

E. Zusammenfassung

Trepte, S.: *In vitro* Untersuchungen zur Beeinflussung des β -adrenergen Rezeptors der Rattenleber durch Glycosaminoglycane und deren Einzelkomponenten

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkungen verschiedener Glycosaminoglycane und deren Einzelkomponenten auf den β -adrenergen Rezeptor der Rattenleber in einem *in vitro* Versuchssystem.

Als Untersuchungsmodell wurde der β -adrenerge Rezeptor in einer Membranfraktion aus Rattenlebern isoliert. Die Präparation der Membranfraktion und die Zusammensetzung des Standardinkubationsansatzes wurden hinsichtlich einer hohen spezifischen Rezeptor-Ligandenbindung optimiert. Der Ansatz wurde bei 25°C für eine Stunde inkubiert. Der Proteingehalt der Reaktionsansätze betrug 1 g/l.

Um Kreuzreaktionen oder Überlagerungen verschiedener Effekte zu minimieren wurden dem Standardinkubationsansatz wenig Komponenten zugesetzt und lediglich die Wirkung der Testsubstanzen auf die Bindungskapazität des Rezeptors für einen spezifischen Liganden getestet.

Den Standardinkubationsansätzen wurden die Glycosaminoglycane Chondroitinsulfat A, Chondroitinsulfat B, Chondroitinsulfat C, Hyaluronsäure und Keratansulfat in Konzentrationen von 1 bis 150 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt.

Die Glycosaminderivate *N*-Acetyl-Heparin und *N*-Acetyl-DE-O-sulfatiertes Heparin wurden ebenfalls in diesem Konzentrationsbereich eingesetzt. Als Einzelkomponenten wurden die Substanzen Glucosamin und Galactosamin sowie deren Sulfate, Glucuronsäure, *N*-Acetyl-Glucosamin, *N*-Acetyl-Galactosamin und dessen Sulfat im Bereich von 0,005 bis 100 μM getestet.

Die sulfatierten Derivate des *N*-Acetyl-Glucosamin wurden im Konzentrationsbereich von 0,005 bis 300 μ M überprüft. Die Ansätze mit diesen Substanzen wurden jeweils im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Glycosaminoglycane bzw. deren Komponenten untersucht.

Die Wirkung auf den β -adrenergen Rezeptor wurde anhand der spezifischen Bindung des radioaktiv markierten β -Antagonisten [3 H]-Dihydroalprenolol quantifiziert.

Die eingesetzten Substanzen zeigten abhängig von Art und Konzentration unterschiedliche Wirkungen auf den β -adrenergen Rezeptor. Die spezifische Bindungsfähigkeit für den Liganden wurde im Vergleich zu den Kontrollansätzen sowohl in positiver als auch in negativer Richtung modifiziert.

Die stärksten Effekte zeigten sich bei den sulfatierten Formen des Aminosuckers *N*-Acetyl-Glucosamin, die Bestandteil der Disacchariduntereinheit verschiedener Glycosaminoglycane sind. Unabhängig von der Position oder Anzahl der Sulfatreste wurde von allen drei untersuchten Stoffen die spezifische Bindung des Rezeptors in zwei Konzentrationsbereichen um 20 bzw. 25% vermindert.

Für die beschriebenen Effekte werden unterschiedliche Wirkungsmechanismen diskutiert.

Auch diese Arbeit zeigt, daß Substanzen der extrazellulären Matrix distinktive Wirkungen auf Bestandteile des Signalübertragungssystems der Zelle ausüben. Dieses Phänomen unterstützt die Annahme, daß die extrazelluläre Matrix eine Regulatorfunktion für die physiologischen und pathologischen Abläufe der Zellen besitzt und diese auch über die Beeinflussung der Signalübertragungskette vermittelt.

F. Summary

Trepte, S.: *In vitro* investigations of the effects of various glycosaminoglycans and their components on the β -adrenergic receptor of rat liver

The purpose of these studies was to investigate the effects of various glycosaminoglycans and their components on the β -adrenergic receptor of rat liver in an *in vitro* assay system.

For the assay system the receptor was prepared as a part of an isolated membrane fragment. Membran preparation and composition of the incubation set-up were optimised to yield high specific radioligand binding.

Incubation was performed at 25° C for one hour, containing 1 g/l of membrane protein.

To minimize cross reactions or overlapping of various effects, only a few components were given to the incubation set-up. Furthermore, only the effect of the examined substances on the binding capacity of the receptor for his specific ligand was tested.

The glycosaminoglycans chondroitin sulphate A, chondroitin sulphate B, chondroitin sulphate C, hyaluronic acid and keratan sulphate were added to the incubation set-up at concentrations between 1 and 150 μ g/ml.

In the same concentration range the glycosaminoglycane derivatives *N*-acetyl-heparin and de-*O*-sulphated *N*-acetyl-heparin were added.

As single components the substances glucosamine and galactosamine as well as their sulphated derivatives, glucuronic acid, *N*-acetyl-glucosamine, *N*-acetyl-galactosamine und its sulphate were tested in a range between 0,005 and 100 μ M.

The sulphated forms of *N*-acetyl-glucosamine were examined at concentrations from 0,005 to 300 μ M. All determinations were performed in parallel to untreated control set-ups.

The effect on the β -adrenergic receptor was detected by quantifying specific binding of the radiolabelled β -antagonist [3 H]-dihydroalprenolol.

The examined substances showed different effects on the receptor, depending on kind and concentration of the added molecules. Specific radioligand binding was modified both in negative and positive way compared to the control set-up.

The strongest effect was seen by testing the sulphated derivatives of the amino sugar *N*-acetyl-glucosamine, which is part of the disaccharid moiety of various glycosaminoglycans. Independent of position and amount of the sulphate groups all three tested substances inhibited specific radioligand binding at two different concentrations in a range of 20 and 25% respectively.

For the effects described different mechanisms are discussed.

This work shows again, that substances of the extracellular matrix do have distinct effects on elements of the signal transducing pathway. This phenomenon supports the notion, that extracellular matrix has a regulatory function for physiological and pathological actions of cells and is mediating this function also by influence on the signal transduction pathway.