)	1333	2667	1000	2000
QC (6)	2667	2667	2000	2000

Schema 5 Übersicht der Konzentrationen von Analyt (S)-Fluoxetin [(S)-3] und dem internen Standard [²H₅]Fluoxetin (*rac-7*) in den methanolischen Proben zur Elution (links) und in den finalen Kalibrierstandards und QCs, welche über LC-MS/MS analysiert wurden (rechts); Kal = Kalibrierstandards, QC = *Quality Control Sample*, (n) = Anzahl der Proben.

Nach der Elution wurden in jedes Well der 1.2 mL 96-Deepwell Platte 70 μ L Ammoniumbicarbonatpuffer (5 mM, pH 9.5) gegeben. Dadurch ergaben sich

Endkonzentrationen von (S)-Fluoxetin [(S)-3] zwischen 50 pM und 3 nM für die Kalibrierstandards und Endkonzentrationen von 100 pM, 1 nM und 2 nM für die QCs (siehe Schema 5 rechts). Die Endkonzentration des internen Standards *rac-7* betrug in den Proben 2 nM. Matrixproben, welche durch Elution mit reinem Methanol erhalten wurden, dienten in der LC-MS/MS Analyse als Matrixblanks. Bevor die Proben quantifiziert wurden (siehe *Quantifizierung von (S)- und (R)-Fluoxetin in Proben aus Bindungsstudien über LC-ESI-MS/MS am API 5000* unter 5.2.2 beziehungsweise *Transfer der entwickelten LC-ESI-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Fluoxetin auf andere RP18 Säulen* unter 5.2.2), wurde die Deepwell-Platte vorsichtig gevortext und mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Sowohl bei der Durchführung von MS-Sättigungsexperimenten als auch bei der Durchführung kinetischer und kompetitiver MS-Experimente wurde an jedem Versuchstag sowohl eine individuelle Kalibrierfunktion (8 Konzentrationen, siehe Schema 5) als auch QCs (3 Konzentrationen, siehe Schema 5) zur Untersuchung von Richtigkeit und Präzision erstellt. Das LLOQ und die QCs wurden dabei immer in sechsfacher Ausführung, die Kalibrierstandards dagegen nur in Triplikaten hergestellt und analysiert. Die Vorgehensweise unterschied sich bei der Durchführung kinetischer und kompetitiver Experimente von der oben beschriebenen Vorgehensweise nur dadurch, dass die Inkubation von Target in Inkubationspuffer – wie für kinetische und kompetitive MS-Experimente üblich – in einem Assayvolumen von 300 µL erfolgte und davon dann 280 µL filtriert wurden.

In den Untersuchungen mit (R)-Fluoxetin [(R)-3] als Marker erfolgte die Quantifizierung dieses Markers auf die gleiche Weise wie für (S)-Fluoxetin [(S)-3] beschrieben (siehe *Quantifizierung von (S)- und (R)-Fluoxetin in Proben aus Bindungsstudien über LC-ESI-MS/MS am API 5000* unter 5.2.2). Kalibrierstandards und QCs wurden dabei an Versuchstagen, in welchen MS-Sättigungs- oder MS-Kompetitionsexperimente mit (R)-Fluoxetin [(R)-3] durchgeführt wurden, mit dem Analyten (R)-3 und dem internen Standard *rac-7* auf die gleiche Weise wie oben für (S)-3 beschrieben, hergestellt.

5.3.4 Datenanalyse in Bindungsstudien

In allen Bindungsexperimenten wurde die spezifische Bindung als Differenz von Gesamtbindung (Bindung des Markers ohne Kompetitor) und nichtspezifischer Bindung (Bindung des Markers in Anwesenheit eines Überschusses an Kompetitor) definiert. Sowohl die Proben für die Gesamt- als auch für die nichtspezifische Bindung wurden immer in Triplikaten hergestellt und analysiert. Zur Charakterisierung transfizierter Zellen bezüglich der Expressionsrate von hSERT beziehungsweise hSERT-Myc-Flag[®] wurde der Quotient aus Gesamt- und nichtspezifischer Bindung gebildet (GB/NSB). In MS-Sättigungsexperimenten konnte die nichtspezifische Markerbindung für (S)-Fluoxetin-Konzentrationen < 10 nM und für (R)-Fluoxetin-Konzentrationen < 15 nM experimentell nicht bestimmt werden. Daher wurde sie aus einer nach linearer Regression erhaltenen Geraden für die experimentell bestimmte nichtspezifische Markerbindung bei nominalen (S)-Fluoxetin-Konzentrationen ≥ 10 nM beziehungsweise bei nominalen (R)-Fluoxetin-Konzentrationen ≥ 15 nM extrapoliert. In allen Sättigungsexperimenten wurde die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_d) und die maximale Zahl an Bindungsstellen (B_{max}) mittels nichtlinearer Regression (*one site binding*; Prism 4.01, Graph Pad Software, San Diego, CA) aus den Sättigungsisothermen der spezifischen Markerbindung ermittelt. In Konkurrenzexperimenten wurde die Konzentration einer Testverbindung, welche die spezifische Bindung des Markers um 50 % reduzierte (IC_{50}) mittels nichtlinearer Regression (*one site competition*; Prism 4.01, Graph Pad Software, San Diego, CA) aus der sigmoidalen Inhibitionskurve erhalten. Das obere Plateau der Kurve wurde auf 100 % spezifische Bindung (Bestimmung ohne Kompetitor) und das untere Plateau auf 0 % spezifische Bindung (entspricht dem Wert der nichtspezifischen Bindung) normiert. Die K_i -Werte wurden nach Cheng-Prusoff¹²⁶ berechnet. Da in MS-Konwettbewerbsexperimenten die nichtspezifische Markerbindung bei einer im Assay vorliegenden (S)-Fluoxetin-Konzentration von 5 nM beziehungsweise einer (R)-Fluoxetin-Konzentration von 10 nM experimentell nicht bestimmt werden konnte, wurde sie aus einer nach linearer Regression experimentell ermittelter Werte für die nichtspezifische Markerbindung bei nominalen Konzentrationen von (S)- [(S)-3] beziehungsweise (R)-Fluoxetin [(R)-3] zwischen 30 nM und 100 nM (unter Anwesenheit von 10 μ M Imipramin (2)) erhaltenen Geraden extrapoliert. Nichtlineare Regression (Prism 4.01,

Graph Pad Software, San Diego, CA) der kinetischen Bindungskurven lieferte eine Dissoziationskonstante k_{-1} (*one-phase exponential decay*) und eine observed rate constant k_{obs} (*one-phase exponential association*) aus welcher die Assoziationskonstante k_{+1} gemäß der Gleichung $k_{+1} = (k_{\text{obs}} - k_{-1})/c$ (wobei c die eingesetzte Markerkonzentration darstellt) berechnet wurde. Die Markerdepletion war in allen Experimenten vernachlässigbar ($\leq 10\%$).

6 Abkürzungsverzeichnis

API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
bp	Basenpaare
CAD	<i>Collision Gas</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	<i>Collision Energy</i>
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
cpm	<i>Counts per Minute</i>
CRM	<i>Charge Residue Model</i>
CUR	<i>Curtain Gas</i>
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
DAT	Dopamin-Transporter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	<i>Declustering Potential</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	<i>Entrance Potential</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
FP	Fluoreszenz-Polarisation
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

GABA	γ -Aminobuttersäure
GAT	GABA-Transporter
GB	Gesamtbindung
GS1	<i>Nebulizer Gas</i>
GS2	<i>Auxiliary Gas</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney Cell</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
hSERT	Humaner Serotonin-Transporter
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
IEM	<i>Ion Evaporation Model</i>
ihe	<i>Interface Heater</i>
IS	<i>Ionspray Voltage</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LeuT	Leucin-Transporter
LLOQ	<i>Lower Limit of Quantification</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mGAT	Muriner GABA-Transporter
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-MS
NET	Noradrenalin-Transporter
NSB	Nichtspezifische Bindung
NSS	Neurotransmitter Natrium Symporters
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglycol

PEI	Polyethylenimin
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
SB	Spezifische Bindung
SD	<i>Standard Deviation</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SERT	Serotonin-Transporter
SLC6	<i>Solute Carrier Family 6</i>
SNRI	Selektive Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren
SPA	<i>Scintillation Proximity Assay</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SRM	<i>Single Reaction Monitoring</i>
SSRI	Selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren
TCA	Tricyclische Antidepressiva
TEM	Temperatur
TIC	<i>Total Ion Current</i>
TM	Transmembranäre Helix
t_R	Retentionszeit
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	<i>Unit</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

- ¹ WHO, World Health Report **2001**, <http://www.who.int/whr/2001> (accessed 12. April 2011).
- ² Europäische Kommission, Grünbuch zur psychische Gesundheit **2005**, http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/mental/green_paper/mental_gp_de.pdf (accessed 12. April 2011).
- ³ Wittchen, H.-U.; Jacobi, F. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2005**, *15*, 357–376.
- ⁴ Robert Koch Institut, Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 51 **2010**, http://www.rki.de/cln_178/nn_205770/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/depression,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/depression.pdf (accessed 01. Mai 2011).
- ⁵ Schildkraut, J. J.; Kety, S. S. *Science.* **1967**, *156*, 21–30.
- ⁶ Lapin, I. P.; Oxenkrug, G. F. *Lancet* **1969**, *293*, 132–136.
- ⁷ Hoyer, D.; Hannon, J. P.; Martin, G. R. *Pharmacol. Biochem. Be.* **2002**, *71*, 533–554.
- ⁸ Starke, K. Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K., Eds.; Elsevier, München, **2009**; 10. Auflage.
- ⁹ Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. *Pharmacology*; Elsevier Science, Philadelphia, **2003**; p 481.
- ¹⁰ Den Boer, J. A.; Bosker, F. J., Slaap, B. R. *Hum. Psychopharmacol.* **2000**, *15*, 315–336.
- ¹¹ Tunnicliff G. *Pharmacol. Toxicol.* **1991**, *69*, 149–156.
- ¹² Peroutka, S. J.; McCarthy, B. G. *Eur. J. Pharmacol.* **1989**, *163*, 133–136.
- ¹³ Marek, G. J.; Aghajanian, G. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *278*, 1373–1382.
- ¹⁴ Bymaster, F. P.; Calligaro, D. O.; Falcone, J. F.; Marsh, R. D.; Moore, N. A.; Tye, N. C.; Seeman, P.; Wong, D. T. *Neuropsychopharmacol.* **1996**, *14*, 87–96.

- ¹⁵ Wolf, H. *Scand. J. Rheumatol.* **2000**, 29, 37–45.
- ¹⁶ Dumuis, A.; Sebben, M.; Bockaert, J. N.-S. *Arch. Pharmacol.* **1989**, 340, 403–410.
- ¹⁷ Sandler, M.; Revely, M. A.; Glover, V. *J. Clin. Pathol.* **1981**, 34, 292–302.
- ¹⁸ Tiller, J. W. G. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **1993**, 17, 703–712.
- ¹⁹ Rudnick, G. *J. Bioenerget. Biomembr.* **1998**, 30, 173–185.
- ²⁰ Westrheim Ravna, A.; Sylte, I.; Dahl, S. G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 307, 34–41.
- ²¹ Seidel, S.; Singer, E. A.; Just, H.; Farhan, H.; Scholze, P.; Kudlacek, O.; Holy, M.; Koppatz, K.; Krivanek, P.; Freissmuth, M.; Sitte, H. H. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 67, 140–151.
- ²² Kanner, B. I.; Zomot, E. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1654–1668.
- ²³ Jardetzky, O. *Nature* **1966**, 211, 969–970.
- ²⁴ Blakely, R. D.; Berson, H. E.; Fremeau, R. T.; Caron, M. G.; Peek, M. M.; Prince, H. K.; Bradley, C. C. *Nature* **1991**, 354, 66–70.
- ²⁵ Chen, J.-G.; Liu-Chen, S.; Rudnick, G. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 12675–12681.
- ²⁶ Yamashita, A.; Singh, S. K.; Kawate, T.; Jin, Y.; Gouaux, E. *Nature* **2005**, 437, 215–223.
- ²⁷ Celik, L.; Sinning, S.; Severinsen, K.; Hansen, C. G.; Møller, M. S.; Bols, M.; Wiborg, O.; Schiøtt, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3853–3865.
- ²⁸ Holinski-Feder, E. Mutationen beim Menschen und ihre Folgen In *Humangenetik*; Murken, J., Grimm, T., Holinski-Feder, E., Eds.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2006**.
- ²⁹ Beuming, T.; Shi, L.; Javitch, J. A.; Weinstein, H. *Mol. Pharmacol.* **2006**, 70, 1630–1642.
- ³⁰ Ravna, A. W.; Jaronczyk, M.; Sylte, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 5594–5597.

-
- ³¹ Forrest, L. R.; Zhang Y.-W.; Jacobs M. T.; Gesmonde, J.; Xie, L.; Honig, B. H.; Rudnick, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 10338–10343.
- ³² Forrest, L. R.; Tavoulari, S.; Zhang, Y.-W. ; Rudnick, G. ; Honig, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 12761–12766.
- ³³ Zomot, E.; Bendahan, A.; Quick, M.; Zhao, Y.; Javitch, J. A.; Kanner, B. I. *Nature* **2007**, *449*, 726–730.
- ³⁴ Kuhn, R. *Schw. Med. Wo.* **1957**, *87*, 1135–1139.
- ³⁵ Peretti, S.; Judge, R.; Hindmarch, I. *Acta Psychiatr. Scand.* **2000**, *101*, 17–25.
- ³⁶ Carlsson, A.; Corrodi, H.; Fuxe, K.; Hökfelt, T. *Eur. J. Pharmacol.* **1969**, *5*, 367–373.
- ³⁷ Wong, D. T.; Horng, J. S.; Bymaster, F. P.; Hause, K. L.; Molloy, B. B. *Life Sci.* **1974**, *15*, 471–479.
- ³⁸ Spinks, D.; Spinks, G. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 799–810.
- ³⁹ Edwards, J. G. *Br. Med. J.* **1992**, *304*, 1644–1646.
- ⁴⁰ Andersen, J.; Kristensen, A. S., Bang-Andersen, B.; Strømgaard, K. *Chem. Comm.* **2009**, *25*, 3677–3692.
- ⁴¹ Wong, D. T.; Bymaster, F. P.; Engleman, E. A. *Life Sci.* **1995**, *57*, 411–441.
- ⁴² Moltzen, E.; Bang-Andersen, B. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1801–1823.
- ⁴³ Blier, P.; de Montigny, C. *Trends Pharmacol. Sci.* **1994**, *15*, 220–226.
- ⁴⁴ Adell, A.; Castro, E.; Celada, A. B.; Pazos, A.; Antigas, F. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 578–585.
- ⁴⁵ Talvenheimo, J.; Nelson, P. J.; Rudnick, G. *J. Biol. Chem* **1979**, *254*, 4631–4635.
- ⁴⁶ Thomas, D. R.; Nelson, D. R.; Johnson, A. M. *Psychopharmacology* **1987**, *93*, 193–200.
- ⁴⁷ Apparsundaram, S.; Stockdale, D. J.; Henningsen, R. A.; Milla, M. E.; Martin, R. *S. J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *327*, 982–990.

- ⁴⁸ Sinning, S.; Musgaard, M.; Jensen, M.; Severinsen, K.; Celik, L.; Koldsø H.; Meyer, T.; Bols, M.; Helligsø Jensen, H.; Schiøtt, B.; Wiborg, O. *J. Biol. Chem* **2010**, *285*, 8363–8374.
- ⁴⁹ Sarker, S.; Weissensteiner, R.; Steiner, I.; Sitte, H. H.; Ecker, G. F.; Freismuth, M.; Sucus, S. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78*, 1026–1035.
- ⁵⁰ Andersen, J.; Taboureau, O.; Hansen, K. B.; Olsen, L.; Egebjerg, J.; Strømgaard, K.; Kristensen, A. S. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 10276–10284.
- ⁵¹ Andersen, J.; Olsen, L.; Hansen, K. B.; Taboureau, O.; Jørgensen, F. S.; Jørgensen, A. M.; Bang-Andersen, B.; Eggebjerg, J.; Strømgaard, K.; Kristensen, A. S. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 2051–2063.
- ⁵² Singh, S. K.; Yamashita, A.; Gouaux, E. *Nature* **2007**, *448*, 952–956.
- ⁵³ Zhou, Z.; Zhen, J.; Karpowich, N. K.; Goetz, R. M.; Law, C. J.; Reith, M. E. A.; Wang, D.-N. *Science* **2007**, *317*, 1390–1393.
- ⁵⁴ Zhou, Z.; Zhen, J.; Karpowich, N. K.; Law, C. J.; Reith, M. E. A.; Wang, D.-N. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 652–658.
- ⁵⁵ Plenge, P.; Møllerup, E. T. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *119*, 1–8.
- ⁵⁶ de Jong, L. A. A.; Uges, D. R. A.; Franke, J. P.; Bischoff, R. *J. Chromatogr. B.* **2005**, *829*, 1–25.
- ⁵⁷ Cooper, M. A. *J. Mol. Recognit.* **2004**, *17*, 286–315.
- ⁵⁸ Wu, G. *Assay Development: Fundamentals and Practices*; John Wiley & Sons, New Jersey, **2010**; pp. 125–154.
- ⁵⁹ Höfner, G.; Zepperitz, C.; Wanner, K. T. MS Binding Assays – An alternative to Radioligand Binding. In *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry*; Wanner, K. T., Höfner, G., Eds.; VCH, Weinheim, **2007**, pp. 247–248.
- ⁶⁰ Haylett, D. G. Direct measurement of drug binding to receptors In *Textbook of Receptor Pharmacology*; Foreman, J. C., Johansen, T., Eds.; CRC Press, Boca Raton, **2003**, pp. 153–180.
- ⁶¹ Major, J. S. *J. Recept. Signal Tr. R.* **1995**, *15*, 595–607.
- ⁶² Hart, H. E.; Greenwald, E. B. *Mol. Immunol.* **1979**, *16*, 265–267.

-
- ⁶³ Lazareno, S. *J. Recept. Signal Tr. R.* **2001**, *21*, 139–165.
- ⁶⁴ Ilien, B.; Franchet, C.; Bernard, P.; Morisset, S.; Weill, C. O.; Bourguignon, J.-J.; Hibert, M.; Galzi, J.-L. *J. Neurochem.* **2003**, *85*, 768–778.
- ⁶⁵ Allen, M.; Reeves, J.; Mellor, G. *J. Biomol. Screen.* **2000**, *5*, 63–69.
- ⁶⁶ Wilson, W. D. *Science* **2002**, *295*, 2103–2105.
- ⁶⁷ Jonker, N.; Kool, J.; Irth, H.; Niessen, W. M. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 2669–2681.
- ⁶⁸ Lee, M. S.; Kerns, E.H. *Mass Spectrom. Rev.* **1999**, *18*, 187–279.
- ⁶⁹ Lee, H. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2005**, *28*, 1161–1202.
- ⁷⁰ Niessen, W. M. A. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 413–436.
- ⁷¹ Zepperitz, C.; Höfner, G.; Wanner, K. T. *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 208–217.
- ⁷² Höfner, G.; Wanner, K. T. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 1356–1364.
- ⁷³ Tatsumi, M.; Groshan, K.; Blakely, R. D.; Richelson, E. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *340*, 249–258.
- ⁷⁴ Owens, M. J.; Morgan, W. N.; Plott, S. J.; Nemeroff, C. B. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1997**, *283*, 1305–1322.
- ⁷⁵ Micheli, F.; Cavanni, P.; Arban, R.; Benedetti, R.; Bertani, B.; Bettati, M.; Bettelini, L.; Bonanomi, G.; Braggio, S.; Checchia, A.; Davalli, S.; Di Fabio, R.; Fazzolari, E.; Fontana, S.; Marchioro, C.; Minick, D.; Negri, M.; Oliosio, B.; Read, K. D.; Sartori, I.; Tedesco, G.; Tarsi, L.; Terreni, S.; Visentini, F.; Zocchi, A.; Zonzini, L. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2534–2551.
- ⁷⁶ Koch, S.; Perry, K. W.; Nelson, D. L.; Conway, R. G.; Threkeld, M. S.; Bymaster, F. P. *Neuropsychopharmacol.* **2002**, *27*, 949–959.
- ⁷⁷ Habert, E.; Graham, D.; Tahraoui, L.; Claustre, Y.; Langer, S. Z. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *118*, 107–114.
- ⁷⁸ Rothman, R. B.; Silverthorn, M. L.; Glowla, J. R.; Matecka, D.; Rice, K. C.; Carroll, F. I.; Partilla, J. S.; Uhl, G. R.; Vandenberg, D. J.; Dersch, C. *Synapse* **1998**, *28*, 322–338.

- ⁷⁹ Zepperitz, C. *Dissertation*, LMU München, **2007**.
- ⁸⁰ U.S. FDA Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. United States Food and Drug Administration, Washington, **2001**,
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf> (aufgerufen am 10. August 2010).
- ⁸¹ Graham, F. L.; Smiley, J. *J. Gen. Virol.* **1977**, *36*, 59–72.
- ⁸² Thomas, P.; Smart, T. G. *J. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, 187–200.
- ⁸³ Kragler, A. *Dissertation*, LMU München, **2004**.
- ⁸⁴ Dingermann, T.; Winckler, T.; Zündorf, I. *Gentechnik Biotechnik*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, **2011**.
- ⁸⁵ TrueClone and TrueORF products, OriGene
<http://www.origene.com/assets/Documents/TrueORF/OrigeneBrochure308.pdf>
(aufgerufen am 19. Mai 2011).
- ⁸⁶ Invitrogen pcDNA™3.1(-), pcDNA™3.1(+) User Manual
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna3_1_man.pdf (aufgerufen am 19. Mai 2011).
- ⁸⁷ Roche Diagnostics Corporation: FuGENE 6® Instruction Manual; Version 5, September **2000**.
- ⁸⁸ Cheetham, S. C.; Viggers, J. A.; Slater, J. A.; Heal, D. J.; Buckett, W. R. *Neuropharmacol.* **1993**, *32*, 737–743.
- ⁸⁹ Cupello, A.; Albano, C.; Gatta, E.; Scarpone, S.; Villa, E.; Zona, G. *Neurochem. Res.* **2009**, *34*, 255–259.
- ⁹⁰ Bradford, M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- ⁹¹ Martin, R. S.; Henningsen, R. A.; Suen, A.; Apparsundaram, S.; Leung, B.; Jia, Z.; Kondru, R. K.; Milla, M. E. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *327*, 991–1000.
- ⁹² de Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*, 3rd edition; John Wiley & Sons, West Sussex, **2007**.

-
- ⁹³ AB Sciex *API 5000 LC/MS/MS System: The world's most sensitive LC/MS/MS system* http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/mass-spectrometry-cms_040627.pdf (aufgerufen am 31.07.2011).
- ⁹⁴ Niessen, W. M. A. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry In: *Chromatographic Science Series*; Cazes, J., Eds.; CRC Press Press, Boca Raton, **2006**; Vol. 97.
- ⁹⁵ Kebarle, P. J. *Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 804–817.
- ⁹⁶ Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. J. *Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240–2249.
- ⁹⁷ Irbarne, J. V.; Thomson, B. A. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287–2293.
- ⁹⁸ Thomson, B. A.; Irbarne, J. V. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4451–4463.
- ⁹⁹ Chen, F.; Larsen, M. B.; Sánchez, C.; Wiborg, O. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2005**, *15*, 193–198.
- ¹⁰⁰ Zhu, Z.; Neirinck, L. J. *Chromatogr. B* **2002**, *780*, 295–300.
- ¹⁰¹ Massaroti, P.; Cassiano, N. M.; Duarte, L. F.; Campos, D. R.; Marchioretto, M. A. M.; Bernasconi, G.; Calafatti, S.; Barros, F. A. P.; Meurer, E. C.; Pedrazzoli, J. J. *Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, *8*, 340–347.
- ¹⁰² Jhee, O. H.; Seo, H. K.; Lee, M. H.; Jeon, Y. C.; Shaw, L. M.; Lee, S. H.; Hur, Y.; Kim, K.-H.; Lee, S. E.; Kang, J. S. *Arzneimittel-Forsch.* **2007**, *57*, 455–461.
- ¹⁰³ Smyth, W. F.; Leslie, J. C.; McClean, S.; Hannigan, B.; McKenna, H. P.; Doherty, B.; Joyce, C.; O’Kane, E. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1637–1642.
- ¹⁰⁴ Applied Biosystems, *MDS Sciex Operator’s Manual API 3200 LC/MS/MS System*, **2005**.
- ¹⁰⁵ Unger, K. K.; Weber, E. Bestimmung der Totzeit. In: *Handbuch der HPLC Teil 1*; GIT Verlag, Darmstadt, **1995**; 2. Auflage.
- ¹⁰⁶ Taylor, P. J. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 328–334.
- ¹⁰⁷ Annesley, T. M. *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 1041–1044.

- ¹⁰⁸ King, R.; Bonifiglio, R.; Fernandez-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 942–950.
- ¹⁰⁹ Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3019–3030.
- ¹¹⁰ Trufelli, H.; Palma, P.; Famigliani, G.; Cappiello, A. *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *30*, 491–509.
- ¹¹¹ Li, C.; Ji, Z.; Nan, F.; Shoe, Q.; Liu, P.; Dai, J.; Zhen, J.; Yuan, H.; Xu, F.; Cui, J.; Huang, B.; Zhang, M.; Yu, C. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1844–1850.
- ¹¹² De Castro, M.; Concheiro, M.; Quintela, Q.; Cruz, A.; López-Rivadulla, M. *J. Pharm. Biomed.* **2008**, *48*, 183–193.
- ¹¹³ Queiroz, M. E.; Oliviera, E. B.; Breton, F.; Pawliszyn, J. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1174*, 72–77.
- ¹¹⁴ Lajeunesse, A.; Gagnon, C.; Sauv e, S. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5325–5333.
- ¹¹⁵ Souverain, S.; Mottaz, M.; Cherkaoui, S.; Veuthey, J. L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 880–885.
- ¹¹⁶ Snyder, L.R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. Ionic samples: reversed-phase, ion-pair, and ion-exchange chromatography. In *Introduction to modern liquid chromatography*, 3rd edition; John Wiley & Sons, New Jersey, **2010**.
- ¹¹⁷ Peng, L.; Farkas, T. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1179*, 131–144.
- ¹¹⁸ Wong, D. T.; Bymaster, F. P.; Reid, L. R.; Fuller, R. W.; Perry, K. W. *Drug Dev. Res.* **1985**, *6*, 397–403.
- ¹¹⁹ Turowski, M.; Yamakawa, N.; Meller, J.; Kimata, K.; Ikegami, T.; Hosoya, K.; Tanaka, N.; Thornton, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13836–13849.
- ¹²⁰ European Medicines Agency ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures, **1995**,
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf (aufgerufen am 31.07.2011).
- ¹²¹ Wong, D. T.; Bymaster, F. P. *Fed. Proc.* **1983**, *42*, 1164.

-
- ¹²² Jenkinson, D. H. Classical Approaches to the Study of Drug-Receptor Interactions. In *Textbook of Receptor Pharmacology*; Foreman, J. C.; Johansen, T., Eds.; CRC Press: Boca Raton, **2003**; pp. 3–78.
- ¹²³ Bennett, J. P. Jr.; Yamamura, H. I. Neurotransmitter, Hormone, or Drug Receptor Binding. In *Neurotransmitter Receptor Binding*; Yamamura, H. I.; Enna, S. J.; Kuhar, M. J., Eds.; Raven Press: New York, **1985**; pp 61–89.
- ¹²⁴ Bylund, D. B.; Deupree, J. D.; Toews, M. L. Radioligand-Binding Methods for Membrane Preparations and Intact Cells. In *Methods in Molecular Biology, vol. 259, Receptor Signal Transduction Protocols*; Willars, G. B.; Challiss, R. A. J., Eds.; Humana Press: Totowa, **2004**; 2nd ed., pp. 1–28.
- ¹²⁵ Avlani, V. A.; McLoughlin, D. J.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *325*, 927–934.
- ¹²⁶ Cheng, Y.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- ¹²⁷ Motulsky, H. *The Graph Pad Guide to Analyzing Radioligand Binding Data*, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, **1995-96**.
- ¹²⁸ Tsuruda, P. R.; Yung, J.; Martin, W. J.; Chang, R.; Mai, N.; Smith, J. A. M. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2010**, *61*, 192–204.
- ¹²⁹ Hulme, E. C.; Birdsall, N. J. M. Strategy and tactics in receptor-binding studies. In *Receptor-Ligand Interactions: A Practical Approach*; Hulme, E. C., Eds.; Oxford University Press: Oxford, **1992**, pp. 63–176.
- ¹³⁰ Chung, C. T.; Niemela S. L.; Miller, R. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2172–2175.
- ¹³¹ Gallagher S. R. Detection of Nucleic Acids using Absorption Spectroscopy. In *Short protocols in molecular biology*; Ausuble, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. F.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K., Eds.; *Short protocols in molecular biology*, 4th ed.; Wiley: New York, **1999**; pp A3-10–A3-12.