

**Synthese und In-vitro-Pharmakologie neuer
Phenylcarbamate als Liganden für
nicotinische Acetylcholin-Rezeptoren
(nAChR)**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Matthias Andrä

aus Bonn

Bonn 2005

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

1. Referent: PD. Dr. D. Gündisch
2. Referent: Prof. Dr. C. E. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Oktober 2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2001 bis Juli 2005 in der Abteilung Pharmazeutische Chemie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn unter der Leitung von PD. Dr. Daniela Gündisch und Prof. Dr. Christa Müller angefertigt.

Ich danke herzlich Frau PD. Dr. D. Gündisch für die wissenschaftliche Leitung dieser Arbeit sowie für ihre hervorragende Betreuung.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Prof. Dr. C. E. Müller für die Übernahme der Zweitbetreuung und des Koreferates.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	REZEPTOR.....	1
1.2	LIGAND-GESTEUERTE IONENKANÄLE	2
1.3	NICOTINISCHE ACETYLCHOLINREZEPTOREN (NACHR).....	4
1.4	ACETYLCHOLIN-BINDUNGSSTELLE	8
1.5	VERTEILUNG VON NICOTINISCHEN ACETYLCHOLINREZEPTOREN IN UNTERSCHIEDLICHEN GEWEBEN	13
1.6	FUNKTION UND PATHOLOGIE VON NACHR	19
1.6.1	<i>Rezeptorkonformationen</i>	19
1.6.2	<i>Rezeptordichte</i>	20
1.6.3	<i>Pathologie</i>	21
1.7	NICOTINREZEPTOR-LIGANDEN	29
1.7.1	<i>Acetylcholin und Cholin</i>	29
1.7.2	<i>Acetylcholin und Cholin-Analoga</i>	30
1.7.3	<i>Nicotin</i>	32
1.7.4	<i>Nicotin-Analoga</i>	32
1.7.5	<i>Pyridylether-Analoga des Nicotins</i>	36
1.7.6	<i>Anabasin, Anabasein und abgeleitete Derivate</i>	37
1.7.7	<i>Lobelin</i>	38
1.8	NICOTINREZEPTOR-LIGANDEN MIT ÜBERBRÜCKTEN N-HETEROZYKLEN	39
1.8.1	<i>Epibatidin</i>	39
1.8.2	<i>Cytisin</i>	42
1.8.3	<i>Ferruginin</i>	43
1.8.4	<i>Anatoxin-a</i>	44
1.8.5	<i>Mecamylamin</i>	45
1.9	WEITERE NICOTINREZEPTOR-LIGANDEN.....	46
1.9.1	<i>Dihydro-β-erythroidin (DHβE)</i>	46
1.9.2	<i>Methyllycaconitin (MLA)</i>	47
1.10	PEPTID-LIGANDEN.....	48
1.10.1	<i>α-Bungarotoxin</i>	48
1.10.2	<i>α-Conotoxine</i>	49
1.11	PHARMAKOPHOR-MODELLE FÜR NICOTINREZEPTOREN	53
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	57
3	ERGEBNISSE	61

3.1	DARSTELLUNG NEUER CARBAMATE ALS SUBTYPSELEKTIVE LIGANDEN AN NACHR.....	61
3.1.1	<i>Bedeutung von Cholinethern</i>	61
3.1.2	<i>Herstellung von 2-Phenylcholinether (42) [Trimethyl-(2-phenoxy-ethyl)-ammoniumbromid]</i>	63
3.1.3	<i>Herstellung von N-Methyl-Diphenhydramin (47)</i>	65
3.1.4	<i>Herstellung von N-Methyl-Nefopam (48)</i>	65
3.2	CARBAMATE.....	67
3.2.1	<i>Bedeutung von Carbamaten</i>	67
3.2.2	<i>Allgemeine Synthese von Carbamaten</i>	71
3.2.3	<i>Überführung in Hydrochloridsalze</i>	75
3.2.4	<i>Herstellung von (2-Phenylcarbamoyloxy-ethyl)-trimethyl-ammonium-Derivaten</i>	76
3.2.5	<i>Ersatz der Trimethylammonium-Struktur und Aromatsubstitution</i>	77
3.2.6	<i>Herstellung von Phenyl-carbaminsäure-1-methyl-pyrrolidin-2-yl-methylestern</i>	79
3.2.7	<i>Herstellung von Phenyl-carbaminsäure-pyrrolidin-2-ylmethylestern</i>	79
3.2.8	<i>Herstellung von Phenyl-carbaminsäure-1-methyl-piperidin-2-ylmethylestern</i>	81
3.2.9	<i>Herstellung von Phenyl-carbaminsäure-1-methyl-piperidin-3-ylestern</i>	82
3.2.10	<i>Herstellung von Phenyl-carbaminsäure-1-chinuclidin-3-ylestern</i>	83
3.2.11	<i>Herstellung von N-Methyl-chinuclidin-3-ol</i>	84
3.3	BESONDERHEITEN DER ¹ H- UND ¹³ C-NMR-SPEKTREN DER HERGESTELLTEN PHENYLCARBAMATE.....	85
3.3.1	<i>Phenylring</i>	85
3.3.2	<i>Chinuclidin-Ringsystem</i>	89
3.4	ERGEBNISSE DER RADIOLIGAND-BINDUNGSSTUDIEN.....	93
3.4.1	<i>Theoretische Grundlagen der Radioligand-Bindungsstudien</i>	93
3.4.2	<i>Projekt</i>	97
3.4.3	<i>Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien</i>	98
3.4.4	<i>Diskussion</i>	110
3.5	TRANSFEKTION.....	119
3.5.1	<i>Allgemeine Grundlagen der Transfektion</i>	119
3.5.2	<i>Projekt</i>	120
3.5.3	<i>Das transfizierte Plasmid</i>	121
3.5.4	<i>Rezeptorexpression in untransfizierten PC12 und SH-SY5Y-Zellen</i>	123
3.5.5	<i>Ergebnisse der Transfektion von PC12-Zellen</i>	125
3.5.6	<i>Ergebnisse der „Differenzierung“ von PC12-Zellen durch NGF</i>	127
3.5.7	<i>Ergebnisse der Transfektion von SH-SY5Y-Zellen</i>	128
3.5.8	<i>Diskussion der Transfektionsversuche</i>	131
3.6	ERGEBNISSE DER PATCH-CLAMP-EXPERIMENTE.....	135

3.6.1	<i>Allgemeine Grundlagen</i>	135
3.6.2	<i>Patch-Clamp-Experimente an Nicotinrezeptoren</i>	140
3.6.3	<i>Projekt</i>	141
3.6.4	<i>Datenanalyse</i>	142
3.6.5	<i>Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente</i>	142
3.6.6	<i>Diskussion</i>	162
3.7	BESTIMMUNG DER $[Ca^{2+}]_i$ IN MÄUSEMAKROPHAGEN	171
3.7.1	<i>Allgemeine und physikalische Grundlagen der Fluorimetrie</i>	171
3.7.2	<i>Fluoreszenzindikator Fura-2</i>	172
3.7.3	<i>Datengewinnung und Funktionsweise des invertierten Mikroskops</i>	176
3.7.4	<i>Projekt</i>	177
3.7.5	<i>Ergebnisse</i>	178
3.7.6	<i>Diskussion</i>	186
4	TESTUNG AN WEITEREN ZIELSTRUKTUREN	191
4.1	RADIOLIGAND-BINDUNGSSTUDIEN AN SEROTONINREZEPTOREN (5-HT_{3A})	191
4.1.1	<i>Grundlagen</i>	191
4.1.2	<i>Projekt</i>	192
4.1.3	<i>Methode</i>	192
4.1.4	<i>Ergebnisse</i>	193
4.2	INHIBITION DER ACETYLCHOLINESTERASE	203
4.2.1	<i>Grundlagen</i>	203
4.2.2	<i>Projekt</i>	205
4.2.3	<i>Methode</i>	206
4.2.4	<i>Ergebnisse</i>	208
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	217
5.1	ZUSAMMENFASSUNG	217
5.1.1	<i>Synthese</i>	217
5.1.2	<i>Radioligand-Bindungsstudien</i>	218
5.1.3	<i>Transfektion</i>	221
5.1.4	<i>Patch-Clamp-Experimente</i>	221
5.1.5	<i>Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration</i>	223
5.1.6	<i>Radioligand-Bindungsstudien am 5-HT_{3A}-Rezeptor</i>	225
5.1.7	<i>Inhibition der Acetylcholinesterase:</i>	227
5.2	AUSBLICK	228
6	EXPERIMENTELLER TEIL	229

6.1	ALLGEMEINE VORBEMERKUNGEN ZUR SYNTHESE	229
6.2	SYNTHESEN	231
6.2.1	<i>Trimethyl-(2-phenoxy-ethyl)-ammoniumbromid (42)</i>	231
6.2.2	<i>Phenylcarbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (53)</i>	232
6.2.3	<i>(3-Fluor-phenyl)carbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (54)</i>	233
6.2.4	<i>(3-Trifluormethyl-phenyl)carbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (55)</i>	234
6.2.5	<i>(2-Phenylcarbamoyloxy-ethyl)-trimethyl-ammoniumiodid (56)</i>	235
6.2.6	<i>[2-(3-Fluor-phenylcarbamoyloxy)-ethyl]-trimethyl-ammoniumiodid (57)</i>	236
6.2.7	<i>[2-(3-Trifluormethyl-phenylcarbamoyloxy)-ethyl]-trimethyl-ammoniumiodid (58)</i>	237
6.2.8	<i>Phenyl-carbamidsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (59)</i>	238
6.2.9	<i>(3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (60)</i>	239
6.2.10	<i>(3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (61)</i>	240
6.2.11	<i>Phenyl-carbamidsäure-(R)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (62)</i>	242
6.2.12	<i>(3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(R)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (63)</i>	243
6.2.13	<i>(3-Trifluoromethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (64)</i>	245
6.2.14	<i>Phenyl-carbamidsäure-(S)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (65)</i>	246
6.2.15	<i>(3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (66)</i>	247
6.2.16	<i>(3-Trifluoromethyl-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (67)</i>	249
6.2.17	<i>Phenyl-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (68)</i>	250
6.2.18	<i>(3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (69)</i>	251
6.2.19	<i>(3-Trifluoromethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester</i> <i>(70)</i>	253
6.2.20	<i>Phenyl-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylester (71)</i>	254
6.2.21	<i>(3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylester (72)</i>	256
6.2.22	<i>(3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylester (73)</i> ...	257
6.2.23	<i>Phenyl-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (74)</i>	258
6.2.24	<i>(3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (75)</i>	259
6.2.25	<i>(3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (76)</i>	260
6.2.26	<i>3-Hydroxy-1-methyl-1-aza-bicyclo[2.2.2]octan-iodid (77)</i>	262
6.2.27	<i>(2-Benzhydroxy-ethyl)-trimethyl-ammoniumiodid (N-Methyl-Diphenhydramin) (47)</i>	263
6.2.28	<i>(RS)-3,4,5,6-Tetrahydro-5,5-dimethyl-1-phenyl-1H-2,5-benzoxazocin-5-iumiodid (N-</i> <i>Methyl-nefopam) (48)</i>	264
6.3	RADIOLIGAND-BINDUNGSSTUDIEN.....	266
6.3.1	<i>Geräte und Materialien</i>	266

6.3.2	<i>Allgemeine Vorbemerkungen zu den Radioligand-Bindungsstudien an nicotinischen Acetylcholinrezeptoren</i>	268
6.3.3	<i>Durchführung der Membranpräparationen</i>	269
6.3.4	<i>Präparation einer Membranfraktion vom elektrischen Organ des Rochens <i>Torpedo californica</i></i>	270
6.3.5	<i>Durchführung der Konkurrenzexperimente</i>	270
6.4	ZELLBIOLOGISCHE ARBEITEN & TRANSFEKTIONSVERSUCHE	273
6.4.1	<i>Geräte und Materialien</i>	273
6.4.2	<i>Allgemeine zellbiologische Arbeitsmethoden</i>	278
6.4.3	<i>Zellen für Patch-Clamp Experimente:</i>	280
6.4.4	<i>Transfektion</i>	281
6.4.5	<i>Proteinuntersuchung mittels Immunoblotting</i>	283
6.5	PATCH-CLAMP EXPERIMENTE	287
6.5.1	<i>Geräte und Materialien</i>	287
6.5.2	<i>Allgemeine Vorbemerkungen zu Patch-Clamp Experimenten</i>	289
6.6	BESTIMMUNG DER $[Ca^{2+}]_i$ IN MAKROPHAGEN	291
6.6.1	<i>Geräte und Material</i>	291
6.6.2	<i>Vorarbeiten</i>	292
6.6.3	<i>Isolation der Mäusemakrophagen</i>	293
6.6.4	<i>Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ in Makrophagen</i>	294
6.6.5	<i>Kamerasystem</i>	294
6.6.6	<i>Versuchsauswertung</i>	295
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	297
8	LITERATURVERZEICHNIS	303

1 Einleitung

1.1 Rezeptor

Ein „Rezeptor“ (*receptor*) ist definiert als ein intrazelluläres oder membranständiges Protein, das nach Bindung eines Liganden einen bestimmten Effekt hervorruft. Die Interaktion zwischen Rezeptor und dem Effekt-auslösenden Stoff (*receptive substance*) geschieht dabei an einer für diese Substanz spezifischen Bindungsstelle (*orthosterische Bindungsstelle*)¹.

Die Begriffe „receptor“ und „receptive substance“ gehen auf John Langley (Cambridge University) zurück², der im Jahr 1905 erstmals anhand einer Serie von Experimenten mit (S)-(-)-Nicotin (Nicotin) **1** an Skelettmuskeln von Fröschen und Hühnern eine Rezeptortheorie aufstellte³. Erst später fanden Dale et al. heraus, dass Acetylcholin (ACh) **2** der physiologische Überträgerstoff an dem von Langley entdeckten Rezeptor der neuromuskulären Endplatte ist⁴.

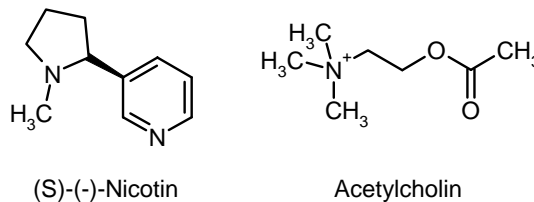


Abbildung 1: Strukturen von (S)-(-)-Nicotin **1** und Acetylcholin **2**

Generell unterscheidet man Rezeptoren anhand ihrer Lokalisation in *intrazelluläre* und *membranständige* Rezeptoren. Zu der intrazellulären Gruppe gehören die Steroidhormon-, Schilddrüsenhormon- und Retinoid-Rezeptoren¹.

Die membranständigen Rezeptoren lassen sich in drei weitere Untergruppen aufteilen. Die erste Untergruppe wird durch die „einfach-membranständigen Rezeptoren“, zu denen der Insulinrezeptor, die Lipoproteinrezeptoren und die Rezeptoren für Zytokine gehören, gebildet. Adenosin-, GABA_B-, metabotrope Glutamat-, Histamin-, Opiat-, einige Serotonin-, Muskarin- sowie adrenerge Rezeptoren sind der zweiten Untergruppe zuzuordnen, den so genannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

Die dritte Fraktion der membranständigen Rezeptoren, die auch als *Ligand-gesteuerte Ionenkanäle* bezeichnet wird, besteht aus den ATP-gesteuerten Ionenkanälen (ATP2x-

Rezeptoren), den Glutamat-aktivierbaren Kationenkanäle (NMDA-Rezeptoren, AMPA-Rezeptoren, Kainat-Rezeptoren etc.) und den Rezeptoren der „Cys-loop“-Superfamilie (GABA_A-, ionotrope Glutamat-, Glycin-, Serotonin-5-HT_{3A}- und nicotinsche Acetylcholin-Rezeptoren)^{1,5}.

1.2 Ligand-gesteuerte Ionenkanäle

Das Rezeptorprotein aller Ligand-gesteuerter Ionenkanäle besteht in der Regel aus mehreren Untereinheiten, die sich so in der Zellmembran anordnen, dass sie einen Kanal ausbildet (siehe Abbildung 2). Dieser im Grundzustand geschlossene Ionenkanal kann durch Konformationsänderung des Rezeptorproteins durch Interaktion mit einem Liganden geöffnet werden. Dieses Ligand-gesteuerte Öffnen oder Schließen des Kanalproteins unterscheidet sie von den so genannten *spannungsabhängigen Ionenkanälen* (voltage dependent ion channels), die durch Depolarisation der Zellmembran (Hyperpolarisation) geöffnet werden.

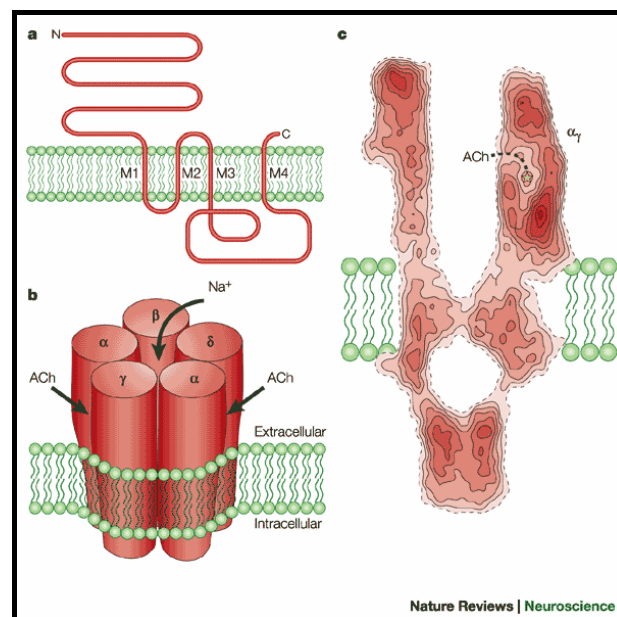


Abbildung 2: der nicotinsche Acetylcholinrezeptor (muskulärer Subtyp)⁶

- a:** funktionelle Domäne des Rezeptors in der Zellmembran: N-terminaler hydrophiler Abschnitt, transmembranäre Domänen (M1 –M4) und kurzes hydrophiles C-terminales Ende.
- b:** schematische Darstellung der Untereinheiten, die den nAChR vom Muskeltyp bilden, der Lokalisation der beiden Bindungsstellen für Acetylcholin (ACh) (zwischen den Untereinheiten α und γ bzw. α and δ) sowie des zentralen Ionenkanals.
- c:** Querschnitt eines nAChR (4,6 Å) aus Elektrozyten des elektrischen Organs von *Torpedo californica*, aufgenommen mittels eines Elektronenmikroskops

Aufgrund der unterschiedlichen Geometrie und Ladungsverteilung im Protein der verschiedenen Ligand-gesteuerten Ionenkanäle können nur bestimmte Ionen den Rezeptorkanal nach dessen Öffnung passieren. Anhand der Permeabilität für bestimmte Ionen lassen sich die Ligand-gesteuerten Ionenkanäle auch in Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chlorid-Kanäle einteilen¹.

Die treibende Kraft für den Ionenstrom durch das Kanalprotein ist der Konzentrationsgradient zwischen Extra- und Intrazellularraum. Das Ausmaß des Ionenflusses hängt dabei von der Zahl der geöffneten Kanäle, der Öffnungsdauer sowie der Permeabilität der Ionen, der so genannten Leitfähigkeit, ab¹.

Des Weiteren lassen sich die Ionenkanäle auch anhand bestimmter Strukturelemente in „Familien“ einteilen. So sind zum Beispiel für einige Rezeptoren (nicotinische Acetylcholin-, GABA_A-, GABA_C-, Glycin- und Serotoninrezeptoren vom Subtyp 5-HT_{3A})⁷ zwei über eine Disulfidbrücke verknüpfte Cystein-Aminosäuren im extrazellulären N-terminalen Ende jeder Untereinheit charakteristisch⁸. Die dadurch gebildete Schleife aus 15 Aminosäuren wird als „Cys-loop“ bezeichnet und ist namensgebend für diese Superfamilie⁹. Die Untereinheiten der verschiedenen Rezeptortypen dieser Superfamilie zeigen eine hohe Sequenzhomologie (30-70%), wobei die Aminosäuresequenzen der jeweiligen α -Untereinheiten die größte Übereinstimmung aufweisen (siehe Abbildung 2)^{10,11}.

Ein weiteres Merkmal aller Rezeptoren der „Cys-loop“-Superfamilie (z.B. nAChR) ist der Aufbau jeder Untereinheit aus vier Abschnitten: den N- bzw. C-terminalen extrazellulären Enden sowie dem transmembranären und dem zytoplasmatischen Abschnitt¹². Im N-terminalen hydrophilen extrazellulären Abschnitt, der bei nAChR aus 210 Aminosäuren besteht, ist die eine Cystein-Disulfidbrücke und die Bindungsstelle für den natürlichen Neurotransmitter Acetylcholin **2** lokalisiert (Abbildung 2)¹³. Die transmembranäre Domäne ist bei allen Mitgliedern der Superfamilie aus vier Segmenten (M1 bis M4)¹⁴ zusammengesetzt, wobei die Wand des Ionenkanals durch die hydrophilen Seiten der M2-Segmente der jeweiligen Untereinheit gebildet wird (Abbildung 2). Somit bestimmt dieses Segment auch die Ionenselektivität des Kanals^{7,15,16,17,18}. Zwischen den Transmembran-Segmenten M3 und M4 ist eine große hydrophile, zytoplasmatische Schleife ausgebildet, die über zahlreiche Phosphorylierungsstellen verfügt. Diese spielen bei der Regulierung des jeweiligen

Ionenkanals eine entscheidende Rolle¹⁹. An die transmembranäre Domäne M4 schließt sich ein kurzes extrazelluläres, C-terminales Ende an^{7,15-18}.

Als Prototyp der „Cys-loop“-Rezeptoren gelten die nicotinischen Acetylcholinrezeptoren.

1.3 Nicotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

Die nicotinischen Acetylcholinrezeptoren sind typische Kationenkanäle⁷, deren physiologischer Agonist Acetylcholin **2** ist. Dieser Ligand ist namensgebend für die Gruppe der Acetylcholinrezeptoren, zu denen neben den nAChR auch muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) gehören. Letztere sind jedoch im Gegensatz zu Nicotinrezeptoren den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen.

Die verschiedenen Acetylcholinrezeptoren lassen sich anhand zweier natürlich vorkommender Alkaloide, die jeweils selektive Agonisten an diesen darstellen, unterscheiden. Die mAChRs wurden nach dem Hauptalkaloid des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*) Muscarin **3** benannt, während für nAChR das Hauptalkaloid der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*), Nicotin **1**, namensgebend war^{4,20}.



Abbildung 3: Fliegenpilz (*Amanita muscaria*²¹) und Tabak (*Nicotiana tabacum*)

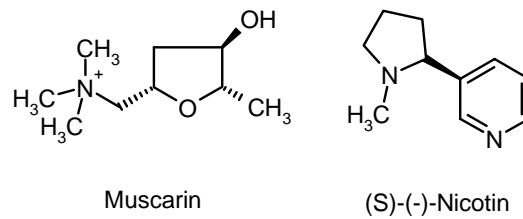


Abbildung 4: Strukturen der Alkaloide Muscarin 3 und Nicotin 1

Die nAChR stellen allosterisch (Konformationsänderung des Rezeptors nach Interaktion mit einem Liganden an einer nicht-orthosterischen Bindungsstelle) modulierbare Proteine dar, die durch die Anordnung ihrer fünf Untereinheiten eine Kanalpore in der Zellmembran ausbilden²². Dieser Kanal verläuft senkrecht zur Ebene der Phospholipiddoppelschicht, wobei sich der Porendurchmesser ober- und unterhalb der Zellmembran vergrößert¹² (Abbildung 5 & Abbildung 6). Die Rezeptoren sind etwa 100 bis 140 Å lang, wobei der Rezeptor mit ca. 60 Å in den Extrazellulärraum und nur mit ungefähr 15 Å ins Zytoplasma ragt¹². Die Breite der nAChR liegt etwa bei 80 Å (Abbildung 5). Das Molekulargewicht der Nicotinrezeptoren beträgt je nach Rezeptorsubtyp und Expressionssystem ca. 300 kDa, wobei sich für die einzelnen Untereinheiten Massenangaben von etwa 50 kDa in der Literatur finden^{12,23,24}.

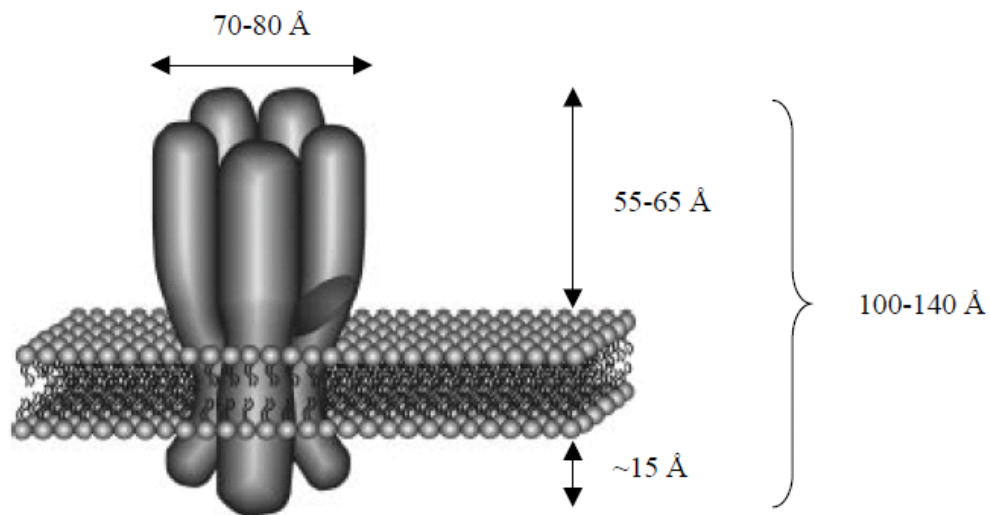


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Größenverhältnisse des nicotinischen Acetylcholinrezeptors¹²

Im Laufe der Evolution haben sich eine Vielzahl von Subtypen des nicotinischen Acetylcholinrezeptors entwickelt²⁵. Allen gemeinsam ist, dass sie wie oben beschrieben aus fünf verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind. Bis heute hat man 17 verschiedene Untereinheiten der nAChRs entdeckt (α 1 bis α 10, β 1 bis β 4, γ , ϵ , δ),

wobei die α -Untereinheiten („Ligand-bindende“-Untereinheit) durch eine Disulfidbrücke zwischen den benachbarten Cysteinresten Cys-192-Cys-193 im N-terminalen Ende charakterisiert werden (gilt für die α 1-Untereinheit)^{26,27}. Alle anderen Untereinheiten unterscheiden sich hauptsächlich anhand ihrer Aminosäure-Sequenzen voneinander^{10,14,28}.

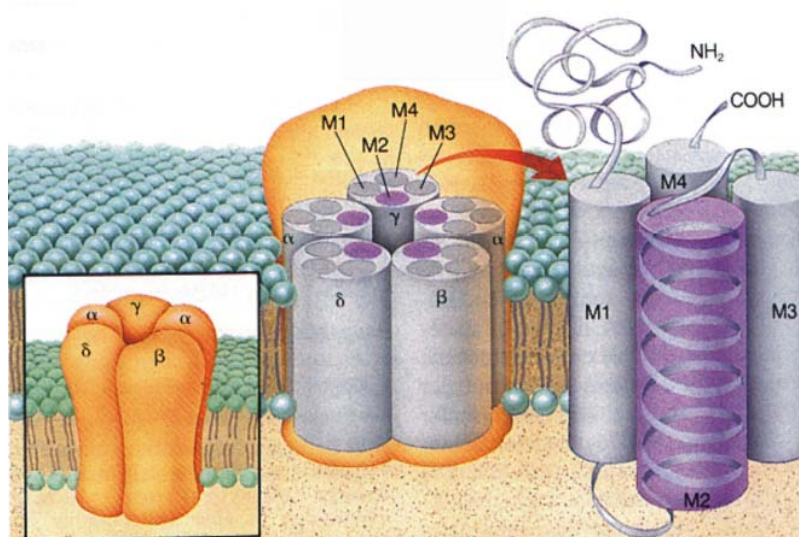


Abbildung 6: Schematische Darstellung des muskulären Acetylcholinrezeptors²⁹

Durch Kombination der 17 bekannten Untereinheiten wäre theoretische eine riesige Anzahl verschiedener Nicotinrezeptoren denkbar, jedoch führen nicht alle Kombinationen von Untereinheiten zu funktionsfähigen Rezeptoren³⁰. Anhand der Zusammensetzung aus verschiedenen Untereinheiten werden die nAChR in drei Klassen unterteilt²⁸:

Die erste Klasse bilden die muskulären nAChR (Abbildung 6 & Abbildung 7), die lediglich in der Peripherie vorkommen. Sie setzen sich aus den folgenden Untereinheiten zusammen: $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ im fetalen und $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ im adulten Muskelgewebe³¹.

Die so genannten heteropentameren neuronalen Nicotinrezeptoren bilden die zweite Klasse. Sie setzen sich aus zwei α - und drei β -Untereinheiten zusammen³². Hauptsächlich werden dabei die Untereinheiten $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ - mit $\beta 2$ - oder $\beta 4$ -Untereinheiten kombiniert³³, seltener werden die Untereinheiten $\alpha 5$ - und $\beta 3$ („orphan subunits“) in die Kombination einbezogen. Letztere sind selbst nicht in der Lage funktionale Rezeptoren zu bilden (Abbildung 7)³⁴. Die $\alpha 6$ -Untereinheit tritt nur in Verbindung mit mindestens zwei β -Einheiten (z.B. $\beta 4$ und $\beta 3$) auf³⁵. Die bedeutendsten

Vertreter der heteropentameren nAChR sind der $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ -Rezeptor (kurz $\alpha 4\beta 2$), und der so genannte ganglionäre Subtyp $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ (kurz $\alpha 3\beta 4$).

Nicotinrezeptoren, die aus fünf identischen Untereinheiten aufgebaut sind, homopentamere nAChR, werden ausschließlich aus den α -Untereinheiten $\alpha 7$ -, $\alpha 8$ - oder $\alpha 9$ gebildet. Sie stellen die dritte Klasse von Nicotinrezeptoren dar (Abbildung 7)^{36,37}. Ein Sonderfall ist die Untereinheit $\alpha 10$, die selbst nicht in der Lage ist, funktionsfähige homopentamere Rezeptoren zu formen, sondern nur in Kombination mit der Untereinheit $\alpha 9$ auftritt^{26,38}.

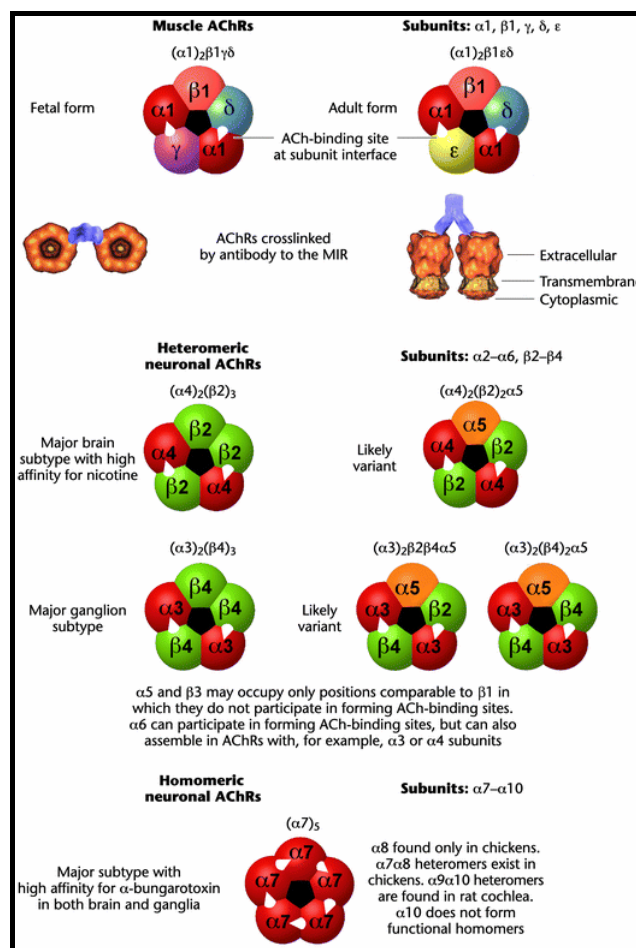


Abbildung 7: die Subtypen des Acetylcholinrezeptors³⁹

Sequenzhomologie-Untersuchungen und der generelle Aufbau der letztgenannten Rezeptorklasse ($\alpha 7$, $\alpha 8$ und $\alpha 9$) lassen vermuten, dass es sich bei diesen um die ursprüngliche Form der nAChR handelt. Durch Genduplikation und anschließende Divergenz sind vermutlich die anderen Subtypen entstanden⁴⁰.

Die Einteilung der nAChR in drei Klassen kann ebenfalls anhand ihres Verhaltens

gegenüber dem Antagonisten α -Bungarotoxin **4** (α -Bgt), einem Neurotoxin aus dem Gift des Vielbindenbungar (*Bungarus multicinctus*) (siehe 1.10 Peptid-Liganden), erfolgen^{28,41}. So besitzt dieser Bestandteil des Schlangengiftes eine hohe Affinität zu heteropentameren Rezeptoren vom Muskeltyp $[(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\varepsilon\delta]$ ⁴² und zu homomeren Rezeptoren, die sich aus den Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 8$ oder $\alpha 9$ zusammensetzen^{41,43,44}. Mit heteropentameren Rezeptoren vom neuronalen Typ, die aus den Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 2$, $\beta 3$ oder $\beta 4$ zusammengesetzt sind, interagiert α -Bungarotoxin nicht^{28,41}.

1.4 Acetylcholin-Bindungsstelle

Reiter et al. fanden durch Untersuchung des muskulären Nicotinrezeptors heraus, dass die α -Untereinheiten eine wichtige Rolle bei der Bindung des physiologischen Agonisten Acetylcholin **2** spielt⁴⁵. Da der Nicotinrezeptor über zwei α -Untereinheiten verfügt $[(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta]$, weist er folglich auch zwei Bindungsstellen für Acetylcholin **2** auf³¹. Darüber hinaus konnten Kao et al. zeigen, dass die zwei benachbarten Aminosäuren α -Cystein-192 und α -Cystein-193, die eine ungewöhnliche Disulfidbrücke ausbilden, an der Bindung des physiologischen Neurotransmitters beteiligt sind⁴⁶. Dies gilt ebenfalls für die aromatischen Aminosäuren α -Tyrosin-93, α -Tryptophan-149, α -Tyrosin-190 und α -Tyrosin-198^{47,48}. Sowohl die aromatischen Aminosäuren, als auch die benachbarten Cysteine sind in allen α -Untereinheiten konserviert, was nahe legt, dass diese Aminosäuren an der Bindung von Acetylcholin **2** beteiligt sind⁶. Vermutlich wird der physiologische Agonist über eine Kation- π -Wechselwirkung mit den erwähnten aromatischen Aminosäuren (α -Tyrosin-93, α -Tryptophan-149, α -Tyrosin-190 und α -Tyrosin-198) gebunden^{6,49}.

Weitere Arbeiten konnten nachweisen, dass sich die Bindungsstelle für Acetylcholin **2** zwischen einer α - und einer nicht- α -Untereinheit befindet und das letztere ebenfalls an der Bindung beteiligt ist^{50,51,52,53}. Die Bindungstasche für Acetylcholin **2** wird im Fall des Muskelsubtyps der nAChR dabei aus drei Schleifen (loop A-C) der α -Untereinheit und vier weiteren Schleifen der nicht- α -Einheit (loop D-G) gebildet¹². Der wesentliche Teil der Bindungstasche, der als „principal component“ bezeichnet wird, ist jedoch in

der α -Untereinheit lokalisiert. Der angrenzende nicht- α -Abschnitt wird als komplementärer Teil (complementary component) genannt¹².

Die beiden Bindungsstellen des muskulären Rezeptors für ACh **2** sind nicht gleichwertig. Eine hochaffine Bindungsstelle ist an der Schnittstelle der Einheiten α und δ lokalisiert, während sich eine schwach affine Bindungsstelle zwischen den Untereinheiten α und γ befindet⁵⁴. Eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, die zum „Öffnen“ des Ionenkanals führt, wird nur bei Besetzung beider Bindungsstellen des physiologischen Agonisten ausgelöst.

Analog sind die Bindungsstellen bei den neuronalen Rezeptoren aufgebaut, wobei die heteropentameren nAChR folglich zwei und die homopentameren Nicotinrezeptoren fünf Bindungsstellen besitzen^{7,33}. Von diesen fünf Bindungsstellen der homopentameren Rezeptoren müssen jedoch nur zwei zum Öffnen des Ionenkanals besetzt sein.

Die pharmakologischen Eigenschaften eines nAChRs werden nicht von der Anzahl der Bindungsstellen für Acetylcholin **2** bestimmt, sondern sind einzig von der Zusammensetzung der Untereinheiten abhängig⁵⁵.

Neben Bindungsstellen von Acetylcholin **2** finden sich an Nicotinrezeptoren noch einige weitere Interaktionsorte für diverse Liganden (Abbildung 9 & Abbildung 11). So existiert an der α -Untereinheit eine Bindungsstelle für Substanzen, die den Ionenstrom durch nAChR modulieren. Diese Substanzen wie die Cholinesterase-Inhibitoren Physostigmin **5**, Galantamin **6**⁵⁶ sowie das Antihelmintikum Ivermectin **7**⁵⁷; (Abbildung 8) werden als „*allosteric potentiating ligands*“ (APL) bezeichnet^{58,59,60}. Es handelt sich um Kanalaktivatoren oder positive allosterische Modulatoren, deren Bindungsstelle im Vergleich zu der von Nicotin **1** über einen anderen Wirkmechanismus verfügt (Abbildung 9). Die Bindung dieser Substanzen führt zwar ebenfalls zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins, die aber nicht in einem Öffnen des Kanals resultiert. Sie wirkt sich lediglich modulierend auf die Rezeptorfunktion aus³³.

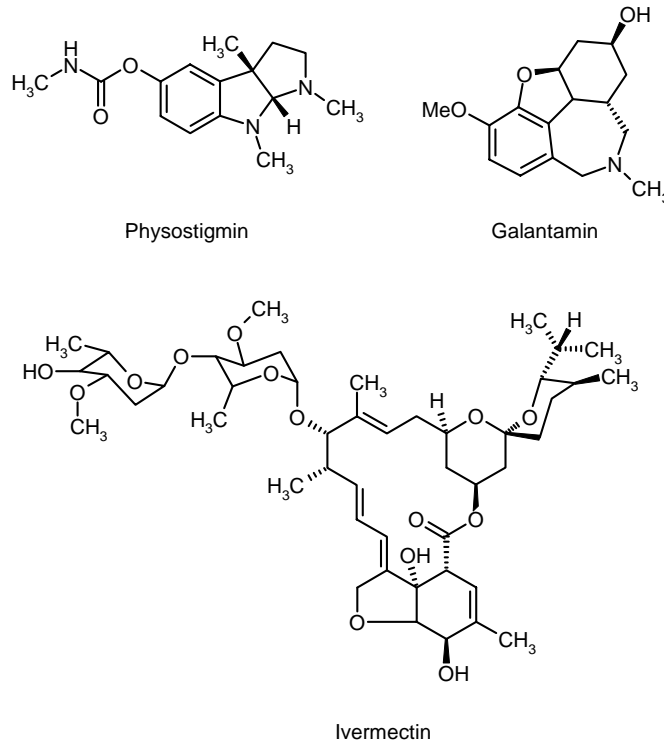


Abbildung 8: Strukturen des Arzneistoffe Physostigmin 5, Galantamin 6 und Ivermectin 7

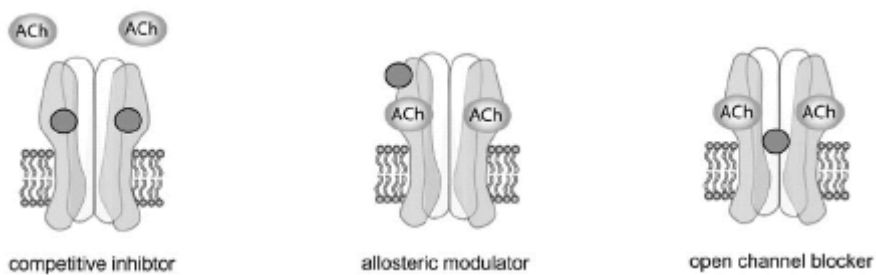


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Bindungsstellen kompetitiver Inhibitoren, allosterischer Modulatoren und „open channel“ Blocker⁶¹

Neben den bereits erwähnten Agonisten und APLs ist auch eine ganze Reihe von Stoffen bekannt, die den Ionenstrom durch den Rezeptorkanal hemmen (siehe 1.7 Nicotinrezeptor-Liganden). So werden zum Beispiel Substanzen, die durch die Konkurrenz mit ACh 2 um die orthosterische Bindungsstelle den Rezeptor blockieren, als *kompetitive Antagonisten* bezeichnet. Eine Hemmung der nAChR ist jedoch auch auf nicht-kompetitive Art möglich. Verbindungen mit dieser Wirkungsweise werden als *nicht-kompetitive Blocker* (NCB) oder negative allosterische Modulatoren bezeichnet (z.B. Mecamylamin 8, Histronicotoxin 9 Chlorpromazin 10, Lokalanästhetika, Fettsäuren, Barbiturate, n-Alkohole; Abbildung 10)³³. Sie beeinflussen die

Rezeptorfunktion über die Interaktion an verschiedenen Bindungsstellen, die sich von denen der APLs und kompetitiv wirksamer Stoffe unterscheidet.

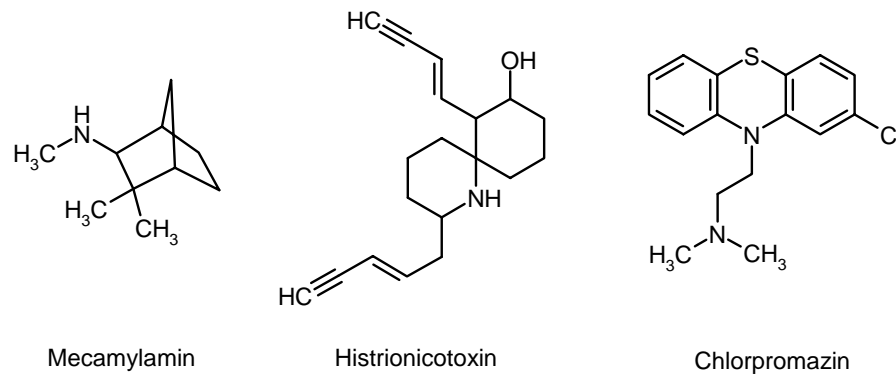


Abbildung 10: Strukturen von Mecamylamin **8**, Histronicotoxin **9** und Chlorpromazin **10**

Der erste Interaktionspunkt für NCBs befindet sich am M2-transmembranären Segment (Abbildung 11, siehe auch Abbildung 2) in der Ionenpore, an den die Liganden mit etwa mikromolarer Affinität binden. Die Wechselwirkung der NCBs wird dabei durch die Anwesenheit des Agonisten verstärkt^{62,63,64}. Liganden, die mit dieser Stelle interagieren, rufen entweder eine schnelle reversible Blockade des Rezeptors hervor oder verkürzen dessen Kanalöffnungszeit⁶⁵.

An der zweiten, wesentlich niedrig affineren Bindungsstelle, beschleunigen nicht-kompetitive Hemmstoffe die Desensibilisierung der nAChR und verschieben somit das Gleichgewicht zum desensibilisierten Zustand des Rezeptors (siehe 1.6 Funktion und Pathologie von nAChR). Die Lokalisation dieser zweiten Bindungsstelle ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch ist aufgrund der lipophilen Liganden zu vermuten, dass diese im Interface zwischen dem Nicotinrezeptor und den Lipiden der Zellmembran liegt^{33,66}.

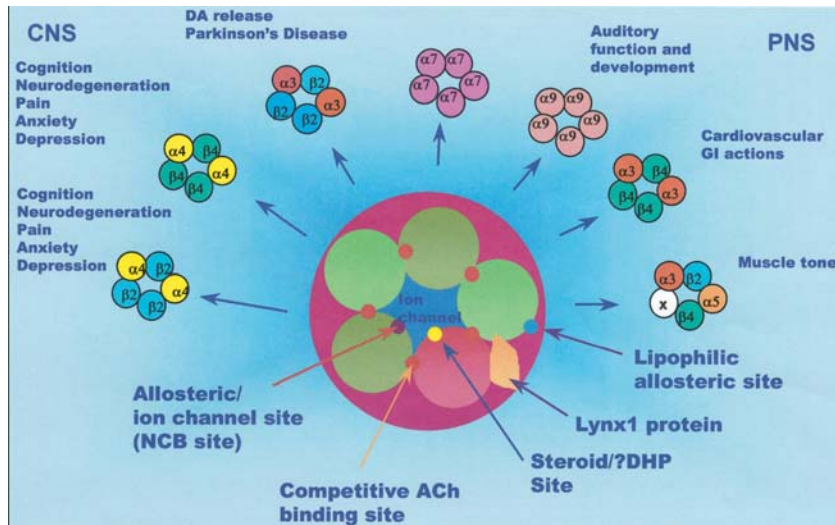


Abbildung 11: Schema des pentamerischen nAChR und ihre möglichen Funktionen³³.

Buisson et al. berichteten, dass auch Steroide neuronale Nicotinrezeptoren modulieren können. Sie interagieren dabei mit einer allosterischen Bindungsstelle, die sich von den Interaktionspunkten der APLs und NCBs unterscheidet. So führen beispielsweise die Steroide Progesteron **11** und Testosteron **12** (Abbildung 12) zu einer spannungsunabhängigen Inhibition von $\alpha 4\beta 2$ -, $\alpha 3\beta 4$ - und $\alpha 7$ -Rezeptoren^{58,67,68}.

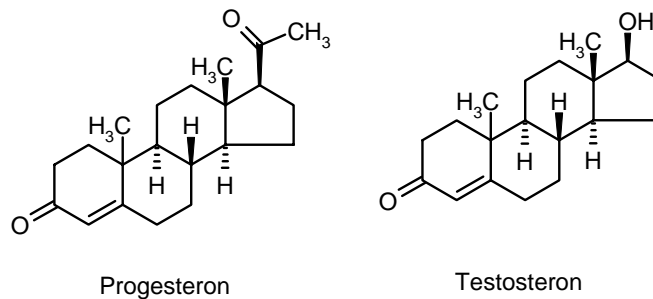
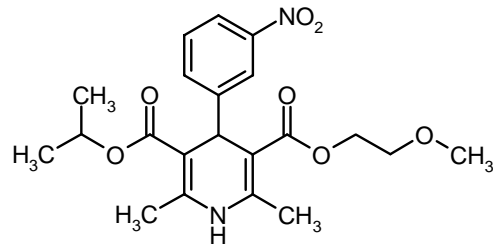


Abbildung 12: Strukturen der Steroide Progesteron **11** und Testosteron **12**

Ebenfalls modulierende Einflüsse an nAChR zeigen Calcium-Antagonisten vom Dihydropyridin-Typ (z.B. Nimodipin **13**, Abbildung 13) sowie extrazelluläres Calcium⁶⁹.



Nimodipin

Abbildung 13: Struktur des Calcium-Antagonisten Nimodipin 13

Neben den bereits aufgeführten Substanzen, die als so genannte „small molecules“ betrachtet werden können, interagiert auch das endogene Lynx1-Protein mit nAChR. Das Cystein-reiche Protein weist große Ähnlichkeit mit den Elapiden-Schlangengiften der Ly-6/Neurotoxin-Familie auf und potenziert den Effekt des natürlichen Neurotransmitters ACh ²⁷⁰.

1.5 Verteilung von nicotinischen Acetylcholinrezeptoren in unterschiedlichen Geweben

Die Verteilung von Nicotinrezeptoren im Organismus wurde mit Hilfe radioaktiv markierter Liganden, In-situ-Hybridisierung mit markierten Nukleinsäuren und durch immunohistochemische Verfahren mit spezifischen Antikörpern ermittelt ^{71,72}.

Die ersten bedeutenden Informationen über die Struktur und Verteilung von Ligand-gesteuerten Ionenkanälen erhielt man durch eingehende Studien des Muskelsubtyps der nAChR ⁷³. Dieser Rezeptorsubtyp, der wie schon beschrieben aus den Untereinheit $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , γ oder ϵ gebildet wird (Abbildung 6 & Abbildung 7) ^{31,41}, kommt fast ausschließlich an der postsynaptischen Membran der neuromuskulären Endplatte aller höher entwickelten Lebewesen vor ⁷⁴. Durch die Entdeckung dieses Rezeptors im elektrischen Organ des Zitterrochen (*Torpedo californica*, Abbildung 14), war es erstmals möglich, größere Proteinmengen an nAChR zu gewinnen und die Funktion sowie die Struktur der im Gewebe exprimierten Ionenkanäle zu untersuchen ^{75,76}.

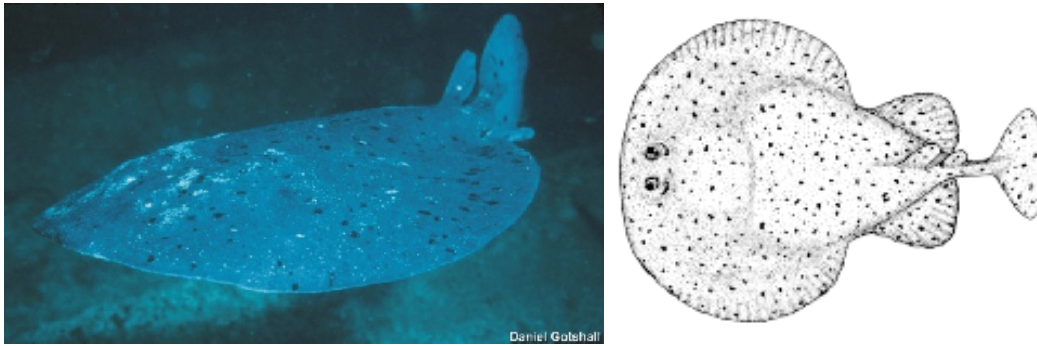


Abbildung 14. kalifornischer Zitterrochen (*Torpedo californica*)⁷⁷

Neben dem Muskelsubtyp finden sich noch weitere nAChRs in peripheren Geweben des menschlichen Organismus. So wurden diverse Subtypen (u.A. $\alpha 7$) in Muskelzellen⁷⁸, in Keratinozyten der Haut⁷⁹, in Epithel- bzw. Endothel-Zellen der Bronchien⁸⁰ und Aorta⁸¹, in der Blase⁸², im Hoden sowie in Immunzellen nachgewiesen^{83,84}. Besonders interessant ist das Vorkommen des Subtyps $\alpha 7$ in B-Lymphozyten, da dieser Rezeptor möglicherweise an der Herstellung von Antikörpern und an der Förderung der Proliferation von Tumorzellen beteiligt ist⁸⁴.

Große Aufmerksamkeit erregt ebenfalls die Publikation von Wang et al., die erstmals eine mögliche Beteiligung von $\alpha 7$ -Rezeptoren an Entzündungsprozessen durch Freisetzung von Zytokinen (TNF- α) aus Makrophagen nachwies⁸⁵.

Nicotinrezeptoren vom Subtyp $\alpha 9$ und $\alpha 9\alpha 10$ finden sich in den Haarzellen des Innenohrs, wo sie wahrscheinlich an der Weiterleitung von akustischen Stimuli beteiligt sind^{86,87,88}. In-situ-Hybridisation-Studien zeigten darüber hinaus, dass der $\alpha 9$ -Rezeptor, der durch sein spezielles pharmakologisches Verhalten eine Sonderstellung unter den nAChR einnimmt, im lymphatischen System vorkommt (Mandeln, Thymus und Milz)^{86,89}.

Die Funktion der meisten in peripheren Geweben vorkommenden nAChR wird zurzeit stark diskutiert oder ist noch völlig unbekannt.

Weite Verbreitung finden Nicotinrezeptoren im autonomen Nervensystem. Unter diesem Begriff versteht man den Teil des Nervensystem, der neurale Befehle vom Gehirn an periphere Organe und Gewebe weiterleitet. Die in diesen Nervenbahnen vorkommenden Subtypen sind an der schnellen synaptischen Transmission in den Ganglien beteiligt und in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung für unterschiedliche pharmakologische und funktionelle Prozesse verantwortlich⁹⁰. In den Ganglien wurden

hohe mRNA Spiegel der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\beta 4$ beobachtet, jedoch konnten auch die Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und $\beta 2$ nachgewiesen werden^{91,92,93}. Es finden sich Hinweise, dass die vorherrschenden Nicotinrezeptoren bei der Neurotransmission im intrakardialen Ganglion die Subtypen $\alpha 3\beta 4$ und $\alpha 7$ sind, wobei anscheinend der $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptor für den positiv chronotropen Effekt von Nicotin **1**, der zu einem Anstieg der Herzfrequenz führt, verantwortlich ist^{82,93,94}. Der negativ chronotrope Effekt, der zu einer Erniedrigung der Herzfrequenz führt, wird dabei möglicherweise über den $\alpha 7$ -Rezeptor vermittelt. Dieser wird sowohl in parasymphatischen, als auch symphatischen Neuronen des Herzens exprimiert⁹⁴. Ji et al. postulierten sogar, dass in den intrinsischen kardialen Neuronen die Untereinheit $\alpha 7$ mit anderen Untereinheiten zu heteropentameren Rezeptoren kombiniert ist⁹⁴.

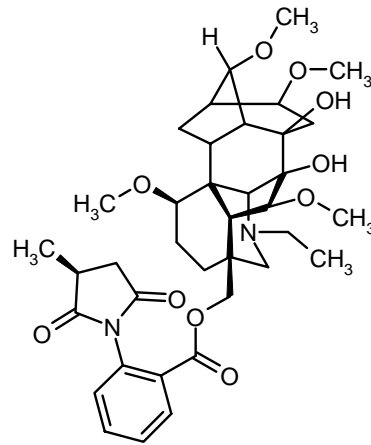
Das autonome Nervensystem innerviert neben dem Herzen auch den Gastrointestinaltrakt sowie die Blase⁸². Bis heute verfügt die Wissenschaft nur über wenige Informationen, welche Subtypen der nAChR an der Steuerung dieser Organe beteiligt sind. Lediglich die Beteiligung der Untereinheiten $\alpha 3$, $\beta 2$ und $\beta 4$ gilt als gesichert^{93,95}.

Die Verteilung von nAChR im Gehirn wurde mit verschiedenen Techniken (Radioligand-Bindungsstudien, Autoradiographie usw.) erforscht und ist bis heute nicht abgeschlossen. Die Rezeptorsubtyp-Verteilung variiert je nach Hirnareal stark. Zoli et al. beschrieben anhand ihrer Ergebnisse aus Versuchen an $\beta 2$ -knock-out ($\beta 2^{-/-}$ KO) und Wildtyp-Mäusen vier verschiedenen Subtypen im Gehirn der Maus (Tabelle 1.5-1)⁹⁶.

Tabelle 1.5-1: Klassifikation von nAChR im Mäusehirn⁹⁶

Rezeptortyp	Zusammensetzung der Untereinheit	vorherrschende Lokalisation im ZNS	Pharmakologie
I	$\alpha 7$	Kortex, limbische Region, Hippocampus, Hypothalamus und andere telencephalische Regionen	α -Bgt und MLA sensitiv, sehr schnelle Desensibilisierung
II	$\alpha 4\beta 2$ ($\alpha 5?$) $(\alpha 2?)\beta 2$ $(\alpha 3?)\beta 2$ $(\alpha 6\beta 3?)\beta 2$	ZNS interpeduncularer Nucleus Hippocampus Catecholaminerge Nuclei	Nicotin > Cytisin
III	$\alpha 3\beta 4$ ($\alpha 5?$)	mediale Habenula, interpeduncular Nucleus, dorsale Medulla	MLA-insensitiv (konzentrationsabhängig) Nicotin = Cytisin
IV	$(\alpha 4\beta 4?)$ $(\alpha 2\beta 4?)$	laterale Habenula dorsaler interpeduncularer Nucleus	MLA insensitiv, Nicotin = Cytisin

Der Rezeptortyp I ist sensitiv für die Antagonisten α -Bgt und Methyllycaconitin (MLA) **14** [Abbildung 15, 1.9.2 Methyllycaconitin (MLA)] und seine Verteilung verändert sich in den $\beta 2$ -knock-out Mäusen nicht. Der Rezeptor ist allerdings in Mäusen, deren $\alpha 7^*$ -Rezeptorgen mutiert wurde, nicht nachweisbar. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Rezeptortyp I um den $\alpha 7$ -nAChR handelt. Dieser kommt laut Zoli et al. verstärkt im Hippocampus, Hypothalamus und anderen telencephalialen Arealen vor. Diese Verteilung korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der Radioligand-Bindungsversuche des $\alpha 7$ -selektiven Antagonisten [¹²⁵I] α -Bgt ($K_D = 1$ nM)^{96,97,98}.

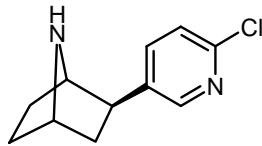


Methyllycaconitin

Abbildung 15: Struktur von Methyllycaconitin (MLA) **14**

Der Rezeptortyp II, der sich ubiquitär im Mäusehirn nachweisen lässt, enthält $\beta 2$ -Untereinheiten. Diese bilden voraussichtlich mit $\alpha 4$ -Untereinheiten den $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor. Eine besonders hohe Dichte dieses Subtyps findet sich im cerebralen Kortex, im Thalamus, im ventralen tegmentalen Areal (VTA), in der Media habenula und der Substantia nigra (Tabelle 1.5-1)⁹⁹. Jedoch können auch weitere Untereinheiten wie $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 6$ mit der $\beta 2$ -Untereinheit zu funktionellen Rezeptoren des Typs II nach Zoli et al. kombiniert werden^{100,101}. Der $\alpha 3\beta 2$ -Rezeptor wird zumeist im habenulären System und in dopaminergen Neuronen exprimiert¹⁰², während In-situ-Hybridisationsstudien von $\alpha 6$ -mRNA zeigten, dass Rezeptoren mit dieser Untereinheit in einigen catecholaminergen Nuclei, im Locus coeruleus, im VTA und der Substantia nigra vorhanden sind^{103,104}. Die Untereinheit $\beta 3$, die zur Bildung von funktionellen Rezeptoren des Typs II mit den Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ oder $\beta 2/\beta 4$ kombiniert werden muss, ist vorwiegend im Mittelhirn exprimiert^{101,105}.

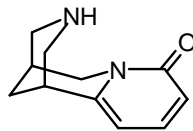
Der Rezeptortyp III enthält keine $\beta 2$ -Untereinheit, jedoch bindet das Alkaloid Epibatidin **15** (Abbildung 16; 1.8.1 Epibatidin) mit hoher Affinität an diesen Subtyp⁹⁶. Seine Verteilung im Gehirn entspricht der von $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, die predominant in den Ganglien, in der Media habenula, im habenulären-pedunculären System, im Locus coeruleus, in der Area postrema, im Cerebellum und in der Epiphyse vorkommen^{101,102,105}. Die als „orphan subunit“ bezeichnete Untereinheit $\alpha 5$ kann zusätzlich in diesem Rezeptor koexprimiert sein^{92,106}.



(1R,2R,4S)-(exo)-(-)-Epibatidin

Abbildung 16: Struktur von Epibatidin 15

Der vierte Rezeptortyp zeichnet sich durch eine schnellere Desensibilisierung aus und verfügt auch nicht über $\beta 2$ -Untereinheiten. Diese Eigenschaften und die hohe Affinität von (\pm) -[^3H]Epibatidin **15** und $(-)$ -[^3H]Cytisin **16** (Abbildung 17, 1.8.2 Cytisin) an diesem Rezeptortyp lassen vermuten, dass es sich um heteropentamere Rezeptoren der Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 4$ und $\beta 4$ handelt^{96,107}.



Cytisin

Abbildung 17: Struktur von Cytisin 16

Generell ist für alle Subtypen der nAChRs zu bemerken, dass sie sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sein können.

Das Vorkommen einiger Subtypen der nAChR ist spezies-abhängig. So exprimieren zum Beispiel Säugetiere nicht die Untereinheit $\alpha 8$, welche lediglich in Vögeln vorkommt. Ferner unterscheidet sich die Expression und Verteilung der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ zwischen Mensch und Nager²⁶.

1.6 Funktion und Pathologie von nAChR

1.6.1 Rezeptorkonformationen

Durch die Bindung eines Agonisten (z.B. Nicotin **1** und ACh **2**) an Nicotinrezeptoren kommt es im Protein des Ionenkanals zu einer Konformationsänderung¹⁰⁸. Der Rezeptorkanal wird dabei vom „Ruhezustand“ innerhalb von 1-50 ms in den „aktiven Zustand“ überführt (Abbildung 18), zu dem nAChR-Agonisten anschließend nur geringe Affinitäten zeigen¹⁰⁹. Die Konformationsänderung führt zur Durchlässigkeit des Rezeptors für Kationen wie Na⁺, K⁺ und Ca²⁺. Diese Ionen, vorwiegend Natrium und Calcium, strömen entsprechend ihres Konzentrationsgefälles in die Zelle, was eine Depolarisierung der Zellmembran zur Folge hat. Die Bindung des Agonisten an den Rezeptor führt nachfolgend zur Desensibilisierung und Schließen des Ionenkanals¹¹⁰.

Es wird angenommen, dass je nach Geschwindigkeit der Desensibilisierung die Rezeptoren in mehrere „desensibilisierte“ (geschlossene) Zustände übergehen. In allen „desensibilisierten Zuständen“ ist der Rezeptor nicht aktivierbar, jedoch binden Agonisten mit hoher Affinität an ihn (siehe 3.6 Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente)¹⁰⁹.

Im Falle einer länger anhaltenden Exposition des Ionenkanals mit Agonisten kommt es zu einer vollständigen Inaktivierung der nAChR. Dieser Zustand geht nur sehr langsam wieder in den Ruhezustand zurück¹⁰⁹.

Das in Abbildung 18 gezeigte Schema stellt eine Vereinfachung der Konformationszustände der nAChR dar. Es wird angenommen, dass noch eine Reihe weiterer Zustände existieren⁶. Möglicherweise haben auch Mutationen im Rezeptorprotein Auswirkung auf diese Rezeptorzustände bzw. auf die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs von einem in den anderen Zustand. Solche veränderten Rezeptorfunktionen werden als eine mögliche Ursache der Epilepsie sowie der Myasthenia gravis (Goldflam-Krankheit) diskutiert^{111,112}.

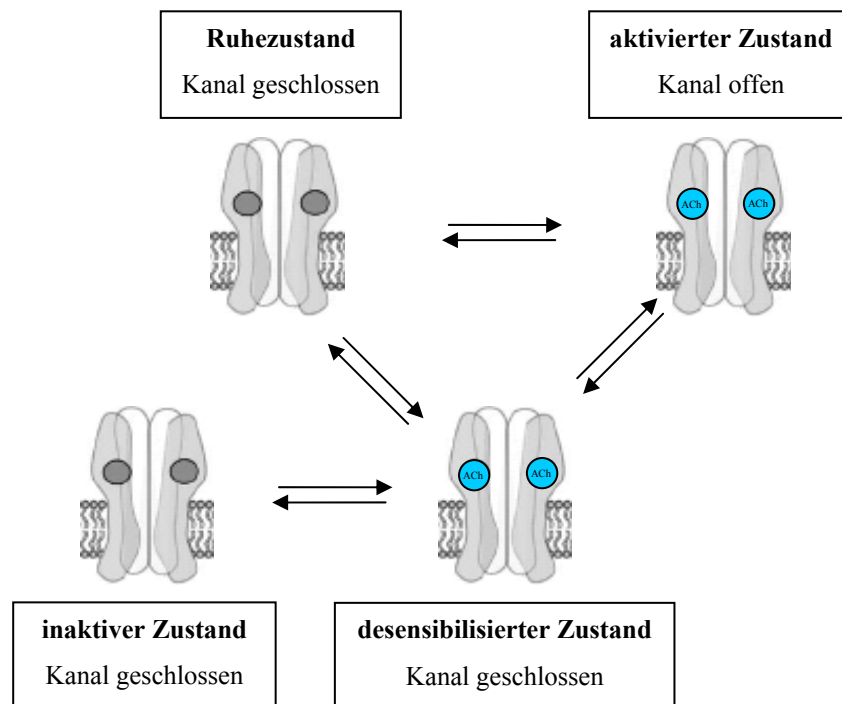


Abbildung 18: vereinfachte Darstellung der Konformationszustände des nAChR

1.6.2 Rezeptordichte

Es ist bekannt, dass es bei einer länger anhaltenden Exposition eines Rezeptors mit Agonisten zu einer Verminderung der Rezeptoranzahl kommt (*down-regulation*). Im umgekehrten Fall führen Antagonisten zu einer Erhöhung der Rezeptordichte (*up-regulation*)²⁷. Nicotinrezeptoren verhalten sich entgegen dieser bei anderen Rezeptoren beobachteten Zusammenhänge. Werden nAChR über einen längeren Zeitraum Agonisten ausgesetzt, kommt es zu einer *up-regulation* der Rezeptoren und somit zur Erhöhung der Rezeptordichte im Hirngewebe²⁷. Es werden zwei Theorien für diesen Effekt bei $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren aufgeführt¹¹³. Die „conformational equilibrium“ Hypothese geht davon aus, dass zwei ineinander überführbare Rezeptorzustände existieren, von denen einer hohe und der andere niedrige Affinität zu Nicotin 1 besitzt. Die längere Exposition von Nicotin 1 würde dabei in einer Verschiebung des Gleichgewichtes der beiden Zustände zugunsten des hochaffinen resultieren.

Die „ligand-locked receptor“ Theorie hingegen postuliert, dass $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren der Zellmembran schnell recycelt werden. Die chronische Exposition mit Agonisten führt dabei zu einer Verminderung der Rezeptor-Endozytose und andererseits zu einer

Erhöhung des Neueinbaus von „hochaffinen“ Nicotinrezeptor aus submembranären Pools²⁷.

1.6.3 Pathologie

Die Aktivierung verschiedener neuronaler Subtypen der nAChR resultiert in einer vermehrten Ausschüttung von diversen Neurotransmittern wie Acetylcholin **2**, γ -Amino-buttersäure, Glutamat, Dopamin, Norepinephrin und 5-Hydroxytryptamin (Serotonin).

Diese sind an einer Vielzahl komplexer Hirnfunktionen wie Lernen, Aufmerksamkeit, Gedächtnis, Schmerzwahrnehmung und Angstepfindung beteiligt¹¹⁴. Dadurch sind Nicotinrezeptoren in die Pathologie von verschiedenen psychiatrischen, neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen involviert¹¹⁵. Diese Erkrankungen werden nachfolgend näher beschrieben:

Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer ist biochemisch durch eine Störung des kortikalen cholinergen Systems mit einer Verminderung der Cholinacetyltransferase und der damit verbundenen verminderten Acetylcholin-Synthese gekennzeichnet (cholinerge Hypothese)^{116,117,118,119}. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen, die eine verminderte Nicotinbindung im frontalen, temporalen und occipitalen Kortex¹¹⁶ und eine im Vergleich zum Gesunden geringere Anzahl von $\alpha 4\beta 2$ -nAChR in der Pathophysiologie von Alzheimer-Patienten belegen^{102,120,121}. Weiterhin sind erhöhte Level an mRNA des $\alpha 7$ -Subtyps der Nicotinrezeptoren im Gehirn von Alzheimererkrankten zu finden¹²². Die Beteiligung von cholinergen Systemen an Morbus Alzheimer wird ferner durch die Tatsache gestützt, dass Raucher wesentlich seltener an dieser Krankheit leiden als Nichtraucher^{123,124}. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Intensivierung der Biosynthese und Sekretion des Enzyms Transthyretin (TTR) durch Nicotin **1**¹²⁵. TTR verhindert die Aggregation des Proteins β -Amyloid ($A\beta_{1-42}$), einem Spaltprodukt des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) und Hauptbestandteil der für Alzheimer charakteristischen senilen Plaques.

Die positiven Effekte des Nicotins **1** auf den Verlauf der Alzheimer Erkrankung lassen sich noch besser verstehen, wenn man in Betracht zieht, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von $A\beta_{1-42}$ und der Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten besteht. Das β -Amyloidprotein bindet mit hoher Affinität an den $\alpha 7$ -Rezeptor¹²⁶ und blockiert somit postsynaptische nAChR-Kanäle im hippocampalen Gewebe¹²⁷. In dem betroffenen Hirnareal liegen Bereiche, die für Kognition, Erinnerungsvermögen und Lernfähigkeit verantwortlich sind.

Die Therapie von Morbus Alzheimer ist bis heute nicht kurativ ausgelegt, sondern beschränkt sich nur auf die Behandlung der Symptome. Die verwendeten Arzneimittel sind nicht in der Lage das Vorschreiten der Krankheit aufzuhalten, sondern erhöhen lediglich die im Gehirn erniedrigte Konzentration des Neurotransmitters ACh **2**. Vornehmlich werden zu diesem Zweck Inhibitoren der Acetylcholinesterase eingesetzt [z.B. Rivastigmin **17** (Exelon[®]) und Galantamin **6** (Reminyl[®])], die durch Hemmung des Abbaus von ACh dessen Konzentration im synaptischen Spalt erhöhen¹²⁸.

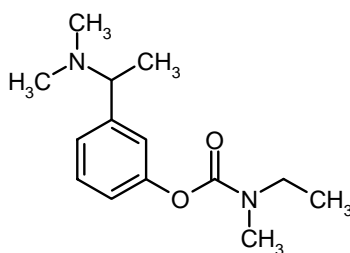


Abbildung 19: Struktur des Acetylcholinesterase-Hemmstoffes Rivastigmin **17**

Schizophrenie

Wie schon bei Personen mit Morbus Alzheimer beobachtet, ist Anteil der Raucher unter Schizophreniepatienten deutlich (ca. dreimal) höher als unter Gesunden. Etwa 93 % aller männlichen Schizophrenen rauchen^{129,130,131}. Eine Entwöhnung der betroffenen Personen führt in der Regel zu einer Verschlechterung der Krankheitssymptomatik³³.

Ein möglicher Erklärungsansatz für den hohen Raucheranteil ist der bewusste Versuch der Patienten, die Symptome ihrer Krankheit zu lindern. Die Selbstapplikation von Nicotin **1** führt wahrscheinlich zur Modulation des dopaminergen und glutaminergen Systems, was sich anscheinend positiv auf die Krankheitssymptomatik auswirkt¹³². Es ist daher zu vermuten, dass nAChR in der Pathophysiologie der Schizophrenie beteiligt

sind.

Diese Vermutung wird durch Versuche an Nagern bestätigt, in denen Schizophrenie-ähnliche Symptome durch die Applikation der $\alpha 7$ -Rezeptor-Antagonisten α -Bungarotoxin **4** und Methylylcaconitin **14** ausgelöst werden konnten¹³³. Ähnliche Ergebnisse ergaben post mortem Hirnuntersuchungen von Schizophrenie-Patienten, in denen eine Verringerung der Bindungsstellen für den $\alpha 7$ -Subtyp-selektiven Liganden α -Bungarotoxin **4** festgestellt wurde¹³⁴.

Die verminderte Gewöhnung an akustische Reize, einem Hauptsymptom der Schizophrenie, ist vermutlich auf eine Funktionsstörung des $\alpha 7$ -nAChR, zurückzuführen¹³⁵. Dieser Defekt der Rezeptorfunktion ist bei einigen Schizophreniepatienten vermutlich erblich bedingt. Bei der genetischen Untersuchung dieser Patienten fand sich ein Dinucleotid-Polymorphismus (Chromosom 15p3-14) des $\alpha 7$ -Rezeptor codierenden Gens¹³⁶.

Histochemische Untersuchungen der mRNA-Expression verschiedener Nicotinrezeptor-Subtypen geben Anlass zur Vermutung, dass auch andere Subtypen, namentlich $\alpha 6$ - und $\beta 3$ -enthaltende Rezeptoren, eine Rolle bei der Schizophrenie spielen¹³⁷.

Tourette-Syndrom (Gilles-de-la-Tourette-Syndrom)

Neue Therapieansätze zur Behandlung des Tourette-Syndroms ergaben, dass die Applikation von Nicotin **1** in Form von Kaugummis und Pflastern die zur Verbesserung der Symptomatik (z.B. Tics) notwendige Dosis des Standard-Therapeutikums Haloperidol (Dopamin-Antagonist) verringern konnte^{138,139}.

Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch noch unklar. Möglicherweise ist eine nAChR vermittelte Dopaminfreisetzung oder die Desensibilisierung bzw. permanente Inaktivierung der Nicotinrezeptoren $\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 7$ beteiligt¹⁴⁰. Da Nicotin **1** in der Regel bei dauerhafter Applikation zur Desensibilisierung der nAChR führt, wurde vermutet, dass sich möglicherweise Nicotinrezeptor-Antagonisten wie Mecamylamin **8** zur Therapie des Tourette-Syndroms eignen würden^{141,142}.

Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS)

Die Ursachen des Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom sind unklar, jedoch wird ein Zusammenspiel von psychosozialen und biologischen Faktoren (Störungen im

Dopaminstoffwechsel), die zu dysfunktioneller Informationsverarbeitung im Gehirn führen, diskutiert.

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die Symptome von ADHS durch die Gabe von Nicotin **1** gelindert, und die Aufmerksamkeit gesteigert werden kann¹⁴³. Wie schon bei schizophrenen Personen beobachtet, liegt auch unter ADHS-Patienten die Anzahl der Raucher mit 40 % über dem Niveau der Normalbevölkerung (ca. 30%). Auch in diesem Fall wird angenommen, dass es sich dabei um eine Art Eigetherapie handelt¹⁴⁴. In einem Therapieansatz mit Nicotin **1** und dem Nicotinrezeptor-Agonisten ABT-418 **18** (Abbildung 20) konnte zwar eine signifikante Verbesserung der ADHS beobachtet werden¹⁴⁵, jedoch kommt dieser Therapieansatz aufgrund der auftretenden Nebeneffekte (Schwindelanfälle, Übelkeit, Kopfschmerz, Dysphorie) zur Behandlung der zumeist relativ jungen Patienten (Kinder und Jugendliche) nicht in Frage³³.

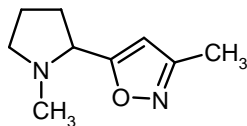


Abbildung 20: Struktur des Nicotinrezeptor-Agonisten ABT-418 **18**

Epilepsie

Für die idiopatische Form der Epilepsie werden charakteristische Veränderungen in Genen, die für verschiedene Untereinheiten von neuronalen Natrium- und Kaliumkanälen bzw. für Nicotinrezeptorsubtypen kodieren, diskutiert.

Im Fall der erblichen Frontallappenepilepsie ADFLE (autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy), die sich durch vorwiegend nachts auftretende, vom Fronthirn ausgehende Anfälle auszeichnet, konnten insgesamt fünf Mutationen der Gene CHRNA4 (Chromosom 20q13.2) und CHRNB2 (Chromosom 1q21.3) nachgewiesen werden^{61,146,147,148,149,150,151}. Die beiden Gene kodieren das M2-Transmembransegment der α - (CHRNA4) bzw. der β 2-Untereinheiten (CHRNB2) des nAChR¹⁵². Diese Form der Epilepsie scheint autosomal dominant vererbt zu werden¹⁵³.

Morbus Parkinson

Bei der nach dem Chirurgen und Paläontologen James Parkinson benannten Krankheit handelt es sich um ein extrapyramidales Syndrom mit Überwiegen von cholinergen

Reaktionen infolge einer Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra, die normalerweise auf die cholinergen Neurone im Corpus striatum hemmend einwirken^{117,121,154}.

Wie schon für Morbus Alzheimer beschrieben, erkrankten Raucher wesentlich seltener an Parkinson als Nichtraucher¹⁵⁵. Der vermeintliche neuroprotektive Effekt von Nicotin **1**, der vermutlich über $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 7$ -nAChR vermittelt wird^{138,156}, hat zu Beginn des 20. Jahrhundert zum Einsatz des Alkaloides zur Behandlung des Parkinson-Syndroms geführt¹⁵⁷. Die Wirkung des Nicotins **1** beruht wahrscheinlich auf einer gesteigerten Dopaminfreisetzung, die durch präsynaptische Stimulation von $\alpha 3$ - und $\alpha 6$ -enthaltende Subtypen der nAChR, die sich auf den dopaminergen Nervenendigungen befinden, hervorgerufen wird^{115,158,159,160}. Diese These wird durch Tiermodelle des Parkinson-Syndroms bestätigt, in denen eine bis zu 50 %ige Abnahme der $\alpha 3$ - und $\alpha 6$ -enthaltenden Nicotinrezeptoren im frontalen und temporalen Kortex sowie im Hippocampus gefunden wurde^{156,161}. Diese Regionen sind assoziiert mit Erinnerungsvermögen und Lernfähigkeit¹⁰².

Newhouse et al. berichteten, dass eine länger anhaltende Nicotinapplikation die neuronale dopaminerge Degeneration verhindert und die synaptische Dopaminspiegel in der Substantia nigra und im Striatum erhöht¹¹⁵. Die Aufrechterhaltung des dopaminergen Systems ist in diesem Fall wahrscheinlich MAO-B vermittelt¹⁶².

Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass $\alpha 4$ -enthaltende nAChR-Subtypen ebenfalls Einfluss auf die Parkinson-Krankheit haben¹⁶³. Diese Tatsache spricht dafür, dass das $\alpha 4\beta 2$ -selektive Nicotin-Analogon SIB-1508Y **19** (Abbildung 21) Aktivität in experimentellen Parkinson-Modellen zeigte¹⁶⁴.

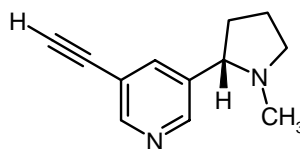


Abbildung 21: Struktur des $\alpha 4\beta 2$ -selektiven Nicotin-Analogons SIB-1508Y **19**

Depression

Neuere Forschungsergebnisse lassen eine positive Korrelation zwischen Nicotinabhängigkeit und der typischen Depression (major depression) erkennen^{165,166}.

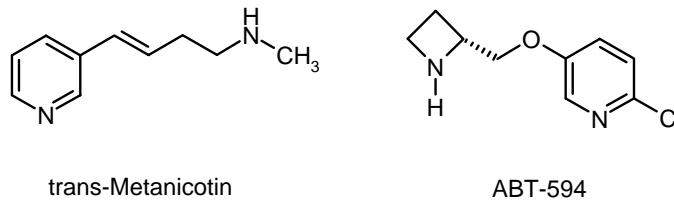
Wie schon für Patienten mit Schizophrenie, Morbus Parkinson oder Alzheimer beschrieben, scheinen auch Depressive das Rauchen als Selbsttherapie zu verwenden. Diese Hypothese wird durch die Tatsache bestätigt, dass Nicotin **1** über die Aktivierung von nAChR die Freisetzung von einigen Neurotransmittern (Dopamin, Norepinephrin, Serotonin), deren Konzentrationen bei der Depression erniedrigt sind, stimuliert³³.

Ein weiter Hinweis auf eine positive Wirkung von Nicotin **1** auf die Symptomatik der Depression findet sich in der Veröffentlichung von Fowler et al.¹⁶². Sie beschreiben, dass Raucher erniedrigte Spiegel des Enzyms Monoaminoxidase (MAO) in peripheren Organen und im Gehirn aufweisen. Verschiedene Antidepressiva wirken gerade über die Hemmung der Monoaminoxidase (MAO-A und MAO-B), die im Organismus für den Abbau der biogenen Amin-Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Serotonin verantwortlich sind.

Schmerz

Die analgetische Wirkung von Nicotin **1** ist bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts bekannt¹⁶⁷. Mit der Entdeckung des Alkaloides Epibatidin **15**, das im Hot-plate-Test (Maus) 200x stärker analgetisch wirkt als Morphin und kaum Affinität zu Opiatrezeptoren besitzt ($K_i > 3,0 \mu\text{M}$)^{168,169}, hat das Interesse an Nicotinrezeptor-Liganden zur Schmerztherapie stark zugenommen.

Auf Grund der hohen Toxizität und der damit verbundenen geringen therapeutischen Breite eignet sich Epibatidin **15** nicht als Analgetikum¹⁷⁰. Daher wurde versucht, subtypelektive Agonisten für nAChR zu entwickeln. Im Falle von RJR-2403 **20** (trans-Metanicotin) und ABT-594 **21** (Abbildung 22) konnten zwei potentielle Analgetika entwickelt werden (ABT-594 **21** befindet sich derzeit in Phase II der klinischen Prüfung), die im Tierversuch effektiv gegen thermische, chemische und neuropathische Schmerzen wirksam waren, aber nicht über die toxischen Eigenschaften des Epibatidins **15** verfügen^{171,172,173}.



*Abbildung 22: Strukturen der potentiellen Analgetika
RJR-2403 20 (trans-Metanicotin) und ABT-594 21*

Die Subtypselektivität dieser Substanzen und Versuche mit Knock-out-Mäusen (KO-Mäusen) haben gezeigt, dass sowohl die $\alpha 4$ - als auch die $\beta 2$ -Untereinheit des nAChR essentiell für die Schmerzwahrnehmung sind^{173,174}. Es ist aber nicht auszuschließen, dass noch weitere Subtypen der nAChR bei der Schmerzwahrnehmung beteiligt sind¹⁷⁴. Die Nebenwirkungen der zur Schmerztherapie eingesetzten nAChR-Liganden scheinen dabei mit den Selektivitäten zu den neuronalen ($\alpha 4\beta 2$ & $\alpha 7$), ganglionären ($\alpha 3\beta 4$) und muskulären [$(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$] Subtypen zu korrelieren¹⁷⁵.

Tabakabhängigkeit

Das Rauchen ist die häufigste Form der Suchterkrankungen und führt weltweit zu über drei Millionen Todesfällen pro Jahr durch Folgeerkrankungen (koronare Herzkrankheiten, Schlaganfall, vaskuläre Erkrankungen, chronische Lungenerkrankungen) dieser Abhängigkeit¹⁷⁶. Der Großteil der mit dem Rauchen assoziierten Erkrankungen ist hauptsächlich auf die durch die Tabakverbrennung freigesetzten Stoffe (bis zu 4000 Substanzen) zurückzuführen¹⁷⁷. Die suchterzeugende Wirkung des Tabaks wird jedoch durch den Hauptinhaltsstoff, das Nicotin **1**, sowie durch die respiratorische Stimulation nach Einatmen des Tabakrauchs hervorgerufen^{178,179,180}. Die Abhängigkeit beruht auf der Aktivierung des Belohnungssystems, da Nicotin **1** wie viele andere suchterzeugende Stoffe (z.B. Kokain und Amphetamine) eine vermehrte Ausschüttung von Dopamin in der Area ventralis tegmentalis (AVT, VTA) induziert. Dies wiederum aktiviert den Nucleus accumbens im Vorderhirn. Es wird angenommen, dass dieses mesolimbische Dopaminsystem und seine weiteren Verbindungen an der Verarbeitung natürlicher und Suchtstoff-induzierter Belohnung beteiligt sind^{178,181,182,183}.

In Experimenten mit $\beta 2$ -KO-Mäusen zeigten die Nager keine Neigung zur Selbstverabreichung von Nicotin. Weiterhin konnte keine Erhöhung der

Dopaminfreisetzung im Belohnungszentrum beobachtet werden, was impliziert, dass dieser Effekt über $\beta 2$ -haltige Subtypen vermittelt wird¹⁸⁴.

Zur Raucherentwöhnung wurde bisher immer Nicotin **1** in Form von Pflastern, Kaugummis und Nasenspray eingesetzt, jedoch waren die Erfolge relativ gering¹⁸⁵. Daher besteht gerade bei der Raucherentwöhnung großes Interesse an der Entwicklung von Subtyp selektiven Nicotinrezeptor-Liganden.

Colitis ulcerosa

Einige epidemiologische Studien konnten zeigen, dass Rauchen nachweislich Effekte auf entzündliche Darmerkrankung hat (inflammatory bowel disease, IBD)^{186,187}. Der Tabakgenuss wirkt sich günstig auf den Verlauf von Colitis ulcerosa und nachteilig auf Morbus Crohn aus^{186,188}. Diese Effekte werden dem Nicotin **1** zugeschrieben, wobei der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus noch völlig unbekannt ist¹⁸⁹. Jedoch könnte sich Nicotin **1** in Form eines transdermalen Systems zur Therapie von Colitis ulcerosa eignen¹⁹⁰.

Im Gegensatz dazu scheint das Rauchen, aber auch das Passivrauchen das Risiko der Entstehung von Morbus Crohn zu erhöhen. Dies ist möglicherweise auf die verschiedenen Einflüsse des Nicotins **1** auf unterschiedliche Nicotinrezeptor-Subtypen des autonomen Nervensystems zurückzuführen¹⁸⁹.

Entzündung

Über den so genannten „cholinergic anti-inflammatory pathway“ scheinen Acetylcholin und nAChR-Agonisten die Freisetzung von TNF- α aus Makrophagen inhibieren zu können. TNF- α ist einer der zentralen Mediatoren der systemischen Entzündungs- und Immunreaktion mit Wirkung auf eine Vielzahl von Targets (Granulozyten, Endothelzellen, Hepatozyten, Hypothalamus, Fett- und Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen).

Durch Fluoreszenz-Labeling mit markierten $\alpha 7$ -Bungarotoxin **4** konnte eine mögliche Beteiligung des $\alpha 7$ -Subtyps an der Freisetzung von TNF- α aus humanen Makrophagen und der damit verbundenen Unterhaltung des Entzündungsprozesses gezeigt werden^{85,191}.

1.7 Nicotinrezeptor-Liganden

1.7.1 Acetylcholin und Cholin

Der bedeutendste Ligand an nAChR ist Acetylcholin **2**, das chemisch betrachtet einen Essigsäureester des Cholins **22** darstellt (Abbildung 23).

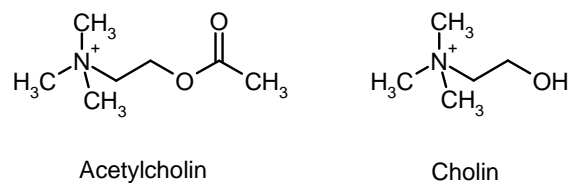


Abbildung 23: Strukturen der physiologischen nAChR-Agonisten Acetylcholin **2** und Cholin **22**

Im menschlichen Körper erfolgt die Herstellung des AChs **2** überwiegend im präsynaptischen Teil cholinergischer Nervenfasern durch die Übertragung von Acetyl-CoA auf Cholin **22**, wobei diese Reaktion unter Katalyse des Enzym Cholinacetyltransferase abläuft. Acetylcholin **2** fungiert als Neurotransmitter an cholinergen Synapsen des Parasympathikus und präganglionären Sympathikusfasern sowie an der motorischen Endplatte, und löst im Organismus eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse aus^{1,117}.

Durch den Stimulus eines eintreffenden Aktionspotentials wird ACh durch Exozytose aus den Speichervesikel der Präsynapse in den synaptischen Spalt freigesetzt und kann, sowohl prä-, als auch postsynaptisch, mit Cholinrezeptoren (mAChR & nAChR) interagieren.

Durch die Bindung des AChs **2** an nAChR resultiert, wie bereits beschrieben, eine Änderung der Ionenpermeabilität des Rezeptorkanals. Die Interaktion eines Agonisten mit nAChR der motorischen Endplatte führt zum Beispiel zur Depolarisation von Muskelfasern, was wiederum eine Kontraktion der Muskulatur nach sich zieht. Eine Erregung von Nicotinrezeptoren des Herzens wiederum hat eine primäre Zunahme der Kaliumionen-Permeabilität und somit eine Hyperpolarisation von Zellen zur Folge. Dies resultiert nachfolgend zum Beispiel in einer Hemmung von Schrittmacherzellen (negativ chronotroper Effekt).

In der Regel wird ACh **2** im Körper schnell durch unspezifische Esterasen oder die spezifische Acetylcholinesterase in Cholin **22** und Essigsäure abgebaut (4.2 Inhibition der Acetylcholinesterase). Beide Abbauprodukte werden vorwiegend von den Neuronen des synaptischen Spaltes resorbiert und zur erneuten Synthese wieder

verwendet^{1,117}.

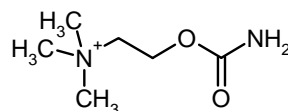
Acetylcholin **2** ist nicht nur in der Lage direkt an Cholinrezeptoren zu binden, sondern es vermag schon in niedriger Konzentration Schmerzen zu verstärken, mit der Folge, dass Schmerz-Mediatoren in Kombination mit ACh **2** bereits bei wesentlich geringeren Konzentrationen Schmerz auslösen. In hoher Konzentration wirkt Acetylcholin **2** selbst als eigenständiger Schmerzstoff^{1,117}.

An Nicotinrezeptoren bindet Acetylcholin **2** mit hoher Affinität, wobei diese zwischen den Subtypen stark variiert ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 15 \text{ nM}$; $\alpha 3\beta 4$: $K_i = 560 \text{ nM}$; $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$: $K_i = 15 \text{ nM}$; $\alpha 7$ $K_i = 4000 \text{ nM}$)^{192,193,194}. Der Neurotransmitter bindet jedoch ebenfalls mit nanomolarer Affinität an mAChR.

In diesem Zusammenhang sind auch die Arbeiten von Alkondon et al. und Papke et al. interessant^{195,196}. Sie konnten zeigen, dass der Precursor und Metabolit von ACh **2**, das Cholin **22**, das selber nur eine geringe Affinität zu Nicotinrezeptoren besitzt ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 112 \text{ }\mu\text{M}$ & $\alpha 7$: $K_i = 2,2 \text{ mM}$), am $\alpha 7$ -nAChR als voller und selektiver Agonist und am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor als Co-Agonist fungiert. Es wird daher vermutet, dass Cholin **22** zumindest am $\alpha 7$ -Subtyp der nAChR als weiterer physiologischer Ligand neben ACh **2** fungiert^{195,196}. Daher scheinen sich Cholin **22** und ACh **2** als Leitstruktur für die Entwicklung selektiver Liganden für nAChR und mAChR zu eignen.

1.7.2 Acetylcholin und Cholin-Analoga

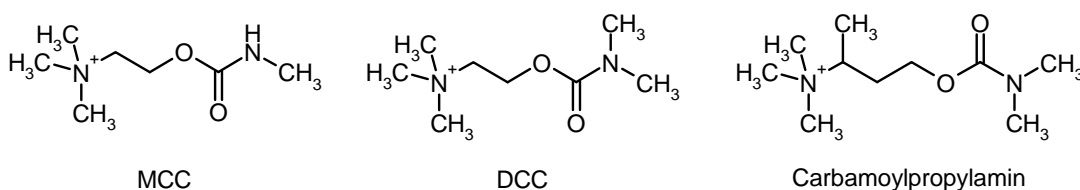
Der Austausch des Essigesters des ACh **2** gegen einen Carbamidsäureester führte zu dem Hydrolyse-stabilen Parasympathomimetikum Carbachol **23** (CCh) (Abbildung 24), das als Agonist einen K_i -Wert von 5 nM am Muskarinrezeptor aufweist. Die Substanz interagiert jedoch auch mit nAChR ($K_i = 750 \text{ nM}$)¹⁹⁷.



Carbachol

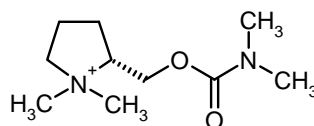
Abbildung 24: Struktur des Parasympathomimetikum Carbachol **23**

Die N-Methylierung des Carbachols **23** zu N-Methyl-carbacholin (MCC) **24** und N,N-Dimethylcarbacholin (DMCC) **25** geht mit einer Erhöhung der Affinität zu neuronalen nAChR ($\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 7$) und einer gesteigerten Selektivität für nAChR gegenüber mAChR einher (Abbildung 25).

Abbildung 25: Strukturformel der Carbachol-Abkömmlinge MCC **24**, DMCC **25** und Carbamoylpropylamin **26**

Die weitere strukturelle Variation von DMCC **25** führte zu dem potentesten Vertreter der Cholin-Analoga an nAChRs ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 9$ nM), dem Homocholin-Derivat Carbamoyl-propylamin **26** (3-Dimethylcarbamoyl-1-methyl-propyl)trimethylammonium)¹⁹⁷.

Des Weiteren wurde durch Zyklisierung der Cholin-Teilstruktur versucht zu selektiven und potenten Nicotinrezeptor-Liganden zu gelangen. Diese Vorgehensweise führte zu einigen potenten, teilweise zur Behandlung von kognitiven, neurologischen und mentalen Störungen patentierten Substanzen wie dem (S)-Enantiomer des 1-Methyl-2-(N,N-dimethylaminocarbonyloxy-methyl)pyrrolidins **27** ($\alpha 4\beta 2$: $IC_{50} = 18$ nM) (Abbildung 26)^{198,199}.



(S)-1-Methyl-2-(N,N-dimethylaminocarbonyloxy-methyl)pyrrolidin

Abbildung 26: Strukturformel von (S)-1-Methyl-2-(N,N-dimethylaminocarbonyloxy-methyl)pyrrolidin **27**

1.7.3 Nicotin

(S)-(-)-Nicotin **1** (kurz Nicotin **1**, Abbildung 27) ist das Hauptalkaloid der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*, Solanaceae) die von dem Mönch Romano Pane, ein Begleiter von Christoph Kolumbus, Ende des 15. Jahrhunderts nach Europa eingeführt wurde. Der Hauptinhaltsstoff des Tabaks wurde nach Jean Nicot de Villemain benannt, der 1570 den Tabak in Frankreich einführte. Isoliert und erstmals beschrieben wurde Nicotin **1** 1828 von dem Chemiker Reimann und dem Mediziner Posselt^{200,201}.

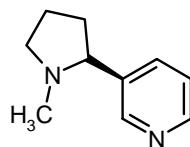


Abbildung 27: Strukturformel von (S)-(-)-Nicotin **1**

Chemisch handelt es sich bei dem natürlich vorkommenden Nicotin **1** um (S)-3-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)-pyridin. Das (R)-Enantiomer findet sich nicht in der Natur und weist im Vergleich zu seinem Antipoden eine 10-30fach geringere Affinität zu nAChR auf. Die (S)-Stereochemie, aber auch die N-Methylgruppe stellen wichtige strukturelle Merkmale dar, die für die hohe Affinität zu nAChR unentbehrlich sind²⁰².

Das Alkaloid verfügt über eine hohe Affinität zu nAChR, wobei ein gewisse Prävalenz zum $\alpha 4\beta 2$ -Subtyp festzustellen ist ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 0,838 \text{ nM}$; $\alpha 3\beta 4$: $K_i = 84 \text{ nM}$; $\alpha 7$: $K_i = 127 \text{ nM}$; $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$: $K_i = 1 \text{ }\mu\text{M}$)^{203,204}.

Nicotin **1** ist nach Inhalation über den Tabakrauch in der Lage die BBB rasch zu überwinden und führt zur vermehrten Ausschüttung von Dopamin im Belohnungszentrum. Dieser Mechanismus gilt als maßgeblich für die suchterzeugende Wirkung des Nicotins **1** (1.6 Funktion und Pathologie von nAChR, Tabakabhängigkeit). Aufgrund der Tatsache, dass Nicotin **1** schnell ins Gehirn vordringt, findet die Substanz breite Anwendung in Verhaltensstudien^{181,205}.

1.7.4 Nicotin-Analoga

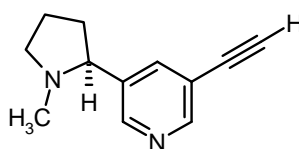
Mit der Entdeckung der Beteiligung von Nicotinrezeptoren an der Pathologie verschiedener Krankheiten wurde Nicotin **1** zur Leitstruktur bei der Entwicklung potentieller Arzneistoffe zu Behandlung dieser Erkrankungen. Vielseitige

Strukturvariationen (Austausch oder Substitution des Pyrrolidin- bzw. Pyridinrings, Veränderung des chiralen Zentrums oder Rigidisierung des Gesamtmoleküls) wurden an diesem Molekül zur Verbesserung der Wirksamkeit, Selektivität, Stabilität und Verträglichkeit vorgenommen, jedoch führten nur wenige zum Erfolg^{206,207}.

Die nachfolgenden Substanzen stellen eine Auswahl der potentesten Nicotinanaloga dar.

Altiniclin (SIB-1508Y)

Altiniclin **19** stellt ein 5-Ethynyl-substituiertes Nicotin **1** dar (Abbildung 28). Die Verbindung zeigt hohe Affinität zum $\alpha 4\beta 2$ -Subtyp ($K_i = 4$ nM), geringe Affinität zu $\beta 4$ -enthaltenden Rezeptoren und ist nicht in der Lage, den $\alpha 7$ -Rezeptor zu aktivieren. Die Verbindung besitzt etwa vergleichbare agonistische Wirkung am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor wie Nicotin **1** (Altiniclin **19**: $EC_{50} = 1,8$ μ M; Nicotin **1**: $EC_{50} = 4,6$ M; $[Ca^{2+}]_i$ Bestimmung in transfizierten HEK 293 Zellen). Altiniclin **19** induziert verglichen mit Nicotin **1** eine deutlich stärkere Dopaminfreisetzung im Striatum der Ratte. Aufgrund dieses verbesserten pharmakologischen Profils wurde SIB-1508Y **19** für präklinische und klinische Prüfung zur Behandlung des Morbus Parkinson ausgewählt^{207,208,209}.



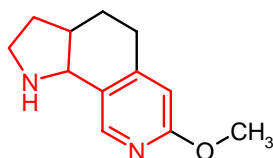
SIB-1508Y

Abbildung 28: Struktur des Nicotinanalogon SIB-1508Y **19**

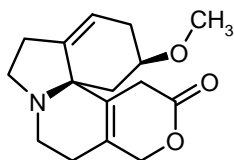
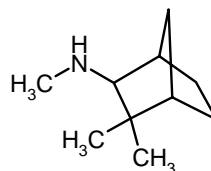
SIB-1663

SIB-1663 **28** (7-Methoxy-2,3,3a,4,5,9b-hexahydro-1-H-pyrrolo[3,2-h]isochinolin) ist ein rigidisiertes, in Position 7 Methoxy-substituiertes Nicotin. Obwohl dieses Nicotinanalogon nur eine verhältnismäßig geringe Interaktion mit nAChR zeigt ($IC_{50} = 1,9$ μ M; (-)- $[^3H]$ Nicotin, Rattenhirn), verfügt es über interessante Eigenschaften. Denn weder die nAChR-Antagonisten Mecamylamin **8** und Dihydro- β -erythroidin (DH β E) **29**, noch Atropin **30** (mAChR-Antagonist) und Naloxon **31** (Opioidrezeptor-Antagonist) blocken den SIB-1663 **28** induzierten analgetischen Effekt im Tail-Flick-Assay.

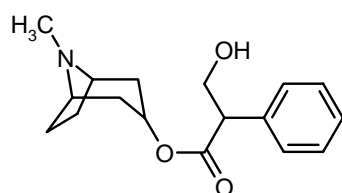
Aufgrund des durch diese Antagonisten nicht aufhebbaren antinozizeptiven Effekts von SIB-1663 **28** wird angenommen, dass diese Substanz ihre Wirkung weder über nAChR, noch über Opioidrezeptoren vermittelt, sondern laut Literatur über eine noch „unbekannte Struktur“^{206,207,210}.



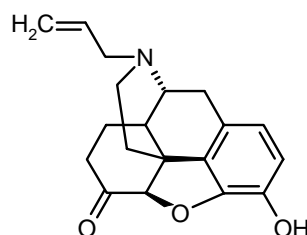
SIB-1663

Abbildung 29: Struktur von SIB-1663 **28** (rot: Nicotin)Dihydro- β -erythroidin (DHbE)

Mecamylamin



Atropin



Naloxon

Abbildung 30: Strukturen der Antagonisten Mecamylamin **8**, Dihydro- β -erythroidin (DHbE) **29**, Atropin **30** und Naloxon **31**

RJR-2403 und TC-2559

Die trans-Metanicotin-Analoga RJR-2403 **20** und TC-2559 **32** (Abbildung 31) sind ringoffene Isomere des Nicotins **1**²¹¹. Obwohl RJR-2403 **20** etwa 6fach geringere Affinität zum $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor besitzt, als das Hauptalkaloid des Tabaks, aktiviert es den Rezeptor mit annähernd gleicher Effizienz^{212,213}. Die Substanz weist eine analgetische Wirkung auf, die durch Mecamylamin **8**, aber nicht durch Muskarin- und Opioid-Antagonisten aufgehoben werden kann^{214,215}. Möglicherweise eignet sich daher das trans-Metanicotin-Analogon zur Schmerztherapie.

Das von der Firma Targacept entwickelte Derivat TC-2559 **32** verfügt, im Vergleich zu ganglionären und peripheren nAChR, über eine hohe Selektivität zu neuronalen Nicotinrezeptoren ($\alpha 4\beta 2$ & $\alpha 7$) (ratio > 4.000). Der K_i -Wert dieser Verbindung am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor liegt bei 5 nM ($[^3\text{H}]\text{Nicotin}$, Rattenthalamus)^{216,217}.

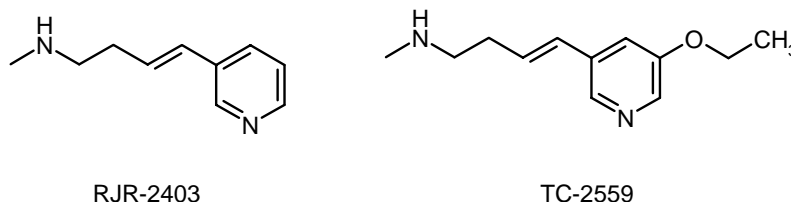


Abbildung 31: Struktur der trans-Metanicotin-Analoga RJR-2403 **20** und TC-2559 **32**

ABT-418

Das von der Abbott-Gruppe entwickelte Isoxazol-Isoster des Nicotins ABT-418 **18** zeigt, im Vergleich zu ganglionären nAChR, funktionelle Selektivität für den $\alpha 4\beta 2$ -Subtyp ($K_i = 4,2$ nM). Weiterhin besitzt diese Substanz anxiolytische Eigenschaften und einen positiven Einfluss auf die Kognition^{218,219,220}. In einem Therapieansatz zur Behandlung von ADHS führte ABT-418 **18** zu einer signifikanten Verbesserung der Symptomatik, jedoch schließen die auftretenden Nebenwirkungen (Schwindelanfälle, Übelkeit, Kopfschmerz, Dysphorie) eine Behandlung von vorwiegend jungen Patienten aus¹⁴⁵.

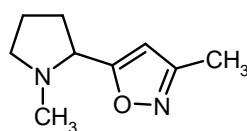


Abbildung 32: Strukturformel von ABT-418 **18**

1.7.5 Pyridylether-Analoga des Nicotins

Die von Nicotin **1** abgeleiteten Pyridylether verfügen über eine Cholin-ähnliche Partialstruktur (Abbildung 33).

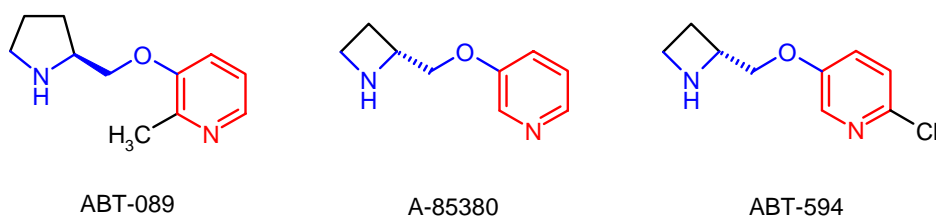


Abbildung 33: Strukturen der Pyridylether ABT-089 **33**, A-85380 **34** und ABT-594 **21** (rot: Nicotin; blau: Acetylcholin)

Das ebenfalls von der Abbott-Gruppe entwickelte Pyridylether ABT-089 **33** zeigte in Radioligand-Bindungsstudien Selektivität zu $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs ($K_i = 16,7$ nM). Dabei lagen die Affinitäten zum Muskeltyp und Subtyp $\alpha 7$ deutlich niedriger ($\alpha 7$: $K_i = 10000$ nM); $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$: $K_i = > 1000$ nM)²²¹. Aufgrund der neuroprotektiven Eigenschaften sowie der Verbesserung der Kognition im Tierversuch wurde die Substanz für präklinische Studien ausgewählt²²².

Der Pyridylether A-85380 **34** wurde als einer der affinsten nAChR-Agonisten identifiziert. Er verfügt bei pikomolarer Affinität über eine hohe Selektivität zum $\alpha 4\beta 2$ nAChR ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 0,05$ nM; $\alpha 7$: $K_i = 148$ nM; $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$: $K_i = 314$ nM)^{223,224}. Damit ist A-85380 **34** deutlich potenter als Nicotin. Es zeigt wie dieses eine Enantioselektivität für das (S)-Isomer²⁰⁷.

Eine 2-Chlor-Substitution von A-85380 **34** führt zu ABT-594 **21**. Dieser Ligand ist durch eine extrem hohe Selektivität zwischen Muskel- und $\alpha 4\beta 2$ -Subtyp gekennzeichnet (ratio > 180000), wobei er eine pikomolare Affinität ($K_i = 37$ pM) zu dem neuronalen Rezeptor aufweist^{175,225}. Der Ether **21** zeigt im Tierversuch eine antinozizeptive Wirkung, die durch den nAChR-Antagonisten Mecamylamin **8** aufhebbar ist. Diese Ergebnisse implizieren, dass der analgetische Effekt der Verbindung über Nicotinrezeptoren vermittelt wird¹⁷³. Die Substanz stellt daher ein viel versprechendes nicht-opioides Analgetikum dar (klinische Prüfung Phase II), die eine ähnliche Affinität zum $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor besitzt wie Epibatidin **15**, jedoch wesentlich weniger toxisch ist¹⁷².

1.7.6 Anabasin, Anabasein und abgeleitete Derivate

Anabasin **35** ist ein Nebenalkaloid des Tabaks, während Anabasein **36** aus einem marinen Wurm bzw. aus einer Ameisen-Art isoliert wurde (Abbildung 34 & Abbildung 35). Die Alkaloide unterscheiden sich lediglich durch eine Doppelbindung im Piperidinring. Sowohl Anabasin **35**, als auch Anabasein **36** verfügen über eine im Vergleich zu Nicotin **1** erhöhte Affinität zum Subtyp $\alpha 4\beta 2$ und über eine verbesserte Wirksamkeit am $\alpha 7$ -Rezeptor (Anabasein **36**: efficacy $EC_{50} = 6,7 \mu\text{M}$; $\alpha 7$: $K_i = 58 \text{ nM}$ Rattenhirn, [^{125}I] α -Bgt). Beide Substanzen wirken am $\alpha 7$ - als volle Agonisten, während sie am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor nur partiell agonistisch wirksam sind (Anabasin **35**: $\alpha 7$ $EC_{50} = 16,8 \mu\text{M}$, $\alpha 4\beta 2$ n.b.; Anabasein **36**: $\alpha 7$ $EC_{50} = 6,7 \mu\text{M}$, $\alpha 4\beta 2$ $EC_{50} = 4,2 \mu\text{M}$; Nicotin **1**: $\alpha 7$ $EC_{50} = 47 \mu\text{M}$, $\alpha 4\beta 2$ $EC_{50} = 14 \mu\text{M}$)²²⁶.

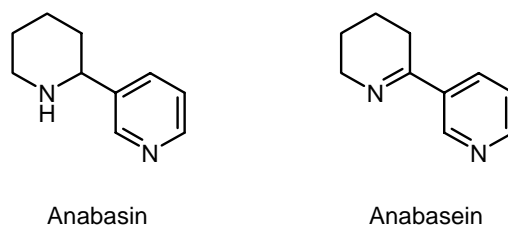


Abbildung 34: Strukturen der Alkaloide Anabasin **35** und Anabasein **36**

Das Alkaloid Anabasein **36** wurde erstmals aus dem Bandwurm *Paranemertes peregrina* isoliert und konnte mittlerweile auch in der nordamerikanischen Ameise *Aphaenogaster rudis* nachgewiesen werden (Abbildung 35)^{227,228,229}.



Abbildung 35: Bandwurm *Paranemertes peregrina*²³⁰ und Ameise *Aphaenogaster rudis*²³¹

Die biologische Funktion des Anabaseins **36** der Ameise ist bekannt. Die Insekten nutzen das Alkaloid als Teil eines Pheromoncocktails zur Wegmarkierung. Anhand dieser Duftspur sind sie in der Lage, ihren Weg zum Nest, zur Beute oder zum Feind

zurückzufinden²²⁶.

Ausgehend vom Anabasein **36** wurde durch Einführung eines 2,4-Dimethoxystyrenrestes das potentielle Alzheimer-Therapeutikum GTS-21 **37** (DMXBA) entwickelt (Abbildung 36). Die Verbindung zeigt nanomolare Affinität zu neuronalen nAChR ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 85 \text{ nM}$ & $\alpha 7$: $K_i = 212 \text{ nM}$)²²⁶. Sowohl GTS-21 **37**, als auch sein Metabolit 4-Hydroxy-GTS-21 **37a** (HMBA) sind potente und selektive Agonisten am $\alpha 7$ -Rezeptor und verfügen über eine neuroprotektive Wirkung^{192,232}. Aus einer Studie an Ratten ging hervor, dass das Anabasein-Derivat zu einer Steigerung der kognitiven Leistungsfähigkeit, und bei chronischer Gabe zu einem positiven Effekt auf das Erinnerungs- und Lernvermögen führt²³³. Daher befindet sich der Anabasein-Abkömmling GTS-21 **37** derzeit in einer klinischen Phase I-Studie zur Therapie von Morbus Alzheimer²³⁴.

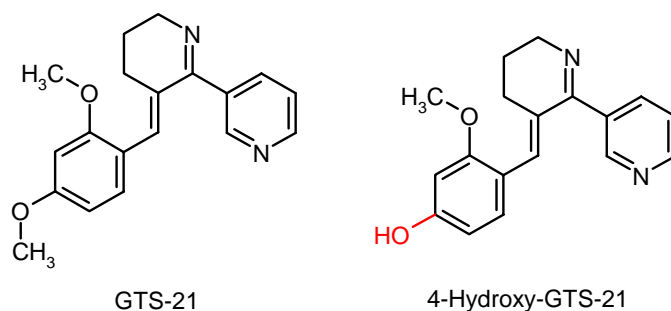


Abbildung 36: Strukturen von GTS-21 **37** und des aktiven Metaboliten 4-Hydroxy-GTS-21 **37a**

1.7.7 Lobelin

Ein weiterer Naturstoff mit hoher Affinität zu nAChR ist das lipophile Alkaloid (-)-Lobelin **38** [α -(-)-Lobelin]. Es wurde aus dem indischen Tabak *Lobelia inflata* (Campanulaceae) isoliert (Abbildung 37). Die Substanz zeigt eine hohe Affinität zum $\alpha 4\beta 2$ -nAChR ($K_i = 1,4 - 2 \text{ nM}$) sowie eine hohe Selektivität für diesen Subtyp ($\alpha 7$: $K_i = 10000 \text{ nM}$). Strukturvariationen der Verbindung haben gezeigt, dass sowohl die beiden Aromaten, als auch die Carbonylfunktion für die Bindung an nAChR notwendig sind^{235,236}.

Trotz der ungewöhnlichen Struktur des Lobelins **38** weist dieser Agonist an nAChR einige Gemeinsamkeiten mit Nicotin **1** auf. Im Tierversuch ist das Alkaloid analgetisch

wirksam, fördert die Selbstapplikation und führt zu einer verminderten Aktivität des Versuchstieres^{235,237}.

Weitere Studien haben gezeigt, dass das Alkaloid als kompetitiver, nicht-selektiver Antagonist an $\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 3\beta 2$ nAChR fungiert und eine Nicotin-induzierte Dopaminfreisetzung sowie eine Bindung von (-)-[³H]Nicotin inhibiert²³⁸. Daher könnte (-)-Lobelin **38** in der Behandlung von Angstzuständen, Lern- und Gedächtnisstörungen sowie bei der Raucherentwöhnung nützlich sein²³⁵.

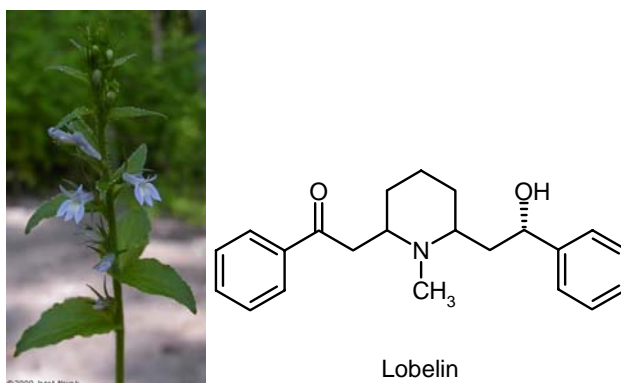


Abbildung 37: Struktur des Piperidinalkaloids Lobelin **38** des indischen Tabaks (*Lobelia inflata*)²³⁹

1.8 Nicotinrezeptor-Liganden mit überbrückten N-Heterozyklen

1.8.1 Epibatidin

Das Alkaloid Epibatidin **15** (Abbildung 38) wurde 1974 erstmals von John Daly aus dem Sekret exokriner Drüsen des Färberfroschs (Baumsteigerfrosch) *Epipedobates tricolor* (*Dendrobatidae*) (Abbildung 39) isoliert. Die Struktur dieses Spurenalkaloides (ca. 1 μ g Epibatidin **15** pro Frosch) konnte allerdings bedingt durch die geringen isolierten Substanzmengen erst 1992 aufgeklärt werden²⁴⁰.

Chemisch stellt das Alkaloid ein 7-Azabicyclo[2.2.1]heptan (Norbornan) dar, das mit einem in Position 6 Chlor-substituierten Pyridin-3-yl-Rest verknüpft ist. Aufgrund des bicyklischen Aufbaus dieser Verbindung gestaltet sich ihre Stereochemie etwas komplexer. Der im Pfeilgiftfrosch vorkommende Naturstoff ist exo-konfiguriert. Es handelt sich also um das Stereoisomer, bei dem der Substituent (Pyridinring) räumlich näher bei der kürzeren Brücke des Azabicyclo[2.2.1]heptan-Grundgerüsts steht (Abbildung 38). Obwohl Epibatidin **15** über drei chirale Kohlenstoffe verfügt (C1, C2

und C4, Abbildung 38), wodurch sich theoretisch acht Stereoisomere ergeben würden ($2^3 = 8$), finden sich jedoch nur vier Stereoisomere für das Alkaloid. Dies liegt daran, dass die Brücke des Bicyklus nur cis-konfiguriert sein kann, womit sich die Anzahl der Stereoisomere auf vier reduziert: ein endo- und ein exo-Enantiomerenpaar²⁴¹. Von diesen vier Isomeren zeigt lediglich das natürlich vorkommende (1R,2R,4S)-(exo)-(-)-Epibatidin **15** (Abbildung 38) eine sehr hohe Affinität zu nAChR. Die endo-konfigurierten epi-Epibatidine sind hingegen deutlich schwächer wirksam²⁰⁷.

Während die Alkaloid-Basen negative spezifische Drehwerte zeigen [(1R,2R,4S)-(exo)-(-)-Epibatidin **15**: -6,7 in CHCl_3], besitzen ihre Salze (Hydrochloride, Hydrogenoxolate) in Methanol positive Drehwerte.

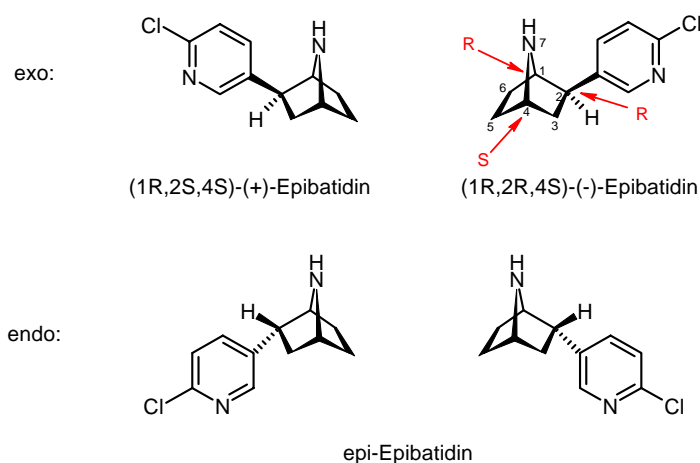


Abbildung 38: Struktur des Epibatidins **15**²⁴¹

Neue Erkenntnisse zeigen, dass der Pfeilgiftfrosch nicht in der Lage ist, dieses Gift selber zu produzieren, sondern das Alkaloid oder seine Ausgangsstoffe über die Nahrung in seinem natürlichen Habitat aufnimmt. Anschließend akkumuliert die Amphibie die Substanz in ihrer Haut, was sie für ihre natürlichen Feinde ungenießbar macht. Somit stellt das Epibatidin **15** einen geeigneten Fraßschutz für den Frosch dar. *Epipedobates* selber scheint gegenüber dem Alkaloid resistent zu sein, allerdings ist der Mechanismus der Unempfindlichkeit noch nicht geklärt^{242,243}.



Abbildung 39: Baumsteigerfrosch *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae)

Epibatidin **15** besitzt bemerkenswerte Eigenschaften. Neben seiner hohen Toxizität für Wirbeltiere, die zu seiner Verwendung als Jagdgift führte, weist das Alkaloid im Hot-Plate-Test eine 200fach stärkere analgetische Wirkung auf als Morphin **29**. Interessant ist, dass ein analgetischer Effekt bereits in Dosen von $0,01 \mu\text{mol/kg}$ erzielt wird, aber die Substanz nur eine geringe Affinität zu Opioidrezeptoren zeigt^{243,244,245}. Aus diesem Grund wurden Epibatidin **15** nach der Entwicklung von Totalsynthesen, die das Alkaloid in größerem Maßstab zugänglich machten, zu einer Leitstruktur für die Entwicklung neuer Schmerzmittel^{246,247,248}. Das Norbornan-Alkaloid eignet sich aufgrund seiner hohen Toxizität und damit verbundenen geringen therapeutischen Breite nicht als Analgetikum²⁴⁹.

Eine Vielzahl von Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass das Alkaloid über die Bindung an nAChR in unterschiedlichen Gehirnregionen Neurotransmitter, z.B. Dopamin im Striatum und Norepinephrin im Thalamus und Hippocampus, freisetzt. Die Substanz wirkt somit agonistisch an nAChR und verfügt dabei über extrem hohe Affinitäten zu verschiedenen Subtypen, wobei sich von einer Prävalenz zu den Subtypen $\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 3\beta 4$ sprechen lässt ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 8 \text{ pM}$; $\alpha 7$: $K_i = 4 \text{ nM}$; $\alpha 3\beta 4$: $K_i = 50 \text{ pM}$; Muskeltyp: 2 nM)^{250,245,251}. Die nachfolgende Entwicklung des tritierten Radioliganden $(\pm)\text{-}[^3\text{H}]\text{Epibatidin}$ erwies sich als sehr nützlich bei der Untersuchung der Verteilung von nAChR in nativen Geweben und heterologen Expressionssystemen^{252,253}.

Mittelweile wurden eine Fülle von Strukturvariationen des Epibatidins **15** hergestellt, um Analoga mit höherer Subtypeselektivität und verringerten Nebenwirkungen zu erhalten¹⁷². Diese strukturellen Veränderungen umfassen einen Austausch des Halogen-Atoms, die Substitution bzw. den bioisosteren Ersatz des Aromaten sowie eine

Ringerweiterung bzw. einen Austausch des Norbornanzyklus.

1.8.2 Cytisin

Cytisin **16** [(7R,9S)-(-)-Cytisin] ist das Hauptalkaloid des Goldregens (*Laburnum anagyroides* med. bzw. *Cytisus laburnum* L., *Fabaceae*), der sich als Zierstrauch in hiesigen Gärten und Parkanlagen großer Beliebtheit erfreut. Sein ursprüngliches, natürliches Verbreitungsgebiet liegt in Süd- und Süd-Ost-Europa.

Cytisin **16** kommt in unterschiedlicher Konzentration in der gesamten Pflanze vor (Blüten 0,2 %, Blätter 0,1-0,4 %; Samen 0,7-1,6 %) ²⁵⁴.

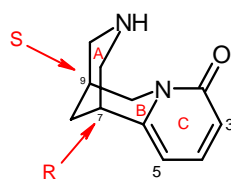
Es wurde ebenfalls in anderen Fabaceen nachgewiesen, von denen die Ginsterarten *Genista germanica* L. (Deutscher Ginster), *Genista tinctoria* (Färber-Ginster) und *Ulex europaeus* L. (Stechginster) die bekanntesten sind.



Abbildung 40: Blüten und Samen des Goldregens (*Cytisus laburnum*, *Fabaceae*) ²⁵⁵

In Bulgarien ist Cytisin **16** unter dem Handelsnamen Tabex[®] zur Entwöhnungstherapie von Rauchern auf dem Arzneimittelmarkt. Eine Tablette enthält 1,5 mg des Chinolizidinalkaloids; die tägliche Dosis wird mit bis zu 9 mg angegeben. Die Gabe von Cytisin **16** zur Raucherentwöhnung stellt eine Alternative zur klassischen Substitutionstherapie mit Nicotin **1** in Form von Pflastern, Kaugummis oder Nasensprays dar.

Chemisch betrachtet ist Cytisin **16** ein chirales Chinolizidinalkaloid, das aus einem trizyklischen Grundgerüst besteht. Die Ringe A und B formen dabei einen Bispidin-Bizyklus, der mit einem Pyridin-2-on-Fragment (Ring C) fusioniert ist (Abbildung 41).



Cytisin

Abbildung 41: Struktur des Chinolizidinalkaloid Cytisin **16**

Cytisin **16** zeichnet sich, im Vergleich zu Nicotin **1**, durch eine höhere Selektivität am $\alpha 4\beta 2$ nAChR aus. Die Substanz fungiert bei einer Affinität von $K_i = 0,122$ nM als partieller Agonist an diesem Rezeptorsubtyp^{250,256}. Die funktionelle Wirksamkeit der Verbindung am Rezeptor ist anscheinend abhängig von der beteiligten β -Untereinheit, was die Bedeutung dieser Untereinheit bei der Vermittlung der agonistischen Wirkung deutlich macht. Am $\alpha 7$ -Rezeptor hingegen interagiert das Chinolizidinalkaloid trotz geringer Potenz als voller Agonist ($EC_{50} = 83$ μ M)²⁵⁷.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben einige nAChR Modulatoren auf der Basis des Cytisin **16** zur möglichen Therapie von akuten und chronischen Schmerzen sowie neurodegenerativen Erkrankungen entwickelt und patentiert. Als potenteste Verbindung erwies sich 3-Bromocytisin, das funktionell 60fach wirksamer am $\alpha 7$ -nAChR war als das native Alkaloid ($EC_{50} = 1,3$ μ M)^{257,258,259,260}.

1.8.3 Ferruginin

Ferruginin **39** [(1R,5S)-(+)-Ferruginin, Abbildung 42] wurde aus der braunen Seideneiche (*Darlingiana ferruginea* J. F. Bailey & *Darlingiana darlingiana* F. Muell, *Proteaceae*), einem in Nordaustralien vorkommenden Baum, isoliert. Das Alkaloid weist ein 8-Azabicyclo[3.2.1]octen Grundgerüst auf und stellt ein agonistisches Neurotoxin am $\alpha 4\beta 2$ -nAChR dar^{261,262}. Gündisch et al. konnten zeigen, dass sowohl Ferruginin **39**, als auch sein N-demethyliertes Analogon im Vergleich zu Nicotin **1** eine ca. 100fach geringere Affinität zum $\alpha 4\beta 2$ -Subtyp der nAChR besitzen. Ferner konnten sie nachweisen, dass sich das nicht natürlich vorkommende (-)-Ferruginin-Enantiomer zur Entwicklung neuer potenter Diazin-haltiger Liganden an diesen Rezeptoren eignet²⁶³.

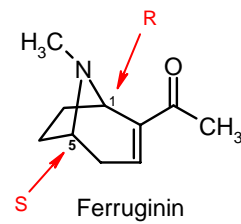


Abbildung 42: Struktur des bicyclischen Alkaloides Ferruginin 39



Abbildung 43: *Darlingiana ferruginea* (Proteaceae)²⁶⁴

1.8.4 Anatoxin-a

Anatoxin-a **40** [(1R,6S)-(+)-Anatoxin-a] ist ein natürlich vorkommendes Alkaloid, das zunächst unter der Bezeichnung „very fast death factor (VFDF)“ beschrieben wurde. Isoliert wurde die Substanz aus dem Süßwasser-Cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* (Blaualge, Abbildung 44)²⁶⁵.

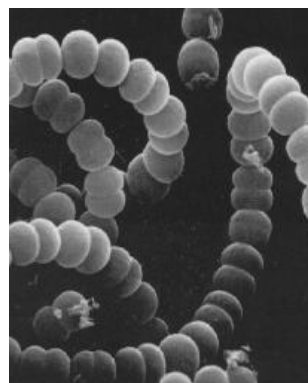
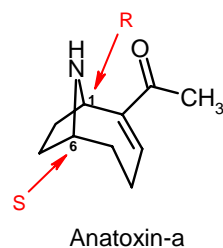
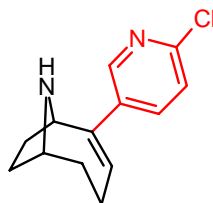


Abbildung 44: Anatoxin-a **40** aus der Süßwasseralge *Anabaena flos-aquae*

Die Verbindung ist in verschiedenen Assays an muskulären, peripheren und zentralen Nicotinrezeptoren etwa 10-50fach stärker wirksam als Nicotin **1**. Es finden sich in der

Literatur allerdings unterschiedliche K_i -Werte für die Substanz an den diversen Subtypen^{266,267}, wobei Brunelle et al. eine subnanomolare Affinität für Anatoxin-a **40** am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor angeben²⁰⁷. Das natürliche rechtsdrehende Enantiomer wird in Abhängigkeit des betrachteten Rezeptors als 200 bis 1000fach stärker wirksam als sein Antipode beschrieben²⁶⁷.

Wright et al. entwickelten aus dem Azabicyclononen-Bizyklus des Anatoxin-a **40** und dem Chloropyridyl-Rest des Epibatidin **15** das Hybridmolekül UB-165 **41** (Abbildung 45)²⁶⁸. Das partiell agonistisch wirksame Hybridmolekül verfügt über Affinität zu $\alpha 7$ -, $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptoren, wobei diese jeweils zwischen den Werten der Ausgangsmoleküle liegt ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 0,04$ nM; $\alpha 7$: $K_i = 12$ nM; $\alpha 3\beta 4$: $K_i = 1,3$ nM)^{269,270}.



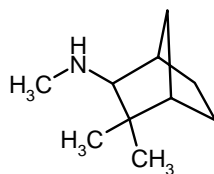
UB-165

Abbildung 45: Struktur des Hybridmoleküls UB-165 **41** aus dem Azabicyclononen-Bizyklus des Anatoxin-a **40** (schwarz) und dem Chloropyridyl-Rest des Epibatidins **15** (rot)

1.8.5 Mecamylamin

Mecamylamin **8** (Abbildung 46) wurde 1956 von der Firma Merck als Bluthochdruckmittel lanciert (Inversene[®]), jedoch 1977 aufgrund von Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen²⁷¹. Im Jahre 2000 erhielt die Firma Layton BioScience Inc. von der FDA die Genehmigung zum Vertrieb der Substanz als Therapeutikum für das Tourette-Syndrom²⁷². Mittlerweile wird das an nAChR antagonistisch wirkende Amin **8** von der Firma Targacept wieder zur Behandlung der essentiellen Hypertonie vermarktet²⁷³. Anfang 2004 berichtete der Online-Dienst der Fachzeitschrift *Nature*, dass Wissenschaftler der Duke University in Durham, North Carolina (USA) eine klinische Studie mit Mecamylamin-Pflaster starten wollen. Sie vermuten, dass durch die Gabe dieses „open channel“ Blockers eine Verringerung des Alkoholgenusses von Patienten erreicht werden kann. Diese Theorie wurde kürzlich von Young et al.

bestätigt. Sie berichteten, dass der Nikotinkanalblocker Mecamylamin **8** in einer klinischen Studie der Universität Chicago deutlich das Bedürfnis der Testpersonen nach Alkohol senkte²⁷⁴.



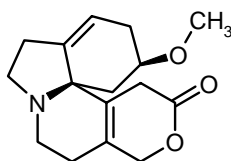
Mecamylamin

Abbildung 46: Strukturformel des nicht-kompetitiven Antagonisten Mecamylamin **8**

1.9 Weitere Nicotinrezeptor-Liganden

1.9.1 Dihydro- β -erythroidin (DH β E)

Dihydro- β -erythroidin **29** (Abbildung 47) ist ein Erythrina-Alkaloid, das aus den Samen von Erythrina Subspezies (Korallenbäume, Fabaceae) isoliert wurde²⁷⁵. Die Verbindung findet weite Anwendung in In-vitro- Studien als klassischer kompetitiver, nicht-selektiver Antagonist an neuronalen Nicotinrezeptoren²⁷⁶. DH β E **29** besitzt nanomolare Affinität zu $\alpha 4\beta 2$ ($K_i = 35$ nM) und $\alpha 3\beta 2$ -Rezeptoren, jedoch interagiert die Substanz kaum mit dem ganglionären und dem muskulären Subtyp ($K_i = > 11000$ nM)^{26,276}.



Dihydro- β -erythroidin (DH β E)

Abbildung 47: Struktur des kompetitiven Antagonisten Dihydro- β -erythroidin **29**

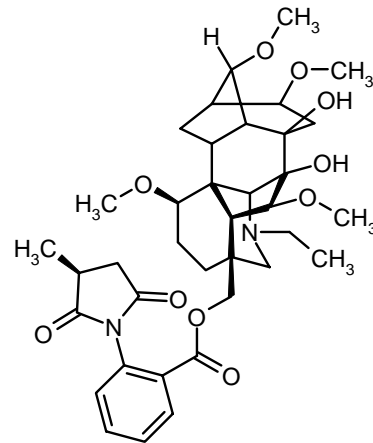


Abbildung 48: Korallenbäume *Erythrina sandwicensis* und *Erythrina variegata* (Fabaceae)²⁷⁷

1.9.2 Methyllaconitin (MLA)

Methyllaconitin **14** (MLA) wurde 1938 erstmals von Manske et al. aus der kanadischen Ritterspornart *Delphinium brownii*, Fabaceae isoliert²⁷⁸. Goodson et al. konnten 5 Jahre später die Struktur des Alkaloides aufklären²⁷⁹. Nachfolgend wurde festgestellt, dass Methyllaconitin **14** auch in diversen anderen Rittersporn-Arten (*Delphinium ssp.*, Fabaceae) vorkommt²⁸⁰.

Aufgrund seiner relativen Selektivität zum $\alpha 7$ -Subtyp der nAChR ($K_i = 1$ nM) ist Methyllaconitin **14** (MLA) (Abbildung 49) ein wichtiger kompetitiver Antagonist zur Untersuchung von Nicotinrezeptoren²⁸¹. Die Substanz ist, im Vergleich mit dem $\alpha 7$ -Rezeptor, etwa 30fach schwächer wirksam an den Subtypen $\alpha 3\beta 4$ und $\alpha 4\beta 2$. Außerdem zeigt sie keine Aktivität am Muskelsubtyp²⁸². Somit lassen sich durch die Verwendung der Substanz α -Bgt-sensitive Bindungsstellen weiter unterscheiden, da der Naturstoff im Gegensatz zum dem Schlangengift α -Bungarotoxin **4** keine Affinität zum Muskelsubtyp der nAChR zeigt²⁸³. Durch die schnelle Assoziations- und Dissoziationskinetik von [³H]MLA stellt die Verbindung eine echte Alternative zum „kinetisch“ langsamen [¹²⁵I] α -Bgt bei der Markierung von $\alpha 7$ -Rezeptoren dar. Nachteilig wirkt sich jedoch die Interaktion des Norditerpenoid-Alkaloids mit $\alpha 3$ - und $\alpha 6$ - enthaltenden nAChR ab einer Konzentration von ca. 100 nM ($\alpha 3\beta 2$: $K_i = 33$ nM) aus²⁸⁴.



Methyllycaconitin

Abbildung 49: Struktur des Norditerpenoid-Alkaloids Methyllycaconitin **14**Abbildung 50: Großer Larkspur (*Delphinium barbeyi*, Fabaceae) und Narrenkappen (duncecap!) Larkspur (*Delphinium occidentale*, Fabaceae) ²⁸⁵

1.10 Peptid-Liganden

1.10.1 α -Bungarotoxin

Das Neurotoxin α -Bungarotoxin **4** stammt aus dem Gift des Vielbindenbungars (Bungarus multicinctus, Abbildung 51). Diese auch als Krait bezeichnete, aus der Familie der Giftnattern (*Elapidae*) stammende, nachtaktive Schlange ist über ganz Asien verbreitet. Das etwa 1m lange Reptil ist vornehmlich in lichten Wäldern, buschigem Gelände und Reisfeldern zu finden. Die Natter gilt jedoch aufgrund ihres Beuteschemas (Nagetiere) als ausgesprochener Kulturfolger²⁴².

Das Gift des Kraits besteht hauptsächlich aus drei verschiedenen basischen Proteinen

mit einer Masse von 6-8 kDa. Neben dem α -Bungarotoxin **4** finden sich im Gift der Schlange das β -Bungarotoxin, eine Phospholipase A_2 und das χ -Bungarotoxin, ein Neurotoxin mit Prävalenz zu neuronalen und ganglionären Subtypen der nAChR²⁸⁶. Das α -Bungarotoxin **4** ist aus 75 Aminosäuren zusammengesetzt und verfügt über fünf Disulfidbrücken. Es gehört somit zu den langkettigen Neurotoxinen (kurzkettige Neurotoxine: 60-62 Aminosäuren).

An Nicotinrezeptoren zeigt dieses Toxin hohe Affinität und Selektivität für den $\alpha 7$ - und den Muskel-Subtyp ($K_i = 0,35 - 3,5 \text{ nM}$)^{287,288}. Neben diesen interagiert α -Bungarotoxin **4** mit dem Subtyp $\alpha 8$, der nur in Vögeln vorkommt, und mit dem Subtyp $\alpha 9$ der kochlearen Haarzellen. Zu allen anderen neuronalen nAChR, die aus den Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 4$ and $\beta 2$ - $\beta 4$ zusammengesetzt sind, besitzt das Neurotoxin keine Affinität⁴². Die Entwicklung des Radioliganden [¹²⁵I] α -Bgt, der über einen K_D -Wert von 1 nM am $\alpha 7$ -Rezeptor verfügt, war von großer Bedeutung bei der Untersuchung der Nicotinrezeptor-Verteilung im ZNS und PNS²⁸⁷.



Abbildung 51: Vielbindenbungar (*Bungarus multicinctus*, Elapidae)

1.10.2 α -Conotoxine

Conotoxine sind Peptide aus Kegelschnecken (Conidae), die mit über 600 bekannten Arten in allen Weltmeeren vorkommen. Die Schnecken verfügen über einen ausgefallenen Giftapparat, der aus der Giftblase, der Giftdrüse und dem Giftzähnen zusammensetzt (Abbildung 52)²⁸⁹.

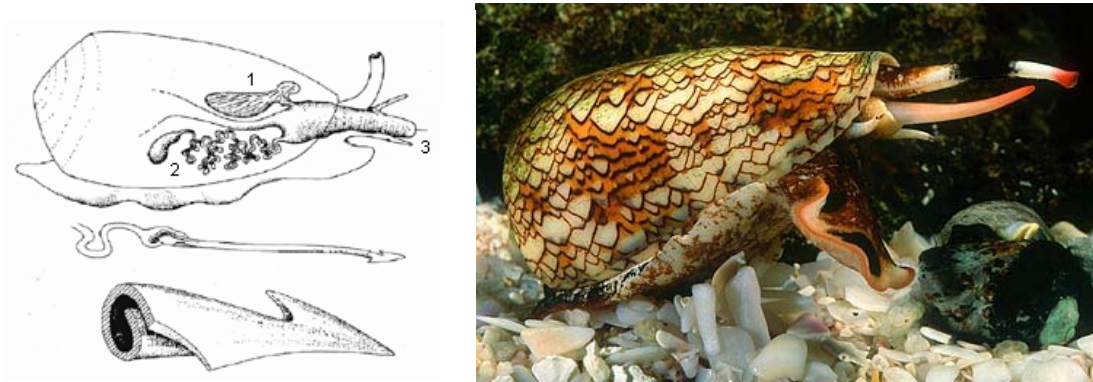


Abbildung 52: Kegelschnecke *Conus textile*²⁴²
 links: Giftapparat der Kegelschnecken
 oben: Radulartasche 1; Giftdrüse 2, Proboscis 3
 Mitte: Radular mit einem Giftzahn
 Unten: Giftzahn in Detailansicht

Die harpunenartigen Giftzähnen sind modifizierte Produkte der Schneckenzunge und dienen der Giftapplikation sowie dem Festhalten der Beute. Die Conidae werden anhand ihres Beuteschemas (Würmer, Schnecken und Fische) in drei Gruppen unterteilt, wobei ein Biss/Stich der Fisch-jagenden Arten sogar für den Menschen gefährlich werden kann²⁹⁰. Aufgrund der evolutionären Nischenbesetzung haben die Kegelschnecken eine Reihe von Neurotoxinen aus 10 bis 30 Aminosäuren zum Beuteerwerb und zur Verteidigung entwickelt. Das Gift jeder einzelnen Conidae setzt sich aus einer Vielzahl von Bestandteilen zusammen, wobei diese individuell auf die Beute der Schnecke abgestimmt sind. Man schätzt, dass die Gifte aller Kegelschnecken insgesamt zwischen 50000-100000 verschiedene Substanzen enthalten. Eine systematische Einteilung dieser Giftbestandteile wurde erstmals von B.M. Olivera & J.M. Mc Intosh vorgenommen, die die Verbindungen in Conopeptide (Substanzen ohne Disulfidbrücken-Gerüst) und Conotoxine (Substanzen mit Disulfidbrücken-Gerüst) einteilten^{290,291}.

Das eigentliche Conotoxin entsteht durch proteolytische Spaltung eines Vorläuferpeptids (60-90 Aminosäuren) und anschließender post-translationaler Modifikation (Disulfidbrücken, Epimerisierung, Aminierung). Charakteristisch für alle Conotoxine sind eine kleine, kompakte und definierte 3D-Struktur bedingt durch die Disulfidbrücken, Sekundärstrukturen wie α - und 3_{10} -Helices, β -Turns und β -Faltblattstrukturen sowie relativ konservierte loop-Größen bei den Conotoxinen mit gleicher Zielstruktur. Die räumliche Gestalt ist essentiell für die Rezeptorerkennung. Hingegen sind die Primärstruktur sowie die Größe der Loops und die hydrophilen oder

hydrophoben Eigenschaften des Toxins entscheidend für die hohe Subtypselektivität der Conotoxine innerhalb der Rezeptorfamilien (Natrium-, Kalium-, und Calciumkanäle)²⁹⁰.

Olivera et al. haben für die Bindung des Neurotoxins an den Rezeptor einen speziellen Mechanismus postuliert, der als „lock & dock ligand mechanism“ bezeichnet wird. Demzufolge verfügen die α -Conotoxine über zwei bestimmte Erkennungs-Oberflächen (docking und locking faces), die mit komplementären Erkennungs-Oberflächen des Ligand-gesteuerten Ionenkanals interagieren. Bei Kontakt der „docking site“ mit dem Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb des Peptid-Liganden, die die Zuführung der „locking site“ zum passenden Gegenstück des Rezeptor ermöglicht²⁹².

Aus allen heute bekannten Conus-Spezies wurde mindestens ein Antagonist an nAChR isoliert, dessen neuromuskulärer Block durch Acetylcholinesterase-Inhibitoren aufhebbar ist. Solche antagonistischen Peptide lassen sich in α -, αA - und ψ -Conotoxine einteilen; die α -Conotoxine unterteilt man nochmals anhand der Position der intramolekularen Disulfidbrücken in die Subfamilien $\alpha 3/5$ und $\alpha 4/7$.

So weisen zum Beispiel α -Conotoxine aus der Subfamilie $\alpha 3/5$ hohe Affinität zum Muskeltyp $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$, speziell zur Acetylcholin-Bindungsstelle α/δ , und nur sehr geringe Affinität zu neuronalen nAChRs auf. Die Vertreter der Subfamilie $\alpha 4/7$ hingegen zeigen ein genau umgekehrtes Bindungsverhalten. Die extreme Selektivität der α -Conotoxine zu einzelnen Subtypen der nAChR ist sehr bemerkenswert. Sie divergiert mit der Schneckenart, aus der die Peptide isoliert wurden, jedoch finden sich auch innerhalb einiger Kegelschnecken-Arten Neurotoxine mit unterschiedlicher Rezeptorprävalenz. Die Tabelle 1.10-1 gibt einen kurzen Überblick über die Verschiedenheit der Subtypselektivität diverser α -Conotoxine²⁹⁰.

Tabelle 1.10-1: Subtypselektivität von α -Conotoxin-Antagonisten aus der Subfamilie α 4/7²⁹⁰

Conotoxin	Spezies	nAChR
α -ImI	<i>C. imperialis</i>	$\alpha 7$
α -MII	<i>C. magus</i>	$\alpha 3\beta 2$
α -AuIA	<i>C. aulicus</i>	$\alpha 3\beta 4$
α -AuIB	<i>C. aulicus</i>	$\alpha 3\beta 4$ (Ratte)
α -AuIC	<i>C. aulicus</i>	$\alpha 3\beta 4$
α -PnIA	<i>C. pennaceus</i>	$\alpha 3\beta 2$
α -PnIB	<i>C. pennaceus</i>	$\alpha 7$
α -EpI	<i>C. episcopatus</i>	neuronale nAChR

Aufgrund der Selektivität der Conotoxine sind sie nicht nur als Werkzeuge zur Erforschung der nAChR wichtig, sondern stellen auch potentielle Arzneistoffe zur Therapie verschiedener Krankheiten dar. In den USA sind ca. 50 Patente zur Anwendung von Conotoxinen u.A. als Lokalanästhetika, Analgetika und Antiepileptika registriert. Einige dieser Verbindungen befinden sich bereits in der klinischen Prüfung²⁹⁰.

Durch ihre schlechte Wasserlöslichkeit, geringe Stabilität und Permeabilität eignen sich die Toxine nur zur parenteralen Applikation bzw. zur Darreichung über implantierfähige, osmotisch wirksame Pumpsysteme. Ein Beispiel für ein solches Conotoxin ist der Wirkstoff Ziconotide, ein synthetisches Conotoxin-Analogon, das etwa 10.000fach stärker analgetisch wirksam ist als Morphin. Ziconotide (Prialt®) wurde kürzlich von der FDA als Analgetikum zur intrathekalen Therapie starker Schmerzen und Ischämien von Krebs- und Aids-Patienten zugelassen.

1.11 Pharmakophor-Modelle für Nicotinrezeptoren

Trotz mangelnder Kenntnisse über die Bindungsstellen der Nicotinrezeptoren, der geringen Anzahl Subtyp-selektiver Liganden und dem Auftreten verschiedener Rezeptorzustände sind seit 1970 verschiedene Pharmakophor-Modelle für nicotinische Acetylcholinrezeptoren entwickelt worden. Diese beziehen sich entweder auf alle Subtypen oder auf die $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren. Deshalb soll an dieser Stelle betont werden, dass die nachfolgend aufgeführten Modelle für den $\alpha 4\beta 2$ -Subtyp gelten, auch wenn im Laufe der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit anderen Subtypen auf sie verwiesen wird. Des Weiteren stellen alle Pharmakophor-Modelle lediglich viel versprechende Ansätze dar, die bei weitem nicht alle aus Bindungsstudien und anderen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse erklären können.

Das erste Modell eines Pharmakophors beruht auf dem Vergleich von vier Liganden und wurde von Beer und Reich entwickelt²⁹³. Sie beschrieben nur zwei essentielle Pharmakophor-Elemente: ein kationisches Stickstoffatom (N^+ , Onium-Gruppe) und ein zur Wasserstoffbrückenbindung befähigtes Element (HBA, hydrogen bond acceptor) (Abbildung 53), deren Abstand etwa 5,9 Å beträgt.

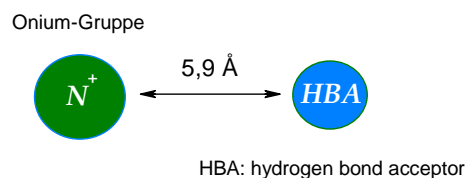


Abbildung 53: Pharmakophor-Modell für den $\alpha 4\beta 2$ -nAChR nach Beer und Reich²⁹³

Sheridan et al. erweiterten 1986 dieses erste Modell um ein π -Elektronensystem (C), aus einem Arylzentrum (heteroaromatischer Ring) oder einem Carbonyl-Kohlenstoffatom bestehen kann²⁹⁴ (Abbildung 54). Ferner wurde ein imaginärer Punkt im Molekül („dummy atom“) definiert, der die Richtung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem π -Elektronensystem und dem Rezeptorprotein beschreibt.

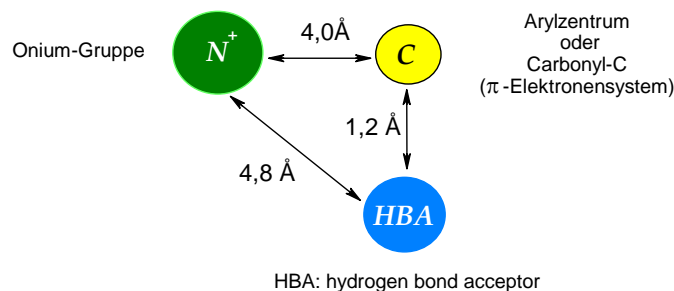


Abbildung 54: Pharmakophor-Modell nach Sheridan^{294,295}

Als ideale Distanz zwischen den Pharmakophor-Elementen postulierte die Arbeitsgruppe $4,8 \text{ \AA}$ für den Abstand zwischen N^+ und HBA; $4,0 \text{ \AA}$ zwischen N^+ und C sowie $1,2 \text{ \AA}$ zwischen C und HBA. Diese Angaben sind bis heute Gegenstand kontroverser Diskussionen, da selbst für bekannte Substanzen wie Epibatidin **15** je nach verwendeter Methode unterschiedliche Werte für die Abstände zwischen den jeweiligen Punkten N^+ , HBA und C ermittelt wurden (N-N Abstände von $4,4 - 5,7 \text{ \AA}$)²⁹⁵.

Holladay et al. bauten am Beispiel des Nicotins **1** das 3-Punkt-Modell von Sheridan zu einem 4-Punkt-Modell, das sich erstmals auf einen einzelnen nAChR-Subtyp ($\alpha 4\beta 2$) bezieht, aus²⁹⁶. Sie vermuteten, dass die beiden Stickstoffatome (1) und (2) (Abbildung 55), die als Pharmakophor-Elemente betrachtet werden können, mit zwei korrespondierenden Punkten (3) und (4) des nAChR-Proteins interagieren. Der optimale Abstand zwischen den Stickstoffatomen des Nicotins **1** soll dabei etwa $4,85 \text{ \AA}$ betragen.

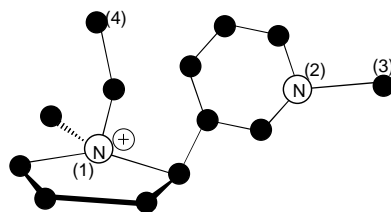


Abbildung 55: Pharmakophor-Modell nach Holladay²⁹⁶

Ein von Olesen et al. postuliertes und von Tønder et al. modifiziertes Vektormodell besagt, dass nicht der Abstand zwischen den Pharmakophor-Elementen entscheidend für die Bindung an dem Rezeptor ist, sondern die Distanz zwischen den Pharmakophor-Elementen N^+ und HBA zu korrespondierenden „site points“ a und b des Rezeptors. Diese Distanz soll etwa $2,9 \text{ \AA}$ betragen. Als optimaler Abstand der „site points“ wurde

7,3 bis 8 Å vorgeschlagen^{297,298,299}. Die Arbeitsgruppe postulierte außerdem einen Abstand des π -Elektronensystem (C) zum „site point“ A von 6,5 bis 7,4 Å, wobei sich zwischen den Achsen „site points“ A und B sowie „site point“ A und Element C ein Winkel von 30° ergibt (Abbildung 56).

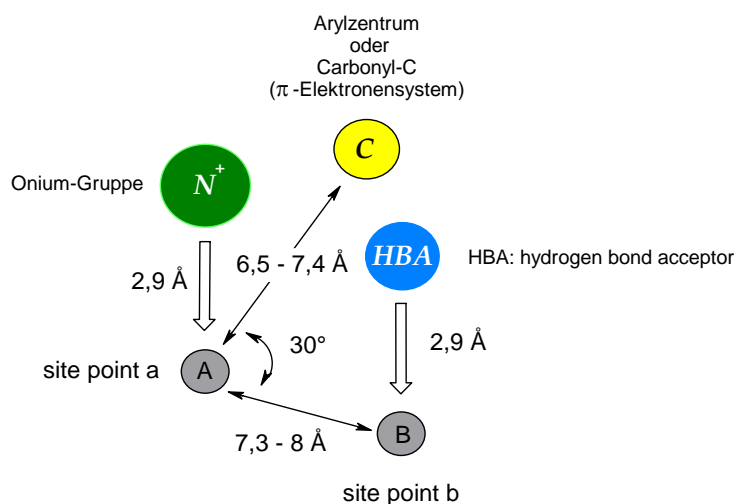


Abbildung 56: Pharmakophor-Modell nach Tønder^{299,303}

Die entwickelten Pharmakophor-Modelle sind nicht in der Lage, alle Effekte von Liganden an Nicotinrezeptoren hinreichend zu erklären. So gehen zum Beispiel parallele Veränderungen der Substitution des Arylrings von Nicotin **1** und Epibatidin **15** mit einer Parallelverschiebung der Affinität beider Substanzen zu nAChR einher³⁰⁰. Gleiches gilt auch für Aminomethylpyridin-Analoga (AMP) des Nicotins **1** (Abbildung 57)³⁰¹. Dies ist jedoch nicht der Fall bei Aminoethoxypyridin-Derivaten (AEOP) (Abbildung 57), obwohl diese wie Nicotin **1** und AMPs konform mit dem Vektor-Pharmakophor-Modell nach Tønder sind. Dies weist darauf hin, dass AEOPs auf einer anderen Art und Weise als Nicotin **1** und Epibatidin **15** an nAChR binden³⁰² bzw. mit den „site points“ (Abbildung 56) auf einer anderen Ebene interagieren.

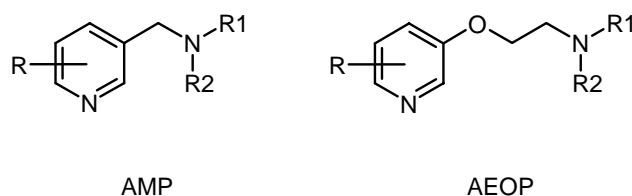


Abbildung 57: Grundstrukturen der AMP- und AEOP-Analoga des Nicotins **1**

Ein weiteres Hauptproblem der Modelle ist, dass die verschiedenen

Konformationszustände des Rezeptors (Abbildung 18) nicht in Betracht gezogen werden³⁰³. Ferner wird auch der mögliche Einfluss von Wassermolekülen nicht berücksichtigt, die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen dem Ligand und dem Rezeptor vermitteln können²⁹⁵.

2 Zielsetzung der Arbeit

Im Laufe der letzten Jahre hat das Interesse an neuronalen Nicotinrezeptoren stark zugenommen, da diese an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen des ZNS beteiligt sind, die im Zusammenhang mit Kognition und Lernen stehen^{304,305,306}. Des Weiteren existieren verschiedene nAChR-Subtypen in den peripheren Neuronen der autonomen und sensorischen Ganglien. Ferner finden sich Nicotinrezeptoren auch in anderen Geweben und Zelltypen, z.B. Lymphozyten, Fibroblasten, Makrophagen, Keratinozyten, Spermatozoon, neuroendokrine Zellen der Lunge, in der Plazenta und in einigen Sinnesorganen^{85,307,308}. Dabei ist die physiologische Bedeutung der nAChR in vielen Fällen unklar.

Die Suche und Herstellung von Nicotinrezeptor-Liganden war in der Vergangenheit zumeist auf den $\alpha 4\beta 2$ -Subtyp, dem am häufigsten im ZNS vorkommenden Subtyp, fokussiert. Mittlerweile wächst aber das Interesse an der Entwicklung von Liganden für $\alpha 7$ - und $\alpha 3$ -enthaltene Subtypen, da diese nicht nur im zentralen Nervensystem vorkommen, sondern zusätzlich in verschiedene Krankheitsprozesse des PNS involviert sind.

Kürzlich wurde Cholin **22**, der Precursor und Metabolit des ACh **2**, trotz geringer Affinität ($K_i = 2.380 \mu\text{M}$) zum $\alpha 7$ -Rezeptor als selektiver Aktivator dieses Subtyps beschrieben¹⁹⁵. Obwohl Acetylcholin **2** und Cholin **22** in der Vergangenheit nur wenig Interesse als Leitstrukturen geweckt haben, findet sich die Cholin-Teilstruktur in einer ganzen Reihe von Verbindungen mit vielseitigen pharmakologischen Effekten. Zu diesen Verbindungen zählen z.B. die Arzneistoffe Diphenhydramin und Nefopam, die antihistaminische und analgetische Eigenschaften besitzen. Das Cholin-Motiv findet sich aber auch in einigen Arylether-Analogen wie dem Phenylcholinether **42**, der als Inhibitor der Aminoxidase beschrieben wurden und antibakteriell, germizid und senkend auf die Cholesterinkonzentration wirkt^{309,310,311}.

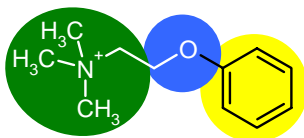
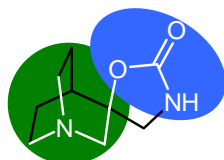


Abbildung 58: Struktur des Arylether-Analogen Phenylcholinether **42**

Die Erweiterung des Cholins **22** um eine Amidfunktion zum Carbamat führt zu dem Parasympatholytikum Carbachol **23**. Die N-methylierten Analoga MCC **24** und DMCC **25** dieser Verbindung wurden hingegen als Agonisten der nAChR beschrieben^{312,313}. Carbamate und besonders Phenylcarbamate sind als Verbindungen mit einem breiten pharmakologischen Spektrum bekannt. Sie interagieren mit Muscarin- und 5-HT₃-Rezeptoren^{314,315}, zeigen lokalanästhetische^{316,317}, spasmolytische³¹⁸ und analgetische Eigenschaften³¹⁹ und wurden kürzlich als selektive $\alpha 7$ -nAChR-Liganden beschrieben^{320,321}.



AR-R17779

Abbildung 59: Struktur des selektiven $\alpha 7$ -nAChR-Liganden AR-R17779 **43**

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst, ausgehend von dem Phenylcholinether **42**, einige bekannte und neuartige Phenylcarbamate hergestellt und mittels Radioligand-Bindungsstudien an verschiedenen nAChR-Subtypen evaluiert werden (Abbildung 60).

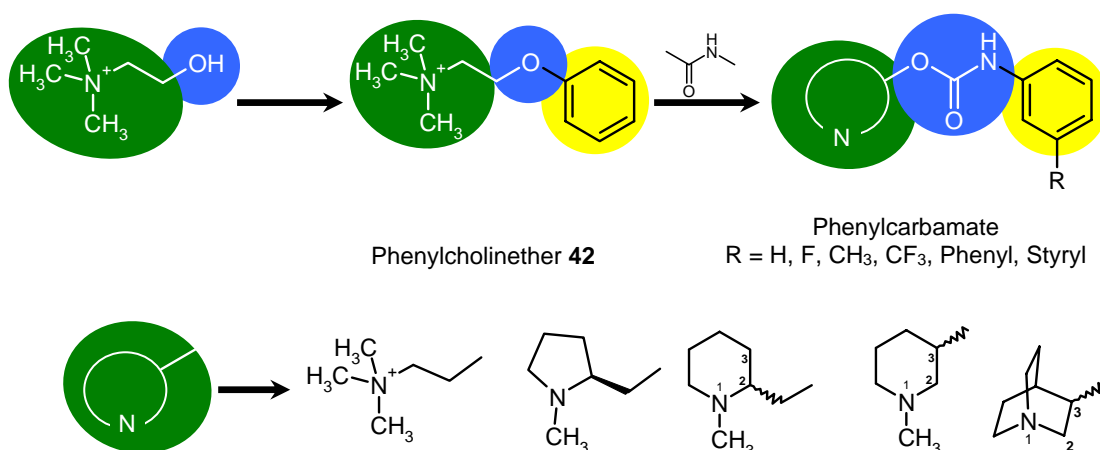


Abbildung 60: Strukturvariationen von Phenylcholinether **42** abgeleiteter Phenylcarbamate

Um weitere Einblicke in die strukturellen Erfordernisse für Nicotinrezeptoren zu erhalten, sollten nachfolgend Verbindungen hergestellt werden, in denen die Trimethylammonium-Teilstruktur der Ausgangsverbindung **42** in einen basischen Heterozyklus integriert wurde (Abbildung 60). Durch die Substitution des Phenylrings dieser Carbamate sollten ferner die Auswirkungen verschiedener Reste (H, F, Br, CH₃, CF₃, Phenyl-, Styryl-) auf die Affinität und Subtypselektivität untersucht werden.

Da sich anhand der Radioligand-Bindungsdaten keine Aussagen über die funktionellen Eigenschaften einer Verbindung treffen lassen, sollten letztere während eines sechsmonatigen Auslandsaufenthaltes am „Department of Molecular and Pharmacological Neuroscience“ der Universität Hiroshima (Japan) mittels Patch-Clamp-Experimenten untersucht werden. Der Schwerpunkt dieser Experimente sollte dabei auf einem funktionellen Screening möglichst vieler Substanzen an $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 7$ -Rezeptoren liegen. Aufgrund der Vielzahl der in Japan vorgesehenen Projekte war aus Zeitgründen eine detaillierte Charakterisierung einzelner Substanzen nicht vorgesehen. Neben der Untersuchung der synthetisierten Carbamate mittels Patch-Clamp-Experimenten war im Rahmen dieses Projektes auch die Herstellung einer den $\alpha 7$ -Rezeptor exprimierenden Zelllinie geplant. Dies sollte durch Transfektion des Rezeptorgens mittels Lipofektion oder Elektroporation in PC-12- und SH-SY5Y-Zellen erreicht werden.

In einem weiteren Projekt im Rahmen des Forschungsaufenthaltes sollte versucht werden, eine fluorimetrische Messung der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration in Mäusemakrophagen als Methode zur Evaluation von selektiven nAChR-Liganden zu etablieren. Dies sollte in Kooperation mit dem Arbeitskreis um Dr. I. Hide (Department of Pharmacology, Graduated School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Japan) vorgenommen werden.

Wie bereits erwähnt, interagieren Carbamate und besonders Phenylcarbamate nicht nur mit nAChR, sondern auch mit diversen anderen Targets. So zum Beispiel mit dem 5-HT_{3A}-Rezeptor, der als Ligand-gesteuerter Ionenkanal große Ähnlichkeit mit dem $\alpha 7$ -nAChR besitzt^{11,315}. Aufgrund dieser Verwandtschaft sowie der nachweislichen Affinität verschiedener Liganden zu beiden Rezeptoren³²², sollten die hergestellten Carbamate ebenfalls am 5-HT_{3A}-Rezeptor untersucht werden. Dies geschah in

Kooperation mit dem Arbeitskreis um Prof. H. Bönisch (Diplomarbeit von Herrn Mesfin Seleshi, Institut für Pharmakologie & Toxikologie, medizinische Fakultät, Universität Bonn).

Eine weitere Zielstruktur, mit der verschiedene Carbamate interagieren, ist das Enzym Acetylcholinesterase (AChE). In den letzten Jahren sind eine ganze Reihe von potenten Acetylcholinesterase-Hemmstoffen aus der Gruppe der Carbamidsäureester zur Behandlung von Morbus Alzheimer entwickelt worden (z.B. Rivastigmin **17**). Aus diesem Grund sollten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Carbamate von Herrn Markus Pietsch und Frau Camino Gonzalez aus dem Arbeitskreis um Prof. Dr. M. Gütschow (Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn) in einem AChE-Inhibitionsassay untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung neuer Carbamate als subtypselektive Liganden an nAChR

3.1.1 Bedeutung von Cholinethern

Wie schon in der Einleitung (1.7.1 Acetylcholin und Cholin) erwähnt, ist Acetylcholin **2** einer der wichtigsten Neurotransmitter des zentralen und vegetativen Nervensystems. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Acetylcholin **2** und seines Precursors und Metaboliten Cholin **22** (siehe Abbildung 61) sowie ihrer vielseitigen Interaktionen mit unterschiedlichen körpereigenen Strukturen (mAChR, nAChR, AChE, ChE), eignen sich beide biogenen Amine besonders als Leitstruktur zur Arzneimittelentwicklung. Seit der Entdeckung des Acetylcholins **2** als Botenstoff durch Otto Loewi (1921) -für die der Forscher zusammen mit Henry Dale 1936 den Nobelpreis für Medizin erhielt-, wurden unzählige Substanzen mit Cholin- oder Acetylcholin-Partialstruktur entwickelt. Einige dieser Verbindungen, die über die unterschiedlichsten Wirkungsmechanismen verfügen, sind bis heute wichtige Arzneistoffe in der Therapie verschiedenster Krankheiten. So zum Beispiel das depolarisierende Muskelrelaxans Suxamethonium **44** (Lysthenon[®], Pantolax[®]), das ein dimerisiertes Acetylcholin **2** darstellt (siehe Abbildung 61). Ein weiteres Beispiel ist das direkte Parasympathomimetikum Carbachol **23** (Carbamann[®], Doryl[®]). Eingesetzt wird der Carbamidsäureester des Cholins **22** (siehe 3.2.1 Bedeutung von Carbamaten) zur Behandlung der Darm- und Blasenatonie sowie des Glaukoms¹.

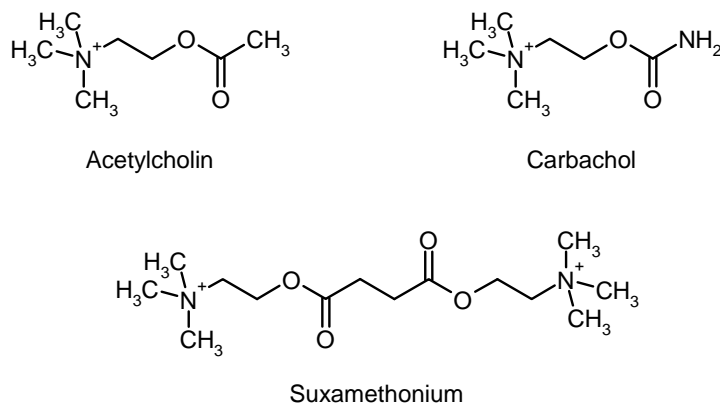


Abbildung 61: Strukturen der Wirkstoffe Acetylcholin **2**, Carbachol **23** und Suxamethonium **44**

Interessant ist, dass eine große Anzahl von Arzneistoffen mit Cholin-Partialstruktur nie eingehender an Nicotinrezeptoren untersucht wurde, obwohl ihr Nebenwirkungsprofil auf Wechselwirkungen mit cholinergen Systemen schließen lässt. Zwei bekannte Vertreter solcher Verbindungen sind das H₁-Antihistaminikum Diphenhydramin **45** (Dolestan[®]), das als 8-Chlortheophyllinsalz besser unter der Bezeichnung Dimenhydrinat (Emesan[®], Vomex[®]) bekannt ist, und das Analgetikum Nefopam **46** (Ajan[®]). Diese Arzneistoffe stellen strukturell Ether des Cholins **22** dar, wobei Nefopam **46** als ein zyklisiertes Diphenhydramin **45** betrachtet werden kann. Gemeinsam sind ihnen typische cholinerge (muskarinische & nicotinische) Nebenwirkungen wie Verwirrheitszustände, Blutdruck- und Herzfrequenzanstieg, Mundtrockenheit und mögliche Glaukominduktion^{1,323}. So lassen einige dieser Nebenwirkungen vermuten, dass beide Arzneistoffe mit nAChR interagieren, allerdings wurde dieser Zusammenhang nie eingehender untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden beide Wirkstoffe und ihre N-methylierten Analoga mittels Radioligand-Bindungsstudien an verschiedenen Nicotinrezeptoren getestet.

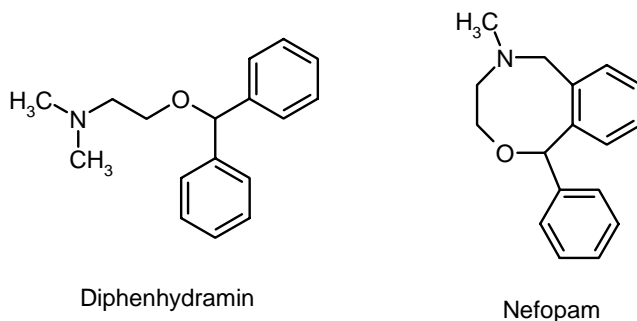


Abbildung 62: Strukturen der Arzneistoffe Diphenhydramin **45** und Nefopam **46**

Weitere Literaturbekannte Cholinether mit Aryl- und Pyridylsubstitution verfügen über antibakterielle, germizide und Cholesterin senkende Eigenschaften³²⁴ oder wurden im Fall von mono- und polysubstituierten Pyridylethern sogar als Pestizide patentiert³²⁵. Kürzlich veröffentlichten Simsek et al. 3-Pyridyl-Cholinether-Analoga mit antinozizeptiven Eigenschaften, die nanomolare Affinitäten zu [³H]Nicotin sensitiven Bindungsstellen aufweisen³²⁶. Ähnliche Derivate, bei denen die Aminkomponente in ein zyklisches Kohlenstoffskelett eingebaut wurde, stellen einen der potentesten Liganden (A-85380 **34**) für den $\alpha 4\beta 2$ Subtyp der nAChR dar²²³. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass sich das Cholinether-Motiv zur Herstellung von Subtyp-selektiven Nicotinrezeptor-Liganden eignet.

Selektive nAChR-Liganden könnten maßgeblich zur Aufklärung der pathophysiologischen Bedeutung einzelner Subtypen der nicotinischen Acetylcholinrezeptoren beitragen. Leider stehen der Wissenschaft derzeitig nur sehr wenige hoch affine und selektive Verbindungen zur Verfügung. Daher besteht ein großes Interesse an der Entwicklung dieser essentiellen Werkzeuge.

3.1.2 Herstellung von 2-Phenylcholinether (**42**)

[Trimethyl-(2-phenoxy-ethyl)-ammoniumbromid]

Ein schon lange bekannter Cholinether, der eine Interaktion mit nAChRs vermuten lässt, ist der von Renshaw et al. bereits 1933 entwickelte 2-Phenylcholinether **42**³⁰⁹. Hey et al. veröffentlichten zwischen 1952 und 1956, dass diese Verbindung in der Lage ist eine In-vitro-Hemmung der Monoaminoxidase (MAO) und einen Blutdruckanstieg nach i.v. Injektion (Katze) zu induzieren^{310,311}. Des Weiteren veröffentlichten Elliott et al. für einige Pyridyl-Analoga des Ethers nanomolare Affinitäten zu $\alpha 4\beta 2$ Rezeptoren³²⁷.

Jedoch wurde eine detaillierte Untersuchung des Ethers an verschiedenen Subtypen des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors erstmals von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt^{328,329}.

Zu diesem Zweck wurde der Phenylcholinether **42** anhand der Vorschrift von Renshaw et al. synthetisiert³⁰⁹.

In einem Druckreaktionsrohr wurden Trimethylamin und 2-Bromethoxy-benzen in Toluol über 48 h kondensiert. Um die Reaktion abzuschließen wurde danach der

Reaktionsansatz für 60 min auf 50 °C erhitzt.



Abbildung 63: Versuchsaufbau für die Synthese von Trimethyl-(2phenoxy-ethyl)-ammoniumbromid **42**

Das Endprodukt wurde in einer Ausbeute von 78% durch Umkristallisation des Rohproduktes in absolutem Ethanol gewonnen.

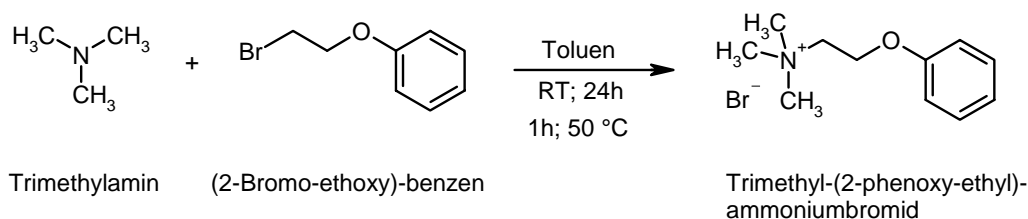


Abbildung 64: Reaktionsschema der Synthese von Trimethyl-(2phenoxy-ethyl)-ammoniumbromid **42**

Aus der Synthesevorschrift von Renshaw et al.³⁰⁹ geht nicht eindeutig hervor, ob Trimethylamin als Gas in das Druckgefäß eingeleitet wurde oder ob eine Lösung der Verbindung Anwendung fand. Auf Grund des geringeren apparativen Aufwandes wurde eine 35%ige ethanolische Lösung von Trimethylamin eingesetzt. Die Verwendung eines Druckgefäßes zur Synthese ist trotz der Anwendung der ethanolischen Lösung sinnvoll, um das Ausgasen von Trimethylamin auf ein Minimum zu beschränken.

Eine Bewertung der von uns erzielten Ausbeute von 78 % ist leider aufgrund fehlender Angaben in der Originalvorschrift nicht möglich.

Die Identität und Reinheit der Verbindung konnte anhand von ¹³C- und ¹H-NMR-Spektren, Massen- und IR-Spektren sowie einer Elementaranalyse gesichert werden.

3.1.3 Herstellung von N-Methyl-Diphenhydramin (47)

Die Strukturverwandtschaft des H₁-Antihistaminikums Diphenhydramin **45** mit Cholin **22** lässt vermuten, dass diese Substanz möglicherweise mit Nicotinrezeptoren interagiert. Weitere Indizien für diese mögliche Interaktion sind die bereits erwähnt Nebenwirkungen dieses Arzneistoffs. Es wurden jedoch für Diphenhydramin **45** nie umfangreichere Untersuchungen an verschiedenen Nicotinrezeptor-Subtypen veröffentlicht.

Neben Diphenhydramin **45** sollte auch sein methyliertes Analogon im Rahmen dieser Arbeit auf Wechselwirkungen mit Nicotinrezeptoren näher untersucht werden, da Sokilde et al. postulierten, dass im Allgemeinen quartäre Stickstoffverbindungen höhere Affinitäten zu nAChRs zeigen als ihre tertiären Analoga³³⁰.

Die Herstellung von N-Methyl-Diphenhydramin **47** (Abbildung 65) erfolgte mit über 80%iger Ausbeute nach Gewinnung der freien Base aus Diphenhydramin-Hydrochlorid **45** und anschließender Methylierung durch Methyljodid in Aceton³⁴².

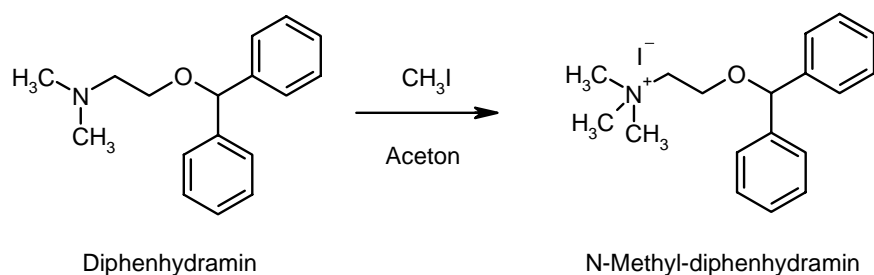


Abbildung 65: Reaktionsschema zur Methylierung von Diphenhydramin **45**

3.1.4 Herstellung von N-Methyl-Nefopam (48)

Das Analgetikum Nefopam **46** stellt strukturell ein zyklisiertes Diphenhydramin **45** dar und weist ebenfalls Nebenwirkungen auf, die Wechselwirkungen mit cholinergen Systemen vermuten lassen. Wie schon für Diphenhydramin **45** wurden nie umfangreichere Studien von Nefopam **46** an nAChR veröffentlicht. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit dieses Analgetikum, aber auch sein quartärnisiertes Analogon untersucht werden.

Die Herstellung von N-Dimethyl-Nefopam **48** (Abbildung 66) erfolgte nach Gewinnung der freien Base aus Nefopam-Hydrochlorid **46** nach erwähnter Methode³⁴². Die

Ausbeute betrug 54 %. Die im Vergleich zur Methylierung von Diphenhydramin **45** niedrigere Ausbeute ist womöglich auf Hydrolyse des Methyliodids durch im Lösungsmittel enthaltenes Wasser zurückzuführen und/oder durch eine eventuelle sterische Hinderung der Methylierung durch die N-Methyl-[1,4]oxazolan-Partialstruktur bedingt.

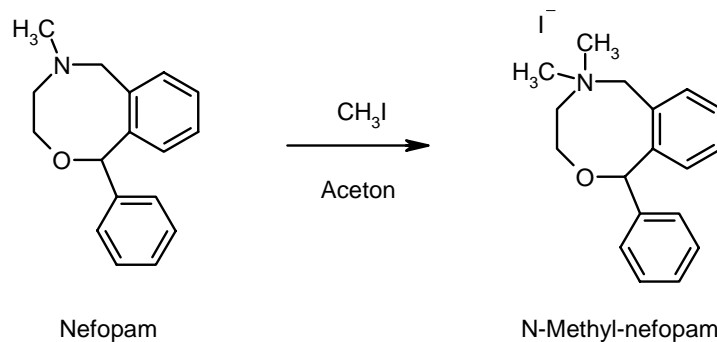


Abbildung 66: Reaktionsschema zur Methylierung von Nefopam **46**

3.2 Carbamate

3.2.1 Bedeutung von Carbamaten

Unter Carbamaten versteht man definitionsgemäß die Ester und Salze der Carbamidsäure (veraltet: Carbaminsäure, Amino-Ameisensäure, Kohlensäuremonoamid) sowie ihre N-substituierten Derivate³³¹. Die Carbamidsäure ist im freien Zustand nicht bekannt, allerdings leiten sich von ihr die Carbamate, Carbanilsäure-Derivate, Allophanate sowie Harnstoffe (Amide der Carbamidsäure), Semicarbazide (Hydrazide der Carbamidsäure) und Guanidine (Amidine der Carbamidsäure) ab (Abbildung 67)³³¹.

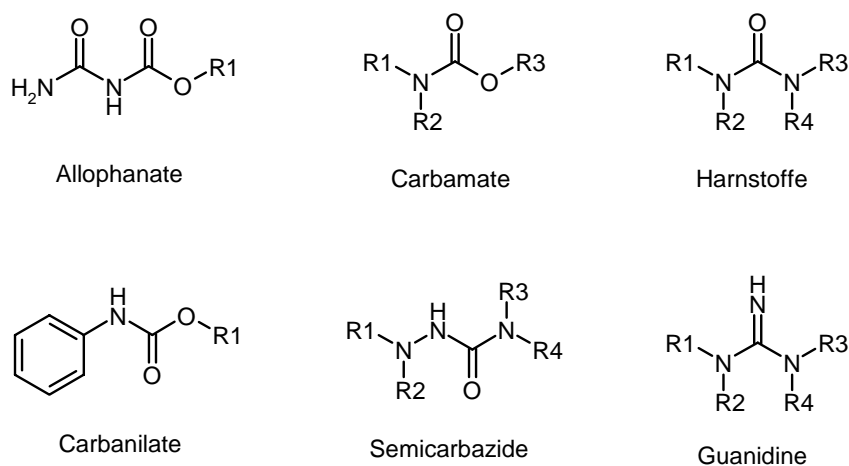


Abbildung 67: Strukturformeln verschiedener von der Carbamidsäure abgeleiteter Verbindungen

Die Salze der Carbamidsäure sind in wässriger Lösung relativ instabil und zerfallen in die entsprechenden Carbonate und Ammoniak. Größere Bedeutung besitzen die N-substituierten Ester. Einer der bekanntesten Vertreter dieser Verbindungen ist der Carbamidsäureethylester (Ethylcarbamate), der unter dem vom lateinischen Wort für Harnstoff (urea) und Ethanol abgeleiteten Trivialnamen Urethan bekannt ist. Diese Substanz wurde früher als Anästhetikum und Sedativum sowie zur Behandlung von bestimmten Leukämieformen eingesetzt, besitzt aber auf Grund seiner krebserzeugenden und giftigen Eigenschaften keine arzneiliche Bedeutung mehr³³¹.

Vom Ethylcarbamate leitet sich die historische, aber bis heute recht gebräuchliche Bezeichnung „Urethane“ für die Gruppe der Carbamidsäureester (Carbamate) ab³³¹. Dieses Synonym für Carbamate ist leicht missverständlich, da es sich bei den Verbindungen keinesfalls um Harnstoffderivate handelt, was die lateinische Silbe

„ure(a)“ impliziert. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher der Begriff „Urethane“ in Bezug auf Carbamidsäureester nicht verwendet werden.

Grosse technische Bedeutung besitzen Carbamate als Kunststoffe, die so genannten „Polyurethane“ (!). Es handelt sich dabei um Polymere, in denen die Wiederholungseinheiten durch Carbamat-Gruppierungen -NH-CO-O- verknüpft sind. Zugänglich sind diese Polymere über Polyaddition aus zwei- oder höherwertigen Alkoholen und Isocyanaten. Je nach Wahl der Ausgangsprodukte und ihrer stöchiometrischen Verhältnisse ergeben sich Polyurethane mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften. Die Kunststoffe finden sich in Klebstoffen und Lacken, in Elastofasern (Elastan- oder Spandex-Fasern), in thermoplastischen Materialien für Rollen und Walzen, in Dichtungen, Folien, Gummibändern und Reifen als Polyurethan-Kautschuke. Ihre größte Bedeutung aber besitzen sie als Schaumkunststoffe zur Herstellung Wärmeisolier- und Dichtungsmaterialien, Verpackungsmittel sowie Polsterfüllungen³³¹.

Analytisch macht man sich die Bildung von Carbamaten aus Alkoholen und Isocyanaten zu Nutze. In Abhängigkeit ihrer Substituenten sind Carbamidsäureester meist gut kristallin und zeichnen sich durch einen scharfen Schmelzpunkt aus. Diesen Zusammenhang nutzt man zur Identifizierung der bei der Umsetzung verwendeten Alkoholkomponenten aus, wobei als Isocyanate in der Regel Phenyl-, Nitrophenyl- oder 1-Naphthyl-isocyanat eingesetzt werden^{331,332}.

Die Carbamidsäureester sind gegenüber Basen und katalytischer Hydrierung relativ stabil, was sie als bioisosteren Ersatz für Ester und Amide interessant macht³³³.

Die günstigeren Stabilitätseigenschaften der Carbamatfunktion im Vergleich zur anderen Teilstrukturen (z.B. Ester) macht man sich in der Schutzgruppenchemie zunutze. Die wichtigsten drei Schutzgruppen (Boc, Fmoc, Z), die zum Teil auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, werden im folgenden Abschnitt kurz vorgestellt.

Von großer Bedeutung für die Peptidsynthese ist die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (Boc), eine α -Amino-Schutzgruppe, die von F. Mc Kay und N. Albertson³³⁴ als Linker

zur Festphasensynthese entwickelt wurde. Sie kann im Boc-Anhydridverfahren (DiBoc in Dioxan/Wasser) eingeführt werden und ist unter Verwendung von 4M HCl in Dioxan oder Trifluoressigsäure in Dichlormethan leicht abspaltbar. Beim Endschützen zerfällt die Boc-Schutzgruppe in das Isobuten und die freie Carbonsäure, die wiederum zum freien Amin decarboxyliert (Abbildung 68)³³⁵. Dieses Verfahren wurde bei der Herstellung von Phenyl-carbaminsäure-pyrrolidin-2-ylmethylestern (3.2.7) verwendet.

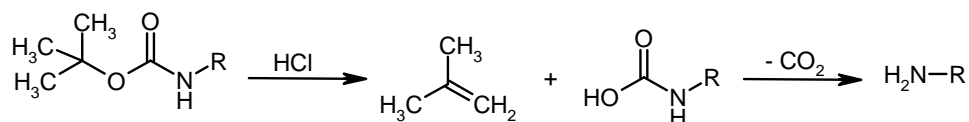


Abbildung 68: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

Ein weiterer wichtiger Vertreter der Aminoschutzgruppen aus der Klasse der Carbamate ist die Fluorenylmethyloxycarbonyl-Gruppe (Fmoc), die von Carpino et al. entwickelt wurde³³⁶. Im Gegensatz zur Boc-Schutzgruppe ist sie säurestabil und wird durch Basen (z.B. 20% Piperidin in DMF) in Dibenzofulven, CO₂ und das freie Amin gespalten (Abbildung 69). Die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt über Chlorameisensäure-fluorenylmethyl-ester (Fmoc-Cl) oder dem O-Succinimid-Derivat (Fmoc-OSuc) in Wasser/Dioxan oder Dichlormethan unter Basenzusatz von NaCO₃ oder Diisopropylethylamin (Hünig's Base)^{335,337}. Ein Nachteil Fmoc-geschützter Verbindungen ist deren schlechte Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln, sowie die notwendige säulenchromatographische Aufreinigung des Produktes nach Schutzgruppenabspaltung.

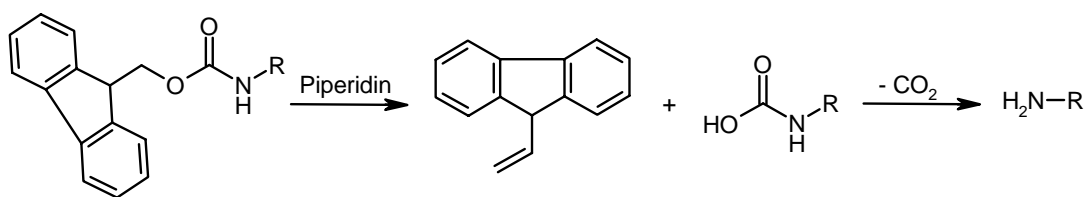


Abbildung 69: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die dritte für die Peptidsynthese bedeutende Schutzgruppe ist die Z-Schutzgruppe (Cbz)³³⁸. Die Einführung dieser Schutzgruppe, die sowohl im schwach sauren als auch im schwach alkalischen Milieu stabil ist, erfolgt durch Umsetzung mit Dibenzylidicarbonat, Chlorameisensäure-benzylester oder Benzotriazol-1-carbonsäurebenzylester (BTAZ). Zur Abspaltung wird in erster Linie eine katalytische

Hydrierung mit Palladium-Aktivkohle in Methanol verwendet (Abbildung 70)^{335,339}.

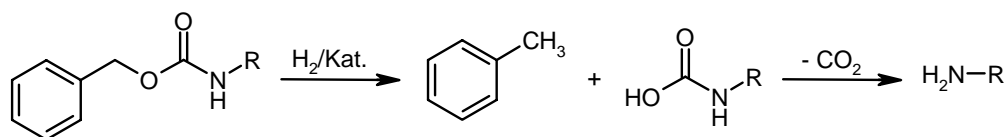


Abbildung 70: Abspaltung der Z-Schutzgruppe

Neben der Ausnutzung der Carbamatgruppe in der Schutzgruppenchemie gewinnt diese funktionelle Gruppe immer mehr Bedeutung bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe und Wirkstoffe in der medizinischen Chemie (Patentliteratur). Schon lange bekannt sind Carbamidsäureester als Insektizide (Multamat[®], Pflanzen Paral[®], Lamate[®] Unden[®]), wobei ihre Wirkung auf der Hemmung der Acetylcholinesterase der Insekten beruht¹. Ebenfalls wird schon länger der hemmende Effekt verschiedener Carbamate auf die Zellteilung und Photosynthese von Pilzen und Pflanzen in Herbiziden (Pradone[®], Alipur[®], Betanal Expert[®]) und Fungiziden (Valbon[®], Sorenor[®], Antracol[®]) ausgenutzt.

Es finden sich aber auch Carbamidsäureester unter schon lange bekannten Arzneistoffen. So zum Beispiel das bereits erwähnte Carbachol **23** (siehe 3.1.1 Bedeutung von Cholinethern) oder Meprobamat (Visano N[®]), welches als zentral angreifendes Muskelrelaxans und Tranquillans eingesetzt wurde, aber aufgrund seines großen Abhängigkeitspotentials, seiner Toxizität und der Induktion von Cytochrom P-450 1A als veraltet gilt¹. In den letzten Jahren wurden weitere Carbamate mit sehr unterschiedlichen Wirkmechanismen patentiert oder als Arzneimittel zugelassen. Von großer Bedeutung sind dabei die Acetylcholinesterase-Inhibitoren Neostigmin **49** (Prostigmin[®], Normastigmin[®]) und Rivastigmin **17** (Exelon[®]) zur Behandlung von Myasthenia gravis, Glaukom und Morbus Alzheimer. Weitere Beispiele sind die 2000 und 2004 zur HIV-Therapie zugelassenen Protease-Inhibitoren Amprenavir **50** (Agenerase) und Atazanavir **51** (Reyataz[®]) sowie das 2001 auf dem Markt erschienene orale Zytostatikum Capecitabin **52** (Xeloda[®]) zur Behandlung von metastasierenden Dickdarmtumoren.

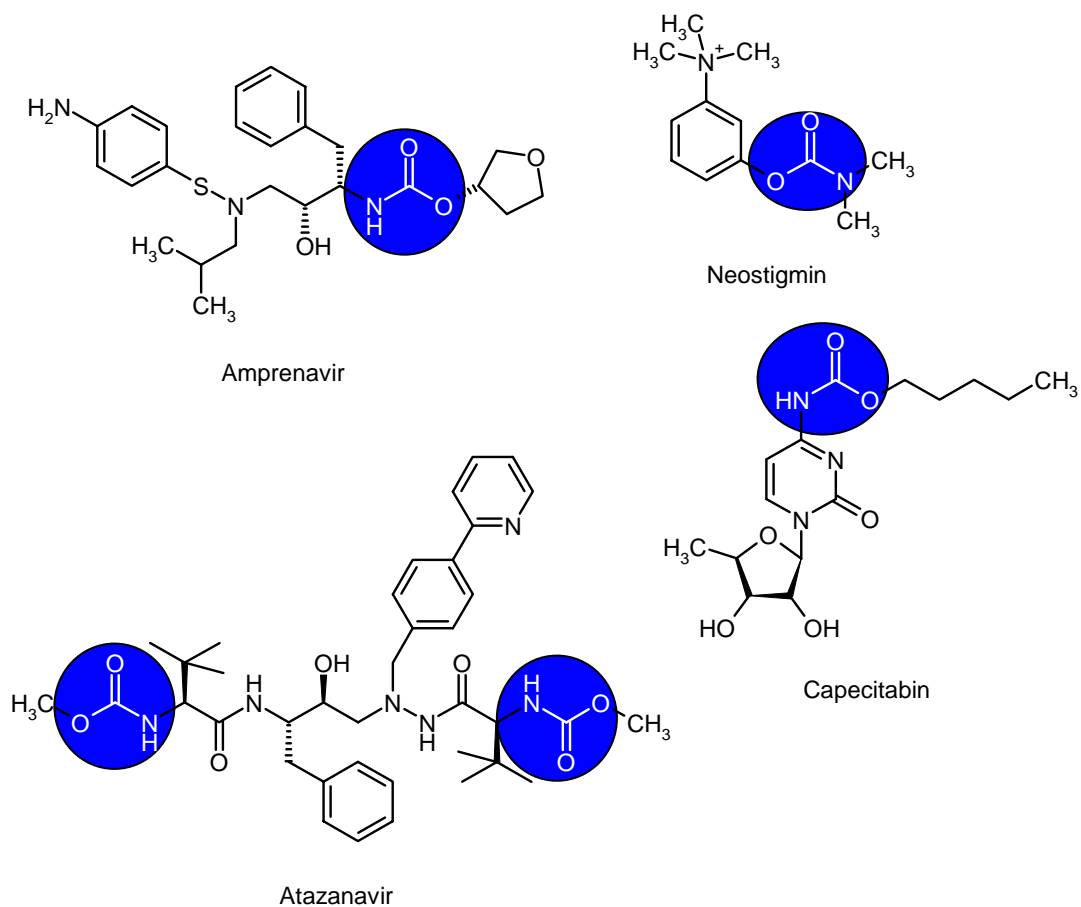


Abbildung 71: Strukturformeln der Arzneistoffe Neostigmin 49, Amprenavir 50, Capecitabin 52 und Atazanavir 51

3.2.2 Allgemeine Synthese von Carbamaten

N-substituierte Carbamate sind hauptsächlich über zwei Synthesewege zugänglich. Die erste Möglichkeit besteht in der Umsetzung von Chlorameisensäureester mit Aminen in einer nukleophilen Substitutionsreaktion (S_N -Reaktion). Diese Reaktion wird sehr häufig zur Einführung der bereits erwähnten α -Aminoschutzgruppen Cbz und Fmoc verwendet (siehe 3.1 Bedeutung von Carbamaten)³³².

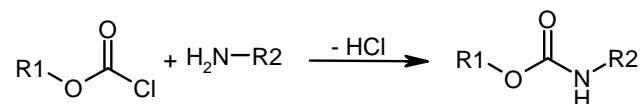


Abbildung 72: Carbamatsynthese durch Umsetzung von Chlorameisensäureester und Aminen

Aufgrund der hohen Reaktivität, der schnellen Zersetzung und der relativ hohen Toxizität³³¹ sowie der geringen Verfügbarkeit geeigneter Chlorameisensäureester und

Anilinderivaten wurde dieser Syntheseweg für die von uns hergestellten Phenylcarbamidsäureester (Carbanilsäureester) nicht verwendet.

Die Herstellung aller im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Phenylcarbamate erfolgte anhand des abgebildeten Schemas durch nukleophile Addition (A_N -Reaktion) von verschiedenen Amino-Alkoholen an entsprechend substituierte Phenylisocyanate^{340,341}.

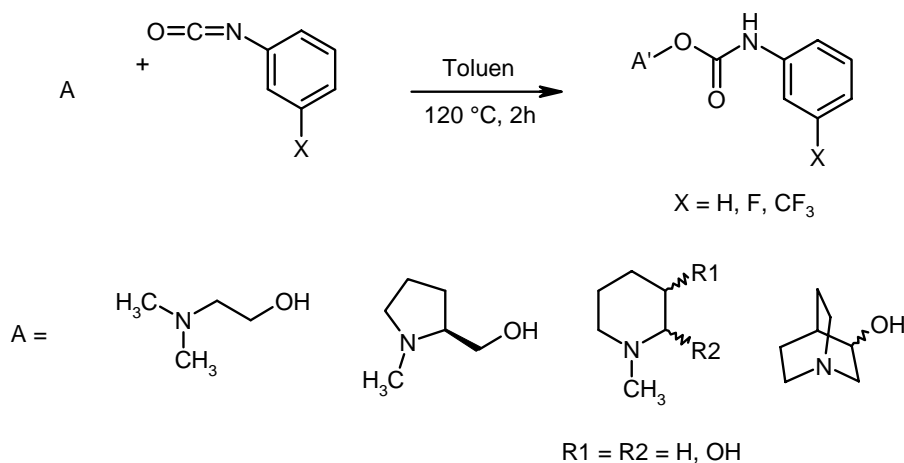


Abbildung 73: Carbamatsynthese durch nukleophile Addition von Aminoalkoholen an Phenylisocyanate

Die Umsetzungen wurden in wasserfreiem Toluol oder alternativ in trockenem Acetonitril unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit (Argonatmosphäre) durchgeführt, um eine Zersetzung der Isocyanate zu verhindern³³². Die untere Abbildung zeigt diese Zersetzung beispielhaft am Phenylisocyanat (Carbanil).

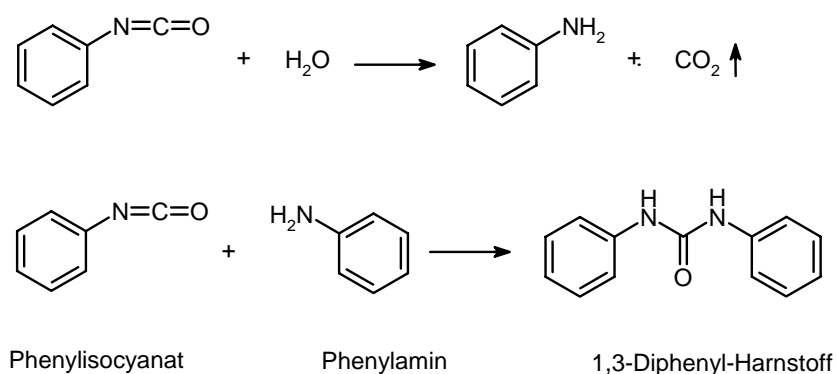


Abbildung 74: Zersetzung von Phenylisocyanat unter Wassereinfluss^{332,355}

Bei Anwesenheit von Wasser im Reaktionsansatz greift dieses nukleophil am Kohlenstoff der Isocyanatgruppe an, worauf das Carbanil unter Ausbildung von Anilin decarboxyliert. Anilin ist nun wiederum in der Lage, Isocyanaten nach dem gleichen nukleophilen Reaktionsmechanismus anzugreifen³⁵⁵. Es entsteht das jeweilige

Harnstoffderivat, im vorliegenden Beispielfall 1,3-Diphenylharnstoff (Carbanilid). Dies wurde für den 1,3-Di-m-tolylharnstoff ($M_r = 240,31$) nachgewiesen (MS (ESI): 1,3-Di-m-tolylharnstoff $[M+H]^+ = 240,2$; m-Tolylamin $[M+H]^+ = 107,1$).

Der entstandene Harnstoff ist im Gegensatz zu den Edukten und dem gewünschten Produkt relativ schlecht in Toluol löslich, so dass er bei Abkühlen des Reaktionsansatzes auskristallisiert und vor der eigentlichen Aufreinigung leicht abfiltriert werden kann.

Wie die Abbildung 74 verdeutlicht, wirken sich geringste Feuchtigkeitsmengen auf die Konzentration der Edukte im Reaktionsansatz aus. Pro Wassermolekül werden der Umsetzung zwei Moleküle Isocyanat entzogen, was die Ausbeute drastisch verschlechtert. Durch sorgfältiges Ausheizen des Versuchsaufbaus und Verwendung einer Argonatmosphäre sowie gut getrockneter Lösungsmittel kann diese Nebenreaktion vollständig vermieden werden, so dass eine stöchiometrische Umsetzung der Edukte in der Regel zu guten Ausbeuten zwischen 60 und 90% führte.

Der Einsatz eines größeren Überschusses des jeweiligen Phenylisocyanates rechtfertigt sich aus zwei Gesichtspunkten nicht. Zum einen lassen sich, wie schon erwähnt, gute Ausbeuten durch wasserfreies Arbeiten erreichen. Zum anderen entsteht aus überschüssigem Phenylisocyanat durch Wassereinwirkung (Wasser aus ungetrockneten Lösungsmittel oder eventuell vorhandener Luftfeuchtigkeit) der weiteren Produktaufreinigung Anilin, was sich durch seine basischen Eigenschaften vom den ebenfalls basischen Endprodukten (Carbamate) nur schlecht abtrennen lässt. Der überstöchiometrische Einsatz von Isocyanaten käme folglich einer Verschwendung der toxikologisch nicht ganz unbedenklichen Substanzen gleich.

Eine weitere mögliche Nebenreaktion, die bei der Umsetzung von basischen Aminoalkoholen mit Isocyanaten auftreten kann, ist die in Abbildung 75 gezeigte Trimerisierung zu Triphenylcyanursäure-Derivaten. Der Amino-Alkohol fungiert bei dieser Reaktion lediglich als katalytische Base³³².

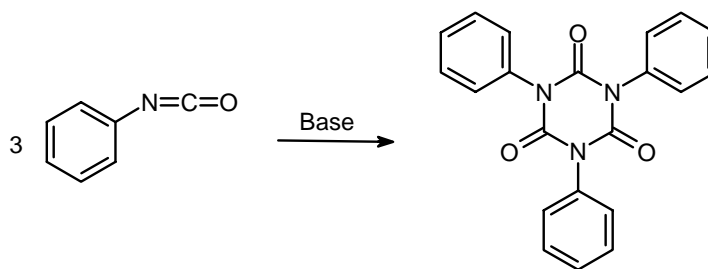


Abbildung 75: Trimerisierung von Phenylisocyanaten unter Basenkatalyse zu Triphenylcyanursäuren³³²

Zur Synthese von Carbamaten über die Umsetzung von Alkoholen mit Isocyanaten wird zumeist Toluol als Lösungsmittel in der Literatur beschrieben^{340,341,342}, alternativ findet sich aber auch Acetonitril³⁴³. Letzteres besitzt einen deutlich niedrigeren Siedepunkt (81 °C) als Toluol (110 °C), der eine Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum erleichtern würde, aber die gute Mischbarkeit von Acetonitril und Wasser würde die im Anschluss zur Aufreinigung verwendete Methode erheblich erschweren. Daher wurde bei der Herstellung der aufgeführten Verbindung fast ausschließlich Toluol als Lösungsmittel verwendet.

Die in der Literatur beschriebenen Synthesen von Carbamidsäureestern erfolgten immer unter Rückfluss, allerdings variierten die Reaktionszeiten je nach Literaturquelle zwischen 2 und 16 h^{340,341,342,343}. Um einen möglichen Einfluss der Reaktionsdauer auf die Ausbeute zu untersuchen, wurden Reaktionszeiten von 2, 4, 8 und 16 h gewählt. In diesen Experimenten konnte keine deutliche Verbesserung der Ausbeute bei längerer Synthesedauer festgestellt werden. Da sich bei einer Reaktionszeit von 2 h schon eine gute Ausbeute erzielen ließ, wurde dieser Zeitdauer für alle weiteren Synthesen dieses Reaktionstyps gewählt.

Die Aufreinigung der Syntheseprodukte erfolgte in zwei Schritten. Der Reaktionsansatz wurde zunächst nach Abkühlen mit 2 M Salzsäure gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 2 M Natronlauge alkalisiert (\geq pH 10), was eine Ausfällung des Produktes zur Folge hatte. Mit Dichlormethan, oder alternativ Diethylether, wurde das Carbamat aus der wässrigen Lösung zügig extrahiert, um eine mögliche alkalische Hydrolyse des Produktes durch längere Einwirkung des basischen Lösungsmittels zu verhindern. Nach Trocknung des organischen Extraktionsmittels mit wasserfreiem Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gelblich transparente, ölige

Produkt wurde im zweiten Schritt säulenchromatographisch aufgereinigt.

Dieses Vorgehen zur Aufreinigung der Carbamate bietet zwei Vorteile: Das Produkt wird zum einen aus Toluol in ein leichter entfernbare Lösungsmittel (Dichlormethan oder Diethylether) überführt, zum anderen werden überschüssige Phenylisocyanate, die toxikologisch nicht unbedenklich sind, zum Anilinderivat hydrolysiert (siehe Abbildung 74).

Die säulenchromatische Aufreinigung der basischen, öligen, teilweise hygroskopischen Endprodukte erfolgte wie im experimentellen Teil (6.2 Synthesen) beschrieben.

3.2.3 Überführung in Hydrochloridsalze

Einige Carbamate, insbesondere Verbindungen mit Pyrrolidin- und Piperidin-Teilstruktur, verfügten teilweise über hygroskopische Eigenschaften, was bei längerer Lagerung zu einer Hydrolyse der Esterstruktur führte (siehe Abbildung 74). Diese Zersetzung der Carbamate war anhand einer Intensivierung der Gelbfärbung des anfänglich weißlich transparenten Öls leicht zu beobachten. Die Farbveränderung des ursprünglich klaren Öls wird vermutlich durch die Entstehung des jeweiligen Anilinderivats, das sich durch Luftkontakt bräunlich verfärbt³⁴⁴, hervorgerufen.

Um eine bessere Handhabung der teilweise öligen Substanzen zu ermöglichen, wurden einige Carbanilsäureester in die entsprechende Hydrochloridsalze überführt.

Hierzu wurde das jeweilige ölige Carbamat in 1-2 ml Dioxan gelöst und mit einem 5fachen Überschuss einer 4M Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan versetzt. Die Lösung wurde zunächst für 30 bis 60 min bei RT gerührt. Um eine vollständige Fällung des Salzes zu gewährleisten, wurden 10 ml Diethylether hinzugefügt und die Suspension für weitere 1 bis 2 h gerührt. Einige Carbamidsäureester, zum Beispiel Verbindungen mit N-Methyl-piperidin-Struktur, fielen schon unmittelbar nach Zugabe der Chlorwasserstofflösung aus, andere erst nach Etherzugabe. Nach Abtrennung des Feststoffes mittels einer Glasfritte wurde dieser mit trockenem Diethylether gewaschen und anschließend im Exsikator getrocknet.

Mit Ausnahme des (R,S)-1-Methyl-piperidin-3-yl-carbanilsäureesters **71**, dessen Hydrochlorid sich auch als stark Wasser ziehend erwies, fielen alle Hydrochloride als weiße, kristalline Feststoffe an, die kaum hygroskopische Eigenschaften aufweisen.

3.2.4 Herstellung von (2-Phenylcarbamoyloxy-ethyl)-trimethyl-ammonium-Derivaten

Um den Einfluss einer Vergrößerung des Phenylcholinethers **42** auf die Affinität und Subtypselektivität zu untersuchen bzw. die Selektivität auf den $\alpha 7$ -Rezeptor zu verschieben, wurde versucht die Etherfunktion um eine Amidgruppe zum Carbamat zu erweitern. Das daraus resultierende Carbamat **56** (Abbildung 76) und sein Dimethyl-Analogon **53** wurden bereits von Abood et al. als Inhibitoren der spezifischen Bindung an neuronalen Nicotin- und Muskarinrezeptoren beschrieben³⁴².

Zu diesem Zweck wurde nach der unter 3.2.2 „Allgemeine Synthese von Carbamaten“ aufgeführten Synthesemethode das jeweilige Phenylisocyanat mit Dimethylamino-ethanol (Deanol, DMAE, Demanol), welches selbst parasymphomimetisch und psychostimulierend wirkt³⁴⁵, umgesetzt. Die Ausbeute betrug zwischen 40 und 63 %. Die Aufreinigung sowie die Methylierung zur quartären Ammoniumverbindung **56-58** erfolgten ebenfalls nach den bereits beschriebenen Methoden (3.2.2 Allgemeine Synthese von Carbamaten). Die Ausbeuten für den zweiten Syntheseschritt lagen zwischen 48 und 99 %.

Während den ersten Syntheseversuchen von Phenylcarbamaten stellte sich heraus, dass Wasser einen negativen Einfluss auf die Ausbeute hat. Die im Vergleich zu anderen Carbamatsynthesen geringeren Ausbeuten in den ersten Versuchensansätzen sind daher durch Wasserreste zu erklären.

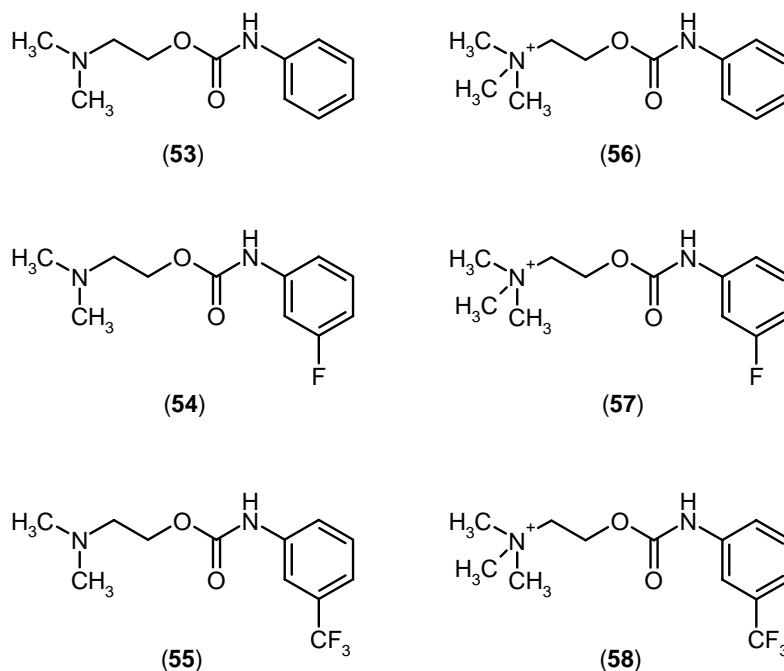


Abbildung 76: Strukturen der synthetisierten (2-Phenylcarbamoyloxy-ethyl)-trimethyl-ammonium **56-58** Derivate

3.2.5 Ersatz der Trimethylammonium-Struktur und Aromatsubstitution

Durch den Austausch der Etherfunktion des Phenylcholinethers **42** durch ein Carbamat wird sich möglicherweise eine Änderung des Bindungsprofils ergeben. Diese Modifikation könnte ebenfalls Auswirkungen auf die Subtypselektivität haben und diese $\alpha 4\beta 2$ auf den $\alpha 7$ -Rezeptorsubtyp umkehren.

Obwohl es mittlerweile einige Hinweise gibt, dass permanent geladene Ammoniumstrukturen aktiv mittels so genannter Cholintransporter ins Gehirn gelangen können^{346,347,348,349}, gilt diese quartäre Struktur aber eher als ungünstig zur Überwindung der BBB¹. Daher sollte versucht werden, diese permanent geladene Partialstruktur gegen einen basischen protonierbaren Stickstoff auszutauschen, so dass die resultierende Verbindung in das ZNS penetrieren kann. Als bioisosterer Ersatz der Ammoniumstruktur boten sich basische Heterozyklen an, die bei physiologischem pH-Wert größtenteils protoniert und somit kationisch vorliegen, aber theoretisch in ihrer unprotonierten Form die BBB überwinden können. Die zur Synthese verwendeten Aminoalkohole wurden so gewählt, dass der für die Wirkung an Nicotinrezeptoren wichtige basische Stickstoff (1.11 Pharmakophor-Modelle für Nicotinrezeptoren) einen Abstand von zwei Kohlenstoffatomen (Spacer) zum Sauerstoffatom der Hydroxygruppe

aufweist (Abbildung 77). Der Abstand von zwei Kohlenstoffatomen entspricht dabei den Verhältnissen im Acetylcholin **2**, dem physiologischen Agonist an nAChRs. Durch den Einbau des Stickstoffatoms in eine Ringstruktur erfolgt allerdings eine Rigidisierung der Kohlenstoffbrücke zwischen dem Stickstoffatom und der Carbamatgruppe. Je nach Ringsystem sollten sich daher leichte Unterschiede in den Abständen zwischen den beiden Pharmakophor-Elementen ergeben, die möglicherweise Rückschlüsse auf Strukturwirkungsbeziehungen zulassen²⁰⁷. Zum anderen wird durch den teilweisen oder vollständigen Einbau des „Spacers“ in den Heterozyklus die freie Drehbarkeit der C-C-Bindungen eingeschränkt, was sich limitierend auf die Konformationsvielfalt eines Moleküls auswirkt. Möglicherweise ergeben sich aus diesen Einschränkungen Hinweise, welche Molekülkonformation einen günstigen oder ungünstigen Effekt auf die Rezeptorinteraktion aufweist. Die Verwendung von Enantiomeren-reinen Aminoalkoholen zur Synthese könnte ebenfalls einen Beitrag zur Klärung dieser Fragestellung und zur Untersuchung der Strukturwirkungs-Beziehungen liefern.

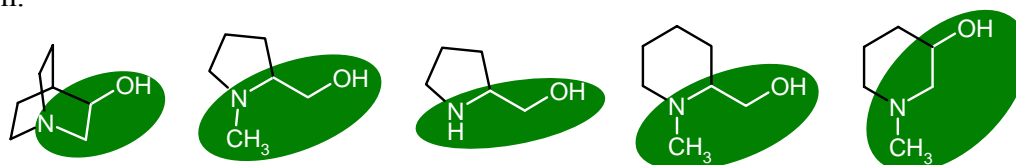


Abbildung 77: Strukturen der verwendeten basischen, stickstoffhaltigen Heterozyklen mit Cholin-Partialstruktur

Neben der Modifikation des stickstoffhaltigen Heterozyklus sollte auch der Einfluss von Variationen des Aromaten der Phenylcarbamate auf die Rezeptorinteraktion untersucht werden. Die Ringerweiterung durch eine Fluor- oder Trifluormethyl-Gruppe wurde dabei ausschließlich in *meta*-Position vorgenommen, da es Hinweise gibt, dass eine Substitution in *ortho*- und *para*-Position zu einer unerwünschten Affinitäts-Prävalenz zu Muskarinrezeptoren führt³¹⁴. Weiterhin berichteten Romanelli et al. von einem günstigen Einfluss eines Wasserstoffbrücken-bildenden Substituenten in *meta*-Position auf die Affinität zu nAChR für eine Serie von DMPP-Analogen (1,1-Dimethyl-4-phenylpiperazinum)³⁵⁰.

3.2.6 Herstellung von Phenyl-carbaminsäure-1-methyl-pyrrolidin-2-yl-methylestern

Als basischer stickstoffhaltiger Heterozyklus bot sich eine Pyrrolidin- oder N-Methyl-pyrrolidin-Struktur an, da diese sich in vielen bekannten und hoch potenten Nicotinrezeptor-Liganden findet (Nicotin **1**³⁵¹, SIB-1765F^{352,353}, SIB-1553A **87**³⁵⁴, ABT-089 **33**^{221,222}). Da Abreo et al. in Bindungsstudien am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor für einige 3-(1-Methyl-pyrrolidin-2-ylmethoxy)-pyridine eine ausgesprochene (S)-Enantio-selektivität postulierte, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst die (S)-konfigurierten Methyl-pyrrolidin-2-yl-phenylcarbamate hergestellt.

Nach beschriebener Methode wurde ((S)-1-Methyl-pyrrolidin-2-yl)-methanol zu dem jeweiligen Carbanil umgesetzt (Abbildung 78). Die Ausbeuten betragen zwischen 69 und 77 %. Da diese Carbamate nur schlecht kristallisierten, wurden sie in das entsprechende Hydrochlorid mit Ausbeuten von 79 bis 92 % überführt.

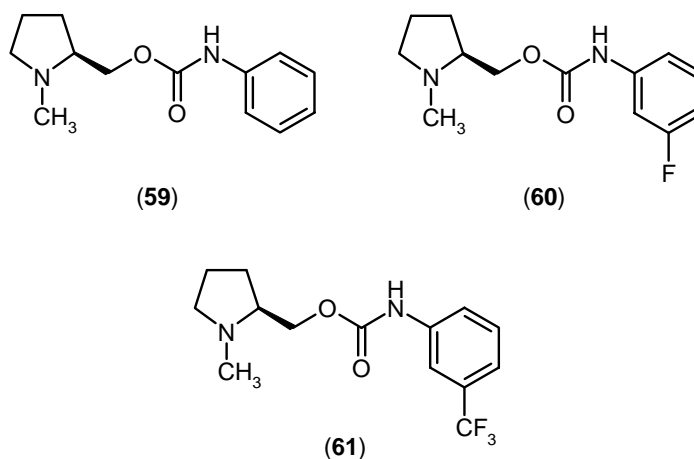


Abbildung 78: Strukturen der hergestellten Phenyl-carbaminsäure-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester **59-61**

3.2.7 Herstellung von Phenyl-carbaminsäure-pyrrolidin-2-ylmethylestern

Die Synthese von Phenyl-carbaminsäure-pyrrolidin-2-ylmethylestern erforderte einen zusätzlichen Syntheseschritt, da aufgrund der geringeren Reaktivität des Alkohol im Vergleich zu Aminen bei der Umsetzung mit Isocyanaten quantitativ das entsprechende Harnstoffderivat entstehen würde und nicht das gewünschte Carbamat (siehe Abbildung 79 & Abbildung 80)³⁵⁵.

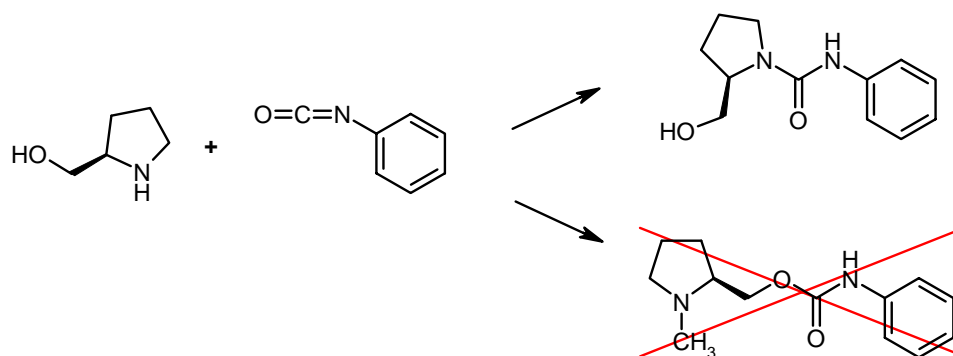


Abbildung 79: Umsetzung von (R)-1-Pyrrolidin-2-yl-methanol mit Phenylisocyanat zu (R)-2-Hydroxymethyl-pyrrolidin-1-carbonsäure-phenylamide

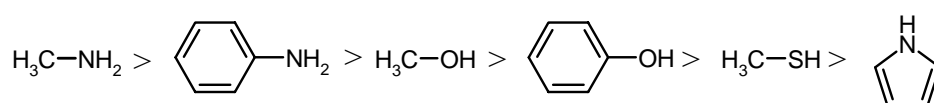


Abbildung 80: Reihenfolge der Reaktivitäten von Nucleophilen bei der Umsetzung mit Isocyanaten³⁵⁵

Zu diesem Zweck wurde die jeweilige Enantiomeren-reine Alkoholkomponente zunächst mittels des Boc-Anhydridverfahren geschützt³³⁴ und erst anschließend mit dem entsprechenden Phenylisocyanat umgesetzt. Bei der Abspaltung der Schutzgruppe wurden die Carbamate, wie unter 3.2.3 beschrieben, direkt in ihre Hydrochloridsalze überführt (Abbildung 81).

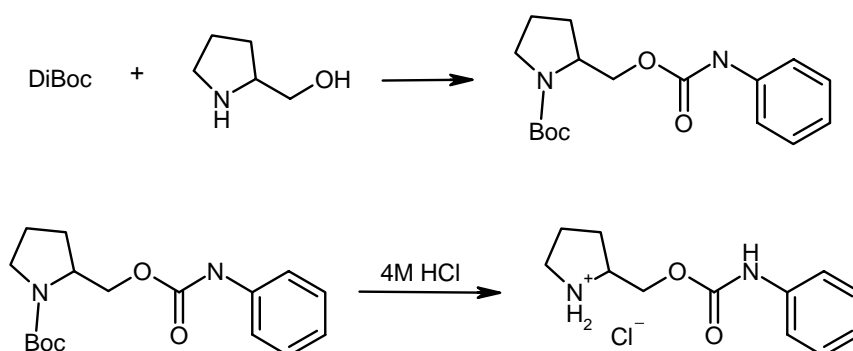


Abbildung 81: Umsetzung von Boc-geschütztem (R)-1-Pyrrolidin-2-yl-methanol mit Phenylisocyanat zum erwünschten Phenylcarbamate

Die Ausbeuten betragen für die Einführung der Schutzgruppen zwischen 80 und 98 % sowie für die Abspaltung der Schutzgruppen und gleichzeitiger Überführung in das Hydrochlorid zwischen 81 und 96 %.

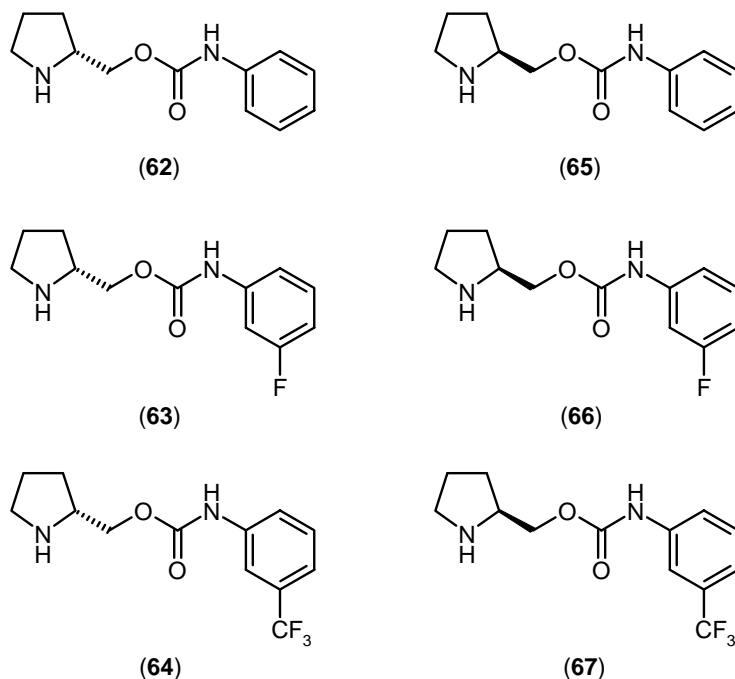


Abbildung 82: Strukturen hergestellter Phenyl-carbamidsäure-pyrrolidin-2-ylmethylester **62-67**

3.2.8 Herstellung von Phenyl-carbamidsäure-1-methyl-piperidin-2-ylmethylestern

Ein weiterer Heterozyklus, der sich in verschiedenen bekannten Nicotinrezeptor-Liganden findet (GTS-21 **37**^{226,232,356,357}, Anabasin **35**³⁵⁸, Lobelin **38**^{235,237}) und sich daher ebenfalls als Ersatz der Trimethylammonium-Struktur anbietet, ist das Piperidin-Ringsystem.

Die Phenylcarbamidsäure-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester **68-70** (Abbildung 83) wurden durch Umsetzung der jeweiligen Phenylisocyanate mit (1-Methyl-piperidin-2-yl)-methanol in Ausbeuten von 77 bis 99 %, hergestellt. Die Ausbeuten der Hydrochlorid-Fällung betragen zwischen 86 und 98 %.

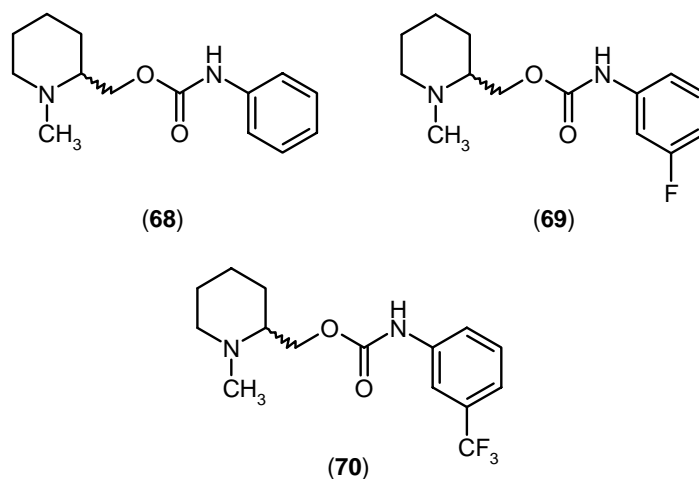


Abbildung 83: Strukturen der hergestellten Phenyl-carbamidsäure-1-methyl-piperidin-2-ylmethylestern 68-70

3.2.9 Herstellung von Phenyl-carbamidsäure-1-methyl-piperidin-3-ylestern

Um eine weitere Rigidisierung der Piperidinyl-phenylcarbamidsäureester **68-70** zu erreichen, wurde die Substitution des Heterozyklus von Position 2 auf 3 geändert, wobei der Abstand von zwei Kohlenstoffatomen zwischen den beiden Pharmakophor-Elementen, der basische Stickstoff des Heterozyklus und das Sauerstoffatom des Carbamates, nicht verändert wurde (Abbildung 77). Durch Umsetzung von 3-Hydroxy-1-methylpiperidin mit den jeweils substituierten Phenylisocyanaten wurden Phenylcarbamidsäure-1-methyl-piperidin-3-ylester **71-73** in Ausbeuten von 76 bis 85 % gewonnen (Abbildung 84).

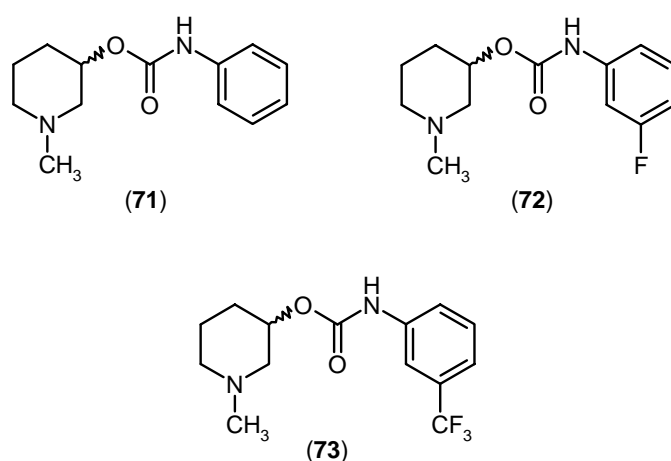


Abbildung 84: Strukturen der synthetisierten Phenyl-carbamidsäure-1-methyl-piperidin-3-ylester 71-73

Die entsprechenden Hydrochloride wurden in Ausbeuten von 86 bis 99 % erhalten.

3.2.10 Herstellung von Phenyl-carbamidsäure-1-chinuclidin-3-ylestern

Ein weiterer Stickstoff-haltiger Heterozyklus, der sich in einigen potenten Arzneistoffen findet, ist der Chinuclidinring (1-Aza-bicyclo[2.2.2]octan). Substanzen mit diesem Heterozyklus verfügen über sehr unterschiedliche Wirkungen; so fungiert z.B. Aceclidin (Glaukostat[®]) als direktes Parasympathomimetikum, Benzoclidin als Antihypertonikum und Sedativum, Mequitazin als Antihistaminikum und Sedativum, Quinupramin als trizyklisches Antidepressivum sowie Chinin als Antimalariamittel und Muskelrelaxans (Limptar[®] N, Chininum hydrochloricum 0,25 g[®]). Größere Bedeutung kommen Chinuclidinderivaten auch als Modulatoren von Serotoninrezeptoren (5-HT₃ Rezeptoren) zu. Als Beispiele sind hier zu nennen: MKC-733 (Mitsubishi, Japan) und Azasetron (Antiemetikum Serotone[®], Japan). Kürzlich berichteten Macor et al. dass 5-HT₃-Rezeptorenmodulatoren wie Tropisetron **93** [siehe 4.1 Radioligand-Bindungsstudien an Serotoninrezeptoren (5-HT_{3A})] Affinität zum $\alpha 7$ -Rezeptor zeigen³²². Weiterhin veröffentlichten Mullen et al. im Jahre 2000 die Spiro-oxazolidinon-Verbindung AR-R17779 **43**, die ebenfalls über einen Chinuclidinring verfügt. Diese Substanz stellt einen selektiven und hochaffinen $\alpha 7$ -Rezeptor Agonist dar^{320,321}. Einige weitere Wirkstoffe mit Chinuclidin-Partialstruktur und hohen Affinitäten zu Nicotinrezeptoren (**74** & **75**) finden sich in Patenten der Firmen Astra, Pharmacia und Novartis^{343,359,360,361,362}. Der Phenylcarbamidsäure-1-chinuclidin-3-ylester **74** wurde bereits von Naito et al. als M₁-selektiver Muskarinrezeptor-Antagonist beschrieben, jedoch veröffentlichte die Arbeitsgruppe keinerlei Daten dieser Verbindung über Effekte an Nicotinrezeptoren³¹⁴.

Es finden sich in der Literatur folglich mehrere Befunde, dass Substanzen die über den basischen Stickstoff-haltigen Heterozyklus Chinuclidin verfügen, mit cholinergen Strukturen interagieren. Daher bietet sich diese Ringstruktur als potentieller Ersatz der Trimethylammonium-Partialstruktur zur Herstellung $\alpha 7$ -Subtypselektiver Rezeptor-Liganden an.

Für einige 3-Aminochinuclidin-amide, die große Ähnlichkeit zu den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Chinuclidin-3-yl-phenylcarbamidsäureester **74-76** aufweisen, ist in der Literatur eine ausgesprochene Enantioselektivität (R) beschrieben worden^{363,364}. Um überprüfen zu können, ob diese Enantioselektivität auch bei Phenylcarbamaten auftritt, ist z.B. eine enantioselektive Synthese notwendig. Da jedoch das Enantiomeren-reine

Edukt Chinuclidin-3-ol nicht kommerziell erwerblich ist, wurde zunächst das jeweilige Razemat der Carbamate **74-76** synthetisiert.

Die Herstellung der Phenylcarbamidsäure-1-chinuclidin-3-ylester **74-76** erfolgte durch Reaktion des entsprechend substituierten Phenyisocyanats mit Chinuclidin-3-ol (1-Azabicyclo[2.2.2]octan-3-ol) in Ausbeuten von 70 bis 88 %. Die Ausbeute für das unsubstituierte Derivat lag im Vergleich zu anderen Synthesen dieses Typs deutlich niedriger (46 %), wobei die Ursache für dieses Ergebnis unklar ist.

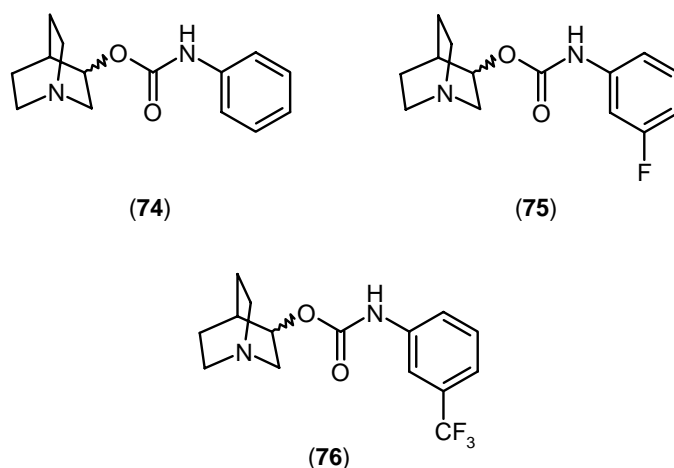


Abbildung 85: Strukturen der synthetisierten Phenylcarbamidsäure-1-chinuclidin-3-ylester **74-76**

3.2.11 Herstellung von N-Methyl-chinuclidin-3-ol

Strukturell verfügt das Edukt zur Herstellung der Phenylcarbamidsäure-1-chinuclidin-3-ylester **74-76** (Chinuclidin-3-ol) bereits über eine Cholin-artige Partialstruktur. Daher ist nicht auszuschließen, dass die Interaktion von Chinuclidin-Derivate mit nAChR über den Alkohol an sich zustande kommt. Aus diesem Grund sollten sowohl Chinuclidin-3-ol und sein methyliertes Analogon **77** an Nicotinrezeptoren getestet werden.

Die Methylierung des Alkohols erfolgte nach beschriebener Methode durch Umsetzung von Methyljodid mit Chinuclidin-3-ol. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 52 % erhalten.

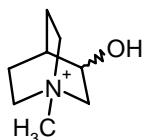


Abbildung 86: Strukturformel von *N*-Methyl-chinuclidin-3-ol 77

3.3 Besonderheiten der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der hergestellten Phenylcarbamate

3.3.1 Phenylring

Sowohl die ^{13}C - als auch die ^1H -Spektren der Fluor- und Trifluormethyl-substituierter Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, weisen Besonderheiten im Aromatenbereich auf. Der mit zwei verschiedenen Resten substituierte Phenylring stellt theoretisch ein ABCD-Spin-System im ^1H -Spektrum dar, was ohne Einbeziehung von Fernkopplungen zu folgenden Signalen führen sollte³⁶⁵:

H₁: Singulett

H₂: Duplett

H₃: Triplett

H₄: Duplett

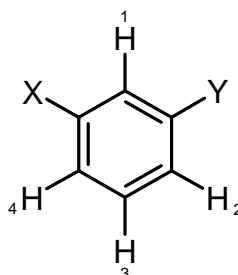


Abbildung 87: theoretisches Spin-System eines mit zwei verschiedenen Resten in meta-Position substituierten Aromaten

Betrachtet man die Aromatensignale der hergestellten Fluor- und Trifluormethyl-substituierten Verbindungen im ^1H -Spektrum genauer, fällt auf, dass die Signale entgegen dem Schema der Abbildung 87 ein deutlich komplexeres Aufspaltungsmuster zeigen, als durch die Einbeziehung von Fernkopplungen zu erklären wäre. In den ^{13}C -Spektren zeigen die Fluor- und Trifluormethyl-Derivate ebenfalls zusätzliche Kopplungen bzw. Signale.

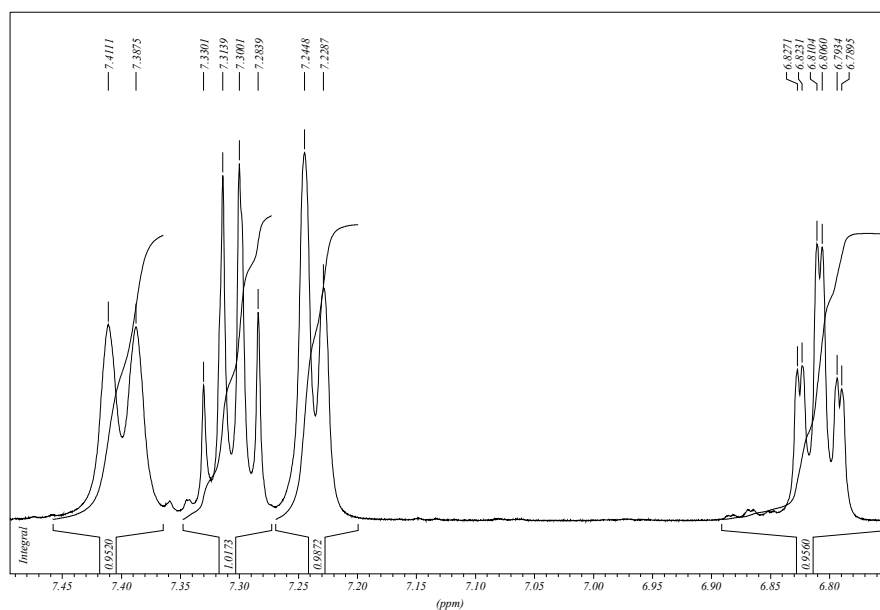


Abbildung 88: Teilausschnitt eines ^1H -NMR-Spektrum von (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester **75**

Diese Aufspaltung ist auf eine zusätzliche Kopplung der betrachteten Kerne mit ^{19}F -Atomen zurückzuführen, da diese wie ^1H - und ^{13}C -Isotope eine Spin-Quantenzahl (I) von $\frac{1}{2}$ aufweisen³⁶⁵.

Um den genauen Einfluss der Fluorkopplungen auf die Signale des ^1H -Spektrums zu untersuchen und eine eindeutige Signal-Struktur-Zuordnung zu gewährleisten, wurde von (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-chinuclidin-3-ylester **75** sowohl ein ^{19}F entkoppeltes (heteronukleare Spin-Entkopplung³⁶⁵), als auch ein unter Standardbedingungen aufgenommenes Spektrum angefertigt. Aufgrund der Gleichartigkeit der Kopplungensignale in allen hergestellten Fluor- bzw. Trifluormethyl-Verbindungen, soll im folgenden Abschnitt der Einfluss der Fluorkopplungen unter Einbeziehung der oben genannten Messtechniken exemplarisch anhand des (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-chinuclidin-3-ylesters **75** besprochen werden.

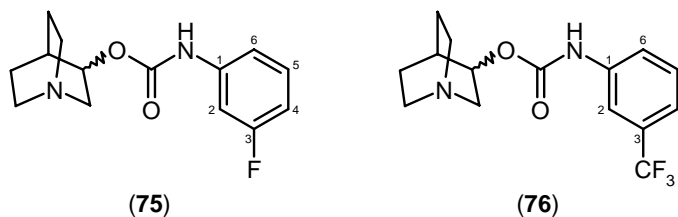


Abbildung 89: Strukturformeln von (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester **75** und (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester **76**

Vergleicht man die Spektren (Abbildung 88 & Abbildung 90), so fällt auf, dass der Wasserstoff in Position 2 des Phenylrings (siehe Abbildung 89), dessen Signal aufgrund seiner benachbarten Reste die größte Tieffeldverschiebung aufweist, im unter Standardbedingungen aufgenommenem Spektrum (Abbildung 88) zu einem Duplett (d; 7,39 ppm; $J = 11,75$ Hz) führt. Der gleiche Kern ruft im ^{19}F entkoppelten Spektrum (Abbildung 90) ein Singulett (s; 7,39 ppm) hervor. Die Signalveränderung ist anhand des Spektrenvergleichs eindeutig durch die Kopplung mit dem Fluoratom in Position 3 erklärbar. Die Kopplungskonstante des Dupletts fällt, bezogen auf den Literaturwert, aufgrund der benachbarten Carbamatfunktion etwas größer (11,75 statt 9 Hz) aus (siehe Tabelle 3.3-1 & Tabelle 3.3-2).

Das Wasserstoffatom in Position 5 (siehe Abbildung 89) sollte theoretisch zu einem Triplettsignal führen, dass im ^{19}F entkoppelten Spektrum (Abbildung 90) auch zu finden ist (t; 7,30 ppm; $J = 8,16$ Hz). Bei der Aufnahme des Spektrums unter Standardbedingungen (Abbildung 88) ist dieses Signal aufgrund der *meta*-Fluorkopplung deutlich mehr aufgespaltet (dt; 7,30 ppm; $J = 8,13$ Hz; $J = 6,92$ Hz), wobei die Kopplungskonstante zum Fluoratom geringfügig von den Literaturwerten abweicht (6,92 statt 5,7 Hz) (siehe Tabelle 3.3-1 & Tabelle 3.3-2).

Die Konstante der *para*-Kopplung des Wasserstoffs im Position 6 zum Fluor (Literatur: 0,2 Hz³⁶⁵) ist zu gering um noch aufgelöst zu werden, daher stimmt das Signal des Kerns in Position 6 in beiden Spektren überein (d; 7,23 ppm; $J = 8,5$ Hz).

Das Signal des H-Kerns in Position 4 ist durch die *ortho*-Kopplung zum Fluoratom ebenfalls verändert. Im ^{19}F entkoppelten Spektrum, ist diesem Kern ein durch Fernkopplungen zweifach aufgespaltetes Duplett zuzuordnen (ddd; 6,80 ppm; $J = 8,13$ Hz; $J = 2,63$ Hz; $J = 0,95$ Hz). Im Spektrum, das unter Standardbedingungen aufgenommen wurde, findet sich stattdessen ein „Duplett vom Triplett“ (dt; 6,80 ppm; $J = 8,39$ Hz; $J = 2,14$).

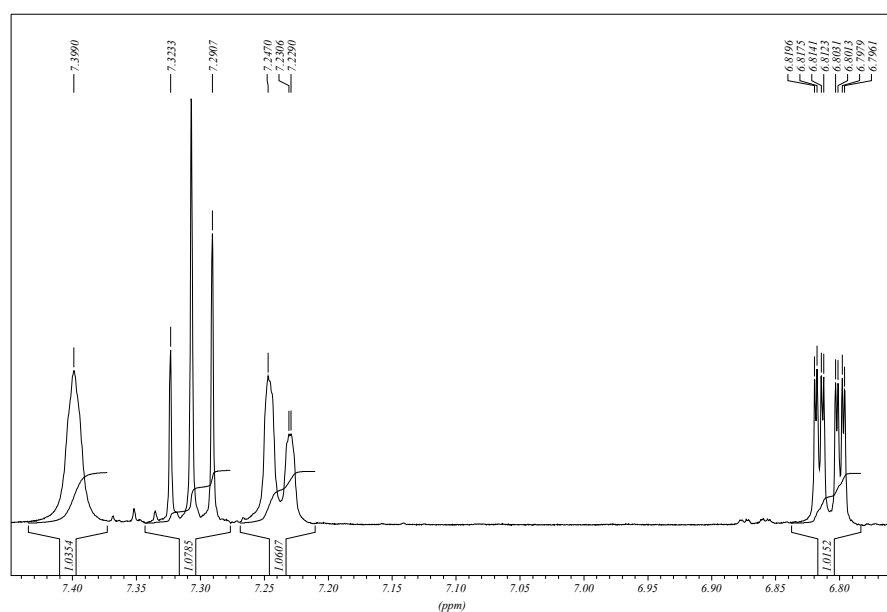


Abbildung 90: Teilausschnitt eines ^{19}F entkoppeltes ^1H -NMR-Spektrum von (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester **75**

Auf die Messung eines ^{19}F entkoppelten ^{13}C -Spektrums des Carbamidsäureesters **75** konnte verzichtet werden, da die Zuordnung der Signale eines unter Standardbedingungen aufgenommenen ^{13}C -Spektrums der Beispielsubstanz im Vergleich zum ^1H -Spektrum durch die großen Kopplungskonstanten zwischen Kohlenstoff und Fluor, den geringeren Signalmultiplizitäten und durch bessere Übereinstimmung der chemischen Verschiebung mit Inkrementsystemwerten deutlich leichter fällt. Vergleicht man zum Beispiel die Literaturwerte der Kopplungskonstanten der Fluor- und Trifluormethyl-Gruppe mit den tatsächlich bestimmten Werten der Substanzen (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-chinuclidin-3-ylester **75** und (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-chinuclidin-3-ylester **76** (siehe Tabelle 3.3-1 & Tabelle 3.3-2), so stellt man eine fast 100%ige Übereinstimmung dieser Werte fest.

Tabelle 3.3-1: Literaturangaben von ^1H , ^{19}F und ^{13}C , ^{19}F Kopplungskonstanten³⁶⁵

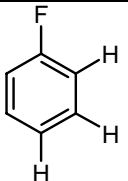
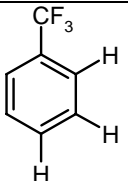
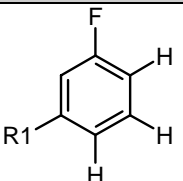
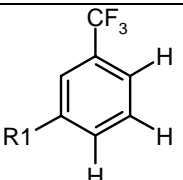
Verbindung	^1H Kopplungstyp	^1H Literatur J (Hz)	^{13}C Kopplungstyp	^{13}C Literatur J (Hz)
	$^3J(\text{H},\text{F})$ $^4J(\text{H},\text{F})$ $^5J(\text{H},\text{F})$	9,0 5,7 0,2	$^1J(\text{C},\text{F})$ $^2J(\text{C},\text{F})$ $^3J(\text{C},\text{F})$ $^4J(\text{C},\text{F})$	245 21 8 3
	$^1J(\text{H},\text{F})$ $^2J(\text{H},\text{F})$ $^3J(\text{H},\text{F})$ $^4J(\text{H},\text{F})$	keine Angaben	$^1J(\text{C},\text{F})$ $^2J(\text{C},\text{F})$ $^3J(\text{C},\text{F})$ $^4J(\text{C},\text{F})$	272 32 4 1

Tabelle 3.3-2: gemessene Kopplungskonstanten ^1H , ^{19}F und ^{13}C , ^{19}F von (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester **75**

Verbindung	^1H Kopplungstyp	^1H gemessene J (Hz)	^{13}C Kopplungstyp	^{13}C gemessene J (Hz)
	$^3J(\text{H},\text{F})$ $^4J(\text{H},\text{F})$ $^5J(\text{H},\text{F})$	11,75 6,92 nicht messbar	$^1J(\text{C},\text{F})$ $^2J(\text{C},\text{F})$ $^3J(\text{C},\text{F})$ $^4J(\text{C},\text{F})$	244,1 21,4 9,5 3,5
	$^1J(\text{H},\text{F})$ $^2J(\text{H},\text{F})$ $^3J(\text{H},\text{F})$ $^4J(\text{H},\text{F})$	nicht messbar	$^1J(\text{C},\text{F})$ $^2J(\text{C},\text{F})$ $^3J(\text{C},\text{F})$ $^4J(\text{C},\text{F})$	272,4 32,3 3,8 n.d.

3.3.2 Chinuclidin-Ringsystem

Das Chinuclidin-Ringsystem, dessen Bezeichnung von den China-Alkaloiden Chinin **78** und Chinidin abgeleitet wurde³³¹, weist eine stereochemische Besonderheit auf. Es verfügt durch seinen zentrosymmetrischen Aufbau über keinerlei Chiralitätszentren. Erst durch Substitution entsteht ein asymmetrischer Kohlenstoff und somit ein Enantiomerenpaar. Im verwendeten Chinuclidin-3-ol liegen folglich zwei Stereoisomere vor (3R & 3S), wobei zur Synthese das Razemat verwendet wurde^{366,367}.

Der zentrosymmetrische Aufbau des Chinuclidinrings erschwert die exakte Zuordnung der Signale in ^1H - und ^{13}C -Spektren, da bei einfacher Substitution die beiden verbleibenden unsubstituierten Brücken des Ringsystems nahezu chemisch und magnetisch identisch sind.

Die Zuordnung der ^{13}C -Signale erfolgte anhand des unter Standardbedingungen aufgenommenen ^1H -Breitband-entkoppelten Spektrums, einer DEPT-Aufnahme (distortionless enhancement by polarization transfer) und mittels Vergleich mit Literatur-bekanntem Werten des Chinuclidin-Ringsystems von Chinin **78** (siehe Abbildung 89)³⁶⁵.

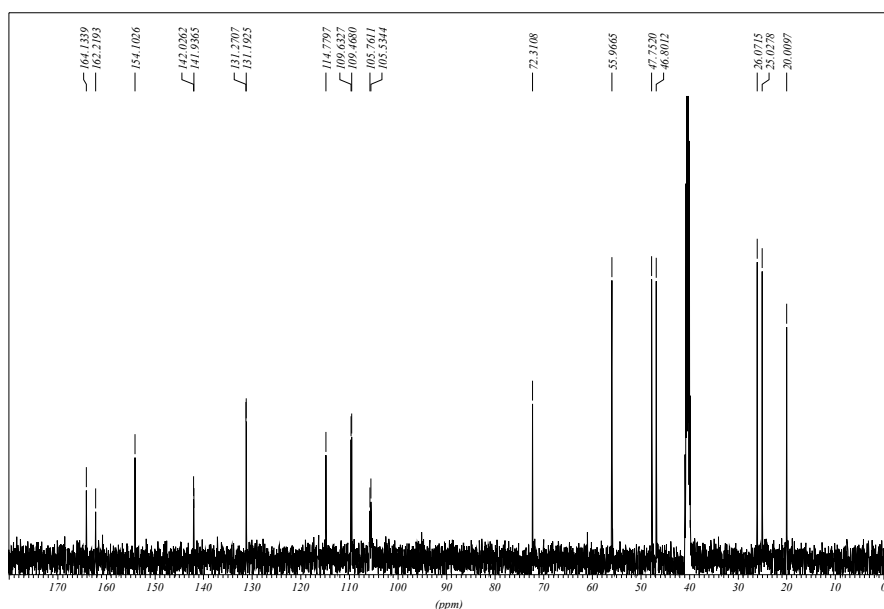


Abbildung 91: ^1H -Breitband-entkoppeltes ^{13}C -Spektrum von (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-chinuclidin-3-ylester **75**

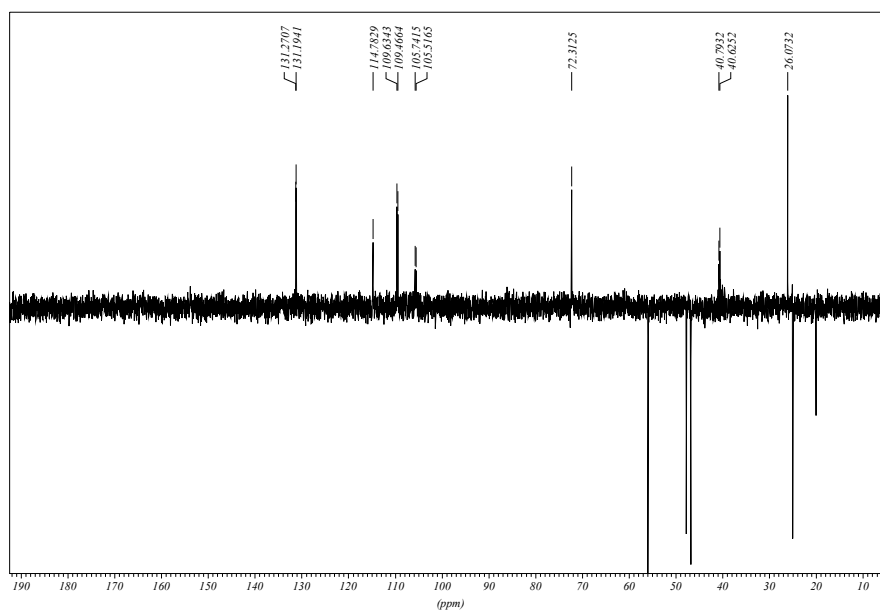
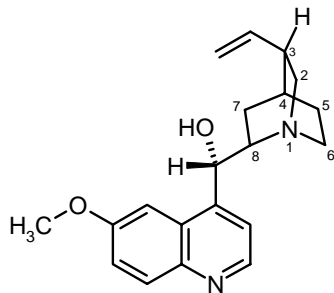


Abbildung 92: DEPT- ^{13}C -Spektrum von (3-Fluor-phenyl)-
 carbamidsäure-(R,S)-1-chinuclidin -3-ylester **75**
 (positive Signale = CH- und CH_3 -Gruppen; negative Signale = CH_2 -Gruppen)

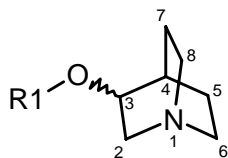
Tabelle 3.3-3: Literaturwerte der chemischen Verschiebung eines ^{13}C -Spektrum von Chinin **78** ³⁶⁵



Kern	δ (ppm)
2	57,0
3	40,0
4	27,9
5	21,6

Kern	δ (ppm)
6	43,2
7	27,7
8	60,1

Tabelle 3.3-4: ermittelte chemische Verschiebungen des Chinuclidin-Ringsystems von (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-chinuclidin-3-ylester **75**



Kern	δ (ppm)	DEPT Signal
2	55,9	CH ₂
3	72,3	CH
4	26,0	CH
5	20,0	CH ₂

Kern	δ (ppm)	DEPT Signal
6	46,8	CH ₂
7	25,0	CH ₂
8	47,7	CH ₂

Die exakte Signal-Struktur-Zuordnung der erhaltenen Signale des Chinuclidin-Ringsystems im ¹H-Spektrum (Abbildung 93), zu der sich in der Fachliteratur nur wenig detaillierte Angaben finden, ist aufgrund der nahezu chemischen und magnetischen Identität der beiden unsubstituierten Brücken des Ringsystems mit den unternommenen Messungen nur teilweise möglich. Zweidimensionale Spektren (COSY, NOESY, HSQC und HMQC) könnten zwar zur Vervollständigung der Signalzuordnung beitragen, da aber durch die Verwendung des käuflich erwerblichen Chinuclidin-3-ol, die Massenspektren und die ¹³C-NMR-Spektren die Identität des Chinuclidin-Ringsystems der hergestellten Verbindungen gesichert werden konnte, war die Aufnahme der aufwendigen 2-dimensionalen Spektren nicht erforderlich.

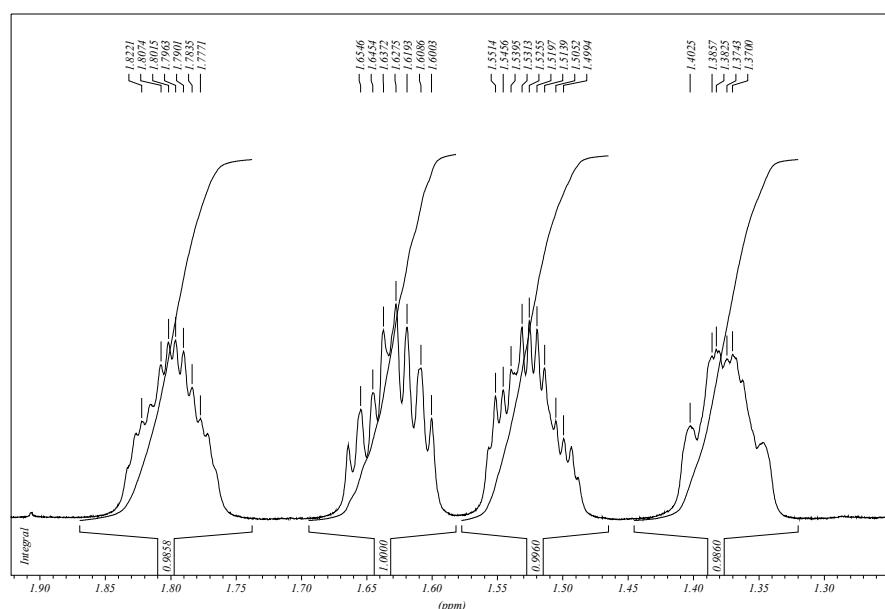


Abbildung 93: Teilausschnitt eines ¹H-NMR-Spektrum von (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-ylester **75** (Signale der CH₂-Gruppen in Position 5 und 7)

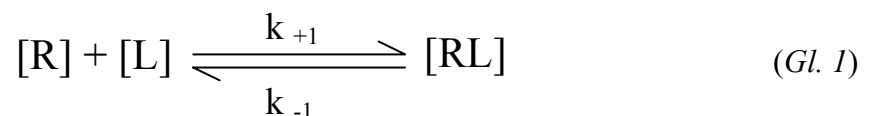
3.4 Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien

3.4.1 Theoretische Grundlagen der Radioligand-Bindungsstudien

Radioligand-Bindungsstudien sind wichtige Methoden zur pharmakologischen Untersuchung von Rezeptoreigenschaften. Mit ihrer Hilfe können Informationen über die Struktur und Funktion sowie über die Verteilung und Konzentration von Rezeptoren im Gewebe gewonnen werden. Weiterhin lassen sich mit diesem Verfahren Substanzen untersuchen, die mit spezifischen Bindungsstellen des Rezeptors wechselwirken oder um diese mit Radioliganden konkurrieren. Als Radioligand wird in der Regel ein radioaktiv markierter Wirkstoff bezeichnet, der hohe Affinität zum untersuchten Rezeptor aufweist³⁶⁸. In der vorliegenden Arbeit wurden Substanzen mit Hilfe der Radioliganden (\pm)-[³H]Epibatidin und [³H]Methyllycaconitin an Homogenaten aus Rattenhirnen, Schweine Nebennieren und des elektrischen Organs des kalifornischen Zitterrochen (*Torpedo californica*) untersucht.

Grundprinzip von Rezeptorbindungsstudien

Reversible Ligand-Rezeptor-Interaktionen lassen sich anhand des Massenwirkungsgesetzes (MWG) beschreiben.



Hierbei steht [R] für die Konzentration des Rezeptors, [L] für die Konzentration des Liganden und [RL] für die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe. Die Indizes k_{+1} und k_{-1} sind die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- bzw. Dissoziationsreaktion der Rezeptor-Ligand-Komplexe.

Die Assoziationsgeschwindigkeit eines Liganden an das Rezeptorprotein ergibt sich dabei aus folgender Gleichung:

$$v_{\text{hin}} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] \quad (Gl. 2)$$

Dementsprechend berechnet sich die Dissoziationsgeschwindigkeit der Rezeptor-Ligand-Komplexe wie folgt:

$$v_{\text{rück}} = k_{-1} \cdot [\text{RL}] \quad (\text{Gl. 3})$$

Die Reaktion befindet sich im Gleichgewicht, wenn sich die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe nicht mehr ändert, d.h. wenn die Geschwindigkeit der Hin- und Rückreaktion genau gleich ist:

$$k_{+1} \cdot [\text{R}] \cdot [\text{L}] = k_{-1} \cdot [\text{RL}] \quad (\text{Gl. 4})$$

Der Quotient aus den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{+1}) und der Dissoziation (k_{-1}) ergibt die Gleichgewichtsdissoziations-Konstante K_D , die dem reziproken Wert der Gleichgewichtsassoziations-Konstanten K_A entspricht:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[\text{R}] \cdot [\text{L}]}{[\text{RL}]} = \frac{1}{K_A} \quad (\text{Gl. 5})$$

Die Gleichgewichtsdissoziations-Konstante K_D (Einheit: mol/l) entspricht exakt der Ligandkonzentration, bei der die Hälfte aller Rezeptoren besetzt sind, und ist so ein Maß für die Affinität des verwendeten Liganden zum Rezeptor.

Generell unterscheidet man zwei Haupttypen der Rezeptorbindungsexperimente: Sättigungs- und Konkurrenzexperimente³⁶⁹.

Sättigungsexperiment

In Sättigungsexperimenten wird die spezifische Radioligand-Bindung im Gleichgewichtszustand bei verschiedenen Konzentrationen des Radioliganden bestimmt. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit elf verschiedene Konzentrationen vermessen.

Die Sättigungsexperimente beruhen auf der Sättigungsisotherme nach Langmuir (Gl. 6). Aus dieser geht hervor, dass die Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes [RL], die auch als spezifische Bindung des Radioliganden betrachtet werden kann, dem Quotienten aus der Rezeptorkonzentration B_{max} , der Konzentration des ungebundenen Radioliganden [L] und der Dissoziations-Gleichgewichts-Konstante K_D entspricht.

$$[RL] = \frac{B_{\max} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (Gl. 6)$$

Die spezifische Bindung ergibt sich auch anhand der folgenden Überlegung:

$$\text{spez. Bindung} = \text{Gesamtbindung} - \text{unspez. Bindung} \quad (Gl. 7)$$

Durch Umformung der Sättigungsisotherme nach Langmuir (Gl. 6) lassen sich dadurch nachfolgend sowohl B_{\max} , als auch K_D berechnen.

Für die verwendeten Radioliganden ergaben sich folgende K_D -Werte an den untersuchten nAChR-Subtypen:

$\alpha 4\beta 2^*$:	(\pm)-[^3H]Epibatidin	$K_D = 10 \text{ pM}$ (Rattenhirn)
$\alpha 7^*$:	[^3H]Methyllycaconitin	$K_D = 1 \text{ nM}$ (Rattenhirn)
$\alpha 3\beta 4^*$:	(\pm)-[^3H]Epibatidin	$K_D = 50 \text{ pM}$ (Schweineebennieren)
$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$:	(\pm)-[^3H]Epibatidin	$K_D = 2 \text{ nM}$ (Torpedo calif. Elektroplax)

Kompetitionsexperimente

Mittels Kompetitionsexperimenten lässt sich die Affinität eines unmarkierten Liganden zum untersuchten Rezeptor ermitteln. Im heterologen Kompetitionsexperiment konkurrieren der Radioligand und die Testsubstanz um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor. Dabei wird die Konzentration des Radioliganden konstant gehalten, während die Testverbindung in steigender Konzentration eingesetzt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden meist neun Konzentrationen der jeweiligen Testverbindung vermessen.

Die ermittelte spezifische Radioligand-Bindung wird gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Konzentration des Inhibitors aufgetragen, wodurch sich ein sigmoider Verlauf des erhaltenen Graphen ergibt. Dieser Verlauf wird durch die „4-Parameter logistische Gleichung“ von Barlow und Blake (Gl. 8)³⁷⁰ beschrieben. Das Steigungsmaß (n) der Kurve entspricht dabei dem Hill-Koeffizienten (n_H) der Hill-Gleichung³⁷¹.

$$B_{\text{ges}} = \text{MIN} + \frac{\text{MAX} - \text{MIN}}{1 + (\text{IC}_{50}/10^{[\text{X}]})^{n_{\text{H}}}} \quad (\text{Gl. 8})$$

B_{ges} :	Gesamtbindung des Radioliganden
MIN:	Unteres Kurvenplateau = Gesamtbindung in Anwesenheit einer hohen Konzentration des nicht markierten Inhibitors
MAX:	Oberes Kurvenplateau = Gesamtbindung in Abwesenheit des Inhibitors
IC_{50} :	Wendepunkt des Sigmoids = Konzentration des Inhibitors, die die Bindung des Radioliganden um die Hälfte reduziert
[X]:	Konzentration des Inhibitors
n_{H} :	Maß für die Kurvensteilheit = Hill-Koeffizient

Der Wendepunkt der sigmoiden Kurve stellt den IC_{50} -Wert dar, also die Konzentration des Inhibitors, bei der die Hälfte aller vorhandenen Rezeptoren besetzt ist. Anhand des IC_{50} -Wertes lässt sich nach der Cheng-Prussoff-Gleichung (Gl. 9)³⁷² die Affinität des Inhibitors zum verwendeten Rezeptor berechnen:

$$K_{\text{I}} = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{[\text{L}]}{K_{\text{D}}}} \quad (\text{Gl. 9})$$

[L] steht dabei für die Konzentration und K_{D} für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden.

Die Affinität des Inhibitors (K_{I}) ist im Gegensatz zum IC_{50} -Wert ein von der Konzentration und der Art des verwendeten Radioliganden unabhängiges Affinitätsmaß.

Radioliganden und Radioaktivitätsbestimmung

Die verwendeten Radioliganden (\pm - ^3H]Epibatidin und ^3H]Methyllycaconitin) besitzen eine hohe Affinität zu den untersuchten Rezeptorsubtypen. Unter spezifischer Aktivität versteht man die Radioaktivität pro Massenanteil der markierten Verbindung, angegeben in MBq/mmol (Bq = Bequerel; entspricht der Anzahl von Zerfällen pro Sekunde = 1dps) oder in Ci/mmol (1 Curie = $3,17 \cdot 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde = $2,22 \cdot 10^{12}$ dpm). Je höher die spezifische Aktivität einer Substanz, desto weniger Masse des Radioliganden wird für den Assay benötigt. Andererseits führt eine hohe Aktivität zu einer verstärkten Radiolyse in der Radioligand-Lösung. Durch bestimmte

Vorsichtsmassnahmen, wie der Verwendung geeigneter Lösungsmittel, Lagerung bei -20 °C und Schutz vor UV-Licht kann die radiolytische Zersetzung der Radioliganden in Lösung minimiert werden³⁷³.

Die Messung der an den Rezeptor gebundenen Radioaktivität erfolgte aufgrund der geringen Strahlungsreichweite der von den verwendeten tritiierten Radioliganden emittierten β^- -Strahlung (18,6 keV) durch Flüssigkeits-Szintillationsspektrometrie.

Datenanalyse

Die Daten der Bindungsexperimente wurden nicht wie sonst üblich mit einer kommerziell erwerblichen Auswertungssoftware (GraphPAD, CURVEFIT) analysiert, sondern mit einem eigens für diesen Zweck geschriebenen Excelprogramm.

Die in den nachfolgenden Tabellen aufgeführten K_i -Werte sind, wenn nicht anders angegeben, die Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Experimenten. Ihre Berechnung erfolgte anhand der Cheng-Prussoff-Gleichung (Gl. 9)³⁷², wobei für den Parameter K_D der verwendeten Radioliganden folgende Werte verwendet wurden:

$\alpha 4\beta 2^*$:	(\pm)-[³ H]Epibatidin	$K_D = 10$ pM (Rattenhirn)
$\alpha 7^*$:	[³ H]Methyllycaconitin	$K_D = 1$ nM (Rattenhirn)
$\alpha 3\beta 4^*$:	(\pm)-[³ H]Epibatidin	$K_D = 50$ pM (Schweineebennieren)
$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$:	(\pm)-[³ H]Epibatidin	$K_D = 2$ nM (Torpedo calif. Elektroplax)

3.4.2 Projekt

Im Rahmen der Untersuchungen von Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) für Nicotinrezeptor-Liganden wurden die im Laufe der vorliegenden Arbeit synthetisierten Cholin- und Phenylcarbamate-Derivate (**45-48** & **53-77**) mittels Radioligand-Bindungsstudien an verschiedenen Subtypen der nAChR ($\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$) getestet. Die bereits in der Literatur bekannten Verbindungen Phenylcholinether **42**³⁰⁹, DMAE und TMAE (**53** & **56**)³⁴² (3.2 Carbamate) und die patentierten Chinuclidinderivate **74** & **75**³⁴³ wurden dabei erstmals auf ihre Affinität zu verschiedenen Nicotinrezeptoren untersucht.

Anhand der Radioligand-Bindungsstudien wurden folgende Informationen über die Struktur-Wirkungsbeziehung der hergestellten Carbamate an nAChR überprüft (Abbildung 94):

1. Auswirkung der Erweiterungs des Ethers zum Carbamat
2. Einfluss des Einbaus der quartären Aminofunktion in verschiedene N-Heterozyklen
3. Effekt der unterschiedlichen Substitution des Phenylrings

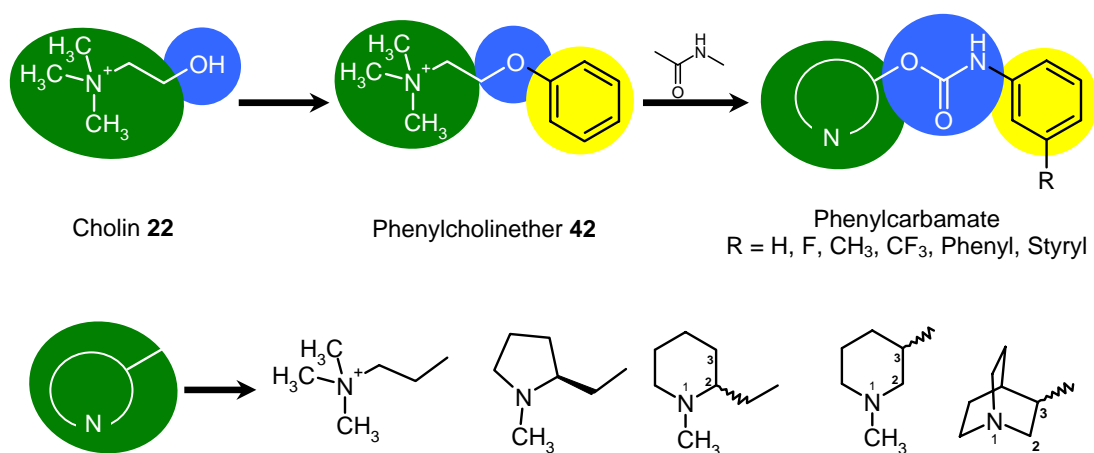


Abbildung 94: Strukturvariationen der von Phenylcholinether **42** abgeleiteten Phenylcarbamate

3.4.3 Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien

Phenylcholinether und abgeleitete Phenylcarbamidsäureester

Der Phenylcholinether **42** zeigte nanomolare Affinitäten zu allen untersuchten Nicotinrezeptoren ($K_i = 22\text{-}697$ nM), wobei man von einer Prävalenz zum $\alpha 4\beta 2^*$ -Subtyp sprechen kann ($\alpha 4\beta 2^* \leftrightarrow \alpha 7^* = 1:9$, $\alpha 4\beta 2^* \leftrightarrow \alpha 3\beta 4^* = 1:6$ & $\alpha 4\beta 2^* \leftrightarrow (\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta = 1:31$). Bemerkenswert ist, dass der Cholinether **42**, im Vergleich zu allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen, die höchste Affinität zum neuronalen $\alpha 4\beta 2^*$ -, zum ganglionären Subtyp $\alpha 3\beta 4^*$ -Rezeptor und zum Muskelsubtyp $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ besitzt.

Die Erweiterung des Cholinethers **42** um eine Amidstruktur zum Carbamat führte zu einer Umkehrung der Subtypselektivität. Bei annähernd gleicher Affinität ($K_i = 38,9$ nM) weist das Phenylcarbamate **56** eine $\alpha 7$ -Subtypselektivität auf. Dabei ist das Ausmaß

der Selektivität im Vergleich zur Ausgangsverbindung **42** deutlich erhöht ($\alpha 7^* \leftrightarrow \alpha 4\beta 2^* = 1:21$, $\alpha 7^* \leftrightarrow \alpha 3\beta 4^* = 1:56$ & $\alpha 7^* \leftrightarrow (\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta > 1:514$). Die Einführung eines Fluoratoms in Position 3 des Phenylrings führt zur Verbindung **57**, die im Vergleich zum Carbamat **56** verminderte Affinitäten zu den neuronalen Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$ und $\alpha 7^*$ aufweist. Eine Verbesserung der Affinität und vor allen Dingen der Subtypselektivität zum $\alpha 7^*$ -Rezeptor wird durch den Einbau einer Trifluormethyl-Gruppe in *meta*-Position des Phenylrings (Carbamat **58**) erreicht ($\alpha 7^* \leftrightarrow \alpha 4\beta 2^* = 1:207$, $\alpha 7^* \leftrightarrow \alpha 3\beta 4^* = 1:131$ & $\alpha 7^* \leftrightarrow (\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta > 1:689$).

Im Gegensatz zu den Trimethylammonium-Derivaten zeigen die Dimethylamino-Analoga **53-55** nur geringe Affinität zu den untersuchten nAChRs.

Tabelle 3.4-1: Bindungsaffinitäten des Phenylcholinester und abgeleiteter Phenylcarbamidsäureester für die Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ des nAChR

Struktur	Nr.	$\alpha 4\beta 2^*$ [³ H]EPI Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 7^*$ [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 3\beta 4^*$ [³ H]Epi Schweine- Nebenniere K _i (nM)	$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ [³ H]Epi Torpedo calif. Elektroplax K _i (nM)
	42	22,3 ± 4,3	196 ± 9,19	135 ± 11	697 ± 22
	53	> 20000	12836 ± 2.762	n.b.	n.b.
	56	835 ± 0,7	38,9 ± 2,9	2200 ± 45	> 20000
	54	> 20000	11000 ^a	23157 ^a	> 20000
	57	1412 ± 17	62 ± 3	2500 ± 35	n.b.
	55	> 20000	> 20000	n.b.	n.b.
	58	6000 ± 23	29 ± 3	3800 ± 120	> 20000

a: Anzahl unabhängiger Experimente n=2

n.b. = nicht bestimmt

Derivate mit Pyrrolidin-Partialstruktur

Bedingt durch die permanent geladene Struktur der Trimethylammonium-phenylcarbamate **56-58** ist es unwahrscheinlich, dass diese Verbindungen die BBB überwinden. Daher wurde versucht den für die Interaktion mit nAChR wichtigen basischen Stickstoff in einen Heterozyklus zu integrieren. Diese Substanzen liegen bei physiologischem pH-Wert ($\text{pH} = 7,4$) größtenteils in ihrer protonierten Form vor, die nach den gängigen Pharmakophor-Modellen (Abbildung 96) günstiger für eine Interaktion mit Nicotinrezeptoren ist³⁰. Jedoch sind diese Verbindungen in ihrer unprotonierten Form in der Lage, die BBB zu überwinden. Somit würden sich diese heterozyklischen Carbamate sowohl als Liganden für periphere, als auch für neuronale Nicotinrezeptoren im Organismus eignen.

Die Einbindung des Stickstoffs in einen basischen Heterozyklus führt außerdem, wie in Abbildung 95 zu sehen, zu einer Rigidisierung des verwendeten Cholin-Leitmotivs. Diese Einschränkung der freien Drehbarkeit des Moleküls ermöglicht möglicherweise Rückschlüsse auf die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Nicotinrezeptor-Liganden.

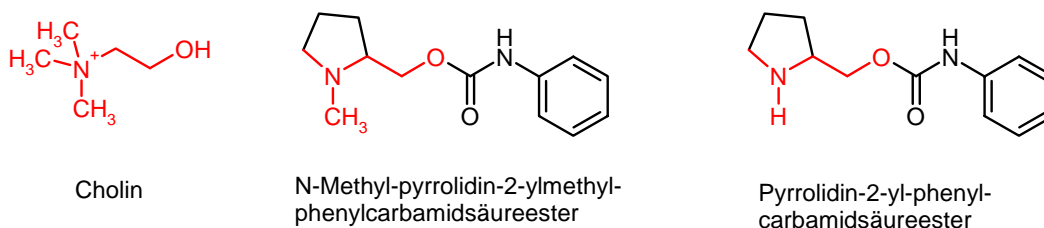


Abbildung 95: Rigidisierung von Cholin in N-Methylpyrrolidinen

Die vorgenommene strukturelle Veränderung der quartären Ammoniumstruktur führte jedoch im Fall der N-Methyl-pyrrolidin-Derivate nicht zu einer hohen Affinität und Selektivität zum $\alpha 7^*$ -Subtyp (Tabelle 3.4-2 & Tabelle 3.4-3).

Entgegen den Affinitäten der Ausgangsverbindung (**42**) und der Carbamate **56-58** interagieren die N-Methyl-pyrrolidin- **59-61** & **79-80** und Pyrrolidin-Analoga **62-67** kaum mit nAChR ($K_i = 1050$ bis >20000 nM), obwohl sie ebenfalls über einen quartären bzw. protonierbaren Stickstoff, eine Carbamat-Struktur als Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor und ein π -Elektronensystem verfügen. Diese gelten laut der Pharmakophor-Modelle als essentiell zur Interaktion mit Nicotinrezeptoren.

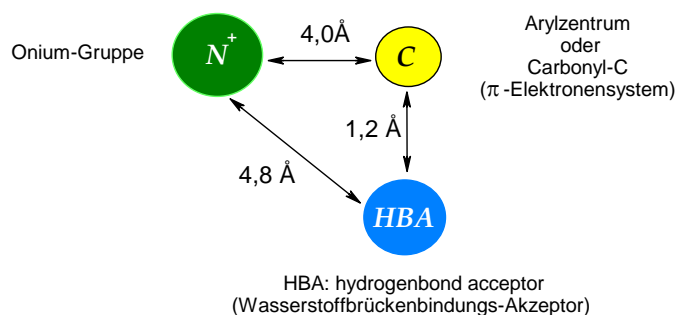


Abbildung 96: Pharmakophor-Modell nach Sheridan^{294,295}

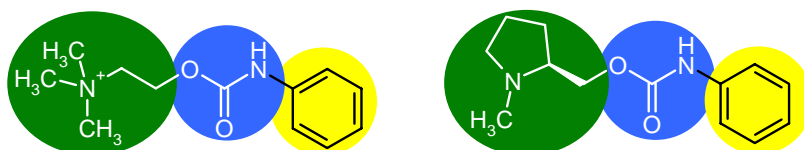
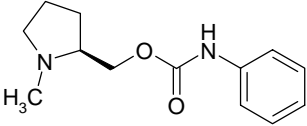
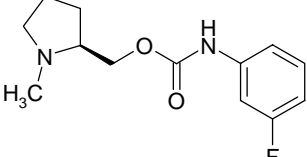
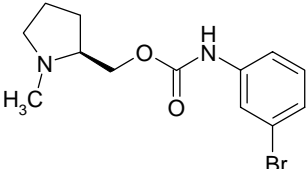
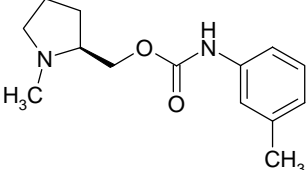
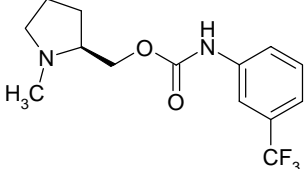


Abbildung 97: Pharmakophor-Elemente nach Sheridan in den Phenylcarbamaten **56** & **59**

Lediglich die N-Methyl-pyrrolidin-Derivate **59-61** & **79-80** weisen Affinitäten im mikromolaren Bereich zu den untersuchten Nicotinrezeptoren auf ($K_i = 1050-1633 \text{ nM}$), während die N-demethylierten Analoga **62-67** nahezu keine Interaktion mit nAChR zeigen ($K_i > 20000 \text{ nM}$) (Tabelle 3.4-2 & Tabelle 3.4-3). Die Phenylcarbamate **59-61** zeigen eine Selektivität zum $\alpha 4\beta 2^*$ -Subtyp, wobei das Brom-substituierte Derivat **79** die höchste Affinität ($K_i = 526 \text{ nM}$) besitzt. Zu den anderen untersuchten Nicotinrezeptoren $\alpha 7^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ & $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ verfügen die N-Methyl-pyrrolidin-phenylcarbamate **59-61** lediglich über eine Affinität im unteren mikromolaren Bereich. Vergleicht man den Einfluss der Substitution am Phenylring auf die Rezeptorbindung, so fällt auf, dass das unsubstituierte Derivat der Serie **59-61** die höchste Affinität zu den Subtypen $\alpha 7^*$ und $\alpha 3\beta 4^*$ besitzt.

Tabelle 3.4-2: Radioligand-Bindungsaffinitäten von *N*-Methyl-Pyrrolidinyl-phenylcarbamaten für die Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ des nAChR

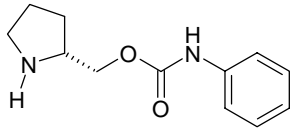
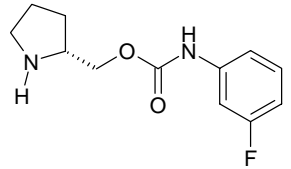
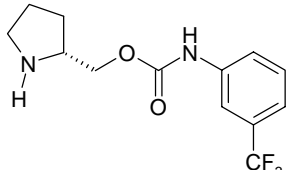
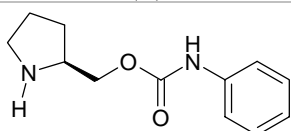
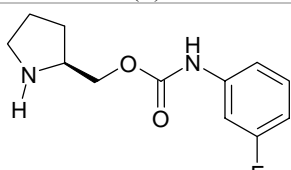
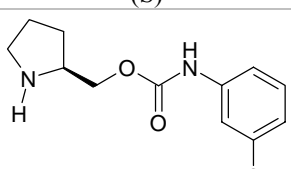
Struktur	Nr.	$\alpha 4\beta 2^*$ [³ H]EPI Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 7^*$ [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 3\beta 4^*$ [³ H]EPI Schweine- Nebenniere K _i (nM)	$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ [³ H]EPI Torpedo calif. Elektroplax K _i (nM)
 (S)	59	1100 ± 223	5853 ± 212	2582 ± 211	> 20000
 (S)	60	1633 ± 62	15000 ^a	13443 ^a	> 20000
 (S)	79*	526 ± 19	10810 ^a	6146 ± 294	n.b.
 (S)	80*	1248 ± 126	14108 ^a	6000 ^a	n.b.
 (S)	61	1050 ± 103	13000 ^a	7790 ^a	> 20000

a = Anzahl unabhängiger Experimente n=2

n.b. = nicht bestimmt

* = synthetisiert von Lenka Munoz

Tabelle 3.4-3: Bindungsaffinitäten von Pyrrolidinyl-phenylcarbamaten für die Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ des nAChR

Struktur	Nr.	$\alpha 4\beta 2^*$ [³ H]EPI Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 7^*$ [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 3\beta 4^*$ [³ H]EPI Schweine- Nebenniere K _i (nM)	$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ [³ H]EPI Torpedo calif. Elektroplax K _i (nM)
 (R)	62	> 20000	> 20000	n.b.	n.b.
 (R)	63	> 20000	> 20000	n.b.	n.b.
 (R)	64	> 20000	> 20000	n.b.	n.b.
 (S)	65	> 20000	> 20000	n.b.	n.b.
 (S)	66	> 20000	> 20000	n.b.	n.b.
 (S)	67	> 20000	> 20000	n.b.	n.b.

a = Anzahl unabhängiger Experimente n=2

n.b. = nicht bestimmt

N-Methyl-piperidinyl-phenylcarbamate

Ein weiterer Heterozyklus, der sich für den Ersatz der Trimethylammonium-Struktur anbietet, ist der N-Methyl-piperidin-Ring. Durch die unterschiedliche Substitution des Heterozyklus in Position 2 oder 3 kann die ursprüngliche Cholin-Teilstruktur, wie in Abbildung 98 abgebildet, schrittweise rigidisiert werden. Aus diesem Vorgehen wurden Informationen über die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Verbindung und die Einflüsse der Rigidisierung auf die Affinität und Subtypselektivität erhofft.

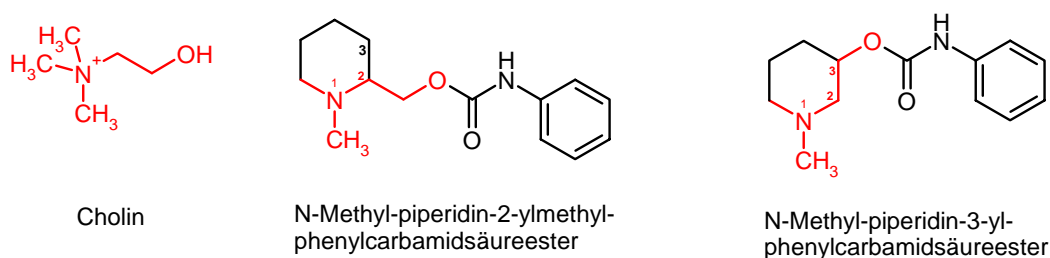
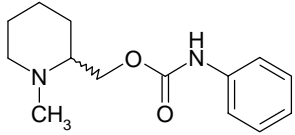
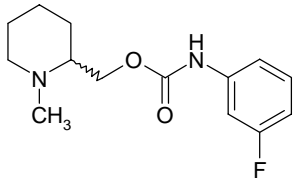
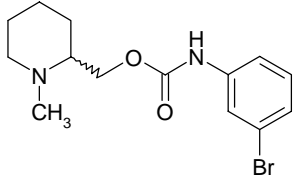
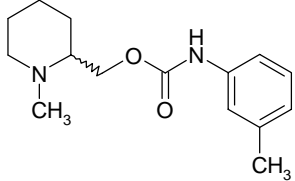
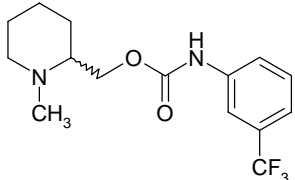


Abbildung 98: Rigidisierung von Cholin in unterschiedlich substituierten N-Methylpiperidinen

Die in Position 2 des Piperidinrings substituierten Analoga (**68-70** & **81-82**) interagieren sehr unterschiedlich mit Nicotinrezeptoren (Tabelle 3.4-4). Während die Phenylcarbamate **68-70** und **81** an den untersuchten Rezeptor-Subtypen lediglich eine Affinität im mittleren oder oberen mikromolaren Bereich besitzen, verfügt das Methyl-substituierte Derivat **82** dieser Serie über einen K_i -Wert von 175 nM am $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptor. Sehr auffällig ist in diesem Zusammenhang auch die Subtyp-Selektivität dieser Verbindung für den $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptor ($\alpha 4\beta 2^* \leftrightarrow \alpha 7^* = 1:181$, $\alpha 4\beta 2^* \leftrightarrow \alpha 3\beta 4^* = 1:82$ & $\alpha 3\beta 4^* \leftrightarrow \alpha 7^* = 1:2$).

Die vergleichsweise hohe Interaktion des Brom- und Methyl-substituierten Derivates (**81** & **82**) mit dem $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptor lässt einen Einfluss des positiven mesomeren Effekts [(+)-M-Effekt], also der Erhöhung der Elektronendichte im Phenylring, der Substituenten auf die Affinität vermuten. Der Fluor-Substituent im Derivat **69** weist wie die Brom- und Methyl-Reste in den Carbamaten **81** & **82** ebenfalls einen (+)-M-Effekt auf, jedoch verfügt Fluor über einen starken (-)-I-Effekt, der sich ungünstig auf die Interaktion mit dem $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR auswirkt.

Tabelle 3.4-4: Radioligand-Bindungsaffinitäten von *N*-Methyl-Piperidin-2-yl-phenylcarbamaten für die Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ des nAChR

Struktur	Nr.	$\alpha 4\beta 2^*$ [³ H]EPI Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 7^*$ [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 3\beta 4^*$ [³ H]EPI Schweine- Nebenniere K _i (nM)	$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ [³ H]EPI Torpedo calif. Elektroplax K _i (nM)
	68	> 20000	15000 ^a	6100 ^a	> 20000
	69	> 20000	22000 ^a	11392 ^a	> 20000
	81*	3770 ± 79	27000 ^a	6357 ^a	n.b.
	82*	175 ± 12	31800 ^a	14392 ^a	n.b.
	70	> 20000	13000 ^a	> 20000	> 20000

a = Anzahl unabhängiger Experimente n=2

n.b. = nicht bestimmt

* = synthetisiert von Lenka Munoz

Die Verbindungen mit Substitution in Position 3 des Piperidinrings (**71-73**) zeigen im Vergleich zu ihren Analoga (**68-70** & **81-82**) bevorzugt einen Effekt am $\alpha 7^*$ -nAChR (Tabelle 3.4-5). Ihre K_i-Werte liegen jedoch lediglich zwischen 2600 und 4400 nM. Die Interaktion dieser Carbamate mit den Subtypen $\alpha 3\beta 4^*$ und $\alpha 4\beta 2^*$ ist gering (K_i > 6900 nM). Auch für die drei Verbindungen dieser Serie ist ein Einfluss des Substituenten am Phenylring aufgrund der geringen Affinitätsunterschiede kaum festzustellen.

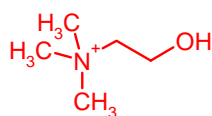
Tabelle 3.4-5: Radioligand-Bindungsaffinitäten von *N*-Methyl-Piperidin-3-yl-phenylcarbamaten für die Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ des nAChR

Struktur	Nr.	$\alpha 4\beta 2^*$ [³ H]EPI Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 7^*$ [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 3\beta 4^*$ [³ H]EPI Schweine- Nebenniere K _i (nM)	$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ [³ H]EPI Torpedo calif. Elektroplax K _i (nM)
	71	> 20000	3600 ^a	23712 ^a	> 20000
	72	> 20000	2600 ^a	6963 ^a	> 20000
	73	> 20000	4400 ^a	17303 ^a	> 20000

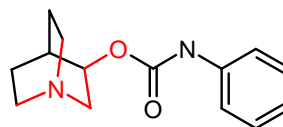
a = Anzahl unabhängiger Experimente n=2

Chinuclidinyl-phenylcarbamate

Ein weiterer Heterozyklus zur Rigidisierung der quartären Ammoniumstruktur ist der Chinuclidinring. Wie die Trimethylammonium-Verbindungen **56-58** zeigen auch die Chinuclidin-Derivate (**74-76** & **83-84**) hohe Affinität zum $\alpha 7^*$ -Subtyp (K_i = 37-321 nM). Die größte Selektivität besitzt dabei die Substanz **75** ($\alpha 7^* \leftrightarrow \alpha 4\beta 2^* = 1:113$, $\alpha 7^* \leftrightarrow \alpha 3\beta 4^* = 1:42$ & $\alpha 7^* \leftrightarrow (\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta > 1:536$).



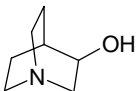
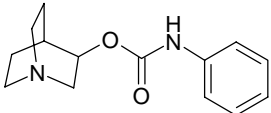
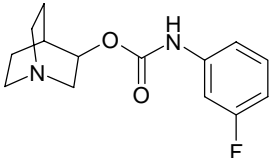
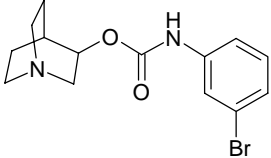
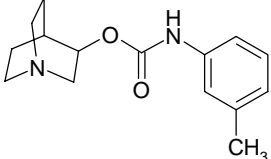
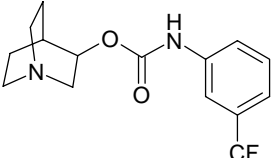
Cholin



Phenyl-carbamidsäure-1-
aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-yl-ester

Abbildung 99: Rigidisierung von Cholin in Chinuclidinphenylcarbamidsäureester

Tabelle 3.4-6: Radioligand-Bindungsaffinitäten von Chinuclidinyl-phenylcarbamaten für die Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ des nAChR

Struktur	Nr.	$\alpha 4\beta 2^*$ [³ H]EPI Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 7^*$ [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 3\beta 4^*$ [³ H]EPI Schweine- Nebenniere K _i (nM)	$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ [³ H]EPI Torpedo calif. Elektroplax K _i (nM)
	77	5924 ± 624	7761 ^a	14604 ± 869	n.b.
	74	3084 ± 132	44 ± 2,3	1627 ± 123	> 20000
	75	4203 ± 98	37,3 ± 5	1581 ± 22	> 20000
	83*	2988 ± 66	273 ± 25	715 (33)	n.b.
	84*	2695 ± 90	321 ± 3,5	1200 ± 66	n.b.
	76	1718 ± 67	173 ± 23	1200 ± 66	> 20000

a = Anzahl unabhängiger Experimente n=2

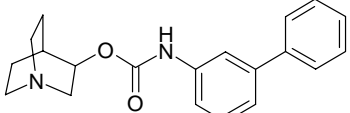
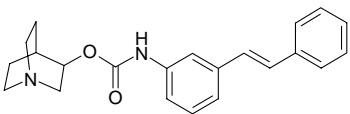
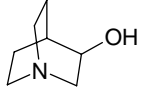
n.b. = nicht bestimmt

* = synthetisiert von Lenka Munoz

Das Ausgangsprodukt der Chinuclidin-Serie (Chinuclidin-3-ol **77**) wurde ebenfalls im Rahmen diese Radioligand-Bindungsstudien getestet, da der Alkohol selber ein rigidisiertes Cholin **22** darstellt. Mit dieser Maßnahme sollte ausgeschlossen werden, dass die hohe Affinität der Chinuclidin-phenylcarbamate einzig in der heterozyklischen Partialstruktur begründet ist. Die Studien ergaben, dass Chinuclidin-3-ol **77** mikromolare Affinität zu nAChRs besitzt (Tabelle 3.4-7).

Die Einführung der voluminöseren Phenyl- und Styryl-Substituenten in *meta*-Position des Phenylrings (Carbamate **85** & **86**) führte zu einem Affinitätsverlust an allen untersuchten nAChR, der besonders deutlich am $\alpha 7^*$ -Subtyp ausfällt. Generell scheint in dieser Serie die Affinität mit dem Volumen des Phenylring-Substituenten zu sinken.

Tabelle 3.4-7: Radioligand-Bindungsaffinitäten von Chinuclidinyl-phenylcarbamaten für die Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ des nAChR

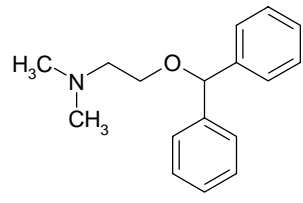
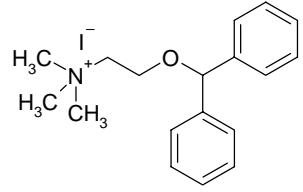
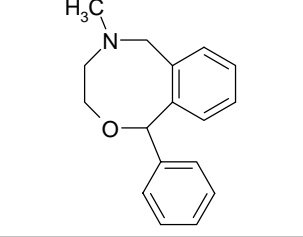
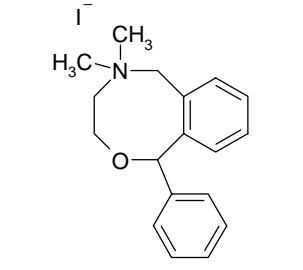
Struktur	Nr.	$\alpha 4\beta 2^*$ [³ H]EPI Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 7^*$ [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 3\beta 4^*$ [³ H]EPI Schweine- Nebenniere K _i (nM)	$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ [³ H]EPI Torpedo calif. Elektroplax K _i (nM)
	85*	7772 ^a	1135 ± 43	1448 ± 66	n.b.
	86*	5350 ^a	6100 ^a	5976 ^a	n.b.
	77	5924 ± 624	7761 ^a	14604 ± 869	n.b.

a = Anzahl unabhängiger Experimente n=2
n.b. = nicht bestimmt
* = synthetisiert von Lenka Munoz

Arzneistoffe und ihre methylierten Analoga

Zwei therapeutisch eingesetzte Arzneistoffe **45** und **46** mit Cholin-artiger Teilstruktur wurden erstmals an unterschiedlichen nAChR-Subtypen evaluiert. Beide Substanzen besitzen Affinität im mikromolaren Bereich zu $\alpha 4\beta 2^*$ - und $\alpha 7^*$ -nAChR (**45**: K_i = 4800 & 5920 nM; K_i = **46**: 8000 & 23000 nM) (Tabelle 3.4-8). Das H₁-Antihistaminikum Diphenhydramin **45** zeigt eine Tendenz zum $\alpha 7^*$ -Subtyp, wohingegen das Analgetikum Nefopam **46** Prävalenz zum $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptoren besitzt. Die Methylierung der Arzneistoffe zu **47** & **48** führte jeweils zu einer geringfügigen Erhöhung der Interaktion mit beiden untersuchten Subtypen, d.h. die Affinitäten liegen weiterhin im mikromolaren Bereich.

Tabelle 3.4-8: Radioligand-Bindungsaffinitäten der Arzneistoffe Diphenhydramin und Nefopam sowie ihrer methylierten Analoga für die Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ des nAChR

Struktur	Nr.	$\alpha 4\beta 2^*$ [³ H]EPI Rattenhirn K _i (nM)	$\alpha 7^*$ [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM)
	45	5920	4800
	46	4800	2900
	47	8000	23000
	48	3500	6800

3.4.4 Diskussion

Die Radioligand-Bindungsstudien der Phenylcholinether **42**, **47**, **48**; Pyrrolidinyll- **62-67**, N-Methyl-pyrrolidinyll- **59-61** & **79-80**, N-Methyl-piperidinyll- **68-73** & **81-82** und Chinuclidinyll-phenylcarbamate **74-76** & **83-86** ergaben unterschiedliche Subtypselektivitäten dieser Cholin-Abkömmlinge.

Anhand der Ergebnisse der Bindungsstudien konnten die vermuteten Wechselwirkungen des Phenylcholinethers **42** mit Nicotinrezeptoren belegt werden.

Bisher war für diese Substanz lediglich eine In-vitro-Hemmung der Monoaminoxidase (MAO) sowie ein Blutdruckanstieg nach i.v. Injektion (Katze) bekannt^{310,311}. Der Ether **42** zeigt eine gewisse Selektivität für den $\alpha 4\beta 2^*$ -Subtyp ($\alpha 4\beta 2^* \leftrightarrow \alpha 7^* = 1:9$, $\alpha 4\beta 2^* \leftrightarrow \alpha 3\beta 4^* = 1:6$ & $\alpha 4\beta 2^* \leftrightarrow (\alpha 1)\beta 1\gamma\delta = 1:31$), jedoch liegen die Affinitäten zu den anderen untersuchten Subtypen ebenfalls im nanomolaren Bereich ($K_i = 135-697$ nM). Interessant ist, dass **42** von allen mittels Radioligand-Bindungsstudien untersuchten Verbindungen die höchste Affinität zum ganglionären Subtyp ($K_i = 135$ nM) und Muskel-Subtyp ($K_i = 697$ nM) zeigt. Dabei ist die Interaktion mit den genannten Subtypen etwa 17- bzw. 28-fach stärker als die des korrespondierenden Carbamats **56**.

Vergleicht man die Affinitäten des Phenylcholinethers **42** zu nAChR mit denen der Ausgangsverbindung Cholin **22**, so führt die Erweiterung des Liganden um einen Phenylring zu einer deutlichen Steigerung der Affinität zu allen untersuchten Nicotinrezeptor-Subtypen (Cholin **22**: $\alpha 4\beta 2$: $K_i = 112$ μ M & $\alpha 7$: $K_i = 2,2$ mM; Phenylcholinether **42**: $\alpha 4\beta 2$: $K_i = 22,3$ nM & $\alpha 7$: $K_i = 196$ nM)^{195,196,329}.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Resultate der Bindungsstudien für die Verbindungen **53** (DMEA) und **56** (TMEA) charakterisieren die von Abood et al. erwähnten Befunde erstmals näher an verschiedenen Subtypen der nAChR³⁴². Die Arbeitsgruppe berichtete, dass die Carbanile **53** und **56** in milli- (**53**) bzw. mikromolaren (**56**) Konzentration zu einer Inhibition der spezifischen Bindung von (-)-[³H]Nicotin und [³H]Methylcarbamoylcholin in Rattenhirn-Membranpräparationen führen. Allerdings veröffentlichten sie für die Carbamate keine Affinitäten zu den einzelnen Subtypen der Nicotinrezeptoren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die drei hergestellten Trimethylammonium-Derivaten **56-58** nanomolare Affinitäten (29-62 nM) zum $\alpha 7^*$ -Rezeptor ermittelt, während sie an $\alpha 4\beta 2^*$ - und $\alpha 3\beta 4^*$ -Rezeptoren nur Affinitäten im oberen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich zeigten (835-6000 nM). Die Ergebnisse des Phenylcarbamates **56** korrelieren dabei mit Befunden von Schmitt et al., die für das Thiocarbamat-Analogon dieser Verbindungen einen K_i -Wert von 50 nM angaben (unveröffentlichtes Ergebnis, Verdrängung von (-)-[³H]Nicotin aus kortikalen Synaptosomen der Ratte)³⁰³.

Im Gegensatz zu den Trimethylammonium-phenylcarbamaten **56-58** zeigen die Dimethylamino-Carbamate **53-55** geringe bzw. keine Affinität zu den untersuchten nAChRs. Diese Tatsache ist konform mit den Ergebnissen einiger Substanzen, die von Sokilde et al. publiziert wurden. Die Arbeitsgruppe postulierte für ihre Verbindungen, dass quartäre Verbindungen vergleichsweise höhere Affinität zu nAChRs besitzen als ungeladene Substanzen³³⁰.

Die Phenylcarbamate **56-58** verfügen über hohe Affinität und Subtypselektivität zum $\alpha 7^*$ -Rezeptor und ihre Grundstruktur kann als neues Leitmotiv zur Entwicklung potenterer Liganden für diesen Subtyp betrachtet werden.

Die permanente Ladung der Vertreter dieser Carbamatserie verhindert vermutlich, dass sie die BBB überwinden, jedoch eignen sich diese Verbindungen aufgrund ihrer hohen Affinität und Subtypselektivität zur Untersuchung von peripheren Nicotinrezeptoren, insbesondere des $\alpha 7$ -Subtyps.

Die Rigidisierung der Aminofunktion in ein Pyrrolidin- (**59-67** & **79-80**), Piperidin- (**68-73** & **81-82**) und Chinuclidin-Ringsystem (**74-76** & **83-86**) führt überraschenderweise zu ganz unterschiedlichen Affinitäts- und Subtypselektivitätsprofilen.

Derivate, deren Aminofunktion in einen N-Methyl-pyrrolidinring eingebunden wurde (**59-61**), interagieren trotz Carbamat-Teilstruktur vorzugsweise mit $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptoren. Sie verfügen aber selbst zu diesem Rezeptor nur über eine mikromolare Affinität ($K_i = 1050-1633$ nM). Eine etwas höhere Affinität zum $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptor wurde für das Bromsubstituierte Derivat **79** ($K_i = 526$ nM) ermittelt, allerdings konnte ein genereller Einfluss von Phenylring-Substituenten mit starken mesomeren [(+)-M-Effekt] oder induktiven Effekten [(+)-I-Effekt] auf die Affinität dieser Verbindungen nicht beobachtet werden. Gleiches gilt auch für das Volumen dieser Reste.

Vergleicht man die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten N-Methyl-pyrrolidin-phenylcarbamate (**59-61**) mit ihren von Elliott et al. beschriebenen Etheranalogen der Firma Abbott, so weisen die Carbamate deutlich niedrigere Affinitäten zu nAChR auf ($\alpha 4\beta 2$: **59** $K_i = 1100$ nM, Etheranalogon $K_i = 42$ nM)³²⁷.

Ferner berichteten Abreo et al. für 3-(1-Methyl-pyrrolidin-2-ylmethoxy)-pyridin-Analoga der hergestellten Phenylcarbamate eine hohe Enantioselektivität (S-

Konfiguration) am $\alpha 4\beta 2$ -nAChR²²³. Da bereits die (S)-konfigurierten Pyrrolidinyl-carbanile **59-61** nur geringe Interaktion mit nAChRs zeigten, ist nicht zu erwarten, dass die Antipoden höhere Affinität zu Nicotinrezeptoren aufweisen.

Die N-Demethylierung der N-Methyl-pyrrolidin-phenylcarbamate (**59-61**) zu den Carbamaten **62-67** ging mit einem fast vollständigen Verlust der Interaktion mit Nicotinrezeptoren einher. Dies ist auf der einen Seite konform mit den Ergebnissen von Sokilde et al., die für ihre hergestellten Carbamate postulierten, dass quartäre Verbindungen vergleichsweise höhere Affinität zu nAChRs besitzen als ungeladene, tertiäre Substanzen. Auf der anderen Seite zeigen Verbindungen wie der Pyridylether ABT-089 **33**, der strukturelle Ähnlichkeit mit den Phenylcarbamate **62-67** aufweist, nanomolare Affinität zu $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs ($K_i = 16,7 \text{ nM}$)²²¹.

Eine mögliche Erklärung für die geringe Affinität der Pyrrolidin-phenylcarbamate **62-67** könnte der Pyridylthioether SIB-1553A **87** liefern ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 110 \text{ nM}$)(Abbildung 100)³⁵⁴.

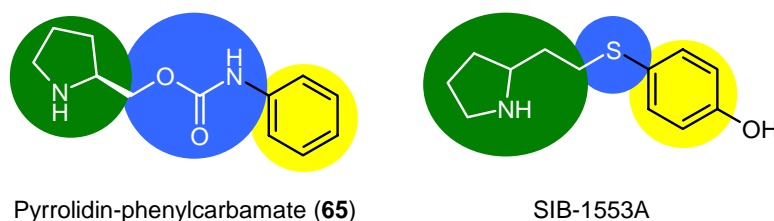


Abbildung 100: Strukturen des Pyrrolidin-phenylcarbamates **65** und SIB-1553A **87**

Die beiden Substanzen weisen unterschiedliche Abstände zwischen dem basischen Stickstoff und dem ersten Heteroatom auf (**65**: Sauerstoff und SIB-1553A **87**: Schwefel), der laut den gängigen Pharmakophor-Modellen maßgeblich für die Affinität zu Nicotinrezeptoren ist (1.11 Pharmakophor-Modelle für Nicotinrezeptoren). Dies liegt zum einen an der unterschiedlichen Anzahl der Kohlenstoffatome zwischen den Strukturelementen (O bzw. S zu NH), zum anderen an der räumlichen Anordnung der drei Strukturelemente zueinander (Abbildung 100 ,grün, blau und gelb). Letztere scheint bei dem Pyridylthioether **87** im Vergleich zu den Pyrrolidin-phenylcarbamaten **62-67** günstiger zu sein, was in einer höheren Affinität des Thioethers **87** zum $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor resultiert. Diese Hypothese soll in Zukunft durch die Herstellung von Pyrrolidin-phenylcarbamate-Analoga mit einem Abstand von drei Kohlenstoffatomen zwischen den Pharmakophor-Elementen überprüft werden.

Dem ungeachtet geht aus den Radioligand-Bindungsstudien für **59-67** hervor, dass die Pyrrolidin-Partialstruktur eher ungeeignet für die Entwicklung von subtypselektiven $\alpha 7^*$ -Carbamaten ist.

Für Carbamate mit N-Methyl-piperidin-Partialstruktur wurden in Abhängigkeit ihrer Substitution am Heterozyklus unterschiedliche Affinitäten und Subtypselektivitäten in den Bindungsstudien gefunden. Während die in Position 2 des Heterozyklus substituierten Phenylcarbamate **68-70** & **81** (Abbildung 101, Abbildung 102) an den untersuchten Rezeptor-Subtypen lediglich eine Affinität im mittleren oder oberen mikromolaren Bereich besitzen, verfügt das Methyl-substituierte Derivat **82** dieser Serie einen K_i -Wert von 175 nM am $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptor. Sehr auffällig ist auch die hohe Subtyp-Selektivität dieser Verbindung **82** für den $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptor ($\alpha 4\beta 2^* \leftrightarrow \alpha 7^* = 1:181$, $\alpha 4\beta 2^* \leftrightarrow \alpha 3\beta 4^* = 1:82$ & $\alpha 3\beta 4^* \leftrightarrow \alpha 7^* = 1:2$). Die im Vergleich zu den anderen Derivaten dieser Serie höhere Affinität des Brom- und Methyl-substituierten Derivates (**81-82**) zum $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptor lässt einen Einfluss des (+)-M-Effekts der Substituenten auf die Affinität vermuten. Der Fluor-Substituent im Derivat **69** weist wie die Brom- und Methyl-Reste in den Carbamaten **81** & **82** ebenfalls einen (+)-M-Effekt auf. Allerdings verfügt Fluor über einen starken (-)-I-Effekt, der sich womöglich ungünstig auf die Interaktion mit dem $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR auswirkt.

Die Positionsänderung der Substitution des Heterozyklus (Carbamate **71-73**) wirkt sich jedoch in einer verbesserten Affinität zum $\alpha 7^*$ -Subtyp aus (**68**: 15000 nM; **71**: 3600 nM). Dies ist vermutlich auf einen etwas günstigeren Abstand durch die Rigidisierung der Brücke zwischen den beiden postulierten Pharmakophor-Elementen (1.11 Pharmakophor-Modelle für Nicotinrezeptoren) zurückzuführen.

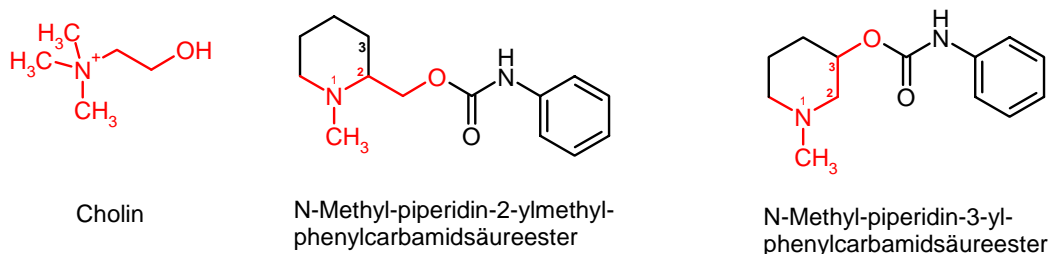


Abbildung 101: Rigidisierung von Cholin in unterschiedlich substituierten N-Methyl-piperidinen

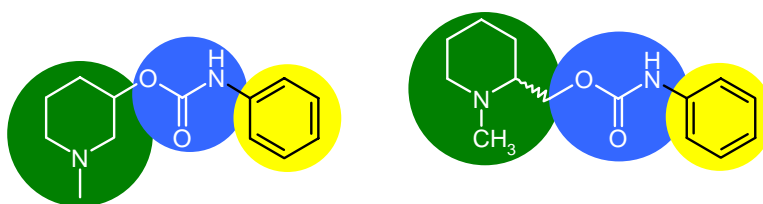


Abbildung 102: Pharmakophor-Elemente der Piperidin-phenylcarbamate nach Sheridan (siehe auch Abbildung 96)

Der Vergleich der Radioligand-Bindungsdaten mit Literaturwerten fällt schwer, da nur wenige Derivate mit ähnlicher Struktur bekannt sind. Die Phenylcarbamate **68-73** besitzen lediglich strukturelle Analogie zu Lobelin **38**. Jedoch konnte für die letztgenannte Verbindung gezeigt werden, dass neben dem Heterozyklus auch die beiden 2-Phenyl-ethyl-Seitenketten essentiell für die Interaktion mit nAChR sind^{235,207}. Den N-Methyl-piperidiny-phenylcarbamten fehlt möglicherweise eine zweite Seitenkette für die Interaktion mit Nicotinrezeptoren, daher wäre eine Erweiterung der Verbindung zur Überprüfung dieser Hypothese interessant.

Wie sich aus den Daten der Bindungsstudien ableiten lässt, scheinen die strukturellen Eigenschaften der Chinuclidinyl-phenylcarbamate **74-76** & **83-86** für Interaktionen mit nAChR sehr günstig zu sein, da alle Verbindungen dieser Serie gute Affinität und Selektivität zum $\alpha 7$ -Rezeptorsubtyp aufweisen.

Der Phenylcarbamidsäure-1-chinuclidin-3-ylester **74** wurde bereits von Naito et al. als M_1 -Muscarin-Antagonist beschrieben (M_1 : $K_i = 690$ nM). Aufgrund des Forschungsgebietes der Arbeitsgruppe an mAChR wurde die Substanz nicht auf mögliche Interaktion mit Nicotinrezeptoren untersucht³¹⁴. In dem Patent der Arbeitsgruppe Mazurov et al., die verschiedene Liganden mit Aktivität am $\alpha 7$ -nAChR zur Untersuchung der Neurotransmission entwickelt haben, findet sich ein K_i -Wert von 129 nM für diese Verbindung³⁷⁴. Dieser Wert liegt somit etwa in der Größenordnung wie die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Affinität des Carbamats **74** ($K_i = 44$ nM). Die potenteste Verbindung innerhalb dieser Serie (**74-76** & **83-86**) ist das Fluor-substituierte Derivat **75**, dessen Selektivität und Affinität zum $\alpha 7^*$ nAChR besser ist als die von (-)-AR-R17779 **43**. Diese kürzlich von AstraZeneca entwickelte Verbindung, die chemisch ein Spiro-Oxazolidinon mit Chinuclidin-Teilstruktur darstellt, ist der erste

bekannte Ligand, der in vitro eine $\alpha 7^*$ -Selektivität zeigt ($\alpha 7^*$: $K_i = 92 \text{ nM}$, [^{125}I] α -Bgt); $\alpha 4\beta 2^*$: $K_i = 16000 \text{ nM}$, (-)-[^3H]Nicotin)^{320,321}.

Der *para*-substituierte N-(4-Bromophenyl)-carbamidsäure-chinuclidin-3-ylester, der sich von dem Phenylcarbammat **83** einzig durch die Substitutionsposition am Phenylring unterscheidet, wurde von Dolle et al. und Macor et al. bereits beschrieben (u.A. als ^{11}C -markierter agonistischer Radiotracer)^{363,375}. Beide Arbeitsgruppen veröffentlichten aber keinen Affinitätswert für diese Verbindung. Dieser findet sich in einer weiteren Patentliteratur von Mazurov et al., die einen K_i -Wert von 40 nM für das Phenylcarbammat angibt³⁷⁴.

In dieser Serie von Carbanilen (**74-76** & **83-86**) ist möglicherweise im Gegensatz zu den anderen bereits beschriebenen Phenylcarbamaten (**56-73**) ein genereller Einfluss des Substituenten am Phenylring zu beobachten. Betrachtet man die Affinität der Verbindungen zum $\alpha 7^*$ -Rezeptor, so sinkt diese mit zunehmendem Volumen des Restes ($\text{H} = \text{F} > \text{CF}_3 > \text{Br} \approx \text{CH}_3 > \text{Ph} \gg \text{Styryl}$).

Jacobsen et al. beschrieben kürzlich eine Enantioselektivität (R-Enantiomer) für einige 3-Aminochinuclidin-amide, die den Phenylcarbamaten **74-76** & **83-86** strukturell sehr ähnliche sind³⁶³. Daher ist eine Überprüfung der Enantioselektivität der Chinuclidin-3-yl-carbanile **74-76** & **83-86** interessant, jedoch wäre selbst bei völliger Wirkungslosigkeit eines Enantiomers nur eine Steigerung der Affinität um 50 % zu erwarten.

Generell ist die Verbindungsklasse der Chinuclidinyl-carbanile aufgrund der hohen Affinität und Subtypselektivität seiner Vertreter als Leitstruktur zur weiteren Entwicklung noch potenterer $\alpha 7^*$ -Rezeptorliganden geeignet.

Betrachtet man die Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien, so sind folgende Ergebnisse festzustellen:

Obwohl in allen untersuchten Carbamatserien ähnliche Strukturelemente, d.h. ein quartärer oder protonierbarer Stickstoff, eine Carbamatfunktion und eine Teilstruktur mit einem π -Elektronensystem kombiniert wurden, ergeben sich je nach N-Heterozyklus unterschiedliche Affinitäts- und Subtypselektivitäts-Profile, die in der Abbildung 103 dargestellt sind.

Die Erweiterung der Etherstruktur der Ausgangsverbindung **42** um ein Amid zum Carbamat führte ausnahmslos zu einer Verschlechterung der Affinität zum $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR, jedoch wurde die Selektivität nicht generell auf einen anderen Subtyp umgekehrt.

Als besonders affin und subtypselektiv am $\alpha 7^*$ -Rezeptor erwiesen sich die Phenylcarbamate **56-58**, **74-76** und **83-84**, während der Phenylcholinether **42** mit den Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 3\beta 4^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ am stärksten interagierte.

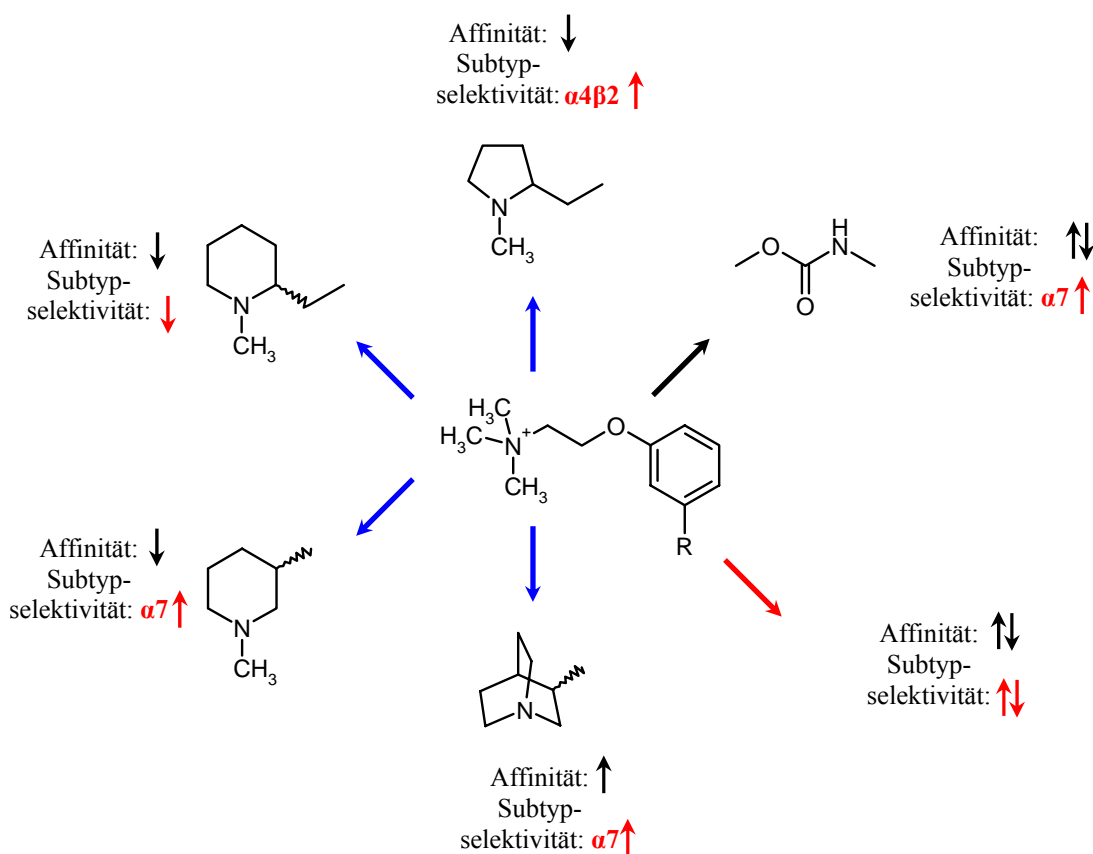


Abbildung 103: schematische Darstellung der unterschiedlichen Affinitäts- und Subtypselektivitätsprofile der von Phenylcholinether **42** abgeleiteten Phenylcarbamate (Angabe der Subtypen nur bei Erhöhung der Selektivität)

Ein prinzipieller Einfluss des Substituenten am Phenylring auf die Affinität oder Subtypselektivität der hergestellten Phenylcarbamate ist nicht festzustellen. Lediglich in der Serie der Chinuclidin-3-yl-phenylcarbamate **74-76** & **83-86** sinkt die Affinität der Verbindungen zum $\alpha 7^*$ -Rezeptor mit zunehmendem Volumen des Restes ($H = F > CF_3 > Br \approx CH_3 > Ph \gg Styryl$). Möglicherweise spielen auch induktive (I-Effekt) und mesomere Effekte (M-Effekt) der Substituenten eine Rolle. So erhöhen beispielsweise

Reste mit (+)-I- (-CH₃) und (+)-M-Effekt (-F, -Br & -CH₃) die Elektronendichte des Aromaten, während Substituenten mit (-)-I- (-F, -Cl, -Br & -I) und (-)-M-Effekt (-NO₂) diese erniedrigen [der (+)-M-Effekt des Fluors überwiegt möglicherweise dessen (-)-I-Effekt]³³². Eine hohe Ladungsdichte im Aromaten würde wiederum π - π -Wechselwirkungen begünstigen, die laut den gängigen Pharmakophor-Modellen große Bedeutung für die Bindung von Liganden am Rezeptor haben. Folglich würde die Verbesserung der Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor eine höhere Affinität bewirken.

Kritisch ist eine weitere Theorie zu betrachten, die postuliert, dass der Fluor-Substituent am Aromaten möglicherweise als Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor fungieren kann und somit die Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor verstärkt^{207,327}. Dies würde folglich auch in einer höheren Affinität resultieren. Theoretisch ist eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Fluoratom möglich³⁷⁶, jedoch postulierte Elliott et al. dies zum ersten Mal für eine Interaktion eines Liganden mit nAChR²⁰⁷.

Für einige Nicotinrezeptor-Liganden ist bekannt, dass die Konfiguration an den chiralen Kohlenstoffatomen entscheidenden Einfluss auf die Affinität der Verbindung zu nAChRs haben kann (z.B. Nicotin **1** & (-)-Epibatidin **15**, siehe 1.7 Nicotinrezeptor-Liganden). Inwieweit dieses auf die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Phenylcarbamate zutrifft, soll in weiteren Experimenten untersucht werden. Dies würde möglicherweise einige Rückschlüsse auf die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Phenylcarbamate zulassen, was wiederum hilfreich für die Entwicklung verbesserter, allgemeiner Pharmakophor-Modelle für Nicotinrezeptoren bzw. subtypspezifischer Modelle (α 7-Subtyp) sein kann.

3.5 Transfektion

3.5.1 Allgemeine Grundlagen der Transfektion

Unter Transfektion versteht man die Einschleusung einer Fremd-DNA in eine lebende eukaryotische Zelle. Bei erfolgreicher Transfektion ist die Zelle nachfolgend in der Lage, Proteine, deren genetische Information über die Fremd-DNA eingebracht wurde, zu exprimieren. In diesem Fall spricht man von einer heterologen Expression³⁷⁷.

Als Fremd-DNA findet in der Regel ein ringförmiges DNA-Molekül (Plasmid, auch als Vektor oder Genfähre bezeichnet) Anwendung. Dies enthält neben der gewünschten genetischen Information auch eine Promotorsequenz, die für eine hohe Transkriptionsrate des Gens sorgt. Antibiotika-Resistenzgene auf dem Plasmidvektor dienen als Selektionsmarker, die eine Abtrennung der untransfizierten Zellen ermöglichen und den Nachweis einer erfolgreichen Transfektion erbringen.

Ein Problem bei der Transfektion ist die negative Ladung der DNA, da es aufgrund der ebenfalls negativ geladenen Zelloberfläche zu einer gegenseitigen Abstoßung kommt und somit eine Penetration der DNA-Moleküle durch die Zellmembran verhindert wird³⁷⁷. Mittels verschiedener Verfahren lässt sich die Ladung der DNA kompensieren und so die Überwindung der Zellmembran gewährleisten, wobei im Folgenden lediglich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden der Lipofektion und Elektroporation näher beschrieben werden sollen.

Lipofektion

Das Verfahren wurde von Felgner et al. etabliert und im Laufe der Zeit weiterentwickelt³⁷⁸. Das Prinzip des zur Lipofektion verwendeten FuGENE® 6 Transfektions-Reagenzes beruht auf der Ultraschall-vermittelten Bildung von nicht-liposomalen DNA-Lipid-Komplexen. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen DNA des Plasmids und den kationischen Lipiden des Reagenzes³⁷⁹ führen zur Komplexbildung. Die entstandenen Komplexe fusionieren mit der ähnlich aufgebauten Zellmembran, worauf es zur Einschleusung der Plasmid-DNA in die Zelle kommt.

Generell unterscheidet man zwei Arten der Transfektion: zum einen die von uns

erwünschte *stabile Transfektion*, die zu einer Integration der eingeführten DNA in das Genom der Wirtszelle führt. Im günstigsten Fall verliert sich die genetische Information mit höheren Passagen nicht.

Zum anderen gibt es die *transiente Transfektion*, bei der die genetische Information der Genfahre nicht ins Zellgenom integriert wird. Die DNA liegt dann frei in der Zelle vor und führt zur kurzfristigen Bildung von großen Proteinmengen, mit dem Nachteil, dass die genetische Information mit steigender Passage verloren geht³⁷⁷.

Elektroporation

Das Prinzip dieser Transfektionstechnik beruht auf einem kurzen elektrischen Spannungsimpuls (Feldstärke: 250 bis 750 V/cm für 10 bis 100 ms) eines sich entladenden Kondensators, der zur Ausbildung von „Löchern“ in der Zellmembran führt und diese somit kurzzeitig permeabilisiert. Die Plasmid-DNA gelangt anschließend durch Diffusion in die Zelle und nachfolgend in den Zellkern³⁷⁷. Für die von Dower et al. beschriebene Methode der Elektroporation wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Nucleofector I von Amaxa Biosystems mit den dazugehörigen Küvetten des Nucleofector™ Kits V verwendet³⁸⁰.

3.5.2 Projekt

Das Ziel dieses Projektes war es, kultivierbare Zelllinien stabil mit dem $\alpha 7$ -nAChR zu transfizieren, da die Verwendung natürlicher Gewebe zur Untersuchung von nAChR mit einigen Nachteilen verbunden ist. In Hirn- und Organgeweben finden sich immer Mischpopulationen verschiedener Rezeptoren, was eine Untersuchung eines einzelnen Subtyps erschwert. Aufgrund der fehlenden selektiven Liganden für nAChR wird die Situation zusätzlich verschärft. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung natürlicher Organe ist die unterschiedliche Rezeptordichte im Gewebe.

Transfizierte Zelllinien, die nAChR heterolog exprimieren, würden diese Probleme umgehen. Durch geeignete Auswahl der Ausgangszelle könnten annähernd gleiche Bedingungen der Enzym- und Proteinausstattung wie im nativen Gewebe gewährleistet werden. Die Sicherstellung einer heterologen Expression des gewünschten Nicotinrezeptorsubtyps würde den negativen Einfluss durch Rezeptor-

mischpopulationen ausschalten. Da in einer Zellkultur nur einheitliche Zellen, die über die identische genetische Information verfügen, vorliegen, unterliegt die Dichte des zu untersuchenden Rezeptors wesentlich geringeren Schwankungen als in heterozellulären Geweben.

Aus diesen Gründen wird seit längerer Zeit versucht, Zelllinien zu etablieren, die nAChRs stabil exprimieren. Für $\alpha 4\beta 2$ -Nicotinrezeptoren ist dies unter Verwendung von HEK-293-, Xenopus-Oozyten und einigen weiterer Zelltypen gelungen^{381,382,383,384,385}.

Im Falle des $\alpha 7$ -Subtyps gestaltet sich die Transfektion deutlich schwieriger^{386,387}. Transfektionsversuche verschiedener Arbeitsgruppen führten teilweise nur zu transient transfizierten Zellen oder zu Zelllinien, die zwar das $\alpha 7$ -Rezeptorprotein aufwiesen, aber den Ionenkanal nicht funktionell exprimierten. Des Weiteren zeigten einige der transfizierten $\alpha 7$ -Rezeptoren, im Vergleich zu Rezeptoren aus nativen Geweben, leicht veränderte Eigenschaften (unterschiedliche Agonist-Effektstärken, veränderte whole-cell Ströme, unvollständige Rezeptorzusammensetzung)^{388,389,390}. Als gesichert gilt, dass der $\alpha 7$ -Nicotinrezeptor-Subtyp stabil und mit unveränderten Eigenschaften in Phäochromozytomzellen der Ratte (PC12) und SH-SY5Y-Neuroblastomzellen transfiziert werden kann²³. In beiden Zelltypen sind lediglich sehr geringe Mengen nativer mRNA verschiedener Nicotinrezeptor-Untereinheiten ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$) bzw. funktionelle nAChR nachzuweisen^{383,23,391,392,393,394,395,396,397}. Zur Erhöhung der Rezeptordichte macht es daher Sinn, die Zelllinien mit $\alpha 7$ -cDNA zu transfizieren²³.

Die Transfektion des unter 3.5.3 erwähnten Plasmids sollte mittels Lipofektion unter zu Hilfenahme von FuGENE[®] 6 Transfektions-Reagenz oder mittels Elektroporation mit einem Nucleofector I von Amaxa Biosystems erfolgen (siehe 3.5.1 & 6.4).

3.5.3 Das transfizierte Plasmid

Das zur Transfektion verwendete Plasmid wurde ursprünglich von Dr. H. Matsubayashi aus dem Arbeitskreis um Prof. Sakai im „Department of Molecular and Pharmacological Neuroscience“ der Universität Hiroshima zur Einführung des $\alpha 7$ -Rezeptors in HEK-293-Zellen hergestellt. Er benutzte für seine Versuche ein Plasmid (NP-54), das ihm vom Arbeitskreis um Prof. John Dani (Division of Neuroscience, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA) zur Verfügung gestellt wurde und

die genetische Information der Ratten-cDNA des $\alpha 7$ -nAChR und ein Ampicillinresistenz-Gen in sich trug (Daten nicht veröffentlicht). Aufgrund der alleinigen Ampicillinresistenz des Plasmids erwies sich diese Genföhre für die Arbeitsgruppe als ungünstig. Daher wurde beschlossen, die den $\alpha 7$ -Rezeptor codierende cDNA des NP-54-Plasmids auf einen Vektor mit anderen Resistenzeigenschaften zu übertragen. Durch Sequenzanalyse des von Prof. Dani gelieferten Vektors konnte die für den Rezeptor codierende Sequenz ermittelt werden. Nach Vervielfältigung der Plasmids wurde die betreffende Sequenz mit Hilfe der Endonukleasen HindIII und XbaI aus dem NP-54-Vektor herausgeschnitten und nach Aufreinigung unter Vermittlung der gleichen Enzyme in den neuen Vektor pcDNA3 5,4 kb (Invitrogen™ life Technologies, Tokyo Japan) integriert.

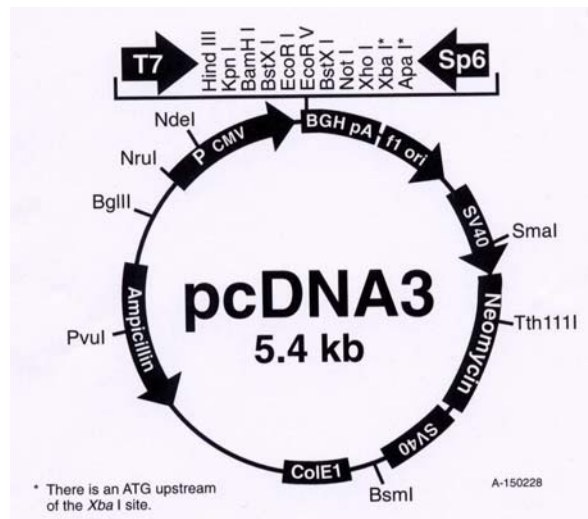


Abbildung 104: Plasmid pcDNA3 5,4 kb (Invitrogen™ Life Technologies, Tokyo, Japan)

Das auf diese Weise gewonnene neue Plasmid NP-74 verfügte nicht nur über eine Ampicillin-, sondern auch über eine Aminoglycosidantibiotika-Resistenz. Folglich wurde in allen weiteren Transfektionsversuchen, bei denen das Plasmid NP-74 zum Einsatz kam, das Aminoglykosid Geneticinsulfat als Selektionsfaktor zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion verwendet. Alle Arbeiten der Plasmid-Gewinnung wurden von Dr. H. Matsubayashi durchgeführt und sind bis heute unveröffentlicht.

Die Herstellung des verwendeten Vektors NP-74 und dessen Transfektion in HEK-293-Zellen war bereits vor Beginn des im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Projektes abgeschlossen. Für die transfizierten embryonalen Nierenzellen wurde die stabile Expression der Rezeptor-kodierenden mRNA und des $\alpha 7$ -Rezeptorproteins gesichert.

Die Funktionalität dieses Rezeptorproteins konnte aber mittels Patch-Clamp Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Die NP-74 transfizierten HEK-293-Zellen dienten als Positivkontrolle der erfolgreichen Transfektion von PC12- und SH-SY5Y-Zellen in Immunoblotting-Experimenten.

3.5.4 Rezeptorexpression in untransfizierten PC12 und SH-SY5Y-Zellen

Da untransfizierte PC12- und SH-SY5Y-Zellen je nach verwendetem Zellklon^{23,397,398} über geringe Mengen endogener $\alpha 7$ -Rezeptoren verfügen können^{23,397}, wurde das Ausmaß der natürlichen Expression dieses Rezeptors mittels Gel-Elektrophorese (SDS-Page, Immunopräzipitation) untersucht.

Die Abbildung 105 zeigt die Ergebnisse des Western-Blot mit Immunopräzipitation des $\alpha 7$ -nAChR für beide Ausgangs-Zelllinien. In den Kontrollbahnen (C) ist eindeutig eine Bande bei etwa 50 bis 55 kDa zu erkennen. Dieses Molekulargewicht entspricht ziemlich genau den Literaturangaben (~50-60 kDa) für das $\alpha 7$ -Rezeptorprotein^{23,24}, wobei die Masse des Proteins durch post-translationale Modifikationen (Phosphorylierung, Glycosylierung, Carboxylierung, Methylierung, Addition prosthetischer Gruppen, proteolytische Prozessierung) variieren kann^{23,24}. Sowohl die Bahnen der SH-SY5Y-, als auch diese beiden PC12-Zelllinien (A & B; nur die neuere Zelllinie B wurde zur Transfektion verwendet) zeigten keine Bande bei 50 bis 55 kDa. Es ist daher davon auszugehen, dass die verwendeten Zellen nicht über den $\alpha 7$ -nAChR verfügen bzw. die Rezeptorexpression unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode liegt.

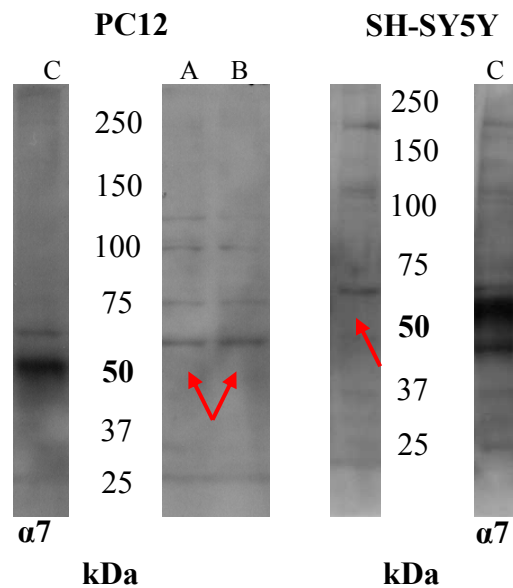


Abbildung 105: Western-Blot untransfizierter PC12-Zellen (links) und SH-SY5Y-Zellen (rechts)
 $\alpha 7$: Antikörper: AChRa7(H-302): sc-5544 (rabbit)
 & Antikörper goat anti-rabbit IgG HRP sc-2054
 A: PC12-Kolonie alt B: PC12-Kolonie neu C: Kontrolle

In der Abbildung 106 sind die Ergebnisse des Immunoblots der Neuroblastom- und Phäochromozytomzellen für die Untereinheiten $\alpha 4$ und $\beta 2$ abgebildet. Neben den untransfizierten PC12-Zellen wurden auch Zellen dieses Typs untersucht, die in NGF-haltigem Medium angezüchtet wurden. Als Positivkontrolle wurden HEK-293-Zellen verwendet, die nach Transfektion den $\alpha 4\beta 2$ -nAChR funktionell exprimierten. Aus der Abbildung für die SH-SY5Y-Zellen (linken Teil) geht hervor, dass diese nicht über die $\alpha 4$ -Untereinheit verfügen. Sie weisen jedoch die $\beta 2$ -Untereinheit auf, da sich auf Höhe der Vergleichsbande in der Bahn der Neuroblastomzelle eine schwache Bande des $\beta 2$ -Proteins befindet. Dieser Befund konvergiert mit bereits veröffentlichten Ergebnissen, die den $\alpha 3\beta 2$ -Rezeptor als den vorherrschenden Subtyp in SH-SY5Y-Zellen beschreiben^{383,391,392,393,394}.

Aus der Abbildung 106 (rechts) des Western-Blots der PC12-Zellen geht hervor, dass weder die in normalem, noch die in NGF-haltigem Medium angezogenen Zellen die Untereinheit $\beta 2$ exprimieren. Auf Höhe der Vergleichsbande der $\alpha 4$ -Untereinheit ist in den Bahnen der beiden PC12-Zelllinien lediglich eine leichte Verfärbung zu erkennen, die nicht als klare Bande interpretiert werden kann. Es ist aber nicht vollkommen auszuschließen, dass diese Zellen nicht doch über die $\alpha 4$ -Untereinheit verfügen. Da sich aber diese Bande kaum vom Untergrund abhebt, könnte es sich auch um Artefakt der

Antikörperreaktion handeln. Dies würde mit den Ergebnissen von Henderson et al. korrelieren, die ebenfalls die $\alpha 4$ -Untereinheit in PC12-Zellen nicht nachweisen konnten³⁹⁶.

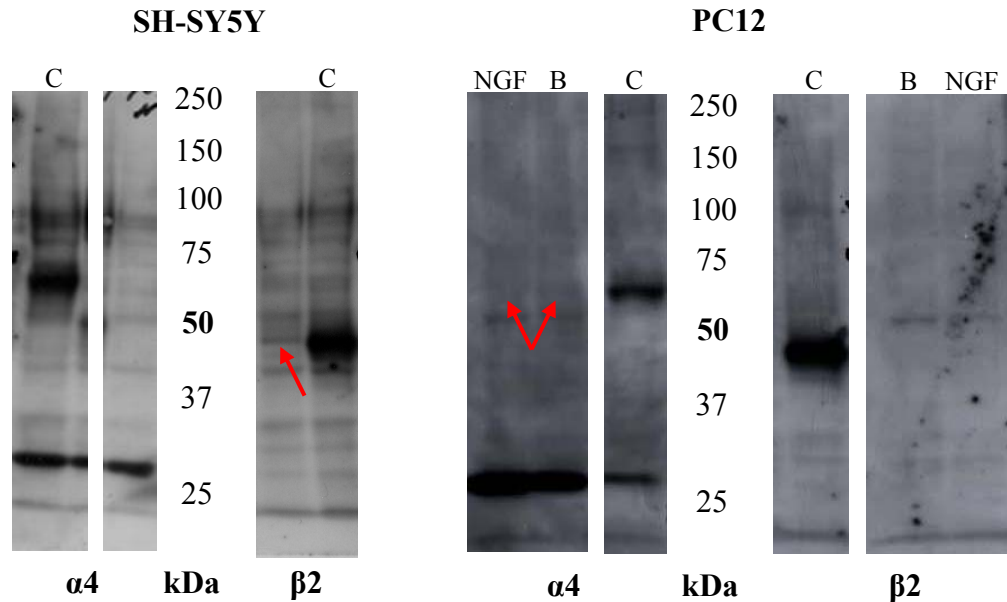


Abbildung 106: Western-Blot untransfizierter SH-SY5Y-Zellen und normaler bzw. NGF behandelter PC12-Zellen
 $\alpha 4$: Antikörper: AChR $\alpha 4$ (A-20): sc-5544 (rabbit)
 $\beta 2$: Antikörper: AChR $\beta 2$ (H-302): sc-5544 (rabbit)
 & Antikörper donkey anti-goat IgG HRP sc-2054
 B: PC12-Kolonie neu C: Kontrolle

3.5.5 Ergebnisse der Transfektion von PC12-Zellen

Zunächst wurde versucht, PC12-Zellen per Elektroporation zu transfizieren. Die ersten beiden Versuchsreihen schlugen fehl, da die Zellen direkt nach der erfolgten Elektroporation oder nach dem ersten Verdünnungsschritt (1:100, 1:1000, 1:5000) zur Selektion einzelner Kolonien im Geneticin-haltigem Medium abstarben. Aufgrund des Verlaufs der ersten beiden Ansätze wurde der dritte Elektroporationsversuch dahingehend variiert, dass die Zellen nach erfolgtem Stromimpuls zunächst in einem Selektionsmarker-freiem Medium herangezogen wurden, um ein stabiles Wachstum zu gewährleisten. Erst während des ersten Verdünnungsschrittes wurden sie dem selektierenden Antibiotikum ausgesetzt. Leider war auch dieser variierte Ansatz nicht erfolgreich.

Aus zwei nachfolgend unternommenen Lipofektionsversuchen konnten nach der jeweils

ersten Verdünnungsreihe 5 bzw. 61 Geneticin-resistente Einzelkolonien gewonnen werden. Von den insgesamt 66 Kolonien wuchsen 29 in Kulturschalen (6 cm) bis zur 80%igen Konfluenz heran und wurden per Western-Blot auf die Expression des $\alpha 7$ -Rezeptorproteins hin untersucht. In Abbildung 107 ist das Ergebnis des Immunoblots von 6 der untersuchten Zellklone (7, 13, 18, 19, 25, 28) zu sehen.

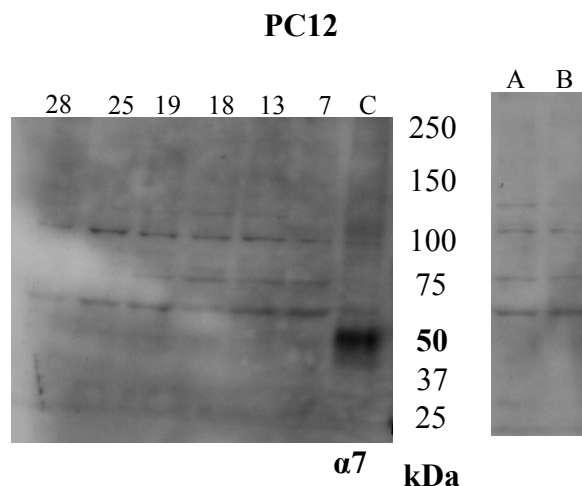


Abbildung 107: Western-Blot transfizierter PC12-Zellkolonien [7, 13, 18, 19, 25, 28] (links) und untransfizierter Zellen (rechts)
 $\alpha 7$: Antikörper: AChRa7(H-302): sc-5544 (rabbit)
 & Antikörper goat anti-rabbit IgG HRP sc-2054
 A: PC12-Kolonie alt B: Kolonie-neu C: Kontrolle

Man erkennt, dass weder eine der transfizierten Zellkolonien (7, 13, 18, 19, 25, 28), noch die beiden untransfizierten Vergleichskulturen A und B auf Höhe der Kontrolle (Bahn C) eine Bande für das Rezeptorprotein aufweisen. Das Ergebnis der abgebildeten Klone ist repräsentativ für alle weiteren gewonnenen Antibiotika-resistenten Kolonien der beiden Lipofektionsansätze. Trotz gelungener Transfektion, was sich anhand der Antibiotikaresistenz der Kulturen konstatieren lässt, ist keine der erhaltenen transfizierten Zellklone in der Lage, den Rezeptor zu exprimieren. Ein weiterer Hinweis auf eine erfolgreiche Transfektion ist die Tatsache, dass die PC12-Zellen analog zur Behandlung mit NGF eine Ausbildung von Neuriten zeigten. Dieser Befund konvergiert mit Ergebnissen von Utsugisawa et al., die dieses Zellverhalten nach Transfektion mit $\alpha 7$ -cDNA beschrieben²⁴. Ein Grund für das Fehlen des Rezeptorproteins trotz erfolgreicher Transfektion könnten u.A. mögliche Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Subklonen der PC12-Zellen sein (siehe 3.5.8 Diskussion der Transfektionsversuche).

3.5.6 Ergebnisse der „Differenzierung“ von PC12-Zellen durch NGF

Schon Greene und Tischler, die die PC12-Zelllinien aus Phäochromozytomzellen eines Nebennierentumors einer bestrahlten Ratte gewannen, berichteten, dass sich diese Zellen durch Zusatz von NGF im Nährmedium verändern lassen³⁹⁹. Wachstumsfaktor induziert kommt es in Anhängigkeit des Zellsubklons^{397,400} bei den ursprünglich sphärischen Zellen zur Ausbildung von Neuriten^{399,401}, zu einer Erhöhung der Anzahl Ionen leitender Kanäle^{384,388} (u.A. nAChR) und einem Anstieg der Genexpression (mRNA)^{396,402}. In Abbildung 108 ist die Veränderung der Zellmorphologie durch Neurit-Auswuchs der PC12-Zellen deutlich zu erkennen.

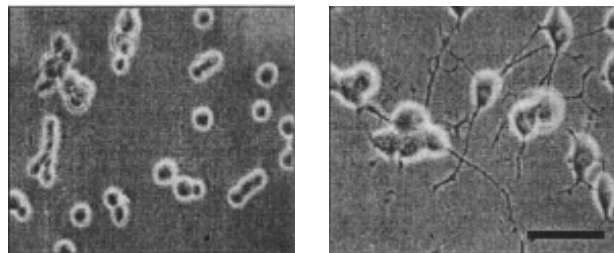


Abbildung 108: morphologische Unterschiede von PC12-Zellen vor und nach Behandlung (87h) mit NGF (50ng/ml)
links: unbehandelte Zellen rechts: behandelte Zellen
Skalierungsbalken = 50 μ m⁴⁰²

Die Differenzierung der PC12-Zellen hat durch Stimulation der Genexpression auch nachweislich Auswirkungen auf die Nicotinrezeptordichte in der Zelle. Da die verwendeten Phäochromozytomzellen bereits endogen über den $\alpha 7$ -Rezeptor verfügen, wurde durch den Zusatz von NGF zum Nährmedium eine veränderte und deutlich gesteigerte Expression von $\alpha 7$ -nAChR erhofft.

Um eine den $\alpha 7$ -Rezeptor exprimierende Zelllinie für Patch-Clamp-Experimente zu erzeugen, wurde dem Nährmedium von untransfizierten PC12-Kulturen NGF in einer Konzentration von 2,5 ng/ml zugesetzt. Nach einer Wachstumszeit von einer Woche zeigten die Wachstumsfaktor behandelten Zellen zwar die oben erwähnte morphologische Veränderung, jedoch waren weder Proteine der Untereinheit $\alpha 7$, noch der Untereinheiten $\alpha 4$ und $\beta 2$ mittels Western-Blot nachweisbar (Abbildung 109). Wie schon unter „3.5.4“ beschrieben, ist auf Höhe der Vergleichsbande der $\alpha 4$ -Untereinheit in den Bahnen der beiden PC12-Zellen eine leichte Verfärbung zu erkennen. Es handelt sich dabei vermutlich um ein Artefakt der Antikörperreaktion und nicht um das $\alpha 4$ -

Protein.

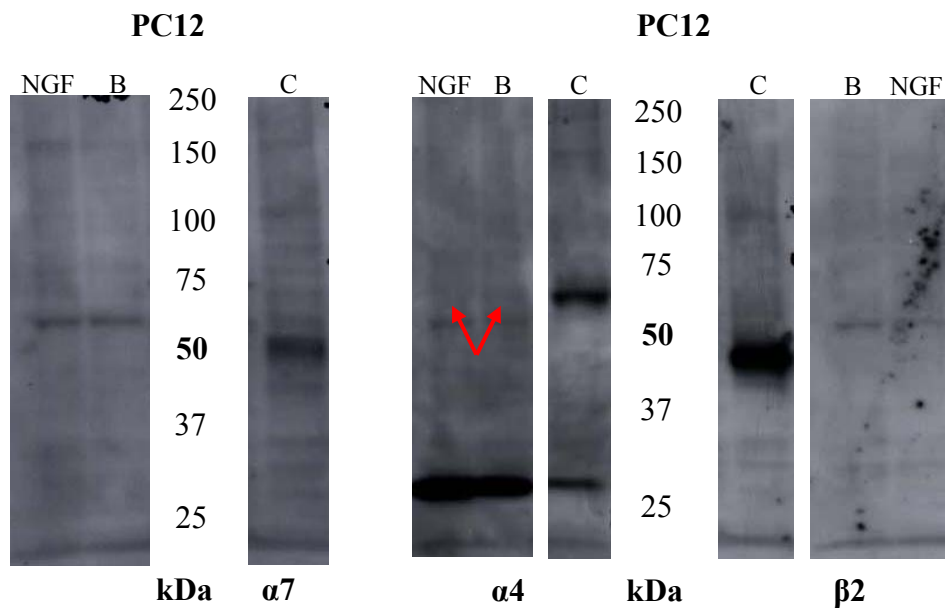


Abbildung 109: Western-Blot untransfizierter, NGF behandelter PC12-Zellen
 $\alpha 4$: Antiköper: AChR $\alpha 4$ (A-20): sc-5544 (rabbit)
 $\beta 2$: Antiköper: AChR $\beta 2$ (H-302): sc-5544 (rabbit)
 & Antiköper donkey anti-goat IgG HRP sc-2054
 $\alpha 7$: Antiköper: AChR $\alpha 7$ (H-302): sc-5544 (rabbit)
 & Antiköper goat anti-rabbit IgG HRP sc-2054
 B: Kolonie neu C: Kontrolle

3.5.7 Ergebnisse der Transfektion von SH-SY5Y-Zellen

Da sich die Lipofektion bei der Transfektion der PC12-Zellen als erfolgreich erwies, wurde diese Methode zunächst auch bei den SH-SY5Y-Zellen eingesetzt. In den ersten beiden Transfektionsversuchen der Neuroblastom-Zellen starben diese rasch im Selektionsmittel-haltigem Medium ab. Aus diesem Grund wurde erneut versucht die transfizierten Zellen zunächst in Genetecin-freiem Medium heranzuziehen, um ein stabiles Wachstum zu gewährleisten. Wie zuvor schon die Phäochromozytomzellen, starben auch die SH-SY5Y-Zellen unter Einwirkung des Antibiotikums im anschließenden Verdünnungsschritt vollständig ab.

Im Gegensatz zur Lipofektion führte der erste Versuch der Elektroporation direkt zum erwünschten Erfolg. Es konnten 96 Aminoglykosid-resistente Zellklone in Kulturschalen (6 cm) transferiert werden, von denen 76 bis zur 80%igen Konfluenz heranwuchsen. Die Untersuchung der Klone mittels Immunoblotting bestätigte, dass fast alle Zellkolonien das $\alpha 7$ -Rezeptorprotein in unterschiedlichem Ausmaß exprimierten. Die Abbildung 110 zeigt das Ergebnis von 8 transfizierten Zellklonen im

Vergleich zur Kontrolle C und der Ausgangszelllinie (ganz rechts). In der Bahn des Klons Nummer 4 ist gerade noch eine Bande auf Höhe des Vergleichs zu erkennen, was eine sehr geringe Expression vermuten lässt. Die Banden der Kolonien 6, 29 und 30 besitzen hingegen eine noch stärkere Intensität als die Kontrollbande C. Durch die vermutlich sehr hohe Dichte des $\alpha 7$ -Rezeptors in den erwähnten Klonen, eignen sich diese möglicherweise zur Untersuchung von Substanzen an den exprimierten Rezeptorensubtyp mittels Patch-Clamp Techniken.

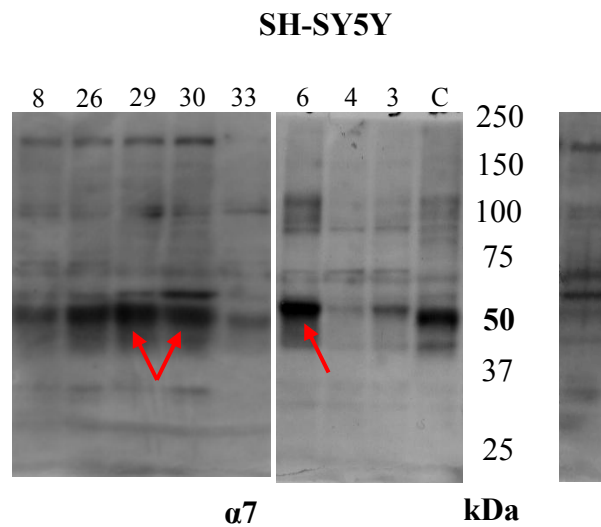


Abbildung 110: Western-Blot transfizierter SH-SY5Y-Zellklone [3, 4, 6, 8, 26, 29,30, 33] (links) und untransfizierter Zellen (ganz rechts) C: Kontrolle
Antikörper: AChR $\alpha 7$ (H-302): sc-5544 (rabbit)
& Antikörper goat anti-rabbit IgG HRP sc-2054

Von den 76 mittels Western-Blot untersuchten Zellklonen zeigten 41 Kulturen keine bis sehr schwache, 24 Kolonien mittlere und 11 Klone starke bis sehr starke Expression.

Um die Funktionalität des Rezeptorproteins zu überprüfen, wurden die Klone mit sehr intensiver Proteinbande im Western-Blot mittels Patch-Clamp-Experimenten untersucht.

Die nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 111 & Abbildung 112) zeigen jeweils zwei Nicotin-induzierte Stromsignale aus zwei unterschiedlichen Zellklonen (Nummer 9 & 29). Zur Unterdrückung von unerwünschten Signalen durch $\alpha 4\beta 2$ -nAChR enthielten sowohl die Perfusions-, als auch die Applikationslösung der vier gezeigten Versuche den selektiven Antagonisten DH β E **29** (symbolisiert durch die rote Linie) (Abbildung 111 & Abbildung 112 links). Um den Einfluss von $\alpha 7$ -Rezeptoren auf die Signalinduktion zu verdeutlichen wurde in einem zweiten Versuch der

Applikationslösung zusätzlich MLA **14** zugesetzt (Abbildung 111 & Abbildung 112 rechts).

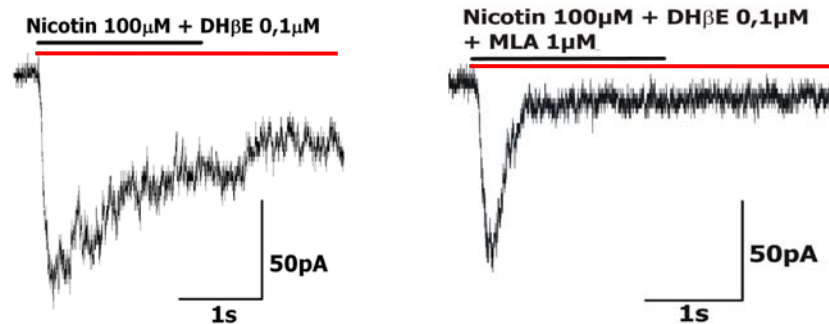


Abbildung 111: Nicotin-induzierte Stromsignale des Klons Nummer 9
 links: in Anwesenheit des selektiven $\alpha 4\beta 2$ -Antagonisten DHβE **29**
 rechts: in Anwesenheit der selektiven $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 7$ -Antagonisten DHβE **29** und MLA **14**
 — : Zeitraum der Substanzapplikation(2 s)
 — : Perfusionslösung enthält 0,1 µM DHβE **29**

Vergleicht man die beiden Nicotin-induzierten Stromantworten der Abbildung 111, so fällt auf, dass der Antagonist MLA **14** einen negativen Einfluss auf die Form der „decay phase“ hat und ebenfalls zu einer leichten Abnahme der maximalen Peakamplitude führt. Es lässt sich daraus schließen, dass der $\alpha 7$ -Rezeptor einen großen Anteil an der Nicotin-induzierten Stromantwort dieser Zellen besitzt. Jedoch zeugt das verbleibende Restsignal in Anwesenheit von MLA **14** von der Beteiligung weiterer Rezeptorsubtypen, das diesen Klon zur Evaluierung von Testsubstanzen unbrauchbar macht.

Die Zuordnung dieses Restsignals bzw. beider gezeigten Stromantworten zu einem bestimmten Nicotinrezeptorsubtyp gestaltet sich schwierig, da die Signalformen den drei gängigen Signaltypen der nAChR (siehe 3.6.2 Patch-Clamp-Experimente an Nicotinrezeptoren) nur wenig ähneln. Es handelt sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Mischsignale von mehreren Subtypen. Aufgrund der verwendeten Antagonisten für die Subtypen $\alpha 7$ und $\alpha 4\beta 2$ (MLA $\rightarrow \alpha 7$; DHβE $\rightarrow \alpha 4\beta 2$), der Form der induzierten Stromantwort sowie der Rezeptorexpression der Ausgangszelllinie (SH-SY5Y-Zellen) ist anzunehmen, dass Rezeptoren mit $\alpha 3$ Untereinheit maßgeblich für dieses Nicotin-induzierte Signal sind.

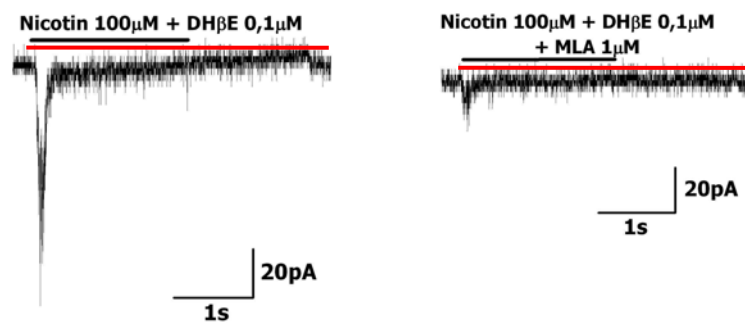


Abbildung 112: Nicotin-induzierte Stromsignale des Klons Nummer 29
 links: in Anwesenheit des selektiven $\alpha 4\beta 2$ -Antagonisten DH β E 29
 rechts: in Anwesenheit der selektiven $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 7$ -Antagonisten DH β E 29 und MLA 14
 — : Perfusionslösung enthält 0,1 μ M DH β E 29

Die in Abbildung 112 links zu sehende Stromantwort weist die gleichen Charakteristika des von Alkondon und Albuquerque⁴⁰³ (siehe 3.6.2 Patch-Clamp-Experimente an Nicotinrezeptoren) beschriebenen $\alpha 7$ -Rezeptorsignals auf. Die nahezu vollständige Unterdrückung des von Nicotin 1 induzierten Stroms durch MLA 14 (Abbildung 112 rechts) beweist, dass dieses Signal einzig durch $\alpha 7$ -Rezeptoren ausgelöst wird. Der Zellklon Nummer 29 würde sich daher zur Evaluierung von Substanzen am exprimierten nAChR-Subtyp eignen. Leider war die Dichte von Zellen, die dieses Nicotin-induzierte Antwortprofil aufwiesen, in der Kultur so gering, so dass an ein Substanz-Screening nicht zu denken war. Zur Evaluierung von Substanzen an der Kolonie 29 wäre eine vorherige Aufreinigung der Kultur durch Verdünnungsschritte (1/1000 und 1/5000) und damit verbundenes Anzüchten von Einzelkolonien nötig. Dies war aus Zeitgründen innerhalb des sechsmonatigen Aufenthaltes in Japan nicht mehr durchführbar.

3.5.8 Diskussion der Transfektionsversuche

Rezeptorexpression in untransfizierten PC12- und SH-SY5Y-Zellen

Obwohl für beide Zellarten in der Literatur beschrieben wurde, dass sie über endogene $\alpha 7$ -Rezeptoren bzw. deren mRNA verfügen²³⁻³⁹⁷, ist das Fehlen des Rezeptorproteins in diesen Zellen nicht ungewöhnlich. Dieses Phänomen wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und mit der unterschiedlichen Expression verschiedener Klone des gleichen Zelltyps begründet^{23,398,397}. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die

Proteinexpression des Rezeptors so gering ist, dass sie außerhalb der Nachweisgrenzen der verwendeten Methode liegt.

Ergebnisse der Transfektion von PC12-Zellen

Aufgrund der Ausbildung von Neuriten²⁴ und einer Geneticin-Resistenz der transfizierten PC12-Zellen, ist davon auszugehen, dass die Transfektion erfolgreich war. Für den negativen Nachweis des Rezeptorproteins trotz erfolgreicher Transfektion finden sich verschiedene Erklärungsansätze in der Literatur. Ein Ansatz wäre die bereits erwähnten Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Subklonen desselben Zelltyps^{23,398,397}.

Für HEK-293-Zellen und Xenopus-Oozyten wurde beschrieben, dass diese den Rezeptor ineffizient oder nur mit begrenzter Kapazität zusammensetzen können. Es kommt zur Ausbildung von Trimeren, Tetrameren oder weiteren ungewöhnlichen Aggregierungs-Abstufungen des $\alpha 7$ -Rezeptors. Da nur korrekt zusammengesetzte Pentamere den Rezeptoren formen können, kommt es möglicherweise zu einem vorzeitigen Abbau der unvollständigen Rezeptoren, bevor diese überhaupt an der Zelloberfläche exprimiert werden können^{404,405}.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass nur Zellen mit endogenem $\alpha 7$ -Rezeptor diesen nach Transfektion exprimieren können²³. Kassner et al. konnten anhand einer Zelllinie, die nicht über einen endogenen $\alpha 7$ -Rezeptor verfügte, diese Theorie allerdings widerlegen⁴⁰⁴.

Einen anderen Erklärungsversuch für das Fehlen des Rezeptorproteins postulierten Cooper et al. sowie Kassner et al. Sie vermuten, dass die Anwesenheit von geringsten Mengen anderer Untereinheiten oder einer noch unbekanntem Untereinheit für die korrekte Zusammensetzung des $\alpha 7$ -Rezeptors nötig sei^{23,404}. Da Phäochromozytomzellen weitere Untereinheiten aufweisen und die erfolgreiche Transfektion des $\alpha 7$ -Rezeptors für diesen Zelltyp bereits beschrieben wurde, ist dieser Erklärungsansatz für PC12-Zellen eher unwahrscheinlich.

Möglich wäre aber auch ein Verbleib der Rezeptoren in intrazellulären Pools, was eine Expression an der Zellmembran verhindert^{398,404}. Dies wurde für den Muskeltyp bereits nachgewiesen⁴⁰⁶. Der Verbleib von Rezeptoren in intrazellulären Pools würde jedoch nur das Ausbleiben einer Zellantwort auf Nicotinstimulus in elektrophysiologischen

Experimenten erklären, aber nicht das Fehlen des Rezeptorproteins im Zell-Lysat. Hypothetisch denkbar wäre ebenfalls ein Verlust der genetischen Information des Rezeptors beim Einbau des Plasmids in das Zellgenom. Dies würde bedeuten, dass lediglich das Antibiotika-Resistenzgen von der Zelle übernommen wurde.

Ergebnisse der „Differenzierung“ von PC12-Zellen durch NGF

Die Ausbildung von Axonen durch PC12-Zellen bei Zusatz von NGF zum Nährmedium beweist, dass eine „Differenzierung“ der verwendeten Phäochromozytomzellen stattfand. Das Fehlen des $\alpha 7$ -Rezeptorproteins ist möglicherweise wieder auf die unterschiedliche Expression in Abhängigkeit des verwendeten Subklons eines Zelltyps zurückzuführen^{23, 398, 397}.

Laut Literatur führen schon geringe Mengen NGF im Nährmedium zur Zelldifferenzierung^{384, 398, 399}, weshalb aus Kostengründen eine Konzentration von 2,5 ng/ml für den unternommenen Versuch gewählt wurde. Wahrscheinlich waren diese Konzentration und die Wachstumsdauer von einer Woche nicht ausreichend um eine Steigerung der Rezeptorexpression hervorzurufen. Der maximale Effekt der Differenzierung wird jedoch nach den Veröffentlichungen von Amy, Blumenthal und Utsugisawa et al. bei einer Konzentration von 50 ng/ml und einer Wachstumsperiode von 87-120h erzielt. Leider waren weitere Differenzierungsversuche mit höheren NGF-Konzentrationen oder längeren Wachstumsperioden während des Auslandsaufenthaltes aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

Ergebnisse der Transfektion von SH-SY5Y-Zellen

Die Ergebnisse der Western-Blots und die Stromantworten der Kolonien 9 und 29, (siehe Abbildung 111 & Abbildung 112) sowie fünf weiterer Klone (Daten nicht dargestellt) zeigen, dass der $\alpha 7$ -Rezeptor in den verwendeten SH-SY5Y-Zellen exprimiert wird. Es wurde somit bewiesen, dass dieser Ionenkanal funktionell in Neuroblastom-Zellen transfiziert werden konnte. Da sowohl ein durch Nicotin 1 induziertes Stromsignal, als auch das $\alpha 7$ -Protein über mehrere Passagen nachweisbar war, kann die Transfektion als *stabil* betrachtet werden.

Lediglich die geringe Dichte der den gewünschten Ionenkanal exprimierenden Zellen verhinderte die Verwendung der SH-SY5Y-Klone zur Evaluierung von Testsubstanzen

am $\alpha 7$ -Rezeptor. Da aus Zeitgründen eine Aufreinigung der Zellkultur nicht mehr möglich war, wurden kurzfristig primäre Kulturen von Hippocampus-Neuronen zum Substanz-Screening eingesetzt.

3.6 Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente

3.6.1 Allgemeine Grundlagen

Die Patch-Clamp-Technik wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann zwischen 1976 und 1981 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen entwickelt^{407,408}. Es ist eine Methode zur Analyse von Strömen in Zellmembranen, deren Prinzip auf der so genannten Spannungsklemme beruht⁴⁰⁹. Dabei wird durch Aufsetzen einer hauchdünnen, mit Elektrolytlösung gefüllten Glaspipette (Innendurchmesser 0,5-1 μm) ein kleiner Fleck (patch) der Zellmembran elektrisch von der Umgebung isoliert. Die Pipette ist über eine Silber/Silberchlorid-Elektrode mit einer sehr aufwendigen elektronischen Schaltung verbunden. Als Elektrode dient ein „chlorierter“ Silberdraht (Überzug aus Silberchlorid, AgCl), der in der Lage ist, „Offset“-Potentiale, die nicht vom biologischen Präparat stammen, sondern an den Übergängen vom Silberdraht auf die Pipettenlösung oder von der Pipettenlösung auf die Badlösung entstehen, zu verringern. Die folgende stark vereinfachte Abbildung 113 stellt die mit der Elektrode verbundene Schaltung dar.

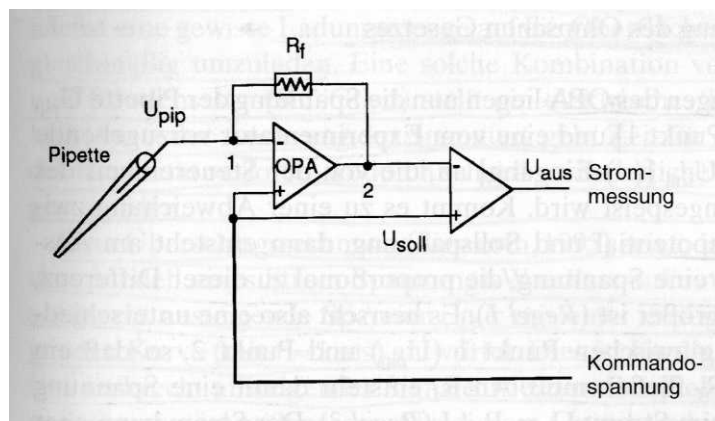


Abbildung 113: vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers⁴¹⁰

OPA: Operationsverstärker, R_f : Rückkopplungswiderstand, U_{soll} : Kommando- oder Sollspannung, U_{pip} : Pipettenpotential, U_{aus} : Ausgangsspannung proportional zu dem in die Pipette injizierten Strom

Die wichtigsten Bestandteile der Schaltung sind der Operationsverstärker (OPA) und der Rückkopplungswiderstand R_f . An dem OPA liegt die Spannung der Pipette (normales Membranpotential ca. 50-120 mV) und eine vom Experimentator gewünschte Sollspannung, auch Kommandospannung genannt, an. Kommt es zu einer Abweichung zwischen dem Pipettenpotential und dem Sollpotential, z.B. durch Ioneneinstrom durch

Ionenkanäle der Zelle, entsteht eine Spannung am Ausgang des OPA. Durch den Spannungsunterschied zwischen Punkt 1 und 2 (siehe Abbildung 113) müsste theoretisch ein Strom fließen, um diesen Spannungsunterschied auszugleichen. Da aber der OPA über einen unendlich hohen Eingangswiderstand verfügt, kann der Strom nur in eine Richtung fließen, vom Verstärker in die Pipette. Es wird solange ein so genannter Kompensationsstrom fließen, bis das Pipettenpotential gleich der angelegten Sollspannung ist. Auf diese Weise gleicht die Schaltung Abweichungen zwischen Pipetten- und Kommandospannung aus und erzeugt zugleich an R_f eine Spannung, die proportional zu dem in die Pipette injizierten Strom ist. Diese Spannung wird an die Steuereinheit weitergeleitet, dort ausgelesen und in einen Strom umgerechnet. Dieser Strom kann von einem Rechner mit geeigneter Software visualisiert und zur Auswertung herangezogen werden.

Patchkonfigurationen

Im Idealfall bildet sich bei Kontakt der Zellmembran mit der Glaswand der Pipette eine so starke Dichtung aus, dass sich ein elektrischer Widerstand von mehr als ein Gigaohm ergibt (Gigaseal). Dieser Zustand ermöglicht die Auflösung und Messung von Ionenströmen selbst durch einzelne Ionenkanäle im Bereich des Patches. Diese Ionenströme lassen sich auf vier unterschiedliche Weisen bestimmen (siehe Abbildung 115). Die einfachste Methode, bei der die Glaspipette die intakte Zellwand berührt, wird als *cell-attached* Konfiguration bezeichnet (Abbildung 114 & Abbildung 115).



Abbildung 114: kultivierte Nervenzelle mit Patchpipette⁴¹⁰

Diese Anordnung kann durch leichtes Zurückziehen der Patchpipette in die *inside-out* Konfiguration überführt werden. Durch die Bewegung wird das an der Pipette haftende „Patch“ aus der Zellmembran gerissen, wobei die Zellinnenseite des Patches

anschließend der Badlösung zugewandt ist (inside-out).

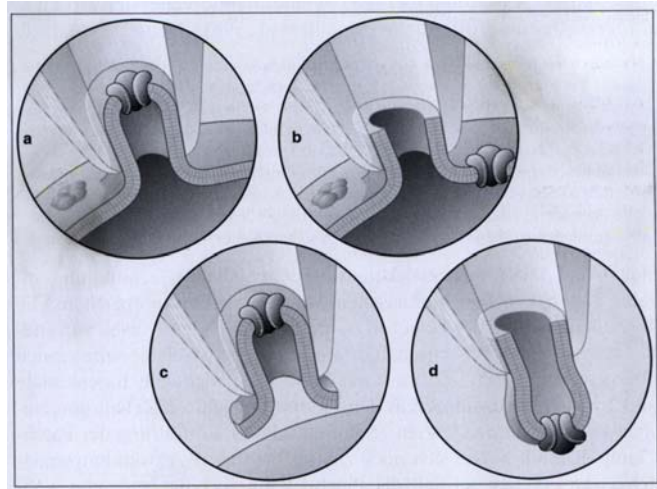


Abbildung 115: Patchkonfigurationen⁴¹⁰ a: cell-attached b: whole-cell c: inside-out d: outside-out

Durchbricht man hingegen in der *cell-attached* Konfiguration die Zellmembran durch Anlegen eines etwas stärkeren Unterdrucks, so erhält man die gebräuchlichste Anordnung, die *whole-cell* Konfiguration. Diese lässt sich wiederum durch Zurückziehen der Glaspipette in eine weitere Konfiguration überführen, die *outside-out* Konfiguration. Hierbei ist die Zelloberfläche der Badlösung zugewandt (Abbildung 115).

Die Ganzzelleableitung (*whole-cell*) ist wie schon erwähnt die gebräuchlichste Anordnung in Patch-Clamp-Untersuchungen und wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich verwendet. Ihr Erfassungsbereich ist nicht wie bei den anderen Konfigurationen auf den Bereich der Pipettenmündung begrenzt, sondern ist auf die gesamte Membran der untersuchten Zelle ausgeweitet. Nachteilig wirkt sich jedoch bei dieser Konfiguration ein allgemein wesentlich höheres „Rauschen“ aus (elektrische Störsignale unterschiedlicher Quellen z.B. Netzbrummen, Vorverstärker, Zellmembran und Pipette), was eine Einzelkanalableitung nur unter günstigen Bedingungen ermöglicht. Generell geben *whole-cell* Ableitungen immer das Ergebnis vieler simultan aktiver Ionenkanäle wieder und vermitteln somit das makroskopische Strommuster einer Zelle, ohne die Betrachtung des Einzelkanalbeitrages⁴¹⁰.

Die *whole-cell* Konfiguration bietet daher einige Vorteile. So ist die Auswertung der Messung in vielen Fällen schneller und einfacher als bei Einzelkanalmessungen. Es treten im Gegensatz zur Verwendung von intrazellulären Elektroden kaum Leckströme auf, was den Zugang zu kleinen Zellen, die durch die Verletzung der Zellmembran nach

Einstecken der intrazellulären Elektroden absterben würden, ermöglicht. Im Vergleich zur intrazellulären Ableitung ist ebenfalls das „Rauschen“ bei der *whole-cell* Anordnung durch den hohen Abdichtungswiderstand (Seal) und die elektronische Schaltung erheblich geringer, was immerhin eine Auflösung von 5 bis 20 pA ermöglicht. Ein weiterer Vorteil ist der rasch erfolgende Stoffaustausch zwischen Zytoplasma und der Pipettenlösung, der zu einer klar definierten - wenn auch unphysiologischen - Zusammensetzung des Zellinneren führt^{410,411,412}.

Pipettenlösung

Die Pipettenlösung weist im Vergleich zur physiologischen Zusammensetzung des Zellplasmas eine Besonderheit auf. Sie enthält statt Kalium- Cäsium-Ionen, die zwar ähnliche Eigenschaften wie Kalium besitzen, aber als relativ große monovalente Kationen Kaliumkanäle nicht passieren können. Durch diesen Austausch lassen sich Leckströme durch Ionenkanäle für Kalium verhindern und somit der Membranwiderstand erhöhen.

Um zusätzlich die Chloridleitfähigkeit zu vermindern oder das Umkehrpotential für Chlorid in den physiologisch negativen Bereich zu verschieben, kann die Chloridkonzentration der Pipettenlösung durch einen Austausch gegen Fluorid-Ionen gesenkt werden. Im Vergleich zu anderen Anionen begünstigt die Verwendung von Fluorid außerdem die Sealbildung (Seal: hoher Abdichtungswiderstand zwischen Pipette und Zellmembran) und Stabilität des Patches³⁸². Aufgrund des Silber/Silberchlorid-Übergangs des chlorierten Silberdrahts der Elektrode darf aber nicht vollständig auf Chlorid in der Pipettenlösung verzichtet werden.

Um die Pipettenlösung frei von Calcium zu halten, werden der Lösung Chelatoren (EGTA oder EDTA) zugesetzt. Auf diese Weise können Calcium-Verunreinigungen der anderen Ausgangssubstanzen, die ansonsten großen Einfluss auf die Messung hätten, komplexiert und somit dem Ionenstrom durch Calciumkanäle entzogen werden⁴¹⁰.

Versuchsanordnung

Die Patchpipette stellt einen der zentralen Bestandteile des Versuchsaufbaus bei Patch-Clamp-Experimenten dar. Die folgende Abbildung 116 soll weitere Komponenten der Patch-Clamp-Apparatur verdeutlichen.

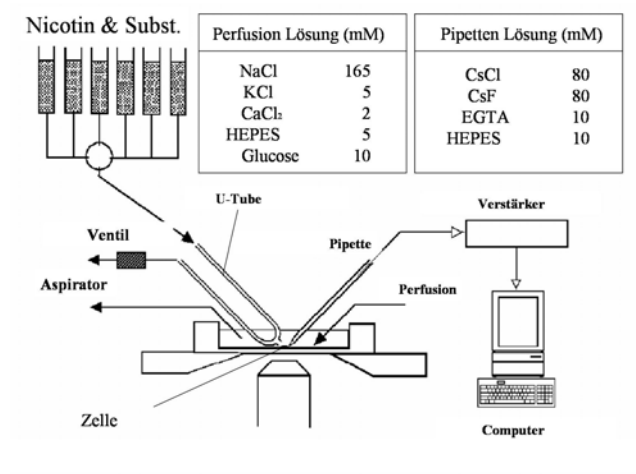


Abbildung 116: Versuchsaufbau der Patch-Clamp-Apparatur

Im Zentrum der Abbildung 116 ist das Objektiv des Mikroskops mit dem darüber liegenden Mikroskopisch zu sehen, auf dem sich die Plexiglas-Messkammer befindet. Die Kammer wird ständig mit Perfusionslösung, die möglichst physiologische Eigenschaften haben sollte, versorgt. Der Flüssigkeitszustrom der Perfusionslösung ist über ein Zuflussventil und den Aspirator (Abbildung 116) dabei so eingestellt, dass ein rascher Flüssigkeitsaustausch möglich ist, die auf einem Deckgläschen in die Kammer eingebrachten Zellen aber nicht vom Glas heruntergespült werden (1,5-4,5 ml/min).

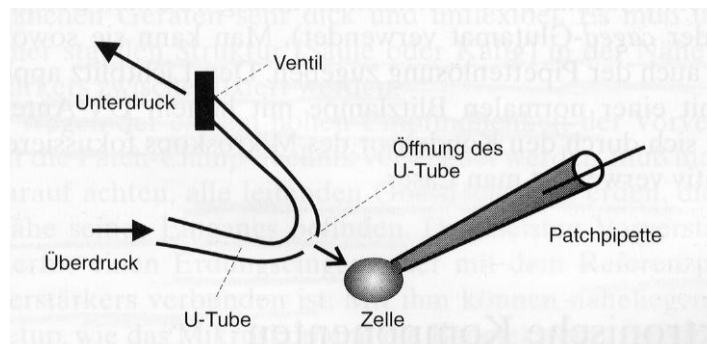


Abbildung 117: U-Tube System zur Substanzapplikation⁴¹⁰

Die neben der Pipette wohl wichtigste Einheit der Apparatur ist das „U-tube System“ mit dem dazugehörigen Flüssigkeitsreservoir (siehe Abbildung 116 und Abbildung 117). Es dient der Substanzapplikation und wird nach erfolgreicher Erzeugung der *whole-cell* Konfiguration über die Spitze der Glaspipette bewegt. Durch ein genau eingestelltes Druck- und Unterdruckverhältnis am „U-tube“ System fließt die Applikationslösung so durch das Röhrchen, dass nur nach Schließen des Steuerventils

(siehe Abbildung 117) Substanzlösung aus dem kleinen Loch an der Spitze der U-Rohrbiegung austreten kann. Durch Vorschalten eines Mehrwegeventils vor das Steuerventil ist ein schneller Wechsel zwischen verschiedenen Applikationslösungen möglich.

Die Öffnung des Hauptventils des Applikationssystems erfolgt über einen Impulsgeber, der ebenfalls mit dem Rechner und somit mit der geeigneten Software in Verbindung steht. Nach Impulsgabe zeichnet die Computersoftware die vom Verstärker weitergeleiteten und zur Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses gefilterten Stromsignale (2 kHz) auf und visualisiert diese.

3.6.2 Patch-Clamp-Experimente an Nicotinrezeptoren

Schon bei der Entwicklung der Patch-Clamp-Techniken durch Neher & Sakmann spielten Nicotinrezeptoren eine wichtige Rolle. Die beiden Nobelpreisträger benutzten für ihre Forschungen Froschmuskelnzellen, die über nAChR vom Muskeltyp verfügen^{407,408}.

Maßgeblich für die elektrophysiologischen Untersuchungen von neuronalen ($\alpha 7$ und $\alpha 4\beta 2$) bzw. ganglionären ($\alpha 3\beta 4$) Nicotinrezeptor-Subtypen sind die Arbeiten von Alkondon & Albuquerque^{403,413,414}. Sie untersuchten das elektrophysiologische Verhalten von Hippocampus-Neuronen der Ratte und fanden dabei vier unterschiedliche, durch Agonisten der nAChR induzierte Stromsignaltypen (IA, IB, II und III; siehe Abbildung 119), die sie verschiedenen Nicotinrezeptor-Subtypen zuordnen konnten. So wird zum Beispiel der Signaltyp IA von nAChR des Subtyps $\alpha 7$ hervorgerufen. Dieser zeichnet sich durch eine kurze Kanalöffnungszeit, eine große Einzelkanalleitfähigkeit, eine schnelle Desensibilisierung, eine hohe Calcium-Durchlässigkeit und das Auftreten eines so genannten „run-down“ Effektes (Abnahme der maximalen Peakamplitude mit zunehmender Applikation eines Agonisten) aus (Abbildung 118).

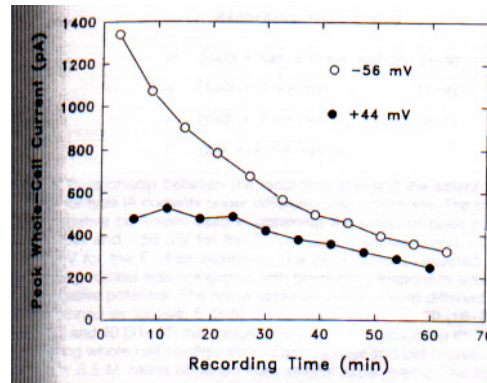


Abbildung 118: run-down“ Effekt des Stromsignal-Typen IA (ACh 2; 3mM) bei positiven und negativen Haltepotential (Hippocampus-Neuronen)⁴¹³

Des Weiteren lässt er sich durch die Antagonisten MLA **14** und α -Bgt **4** hemmen. Der Signaltyp IB stellt ein Mischsignal aus den Typen IA und II dar. Letzterer ist im Vergleich zum Typ IA durch eine langsamere Desensibilisierung charakterisiert und kann von dem Antagonisten DH β E **29** geblockt werden. Laut Alkondon & Albuquerque ist dem Signaltyp II der α 4 β 2-Rezeptor zuzuordnen. Dem verbleibenden Stromsignaltyp III wurde der Rezeptorsubtyp α 3 β 4 zugewiesen (Abbildung 119)^{195,403,413}.

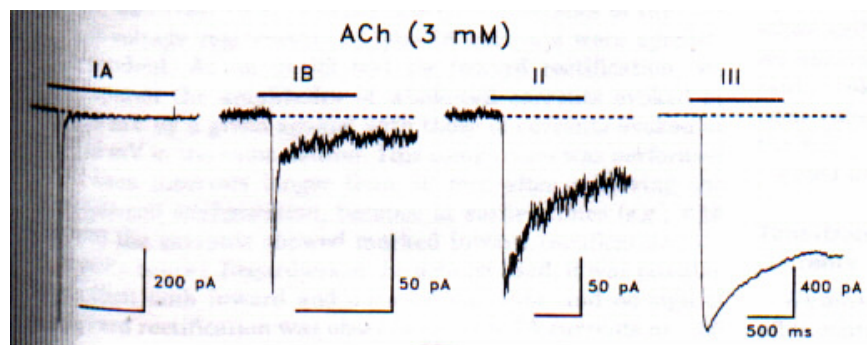


Abbildung 119: charakteristische Stromsignaltypen (IA, IB, II und III) einer whole-cell-Ableitung von Hippocampus-Neuronen der Ratten nach Applikation von ACh 2 (3mM)

3.6.3 Projekt

Anhand der Radioligand-Bindungsstudien an verschiedenen Subtypen der nAChR konnte festgestellt werden, dass einige der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Carbamate hohe Affinität zu den neuronalen Nicotinrezeptoren α 7* und α 4 β 2* besitzen. Zur Aufklärung des funktionellen Verhaltens der Carbamate an Nicotinrezeptoren, das durch Bindungsstudien nicht ermittelt werden kann, waren elektrophysiologische Experimente notwendig. Daher sollten während eines sechsmonatigen Aufenthaltes am

„Department of Molecular and Pharmacological Neuroscience“ der Universität Hiroshima (Japan) diese Eigenschaften der im Rahmen der vorliegenden sowie der Arbeit von Frau Lenka Munoz (Doktorandin aus dem Arbeitskreis um PD D. Gündisch) hergestellten Carbamate mittels Patch-Clamp-Verfahren untersucht werden.

Der Schwerpunkt sollte dabei auf einem funktionellen Screening möglichst vieler Substanzen an $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren, exprimiert in HEK 293 Zellen, und $\alpha 7$ -Rezeptoren, exprimiert in eigens für diesen Zweck transfizierten Zellen bzw. primären Kulturen von Hippocampus-Neuronen, liegen. Eine detaillierte Charakterisierung einzelner Substanzen war aus Zeitgründen von Anfang an nicht vorgesehen.

3.6.4 Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte hauptsächlich durch Vergleich der maximalen Peak-Amplituden der Testsubstanz-induzierten Ströme mit dem Signal, das durch eine Lösung von (S)-(-)-Nicotin-Hydrogentartrat Dihydrat (Nicotin **1**) (100 μM) induziert wurde (Effekt in %). Die ermittelten Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei Stromsignalen, die in verschiedenen Zellen derselben Kultur induziert wurden.

3.6.5 Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente

Agonisten am Subtyp $\alpha 4\beta 2$

Zu Beginn der elektrophysiologischen Untersuchungen wurden alle Verbindungen auf ihre agonistischen Effekte am Nicotinrezeptor-Subtyp $\alpha 4\beta 2$ untersucht. Die Testung wurde an transfizierten HEK-293-Zellen vorgenommen, die den Rezeptor heterolog exprimierten. Eine zur Untersuchung geeignete Zelle wurde zunächst in die *whole-cell* Konfiguration überführt und nachfolgend mit Nicotin **1** (100 μM) stimuliert. Dies diente zur Überprüfung und Sicherstellung eines zur Vermessung geeigneten Gigaseals. Erst danach erfolgte die Applikation der zur untersuchenden Verbindung in einer Konzentration von 100 μM oder 1 mM. Um ausschließen zu können, dass durch die Testsubstanz induzierte Signale durch verbliebenes Nicotin **1** in der Zellumgebung zu Stande kommen, wurde die Applikation der der Untersuchungssubstanz zweimal wiederholt.

Es stellte sich heraus, dass von allen untersuchten Stoffen (siehe Tabelle 3.6-1 bis Tabelle 3.6-7) einzig der Phenylcholinether **42** einen messbaren Strom in den embryonalen Nierenzellen hervorrief. Das Signal entsprach dabei je nach Konzentration zwischen 13 und 17 % des Nicotinvergleichssignals (Abbildung 120).

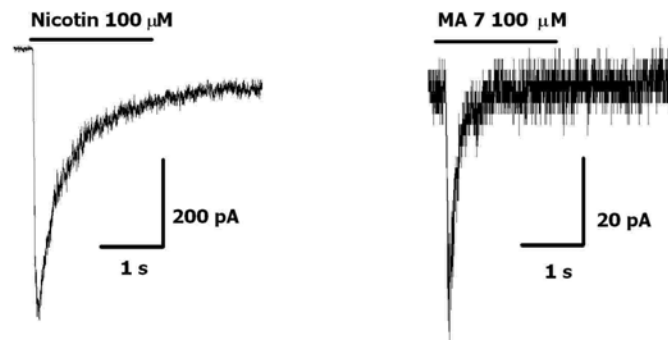


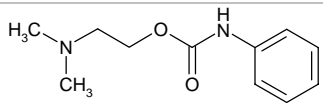
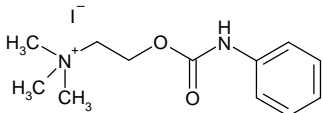
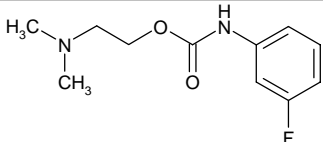
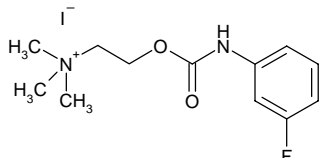
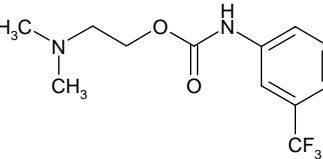
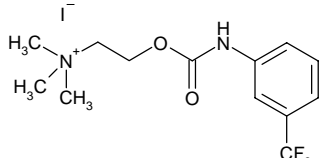
Abbildung 120: Nicotin **1** und Phenylcholinether-induzierte Stromsignale in HEK-293-Zellen
links: Nicotin **1** (100 µM) rechts: Phenylcholinether **42** (100 µM) (MA 7)
— : Zeitraum der Substanzapplikation(2 s)
Die unterschiedliche Skalierung der beiden Stromsignale ist zu beachten,
da sie sich um den Faktor 10 unterscheiden.

Auffällig ist, dass bei der vermessenen Testsubstanz **42** keine Abhängigkeit zwischen Effekt und Konzentration zu beobachten war, sondern die Intensität des induzierten Signals bei beiden getesteten Konzentrationen annähernd gleich blieb (Tabelle 3.6-1). Der durch den Ether **42** induzierte Strom ist bezogen auf das Nicotinvergleichssignal relativ schwach.

Tabelle 3.6-1: agonistischer Effekt von Phenylcholinether **42**
am $\alpha\beta 2$ -nAChR transfizierter HEK-293-Zellen

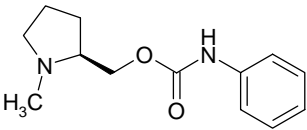
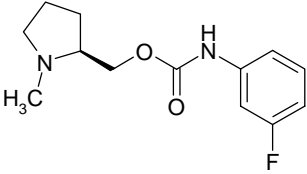
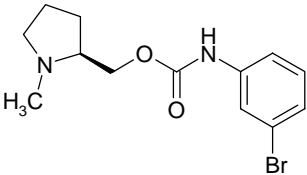
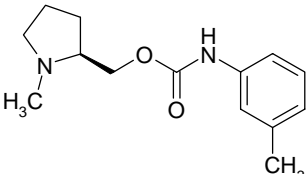
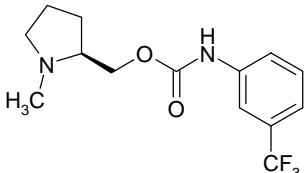
Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 µM	Effekt [%] Testkonzentration 1 mM
	42	16,9	12,6

Tabelle 3.6-2: agonistische Effekte von Phenylcholinester 1 und abgeleiteter Phenylcarbamidsäureester am $\alpha 4\beta 2$ -nAChR transfizierter HEK-293-Zellen

Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M	Effekt [%] Testkonzentration 1 mM
	53	k.E.	k.E.
	56	k.E.	k.E.
	54	k.E.	k.E.
	57	k.E.	k.E.
	55	k.E.	k.E.
	58	k.E.	k.E.

k.E.: kein Effekt

Tabelle 3.6-3: agonistische Effekte von N-Methyl-pyrrolidinyl-phenylcarbamaten am $\alpha\beta_2$ -nAChR transfizierter HEK-293-Zellen

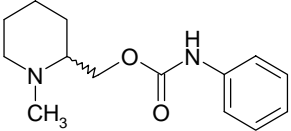
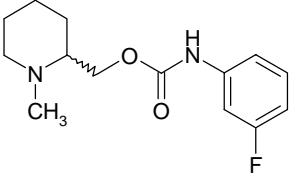
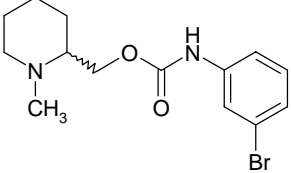
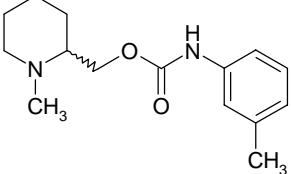
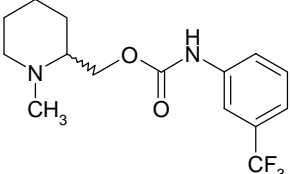
Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M	Effekt [%] Testkonzentration 1 mM
 (S)	59	n.b.	k.E.
 (S)	60	n.b.	k.E.
 (S)	79*	n.b.	k.E.
 (S)	80*	n.b.	k.E.
 (S)	61	n.b.	k.E.

k.E.: kein Effekt

n.b.: nicht bestimmt

*: synthetisiert von Lenka Munoz

Tabelle 3.6-4: agonistische Effekte von *N*-Methyl-piperidin-2-yl-phenylcarbamaten am $\alpha 4\beta 2$ -nAChR transfizierter HEK-293-Zellen

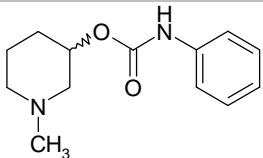
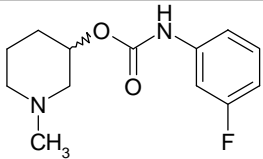
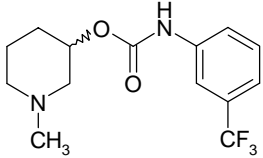
Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M	Effekt [%] Testkonzentration 1 mM
	68	n.b.	k.E.
	69	n.b.	k.E.
	81*	n.b.	k.E.
	82*	k.E.	k.E.
	70	n.b.	k.E.

k.E.: kein Effekt

n.b.: nicht bestimmt

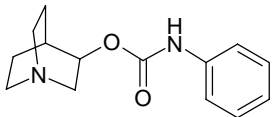
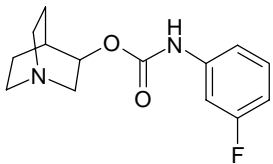
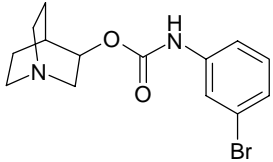
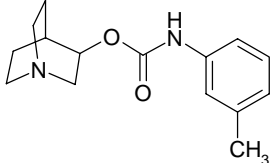
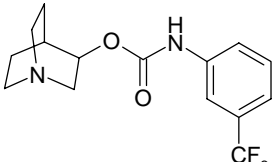
*: synthetisiert von Lenka Munoz

Tabelle 3.6-5: agonistische Effekte von *N*-Methyl-piperidin-3-yl-phenylcarbamaten am $\alpha 4\beta 2$ -nAChR transfizierter HEK-293-Zellen

Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M	Effekt [%] Testkonzentration 1 mM
 <chem>CN1CCCCC1COC(=O)Nc2ccccc2</chem>	71	k.E.	k.E.
 <chem>CN1CCCCC1COC(=O)Nc2ccc(F)cc2</chem>	72	k.E.	k.E.
 <chem>CN1CCCCC1COC(=O)Nc2ccc(C(F)(F)F)cc2</chem>	73	k.E.	k.E.

k.E.: kein Effekt

Tabelle 3.6-6 agonistische Effekte von Chinuclidinyl-phenylcarbamaten
am $\alpha 4\beta 2$ -nAChR transfizierter HEK-293-Zellen

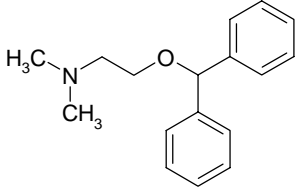
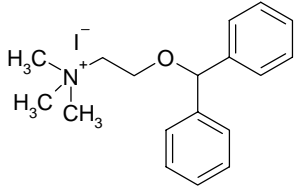
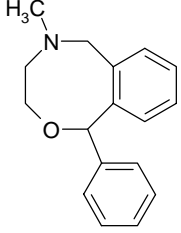
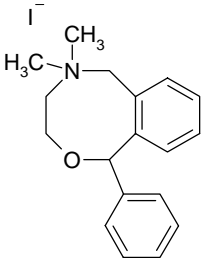
Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M	Effekt [%] Testkonzentration 1 mM
	74	k.E.	k.E.
	75	k.E.	k.E.
	83*	n.b.	k.E.
	84*	n.b.	k.E.
	76	k.E.	k.E.

k.E.: kein Effekt

n.b.: nicht bestimmt

*: synthetisiert von Lenka Munoz

Tabelle 3.6-7: : agonistische Effekte der Arzneistoffe Diphenhydramin **45** und Nefopam **46** sowie ihrer methylierten Analoga **47** & **48** am $\alpha\beta 2$ -nAChR transfizierter HEK-293-Zellen

Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M	Effekt [%] Testkonzentration 1 mM
	45	k.E.	k.E.
	47	k.E.	k.E.
	46	k.E.	k.E.
	48	k.E.	k.E.

k.E.: kein Effekt

Antagonisten am Subtyp $\alpha 4\beta 2$

Bei dem Substanz-Screening am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor fiel auf, dass die auf eine Applikation der Carbamate folgenden Nicotinsignale (bis zu 4,5 min später) nicht annähernd die Amplitude des ersten Nicotinsignals zur Überprüfung des erfolgreichen Patches erreichten. Weiterhin war zu beobachten, dass mit jeder weiteren Nicotinapplikation (siehe Abbildung 121; 3. bis 5.) nach dreimaliger Vermessung der Testsubstanz (Abbildung 121; 2.) die Amplitude des induzierten Signals anstieg. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Carbamidsäureester am $\alpha 4\beta 2$ -nAChR antagonistisch wirken und somit die von Nicotin 1 induzierten Ströme hemmen können.

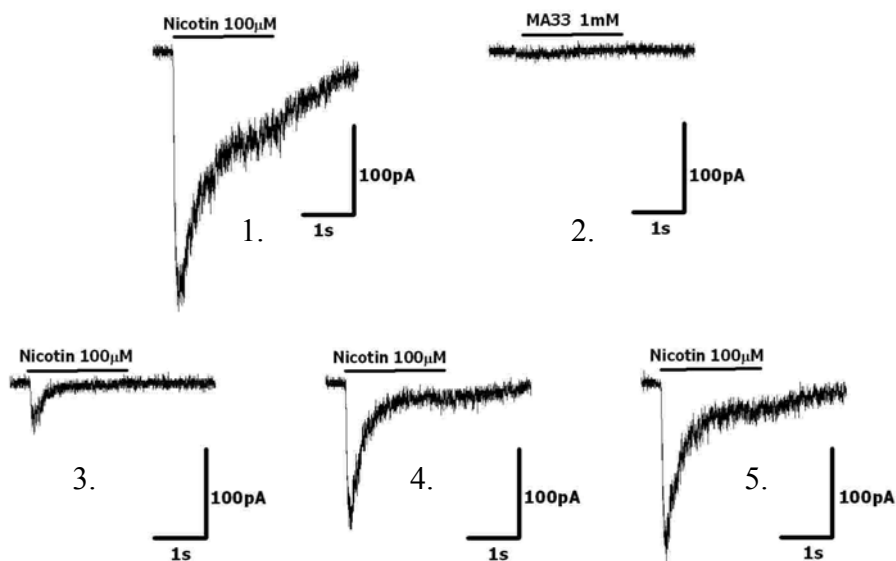


Abbildung 121: Hemmung von Nicotinsignalen nach Applikation des Carbamats 76

- 1.: erstes Nicotinsignal zur Überprüfung des Patches
 2. : Substanzapplikation des Carbamats 76 (MA 33), kein Signal
 - 3.: erste Nicotinapplikation nach erfolgter Vermessung des Carbamats 76; die Amplitude des Nicotin-induzierten Signals ist deutlich gehemmt
 - 4.: zweite Nicotinapplikation nach erfolgter Vermessung des Carbamats; Erholung der Amplitude im Vergleich zu Strom 3
 - 5.: dritte Nicotinapplikation nach erfolgter Vermessung des Carbamats; annähernde Erholung der des induzierten Stromsignal auf Ausgangsstärke (1.)
- : Zeitraum der Substanzapplikation (2 s)

Im Rahmen der Testung auf funktionellen Agonismus ließ sich allerdings diese Reduktion der Signalamplitude nicht eindeutig quantifizieren. Dies liegt an der Tatsache, dass bei dieser Applikationsform generell keine definierte und konstante Konzentration der Testsubstanz in der Zellumgebung zum Zeitpunkt der Nicotinapplikationen (Abbildung 121; 3. bis 5.) gewährleistet ist. Daher stellt die Abbildung 122 lediglich eine grobe Abschätzung des antagonistischen Effekts der Carbamate dar.

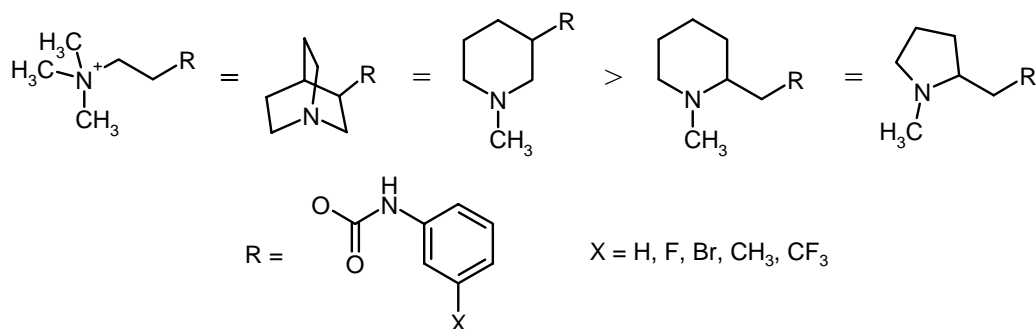


Abbildung 122: Abschätzung des antagonistischen Effekts verschiedener Carbamate in Abhängigkeit ihrer Aminkomponente auf den $\alpha 4\beta 2$ -nAChR

Demzufolge zeigten die Trimethylammonium- **56-58**, Chinuclidin- **74-76** und N-Methyl-piperidin-3-yl-Derivate **71-73** etwa vergleichbare Effekte. Etwas schwächere Wirkung auf die Nicotin-induzierten Stromsignale hatten die N-Methyl-pyrrolidin- **59-61** und die N-Methyl-piperidin-2-yl-phenylcarbamate **68-70**, wobei der hemmende Effekt zwischen diesen beiden Stoffgruppen ebenfalls vergleichbar war. Keinerlei Reduktion der Stromamplitude war bei den Dimethylamino-ethyl-Derivaten **53-55** zu beobachten.

Die in Abbildung 122 aufgeführte Reihenfolge korreliert nur wenig mit den Ergebnissen der Radioligand-Bindungsstudien am $\alpha 4\beta 2$ -nAChR. Im Gegensatz zu den Patch-Clamp-Versuchen ergaben die Bindungsstudien gerade für die Carbanile mit N-Methyl-pyrrolidin-Partialstruktur im Vergleich zu den-N-Methyl-piperidin-Derivaten höhere Affinität zum $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor (3.4 Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien).

Zur genaueren Untersuchung der antagonistischen Effekte der Carbamate wäre die Standardmethode zur Testung auf funktionellen Antagonismus erforderlich. Der vermeintliche Antagonist wird dabei in die Perfusionslösung eingebracht und die untersuchte Zelle mit einer Lösung stimuliert, die neben Nicotin **1** ebenfalls die Testsubstanz enthält. Je nach Konzentration und Stärke des potentiellen Antagonisten wird eine Signalinduktion durch Nicotin **1** vollständig unterdrückt oder im Vergleich mit Antagonist-freien Versuchsbedingungen deutlich gehemmt. Diese Methode erfordert jedoch weitaus größere Mengen der Testsubstanzen.

Eine Abschätzung der antagonistischen Wirkung der untersuchten Carbamate ist aber auch ohne Anwendung der oben beschriebenen Methode zur Testung auf funktionellen Antagonismus denkbar. So kann der vermeintliche Antagonist zeitgleich mit Nicotin **1**

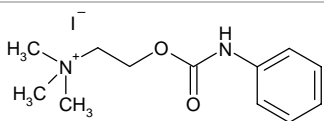
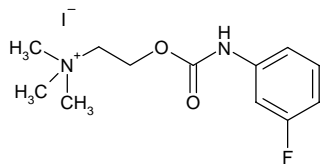
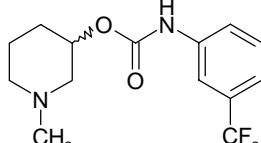
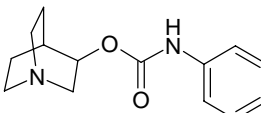
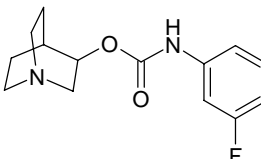
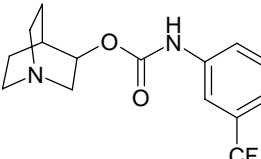
appliziert werden. Dies sollte im Vergleich mit der alleinigen Stimulation durch Nicotin **1** zu einer Reduktion des Agonist-induzierten Stromsignals führen. Setzt man das verbleibende Restsignal ins Verhältnis mit dem Nicotin **1** induzierten Strom, der als 100 % betrachtet wird, so ist behelfsweise ein Vergleich des antagonistischen Effektes verschiedener Verbindungen auch mit dieser Methode möglich.

Eine genauere Charakterisierung der antagonistischen Effekte der Phenylcarbamate war mit dieser Methode allerdings nur für sechs ausgewählte Verbindungen möglich (Carbamate **56**, **57**, **73** & **74** bis **76**). Die Untersuchung weiterer Verbindungen ist jedoch für die Zukunft geplant.

Für die gleichzeitige Applikation von Nicotin **1** und den potentiellen Antagonisten wurden genau die Verbindungen ausgewählt, die in den vorhergehenden Testungen auf Agonismus die größte Hemmung des nachfolgenden Nicotinsignals zeigten (siehe Abbildung 122). Da Derivate mit N-Methyl-pyrrolidin- **59-61** und N-Methyl-piperidin-2-yl-Partialstruktur **68-70** in der Testung auf funktionellen Agonismus nach ihrer Applikation nur wenig inhibitorische Wirkung auf die ihnen nachfolgenden Nicotinsignale hatten, wurden sie für die weitere Testung nicht in Betracht gezogen.

Der Tabelle 3.6-8 lässt sich entnehmen, dass die untersuchten Carbamate das induzierte Stromsignal in der gleichen Größenordnung hemmen (etwa zu 70 %). Dies korreliert vortrefflich mit den Schätzungen aus den Agonist-Experimenten. Lediglich das Fluor-substituierte Chinuclidin-Derivat **75** ist deutlich stärker wirksam; es blockiert das induzierte Signal um ca. 83 %.

Tabelle 3.6-8: antagonistischer Effekt der Phenylcarbamat-Derivate **56**, **57**, **73** & **74** bis **76** am $\alpha 4\beta 2$ -nAChR transfizierter HEK 293 Zellen

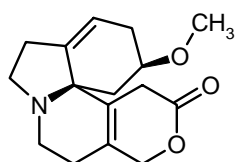
Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M
	56	29,7
	57	36,3
	73	38,9
	74	30,0
	75	16,6
	76	30,2

Agonisten am Subtyp $\alpha 7$

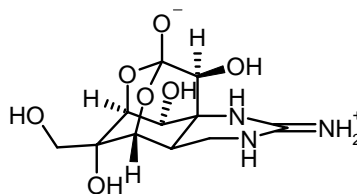
Die Evaluation der funktionellen Eigenschaften der hergestellten Verbindungen am $\alpha 7$ -nAChR sollte ursprünglich an eigens für diesen Zweck transfizierten PC12- oder SH-SY5Y-Zellen vorgenommen werden. Da durch die Transfektion des $\alpha 7$ -Rezeptors in die genannten Wirtszellen keine Zelllinie erzeugt werden konnte, die für ein Substanz-Screening geeignet gewesen wäre, wurden die Untersuchungen an $\alpha 7$ -nAChRs primärer Kulturen von Hippocampus-Neuronen vorgenommen (siehe 3.5 Transfektion). Da zu wenig Zeit für die Untersuchungen an primären Neuronen-Kulturen blieb, konnten nur einige ausgewählte Verbindungen auf Agonismus und Antagonismus am $\alpha 7$ -Rezeptor getestet werden.

Die Untersuchung der Phenylcarbamate (**42**, **56-58**, **59**, **68**, **71**, **74-76**, **83** & **84**) erfolgte dabei analog des agonistischen Protokolls zur Testung am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor (**Agonisten am Subtyp $\alpha 4\beta 2$**). Die Konzentration der Testsubstanzlösung betrug dabei 100 μM .

Da die verwendeten Neuronen neben $\alpha 7$ -nAChR auch über $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren und spannungsabhängige Natriumkanäle verfügen, wurden sowohl der Perfusionslösung als auch der Applikationslösung die selektiven Antagonisten Dihydro- β -erythroidin **29** ($\beta 2$ enthaltende nAChR) und Tetrodotoxin **88** (Natriumkanäle) zur Unterdrückung von unerwünschten Stromsignalen zugesetzt (Abbildung 124 & Abbildung 125, rote Linie).



Dihydro- β -erythroidin (DH β E)



Tetrodotoxin (TTX)

Abbildung 123: Strukturen der Antagonisten Tetrodotoxin **88** und Dihydro- β -erythroidin **29**

Die schwarze Linie in Abbildung 124 gibt den Zeitraum der Applikation der Test- bzw. Nicotininlösung an, die ebenfalls zur Unterdrückung von unerwünschten Signalen die Antagonisten DH β E **29** und TTX **88** enthielt.

Die Trimethylammonium-Carbamate **56-58** erwiesen sich am $\alpha 7$ -Rezeptor ebenfalls als Agonisten, wobei das am Aromaten unsubstituierte Phenylcarbamat **56** im Vergleich zur Bezugssubstanz Nicotin **1** sogar etwas stärker wirksam (107%) war (Abbildung 124 & Tabelle 3.6-9).

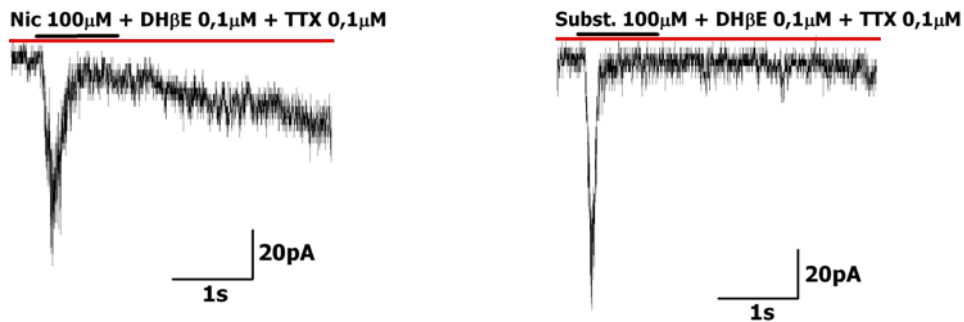


Abbildung 124: Nicotin **1** und Trimethyl-(2-phenylcarbamoyloxy-ethyl)-ammoniumiodid **56** induzierte Stromsignale in primären Hippocampus-Neuronen
links: Nicotin **1** (100 μM) rechts: Phenylcarbamate **56** (100 μM)
— : Zeitraum der Substanzapplikation (2s)
— : Perfusionslösung enthält DH β E **29** (0,1 μM) und TTX **88** (0,1 μM)

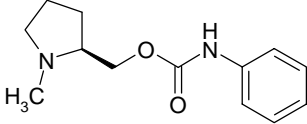
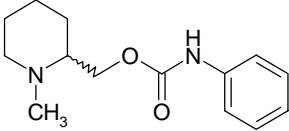
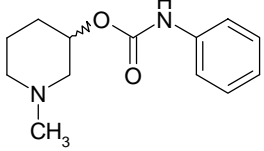
Tabelle 3.6-9: agonistischer Effekt von Phenylcholinether **42** und abgeleiteter Phenylcarbamidsäureester am $\alpha 7$ -nAChR primärer Hippocampus-Neuronen

Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μM
	42	77,8
	56	106,8
	57	n.b.
	58	70,9

n.b.: nicht bestimmt

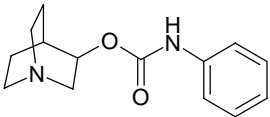
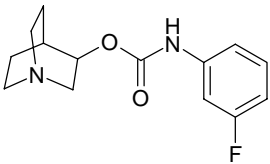
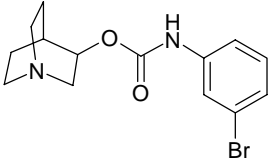
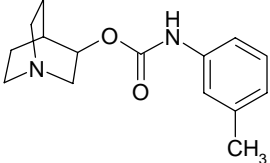
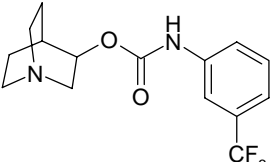
Wie schon zuvor am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor waren die N-Methyl-pyrrolidinyl- **59** und N-Methyl-piperidinyl-phenylcarbamate **68** & **71** auch am $\alpha 7$ -nAChR nicht in der Lage, ein Stromsignal zu induzieren (Tabelle 3.6-10).

Tabelle 3.6-10: agonistischer Effekt von N-Methyl-pyrrolidinyl- **68** und Methyl-piperidinyl-phenylcarbamaten **68** & **71** am $\alpha 7$ -nAChR primärer Hippocampus-Neuronen

Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M
	59	k.E.
	68	k.E.
	71	k.E.

k.E.: kein Effekt

Tabelle 3.6-11: agonistischer Effekt von Chinuclidinyl-phenylcarbamaten am $\alpha 7$ -nAChR primärer Hippocampus-Neuronen

Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M
	74	k.E.
	75	k.E.
	83*	37,8
	84*	n.d.
	76	k.E.

k.E.: kein Effekt
n.b.: nicht bestimmt
*: synthetisiert von Lenka Munoz

Das elektrophysiologische Verhalten der Chinuclidin-Derivate erwies sich in den Untersuchung als sehr unterschiedlich (Tabelle 3.6-11).

Während die Phenylcarbamate **74-76** keine agonistische Wirkung am untersuchten Subtyp besaßen, induzierte das Brom-substituierte Derivat **83** ein Stromsignal, dass etwa 38 % des von Nicotin **1** induzierten Vergleichssignals entsprach (Abbildung 125).

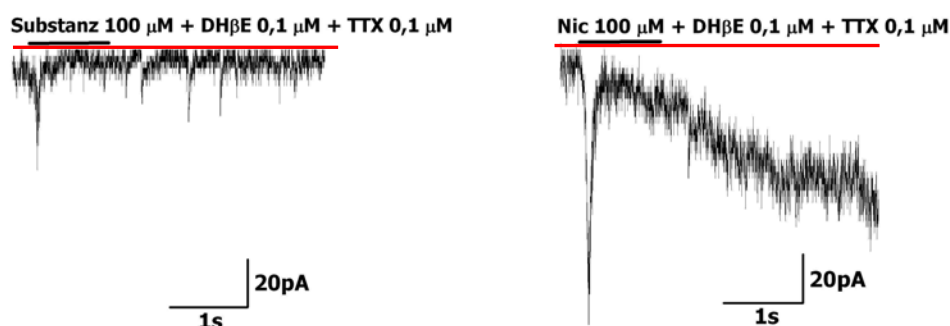


Abbildung 125: Nicotin **1** und 3-Brom-phenyl-carbamidsäure-chinuclidin-3-yl-ester **83** induzierte Stromsignale in primärer Hippocampus-Neuronen
links: Phenylcarbamate **83** (100 μM) rechts: Nicotin **1** (100 μM)
— : Zeitraum der Substanzapplikation (2 s)
— : Perfusionslösung enthält DH β E **29** (0,1 μM) und TTX **88** (0,1 μM)

Es ist nicht auszuschließen, dass die Carbamate **74**, **75** und **76** in einer höheren Konzentration möglicherweise ebenfalls agonistisch wirken. Dies ist in zukünftigen Experimenten zu überprüfen.

Antagonisten am Subtyp $\alpha 7$

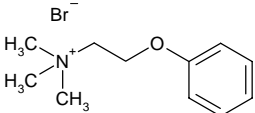
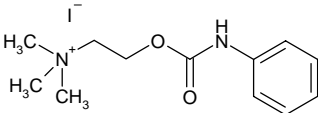
Um überprüfen zu können, ob der Phenylcholinether **42** und die von ihm abgeleiteten Phenylcarbamidsäureester **56-58** als „volle“ oder nur als „partielle“ Agonisten am $\alpha 7$ -Rezeptor fungieren, wurden diese Substanzen neben den agonistisch unwirksamen Carbamaten (**11**, **17**, **20** & **74-76**) gleichzeitig mit Nicotin **1** appliziert. Substanzen mit antagonistischen Eigenschaften sollten bei dieser Applikationsform im Vergleich zur alleinigen Applikation von Nicotin **1** eine Reduktion des induzierten Signals verursachen. Agonisten müssten hingegen durch einen additiven Effekt zu einer Vergrößerung des Signals führen.

Die gleichzeitige Applikation von Nicotin **1** und des Phenylcholinether **42** bzw. des unsubstituierte Trimethylammonium-Derivat **56** führte im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Nicotin **1** zu einem vergrößerten Signal (Tabelle 3.6-12). Allerdings fiel der additive Effekt der Substanzen **42** und **56** mit lediglich etwa 107 % der Nicotinwirkung deutlich kleiner aus, als es die Addition der Einzelwerte von Nicotin **1** und den untersuchten Verbindungen vermuten ließ (≥ 200 %).

Aufgrund der Ergebnisse der agonistischen Untersuchung der Carbamate **57** und **58** am $\alpha 7$ -Rezeptor (siehe **Agonisten am Subtyp $\alpha 7$**) und der Strukturähnlichkeit mit dem

Trimethylammonium-Derivat **56** ist zu erwarten, dass beide Carbanile **57** und **58** ebenfalls einen additiven Effekt bei gleichzeitiger Applikation mit Nicotin **1** zeigen.

*Tabelle 3.6-12: Ergebnis der Testung auf antagonistischen Effekt von Phenylcholinether **1** und den Phenylcarbamidsäureester **3** am $\alpha 7$ -nAChR primärer Hippocampus-Neuronen*

Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M
	42	107,8
	56	106,0

n.b.: nicht bestimmt

Die Untersuchung der unsubstituierten N-Methyl-pyrrolidin- und N-Methyl-piperidin-phenylcarbamate-Derivate **59**, **68** & **71** ergab, dass alle drei Carbamate über antagonistische Wirkung am $\alpha 7$ -Rezeptor verfügen. Das N-Methyl-pyrrolidinyl-phenylcarbamate **59** zeigte dabei die gleiche Wirksamkeit wie seine Piperidin-Analoga **68** und **71** (Tabelle 3.6-13). Bemerkenswert ist, dass die durch die N-Methyl-piperidinyl-carbanile **68** & **71** vermittelte Hemmung des Nicotin-induzierten Stromsignals die gleiche Größenordnung aufweist, obwohl die Carbamate in den Bindungsstudien deutlich unterschiedliche Affinitäten zum $\alpha 7$ -nAChR zeigten (Carbamate 17: $K_i = 15000$ nM; Carbamate 20: $K_i = 3600$ nM;).

Tabelle 3.6-13: antagonistischer Effekt von N-Methyl-pyrrolidinyl- **59** und N-Methyl-piperidinyl-phenylcarbamaten **68** & **71** am $\alpha 7$ -nAChR primärer Hippocampus-Neuronen

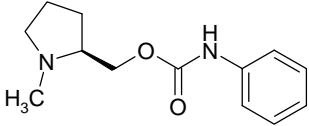
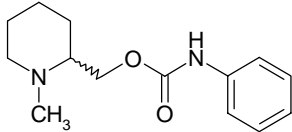
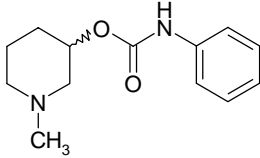
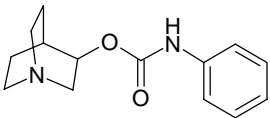
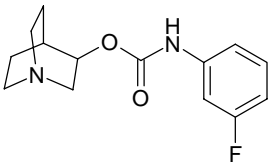
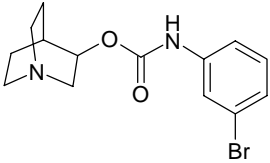
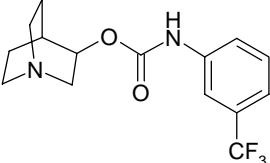
Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M
	59	60,5
	68	64,6
	71	64,8

Tabelle 3.6-14: antagonistischer Effekt von Chinuclidinyl-phenylcarbamaten **74-76** am $\alpha 7$ -nAChR primärer Hippocampus-Neuronen

Struktur	Nr.	Effekt [%] Testkonzentration 100 μ M
	74	65,2
	75	109,2
	83*	68,7
	76	80,4

*: synthetisiert von Lenka Munoz

Die gleichzeitige Applikation von Nicotin **1** und den Chinuclidinyl-phenylcarbamaten **74-76** und **83** ergab die in Tabelle 3.6-14 aufgeführten Ergebnisse. Die Derivate **74**, **76** und **83** wirkten hemmend auf das durch Nicotin-induzierte Signal (siehe Abbildung 126). Das Trifluormethyl-substituierte Carbamat **76** war dabei mit einer Hemmung des Nicotinsignals von ca. 20 % weniger inhibitorisch wirksam am $\alpha 7$ -Rezeptor als die Derivate **74** & **83**. Diese inhibierten die Stromantwort um 30 bis 35 %.

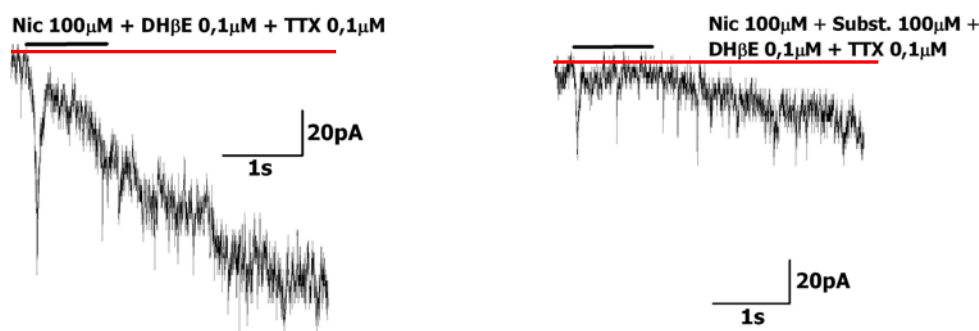


Abbildung 126: von Nicotin **1** und einer Kombination von Nicotin **1** und Phenyl-carbamidsäure-chinuclidin-3-yl-ester **74** induzierte Stromsignale in primären Hippocampus-Neuronen
links: Nicotin **1** (100 µM) rechts: Nicotin **1** (100 µM) & Phenylcarbamamat **56** (100 µM)
— : Zeitraum der Substanzapplikation(2s)
— : Perfusionslösung, enthält DHβE (0,1 µM) und TTX **88** (0,1 µM)

Das Phenylcarbamamat **75**, das sich schon in den Bindungsstudien als das potenteste Derivat dieser Serie erwies, zeigte wahrscheinlich schwach additive Effekte bei gleichzeitiger Applikation mit Nicotin **1** (109 %). Diese Tatsache lässt vermuten, dass möglicherweise alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Chinuclidin-Derivate **74** & **76** in höheren Konzentration (> 100 µM) agonistisch am α7-Rezeptor reagieren.

3.6.6 Diskussion

Ergebnisse am Subtyp α4β2 der nAChR

Von allen am α4β2-Subtyp untersuchten Verbindungen war einzig der Phenylether **42** in der Lage, in HEK-293-Zellen einen Strom zu induzieren. Für diese Substanz beschränkten sich die funktionellen Erkenntnisse bis dato auf eine Inhibition der Aminoxidase und einen Blutdruckanstieg nach i.v. Injektion (Katze)^{309,310,311}.

Das agonistische Verhalten des Cholinethers **42** korreliert mit Befunden aus der Literatur, die verschiedene Cholinether-Analoga (u.A. ABT-089 **33**, A-85380 **34**) als Agonisten am α4β2-Rezeptor beschreiben^{223,415}.

Da sich durch die Konzentrationserhöhung der Applikationslösung des Phenylethers **42** von 100 µM auf 1 mM keine Verbesserung des Verhältnisses der Peak-Amplituden ergab, schient der maximale Effekt der Testsubstanz schon bei einer Konzentration von 100 µM erreicht zu sein (Tabelle 3.6-1). Zur Bestätigung dieser Aussage ist jedoch eine Vermessung des Phenylethers **42** in einer geringeren Konzentration (< 100 µM)

notwendig. Dies ist für die Zukunft geplant.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass die intrinsische Aktivität einiger Verbindungen mit ihrer Affinität korreliert^{416,417}. Sollte dies auch für das Cholin-Analogon **42** gelten, so wäre die hohe Affinität der Substanz zum $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor ($K_i = 22,3$ nM) ein möglicher Erklärungsansatz, warum im Patch-Clamp-Versuch keine Konzentrations-Effektabhängigkeit im Bereich zwischen 100 und 1000 μM zu beobachten war.

Vergleicht man die intrinsische Aktivität des Phenylcholinethers **42** (16 %) mit der von Nicotin **1** bei gleicher Konzentration, so ist anzunehmen, dass diese Substanz am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor nur als partieller Agonist fungiert. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um diese Annahme endgültig zu bestätigen.

Die Hemmung vom Nicotin-induzierten Stromsignalen im Anschluss an die Testsubstanz-Applikation (siehe Abbildung 122) lässt eine antagonistische Wirkung der untersuchten Substanzen am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor vermuten. Die Erholung des Signals mit der Zeit (4,5 min) ist durch die Auswaschung bzw. Dissoziation des Liganden vom Rezeptor zu erklären. Dadurch ist zu vermuten, dass die Carbamate nicht irreversibel an nAChR binden, sondern mit Nicotin **1** um dessen Bindungsstelle konkurrieren (kompetitive Antagonisten). Die Phenylcarbamate dissoziieren im Vergleich zu MLA **14** und DH β E **29** (Daten nicht gezeigt) relativ langsam vom Rezeptor, da sie noch nach über 3 bzw. 4,5 Minuten nach ihrer letzten Applikation ein von Nicotin **1** induziertes Stromsignal partiell inhibieren (Abbildung 121).

Vergleicht man die Ergebnisse der Patch-Clamp-Untersuchungen mit den Resultaten der Radioligand-Bindungsstudien am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor ist festzustellen, dass die Befunde nicht korrelieren. Anhand der ermittelten K_i -Werten der Bindungs-Studien (3.4 Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien) würde man vermuten, dass neben den Trimethylammonium- **56-58** und Chinuclidin-Derivaten **74-76** die N-Methyl-pyrrolidin-phenylcarbamate **59-61** ($K_i = 526-1633$ nM) funktionelle Effekte am $\alpha 4\beta 2$ -nAChR aufweisen. Letztere scheinen aber am Rezeptor schlechter zu wirken, als es ihre Affinitätswerte vermuten lassen. Umgekehrt wurde festgestellt, dass die N-Methyl-piperidin-3-yl-phenylcarbamate **71-73**, für die in Bindungsstudien K_i -Werte von größer

20000 nM ermittelt wurden, ähnlich funktionell aktiv waren, wie die deutlich affineren Trimethylammonium- **56-58** und Chinuclidin-Analoga **74-76**. Diese Tatsache bestätigt einige Aussagen verschiedener Arbeitsgruppen, die postulierten, dass eine hohe Affinität zum Rezeptor nicht zwangsläufig mit einer hohen intrinsischen Aktivität einhergeht und umgekehrt^{221,257,417}. Weiterhin finden sich auch Hinweise in der Literatur, dass Substanzen trotz unterschiedlicher Affinität zu verschiedenen nAChR-Subtypen annähernd gleiche intrinsische Aktivität an diesen besitzen (z.B. Nicotin **1** an $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 7$ -Rezeptoren)^{212,213,226}.

Generell ist zu bemerken, dass die Wechselbeziehung zwischen Affinität und intrinsischer Aktivität abhängig ist von dem eingesetzten Testsystem und somit von dem verwendeten Rezeptor exprimierenden Gewebe. Der Unterschied zwischen der Affinität in den Bindungsstudien und der funktionellen Wirkung im Patch-Clamp-Experiment könnte auf die Verwendung unterschiedlicher Expressionssysteme für den $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor zurückzuführen sein. In den Radioligand-Bindungsstudien wurden Homogenate nativer Gewebe verwendet, während in den funktionellen Studien transfizierte HEK-293-Zellen, die letztendlich artifizielle Konstrukte darstellen, bzw. primäre Kulturen von Hippocampus-Neuronen eingesetzt. Es ist nicht vollkommen auszuschließen, dass sich die Eigenschaften der in den verwendeten organischen Materialien exprimierten Rezeptoren unterscheiden, was zwangsläufig die Ergebnisse der unterschiedlichen Testmethoden beeinflussen würde. Es ist bereits mehrfach in der Literatur erwähnt worden, dass die pharmakologischen Eigenschaften von nAChR aus artifiziellen Expressionssystemen und aus nativen Geweben divergieren^{386,418}.

Ein weiterer Aspekt, der zu einer Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Bindungsstudien und der funktionellen Assays führt, ist die Tatsache, dass bei der Ermittlung der Affinität in Bindungsstudien Rezeptoren im „desensibilisierten Zustand“ berücksichtigt werden, wohingegen diese in funktionellen Studien keinerlei Beitrag leisten^{416,419,420}.

Toma et al. führen einen weiteren Grund für die Widersprüchlichkeit der Resultate auf. Sie vermuten, dass möglicherweise derzeit noch unbekanntere Untereinheiten und Subtypen der nAChR für die Divergenz der Versuchsergebnisse verantwortlich sind⁴¹⁷.

Auch innerhalb einer Carbamatserie mit gleicher Aminkomponente, deren Derivate sich

durch ihre Substitution am Phenylring unterscheiden, stimmen die Ergebnisse der antagonistischen Testung mittels Patch-Clamp-Versuchen nicht mit den Resultaten der Bindungsstudien am nativen $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor überein. Das Fluor-substituierte Chinuclidinyl-phenylcarbamat **75**, das bei gleichzeitiger Applikation mit Nicotin **1** den größten hemmenden Effekt auf das induzierte Stromsignal besaß, zeigte zwar die höchste Affinität aller getesteten Verbindungen am $\alpha 7$ - und 5-HT_{3A}-Rezeptor, war aber am $\alpha 4\beta 2$ -Nicotinrezeptor-Subtyp deutlich schlechter wirksam als die beiden anderen Analoga (**74** & **76**) dieser Serie. Dieses Ergebnis könnte, wie schon oben beschrieben, ebenfalls durch die Verwendung unterschiedlicher Gewebe bzw. Zellen bei den verwendeten Untersuchungsmethoden hervorgerufen werden. In diesem Zusammenhang ist nicht auszuschließen, dass die verwendeten Gewebe und Zellen möglicherweise über noch andere „unbekannte“ Subtypen verfügen und diese bei den Untersuchungen mit erfasst werden.

Jedoch ist ebenfalls denkbar, dass eine hohe Affinität nicht zwangsläufig mit einer guten intrinsischen Aktivität einhergeht.

Die elektrophysiologischen Effekte der Carbamate am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor scheinen sich daher nicht unbedingt anhand der Affinitätswerte der Radioligand-Bindungsstudien vorhersagen zu lassen⁴¹⁶. Zur detaillierten Charakterisierung der antagonistischen Wirkung der hergestellten Carbamate sind daher weitere Experimente, vor allem die unter „**Antagonisten am Subtyp $\alpha 4\beta 2$** “ beschriebene Methode zur Testung von Antagonisten, unerlässlich. Die Ermittlung einer Dosis-Wirkungsbeziehung der Carbanile am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor wäre zusätzlich hilfreich, um die Auswirkung unterschiedlicher Substitutionsmuster auf die funktionellen Eigenschaften besser vergleichen zu können.

Ergebnisse am Subtyp $\alpha 7$ der nAChR

Wie schon am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor zeigt der Phenylcholinether **42** auch an diesem Subtyp ein agonistisches Verhalten, jedoch ist sein Effekt am $\alpha 7$ fast fünffach stärker ($\alpha 4\beta 2 \rightarrow 17\%$; $\alpha 7 \rightarrow 78\%$). Dies korreliert nicht unbedingt mit den Ergebnissen der Bindungsstudien, aus denen sich für den Ether eine etwas höhere Affinität zum Subtyp $\alpha 4\beta 2$ ergab ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 22$ nM; $\alpha 7$: $K_i = 196$ nM) (Tabelle 3.6-1, Tabelle 3.6-9, 3.4 Ergebnisse der

Radioligand-Bindungsstudien). Wie schon für den $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor diskutiert, finden sich mehrere Gründe für das Fehlen einer Korrelation zwischen Affinität und intrinsischer Aktivität in der Literatur. Zum einen könnte die Abweichung der Testergebnisse durch die Verwendung unterschiedlicher Gewebe bzw. Zellen bei den verwendeten Untersuchungsmethoden hervorgerufen werden. Wie bereits zuvor beschrieben, werden aber möglicherweise auch bei der einen oder anderen verwendeten Methode „unbekannte“ Nicotinrezeptor-Subtypen miterfasst. Es ist jedoch ebenfalls denkbar, dass die hohe Affinität einer Substanz nicht zwangsläufig mit einer guten intrinsischen Aktivität einhergeht.

Ein gutes Beispiel für eine Substanz, die gegensätzliche Ergebnisse im Vergleich von Bindungsstudien und funktionellen Tests zeigt, ist Cholin **28**. Alkondon et al. und Papke et al. zeigten, dass der Precursor und Metabolit des Acetylcholins **2** trotz geringer Affinität zu Nicotinrezeptoren ($\alpha 4\beta 2$: $K_i = 112 \mu\text{M}$ & $\alpha 7$: $K_i = 2,2 \text{ mM}$) am $\alpha 7$ -nAChR als selektiver und voller Agonist und am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor als Co-Agonist fungiert^{195,196}.

Im Gegensatz zum $\alpha 4\beta 2$ -Subtyp erwiesen sich die Trimethylammonium-Carbamate **56-58** am $\alpha 7$ -Rezeptor als Agonisten und induzieren im Fall des am Aromaten unsubstituierten Phenylcarbamates **56** sogar ein etwas stärkeres Stromsignal als die Bezugssubstanz Nicotin **1** (107 %) (Tabelle 3.6-9).

Vergleicht man die Effekte der Trimethylammonium-Derivate in den Patch-Clamp-Versuchen mit ihren in den Radioligand-Bindungsstudien ermittelten Affinitäten, so fällt auf, dass auch hier die Ergebnisse nicht immer korrelieren. In den Bindungsstudien zeigten die Phenylcarbamate **56** und **58** gleich hohe Affinität zum $\alpha 7$ -nAChR (ca. 30 nM). Betrachtet man hingegen die Ergebnisse der Patch-Clamp-Versuche, so erweist sich das Carbat **56** im Vergleich zum Carbanil **58** um 30 % wirksamer (**56**→107 %; **58**→71 %) (Tabelle 3.6-9).

Betrachtet man die Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente für die N-Methylpyrrolidinyl- **59-61** und N-Methyl-piperidinyl-phenylcarbamate **68-70** & **71-73** im Vergleich zu ihren Radioligand-Bindungsdaten, so ist festzustellen, dass die Verbindungen trotz stark unterschiedlicher Affinität zum $\alpha 7$ -Rezeptor im funktionellen Test eine ähnliche Wirkstärke besitzen (Tabelle 3.6-13). Weiterhin ist im Patch-Clamp-

Versuch keinerlei Einfluss der Substitutionsposition am Methyl-piperidinring der N-Methyl-piperidin-2-yl- **68-70** und N-Methyl-piperidin-3-yl-Carbamate **71-73** auf die Signalhemmung zu erkennen. Konstatieren lässt sich in jedem Fall, dass die drei Carbamatserien **59-61**, **68-70** und **71-73** antagonistisch am $\alpha 7$ -nAChR wirken, allerdings können nur weitere, detaillierte und konzentrationsabhängige Untersuchungen zeigen, inwieweit sich diese Phenylcarbamate in ihrer Wirkstärke voneinander unterscheiden.

Aufgrund der agonistischen Wirkung des Brom-substituierten Chinuclidin-phenylcarbamats **83** und des additiven Effekts des Carbamats **75** bei gleichzeitiger Applikation mit Nicotin **1** ist nicht auszuschließen (Tabelle 3.6-11 & Tabelle 3.6-14), dass alle Derivate dieser Serie in Abhängigkeit ihrer Konzentration agonistisch am $\alpha 7$ -nAChR wirken. Jedoch sind zur Bestätigung dieser Vermutung weitere Patch-Clamp-Experimente notwendig, in denen die Chinuclidincarbanile **74-76** in einer höheren Konzentration als 100 μM eingesetzt werde. Gestützt wird diese Hypothese durch Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen, die für einige der Carbamaten **74-76** sehr ähnliche Substanzen eine agonistische Wirkung veröffentlichten (z.B. AR-R1779 **43**)^{320,321,421}.

Da diese Carbamate **74-76** aber auch in der Lage sind, ein Nicotin-induziertes Signal zu hemmen (Tabelle 3.6-14), handelt es sich vermutlich um Partialagonisten an diesem Rezeptorsubtyp. Diese Vermutung korreliert wiederum mit Befunden aus der Patentliteratur, in denen diverse Chinuclidinyl-phenylcarbamate bzw. Chinuclidinylamide als Partialagonisten an $\alpha 7$ -Rezeptoren beschrieben wurden^{416,422}. Weiterhin sind die im Rahmen dieser Arbeit an Makrophagen untersuchten Chinuclidinyl-carbanile **74-76** in der Lage in den monozytären Zellen einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hervorzurufen. Sollte diese Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über den Einstrom von Calcium-Ionen durch Ionenkanäle ($\alpha 7$ -Rezeptor) zu Stande kommen, was noch zu beweisen wäre, so würde diese Tatsache ebenfalls für eine agonistische Wirkungsweise der Chinuclidin-Derivate am $\alpha 7$ -nAChR sprechen (siehe 3.7 Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Mäusemakrophagen). Ein weiterer Hinweis auf ein mögliches agonistisches Verhalten der Chinuclidin-Derivate **74-76** & **83** findet sich in der Veröffentlichung von Dolle et al. Die Arbeitsgruppe beschrieb den *para-*

substituierten, ^{11}C -markierten N-(4-Bromophenyl)-carbamidsäure-chinuclidin-3-ylester, der sich von dem Phenylcarbamat **83** einzig durch die Substitutionsposition am Phenylring unterscheidet, als einen agonistischen Radiotracer für den $\alpha 7$ -Rezeptor³⁷⁵.

Kritisch ist in diesem Zusammenhang die Hypothese einer Forschergruppe der Firma Lilly zu beurteilen, die für die Verbindung 5-Pyridin-2-yl-thiophene-2-carbonsäure-(chinuclidin-3-yl)-amid und für einige weitere $\alpha 7$ -Agonisten postulierten, dass diese schon in viel geringeren Konzentrationen, als zur Aktivierung des Ionenkanals notwendig, den Rezeptor desensibilisieren^{416,423,424,425}. O'Neill et al. vermuten sogar, dass diese Desensibilisierung *in vivo* zu einem funktionellen Antagonismus am $\alpha 7$ -nAChR führt⁴²⁵.

Überträgt man diese Theorie auf die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Chinuclidin-Derivate, könnte diese Hypothese die Tatsache erklären, dass die Chinuclidinyl-carbanile **74-76** zwar in Makrophagen zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen, aber kein Stromsignal nach Applikation im Patch-Clamp-Experiment induzieren.

Die Auswirkung des Substituenten am Phenylring der Chinuclidin-phenylcarbamate auf die funktionellen Eigenschaften der Substanzen ist anhand der erhobenen Patch-Clamp-Daten nur schwierig zu bewerten. Aus den Radioligand-Bindungsstudien geht hervor, dass eine Erhöhung der Elektronendichte im Aromat durch den Fluor-Substituenten zu einer Verbesserung der Affinität führt. Diese Tendenz ist im funktionellen Screening ebenfalls zu beobachten. Jedoch erwies sich im Vergleich zum Fluor-substituierten Phenylcarbamate **75** das Brom-substituierte Derivat **83**, dessen Substituent einen geringeren (+)-M-Effekt aufweist und wesentlich voluminöser ist, als potenter. Der (-)-M-Effekt der Trifluormethyl-Gruppe scheint sich wiederum negativ auf die Wirkstärke am $\alpha 7$ -Rezeptor auszuwirken, da das Carbamate **76** deutlich schlechter wirksam ist als die anderen Derivate dieser Serie.

Auch für die Serie der Chinuclidin-Derivate gilt, dass weitere Versuche zum Verständnis der Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Substanzen notwendig sind (5.2 Ausblick).

Zusammenfassung

Für die Patch-Clamp-Experimente am $\alpha 7$ -Rezeptoren lässt sich feststellen, dass die Trimethylammonium- **56-58** und die Chinuclidin-Derivate **74-76**, die schon in den Radioligand-Bindungsstudien die besten Affinitäten zu diesem Subtyp zeigten, die größten funktionellen Effekte (agonistisch) in diesen Versuchen aufwiesen.

Ähnliches ist auch für den $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor festzustellen. Die Substanz mit der höchsten Affinität zu diesem Rezeptorsubtyp, der Phenylcholinether **42**, wirkte ebenfalls agonistisch.

Ferner ist zu bemerken, dass die erhobenen Patch-Clamp-Daten mit den Befunden aus den Bindungsstudien in den wichtigsten Punkten korrelieren. Die potentesten Verbindungen in den Bindungsstudien besitzen auch die stärksten Effekte im funktionellen Test. Lediglich in Detailfragen, wie dem Einfluss der Substitutionsposition der N-Methyl-piperidinyl-carbamate **68-73** auf die Substanz-eigenschaften, ist eine Korrelation der Ergebnisse der beiden Methoden aufgrund der verwendeten unterschiedlichen Gewebe und nicht zuletzt aufgrund der geringen Datenmenge der Patch-Clamp-Versuche kaum feststellbar.

Um eine genauere Struktur-Wirkungsbeziehung der Carbamate an neuronalen nAChR Subtypen zu postulieren, reichen die während des Auslandsaufenthaltes in Japan erhobenen Daten bei weitem nicht aus. Eine exakte Evaluierung der antagonistischen Wirkung der Phenylcarbamate mit der unter „**Antagonisten am Subtyp $\alpha 4\beta 2$** “ beschriebenen Methode wäre genauso erforderlich, wie die Ermittlung der Effekt-Konzentrationsabhängigkeit in der Untersuchung auf Agonismus.

3.7 Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ in Mäusemakrophagen

3.7.1 Allgemeine und physikalische Grundlagen der Fluorimetrie

Verschiedene Feststoffe, Flüssigkeiten oder Gase zeigen bei der Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge des Lichtes eine Leuchterscheinung, die als Fluoreszenz bezeichnet wird. Das emittierte Fluoreszenzspektrum ist charakteristisch für eine Verbindung und kann zu deren Qualifizierung und Quantifizierung herangezogen werden⁴²⁶.

Bei dem optischen Phänomen der Fluoreszenz wird zunächst ein Photon ausreichender Energie von einem Atom oder Molekül absorbiert, was die Anhebung eines Elektrons aus dem Grundzustand (S_0) in ein freies, zuvor unbesetztes, energiereicheres Orbital unter Erhaltung des Spins bedingt. Das Atom bzw. Molekül geht dabei in den so genannten angeregten Singulett-Zustand (S_1 , S_2) über (Abbildung 127).

Die Rückkehr des Moleküls aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand kann nach dem Jablonski-Thermschema (Abbildung 127) auf drei verschiedene Weisen geschehen. Eine Möglichkeit ist, dass die überschüssige Energie bei Kollision mit Nachbarpartikeln strahlungsarm auf diese übertragen oder durch innere Umwandlung abgebaut wird. Einen zweiten Fall stellt der strahlungsarme Übergang des Singulett-Zustands in den Triplettzustand (T_1) unter Spinumkehr dar. Bei der durch die Spinumkehr verzögerten Rückkehr des Moleküls in den Grundzustand (10^{-5} Sekunden bis Minuten) wird die überschüssige Energie in Form von Licht emittiert. Dieses Phänomen wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Als dritte Möglichkeit bleibt die Fluoreszenz - die direkte Umwandlung der Anregungsenergie in Licht und Rückkehr in den Grundzustand ohne Spinumkehr⁴²⁶.

Die Begriffe Phosphoreszenz und Fluoreszenz werden auch unter dem Oberbegriff Photolumineszenz zusammengefasst. Der Unterschied zwischen diesen beiden Lumineszenzeffekten liegt in dem zeitlichen Auftreten der Lichtemission. Wie schon erwähnt tritt diese bei der Phosphoreszenz durch die Spinumkehr erst zeitlich verzögert auf, während der Effekt bei der Fluoreszenz unmittelbar nach Anregung des Elektronensystems erfolgt und auf den Zeitraum der Anregung des Moleküls begrenzt ist. In beiden Fällen gilt, dass die emittierte Wellenlänge größer ist als die der zur

Anregung verwendeten Strahlung.

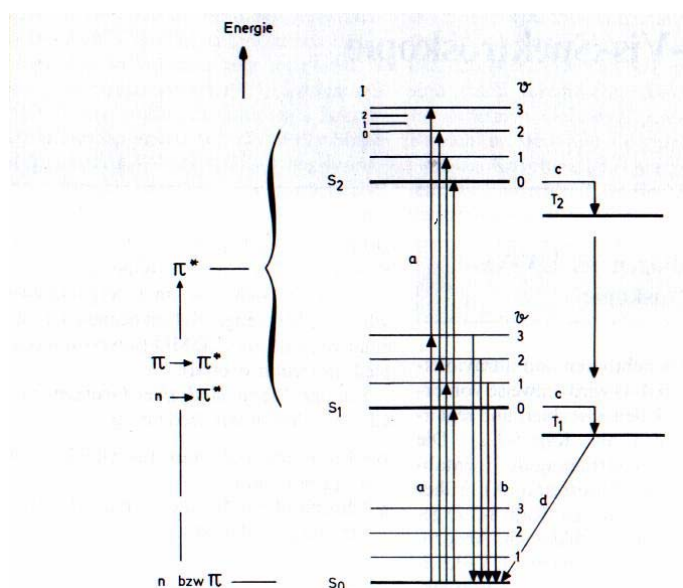


Abbildung 127: vereinfachte Darstellung des Jablonski-Thermschemas⁴²⁶

Fluoreszenzeigenschaften zeigen vermehrt starre Moleküle mit aromatischen Systemen, konjugierten Doppelbindungen, Carbonylverbindungen oder kondensierte Heterozyklen. Diese Eigenschaften sind besonders ausgeprägt bei Verbindungen, die über funktionelle aromatische Gruppen mit energiearmen π - π^* -Übergangsniveaus verfügen⁴²⁶.

Einige chemische Verbindungen sind nach leichter chemischer Modifikation oder nach Wechselwirkung mit Ionen und Oberflächen in der Lage, Fluoreszenz zu entwickeln bzw. eine vorhandene zu intensivieren. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden Calciumkomplexbildner mit diesen Eigenschaften entwickelt, um in Zellen eine durch extrazelluläre Effektoren induzierte Änderung der Calciumkonzentrationen anhand des Anstiegs der Fluoreszenz in Echtzeit zu verfolgen.

3.7.2 Fluoreszenzindikator Fura-2

Der mittlerweile gebräuchlichste Fluoreszenzindikator zur Messung von Konzentrationsänderungen des Calciums in Zellen ist der von Roger Tsien und Mitarbeitern entwickelte und von Molecular Probes (Oregon, USA) vertriebene Chelator Fura-2 **89**⁴²⁷.

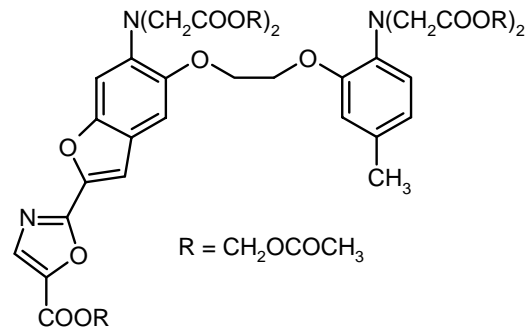


Abbildung 128: Struktur des Fluoreszenzmarkers Fura-2 **89**
 (1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethan-
 N,N,N',N'-tetraessigsäure-pentaacetoxymethylester)

Die Substanz weist in-vitro eine relativ hohe Affinität ($K_i = 224 \text{ nM}$) zu Calcium-Ionen auf und erlaubt eine Messung von Änderungen der Calciumkonzentration im Bereich von 20 nM bis $2 \text{ }\mu\text{M}$ ^{427,428}. Da die bei physiologischen pH-Wert geladene Säureform von Fura-2 **89** nicht membrangängig ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der kommerziell erwerbliche Acetoxymethylester (AM) des Fluoreszenzindikators eingesetzt. Die lipophile, ungeladene Esterform diffundiert passiv durch die Zellmembran und wird im Zytosol durch ubiquitäre, unspezifische Esterasen gespalten. Die Effizienz der Permeation kann durch das nicht-ionische und nicht-denaturierende Detergenz Pluronic[®] F-127 verbessert werden. Durch die Esterspaltung in der Zelle reichert sich die nicht membrangängige Säureform im Plasma an und kann das vorhandene freie Calcium komplexieren⁴²⁹.

Das Hauptproblem bei der Verwendung von Fura-2 **89** ist die Verschiebung der maximalen Exzitation-Wellenlänge in Abhängigkeit der Calciumkonzentration. Bei niedriger Konzentration liegt das Maximum der Anregungswellenlänge bei 363 nm , bei hoher Calciumkonzentration bei 335 nm , wobei sich die Wellenlänge des emittierten Lichtes konstant im Bereich von 510 nm bewegt⁴²⁹.

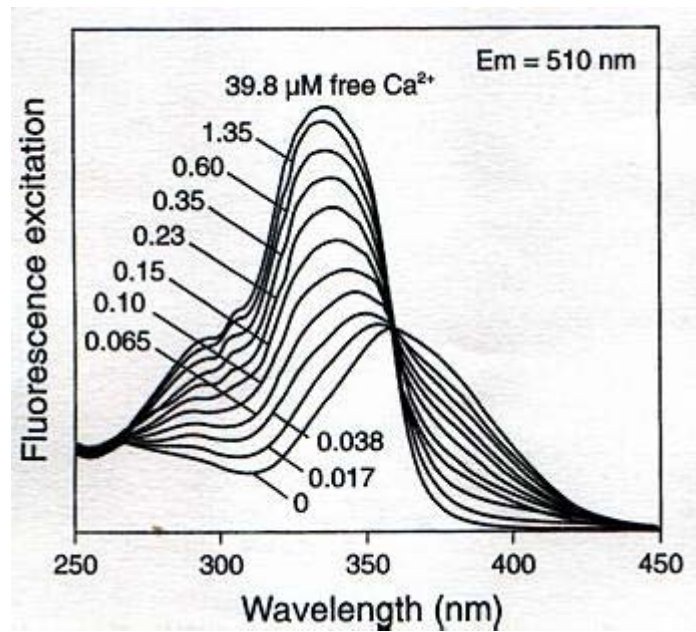


Abbildung 129: Fluoreszenzexcitationsspektrum von Fura-2 **89** bei verschiedenen Calciumkonzentrationen (0 - $39,8 \mu\text{M}$)⁴²⁹

Da die Verschiebung der Exzitation nicht vernachlässigt werden kann, wird die Substanz während des Experiments dual angeregt. Dies bedeutet, dass bei konstanter Emissionswellenlänge Fura-2 **89** in kurzen zeitlichen Abständen jeweils mit zwei verschiedenen Wellenlängen (340 und 380 nm) angeregt wird. Durch Quotientbildung (ratio) der gemessenen Emission bei den Anregungswellenlängen 340 und 380 nm wird zum einen die maximale dynamische Veränderung ermittelt, zum anderen erreicht man eine Annullierung von artifiziellen Variationen des Fluoreszenzsignals (siehe Abbildung 130). Die Messung ist somit unabhängig von der Indikatorkonzentration, der Zeldicke, der Anregungslichtintensität und der Kameraempfindlichkeit. Außerdem spielen ein „Auslaufen“ des Indikators aus der Zelle und „Ausbleicheffekte“ keine Rolle, da beide vermessenen Wellenlängen gleichermaßen davon betroffen sind⁴²⁷.

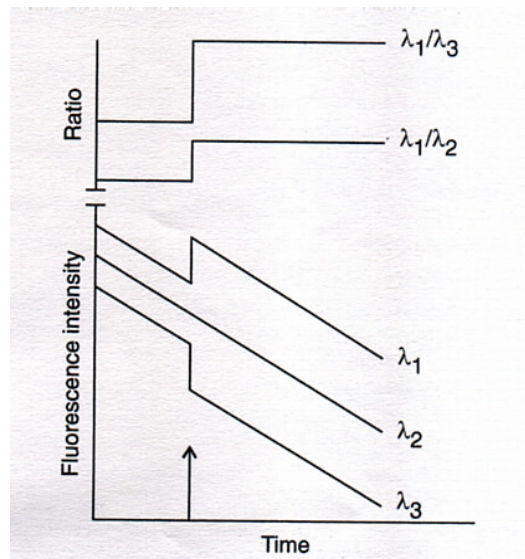


Abbildung 130: simulierte Daten zur Verdeutlichung der Wichtigkeit ratiometrischer Fluoreszenztechnik.

λ_1 & λ_3 (unten): die Fluoreszenz bei diesen Anregungswellenlängen ist abhängig von der Ca^{2+} -Konz.
 λ_2 (unten): die Fluoreszenz bei diesen Anregungswellenlängen ist unabhängig von der Ca^{2+} -Konz.
 λ_1/λ_3 (oben): maximale dynamische Veränderung ermittelt und Annullierung von artifiziellen Variationen⁴²⁹

Die Verwendung von UV-Licht zur Anregung von Fura-2 **89** wirkt sich aufgrund der Phototoxizität negativ auf die verwendeten Zellen aus. Ebenfalls nachteilig ist die Anreicherung des AM-Calciumchelators in Zellorganellen und die dadurch bedingte ungleichmäßige Verteilung innerhalb der Zelle, sowie eine gewisse Eigenfluoreszenz des AM⁴³⁰. Die anionische Form des Fluoreszenzindikators kann über Ionentransporter aus der Zelle eliminiert werden, was die Messung des freien Calciums zusätzlich erschwert.

Eine absolute Quantifizierung der Änderung der Calciumkonzentration ist über die „ratio“ möglich, allerdings bedarf es dazu der Ermittlung der Dissoziationskonstanten von Fura-2 **89** über Kalibrierungskurven⁴²⁷. Diese Konstante ist jedoch abhängig von äußeren Faktoren wie z.B. der Temperatur und der Viskosität^{431,432,433}. Daher erweist sich ihre Bestimmung als schwierig, zeitaufwendig und als teilweise fehlerhaft. Da die Beziehung zwischen Calciumkonzentration und dem Quotient der Emission beider verwendeten Anregungswellenlängen linear für den Bereich zwischen 0 und 2,5 ist, wird auf eine absolute Bestimmung der Konzentrationsänderung in der Regel verzichtet⁴³⁰. Eine Abschätzung der konkreten Änderung ist über die Linearität der Beziehung möglich.

3.7.3 Datengewinnung und Funktionsweise des invertierten Mikroskops

Der Aufbau und die Funktionsweise des invertierten Mikroskops kann anhand der Abbildung 131 erläutert werden.

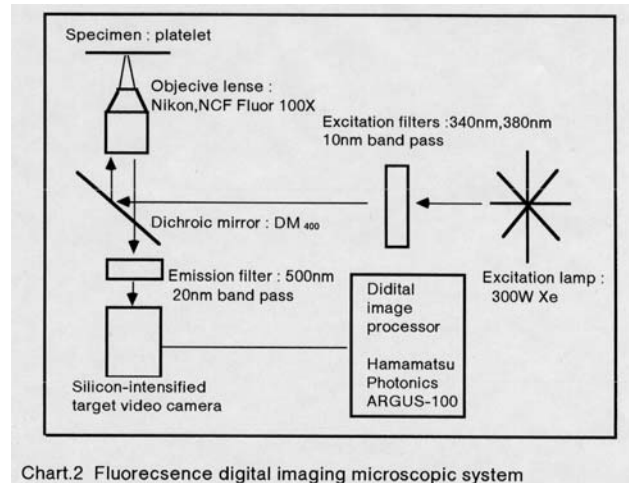


Abbildung 131: schematische Darstellung der Funktionsweise des verwendeten Fluoreszenzmikroskops⁴²⁹

Das zur Anregung des Fluoreszenzmarkers benötigte Licht wird von einer Xenon-Lampe erzeugt und von einem nachgeschalteten Monochromator auf die Wellenlängen von 340 und 380 nm begrenzt (Abbildung 131 & Abbildung 132). Die Strahlung wird über einen speziellen Spiegel umgelenkt und erreicht über das Objektiv die Kulturschale (Flexiperm[®]-Schablonen) mit den Fluoreszenzmarker „geladenen“ Makrophagen. Die nach Anregung von Fura-2 **89** emittierte Wellenlänge des Lichts (510 nm) wird nach Passage des Objektivs und des Spiegels von einem komplexen Kamerasystem registriert, digitalisiert und an einen Personal Computer mit geeigneter Software weitergeleitet. Die verwendete Argus HiSCA Software ist in der Lage die Fluoreszenzintensitäten von zuvor festgelegten Zellen in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge aufzuzeichnen und den Quotient der Fluoreszenzintensitäten (ratio) gegen die Zeit in Echtzeit graphisch darzustellen.

Zu Beginn jedes Versuchs wird zunächst die Basisfluoreszenz bestimmt, bevor die eigentliche Messung durch die Applikation der Testlösung gestartet wird. Die Aufzeichnung der Fluoreszenz wird gestoppt, wenn diese wieder annähernd das Ausgangsniveau erreicht hat.

Der Vergleich der Einzelexperimente ist über die Berechnung der maximalen Fluoreszenzänderung ($\text{ratio}_{\text{max}} - \text{ratio}_{\text{min}}$) möglich. Die Ergebnisse werden als Prozent einer Nicotinkontrolle (1 mM) angegeben.



*Abbildung 132: Versuchsaufbau
von links nach rechts: Lichtquelle, Mikroskop mit Inkubator; Steuerungselement des Inkubators;
Kamerakontroller & PC*

3.7.4 Projekt

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Nicotin **1** auf einem post-transkriptionalen Mechanismus die Freisetzung des Zytokins TNF- α inhibiert⁴³⁴. Wang et al. konnten kürzlich nachweisen, dass der in humanen Makrophagen vorkommende $\alpha 7$ -Subtyp der nAChR eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung des TNF- α spielt. Der Rezeptor stellt somit einen essentiellen Regulator von Entzündungsprozessen dar⁸⁵⁴³⁵. Diese Entdeckung warf die Frage auf, ob $\alpha 7$ -Nicotinrezeptoren ebenfalls in den Makrophagen von Mäusen exprimiert werden und inwieweit sich ein eventueller Calciumeinstrom durch diese Ionenkanäle mit Hilfe einer fluorimetrischen Methode quantifizieren lässt. In Rahmen eines sechsmonatigen Forschungsaufenthaltes in Japan wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis um Dr. I. Hide (Department of Pharmacology, Graduated School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Japan) versucht, eine intrazelluläre Änderung der Calciumkonzentration in Mäusemakrophagen nach Stimulation mit einer Testsubstanz (Nicotin **1**, Phenylcarbamate **56-76**) über die Fluoreszenzintensität des Calcium-Chelators Fura-2 **89** zu bestimmen.

3.7.5 Ergebnisse

Neben der Messung der Calciumkonzentrationsänderung ($[Ca^{2+}]_i$), wurden Western-Blot-Experimente mit den aus männlichen C57BL/6-Mäusen isolierten Makrophagen unternommen. Die Abbildung 133 zeigt die Ergebnisse dieser Immunopräzipitationsversuche für die Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 4$ & $\beta 2$ des nAChR.

Im Western-Blot für die $\alpha 7$ -Untereinheit (Abbildung 133 rechts) ist eindeutig eine scharfe Bande auf der Höhe der Kontrollbande C des Proteins der $\alpha 7$ -Untereinheit zu erkennen. Dies konvergiert mit den Ergebnissen, die von Wang et al. veröffentlicht wurden⁸⁵. Im Vergleich dazu findet sich keine Bande auf der Höhe der Vergleichsbande für die $\beta 2$ -Untereinheit (Abbildung 133 Mitte). Der Immunopräzipitationsversuch für die $\alpha 4$ -Untereinheit zeigt wiederum eine sehr schwache Bande auf der Höhe der Protein-Vergleichsbande dieser Untereinheit. Aus diesem Experiment ist daher abzuleiten, dass die Makrophagen über zwei Untereinheiten verfügen, deren Molekulargewichte denen der Einheiten $\alpha 7$ und $\alpha 4$ entsprechen. Die Existenz der $\beta 2$ -Untereinheit in den Immunzellen ist nach diesen Experimenten eher auszuschließen.

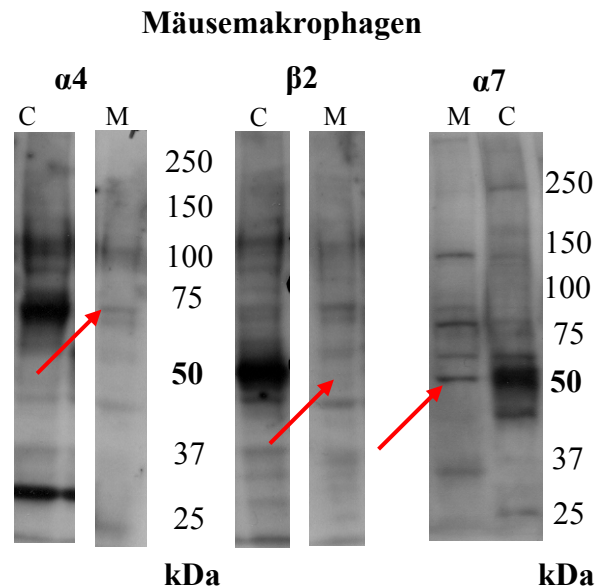


Abbildung 133: Western-Blot von Mäusemakrophagen für die $\alpha 4$, $\alpha 7$ und $\beta 2$ Untereinheit des nAChR

$\alpha 4$: Antikörper: AChRa4(A-20): sc-5544 (rabbit) (links)
 $\beta 2$: Antikörper: AChR $\beta 2$ (H-302): sc-5544 (rabbit) (Mitte)
 & Antikörper donkey anti-goat IgG HRP sc-2054
 $\alpha 7$: Antikörper: AChRa7(H-302): sc-5544 (rabbit) (rechts)
 & Antikörper goat anti-rabbit IgG HRP sc-2054
 C: Kontrolle M: Makrophagen

Die Messungen der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration in Makrophagen nach Nicotin-Applikation ergaben, dass das Alkaloid **1** zu einem konzentrations-abhängigen Anstieg des freien Calciums in der Immunzellen führt (siehe Abbildung 134, schwarze Kurve). Dieser Effekt war unabhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration (Daten nicht gezeigt). Die Testung verschiedener Nicotin-Konzentrationen ergab, dass eine Konzentration von 100 μM bei der gewählten Versuchsanordnung nicht ausreichend war, um eine deutliche Intensitätssteigerung des von Fura-2 **89** emittierten Fluoreszenzlichtes zu erreichen (Daten nicht gezeigt). Ein optimaler Anstieg der Fluoreszenzintensität wurde hingegen mit einer Nicotin-Lösung von 1 mM erreicht. Daher wurde in allen weiteren Experimenten diese Nicotinlösung (1 mM) als Referenz und Bezugsgröße verwendet.

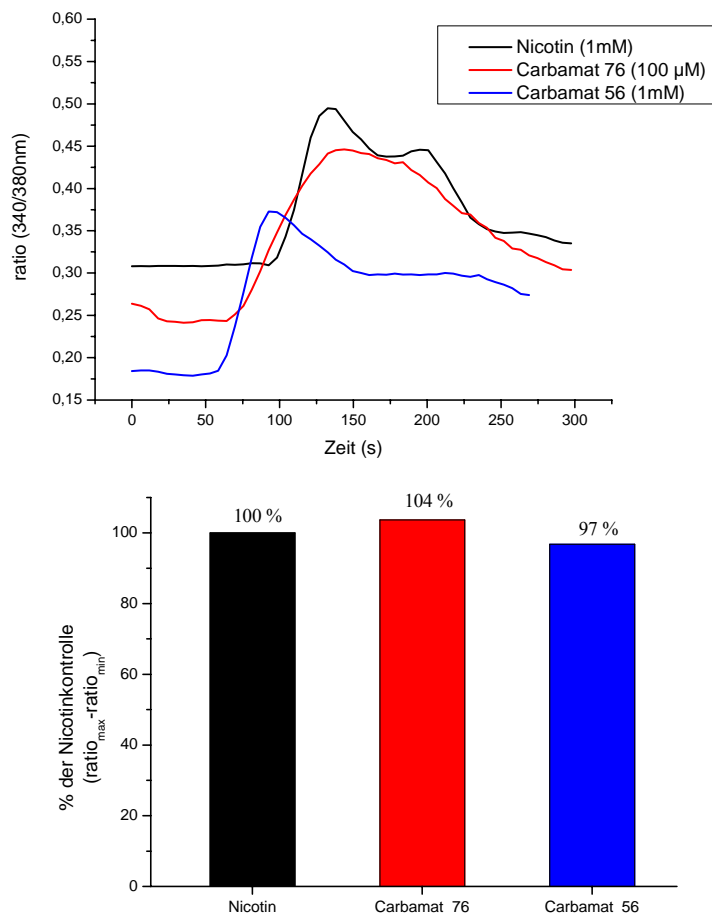


Abbildung 134: Evaluation von intrazellulären Calciumspiegeln nach Applikation von Nicotin **1** (schwarz, 1 mM, Mittelwert aus 2 Experimenten) sowie den Phenylcarbamaten **76** (rot, 100 μM , Einzelerperiment) und **56** (blau, 1mM, Einzelerperiment) (Experimente eines Versuchstages mit den Makrophagen einer Charge)

Aus der Abbildung 134 geht weiterhin hervor, dass auch die Phenylcarbamate **56** (blau) und **76** (rot) einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ hervorrufen. Die Fluoreszenzintensivierung nach Applikation einer Lösung von 1 mM Trimethylammonium-Phenylcarbamat **56** (blau) sowie 100 μ M (3-Trifluormethyl-phenyl)-chinuclidin-3-yl-carbamidsäureester **76** (rot) entspricht dabei etwa der von Nicotin **1** (1 mM).

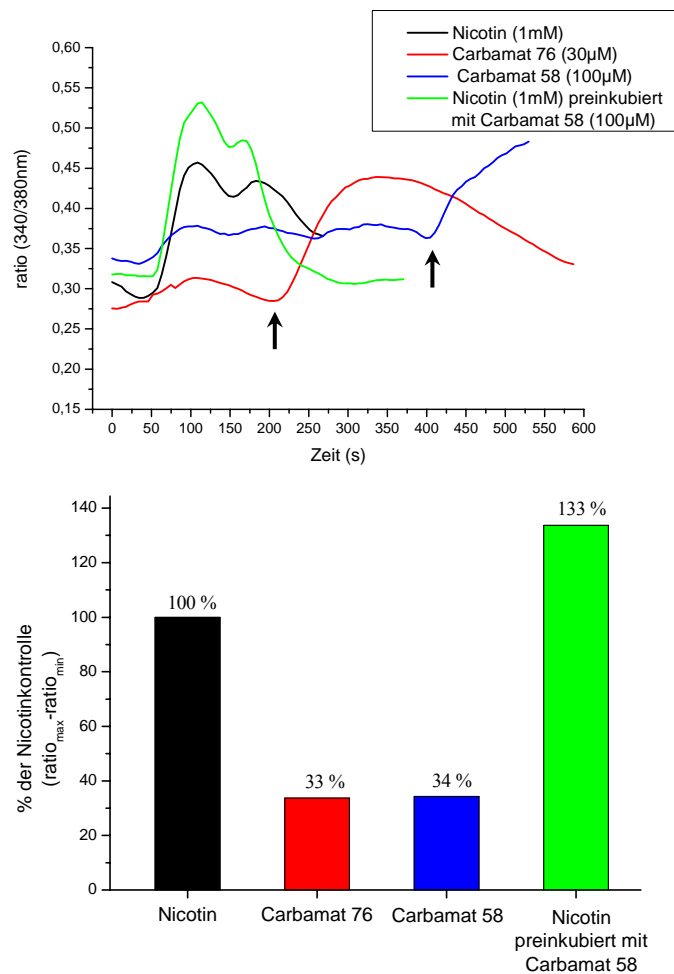


Abbildung 135: Evaluation von intrazellulären Calciumspiegeln nach Applikation von Nicotin **1** (schwarz, 1 mM, Mittelwert aus 2 Experimenten), Phenylcarbamat **76** (rot, 30 μ M, Einzelexperiment), Phenylcarbamat **58** (hellblau, 1 mM, Einzelexperiment) und Nicotin **1** nach Preinkubation mit dem Phenylcarbamat **58** (dunkelblau, Nicotin **1** (1 mM) und Phenylcarbamat **58** (1 mM), Einzelexperiment),
 ↑: Applikation von Nicotin **1** (1 mM) zur Kontrolle
 (Experimente eines Versuchstages mit den Makrophagen einer Charge)

Die Applikation einer 1 mM Lösung des Carbamates **76** führt im Vergleich zur Referenzlösung (Nicotin **1**, 1 mM) zu einem 17fach größeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Daten nicht gezeigt). Selbst in einer Konzentration von 30 μ M entspricht das durch das Carbamat **76** ausgelöste Fluoreszenzsignal noch etwa 33 % des Nicotin-

Vergleichsignals (Abbildung 135).

Die Testung des Trifluormethyl-substituierten Trimethylammonium-Carbanils **58** (blau) ergab, dass auch dieses nach Applikation zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in den Makrophagen führt. Im Vergleich zu dem unsubstituierten Derivat **56** (ca. 100 %) fällt diese aber mit etwa 34 % der Nicotinreferenz deutlich geringer aus (Abbildung 135). Eine Preinkubation von 20 min mit dieser Substanz (**58**) und anschließender Nicotinapplikation führt zu einem Fluoreszenzsignal (ca. 134 %), das exakt der Addition der Einzelwerte von Nicotin **1** und des Carbamates **58** entspricht. Dies lässt vermuten, dass diese Substanz keinen antagonistischen Einfluss auf die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ besitzt (Abbildung 135).

Die einmalige Applikation der Phenylcarbamate **73** und **74** zeigte, dass auch diese Substanzen zu einer Intensivierung der Fluoreszenz in den mit Fura-2 **89** geladenen Makrophagen führen (Daten nicht gezeigt). Dies muss jedoch durch weitere Experimente abgesichert werden.

Die ersten Versuche an den Makrophagen zeigten, dass sich durch Nicotin **1** und Phenylcarbamate **56**, **58**, **73**, **74** & **76** eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration induzieren lässt. Um sicher zu stellen, dass diese Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ über den Einstrom von Calcium-Ionen durch $\alpha 7$ -nAChR zustande kommt, wurde versucht das Testsubstanz induzierte Fluoreszenzsignal durch Preinkubation mit selektiven $\alpha 7$ -Rezeptor-Antagonisten zu hemmen. Zu diesem Zweck wurden α -Bungarotoxin **4** und MLA **14** verwendet.

Aus Abbildung 136 geht hervor, dass die Antagonisten zwar zu einer Hemmung der Nicotin-induzierten Calciumkonzentrations-Erhöhung führen (α -Bungarotoxin **4**: ca. 28 % und MLA **14** ca. 15 %), jedoch waren beide Substanzen erstaunlicher Weise nicht in der Lage, die Intensivierung der Fluoreszenz nach Applikation der Testsubstanz zu hemmen.

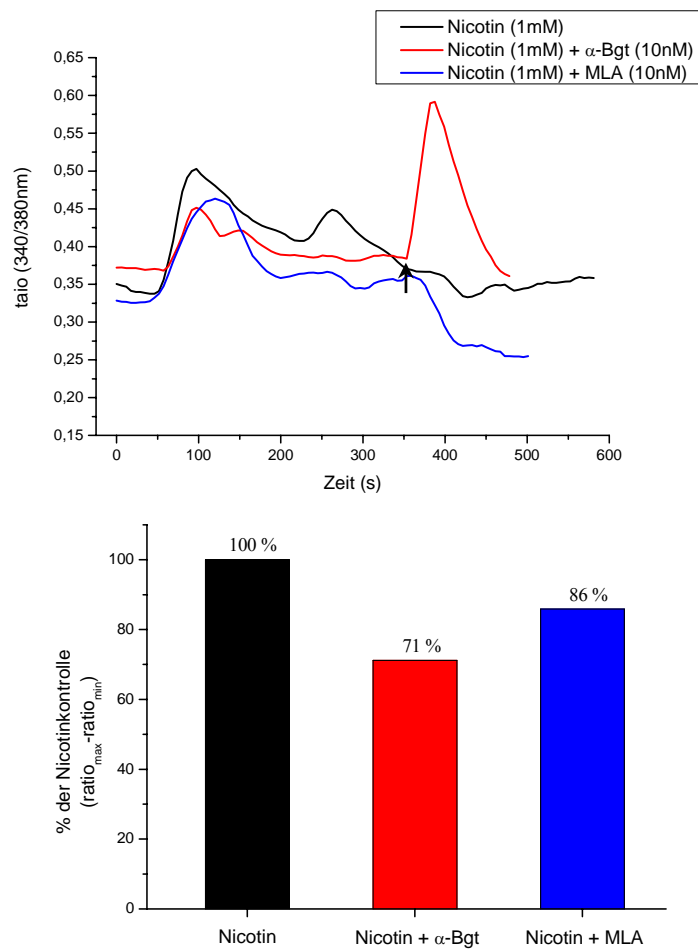


Abbildung 136: Evaluation von intrazellulären Calciumspiegeln nach Applikation von Nicotin **1** (schwarz, 1 mM, Mittelwert aus 2 Experimenten), Nicotin **1** nach Preinkubation mit α-Bungarotoxin **4** (rot, Nicotin **1** (1 mM) und α-Bungarotoxin **4** (10 nM), Mittelwert aus 2 Experimenten) und Nicotin **1** nach Preinkubation mit MLA **14** (blau, 10 nM, Einzelexperiment)
 ↑: Applikation von Nicotin **1** (1 mM) zur Kontrolle
 (Experimente eines Versuchstages mit den Makrophagen einer Charge)

Im Gegensatz zu den α7-selektiven Antagonisten α-Bungarotoxin **4** und MLA **14** zeigte der β2-prävalente Antagonist DHβE **29** keinerlei hemmenden Einfluss auf das Fluoreszenzsignal nach Nicotinapplikation. Dies impliziert, dass α4β2- und α3β2-nAChR keinen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ haben.

Die Versuche mit diversen, subtyp-selektiven Nicotinrezeptor-Antagonisten haben gezeigt, dass diese ein durch Nicotin **1** induziertes Fluoreszenzsignal nicht vollständig unterdrücken können, aber es zumindest hemmend beeinflussen. Dies lässt vermuten, dass zumindest der α7-Subtyp an der Vermittlung der intrazellulären Calciumkonzentrations-Erhöhung beteiligt ist. Auszuschließen ist jedoch, dass diese Erhöhung durch den Einstrom von Calcium-Ionen durch den α7-Ionenkanal verursacht

wird.

Ein Anstieg der Calciumkonzentration in den Makrophagen kann neben dem Einstrom durch Nicotinrezeptorkanäle auch durch Freisetzung der Kationen aus intrazellulären Speichervesikeln im sarkoplasmatischen Retikulum verursacht werden. Die Freisetzung wird in der Regel durch die vermehrte Bildung der „second messengers“ Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol aus Polyphosphoinositid (PPI) verursacht, die wiederum durch die Phospholipase C (PLC) vermittelt wird⁴³⁶.

Aus dieser Überlegung heraus sollte versucht werden die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Nicotinapplikation durch den Phospholipase C Inhibitor U-73122 **90** zu inhibieren. Diese Substanz hemmt die Hydrolyse von Phosphatidyl-inosit-4,5-Diphosphat (PIP_2) zu IP_3 und die Aktivierung der G-Protein gekoppelten Phospholipase C, während die Produktion von cAMP unbeeinflusst bleibt^{437,438,439}.

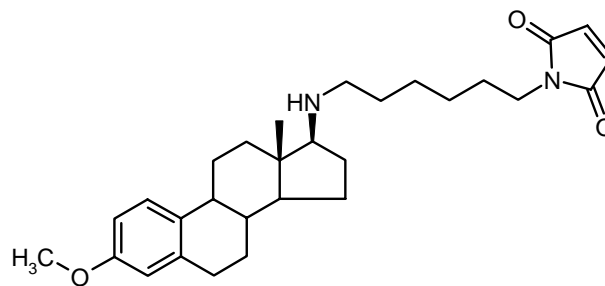


Abbildung 137: Struktur des Phospholipase C Inhibitors U-73122 **90**

Ein weiterer Versuch den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zu verhindern, sollte mit dem hoch selektiven Calcium-Chelator BAPTA **91** unternommen werden. Diese Substanz zeigt sehr hohe Affinität und Selektivität für Calcium-Ionen (Kd für Ca^{2+} : in Abwesenheit von Mg^{2+} : 160 nM, in Anwesenheit von Mg^{2+} : 700 nM)^{430,440,441}.

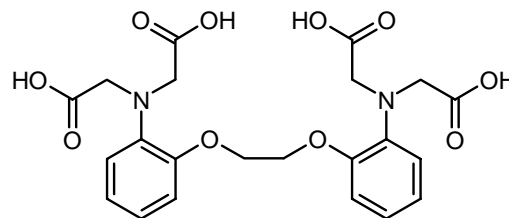


Abbildung 138: Struktur des Calcium-Chelators BAPTA **91**

Aus der Abbildung 139 geht hervor, dass der Phospholipase C Inhibitor U-73122 **90** das

durch Nicotin **1** induzierte Calciumsignal lediglich zu 33 % inhibiert. Dies lässt vermuten, dass der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ teilweise über das Enzym Phospholipase C vermittelt wird. Jedoch kommt der größere Anteil des Calciumkonzentrationsanstiegs nach Nicotinapplikation (67 %) über einen Phospholipase C unabhängigen Wirkungsmechanismus zustande. Auffällig ist, dass der inhibitorische Effekt von U-73122 **90** (33 %) in gleichen Größenordnungsbereich liegt wie der von α -Bgt **4** (28 %).

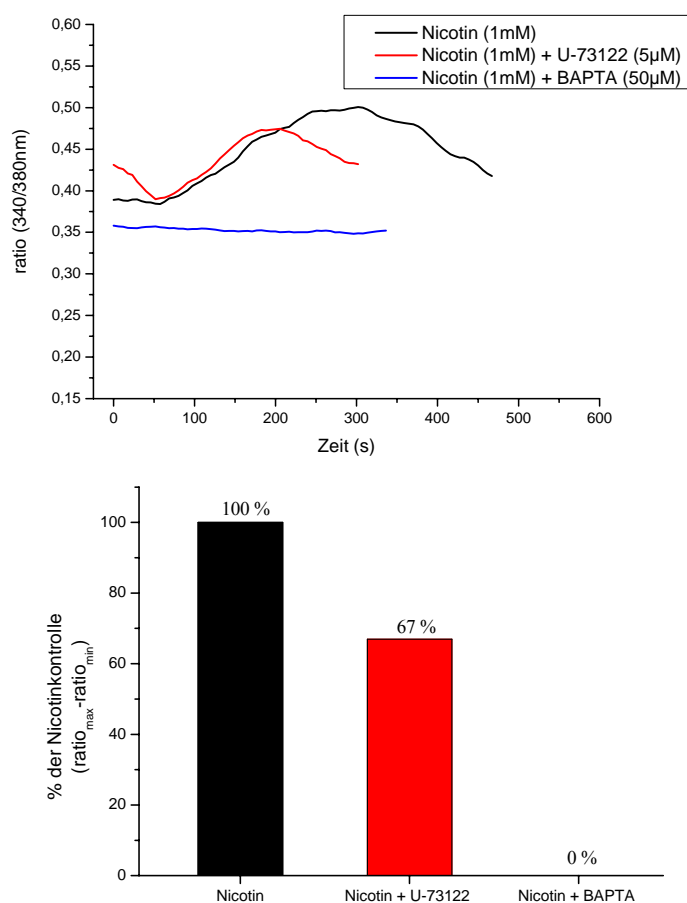


Abbildung 139: Evaluation von intrazellulären Calciumspiegeln nach Applikation von Nicotin **1** (schwarz, 1 mM, Einzelerperiment), Nicotin **1** nach Preinkubation mit U-73122 **90** (rot, Nicotin **1** (1 mM) und U-73122 **90** (5 µM), Mittelwert aus 3 Experimenten) und Nicotin **1** nach Preinkubation mit BAPTA **91** (Nicotin **1** (1 mM) und BAPTA **91** (50 µM), Einzelerperiment) (Experimente eines Versuchstages mit den Makrophagen einer Charge)

Lediglich die Preinkubation der Makrophagen mit dem Calcium-Chelator BAPTA **91** führte zur vollständigen Unterdrückung des Nicotin-induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$. Dies zeigt, dass die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch die Testsubstanzen induziert werden und nicht z.B. über eine mechanische Reizung der Zellen verursacht wird. Des Weiteren deutet diese Hemmung daraufhin, dass der

Anstieg der Calciumkonzentration in den Makrophagen durch die Freisetzung der Kationen aus intrazellulären Speichern verursacht wird.

Da die $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen eher vermuten lassen, dass der Anstieg der Calciumkonzentration nicht über den Einstrom von Ionen durch nicotinische Ionenkanäle zustande kommt, sollte diese Hypothese mittels *whole-cell* Patch-Clamp-Experimenten bestätigt werden (siehe 3.6 Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente). Zur Überprüfung eines erfolgreichen Patches wurden die Immunzellen zunächst mit Adenosintriphosphat **92** (ATP) (Abbildung 140) stimuliert, welches einen Ionenstrom durch P2X-Rezeptoren (ionotrope Nukleotid-Rezeptoren) induziert und somit zu einem Stromsignal führen sollte^{442,443,444}.

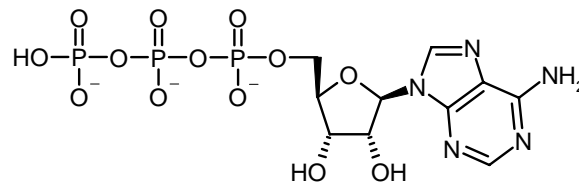


Abbildung 140: Struktur des Calcium-Chelators ATP **92**

Anschließend wurde versucht mit einer Lösung von 100 μ M Nicotin **1** ein Stromsignal in den Immunzellen zu induzieren. Die Abbildung 141 zeigt die gemessenen Ströme nach Applikation von ATP **92** (links) und Nicotin **1** (rechts). Aus dieser geht eindeutig hervor, dass das Nukleotid einen Ioneneinstrom in die Makrophagen induziert, während die nachfolgende Nicotinapplikationen ($n = 3$) zu keiner Stromantwort führte. Eine anschließende Stimulation mit ATP induziert wiederum einen Strom in den Makrophagen. Dies bestätigt, dass der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nicht über den Einstrom von Calcium durch nAChR zustande kommt. Es ist aber nicht auszuschließen, dass Nicotinrezeptoren den Konzentrationsanstieg über andere Wege vermitteln (IP₃, VOCC, usw.).

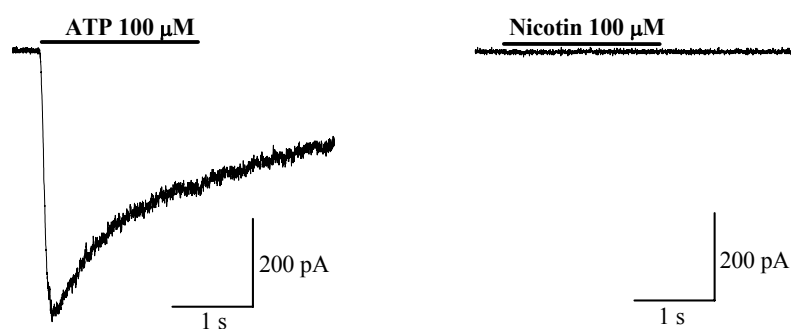


Abbildung 141: ATP **92** und Nicotin **1** induzierte Stromsignale in Makrophagen
 links: ATP **92** (100 µM) rechts: Nicotin **1** (100 µM)
 — : Zeitraum der Substanzapplikation (2s)

3.7.6 Diskussion

Aus den Versuchen an Mäusemakrophagen geht hervor, dass sowohl Nicotin **1**, als auch die untersuchten Phenylcarbamate **56**, **58**, **73**, **74** & **76** einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in den Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems hervorrufen. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Nicotinapplikation wurde bereits von Wang et al. erwähnt und dem Einstrom von Calcium-Ionen durch $\alpha 7$ -nAChR zugeschrieben. Jedoch geht aus der Veröffentlichung der Arbeitsgruppe nicht hervor, dass sie dieses Phänomen näher untersucht haben⁸⁵. Aus den Ergebnissen der Inhibitionsversuche mit den selektiven $\alpha 7$ -Antagonisten α -Bungarotoxin **4**, MLA **14** und DH β E **29** geht allerdings hervor, dass diese zumindest einen leichten inhibitorischen Einfluss auf das durch Nicotin **1** induzierte Fluoreszenzsignal haben. Dies lässt vermuten, dass der $\alpha 7$ -nAChR eine Rolle bei dem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ spielt.

Durch die Preinkubations-Untersuchungen mit den selektiven Antagonisten sowie mit den Patch-Clamp-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Einstrom von Calcium-Ionen durch $\alpha 7$ -Nicotinrezeptoren nicht hauptverantwortlich für den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ sein kann. Der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus ist aber noch unbekannt. Daher ist diese Methode nicht wie erhofft zur Evaluation von selektiven Liganden anhand des Calciumeinstroms durch nAChR geeignet.

Ein nahe liegender Erklärungsansatz für den Wirkungsmechanismus wäre die Beteiligung eines noch unbekanntes nAChR-Subtypen, der wie der $\alpha 7$ -Rezeptor ebenfalls eine hohe Calciumselektivität aufweist. Dies ist im Fall des Subtyps $\alpha 9$

gegeben⁴⁴⁵. Es sprechen jedoch mehrere Gründe gegen eine Beteiligung dieses Subtyps bei der Induktion eines Calciumanstiegs in Makrophagen. Zum einen wird dieser Rezeptor nicht durch Nicotin **1** aktiviert^{86,446,447,448} und zum anderen konnte er mittels Western-Blot-Experimenten nicht in Mäusemakrophagen nachgewiesen werden (mündliche Mitteilung des Arbeitskreises um Dr. I. Hide).

Die Nicotin **1** induzierten Ca^{2+} -Signale stehen vermutlich in keinen Zusammenhang mit einem Einstrom von Ionen durch nAChR.

Neben dem direkten Einstrom von Calcium durch $\alpha 7$ -Ionenkanäle postulierten Vijayaraghavan et al. sowie Rathouz und Berg, dass auch der Natriumeinstrom und die damit verbundene Depolarisation der Zellmembran indirekt zur Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beitragen kann. Es kommt durch die Depolarisierung zu einer Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen (VOCC), der somit zu einer Verstärkung des Calciumtransienten führt^{449,450}. Dieser Mechanismus ist abhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration sowie der Aktivierung von nAChR und dem damit verbundenen Calciumeinstrom in die Zelle³⁹¹. Daher scheidet dieser Mechanismus im vorliegenden Fall der Makrophagen auch aus, da keine Depolarisation der Immunzellen durch die Applikation von Nicotin **1** erreicht werden konnte.

Kürzlich veröffentlichten Tsuneki et al. und Shoop et al., dass intrazelluläre Calciumspeicher zum Erhalt eines anhaltenden, durch Nicotinrezeptoren induzierten Calciumsignals beitragen^{451,452}. Die Freisetzung der Kationen aus den Speichern erfolgt dabei als Antwort auf einen Agonist vermittelten Calciumeinstrom^{453,454,455}. Wahrscheinlich sind Nicotinrezeptoren auf diese Weise in der Lage, in Abhängigkeit von Calcium, eine ganze Reihe von Zellprozessen zu regulieren, z.B. Neurotransmitter-Freisetzung^{456,457,458}, Neuroprotektion^{218,459} und synaptische Plastizität^{460,461}. Es wird daher angenommen, dass die zelluläre Auswirkung einer Stimulation von nAChR über die Aktivierung von Calcium-abhängigen Kaskaden vermittelt wird⁴⁶². Diese Aktivierung wurde tatsächlich für einige Enzyme nachgewiesen, u.A. für die Proteinkinase C⁴⁶³.

Die Theorie von Tsuneki et al. und Shoop et al. ist aufgrund des fehlenden Calciumeinstroms nicht direkt auf die Mäusemakrophagen übertragbar. Jedoch liefern

die Experimente mit den Hemmstoffen U-73122 **90** und BAPTA **91** einige Hinweise, dass die Freisetzung von Calcium aus den Speichervesikeln der Makrophagen für den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verantwortlich ist.

Die Teilinhibition des durch Nicotin **1** induzierten Fluoreszenzsignals durch U-73122 **90** lässt eine Beteiligung der Phospholipase C und somit der Freisetzung von Calcium über den IP_3 -Signalweg vermuten. Eine Stimulation der Phospholipase C würde in einer vermehrten Spaltung von Phosphatidyl-inosit-4,5-Diphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) resultieren. Das IP_3 führt über die Bindung an IP_3 -Rezeptoren, die auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind und Ligand-gesteuerte Ca^{2+} -Ionenkanäle darstellen, zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern^{436,464}. Infolgedessen können speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran aktiviert werden, die somit zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ beitragen. Für die Freisetzung des Calciums aus intrazellulären Speichern der Makrophagen spricht auch, dass der intrazelluläre Calcium-Chelator BAPTA **91** eine Zunahme der Fluoreszenz nach Nicotinapplikation vollständig unterdrückt.

Aber auch im Fall der Phospholipase C vermittelten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern gilt, dass dieser Wirkmechanismus aufgrund der geringen Hemmeffekte des Antagonisten U-73122 **90** nicht einzig für den Anstieg der Calciumkonzentration verantwortlich sein kann.

Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass möglicherweise eine Sonderform des $\alpha 7$ -Rezeptors oder ein noch unbekannter Nicotinrezeptor für die Phospholipase C vermittelte Freisetzung von Calcium verantwortlich ist. Die Existenz eines noch unbekanntes nAChR bzw. einer Variation eines Rezeptorsubtyps, der eventuell mit einer Phospholipase C gekoppelt ist, wurde bereits von Garnier et al. postuliert⁴⁶⁵. Einen möglichen Hinweis auf die Verknüpfung der PLC und nAChR in den Makrophagen könnte man in den Ergebnissen der Inhibitionsversuche mit α -Bungarotoxin **4**, MLA **14** und U-73122 **90** sehen. Die Testungen der drei Substanzen ergaben Inhibitionswerte des Fluoreszenzsignals, die in der gleichen Größenordnung lagen (ca. 30 %).

Garnier et al. berichteten weiterhin, dass ein durch Nicotin **1** induzierter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in melanotrophen Zellen des Froschs *Rana ridibunda* unabhängig von dem Calcium- und Natrium-Einstrom durch nAChR ist. Ferner spielt auch die extrazelluläre Konzentration dieser Ionen keine Rolle für die Erhöhung der Calciumkonzentration in

den Zellen⁴⁶⁶. Im Fall der untersuchten Makrophagen konnte zumindest letzteres gezeigt werden.

Weiterhin fand die Arbeitsgruppe heraus, dass sich der durch Nicotin **1** induzierte Anstieg der Calciumkonzentration durch die Substanz Thapsigargin, die zu einer Entleerung IP₃-sensitiver Calciumspeicher führt, hemmen lässt. Aufgrund dieser Befunde postulierte diese Gruppe, dass die von ihnen als „nonclassical“ bezeichneten Nicotinrezeptoren mit der Phospholipase C gekoppelt sind. Sie vermuteten weiterhin, dass es sich bei diesem Rezeptor um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor handelt, dessen genauer Wirkungsmechanismus unklar ist. Die ähnlichen Befunde der Experimente an Makrophagen und den Hypophysenzwischenlappen-Zellen des Froschs lassen vermuten, dass es sich möglicherweise um den gleichen Rezeptor handelt.

Eine weitere Möglichkeit der intrazellulären Calciumfreisetzung ist über den Ryanodin-Rezeptor gegeben. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um einen Calciumkanal, der in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums, in den so genannten terminalen Zisternen, lokalisiert ist. Durch die Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors kommt es zur Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Myoplasma^{464,465}. Dajas-Bailador et al. konnten nachweisen, dass dieser Wirkmechanismus eine Rolle bei der Nicotin **1** induzierten Calciumfreisetzung in SH-SY5Y-Zellen spielt⁴⁵⁹. Jedoch bedarf es für die Calciumfreisetzung über den Ryanodin-Rezeptor wiederum einen initiierenden Einstrom von Calcium-Ionen durch nAChR, der in den Makrophagen nicht gegeben ist. Daher ist auch dieser Mechanismus der Calciumfreisetzung in den untersuchten Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems eher unwahrscheinlich. Ein weiterer Aspekt, der von der Arbeitsgruppe postuliert wurde, trifft eher auf die untersuchten Makrophagen zu. So vermuten Dajas-Bailador et al., dass unter Umständen sowohl mehrere Subtypen, als auch verschiedene Quellen (direkter Calciumeinstrom durch nAChR, VOCC, IP₃-Signalweg und Ryanodin-Rezeptoren) gleichzeitig für den durch Nicotin **1** induzierten Anstieg der [Ca²⁺]_i verantwortlich sind.

Obwohl sich der Argus-Calcium-Assay als ungeeignet für die Evaluation der funktionellen Eigenschaften von Nicotinrezeptor-Liganden herausstellte, liefert er doch

eine ganze Reihe sehr interessanter Daten. Besonders aufschlussreich ist in diesem Zusammenhang, dass Nicotin **1** bzw. die Carbamate **56**, **58**, **73**, **74** & **76** zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führen, ohne dass dieser über den Einstrom von Calcium-Ionen durch Nicotinrezeptorkanäle zustande kommt. Um den genauen Wirkungsmechanismus dieser Substanzen aufzuklären, sind jedoch weitere Experimente notwendig. Um dies angehen zu können, sollte jedoch der eigentliche Assay zunächst optimiert werden. Die geringen Datenmengen pro Testung stehen in einem ungünstigen Verhältnis zu dem großen zeitlichen Aufwand (6-8 Einzeltestungen pro Versuchstag). Zum Beispiel würde die Entwicklung eines Perfusionssystems für die Flexiperm[®]-Schablonen, das die störungsfreie Entfernung des die Makrophagen umgebenden Mediums gestattet, eine Mehrfachapplikation von Testsubstanzen pro Flexiperm[®]-Well ermöglichen. Dies ist gleichbedeutend mit der Erhebung von größeren Datenmengen pro Versuchstag, was zu einer verbesserten Vergleichbarkeit der Ergebnisse führen würde (siehe experimenteller Teil). Der komplette Austausch der verwendeten Flexiperm[®]-Schablonen gegen Kulturschalen oder Mikrotiterplatten könnte ebenfalls von Vorteil sein. Eine Alternative zum Kamera-gestützten Argus-Calcium-Assay stellt auch die Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ in Makrophagen mittels eines Fluoreszenzspektrometers dar.

4 Testung an weiteren Zielstrukturen

4.1 Radioligand-Bindungsstudien an Serotoninrezeptoren (5-HT_{3A})

4.1.1 Grundlagen

Serotoninrezeptoren sind eine sehr heterogene Gruppe von Rezeptoren. Es finden sich unter ihnen sowohl G-Protein gekoppelte Rezeptoren, als auch Ionenkanäle. Ein bekannter Vertreter der letzteren ist der Subtyp 5-HT_{3A}, ein Kationenkanal für Na⁺ und K⁺. Als Ligand-gesteuerter Ionenkanal aus der Cys-loop Familie weist er sehr große Homologie zum $\alpha 7^*$ -nAChR auf^{1,467}. Dies gilt insbesondere auch für die Ligand-Bindungsregion⁴⁶⁸ sowie für die nachgeschalteten Signal-Transduktionswege⁴⁶⁹. Diese Ähnlichkeit der beiden Rezeptoren wurde ebenfalls durch Arbeiten von Eisele et al. bestätigt, die einen chimären, funktionsfähigen Rezeptor aus dem C-terminalen Ende eines 5-HT_{3A}-Rezeptors und dem N-Terminus eines $\alpha 7^*$ -nAChR herstellen konnten⁴⁷⁰. Dieser chimäre Rezeptor ist zwar durch Nicotinrezeptor-Liganden aktivierbar, aber wird wie der 5-HT_{3A}-Serotoninrezeptor durch Ca²⁺ blockiert.

Palma et al. fanden 1996 heraus, dass Serotonin, der physiologische Agonist des 5-HT_{3A}-Rezeptors, in mikromolarer Konzentration $\alpha 7^*$ -nAChR in *Xenopus*-Oozyten blockiert⁴⁷¹. Umgekehrt konnten etwas später Gurley et al. ebenfalls an den Eizellen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* zeigen, dass mehrere bekannte Agonisten der nAChR (z.B. ACh **2** und Nicotin **1**) in der Lage sind, Serotonin induzierte Ströme in Voltage-Clamp-Experimenten (3.6 Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente) kompetitiv zu inhibieren⁴⁶⁸. Besondere Aufmerksamkeit wurde kürzlich dem 5-HT_{3A}-Antagonisten Tropisetron **93** zu Teil, der als Antiemetikum bei Zytostatika induziertem Erbrechen auf dem Arzneimittelmarkt ist. Macor et al. konnten für diese Substanz nicht nur eine sehr hohe Affinität zum 5-HT_{3A}-Rezeptor ($K_i = 5,3$ nM) nachweisen, sondern auch zum $\alpha 7$ nAChR ($K_i = 6,9$ nM)³²².

4.1.2 Projekt

Aufgrund der nahen Verwandtschaft des 5-HT_{3A}-Rezeptors mit dem $\alpha 7^*$ nAChR sowie der nachweislich hohen Affinität verschiedener Liganden zu beiden Rezeptoren (z.B. Tropisetron **93**, PSAB-OFP **94**, PNU-282987 **95** (Abbildung 142)^{322,364,472,473}, stellte sich die Frage, ob die von uns hergestellten $\alpha 7$ -selektiven Carbamate auch am Serotoninrezeptor wirksam sind. Im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Mesfin Seleshi aus dem Arbeitskreis um Prof. H. Bönisch (Institut für Pharmakologie & Toxikologie, medizinische Fakultät, Universität Bonn) wurden daher die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Substanzen auf ihre Bindungseigenschaften am 5-HT_{3A}-Rezeptor untersucht.

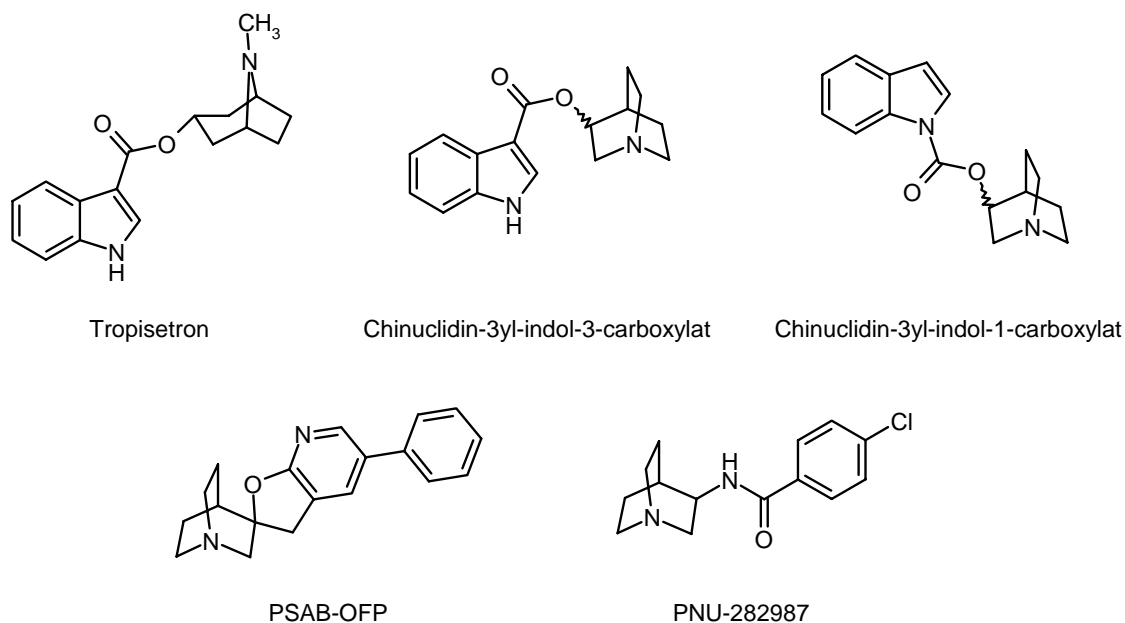


Abbildung 142: Strukturen verschiedener Liganden (**93**, **94** & **95**) mit Affinität zu $\alpha 7$ -nAChR und 5-HT_{3A}-Rezeptoren²⁰⁷.

4.1.3 Methode

Die verwendete Methode zur Bestimmung der Affinitäten am Serotoninrezeptor-Subtyp 5-HT_{3A} beruht auf den bereits beschriebenen Grundlagen von Radioligand-Bindungsstudien (3.4 Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien).

Für die Testung wurden zunächst HEK-293-Zellen stabil mit der cDNA des klonierten humanen 5-HT_{3A}-Rezeptors transfiziert. Nach Gewinnung der Zellmembranen der transfizierten embryonalen Nierenzellen wurde die Bindung des antagonistischen Radioliganden [³H]-GR65630 **96** bestimmt ($K_d = 0,8$ nM; $B_{max} = 11,8$ pmol/mg

Protein). Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 50 μM MDL-72222 **97** (3-Tropanyl-3,5-dichlorobenzoat) (Abbildung 143) ermittelt. Die K_i -Werte sind als Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten angeben.

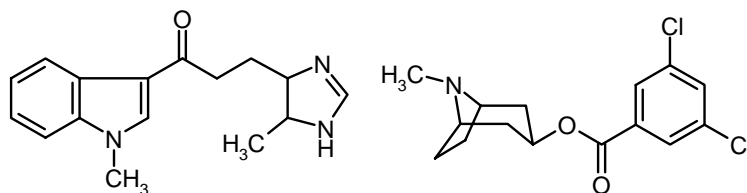


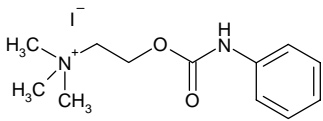
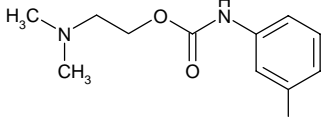
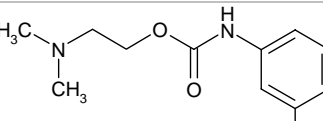
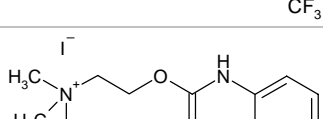
Abbildung 143: Strukturen der Antagonisten GR65630 **96** und MDL72222 **97** (3-Tropanyl-3,5-dichlorobenzoat)

4.1.4 Ergebnisse

Die ermittelten Affinitäten der Trimethylammonium-Derivate **56-58** zum Serotoninrezeptor-Subtyp 3A liegen im gleichen Größenordnungsbereich wie die zum $\alpha 7$ nAChR ($K_i = 305$ bzw. 356 nM; siehe Tabelle 4.1-1 bis Tabelle 4.1-4). Vergleicht man diese Werte mit den Ergebnissen am $\alpha 7^*$ -Rezeptor, so sind die Affinitäten zum 5-HT_{3A}-Rezeptor etwa um den Faktor 10 geringer.

Auffällig ist in dieser Serie der Affinitätsunterschied der Dimethylamino-Derivate **54** & **55**, der durch die Substitution des Aromaten hervorgerufen wird. Zum einen unterscheiden sich der Fluor- und der Trifluormethyl-Rest anhand ihrer Größe, zum anderen durch ihre unterschiedlichen induktiven und mesomeren Effekte. Während der verhältnismäßig kleine Fluor-Substituent einen (-)-I- und (+)-M-Effekt besitzt, und so die Elektronendichte des Aromaten erhöht, verfügt die voluminöse Trifluormethyl-Gruppe über einen (-)-I- und (-)-M-Effekt. Dieser erniedrigt die Ladungsdichte des aromatischen Ringsystems. Kritisch zu betrachten ist der Vorschlag von Bunnelle et al. bzw. Elliott et al., dass ein Fluor-Substituent möglicherweise als Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor fungieren (siehe 3.4 Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien)^{207,327}.

Tabelle 4.1-1: Bindungsaffinitäten von Carbamat-Analoga am 5-HT_{3A}-Rezeptor im Vergleich zum α7-nAChR

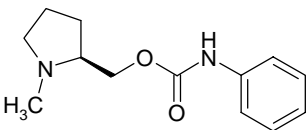
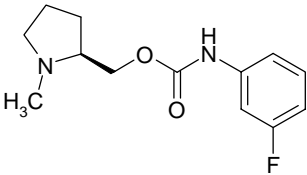
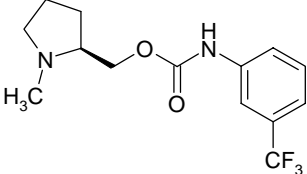
Struktur	Nr.	5-HT _{3A} [³ H]GR65630 HEK 293 K _i (nM) ^a	α7* [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM) ^a
	56	305	38,9 ± 2,9
	54	3970	11000
	55	11400	> 20000
	58	356	29 ± 3

a = Anzahl unabhängiger Experimente n=3

N-Methyl-pyrrolidin-phenylcarbamate

Die Integration der für die Wirkung an Nicotinrezeptoren wichtigen basischen Aminofunktion in einen N-Methyl-pyrrolidinring führt, wie schon am α7*-Rezeptor beobachtet, zu einer deutlichen Verschlechterung der Affinität (Tabelle 4.2-3). Die Affinitäten des Fluor- und des unsubstituierten Carbamats **59** & **60** unterscheiden sich nicht, wohingegen die Einführung des voluminöseren Trifluormethyl-Rests zu einem deutlichen Affinitätsverlust führt. Bemerkenswert ist in dieser Serie die im Vergleich zum α7-Rezeptor höhere Affinität des Carbamates **60** zum 5-HT_{3A}-Rezeptor.

Tabelle 4.1-2: Bindungsaffinitäten von N-Methyl-Pyrrolidiny-phenylcarbamaten am 5-HT_{3A}-Rezeptor im Vergleich zum α7-nAChR

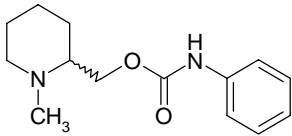
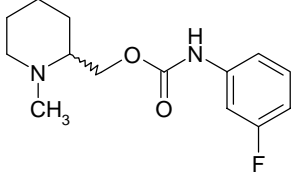
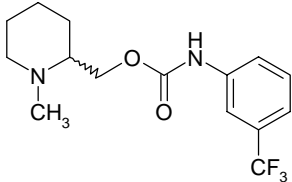
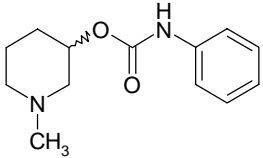
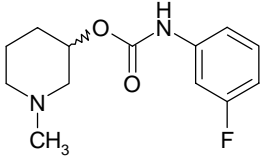
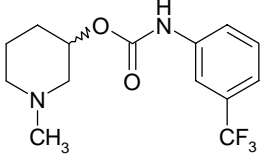
Struktur	Nr.	5-HT _{3A} [³ H]GR65630 HEK 293 K _i (nM) ^a	α7* [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM) ^a
 (S)	59	7800	5853 ± 212
 (S)	60	7620	15000 ^b
 (S)	61	12300	13000 ^a

a = Anzahl unabhängiger Experimente n=3
b = Anzahl unabhängiger Experimente n=2

N-Methyl-piperidiny-phenylcarbamate

Die Bindungsprofile der N-Methyl-piperidiny-phenylcarbamate am 5-HT_{3A}-Rezeptor sind nicht identisch mit denen am α7-nAChR (Tabelle 4.1-3). So besitzen die in Position 3 des Piperidinrings substituierten Derivate **71-73** zum α7-Subtyp der nAChR die höhere Affinität, hingegen interagieren ihre in Position 2 substituierten Analoga **68-70** mit dem Serotoninrezeptor stärker. Jedoch liegen die Aktivitäten aller Piperidin-Verbindungen an beiden Rezeptorarten lediglich im höheren mikromolaren Bereich. Während die Affinitätsänderung der Carbamate **68-70** zum Serotoninrezeptor anscheinend mit dem Volumen des jeweiligen Substituenten korreliert (Tabelle 4.1-3), ist dies für die Substanzen **71-73** weder am 5-HT_{3A}- noch am α7-Rezeptor zu beobachten. Hier scheinen wiederum die oben beschriebenen induktiven und mesomeren Effekte der verschiedenen Reste am Aromaten eine Rolle zu spielen.

Tabelle 4.1-3: Bindungsaffinitäten von *N*-Methyl-Piperidinyl-phenylcarbamaten am 5-HT_{3A}-Rezeptor im Vergleich zum α7-nAChR

Struktur	Nr.	5-HT _{3A} [³ H]GR65630 HEK 293 K _i (nM) ^a	α7* [³ H]MLA Rattenhirn K _i (nM) ^a
	68	4790	15000 ^a
	69	6220	22000 ^b
	70	9330	13000 ^b
	71	13900	3600 ^b
	72	10700	2600 ^b
	73	11400	4400 ^b

a = Anzahl unabhängiger Experimente n=3
b = Anzahl unabhängiger Experimente n=2

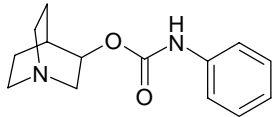
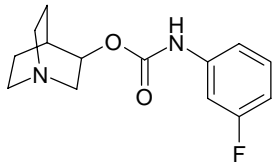
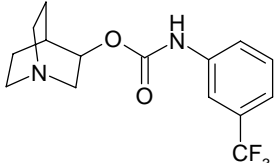
Chinuclidinyl-phenylcarbamate

Wie schon am α7*-Rezeptor erweist sich am Serotoninrezeptor ebenfalls das Fluor-substituierte Chinuclidinyl-phenylcarbamate **75** (K_i = 169 nM) als die potenteste Verbindung dieser Serie. Vergleicht man die Affinitäten der Carbamate **56** & **74** zu α7*-nAChR und 5-HT_{3A}-Rezeptor, so sind diese zum Nicotinrezeptor annähernd identisch (K_i = 39 & 44 nM). Am Serotoninrezeptor unterscheidet sich die Interaktion der beiden

Substanzen **56** & **74** circa um den Faktor zwei (**56**: $K_i = 305\text{nM}$ & **74**: $K_i = 738\text{ nM}$). Somit verfügt das Chinuclidin-Derivat **74** über eine bessere Rezeptorselektivität zum $\alpha 7^*$ -nAChR.

Die beiden anderen Carbanile **74** & **76** der Chinuclidin-Serie besitzen ebenfalls noch nanomolare Affinität zum 5-HT_{3A}-Rezeptor, wobei die Trifluormethyl-substituierte Verbindung **76** mit einem K_i -Wert von 456 nM aktiver ist als das unsubstituierte Carbamat **74**. Die Affinitätsunterschiede der Verbindung **74-76** sind möglicherweise in den unterschiedlichen induktiven und mesomeren Effekten ihrer Substituenten begründet. Der Fluor-Substituent erhöht durch seinen (+)-M-Effekt die Elektronendichte des Aromaten, was unter Umständen eine elektrostatische Wechselwirkung des Ringsystems mit dem Rezeptorprotein begünstigen würde.

Tabelle 4.1-4: Bindingsaffinitäten von Chinuclidinyl-phenylcarbamaten am 5-HT_{3A}-Rezeptor im Vergleich zum $\alpha 7$ -nAChR

Struktur	Nr.	5-HT _{3A} [³ H]GR65630 HEK 293 K_i (nM) ^a	$\alpha 7^*$ [³ H]MLA Rattenhirn K_i (nM) ^a
	74	738	44 ± 23
	75	169	37,3 ± 5
	76	456	173 ± 23

a = Anzahl unabhängiger Experimente n=3

Fasst man die Ergebnisse der Radioligand-Bindungsstudien am Serotoninrezeptor-Subtyp 5-HT_{3A} zusammen, so erkennt man, dass die Trimethylammonium- (**56** & **58**) und Chinuclidin-Derivate (**74-76**) die höchsten Affinitäten besitzen. Die potenteste Verbindung ist dabei das Chinuclidinyl-phenylcarbamat **75**.

Im Vergleich zum $\alpha 7$ nAChR fallen aber die Affinitäten der $\alpha 7$ -selektiven Carbamate

am Serotoninrezeptor um den Faktor 5-10 geringer aus.

Mit Ausnahme der Piperidinderivate **68-73** korrelierten die Affinitäten aller am 5-HT_{3A}-Rezeptor untersuchten Verbindungen sehr gut mit den zuvor ermittelten Affinitäten am $\alpha 7$ nAChR. Am Nicotinrezeptor erwiesen sich die in Position 3 des Heterozyklus substituierten Verbindungen **71-73** als wirksamer, am Serotoninrezeptor waren es die in Position 2 substituierten Phenylcarbamate **68-70** (Tabelle 4.1-3).

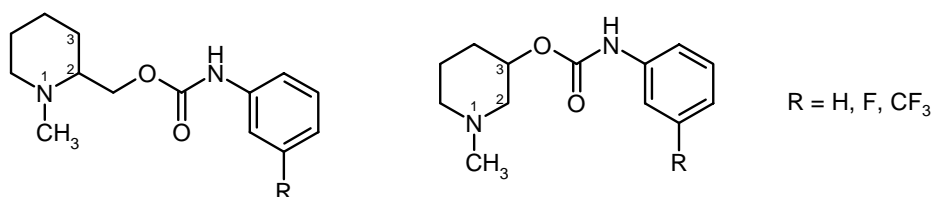


Abbildung 144: *N*-Methyl-Piperidinyl-phenylcarbamate
links: Substitution in Position 2 **68-70** rechts: Substitution in Position 3 **71-73**

Jedoch bewegen sich die K_i -Werte lediglich im mikromolaren Bereich.

Die getesteten Carbanile mit Pyrrolidin-Teilstruktur **59-61** besaßen ähnliche Affinität am 5-HT_{3A}-Rezeptor wie zuvor am $\alpha 7$ nAChR (Tabelle 4.1-2); d.h. vergleicht man die Affinitäten der drei Verbindungen dieser Serie zu den beiden Rezeptortypen, so ist zu beobachten, dass die Interaktion des unsubstituierten **59** sowie des Trifluormethyl-substituierten Derivates **61** an beiden Rezeptoren vergleichbar ist.

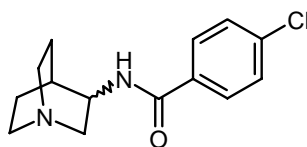
Auch beim Serotoninrezeptor ist ein Einfluss des Substituenten am Aromaten auf die Affinität der Carbamate erkennbar. Bei den schwach wirksamen Derivaten **59-61** & **68-70** scheint die Affinität in Abhängigkeit vom Volumen des Substituenten (Volumen: $H < F < CF_3$) zu sinken. Diese Tendenz ist in der Serie der *N*-Methylpiperidin-2-yl-Derivate **68-70** sehr gut zu erkennen (Tabelle 4.1-3). Die induktiven und mesomeren Effekte scheinen bei diesen Verbindungen keine größere Bedeutung zu haben.

Entgegen dieser Tendenz verfügt jeweils das Fluor-substituierte Derivat der Serien mit Chinuclidinyl- **75**, Piperidin-3-yl-Partialstruktur **72** über die jeweils höchste Affinität zum Serotoninrezeptor. Diese Tatsache spricht für einen Einfluss der Elektronendichte des Aromaten auf die Affinität der Substanz zum 5-HT_{3A}-Rezeptor. Im Vergleich zu unsubstituierten und Trifluormethyl-substituierten Derivaten erhöht der Fluor-

Substituent die Ladungsdichte im Aromaten, was π - π -Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor begünstigt und in einer höheren Affinität resultiert.

Bodnar et al. berichteten für einige Chinuclidin-benzamide (z.B. PNU-282987 **95**), die den Chinuclidin-Carbamidsäureester **74-76** strukturell sehr ähnlich sind, dass die Affinität dieser Verbindungen zum α 7-nAChR und 5-HT_{3A}-Serotoninrezeptor stereochemische Abhängigkeit zeigt. Am Nicotinrezeptor erwiesen sich laut der Arbeitsgruppe die (R)-konfigurierten Derivate als wirksamer, während am Serotoninrezeptor die (S)-konfigurierten Verbindungen höhere Affinität besaßen³⁶⁴.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Chinuclidin-Derivaten **74-76** zu den von Bodnar et al. beschriebenen Benzamiden, wäre es in Zukunft interessant zu untersuchen, ob die Chinuclidin-Carbamidsäureester ebenfalls eine stereochemische Abhängigkeit der Affinität zu Nicotinrezeptoren und 5-HT_{3A}-Serotoninrezeptor zeigen.



PNU-282987

Abbildung 145: Struktur des Chinuclidin-benzamides PNU-282987 **95**

Durch die Testung der von uns hergestellten Verbindungen am Serotoninrezeptor-Subtyp-3A konnten die Ergebnisse von Gurley et al.⁴⁶⁸, die die Bindung von Nicotinrezeptor-Liganden am 5-HT_{3A}-Rezeptor nachweisen, belegt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass gerade die Carbamate **56-58** & **74-76** mit α 7-Selektivität auch am untersuchten Serotoninrezeptor die besten Affinitäten besaßen, was indirekt durch die große Homologie zwischen 5-HT_{3A}- und α 7-Rezeptor erklärt werden kann. Wie erwartet, besaßen gerade die Carbamate (**74-76**) mit großer struktureller Ähnlichkeit zu bekannten 5-HT_{3A}-Rezeptor-Liganden die höchsten Affinitäten zum Serotoninrezeptor.

Diese Tatsachen sind nicht verwunderlich, wenn man die postulierten Pharmakophor-Modelle für nAChRs mit denen für Antagonisten am 5-HT_{3A}-Rezeptor vergleicht. Zwischen ihnen sind große Übereinstimmungen festzustellen.

So sind dem Modell für Antagonisten am Serotoninrezeptor nach Hibert⁴⁷⁴ drei

Pharmakophor-Elemente, die in einem bestimmten Abstand zueinander angeordnet sind, zu entnehmen: eine (aromatische) Ringstruktur, ein Carbonylfunktion als Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor und Linker zu einem basischem Stickstoff (Abbildung 146)⁴⁷⁵. Diese Elemente befinden sich dabei nicht in einer geraden Achse, sondern sind, wenn man die Onium-Gruppe und das Arylzentrum betrachtet, um ca. 1,7 Å gegeneinander verschoben.

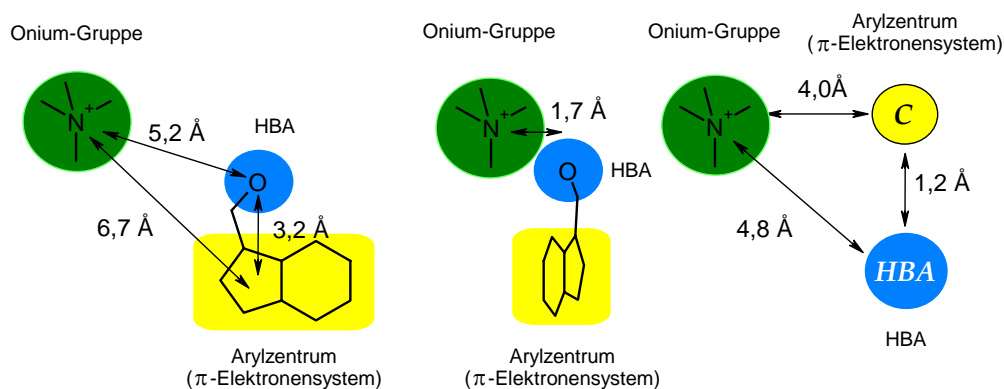


Abbildung 146: Pharmakophor-Modell für den 5-HT_{3A}-Rezeptor nach Hibert⁴⁷⁴

Diese drei Strukturen (Onium-Gruppe, HBA und Arylzentrum) finden sich ebenfalls in dem von Sheridan et al. postulierten Pharmakophor-Modell für nAChR (Abbildung 146)^{294,295}. Allerdings unterscheiden sich die für Nicotinrezeptor ermittelten Abstände der Pharmakophor-Elemente von denen der Serotoninrezeptoren leicht.

Jedoch sind die durch Energieminimierung von Liganden berechneten Distanzen seit längerem Gegenstand kontroverser Diskussionen und treffen bei weitem nicht auf alle hoch affinen Substanzen sowohl am 5-HT_{3A}-Rezeptor, als auch an nAChR zu. Es ist daher anzunehmen, dass die erwähnten Modelle nicht die realen Verhältnisse der Rezeptorinteraktion widerspiegeln. Dies gilt besonders für Pharmakophor-Modelle der Nicotinrezeptoren, da diese ohne Berücksichtigung möglicher Pharmakophor-Unterschiede der verschiedenen nAChR-Subtypen aufgestellt wurden. Lediglich das Modell nach Tønder (Abbildung 56) bezieht sich auf den $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor^{297,298,299}, jedoch ist davon auszugehen, dass es sich nicht einfach auf den $\alpha 7$ -übertragen lässt.

Zusammenfassend lässt sich über den Vergleich der Pharmakophor-Modelle für den nAChR und den 5-HT_{3A}-Rezeptor sagen, dass wahrscheinlich ähnliche Strukturelemente (Onium-Gruppe, HBA und Arylzentrum) für die Interaktion eines Liganden mit den beiden Rezeptoren verantwortlich sind. Zum Beispiel impliziert die

annähernd gleiche Affinität der Chinuclidin- **74-76** und Trimethylammonium-Carbamidsäureester **56-58** zu Serotoninrezeptor und Nicotinrezeptor, dass die entwickelten Pharmakophor-Modelle noch lange nicht ausgereift sind. Bisher ist es nicht möglich anhand von Literaturdaten und den vorgestellten Erkenntnissen voneinander abgrenzbare Pharmakophor-Modelle für nAChR und den 5-HT_{3A}-Rezeptor aufzustellen.

Daher kommt der Entwicklung neuer noch potenter und selektiverer Rezeptor-Liganden eine große Bedeutung bei der Erstellung besserer Modelle zu.

4.2 Inhibition der Acetylcholinesterase

4.2.1 Grundlagen

Bei der Acetylcholinesterase (AChE) handelt es sich um ein in der prä- und postsynaptischen Membran vorkommendes Enzym, das Acetylcholin **2** zu Cholin **22** und Acetat hydrolysiert. Der genaue Reaktionsmechanismus ist in der Abbildung 147 zu sehen.

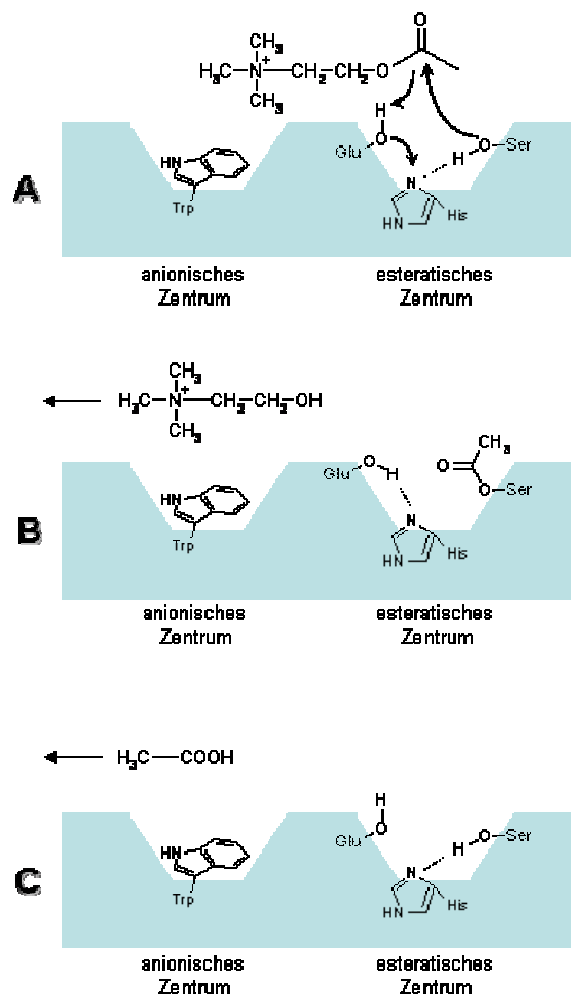


Abbildung 147: Schematische Darstellung der Reaktion von Acetylcholinesterase mit Acetylcholin **2**
His = Histidin Ser = Serin Trp = Tryptophan⁴⁷⁶

Nach Anlagerung an das anionische Zentrum (A) erfolgt primär eine Umesterung, bei der die Acetylgruppe von Acetylcholin **2** auf die Hydroxylgruppe der Aminosäure Serin im esteratischen Zentrum der AChE übertragen wird (B). Der Serin-Essigsäureester wird anschließend hydrolytisch gespalten und somit das Enzym regeneriert (C).

Verschiedene Stoffgruppen sind in der Lage, die Spaltung des Acetylcholins **2** durch die spezifische Acetylcholinesterase zu inhibieren unter denen die Phosphorsäureester und Carbamidsäureester die größte Bedeutung haben. Ihr Wirkmechanismus ist in der Abbildung 148 am Beispiel des Carbamates Neostigmin **49** verdeutlicht.

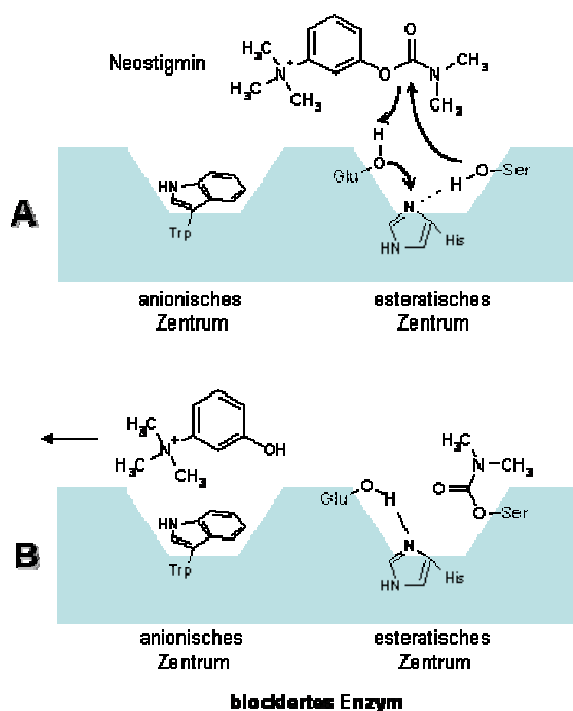


Abbildung 148: Blockade der Acetylcholinesterase durch Neostigmin **49** ⁴⁷⁶

Nach Anlagerung an das anionische Zentrum erfolgt wie bei Acetylcholin **2** eine Umesterung, bei der die Carbamoylgruppe (bzw. Phosphorylgruppe) des Hemmstoffs auf die Hydroxylgruppe des Serins im esteratischen Zentrum der AChE übertragen wird. Das entstandene Carbamoyl-Enzym (bzw. Phosphoryl-Enzym) ist im Vergleich zum Serin-Essigsäureester hydrolytisch wesentlich stabiler, was zu einer sehr viel langsameren Abspaltung des Carbamoyl-Restes führt. Man spricht in diesem Fall von einer reversiblen Hemmung des Enzyms. Im Vergleich zum Carbamoyl- wird das Phosphoryl-Enzym noch wesentlich langsamer hydrolysiert, daher werden Phosphorsäureester als irreversible Hemmstoffe der AChE bezeichnet. In beiden Fällen resultiert letztendlich die verlangsamte Spaltung des Serinesters in einer verzögerten

Regenerierung des Enzyms, was wiederum zu einem Anstieg der Acetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt führt. Da AChE-Inhibitoren über einen Umweg die Konzentration von Acetylcholin **2** erhöhen können, bezeichnet man diese Stoffe auch als indirekte Parasympathomimetika.

Hemmstoffe der AChE werden bei Vergiftungen mit parasympatholytisch wirkenden Verbindungen, bei Blasen- und Darmatonie, bei Glaukom und Myasthenia gravis sowie zur Therapie des Morbus Alzheimer eingesetzt. Die Demenz-Erscheinungen, die bei Morbus Alzheimer auftreten, beruhen wahrscheinlich auf einer Beeinträchtigung der cholinergen Funktionen im zentralen Nervensystem (1.6.3 Pathologie)⁴⁷⁷. Diese als „cholinerge Hypothese“ bezeichnete Theorie hat zur Entwicklung von AChE-Inhibitoren geführt, die durch Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt eine Verbesserung der kognitiven Defizite bewirken sollen⁴⁷⁸ [z.B. Rivastigmin **17** (Exelon[®])].

4.2.2 Projekt

Die Suche nach neuen Therapieansätzen zur Behandlung von Morbus Alzheimer führte in den letzten Jahrzehnten zur Entwicklung einer Reihe von potenten Acetylcholinesterase-Hemmstoffen aus der Gruppe der Carbamidsäureester. Diese Carbamate verfügen über ein leicht anderes Substitutionsmuster (N-Alkyl- und O-Phenyl-Substitution) als die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Phenylcarbamate (N-Phenyl- und O-Alkyl-Substitution).

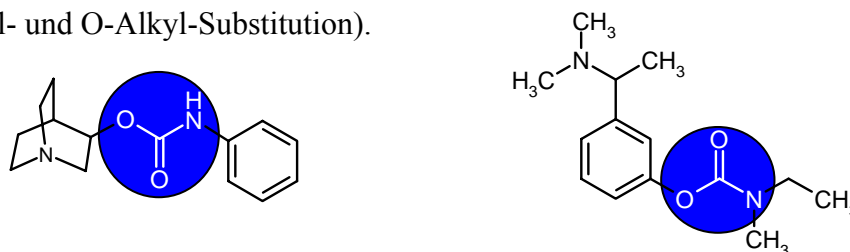


Abbildung 149: Carbamidsäureester mit unterschiedlichem Substitutionsmuster
rechts: N-Alkyl- und O-Phenyl-Substitution (Rivastigmin **17**)
links: N-Phenyl- und O-Alkyl-Substitution (Carbamat **74**)

Aber dennoch stellte sich die Frage, ob die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen aufgrund der vorhandenen Carbamidsäure-Struktur inhibitorische Effekte auf die Acetylcholinesterase besitzen. Daher wurden die hergestellten Carbamate in

einem AChE-Inhibitionsassay von Herrn Markus Pietsch und Frau Camino Gonzalez aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Gütschow im Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn untersucht.

4.2.3 Methode

Die Inhibitionskinetik der AChE wurde bei 25° C anhand der spektro-photometrischen Methode nach Ellman et al. bestimmt⁴⁷⁹. Unter Einwirkung des Enzyms wird das Substrat Acetylthiocholin in Thiocholin und Acetat gespalten. Die Konzentrationsänderung von Thiocholin über die Zeit wurde indirekt anhand der 2-Nitro-5-thiolbenzoesäure, die durch Reaktion des Thiocholins mit 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) freigesetzt wird, verfolgt (Abbildung 150).

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgt in einem Natriumphosphat-puffer (100 mM; pH 7,3) mit Natriumchlorid (100 mM) in Anwesenheit von Acetylthiocholin (ASCh) (500 µM), DTNB (350 µM), Acetonitril (6%), Inhibitor (25 µM) und Acetylcholinesterase (0,033 U/ml) aus *Electrophorus electricus*.

In eine Küvette mit temperiertem Puffer (830 µl) wurden nacheinander Acetonitril (50 µl), DTNB-Lösung (50 µl; 7 mM in Puffer) und einer Inhibitorlösung (10 µl; 2,5 mM in Acetonitril) gegeben und gründlich gemischt. Anschließend wurden eisgekühlte Enzymlösung (10 µl; 3,33 U/ml in Puffer) zugegeben und wiederum gründlich gemischt. Die eingesetzte Enzymlösung wurde unmittelbar vor der Messung frisch aus einer Stammlösung (100 U/ml in Puffer) durch Verdünnen mit Puffer hergestellt (die Aktivität der Stammlösung blieb in Eis für etwa 3-4 Stunden konstant). Die Inkubation erfolgte im temperierbaren Küvettenhalter des VARIAN Cary 50 UV-Vis-Spektrophotometers mit Hilfe des Thermostaten UC-5B von JULABO bei 25° C für 15 Minuten. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Acetylthiocholin-Lösung (10 mM in Puffer) gestartet und die Extinktionszunahme bei 412 nm über einem Zeitraum von fünf Minuten verfolgt.

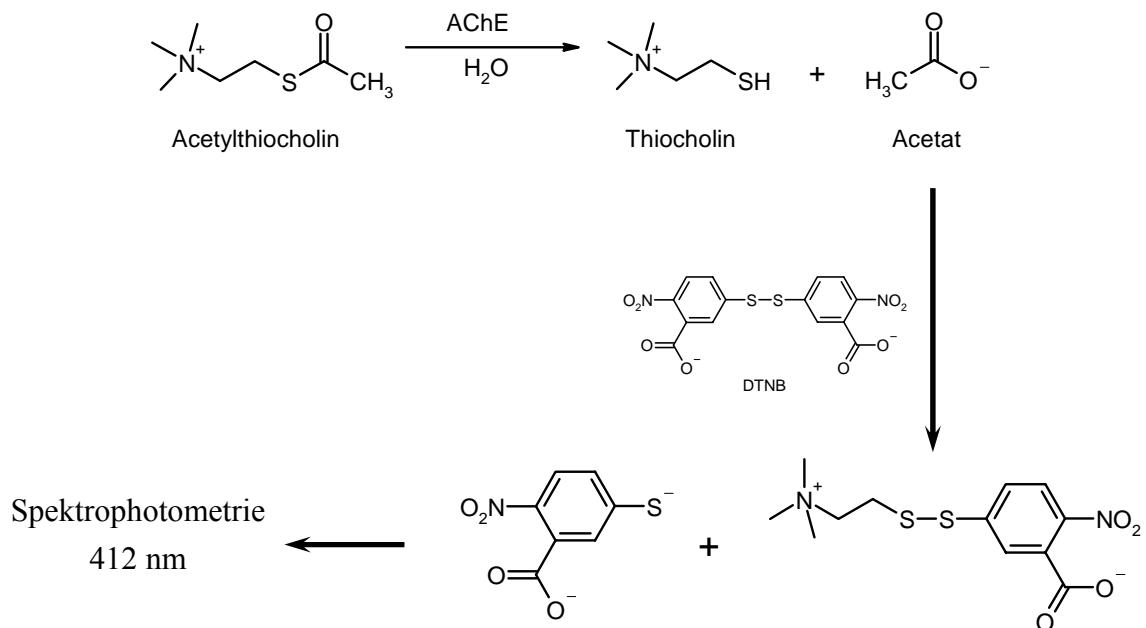


Abbildung 150: Spektrophotometrische Methode zur Bestimmung der Aktivität von Acetylcholinesterase nach Ellman et al.⁴⁷⁹

Die „ungehemmte“ Reaktion wurde in gleicher Weise bestimmt, aber anstelle der Inhibitorlösung wurden 10 μl Acetonitril zugegeben. Der Anstieg der Freisetzung von Thiocholin aus Acetylthiocholin in Anwesenheit der zu untersuchenden Verbindung zeigt einen linearen Verlauf. Die gemessenen Extinktionswerte werden nach folgender Gleichung analysiert:

$$E(t) = v_s \cdot t + E(t_0)$$

Dabei entsprechen $E(t)$ und $E(t_0)$ der Extinktion zum Zeitpunkt t bzw. zum Beginn der Messung (t_0). Die Anstiege der Regressionsgeraden v_s sind steady-state Geschwindigkeiten und wurden zur Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors v_0 nach folgender Gleichung in Bezug gesetzt.

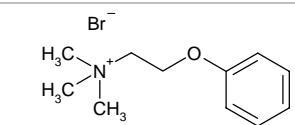
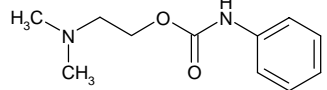
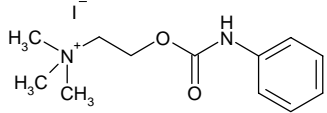
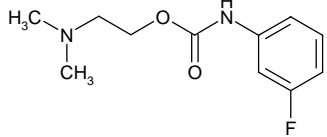
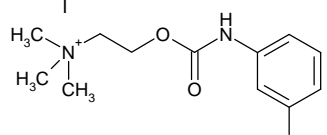
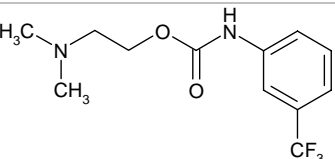
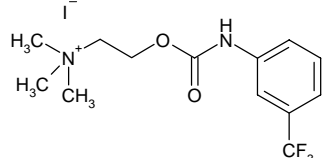
$$\text{rel. Ak.} = \frac{v_s}{v_0} \cdot 100 \%$$

Zuvor wurden v_s und v_0 um den Betrag der nicht-enzymatischen Hydrolyse von Acetylthiocholin korrigiert. Die relativen Enzymaktivitäten (rel. Ak.) geben das inhibitorische Potential der untersuchten Verbindungen wieder. Die Auswertung der kinetischen Daten erfolgte mit Cary WinUV V2.00(26) Kinetics Application Software von VARIAN.

4.2.4 Ergebnisse

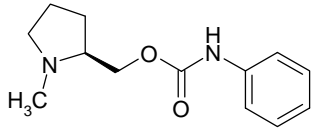
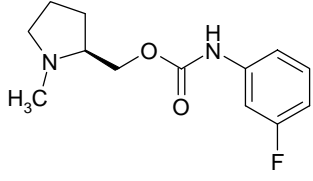
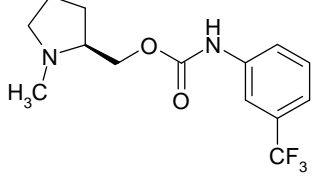
Die in den nachfolgenden Tabellen aufgeführten Stoffe bewirken bei einer Konzentration von 25 μM eine Minderung der Aktivität der AChE von höchstens 6%. Dies bedeutet, dass die Verbindungen kein inhibitorisches Potential gegenüber dem Enzym besitzen.

Tabelle 4.2-1: Hemmung der relativen Acetylcholinesterase-Aktivität durch Phenylcholinester 42 und abgeleiteter Phenylcarbamidsäureester

Struktur	Nr.	relative Enzym-Aktivität ^a [%]
	42	103
	53	102
	56	97
	54	100
	57	97
	55	96
	58	94

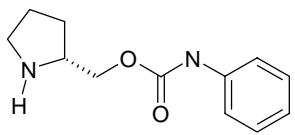
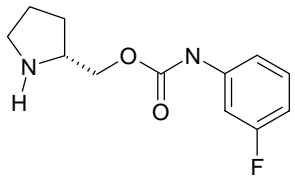
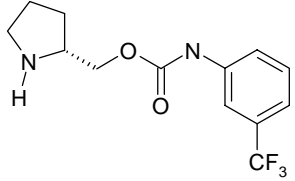
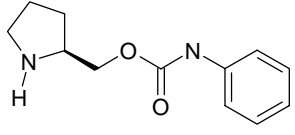
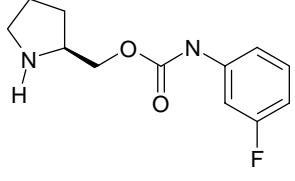
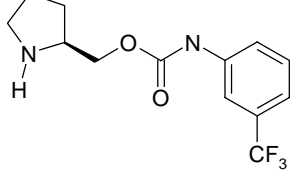
^a = Doppelbestimmung bei einer Inhibitorkonzentration von 25 μM

Tabelle 4.2-2: Hemmung der relativen Acetylcholinesterase-Aktivität durch N-Methyl-pyrrolidinyl-phenylcarbamate

Struktur	Nr.	relative Enzym-Aktivität ^b [%]
 (S)	59	95
 (S)	60	97
 (S)	61	101

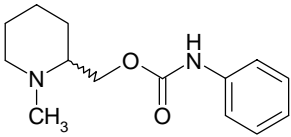
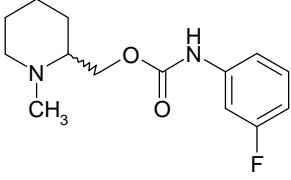
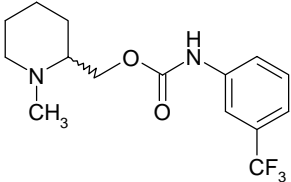
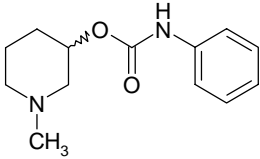
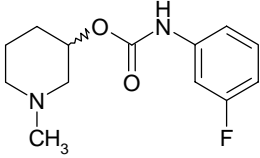
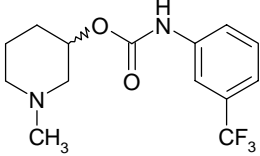
^b = Doppelbestimmung bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μ M

Tabelle 4.2-3: Hemmung der relativen Acetylcholinesterase-Aktivität durch Pyrrolidinyl-phenylcarbamate

Struktur	Nr.	relative Enzym-Aktivität ^b [%]
 (R)	62	101
 (R)	63	97
 (R)	64	100
 (S)	65	102
 (S)	66	95
 (S)	67	100

^b = Doppelbestimmung bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μ M

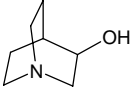
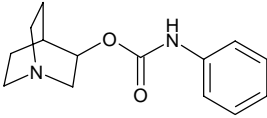
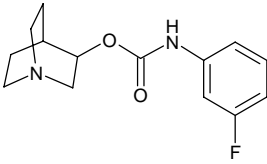
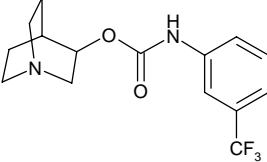
Tabelle 4.2-4: Hemmung der relativen Acetylcholinesterase-Aktivität durch N-Methyl-piperidinyl-phenylcarbamate

Struktur	Nr.	relative Enzym-Aktivität ^b [%]
	68	100 ^a
	69	95
	70	101
	71	101
	72	100
	73	110

^a = Doppelbestimmung bei einer Inhibitorkonzentration von 25 μM

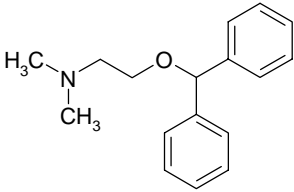
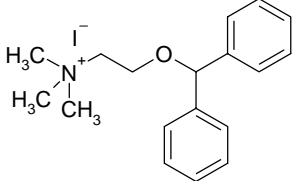
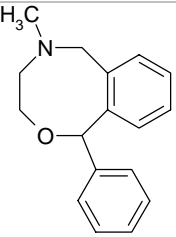
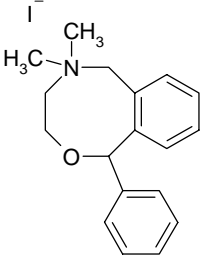
^b = Doppelbestimmung bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μM

Tabelle 4.2-5: Hemmung der relativen Acetylcholinesterase-Aktivität durch Chinuclidinyl-phenylcarbamate

Struktur	Nr.	relative Enzym-Aktivität ^b [%]
	77	101
	74	96
	75	95
	76	101

^b = Doppelbestimmung bei einer Inhibitorkonzentration von 5 μ M

Tabelle 4.2-6: Hemmung der relativen Acetylcholinesterase-Aktivität durch Arzneistoffe und ihre methylierten Analoga

Struktur	Nr.	relative Enzym-Aktivität ^a [%]
	45	98
	47	96
	46	n.b.
	48	97

^a = Doppelbestimmung bei einer InhibitorKonzentration von 25 µM

Das Fehlen eines inhibitorischen Effektes auf die AChE-Aktivität der untersuchten Stoffe trotz vorhandener Carbaminsäureester-Struktur könnte mehrere Gründe haben. Möglicherweise sind die getesteten Verbindungen Substrate der Acetylcholinesterase und werden, ohne diese zu inhibieren, gespalten. Mit dem verwendeten Inhibitionsassay kann nicht untersucht werden, ob es zu einer Substratspaltung der als Inhibitor eingesetzten Verbindung durch die AChE kommt. Die Umsetzung der hergestellten Carbamate durch die AChE kann durch den Nachweis der Zersetzungsprodukte mittels einer HPLC-gestützter Untersuchung des Enzymassays überprüft werden. Dies ist für

die Zukunft geplant.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus der Abbildung 151, in der eine schematische Darstellung der Blockade des esteratischen Zentrums der Acetylcholinesterase aus *Torpedo californica* am Beispiel des AChE-Inhibitors Rivastigmin **17** (Abbildung 149) zu sehen ist. An der OH-Gruppe des Serins [Ser 200 (A)] ist der Ethyl-methyl-carbamoyl-Rest des Rivastigmin **17** gebunden (Carbamoyl-Enzym), der zu verzögerten Regeneration und somit zur Hemmung des Enzyms führt. Dieser Rest wird durch Wasserstoffbrückenbindungen der Aminogruppen benachbarten Aminosäuren (Glycin 118 und 119 sowie Alanin 201) in der Bindungstasche des Enzyms räumlich fixiert. Aus der schematischen Darstellung geht hervor, dass der vergleichsweise kleine Carbamoylrest den vorhandenen Raum im aktiven Zentrum des Enzyms nahezu vollständig ausfüllt. Daher stellt sich die Frage, ob der Phenyl-carbamyl-Rest, der bei Spaltung der von uns hergestellten Phenylcarbamate auf das Enzym übertragen würde, nicht zu voluminös für das aktive Zentrum der AChE ist und dadurch eine Übertragung von Anfang an aus räumlichen Gründen unmöglich ist. Dies würde bedeuten, dass die Substanzen weder als Substrate des Enzyms fungieren, noch als Inhibitoren der AChE in Frage kommen.

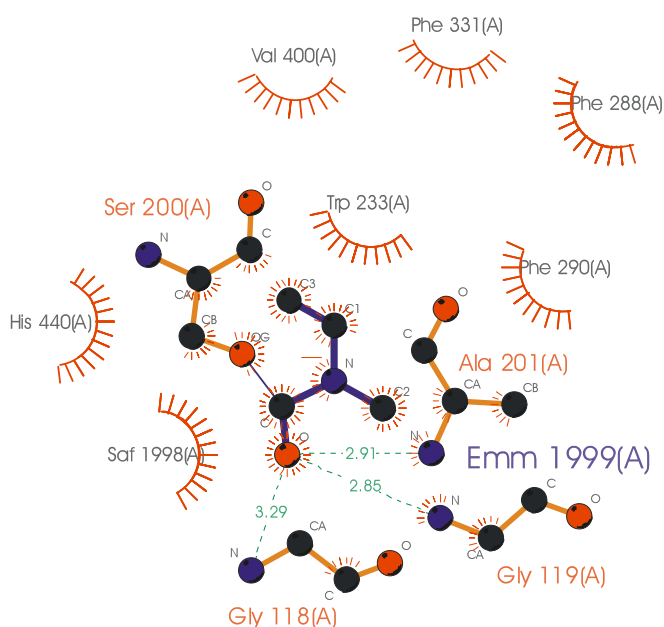


Abbildung 151: schematische Darstellung der Komplexierung der Acetylcholinesterase (*Torpedo californica*) am Beispiel des Rivastigmins **17** ^{480,481}

Dieser Theorie steht die Tatsache entgegen, dass das potentielle Alzheimer-Therapeutikum Phenserin **98** [(-)-N-Phenylcarbamoyl-eserolin] wahrscheinlich über die Bildung eines Carbamoyl-Enzyms in der Lage ist die AChE sehr effektiv zu hemmen^{482,483,484}.

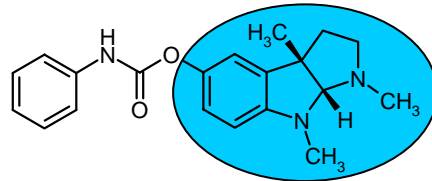


Abbildung 152: Strukturformel des AChE-Inhibitors Phenserin **98**

Warum gerade Phenserin **98** die Esterase zu hemmen vermag und die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Phenylcarbamate nicht, ist schwierig zu beantworten. Der einzige Unterschied zwischen dem AChE-Hemmer Phenserin **98** und den von uns synthetisierten Phenylcarbamaten besteht in der Aminoalkohol-Komponente. Der Eserolin-Rest des Phenserins ist im Vergleich zu den Aminoalkoholen der getesteten Phenylcarbamate möglicherweise eine wesentlich bessere Abgangsgruppe bei der Umsetzung mit der AChE, das die Übertragung des Phenyl-carbamoyl-Restes begünstigen könnte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese und In-vitro-Pharmakologie verschiedener von Cholin **22** bzw. von Phenylcholinether **42** abgeleiteter Phenylcarbamidsäureester sowie N-methylierter Arzneistoffe (Diphenhydramin **45** & Nefopam **46**) beschrieben.

Neben ACh **2** stellt das Cholin **22** einen zweiten physiologischen Agonisten am $\alpha 7$ -Subtyp der nicotinischen Acetylcholinrezeptoren dar^{195,196}. Dieser Amino-Alkohol **22** findet sich als Partialstruktur in einer Reihe von bekannten Wirk- und Arzneistoffen wie dem Phenylcholinether **42**, dem Diphenhydramin **45** und Nefopam **46**, welche im Rahmen dieser Arbeit erstmals auf ihre Affinität an verschiedenen Subtypen der nAChR untersucht wurden.

Ferner konnten Jensen et al. zeigen, dass eine Methylierung des bekannten Parasympatholytikum Carbamoylcholin **23** (Carbachol), dem Carbamidsäureester des Cholins **22**, die Selektivität der Substanz von mAChR auf nAChR umkehrt¹⁹⁷. Mullen et al. beschrieben kürzlich das zyklische Carbamat AR-R17779 **43** als selektiven $\alpha 7$ -nAChR-Liganden^{320,321}.

5.1.1 Synthese

Anhand dieser Erkenntnisse ergab sich die Frage, inwieweit sich die Affinität des Phenylcholinethers **42** zu nAChR durch die Erweiterung der Ethergruppe um eine Amidfunktion zum Carbamat verändert. Da sich die Trimethylammonium-Teilstruktur der Ausgangsverbindung **42** sowie der von dieser Substanz abgeleiteten Carbamate **56-58** wahrscheinlich nicht zur Überwindung der BBB eignet, wurde versucht den für die Interaktion mit Nicotinrezeptoren wichtigen basischen Stickstoff in einen Heterozyklus einzubinden. Zu diesem Zweck wurde diverse Aminoalkohole in einer nukleophilen Additionsreaktion mit substituierten Phenylisocyanaten zu den entsprechenden Phenylcarbamidsäureestern umgesetzt (Abbildung 153).

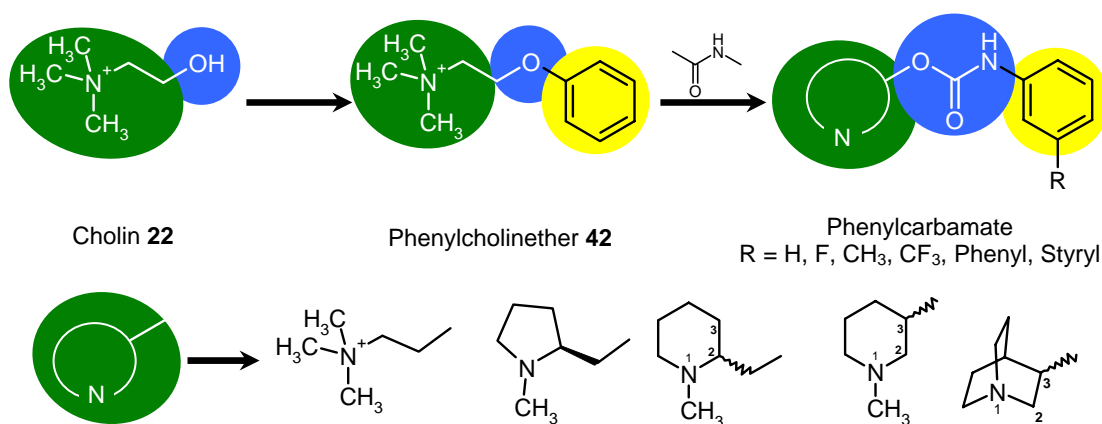


Abbildung 153: Strukturvariationen von Cholin **22** abgeleiteter Phenylcarbamate

Die Herstellung der verschiedenen Carbamate erfolgte nach der Methode von Nilsson et al.^{340,341}. Durch das Arbeiten unter Schutzgas, zum Ausschluss von Feuchtigkeit, konnten die Ausbeuten bei der Herstellung der Carbamate von anfänglich ca. 60 % auf 80-90 % gesteigert werden. Die so erhaltenen Verbindungen wurden mittels Schmelzpunktbestimmung, IR, MS, NMR und Elementaranalyse vollständig charakterisiert.

5.1.2 Radioligand-Bindungsstudien

Alle hergestellten Verbindungen wurden mittels Radioligand-Bindungsstudien an den Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 3\beta 4^*$, $\alpha 7^*$ sowie am muskulären Subtyp $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ der nAChR untersucht. Es wurden folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen ermittelt (siehe Abbildung 154):

Phenylcholinether **42**:

- nanomolare Affinitäten zu allen untersuchten Subtypen ($K_i = 22\text{-}697$ nM)
- Prävalenz zum $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptor

Erweiterung des Ethers zum Carbamat (**56-58**):

- nanomolare Affinitäten zum $\alpha 7$ -Subtyp ($K_i = 29\text{-}62$ nM)
- Verbesserung der Subtypselektivität zum $\alpha 7$ -Rezeptor (z.B. Carbamat **58**: $\alpha 7^* \leftrightarrow \alpha 4\beta 2^* = 1:207$, $\alpha 7^* \leftrightarrow \alpha 3\beta 4^* = 1:131$ & $\alpha 7^* \leftrightarrow (\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta > 1:689$)

- keine Affinität zum muskulären Subtyp

Integration des Stickstoffes in einen Heterozyklus:

- heterogene Ergebnisse
- *Pyrrolidin- bzw. N-Methyl-pyrrolidinring*: keine bzw. mikromolare Affinität mit Selektivität zum $\alpha 4\beta 2^*$ -Rezeptor
- *N-Methyl-piperidinring*: unterschiedliche Affinität (mikromolar) zu verschiedenen Subtypen in Abhängigkeit der Substitutionsposition des Heterozyklus; Derivate mit Substitution in Position 3 zeigen Selektivität zum $\alpha 7^*$ -Rezeptor

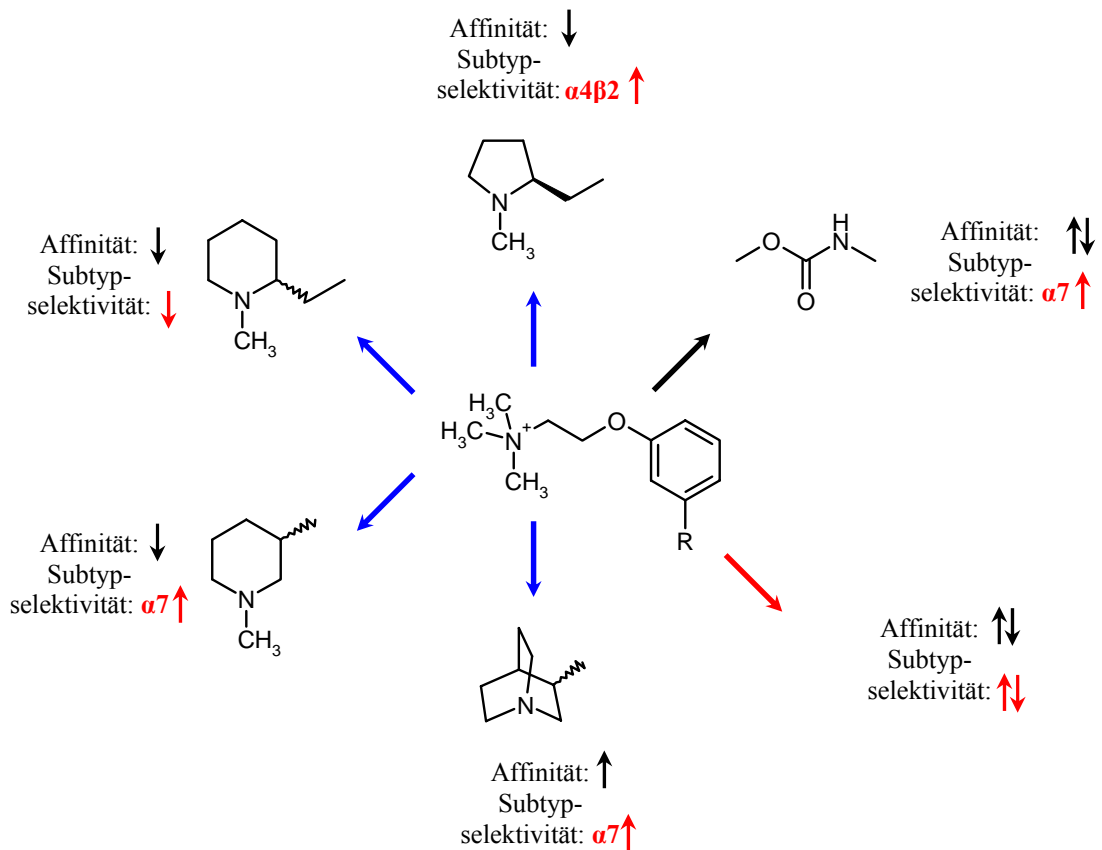


Abbildung 154: schematische Darstellung der unterschiedlichen Affinitäts- und Subtypselektivitätsprofile der von Phenylcholinether **42** abgeleiteten Phenylcarbamate (Angabe der Subtypen nur bei Erhöhung der Selektivität)

- *Chinuclidinring*: nanomolare Affinität mit Subtypselektivität zum $\alpha 7^*$ -Rezeptor (z.B. Carbat **75**: $\alpha 7^* \leftrightarrow \alpha 4\beta 2^* = 1:133$, $\alpha 7^* \leftrightarrow \alpha 3\beta 4^* = 1:42$ & $\alpha 7^* \leftrightarrow (\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta > 1:536$); Affinität der Derivate nimmt mit der Größe des Phenylring-Substituenten ab ($H = F > CF_3 > Br \approx CH_3 > Ph \gg Styryl$)

Einfluss des Phenylring-Substituenten auf die Affinität und Subtypselektivität:

- heterogener Einfluss
- neben der Größe des Substituenten (z.B. Chinuclidinderivate) scheinen induktive und mesomere Effekte, also die Erhöhung oder Erniedrigung der Elektronendichte des Aromaten, eine Rolle zu spielen

Arzneistoffe:

- sowohl Diphenhydramin, als auch Nefopam zeigen mikromolare Affinität zu $\alpha_4\beta_2^*$ - und α_7^* -nAChR
- durch Methylierung der Arzneistoffe lässt sich deren Affinität zu nAChR steigern

Pharmakophor:

- Bestätigung der postulierten Pharmakophor-Elemente [quartären bzw. protonierbaren Stickstoff (grün), Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor (blau) und ein π -Elektronensystem (gelb); siehe Abbildung 155]
- die optimale Abstände der Pharmakophor-Elemente für den α_7 -Rezeptor scheinen in den Trimethylammonium- (**56-58**) und Chinuclidin-Derivaten (**74-76**) gegeben zu sein

Unter den hergestellten Phenylcarbamaten zeigten die Derivate mit Trimethylammonium- (**56-58**) und Chinuclidin-Teilstruktur (**74-76**) die höchsten Affinitäten ($K_i = 29-173$ nM) und Subtypselektivität zum α_7 -Rezeptor. Beide Substanzklassen können daher als neue Leitstrukturen zur Synthese noch potenterer und selektiver Nicotinrezeptor-Liganden für diesen Subtyp betrachtet werden (Abbildung 155).

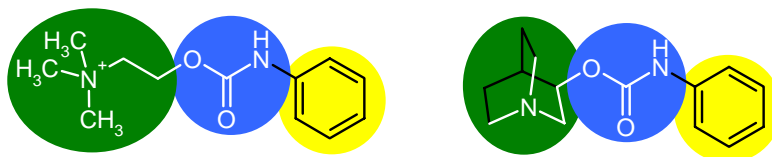


Abbildung 155: neue Leitstrukturen α_7 -Subtyp-selektiver Nicotinrezeptor-Liganden (Carbamate **56** & **74**)

5.1.3 Transfektion

Um die funktionellen Eigenschaften der hergestellten Carbamate zu untersuchen und detailliertere Struktur-Wirkungsbeziehung abschätzen zu können, wurden im Rahmen eines sechsmonatigen Forschungsaufenthaltes in Japan Patch-Clamp-Studien an $\alpha 4\beta 2$ - und $\alpha 7$ -nAChR exprimierenden Zellen unternommen. Für diese Studien wurde zunächst versucht, den $\alpha 7$ -Nicotinrezeptor in Phäochromozytomzellen der Ratte (PC12) und SH-SY5Y-Neuroblastomzellen stabil zu transfizieren. Dies gelang zwar mit den SH-SY5Y-Zellen, jedoch verhinderte die geringe Dichte der Zellen, die den gewünschten Ionenkanal exprimierten, die Verwendung der Kultur zur Evaluierung von Testsubstanzen am $\alpha 7$ -Rezeptor.

5.1.4 Patch-Clamp-Experimente

Das funktionelle Screening der hergestellten Carbamate mittels Patch-Clamp-Experimenten an $\alpha 7$ -Rezeptoren primärer Kulturen von Hippocampus-Neuronen und $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren einer transfizierte HEK-293-Zelllinie führten zu folgenden Resultaten (Abbildung 156):

Agonisten am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor:

- lediglich der Phenylcholinether **42** induziert einen Strom in HEK-293-Zellen, der etwa 17 % eines Nicotin-Vergleichssignals entspricht
- der Ether wirkt vermutlich partial-agonistisch am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor

Antagonisten am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor:

- die Hemmung des durch Nicotin **1** induzierten Stromsignals bei gleichzeitiger Applikation mit der Testsubstanz lässt vermuten, dass zumindest die Carbamate mit Trimethylammonium-, N-Methyl-piperidin- und Chinclidin-Partialstruktur antagonistisch am $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor wirken
- detaillierte Experimente sind jedoch zur Bestätigung dieser These notwendig

Agonisten am $\alpha 7$ -Rezeptor:

- sowohl der Phenylcholinether **42**, als auch die Trimethylammonium-

phenylcarbamate **56-58** wirken agonistisch an diesem Subtyp; der durch diese Substanzen induzierte Strom entspricht zwischen 71 und 107 % eines Nicotinvergleichsignals

- Chinuclidinyl-phenylcarbamate zeigen sehr heterogene funktionelle Eigenschaften
- das Brom-substituierte Chinuclidinyl-phenylcarbamate **83** induzierte ebenfalls ein schwaches Stromsignal in den Hippocampus-Neuronen (38 % des Nicotinvergleichsignals)
- der additive Effekt des Fluor-substituierten Chinuclidinyl-phenylcarbamats **75** bei gleichzeitiger Applikation mit Nicotin **1** lässt vermuten, dass diese Verbindung ebenfalls partial-agonistisch wirkt

Antagonisten am $\alpha 7$ -Rezeptor:

- die gleichzeitige Applikation von N-Methyl-pyrrolidin- **59**, N-Methyl-piperidin-2-yl- **68** und N-Methyl-piperidin-3-yl-phenylcarbamidsäureester **71** mit Nicotin **1** führte zu einer Hemmung des Agonist induzierten Stromsignals zwischen 35 und 40 %
- die Chinuclidinyl-phenylcarbamate **74** & **76** inhibierten ein durch Nicotin **1** induziertes Stromsignals zu 35 bzw. 20 %, was zumindest für eine partial-antagonistische Wirkung spricht
- detaillierte Experimente sind jedoch in allen Fällen zur endgültigen Bestätigung des Antagonismus notwendig

Vergleicht man die erhobenen Patch-Clamp-Daten mit den Befunden aus den Bindungsstudien, so ist festzustellen, dass die Ergebnisse in den wichtigsten Punkten korrelieren. Jedoch reichen die während des Auslandsaufenthaltes in Japan erhobenen Daten bei weitem nicht aus, um eine genauere Struktur-Wirkungsbeziehung der Carbamate an neuronalen nAChR Subtypen zu postulieren. Eine exakte Evaluierung der antagonistischen Wirkung der Phenylcarbamate wäre genauso erforderlich, wie die Ermittlung der Effekt-Konzentrationsabhängigkeit für die untersuchten Agonisten.

Calciumchelators Fura 2 zu bestimmen. Die Experimente führten zu folgenden Resultaten:

- Nicotin **1** induziert einen konzentrationsabhängigen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in den Mäusemakrophagen
- der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ist unabhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration
- die Phenylcarbamate **56**, **58**, **73**, **74** & **76** induzieren nach Applikation ebenfalls einen unterschiedlich starken Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den Immunzellen, dabei entspricht der durch den (3-Trifluormethyl-phenyl)-chinuclidin-3-yl-carbamidsäureester **76** (1 mM) induzierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ dem 17fachen einer Nicotinlösung gleicher Konzentration
- die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Nicotin **1** wird lediglich zu 15 bzw. 28 % durch die Preinkubation der Makrophagen mit den $\alpha 7$ -selektiven Antagonisten MLA **14** und α -Bgt **4** inhibiert; der $\alpha 4\beta 2$ -selektive Antagonisten DH β E **29** hat keinen Effekt auf das durch Nicotin **1** induzierte Calciumsignal (siehe Abbildung 157)
- die Preinkubation der Makrophagen mit dem Phosphorlipase C Inhibitor U-73122 **90** führt zu einer Reduktion des Nicotin **1** induzierten Calciumsignals um 33 % (Abbildung 157)
- der intrazelluläre Calcium-Chelator BAPTA **91** inhibiert den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ durch Nicotin **1** vollständig (Abbildung 157)

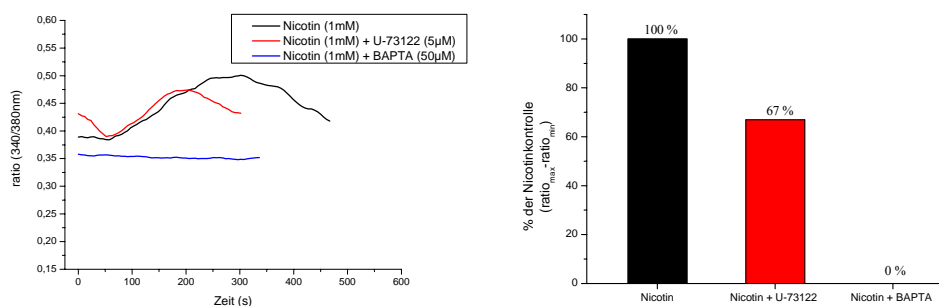


Abbildung 157: Evaluation von intrazellulären Calciumspiegeln nach Applikation von Nicotin **1** (schwarz, 1 mM, Einzelerperiment), Nicotin **1** nach Preinkubation mit U-73122 **90** (rot, Nicotin **1** (1 mM) und U-73122 **90** (5 µM), Mittelwert aus 3 Experimenten) und Nicotin **1** nach Preinkubation mit BAPTA **91** (Nicotin **1** (1 mM) und BAPTA **91** (50 µM), Einzelerperiment) (Experimente eines Versuchstages mit den Makrophagen einer Charge)

- aus Western-Blot-Untersuchungen der Makrophagen geht hervor, dass die Zellen über das Protein des $\alpha 7$ -Rezeptors verfügen
- die Stimulation der Makrophagen durch Nicotin **1** im Patch-Clamp-Experiment induziert kein Stromsignal

Aus den Versuchen mit den $\alpha 7$ -selektiven Antagonisten MLA **14** und α -Bgt **4** geht hervor, dass dieser Rezeptorsubtyp nicht hauptverantwortlich für den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ sein kann, aber zumindest daran beteiligt ist. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Erhöhung der Calciumkonzentration über den Einstrom von Calcium-Ionen durch $\alpha 7$ -Ionenkanäle zustande kommt. Die Hemmung des Nicotinsignals durch den Phosphorlipase-C-Inhibitor U-73122 **90** lässt vermuten, dass dieses Enzym ebenfalls in die Freisetzung des Calciums in den Makrophagen involviert ist. Diese Inhibition weist weiterhin darauf hin, dass der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Freisetzung der Kationen aus intrazellulären Speichern verursacht wird. Diese Hypothese wird durch die vollständige Hemmung des Nicotin-induzierten Calciumsignals durch den intrazellulären Calcium-Chelator BAPTA **91** gestützt.

Der genaue Wirkungsmechanismus der Induktion des Calciumkonzentrationsanstiegs in Makrophagen durch Nicotin **1** und den getesteten Carbamaten ist nach wie vor unklar, jedoch ist ein Einstrom von Calcium-Ionen durch Nicotinrezeptorkanäle eher auszuschließen. Daher ist dieser Assay nicht wie erhofft zur Evaluation von $\alpha 7$ -selektiven Nicotinrezeptor-Liganden über die Messung des intrazellulären Calciumkonzentrationsanstiegs geeignet.

5.1.6 Radioligand-Bindungsstudien am 5-HT_{3A}-Rezeptor

Aufgrund der nahen Verwandtschaft des Serotoninrezeptor-Subtyps 5-HT_{3A} mit dem $\alpha 7^*$ -nAChR sowie der nachweislich hohen Affinität verschiedenster Liganden zu beiden Rezeptoren^{322,364,472,473}, stellte sich die Frage, ob die von uns hergestellten $\alpha 7$ -selektiven Carbamate auch am Serotoninrezeptor wirksam sind. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem Arbeitskreis um Prof. Bönisch (Institut für Pharmakologie & Toxikologie, medizinische Fakultät, Universität Bonn) testete Herr Mesfin Seleshi die hergestellten Carbamate mittels Radioligand-Bindungsstudien auf

ihre Affinität zum 5-HT_{3A}-Rezeptor.

Die Studien ergaben folgende Ergebnisse:

- *Trimethylammonium-Carbamate*: die Derivate **56** & **58** zeigen nanomolare Affinität zum untersuchten Serotoninrezeptor (5-HT_{3A}: K_i = 305 und 356 nM; α7*: K_i = 39 und 29 nM)
- *N-Methyl-pyrrolidinring*: wie schon am α7-Rezeptor besitzen diese Verbindungen eine Affinität im hohen mikromolaren Bereich zum 5-HT_{3A}-Rezeptor
- *N-Methyl-piperidinring*: unterschiedliche mikromolare Affinität zum Serotoninrezeptor in Abhängigkeit der Substitutionsposition des Heterozyklus; im Gegensatz zum α7*-Rezeptor zeigen Derivate mit Substitution in Position 2 höhere Affinität
- *Chinuclidinring*: die Derivate **74-75** besitzen nanomolare Affinität zum 5-HT_{3A}-Rezeptor (5-HT_{3A}: K_i = 738 nM, 169 nM & 456 nM; α7*: K_i = 44 nM, 37 nM & 173 nM)

Einfluss des Phenylring-Substituenten auf die Affinität und Subtypselektivität:

- heterogener Einfluss
- neben der Größe des Substituenten scheinen induktive und mesomere Effekte, also die Erhöhung oder Erniedrigung der Elektronendichte des Aromaten, eine Rolle zu spielen

Pharmakophor:

- Bestätigung der postulierten Pharmakophor-Elemente (quartären bzw. protonierbaren Stickstoff, Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor und ein π-Elektronensystem)
- die optimale Abstände der Pharmakophor-Elemente für den Serotoninrezeptor scheinen in den Trimethylammonium- (**56-58**) und Chinuclidin-Derivaten (**74-76**) gegeben zu sein

Durch die Testung der von uns hergestellten Verbindungen am Serotoninrezeptor-Subtyp-3A konnten die Ergebnisse von Gurley et al.⁴⁶⁸, die die Bindung von Nicotinrezeptor-Liganden am 5-HT_{3A}-Rezeptor nachweisen, belegt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Phenylcarbamate mit α 7-Selektivität auch am untersuchten Serotoninrezeptor die besten Affinitäten besaßen, was indirekt durch die große Homologie zwischen dem 5-HT_{3A}- und dem α 7-Rezeptor erklärt werden kann. Dies geht einher mit der Tatsache, dass gerade die Carbamate (**74-76**) mit großer struktureller Ähnlichkeit zu bekannten 5-HT_{3A}-Rezeptor-Liganden die höchsten Affinitäten zum Serotoninrezeptor besaßen.

5.1.7 Inhibition der Acetylcholinesterase:

Die strukturelle Ähnlichkeit der Phenylcarbamate mit Acetylcholin **2** und Cholin **22** sowie die Existenz einiger Carbamate als Inhibitoren der AChE (Physostigmin **5**, Rivastigmin **17**) lässt vermuten, dass die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Phenylcarbamidsäureester mit dem Enzym interagieren. Aus diesem Grund wurde in einem Kooperationsprojekt mit dem Arbeitskreis um Prof. M. Gütschow der inhibitorische Effekt der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Substanzen untersucht. Frau Camino Gonzalez und Herr Markus Pietsch konnten jedoch zeigen, dass keine der Verbindung die Aktivität des Enzyms hemmt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Carbamate als Substrate der Esterase fungieren. Dies soll in einem weiterführenden Projekt aufgeklärt werden.

5.2 Ausblick

Die Vielzahl der potentiellen Einsatzmöglichkeiten von selektiven Nicotinrezeptor-Liganden in der Therapie verschiedenster Krankheiten ist ein großer Anreiz für die Entwicklung neuer Substanzen. Weiterhin macht das Fehlen von detaillierten Erkenntnissen über die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Liganden an nAChR die Entwicklung neuer, noch potenterer und selektiverer Liganden sowie deren in-vivo und in-vitro Evaluation notwendig.

Für die Zukunft ist die Weiterführung der im Rahmen dieser Arbeit begonnenen Projekte geplant. Dies umfasst die detaillierte funktionelle Charakterisierung der hergestellten Carbamate mittels Patch-Clamp-Experimenten sowie die Aufklärung des Wirkungsmechanismus, der für den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Makrophagen nach Substanzapplikation verantwortlich ist.

Des Weiteren ist die Synthese neuartiger Nicotinrezeptor-Liganden mit leicht variiertes Struktur geplant. Die Carbamatfunktion der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Phenylcarbamidsäureester soll um die ursprüngliche Etherfunktion der Ausgangsverbindung (Phenylcholinether **42**) auf ein Amid reduziert werden, da ähnliche Benzamide von Bodnar et al. als selektive $\alpha 7$ -nAChR beschrieben worden sind³⁶⁴. Ähnliches gilt auch für Imidazolacrylsäure-Derivate, deren Synthese ebenfalls geplant bzw. bereits begonnen wurde.

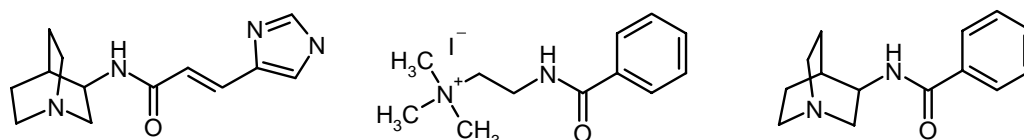


Abbildung 158: Strukturen geplanter Syntheseprodukte [(E)-N-(1-Chinuclidin-3-yl)-3-(1H-imidazol-4-yl)-acrylamid, (2-Benzoylamino-ethyl)-trimethyl-ammoniumiodid, N-(1-Chinuclidin-3-yl)-benzamid]

Ein Ziel dieser Synthesen soll die Entwicklung von reinen $\alpha 7$ -Rezeptor-Liganden sein, die keinerlei Interaktion mit Serotoninrezeptoren aufweisen. Erst dies würde die Subtyp-selektive Untersuchung der $\alpha 7$ -Rezeptorfunktion im Organismus gewährleisten. Für die Therapie einiger neurodegenerativer Erkrankungen könnte sich jedoch die Interaktion von potentiellen Therapeutika mit $\alpha 7$ -nAChR und 5-HT_{3A}-Rezeptoren als nützlich erweisen. Daher ist die Herstellung von Substanzen mit derartigem Wirkprofil ein weiteres Ziel für die geplanten Synthesen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Vorbemerkungen zur Synthese

NMR-Spektroskopie

Bis auf die Fluor-19 entkoppelten wurden alle Spektren auf einem Advance DRX 500 der Firma Bruker (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) im Pharmazeutischen Institut Poppelsdorf aufgenommen. ^1H -Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl_3 oder DMSO gemessen, die Messung der ^{13}C -Spektren erfolgte unter Verwendung von CDCl_3 oder DMSO bei 125 MHz. Als interne Standards dienten undeuterierte Lösungsmittel (^1H -NMR: δ/ppm 2,49 für DMSO und 7,24 für CHCl_3 ; ^{13}C -NMR: δ/ppm 39,7 für DMSO und 77 für CHCl_3). Die Substanzen wurden vorwiegend in DMSO vermessen, da dieses Solvens den Protonenaustausch von OH- und NH-Gruppen verlangsamt. Somit werden die vicinale Kopplungen dieser funktionellen Gruppen sichtbar³⁶⁵.

Die Messungen von ^{19}F -entkoppelten Spektren wurde von in der Zentralanalytik im Chemischen Institut der Universität Bonn auf einem Bruker Advance DRX 300 vorgenommen.

Schmelzpunkte

Die angegebenen Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi Melting Point B545 Gerät bestimmt und sind unkorrigiert angegeben.

Elementaranalyse

Mikroanalysen der Elemente Kohlen-, Wasser- und Stickstoff wurden auf einem VarioEl Gerät (Elementar AnalysenSysteme GmbH, Hanau, Deutschland) im Pharmazeutischen Institut Endenich angefertigt. Bei Abweichungen von mehr als 0,4 % zwischen errechneten und gemessenen Massenanteilen der Elemente sind die Werte durch „*“ hervorgehoben.

R_f-Werte

Für die Bestimmung von R_f-Werten und anderen dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden Kieselgel 60_{F254} DC-Platten der Firma Merck (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Detektion diente UV-Licht der Wellenlänge 254 nm, wässrige Kaliumpermanganat-Lösung 0,3 %⁴⁸⁵ sowie Dragendorffs Reagenz. Als Laufmittel dienten Dichlormethan-Methanol-Gemische, deren Volumenkonzentrationen jeweils angegeben sind.

IR-Spektroskopie

Alle angefertigten Spektren wurden von Frau Ulrike Degen auf einem Perkin-Elmer 1600 Series FTIR (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) im Pharmazeutischen Institut Poppelsdorf aufgenommen.

Massenspektrometrie

Die massenspektroskopische Vermessung aller Substanzen wurden von Frau Marion Schneider und Herrn Frank Umbach mit einem API 2000TM LC/MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit ESI Ionisierungsquelle, Quadrupol-Ionenfalle und BioAnalystTM 1.3 Software im Pharmazeutischen Institut Poppelsdorf durchgeführt.

Säulenchromatographie

Zur säulenchromatographischen Aufreinigung wurde Kieselgel 60 (70 - 230 mesh) der Firma Merck verwendet. Fraktionen wurden mittels eines 7000 Ultrarac[®] Fraction Collectors (LKB, Bromma, Schweden) oder eines Gilson FC 203B Fraction Collectors (Gilson, Middleton, WI, USA) gesammelt, vereinigt und das Lösungsmittel am Vacuubrand CVC 2 Rotationsverdampfer (Vacuubrand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland) entfernt. Zur weiteren Trocknung der teilweise hygroskopischen Öle wurden diese für 12-48 h in der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) gefriergetrocknet. Als Laufmittel fanden Dichlormethan-Methanol-Gemische im Verhältnis 40:1, 19:1 und 4:1 Anwendung.

Reagenzien und Lösungsmittel zur Synthese

Alle käuflich erworbenen Chemikalien (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), mit einer Reinheit von mehr als 97 %, wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Lösungsmittel wurden falls erforderlich vor Verwendung nach Standardmethoden getrocknet⁴⁸⁶, über Molekularsieb A3 der Firma Sigma-Aldrich gelagert bzw. unmittelbar vor Gebrauch frisch destilliert.

6.2 Synthesen

6.2.1 Trimethyl-(2-phenoxy-ethyl)-ammoniumbromid (42)

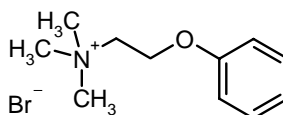


Abbildung 159: Trimethyl-(2-phenoxy-ethyl)-ammoniumbromid (42)

(2-Bromo-ethoxy)-benzen (771,0 mg, 3,8 mmol) und Trimethylamin (0,08 ml; 3,7 mmol) in 2,5 ml Toluol werden in einem Druckgefäßes Druckreaktionsrohr (ACE Glass Inc., NJ, USA) über 48h zur Kondensation gebracht. Das Gemisch sollte anschließend noch einmal auf 50 °C für 1h erhitzt werden. Das entstandene Rohprodukt wird abfiltriert und in EtOH (99 %) umkristallisiert^{309,487}.

Ausbeute:	756,6 mg; 2,9 mmol; 78,0 %	
Smp.:	165,2 °C (Lit. 167 °C)	
R _f :	0,271 (DCM/MeOH 80:20)	
CHN-Analyse:	C ₁₁ H ₁₈ NOBr (260,17)	ber.: C 50,78 H 6,97 N 5,38 gef.: C 50,67 H 6,94 N 5,37
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3014 und 2934 (ν CH), 1600 und 1480 (ν C=C), 1242 (ν C-O), 763 und 693 (δ CH)	
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 180,1	
¹ H-NMR (DMSO):	Bromid δ = 7,32 (t; J = 7,25 Hz; 2H; CH-3 und CH-5); 6,99 (m; 3H; CH-2; CH-4 und CH-6); 4,40 (t; J = 1,89 Hz; 2H; CH ₂ -O); 3,77 (t; J = 5,04 Hz; 2H; N-CH ₂); 2,40 (s; 9H; N-CH ₃)	

^{13}C -NMR (DMSO): Bromid $\delta = 157,51$ (CH-1); 129,70 (CH-3 und CH-5); 121,50 (CH-4); 114,85 (CH-2 und CH-6); 64,28 (CH₂-O); 61,65 (N-CH₂); 53,30 (N-CH₃)

6.2.2 Phenylcarbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (53)

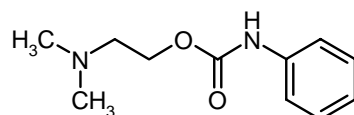


Abbildung 160: Phenylcarbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (53)

Äquimolare Mengen Dimethylamino-ethanol (0,24 ml; 2,4 mmol) und Phenylisocyanat (0,26 ml; 2,4 mmol) werden unter Rückfluss und unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit für 2h erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das leicht gelbliche Öl säulenchromatographisch aufgereinigt (ca. Kieselgel 60, DCM/MeOH 95:5). Das erhaltene klare Öl kristallisiert nach einigen Tagen aus.

Ausbeute: 200,6 mg; 1,0 mmol; 40,0 %

Smp.: Öl

R_f: 0,243 (DCM/MeOH 80:20)

CHN-Analyse: C₁₁H₁₆N₂O₂ (208,26) ber.: C 63,44 H 7,74 N 13,45

gef.: n.b.

IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3220 und 3040 (ν NH und CH); 1725 (ν C=O); 1595 (ν C=C); 1210 (ν C-O); 750 und 700 (δ CH)

MS (ESI): [M+H]⁺ 209,3

^1H -NMR (DMSO): Base $\delta = 9,90$ (bs; 1H; OC-NH); 7,45 (d; $J = 7,88$ Hz; 2H; CH-2 und CH-6); 7,25 (t; $J = 8,04$ Hz; 2H; CH-3 und CH-5); 6,95 (t; 1H; CH-4); 4,14 (t; $J = 5,79$ Hz; 2H; CH₂-O); 3,77 (t; $J = 5,67$ Hz; 2H; N-CH₂); 2,16 (s; 6H; N-CH₃)

^{13}C -NMR (DMSO): Base $\delta = 152,64$ (C=O); 138,89 (CH-1); 128,92 (CH-3 und CH-5); 122,88 (CH-4); 118,54 (CH-2 und CH-6); 61,60 (CH₂-O); 57,69 (N-CH₂); 49,64 (N-CH₃)

6.2.3 (3-Fluor-phenyl)carbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (54)

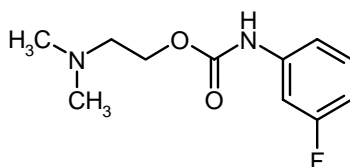


Abbildung 161: (3-Fluor-phenyl)carbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (54)

Die Synthese erfolgt wie unter 6.2.1 beschrieben mit 1 ml Dimethylamino-ethanol (10 mmol) und 1,08 ml 3-Fluorphenylisocyanat (10 mmol). Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie kristallisiert das leicht gelbliche Öl nach einigen Tagen aus.

Ausbeute:	1341,0 mg; 5,9 mmol; 63,2 %
Smp.:	51,0 °C
R _f :	0,557 (DCM/MeOH 80:20)
CHN-Analyse:	C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ O ₂ (226,25) ber.: C 58,40 H 6,68 N 12,38 gef.: C 57,92* H 6,82 N 12,31
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3190 und 2980 (ν NH und CH); 1720 (ν C=O); 1620 (ν C=C); 1560 (δ NH); 1450 (δ CH ₂); 1230 (ν C-O); 760 (δ CH)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 227,1
¹ H-NMR (DMSO):	Base δ = 9,98 (bs; 1H; OC-NH); 7,38 (dt; J = 11,98 Hz; J = 2,21 Hz; 1H; CH-2); 7,29 (dd; J = 6,94 Hz; J = 8,19 Hz; 1H; CH-5); 7,23 (d; J = 9,14 Hz; 1H; CH-6); 6,79 (dt; 1H; J = 1,89 Hz; J = 5,04 Hz; 1H; CH-4); 4,16 (t; J = 5,99 Hz; 2H; CH ₂ -O); 2,52 (m; 2H; N-CH ₂); 2,17 (s; 6H; N-CH ₃)
¹³ C-NMR (DMSO):	Base δ = 162,47 (d; J = 242,35 Hz; C-F); 153,54 (C=O); 141,27 (d; J = 11,22 Hz; CH-1); 130,45 (d; J = 9,47 Hz; CH-5); 114,07 (d; J = 1,99 Hz; CH-6); 108,80 (d; J = 20,94 Hz; CH-4); 104,95 (d; J = 26,43 Hz; CH-2); 62,23 (CH ₂ -O); 57,69 (N-CH ₂); 45,38 (N-CH ₃)

6.2.4 (3-Trifluormethyl-phenyl)carbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (55)

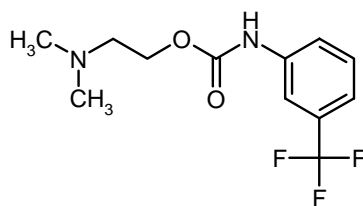


Abbildung 162: (3-Trifluormethyl-phenyl)carbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (55)

Die Synthese erfolgt wie unter 6.2.1 beschrieben mit 1ml Dimethylamino-ethanol (10 mmol) und 1,4 ml 3-Fluorphenylisocyanat (10 mmol). Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie kristallisiert das leicht gelbliche Öl nach einigen Tagen aus.

Ausbeute:	2245,4 mg; 8,1 mmol; 61,0 %	
Smp.:	48,4 °C	
R _f :	0,557 (DCM/MeOH 80:20)	
CHN-Analyse:	C ₁₂ H ₁₅ F ₃ N ₂ O ₂ (276,26)	ber.: C 52,17 H 5,47 N 10,14 gef.: C 48,71* H 5,82 N 9,44*
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 2958 und 2825 (ν NH und CH); 1733 (ν C=O); 1623 (ν C=C); 1559 (δ NH); 1448 (δ CH ₂); 1238 (ν C-O); 794 und 756 (δ CH)	
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 277,4	
¹ H-NMR (DMSO):	Base δ = 10,0 (bs; 1H; OC-NH); 7,90 (s; 1H; CH-2) 7,67 (d; J = 8,51 Hz; 1H; CH-6); 7,50 (t; J = 7,88 Hz; 1H; CH-5); 7,32 (d; J = 7,89 Hz; 1H; CH-4); 4,16 (t; J = 5,58 Hz; 2H; CH ₂ -O); 2,50 (t; J = 5,99 Hz; 2H; N-CH ₂); 2,16 (s; 6H; N-CH ₃)	
¹³ C-NMR (DMSO):	Base δ = 152,79 (C=O); 139,78 (CH-1); 130,26 (CH-5); 129,97 (q; J = 31,50 Hz; C-3); 124,21 (q; J = 273,43 Hz; CF ₃); 122,08 (CH-6); 119,25 (q; J = 3,49 Hz; CH-4); 114,45 (q; J = 4,57 Hz; C-2); 62,23 (CH ₂ -O); 58,69 (N-CH ₂); 53,22 (N-CH ₃)	

6.2.5 (2-Phenylcarbamoyloxy-ethyl)-trimethyl-ammoniumiodid (**56**)

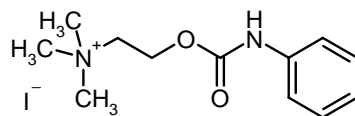


Abbildung 163: (2-Phenylcarbamoyloxy-ethyl)-trimethyl-ammoniumiodid (**56**)

Zu 150 mg (0,72 mmol) Phenylcarbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (**53**) in 3,5 ml Aceton wird Methyljodid (0,93 mmol, 133 mg, 0,059 ml) gegeben und über Nacht gerührt. Das erhaltene Produkt wird abgetrennt, mit Aceton gewaschen und getrocknet.

Ausbeute:	121,5 mg; 0,347 mmol; 48,2 %
Smp.:	130,5 °C
R _f :	0,329 (DCM/MeOH 80:20)
CHN-Analyse:	C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O ₂ I (350,2) ber.: C 41,16 H 5,47 N 8,00 gef.: C 41,18 H 5,47 N 7,96
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3121 und 2970 (ν NH und CH); 1741 (ν C=O); 1595 (ν C=C); 1537 (δ NH); 1441 (δ CH ₂); 1214 (ν C-O); 752 und 690 (δ CH)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 223,1
¹ H-NMR (DMSO):	Iodid δ = 9,70 (bs; 1H; OC-NH); 7,46 (d; J = 7,88 Hz; 2H; CH-2 und CH-6); 7,29 (t; J = 7,25 Hz; 2H; CH-3 und CH-5) 7,01 (t; 7,25 Hz; 1H; CH-4); 4,52 (m; 2H; CH ₂ -O); 3,68 (t; J = 5,05 Hz; 2H; N-CH ₂); 3,15 (s; 9H; N-CH ₃)
¹³ C-NMR (DMSO):	Iodid δ = 152,76 (C=O); 138,82 (CH-1); 128,94 (CH-3 und CH-5); 122,92 (CH-4); 118,53 (CH-2 und CH-6); 64,28 (H ₂ C-O); 58,08 (N-CH ₂); 53,25 (N-CH ₃)

6.2.6 [2-(3-Fluor-phenylcarbamoyloxy)-ethyl]-trimethyl-ammoniumiodid (57)

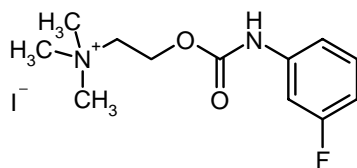


Abbildung 164: [2-(3-Fluoro-phenylcarbamoyloxy)-ethyl]-trimethyl-ammoniumiodid (57)

Unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit wird zu 111,2 mg (0,49 mmol) (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (54) in 5 ml Aceton Methyliodid (0,64 mmol; 92 mg; 0,04 ml) gegeben und über Nacht gerührt. Das erhaltene Produkt wird abgetrennt, mit Aceton gewaschen und getrocknet.

Ausbeute:	179,20 mg; 0,485 mmol; 99,0 %
Smp.:	101,9 °C
R _f :	0,243 (DCM/MeOH 80:20)
CHN-Analyse:	C ₁₂ H ₁₅ FN ₂ O ₂ I (368,19) ber.: C 39,14 H 4,93 N 7,61 gef.: C 37,83* H 4,87 N 7,82
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3486 und 3235 (ν NH); 3070 und 3008 (ν CH); 1725 (ν C=O); 1602 (ν C=C); 1544 (δ NH); 1451 (δ CH ₂); 1222 (ν C-O); 783 und 684 (δ CH)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 241,1
¹ H-NMR (DMSO):	Iodid δ = 9,94 (bs; 1H; OC-NH); 7,39 (d; J = 11,7 Hz; 1H; CH-2); 7,33 (dt; J = 6,9 Hz; J = 8,2 Hz; 1H; CH-5); 7,22 (d; J = 8,2 Hz; 1H; CH-6); 6,84 (dt; J = 2,1 Hz; J = 8,5 Hz; CH-4); 4,53 (m; 2H; CH ₂ -O); 3,69 (m; 2H; N-CH ₂); 3,16 (s; 9H; N-CH ₃)
¹³ C-NMR (DMSO):	Iodid δ = 162,43 (d; J = 241,3 Hz; C-F); 152,67 (C=O); 140,75 (d; J = 11,2 Hz; CH-1); 130,65 (d; J = 9,72 Hz; C-5); 114,31 (CH-6); 109,99 (d; J = 20,95 Hz; CH-4); 105,84 (d; J = 23,44 Hz; CH-2); 64,30 (CH ₂ -O); 58,33 (N-CH ₂); 53,23 (N-CH ₃)

6.2.7 [2-(3-Trifluormethyl-phenylcarbamoyloxy)-ethyl]-trimethyl-ammoniumiodid (58)

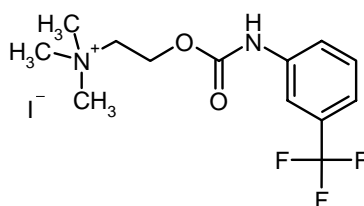


Abbildung 165: [2-(3-Trifluormethyl-phenylcarbamoyloxy)-ethyl]-trimethyl-ammoniumiodid (58)

Unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit wird zu 131,5 mg (0,47 mmol) (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-2-dimethylamino-ethylester (55) in 5 ml Aceton Methyliodid (0,89 mmol, 127 mg, 0,06 ml) gegeben und über Nacht gerührt. Das erhaltene Produkt wird abgetrennt, mit Aceton gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 173,5 mg; 0,414 mmol; 87 %

Smp.: 168,4 °C

R_f: 0,208 (DCM/MeOH 80:20)

CHN-Analyse: C₁₃H₁₈F₃N₂O₂ (418,20) ber.: C 37,34 H 4,34 N 6,70
gef.: C 37,05 H 4,25 N 6,99

IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3141 und 3075 (ν NH); 2957 (ν CH); 1729 (ν C=O); 1614 (ν C=C); 1556 (δ NH); 1471 (δ CH₂); 1222 (ν C-O); 790, 760 und 699 (δ CH)

MS (ESI): [M+H]⁺ 291,0

¹H-NMR (DMSO): Iodid δ = 10,07 (bs; 1H; OC-NH); 7,91 (s; 1H; CH-2); 7,69 (d; J = 8,0 Hz; 1H; CH-6); 7,55 (t; J = 7,9 Hz; 1H; CH-5); 7,36 (d; J = 7,6 Hz; 1H; CH-4); 4,55 (m; 2H; CH₂-O); 3,70 (m; 2H; N-CH₂); 3,16 (s; 9H; N-CH₃)

¹³C-NMR (DMSO): Iodid 152,79 (C=O); 139,78 (CH-1); 130,27 (CH-5); 129,72 (q; J = 31,5 Hz; C-3); 124,21 (q; J = 270,9 Hz; CF₃); 122,08 (CH-6); 119,24 (q; J = 3,49 Hz; CH-4); 114,45 (CH-2); 64,18 (CH₂-O); 58,45 (N-CH₂); 53,22 (N-CH₃)

6.2.8 Phenyl-carbaminsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (**59**)

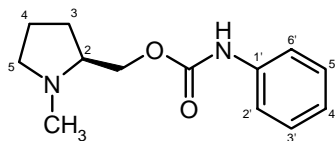


Abbildung 166: Phenyl-carbaminsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (**59**)

Äquimolare Mengen an (S)-(1-Methyl-pyrrolidin-2yl)-methanol (2,13 mmol; 0,25 ml) und Phenylisocyanat (2,13 mmol; 0,2 ml) werden unter Rückfluss und Ausschluss von Luftfeuchtigkeit in 10 ml Toluol für 2h erhitzt. Nach Erkalten wird die Lsg. mit 3 x 2 ml 2 M HCl gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 2 M NaOH alkalisiert und anschließend mit 3 x 5 ml DCM extrahiert. Nach Trocknung des org. Lösungsmittels über wasserfreiem Na_2SO_4 wird dieses einrotiert. Nach erfolgter säulenchromatographischer Aufreinigung kristallisiert das anfangs ölige Produkt nach einigen Tagen.

Um die Kristallisation des Produktes zu verbessern, kann es in das Hydrochlorid-Salz überführt werden. Hierzu löst man den Phenyl-carbaminsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (**59**) (262,3 mg; 1,12 mmol) in 1-2 ml Dioxan und versetzt die Mischung mit einem 5fachen Überschuss einer 4 M Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan. Nach kurzer Zeit fällt das Produkt als HCl-Salz aus. Um eine vollständige Fällung zu erreichen, werden 10 ml Diethylether hinzugefügt und die Suspension für 1 - 2 h weiter gerührt. Nach Abtrennung des Feststoffes wird dieser mit trockenem Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet.

Ausbeute:	345,8 mg; 1,48 mmol; 69,2 %
Ausbeute:	280,0 mg; 1,03 mmol; 92,3 % (Hydrochlorid)
Smp.:	186,1 °C (HCl)
R _f :	0,253 (DCM/MeOH 80:20) (Base)
CHN-Analyse:	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}$ (270,76) ber.: C 57,67 H 7,07 N 10,35 gef.: C 57,14 H 6,90 N 10,12
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2954 (ν CH); 2957 (ν CH); 2789 (ν N-CH ₃); 1728 (ν C=O); 1600 (ν C=C); 1531 (δ NH); 1445 (δ CH ₂); 1224 (ν C-O); 754 und 692 (δ CH) (Base)
MS (ESI):	$[\text{M}+\text{H}]^+$ 235,1

¹H-NMR (DMSO): Base 9,58 (s; 1H; OC-NH); 7,45 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H; CH-2' und CH-6'); 7,26 (t; $J = 7,4$ Hz; 2H; CH-3' und C-5'); 6,97 (t; $J = 7,4$ Hz; 1H; CH-4'); 4,06 (dd; $J = 4,9$ Hz; $J = 10,9$ Hz; 1H; CH₂-O); 3,98 (dd; $J = 5,7$ Hz; $J = 11,0$ Hz; 1H; CH₂-O); 2,90-2,97 (m; 1H; CH-2); 2,38-2,46 (m; 1H; CH₂-5); 2,31 (s; 3H; N-CH₃); 2,12-2,20 (m; 1H; CH₂-5); 1,84-1,92 (m; 1H; CH₂-3); 1,62-1,69 (m; 2H; CH₂-4); 1,53-1,60 (m; 1H; CH₂-3)

¹³C-NMR (DMSO): Base $\delta = 153,70$ (C=O); 139,33 (CH-1'); 128,8 (CH-3' und CH-5'); 122,43 (CH-2' und CH-6'); 118,36 (CH-4'); 66,25 (CH₂-O); 63,70 (CH-2); 57,06 (N-CH₃); 41,19 (CH₂-5); 28,24 (CH₂-3); 22,56 (CH₂-4)

6.2.9 (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (60)

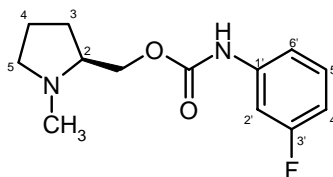


Abbildung 167: (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (60)

Die Synthesen von (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (**60**) erfolgt analog zu 6.2.8 unter Verwendung von äquimolaren Mengen (S)-(1-Methyl-pyrrolidin-2-yl)-methanol (1,98 mmol, 0,24 ml) und 3-Fluorphenyl-isocyanat (2,13 mmol; 0,23 ml).

Die Überföhrungen des Produktes in das Hydrochlorid-Salz erfolgt ebenfalls wie unter 6.2.8 beschrieben (385,67 mg; 1,53 mmol).

Ausbeute:	386,6 mg; 1,53 mmol; 77,4 %
Ausbeute:	348,4 mg; 1,20 mmol; 78,5 % (Hydrochlorid)
Smp.:	198,7 °C (Salz)
R _f :	0,230 (DCM/MeOH 80:20) (Base)
CHN-Analyse:	C ₁₃ H ₁₇ FN ₂ O ₂ (252,29) ber.: C 61,89 H 6,79 N 11,10 gef.: C 59,24* H 6,74 N 10,91

	$C_{13}H_{18}FN_2O_2Cl$ (289,76)	ber.: C 53,89 H 6,61 N 9,67 gef.: C 52,87* H 5,99* N 9,64
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2957 (ν CH); 2793 (ν N-CH ₃); 1730 (ν C=O); 1609 (ν C=C); 1540 (δ NH); 1448 (δ CH ₂); 1225 (ν C-O); 768 und 681 (δ CH) (Base)	
MS (ESI):	$[M+H]^+$ 253,1	
¹ H-NMR (DMSO):	Base 9,83 (s; 1H; OC-NH); 7,38 (d; $J = 12$ Hz; 1H; CH-2'); 7,25-7,32 (m; 1H; CH-5'); 7,22 (d; $J = 8,2$ Hz; 1H; CH-6'); 6,78 (t; $J = 8,2$ Hz; 1H; CH-4'); 4,08 (dd; $J = 4,9$ Hz; $J = 10,9$ Hz; 1H; CH ₂ -O); 3,98 (dd; $J = 5,7$ Hz; $J = 11,0$ Hz; 1H; CH ₂ -O); 2,88-2,97 (m; 1H; CH-2); 2,38-2,45 (m; 1H; C H ₂ -5); 2,32 (s; 3H; N-CH ₃); 2,11-2,19 (m; 1H; CH ₂ -5); 1,84-1,93 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,62-1,72 (m; 2H; CH ₂ -4); 1,52-1,60 (m; 1H; CH ₂ -4)	
¹³ C-NMR (DMSO):	Base $\delta = 162,45$ (d; $J = 239,3$ Hz; C-F); 153,59 (C=O); 141,24 (d; $J = 11,0$ Hz; CH-1'); 130,46 (d; $J = 9,72$ Hz; CH-5'); 114,11 (CH-6'); 108,83 (d; $J = 20,95$ Hz; CH-4'); 104,98 (d; $J = 26,68$ Hz; CH-2'); 66,38 (CH ₂ -O); 63,63 (CH-2); 57,03 (CH ₂ -6); 41,15 (CH ₂ -5); 28,18 (CH ₂ -3); 22,56 (CH ₂ -4)	

6.2.10 (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (61)

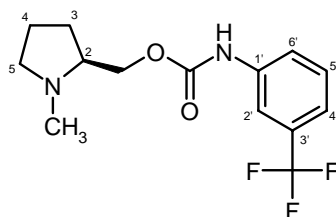


Abbildung 168: (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (61)

Die Synthesen von (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-methyl-pyrrolidin-2-ylmethylester (61) erfolgt analog zu 6.2.8 unter Verwendung von äquimolaren Mengen (S)-(1-Methyl-pyrrolidin-2-yl)-methanol (1,65 mmol; 0,19 ml) und 3-Trifluorphenylisocyanat (1,65 mmol; 0,23 ml).

Ausbeute:	382,0 mg; 1,26 mmol; 76,4 %
Smp.:	Öl
R _f :	0,170 (DCM/MeOH 80:20) (Base)
CHN-Analyse:	C ₁₄ H ₁₇ F ₃ N ₂ O ₂ (302,30) ber.: C 55,63 H 5,67 N 9,27 gef.: C 53,97* H 5,73 N 9,38
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 2957 (ν CH); 2793 (ν N-CH ₃); 1730 (ν C=O); 1609 (ν C=C); 1540 (δ NH); 1448 (δ CH ₂); 1225 (ν C-O); 768 und 681 (δ CH) (Base)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 303,3
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 7,70 (s; 1H; CH-2'); 7,51 (d; <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H; CH-6); 7,39 (t; <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H; CH-5'); 7,29 (d; <i>J</i> = 7,9 Hz; 1H; CH-4'); 6,89 (s; 1H; OC-NH); 4,23 (dd; <i>J</i> = 4,3 Hz; <i>J</i> = 11,2 Hz; 1H; CH ₂ -O); 4,12 (dd; <i>J</i> = 4,7 Hz; <i>J</i> = 11,1 Hz; 1H; CH ₂ -O); 3,06-3,11 (m; 1H; CH-2); 2,43-2,49 (m; 1H; CH ₂ -5); 2,40 (s; 3H; N-CH ₃); 2,20-2,29 (m; 1H; CH ₂ -5); 1,89-1,97 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,72-1,84 (m; 2H; CH ₂ -4); 1,64-1,71 (m; 1H; CH ₂ -3)
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 153,34 (C=O); 138,48 (CH-1'); 131,51 (q; <i>J</i> = 32,4 Hz; C-3'); 129,55 (CH-5'); 123,84 (q; <i>J</i> = 272,5 Hz; CF ₃); 121,50 (C-6'); 119,96 (q; <i>J</i> = 3,8 Hz; CH-4'); 115,25 (CH-2'); 66,34 (CH ₂ -O); 64,15 (CH-2); 57,52 (N-CH ₃); 41,14 (CH ₂ -5); 27,85 (CH ₂ -3); 22,69 (CH ₂ -4)

6.2.11 Phenyl-carbaminsäure-(R)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (62)

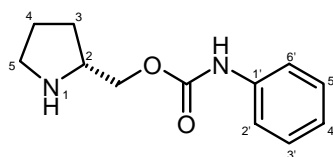


Abbildung 169: Phenyl-carbaminsäure-(R)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (62)

Einführung der Boc-Schutzgruppe:

Eine Lösung von (R)-Pyrrolidin-2-yl-methanol (0,5 ml; 5 mmol) in 50 ml Dioxan/Wasser 1:1 wird bei 0 °C mittels Trimethylamin auf pH 9-10 eingestellt und anschließend mit DiBoc (1,419 mg; 6,5 mmol) versetzt. Das Gemisch wird langsam auf RT erwärmt und 24 h bei gleich bleibender Temperatur gerührt. Nach Ansäuern der wässrigen Lsg. mit 2 M HCl auf pH 4-5 wird mit EtOAc extrahiert. Der Extrakt wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt fällt als weiße Kristalle an.

Ausbeute: 842,7 mg; 4,19 mmol; 80,1%

Äquimolare Mengen an Boc-(R)-Pyrrolidin-2-yl-methanol (1,5 mmol; 315,4 mg) und 3-Phenylisocyanat (1,5 mmol; 0,16 ml) werden unter Rückfluss und Ausschluss von Luftfeuchtigkeit in 10 ml Acetonitril für 2h erhitzt. Nach Erkalten wird das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und das ölige Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt.

Zur Abspaltung des Boc-Restes wird das Produkt in 1-2 ml Dioxan gelöst und die Mischung mit einem 10fachen Überschuss einer Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan (4 M) versetzt. Nach kurzer Zeit fällt das Produkt als Hydrochlorid aus. Um eine vollständige Fällung zu erreichen, werden 10-20 ml Diethylether hinzugefügt und die Suspension für 1 - 2 h weiter gerührt. Nach Abtrennung des Feststoffes wird dieser mit trockenem Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet.

Ausbeute: 354,5 mg; 1,38 mmol; 91,6 %

Smp.: 135,5 °C

R_f: Salz

CHN-Analyse:	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O ₂ Cl (256,73)	ber.: C 56,14 H 6,67 N 10,91 gef.: C 53,41* H 6,89 N 10,49
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3355 (ν NH); 2873(ν CH); 2724 (ν N-CH ₂); 1714 (ν C=O); 1596 (ν C=C); 1531 (δ NH); 1446 (δ CH ₂); 1225 (ν C-O); 770 und 687 (δ CH)	
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 257,1	
¹ H-NMR (DMSO):	Base δ = 9,76 (bs; 1H; OC-NH); 9,34 (bs; 2H; NH ₂); 7,47 (d; J = 7,88 Hz; 2H; CH-2' und CH-6'); 7,28 (dd; J = 7,22 Hz; J = 8,04 Hz; 2H, CH-3' und CH-5'); 7,00 (t; J = 7,25 Hz, 1H, CH-4'); 4,39 (dd; J = 4,41 Hz; J = 11,98 Hz; 1H; CH ₂ -O); 4,25 (dd; J = 7,25 Hz; J = 11,66 Hz; 1H; CH ₂ -O); 3,76-3,83 (m; 1H; CH-2); 3,13-3,25 (m; 2H; CH ₂ -5); 2,03-2,12 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,93-2,02 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,82-1,92 (m; 1H; CH ₂ -4); 1,66-1,75 (m; 1H; CH ₂ -4)	
¹³ C-NMR(DMSO):	Base δ = 153,13 (C=O); 138,97 (C-1'); 128,89 (C-3' und C-5'); 122,76 (C-4'); 118,53 (C-2' und C-6'); 63,33 (CH ₂ -O); 57,67 (CH-2); 45,16 (CH ₂ -5); 26,60 (CH ₂ -3); 23,29 (CH ₂ -4)	

6.2.12 (3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(R)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (63)

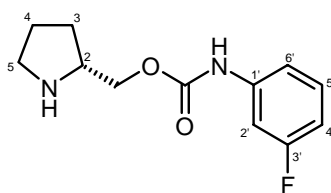


Abbildung 170: (3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(R)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (63)

Die Synthese wird analog zu 6.2.11 durchgeführt. Die Menge eingesetztes 3-Fluorphenylisocyanat beträgt 0,17 ml.

Ausbeute:	417,0 mg; 1,51 mmol; 100,8 %
Smp.:	163,4 °C
R _f :	Salz

CHN-Analyse:	$C_{12}H_{16}FN_2O_2Cl$ (274,72)	ber.: C 52,46 H 5,87 N 10,20 gef.: C 52,00 H 5,80 N 9,91
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3245 (v NH); 2905 (v CH); 2751 (v N-CH ₂); 1737 (v C=O); 1603 (v C=C); 1540 (δ NH); 1448 (δ CH ₂); 1227 (v C-O); 785 und 681 (δ CH)	
MS (ESI):	$[M+H]^+$ 239,1	
¹ H-NMR (DMSO):	Base δ = 10,04 (s; 1H; OC-NH); 9,74 (bs; 1H; NH ₂); 9,08 (bs; 1H; NH ₂); 7,40 (d; J = 11,98 Hz; 1H; CH-2'); 7,31 (dt; J = 6,73 Hz; J = 8,12 Hz; 1H, CH-5'); 7,25 (d; J = 8,20 Hz, 1H, CH-6'); 6,82 (dt; J = 1,79 Hz; J = 8,43 Hz 1H, CH-4'); 4,31 (dd; J = 4,41 Hz; J = 11,98 Hz; 1H; CH ₂ -6); 4,28 (dd; J = 7,25 Hz; J = 11,98 Hz; 1H; CH ₂ -6); 3,76-3,84 (m; 1H; CH-2); 3,13-3,26 (m; 2H; CH ₂ -5); 2,03-2,13 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,93-2,02 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,82-1,92 (m; 1H; CH ₂ -4); 1,65-1,75 (m; 1H; CH ₂ -4)	
¹³ C-NMR (DMSO):	Base δ = 162,43 (d; J = 241,10 Hz; C-F) 153,03 (C=O); 140,92 (d; J = 10,97 Hz; CH-1'); 130,57 (d; J = 9,72 Hz; CH-5'); 114,30 (CH-6'); 109,31 (d; J = 21,19 Hz; CH-4'); 105,18 (d; J = 26,43 Hz; CH-2'); 63,51 (CH ₂ -O); 57,60 (CH-2); 45,15 (CH ₂ -5); 26,58 (CH ₂ -3); 23,28 (CH ₂ -4)	

6.2.13 (3-Trifluoromethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (64)

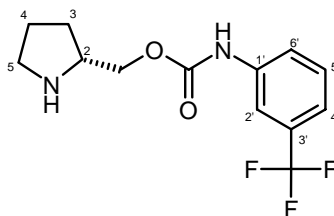


Abbildung 171: (3-Trifluoromethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (64)

Die Synthese wird analog zu 6.2.11 durchgeführt. Die Menge eingesetztes 3-Trifluormethyl-phenylisocyanat beträgt 0,21 ml.

Ausbeute:	226,2 mg; 0,69 mmol; 84,43 %
Smp.:	150,4 °C
R _f :	Salz
CHN-Analyse:	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₂ O ₂ Cl (324,73) ber.: C 48,08 H 4,97 N 8,63 gef.: C 46,62* H 4,92 N 8,34
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3244 (ν NH); 2903 (ν CH); 2760 (ν N-CH ₂); 1737 (ν C=O); 1601 (ν C=C); 1553 (δ NH); 1451 (δ CH ₂); 1225 (ν C-O); 806 und 698 (δ CH)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 289,0
¹ H-NMR (DMSO):	Base δ = 10,19 (s; 1H; OC-NH); 9,71 (bs; 1H; NH ₂); 9,12 (bs; 1H; NH ₂); 7,92 (s; 1H; CH-2'); 7,72 (d, J = 8,20 Hz; 1H; CH-4'); 7,53 (t; J = 8,04 Hz; 1H; CH-5'); 7,35 (d; J = 7,57 Hz; 1H; CH-6'); 4,33 (dd; J = 4,41 Hz; J = 11,98 Hz; 1H; CH ₂ -O); 4,28 (dd; J = 7,25 Hz; J = 11,98 Hz; 1H; CH ₂ -O); 3,78-3,85 (m; 1H; CH-2); 3,13-3,26 (m; 2H; CH ₂ -5); 2,04-2,12 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,93-2,02 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,82-1,92 (m; 1H; CH ₂ -4); 1,66-1,75 (m; 1H; CH ₂ -4)
¹³ C-NMR (DMSO):	Base δ = 153,17 (C=O); 139,95 (CH-1'); 130,17 (CH-5'); 129,69 (q; J = 31,4 Hz; C-3'); 124,24 (q; J = 272,3 Hz; CF ₃); 122,09 (CH-6'); 119,07 (q; J = 3,49 Hz; CH-4'); 114,41 (CH-2'); 63,60

(CH₂-O); 57,61 (CH-2); 45,16 (CH₂-5); 26,58 (CH₂-3); 23,29 (CH₂-4)

6.2.14 Phenyl-carbaminsäure-(S)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (65)

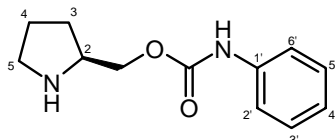


Abbildung 172: Phenyl-carbaminsäure-(S)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (65)

Einführung der Boc-Schutzgruppe:

Eine Lösung von (S)-Pyrrolidin-2-yl-methanol (0,5 ml; 5 mmol) in 50 ml Dioxan/Wasser 1:1 wird bei 0 °C mittels Trimethylamin auf pH 9-10 eingestellt und anschließend mit DiBoc (1,419 mg; 6,5 mmol) versetzt. Das Gemisch wird langsam auf RT erwärmt und 24 h bei gleich bleibender Temperatur gerührt. Nach Ansäuern der wässrigen Lsg. mit 2 M HCl auf pH 4-5 wird mit EtOAc extrahiert. Der Extrakte wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt fällt als weiße Kristalle an.

Ausbeute: 1032,8 mg; 5 mmol; 98,2 %

Äquimolare Mengen an Boc-(S)-Pyrrolidin-2-yl-methanol (1,5 mmol; 315,4 mg) und 3-Phenylisocyanat (1,5 mmol; 0,16 ml) werden unter Rückfluss und Ausschluss von Luftfeuchtigkeit in 10 ml Acetonitril für 2h erhitzt. Nach Erkalten wird das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und das ölige Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt.

Zur Abspaltung des Boc-Restes wird das Produkt in 1-2 ml Dioxan gelöst und die Mischung mit einem 10fachen Überschuss einer Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan (4 M) versetzt. Nach kurzer Zeit fällt das Produkt als Hydrochlorid aus. Um eine vollständige Fällung zu erreichen, werden 10-20 ml Diethylether hinzugefügt und die Suspension für 1 - 2 h weiter gerührt. Nach Abtrennung des Feststoffes wird dieser mit trockenem Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet.

Ausbeute:	354,3 mg; 1,38 mmol; 91,6 %	
Smp.:	136,0 °C	
R _f :	Salz	
CHN-Analyse:	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O ₂ Cl (256,73)	ber.: C 56,14 H 6,67 N 10,91 gef.: C 54,59* H 6,64 N 10,79
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3356 (ν NH); 2871 (ν CH); 2871 (ν N-CH ₂); 1713 (ν C=O); 1596 (ν C=C); 1531 (δ NH); 1446 (δ CH ₂); 1225 (ν C-O); 769 und 687 (δ CH)	
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 221,1	
¹ H-NMR (DMSO):	Base δ = 9,76 (bs; 2H; NH ₂); 9,05 (bs; 1H; OC-NH); 7,47 (d; J = 7,88 Hz; 2H; CH-2' und C-6'); 7,28 (dt; J = 1,68 Hz; J = 6,94 Hz; 2H; CH-3' und CH-5'); 7,00 (t; J = 7,41 Hz; 1H; CH-4'); 4,29 (dd; J = 4,41 Hz; J = 11,98 Hz; 1H; CH ₂ -O); 4,25 (dd; J = 7,25 Hz; J = 11,98 Hz; 1H; CH ₂ -O); 3,75-3,85 (m; 1H; CH-2); 3,13-3,26 (m; 2H; CH ₂ -5); 2,03-2,13 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,93-2,02 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,81-1,92 (m; 1H; CH ₂ -4); 1,66-1,75 (m; 1H; CH ₂ -4)	
¹³ C-NMR (DMSO):	Base δ = 153,14 (C=O); 138,98 (CH-1'); 128,90 (CH-3' und CH-5'); 122,77 (CH-2' und CH-6'); 118,56 (CH-4'); 63,32 (CH ₂ -O); 57,69 (CH-2); 45,16 (CH ₂ -5); 26,61 (CH ₂ -3); 23,30 (CH ₂ -4)	

6.2.15 (3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (66)

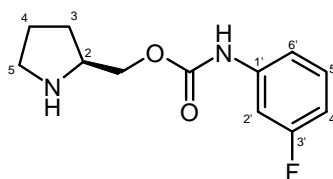


Abbildung 173: (3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (66)

Die Synthese wird analog zu 6.2.14 durchgeführt. Die Menge eingesetztes 3-Fluorphenylisocyanat beträgt 0,17 ml.

Ausbeute: 395,4 mg; 1,43 mmol; 95,6%

Smp.:	155,9 °C
R _f :	Salz
CHN-Analyse:	C ₁₂ H ₁₆ FN ₂ O ₂ Cl (275,73) ber.: C 52,46 H 5,87 N 10,20 gef.: C 51,35* H 5,92 N 10,19
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3419 (ν NH); 2962 (ν CH); 2717 (ν N-CH ₂); 1733 (ν C=O); 1605 (ν C=C); 1544 (δ NH); 1447 (δ CH ₂); 1224 (ν C-O); 774 und 683 (δ CH)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 239,1
¹ H-NMR (DMSO):	Base δ = 10,05 (s; 1H; OC-NH); 9,77 (bs; 1H; NH ₂); 9,09 (bs; 1H; NH ₂); 7,40 (d; <i>J</i> = 11,98 Hz; 1H; CH-2'); 7,31 (dt; <i>J</i> = 6,62 Hz; <i>J</i> = 8,20 Hz; 1H, CH-5'); 7,25 (d; <i>J</i> = 8,20 Hz; 1H, CH-6'); 6,82 (dt; <i>J</i> = 2,57 Hz; <i>J</i> = 8,47 Hz; 1H, CH-4'); 4,32 (dd; <i>J</i> = 4,41 Hz; <i>J</i> = 11,98 Hz; 1H; CH ₂ -O); 4,26 (dd; <i>J</i> = 7,25 Hz; <i>J</i> = 11,98 Hz; 1H; CH ₂ -O); 3,74-3,85 (m; 1H; CH-2); 3,13-3,26 (m; 2H; CH ₂ -5); 2,03-2,13 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,93-2,02 (m; 1H; CH ₂ -3); 1,81-1,91 (m; 1H; CH ₂ -4); 1,66-1,76 (m; 1H; CH ₂ -4)
¹³ C-NMR (DMSO):	Base δ = 162,43 (d; <i>J</i> = 240,85 Hz; C-F) 153,03 (C=O); 140,93 (d; <i>J</i> = 11,22 Hz; CH-1'); 130,57 (d; <i>J</i> = 9,72 Hz; CH-5'); 114,30 (CH-6'); 109,31 (d; <i>J</i> = 21,19 Hz; CH-4'); 105,18 (d; <i>J</i> = 26,18 Hz; CH-2'); 63,51 (CH ₂ -O); 57,59 (CH-2); 45,14 (CH ₂ -5); 26,59 (CH ₂ -3); 23,29 (CH ₂ -4)

6.2.16 (3-Trifluoromethyl-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (67)

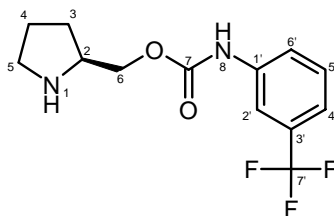


Abbildung 174: (3-Trifluoromethyl-phenyl)-carbamidsäure-(S)-1-pyrrolidin-2-ylmethylester (67)

Die Synthese wird analog zu 6.2.14 durchgeführt. Die Menge eingesetztes 3-Trifluormethyl-phenylisocyanat beträgt 0,21 ml.

Ausbeute: 397,2 mg; 1,21 mmol; 81,3 %

Smp.: 141,4 °C

R_f: Salz

CHN-Analyse: C₁₃H₁₇F₃N₂O₂Cl (325,74) ber.: C 48,08 H 4,97 N 8,63

gef.: C 47,17* H 4,92 N 8,56

IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3239 (ν NH); 2900 (ν CH); 2752 (ν N-CH₂); 1737 (ν C=O); 1601 (ν C=C); 1553 (δ NH); 1451 (δ CH₂); 1224 (ν C-O); 806 und 698 (δ CH)

MS (ESI): [M+H]⁺ 289,0

¹H-NMR (DMSO): Base δ = 9,82 (s; 1H; NH-8); 9,66 (bs; 1H; NH-1); 9,03 (bs; 1H; NH-1); 7,92 (s; 1H; CH-2'); 7,72 (d, *J* = 7,88 Hz; 1H; CH-4'); 7,55 (t; *J* = 8,04 Hz; 1H; CH-5'); 7,35 (d; *J* = 7,88 Hz; 1H; CH-6'); 4,33 (dd; *J* = 4,41 Hz; *J* = 11,98 Hz; 1H; CH₂-6); 4,28 (dd; *J* = 7,25 Hz; *J* = 11,98 Hz; 1H; CH₂-6); 3,78-3,85 (m; 1H; CH-2); 3,14-3,26 (m; 2H; CH-5); 2,04-2,12 (m; 1H; CH-3); 1,94-2,02 (m; 1H; CH-3); 1,83-1,91 (m; 1H; CH-4); 1,66-1,76 (m; 1H; CH-4)

¹³C-NMR (DMSO): Base δ = 153,17 (C-7); 139,94 (C-1'); 130,19 (C-5'); 129,70 (q; *J* = 31,58 Hz; C-3'); 124,24 (q; *J* = 272,18 Hz; C-7'); 122,10 (C-6'); 119,19 (q; *J* = 3,49 Hz; C-4'); 114,14 (C-2'); 63,61 (C-6); 57,67 (C-2); 45,21 (C-5); 26,56 (C-3); 23,28 (C-4)

6.2.17 Phenyl-carbaminsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (68)

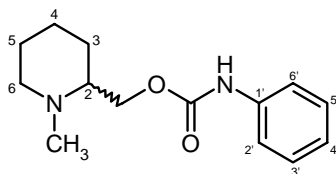


Abbildung 175: (Phenyl-carbaminsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (68))

Äquimolare Mengen an [(R,S)-1-Methyl-piperidin-2yl]-methanol (2,0 mmol; 0,26 ml) und Phenylisocyanat (2,0 mmol; 0,19 ml) werden unter Rückfluss und Ausschluss von Luftfeuchtigkeit in 10 ml Toluol für 2h erhitzt. Nach Erkalten wird die Lsg. mit 3 x 2 ml 2 M HCl gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 2 M NaOH alkalisiert und anschließend mit 3 x 5 ml DCM extrahiert. Nach Trocknung des org. Lösungsmittels über wasserfreiem Na_2SO_4 wird dieses einrotiert. Nach erfolgter säulenchromatographischer Aufreinigung kristallisiert das anfangs ölige Produkt nach einigen Tagen.

Um die Kristallisation des Produktes, kann es in das Hydrochlorid-Salz überführt werden. Hierzu löst man den Phenyl-carbaminsäure-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (68) (173,8 mg; 0,70 mmol) in 1-2 ml Dioxan und versetzt die Mischung mit einem 5fachen Überschuss einer 4 M Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan. Nach kurzer Zeit fällt das Produkt als HCl-Salz aus. Um eine vollständige Fällung zu erreichen, werden 10 ml Diethylether hinzugefügt und die Suspension für 1 - 2 h weiter gerührt. Nach Abtrennung des Feststoffes wird dieser mit trockenem Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet.

Ausbeute:	484,3 mg; 1,96 mmol; 96,8 %	
Ausbeute:	171,9 mg; 0,60 mmol; 85,7 % (Hydrochlorid)	
Smp.:	77,8 °C (HCl)	
R _f :	0,397 (DCM/MeOH 80:20)	
CHN-Analyse:	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ (248,33)	ber.: C 67,72 H 8,12 N 11,28 gef.: C 63,34* H 8,33 N 10,48*
	$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}$ (284,79)	ber.: C 59,05 H 7,43 N 9,84 gef.: C 57,01* H 7,33 N 9,51

- IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2939 (ν CH); 2805 (ν N-CH₃); 1711 (ν C=O); 1601 (ν C=C); 1556 (δ NH); 1444 (δ CH₂); 1242 (ν C-O); 754 und 691 (δ CH) (Base)
- MS (ESI): [M+H]⁺ 249,1
- ¹H-NMR (DMSO): Base δ = 9,58 (s; 1H; OC-NH); 7,46 (d; *J* = 7,5 Hz; 2H; CH-2' und CH-6'); 7,25 (t; *J* = 7,6 Hz; 2H; CH-3' und CH-5'); 6,97 (t; *J* = 7,4 Hz; 1H; CH-4'); 4,14 (dd; *J* = 4,1 Hz; *J* = 11,4 Hz; 1H; CH₂-O); 4,07 (dd; *J* = 4,7 Hz; *J* = 11,4 Hz; 1H; CH₂-O); 2,71-2,78 (m; 1H; CH₂-6); 2,22 (s; 3H; N-CH₃); 2,03-2,09 (m; 1H; CH₂-6); 2,00 (dt; *J* = 3,1; *J* = 11,6; 1H; CH-2); 1,61-1,71 (m; 2H; CH₂-3); 1,49-1,55 (m; 1H; CH₂-5); 1,40-1,48 (m; 1H; CH₂-5); 1,29-1,39 (m; 1H; CH₂-4); 1,16-1,26 (m; 1H; CH₂-4)
- ¹³C-NMR (DMSO): Base δ = 153,69 (C=O); 139,32 (CH-1'); 128,81 (CH-3' und CH-5'); 122,44 (CH-2' und CH-6'); 118,33 (CH-4'); 65,83 (CH₂-O); 62,37 (CH-2); 56,51 (CH₂-6); 43,26 (N-CH₃); 28,74 (CH₂-3); 25,35 (CH₂-4); 23,66 (CH₂-5)

6.2.18 (3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (69)

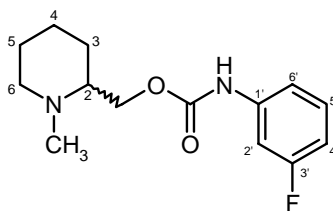


Abbildung 176: (3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (69)

Die Synthesen von (3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (69) erfolgt analog zu 6.2.17 unter Verwendung von äquimolaren Mengen [(R,S)-1-Methyl-piperidin-2-yl]-methanol (1,9 mmol; 0,25 ml) und 3-Fluorphenyl-isocyanat (1,9 mmol; 0,22 ml).

Die Überföhren des Produktes in das Hydrochlorid-Salz erfolgt ebenfalls wie unter 6.2.17 beschrieben (231,6 mg; 0,87 mmol).

Ausbeute:	499,4 mg; 1,88 mmol; 98,9 %	
Ausbeute:	246,7 mg; 0,81 mmol; 93,7 % (Hydrochlorid)	
Smp.:	171,6 °C (HCl)	
R _f :	Salz	
CHN-Analyse:	C ₁₄ H ₁₉ FN ₂ O ₂ (266,32)	ber.: C 63,14 H 7,19 N 10,52 gef.: C 60,46* H 7,51 N 10,62
	C ₁₄ H ₂₀ FN ₂ O ₂ Cl (302,78)	ber.: C 55,54 H 6,66 N 9,25 gef.: C 55,74 H 6,71 N 9,15
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 2950 (ν CH); 2803 (ν N-CH ₃); 1711 (ν C=O); 1614 (ν C=C); 1558 (δ NH); 1447 (δ CH ₂); 1243 (ν C-O); 771 und 681 (δ CH) (Base)	
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 267,1	
¹ H-NMR (DMSO):	Base δ = 9,86 (s; 1H; OC-NH); 7,39 (dt; <i>J</i> = 2,1 Hz; <i>J</i> = 11,8 Hz; 1H; CH-2'); 7,28 (dt; <i>J</i> = 2,1 Hz; <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H; CH-5'); 7,22 (dd; <i>J</i> = 2,1; <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H; CH-6'); 6,79 (dt; <i>J</i> = 6,8 Hz; <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H; CH-4'); 4,15 (dd; <i>J</i> = 4,1 Hz; <i>J</i> = 11,4 Hz; 1H; CH ₂ -O); 4,09 (dd; <i>J</i> = 4,9 Hz; <i>J</i> = 11,4 Hz; 1H; CH ₂ -O); 2,71-2,78 (m; 1H; CH ₂ -6); 2,22 (s; 3H; N-CH ₃); 2,03-2,09 (m; 1H; CH ₂ -6); 1,99 (dt; <i>J</i> = 3,2 Hz; <i>J</i> = 11,6 Hz; 1H; CH-2); 1,61-1,71 (m; 2H; CH ₂ -3); 1,48-1,55 (m; 1H; CH ₂ -5); 1,39-1,47 (m; 1H; CH ₂ -5); 1,29-1,38 (m; 1H; CH ₂ -4); 1,15-1,26 (m; 1H; CH ₂ -4)	
¹³ C-NMR (DMSO):	Base δ = 162,46 (d; <i>J</i> = 240,9 Hz; C-F); 153,59 (C=O); 141,23 (d; <i>J</i> = 11,22 Hz; CH-1'); 130,46 (d; <i>J</i> = 9,47 Hz; CH-5'); 114,11 (CH-6'); 108,84 (d; <i>J</i> = 20,94 Hz; CH-4'); 104,98 (d; <i>J</i> = 26,43 Hz; CH-2'); 66,04 (CH ₂ -O); 62,29 (CH-2); 56,49 (CH ₂ -6); 43,22 (N-CH ₃); 28,71 (CH ₂ -3); 25,34 (CH ₂ -4); 23,67 (CH ₂ -5)	

6.2.19 (3-Trifluoromethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (70)

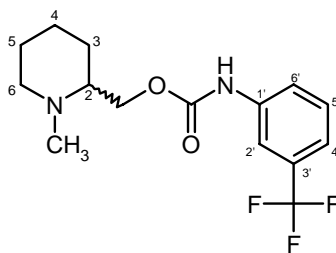


Abbildung 177: (3-Trifluoromethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (70)

Die Synthesen von (3-Trifluoromethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (70) erfolgt analog zu 6.2.17 unter Verwendung von äquimolaren Mengen [(R,S)-1-Methyl-piperidin-2yl]-methanol (1,6 mmol; 0,20 ml) und 3-Trifluormethyl-phenylisocyanat (1,6 mmol; 0,22 ml).

Die Überführen des Produktes in das Hydrochlorid-Salz erfolgt ebenfalls wie unter 6.2.17 beschrieben (156,12 mg; 0,49 mmol).

Ausbeute:	387,3 mg; 1,22 mmol; 77,5 %
Ausbeute:	169,2 mg; 0,48 mmol; 97,9 % (Hydrochlorid)
Smp.:	145,3 °C (HCl)
R _f :	0,416 (DCM/MeOH 80:20) (Base)
CHN-Analyse:	C ₁₅ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₂ (316,33) ber.: C 56,96 H 6,05 N 8,86 gef.: C 50,43* H 6,78* N 8,37
	C ₁₅ H ₂₀ F ₃ N ₂ O ₂ Cl (352,78) ber.: C 51,07 H 5,71 N 7,94 gef.: C 50,60 H 5,79 N 8,01
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 2939 (ν CH); 2796 (ν N-CH ₃); 1713 (ν C=O); 1604 (ν C=C); 1557 (δ NH); 1450 (δ CH ₂); 1222 (ν C-O); 795 und 698 (δ CH) (Base)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 317,0
¹ H-NMR (DMSO):	Base δ = 10,00 (s; 1H; OC-NH); 7,92 (s; 1H; CH-2'); 7,68 (d; J = 7,9 Hz; 1H; CH-4'); 7,50 (t; J = 7,9 Hz; 1H; CH-5'); 7,31 (d; J = 7,9 Hz; 1H; CH-6'); 4,17 (dd; J = 4,1 Hz; J = 11,4 Hz; 1H; CH ₂ -O); 4,12 (dd; J = 4,7 Hz; J = 11,4 Hz; 1H; CH ₂ -O); 2,71-

2,78 (m; 1H; CH₂-6); 2,21 (s; 3H; N-CH₃); 2,04-2,10 (m; 1H; CH₂-6); 2,00 (dt; $J = 3,1$ Hz; $J = 11,6$ Hz; 1H; CH-2); 1,61-1,71 (m; 2H; CH₂-3); 1,48-1,55 (m; 1H; CH₂-5); 1,40-1,47 (m; 1H; CH₂-5); 1,30-1,39 (m; 1H; CH₂-4); 1,16-1,27 (m; 1H; CH₂-4)

¹³C-NMR (DMSO): Base $\delta = 153,70$ (C=O); 140,21 (CH-1'); 130,07 (CH-5'); 129,67 (q; $J = 31,6$ Hz; CH-3'); 124,27 (q; $J = 272,3$ Hz; CF₃); 121,89 (CH-6'); 118,77 (q; $J = 3,9$ Hz; CH-4'); 114,24 (CH-2'); 66,16 (CH₂-O); 62,27 (CH-2); 56,49 (CH₂-6); 43,23 (N-CH₃); 28,71 (CH₂-3); 25,34 (CH₂-4); 23,67 (CH₂-5)

6.2.20 Phenyl-carbaminsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylester (71)

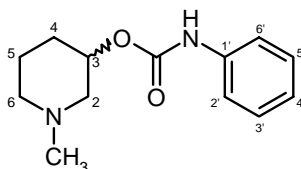


Abbildung 178: Phenyl-carbaminsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylester (71)

Äquimolare Mengen an 3-Hydroxy-(R,S)-1-methylpiperidin (2,1 mmol; 0,25 ml) und 3-Trifluormethyl-phenylisocyanat (1,6 mmol; 0,23 ml) werden unter Rückfluss und Ausschluss von Luftfeuchtigkeit in 10 ml Toluol für 2h erhitzt. Nach Erkalten wird die Lsg. mit 3 x 2 ml 2 M HCl gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 2 M NaOH alkalisiert und anschließend mit 3 x 5 ml DCM extrahiert. Nach Trocknung des org. Lösungsmittels über wasserfreiem Na₂SO₄ wird dieses einrotiert. Nach erfolgter säulenchromatographischer Aufreinigung kristallisiert das anfangs ölige Produkt nach einigen Tagen.

Um die Kristallisation des Produktes, kann es in das Hydrochlorid-Salz überführt werden. Hierzu löst man den (3-Fluor-phenyl)-carbaminsäure-1-methyl-piperidin-2-ylmethylester (71) (406,6 mg; 1,74 mmol) in 1-2 ml Dioxan und versetzt die Mischung mit einem 5fachen Überschuss einer 4 M Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan. Nach kurzer Zeit fällt das Produkt als HCl-Salz aus. Um eine vollständige Fällung zu erreichen, werden 10 ml Diethylether hinzugefügt und die Suspension für 1 - 2 h weiter gerührt. Nach Abtrennung des Feststoffes wird dieser mit trockenem Diethylether

gewaschen und anschließend getrocknet. Das gewonnene Salz ist ebenfalls hygroskopisch.

Ausbeute:	413,3 mg; 1,76 mmol; 84,0 %
Ausbeute:	468,3 mg; 1,72 mmol; 99,1 % (Hydrochlorid)
Smp.:	Öl
R _f :	0,493 (DCM/MeOH 80:20) (Base)
CHN-Analyse:	C ₁₃ H ₁₉ N ₂ O ₂ Cl (270,76) ber.: C 57,67 H 7,07 N 10,35 gef.: C 52,43* H 7,49 N 9,68*
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 2943 (ν CH); 2790 (ν N-CH ₃); 1730 (ν C=O), 1601 (ν C=C), 1546 (δ NH), 1444 (δ CH ₂); 1224 (ν C-O), 754 und 692 (δ CH) (Base)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 235,1
¹ H-NMR (DMSO):	HCl δ = 9,74 (s; 1H, OC-NH), 7,46 (d; J= 7,88 Hz; 2H; CH-2' und CH-6'); 7,28 (t; J= 8,2 Hz; 2H; CH-3' und CH-5'); 7,00 (t; J= 7,41 Hz; 1H; CH-4'); 4,93-5,04 (m; 1H; CH-3); 3,44-3,69 (m; 1H; CH ₂ -2); 2,81-3,06 (m; 2H; CH ₂ -2 und CH ₂ -4); 2,75 (s; 3H; N-CH ₃); 2,03-2,17 (m; 1H; CH ₂ -4); 1,82-2,03 (m; 3H; CH ₂ -6 und CH ₂ -5); 1,42-1,60 (m; 1H; CH ₂ -5)
¹³ C-NMR (DMSO):	HCl δ = 152,35 (C=O); 138,89 (CH-1'); 129,04 (CH-3' und CH-5'); 123,29 (CH-2' und CH-6'); 118,44 (CH-4'); 66,28 (CH-3); 54,64 (CH ₂ -2); 52,57 (CH ₂ -6); 42,70 (N-CH ₃); 27,52 (CH ₂ -4); 19,94 (CH ₂ -5)

6.2.21 (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylester (72)

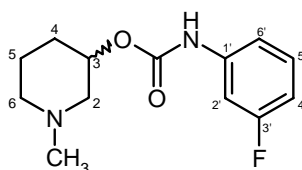


Abbildung 179: (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylester (72)

Die Synthesen von (3-Fluoro-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylmethylester (**72**) erfolgt analog zu 6.2.20 unter Verwendung von äquimolaren Mengen 3-Hydroxy-(R,S)-1-methylpiperidin (2,0 mmol; 0,24 ml) und 3-Fluorphenylisocyanat (2,0 mmol; 0,28 ml).

Die Überführen des Produktes in das Hydrochlorid-Salz erfolgt ebenfalls wie unter 6.2.20 beschrieben (329,5 mg; 1,31 mmol).

Ausbeute:	384,9 mg; 1,53 mmol; 76,3 %
Ausbeute:	337,3 mg; 1,16 mmol; 87,8 % (Hydrochlorid)
Smp.:	182,1 °C (HCl)
R _f :	0,486 (DCM/MeOH 80:20) (Base)
CHN-Analyse:	C ₁₃ H ₁₈ FN ₂ O ₂ Cl (288,75) ber.: C 54,08 H 6,28 N 9,70 gef.: C 53,00* H 6,28 N 9,52
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3354 (ν N-H); 2961 ((ν N-H)); 2790 (ν N-CH ₃); 1726 (ν C=O), 1605 (ν C=C), 1549 (δ NH), 1448 (δ CH ₂); 1220(ν C-O), 783 und 687 (δ CH) (HCl)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 253,1
¹ H-NMR (CDCl ₃):	HCl δ = 10,03 (s; 1H, OC-NH); 7,38 (d; J = 11,66 Hz; 1H; CH-2'); 7,31 (dt; J = 6,94 Hz; J = 7,96 Hz; 1H; CH-4'); 7,23 (dd; J = 0,47 Hz; J = 8,67 Hz; 1H; CH-6'); 6,78-6,85 (m; 1H; CH-5'); 4,94-5,05 (m; 1H; CH-3); 3,46-3,64 (m; 1H; CH ₂ -2); 2,82-3,03 (m; 2H; CH ₂ -2 und CH ₂ -4); 2,49 (s; 3H; N-CH ₃); 2,04-2,25 (m; 1H; CH ₂ -4); 1,64-2,03 (m; 3H; CH ₂ -6 und CH ₂ -5); 1,41-1,56 (m; 1H; CH ₂ -5)
¹³ C-NMR (DMSO):	HCl δ = 162,43 (d; J = 240,6 Hz; C-F); 152,39 (C=O); 140,82 (d; J = 11,22 Hz; CH-1'); 130,58 (d; J = 9,47 Hz; CH-5'); 114,26

(CH-6'); 109,22 (d; $J = 21,94$ Hz; CH-4'); 105,14 (d; 22,44 Hz; CH-2'); 66,58 (CH-3); 54,41 (CH₂-2); 52,49 (CH₂-6); 42,65 (N-CH₃); 27,43 (CH₂-4); 19,95 (CH₂-5)

6.2.22 (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbaminsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylester (73)

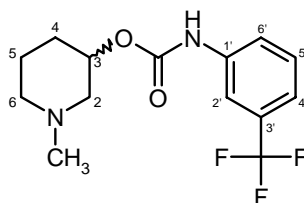


Abbildung 180: (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbaminsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylester (73)

Die Synthesen von (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbaminsäure-(R,S)-1-methyl-piperidin-3-ylester (73) erfolgt analog zu 6.2.20 unter Verwendung von äquimolaren Mengen 3-Hydroxy-(R,S)-1-methylpiperidin (1,65 mmol; 0,20 ml) und 3-Trifluormethyl-phenylisocyanat (1,65 mmol; 0,23 ml).

Die Überföhrungen des Produktes in das Hydrochlorid-Salz erfolgt ebenfalls wie unter 6.2.20 beschrieben (191,0 mg; 0,63 mmol).

Ausbeute:	421,5 mg; 1,4 mmol; 84,5 %
Ausbeute	188,7 mg; 0,55 mmol; 86,2% (Hydrochlorid)
Smp.:	169,1 °C (HCl)
R _f :	0,514 (DCM/MeOH 80:20) (Base)
CHN-Analyse:	C ₁₄ H ₁₈ F ₃ N ₂ O ₂ Cl (338,76) ber.: C 49,64 H 5,36 N 8,27 gef.: C 49,19 H 5,22 N 8,12
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 2949(v CH); 2796 (v N-CH ₃); 1725 (v C=O); 1601 (v C=C); 1551 (δ NH); 1445 (δ CH ₂); 1229 (v C-O); 749 und 698 (δ CH) (Base)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 303,0
¹ H-NMR (CHCl ₃):	Base $\delta = 7,71$ (s; 1H; CH-2'); 7,47 (d; $J = 8,2$ Hz; 1H; CH-4'); 7,37 (t; $J = 7, 9$ Hz; 1H; CH-5'); 7,27 (d; $J = 7,6$ Hz; 1H; CH-6'); 6,97 (s; 1H; OC-NH); 4,92-4,97 (m; 1H; CH-3); 2,43-2,64 (m;

3H; CH₂-2 und CH₂-4); 2,26 (s; 3H; N-CH₃); 2,19-2,25 (m; 1H; CH₂-4); 1,89 (m; 1H; CH₂-6); 1,78-1,88 (m; 1H; CH₂-6); 1,66-1,75 (m; 2H; CH₂-6 und C-5); 1,55-1,64 (m; 1H; CH₂-5)

¹³C-NMR (DMSO): Base δ = 152,76 (C=O); 138,60 (CH-1'); 131,49 (q; J = 32,4 Hz; CH-3'); 129,51 (CH-5'); 123,86 (q; J = 272,5 Hz; CF₃); 121,38 (CH-6'); 119,83 (q; J = 3,82 Hz; CH-4'); 115,11 (CH-2'); 70,26 (CH₂-3); 59,13 (CH₂-2); 55,39 (CH₂-6); 46,45 (N-CH₃); 28,32 (CH₂-4); 21,88 (CH₂-5)

6.2.23 Phenyl-carbaminsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (74)

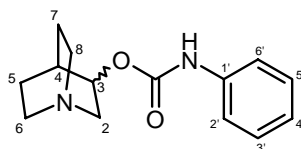


Abbildung 181: Phenyl-carbaminsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (74)

Äquimolare Mengen an (R,S)-1-Aza-bicyclo[2.2.2]octan-3-ol (2,03 mmol; 258 mg) und Phenylisocyanat (2,03 mmol; 0,19 ml) werden unter Rückfluss und Ausschluss von Luftfeuchtigkeit in 10 ml Toluol für 2h erhitzt. Nach Erkalten wird die Lsg. mit 3 x 2 ml 2 M HCl gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 2 M NaOH alkalisiert und anschließend mit 3 x 5 ml DCM extrahiert. Nach Trocknung des org. Lösungsmittels über wasserfreiem Na₂SO₄ wird dieses einrotiert. Nach erfolgter säulenchromatographischer Aufreinigung kristallisiert das anfangs ölige Produkt nach einigen Tagen³¹⁴.

Ausbeute: 228,3 mg; 0,93 mmol; 45,6 %

Smp.: 115,9 °C

R_f: 0,06 (DCM/MeOH 80:20)

CHN-Analyse: C₁₄H₁₈N₂O₂ (246,31) ber.: C 68,27 H 7,37 N 11,37

gef.: C 68,41 H 7,13 N 10,89

IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2947(ν CH); 2870 (ν N-CH₂); 1725 (ν C=O); 1600 (ν C=C); 1548 (δ NH); 1444 (δ CH₂); 1228 (ν C-O); 756 und 692 (δ CH)

MS (ESI):	$[M+H]^+$ 247,1
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):	$\delta = 7,37$ (d; $J = 7,6$ Hz; 2H; CH-2' und CH-6'); 7,28 (t; $J = 7,9$ Hz; 2H; CH-3' und CH-5'); 7,04 (t; $J = 7,4$ Hz; 1H; CH-4'); 6,87 (s; 1H; OC-NH); 4,80-4,85 (m; 1H; CH-3); 3,27 (ddd; $J = 2,2$ Hz; $J = 6,3$ Hz; $J = 14,5$ Hz; 1H; CH ₂ -2); 2,70-2,99 (m; 5H; CH ₂ -2, CH ₂ -6 und CH ₂ -8); 2,08-2,12 (m; 1H; CH-4); 1,82-1,93 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,67-1,75 (m; 1H; ; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,54-1,62 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,38-1,47 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7)
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):	$\delta = 153,22$ (C=O); 137,86 (CH-1'); 129,05 (CH-3' und CH-5'); 123,44 (CH-2' und CH-6'); 118,64 (CH-4'); 71,78 (CH-3); 55,28 (CH ₂ -2); 47,27 (CH ₂ -8); 46,38 (CH ₂ -6); 25,32 (CH-4); 24,29 (CH ₂ -7); 19,35 (CH ₂ -5)

6.2.24 (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (75)

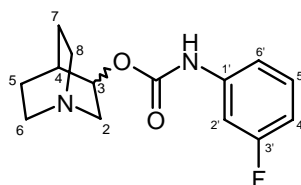


Abbildung 182: (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (75)

Die Synthesen von (3-Fluor-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (75) erfolgt analog zu 6.2.23 unter Verwendung von äquimolaren Mengen (R,S)-1-Aza-bicyclo[2.2.2]octan-3-ol (1,89 mmol; 241 mg) und 3-Fluor-phenylisocyanat (1,89 mmol; 0,22 ml).

Ausbeute:	437,3 mg; 1,65 mmol; 87,5 % und 350,3 mg; 1,33 mmol; 70,1 %
Smp.:	127,3 °C
R _f :	0,091 (DCM/MeOH 80:20)
CHN-Analyse:	C ₁₄ H ₁₇ FN ₂ O ₂ (264,30) ber.: C 63,62 H 6,48 N 10,60 gef.: C 60,01* H 5,94 N 10,11

IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 2949 (ν CH); 2869 (ν N-CH ₂); 1726 (ν C=O); 1605 (ν C=C); 1568 (δ NH); 1446 (δ CH ₂); 1222 (ν C-O); 770 und 676 (δ CH)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 265,1
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 7,29 (d; <i>J</i> = 10,7 Hz; 1H; CH-2'); 7,21 (dt; <i>J</i> = 6,3 Hz; <i>J</i> = 8,2 Hz; 1H; CH-5'); 7,07 (s; 1H; OC-NH); 7,01 (d; <i>J</i> = 7,9 Hz; 1H; CH-6'); 6,72 (dt; <i>J</i> = 2,4 Hz; <i>J</i> = 8,3 Hz; 1H; CH-4'); 4,79-4,85 (m; 1H; CH-3); 3,26 (ddd; <i>J</i> = 2,1 Hz; <i>J</i> = 8,5 Hz; <i>J</i> = 14,6 Hz; 1H; CH ₂ -2); 2,69-2,95 (m; 5H; CH ₂ -2; CH ₂ -6 und CH ₂ -8); 2,06-2,11 (m; 1H; CH-4); 1,79-1,87 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,66-1,74 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,53-1,62 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,37-1,46 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7)
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 163,16 (d; <i>J</i> = 244,6 Hz; C-F); 153,03 (C=O); 139,62 (d; <i>J</i> = 11,0 Hz; CH-1'); 130,10 (d; <i>J</i> = 9,47 Hz; CH-5'); 113,83 (CH-6'); 110,01 (d; <i>J</i> = 21,44 Hz; CH-4'); 106,01 (d; <i>J</i> = 28,67 Hz; CH-2'); 72,29 (CH-3); 55,29 (CH ₂ -2); 47,29 (CH ₂ -8); 46,45 (CH ₂ -6); 25,36 (CH-4); 24,43 (CH ₂ -7); 19,41 (CH ₂ -5)

6.2.25 (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (76)

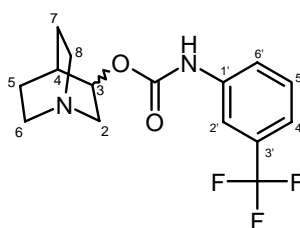


Abbildung 183: (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (76)

Die Synthesen von (3-Trifluormethyl-phenyl)-carbamidsäure-(R,S)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-ylester (76) erfolgt analog zu 6.2.23 unter Verwendung von äquimolaren Mengen (R,S)-1-Aza-bicyclo[2.2.2]octan-3-ol (1,59 mmol; 202 mg) und 3-Trifluormethyl-phenylisothiocyanat (1,59 mmol; 0,22 ml).

Ausbeute: 398,7 mg; 1,27 mmol; 79,7 %

Smp.:	147,8 °C
R _f :	0,104 (DCM/MeOH 80:20)
CHN-Analyse:	C ₁₅ H ₁₇ F ₃ N ₂ O ₂ (314,31) ber.: C 57,32 H 5,45 N 8,91 gef.: C 56,12* H 5,34 N 8,75
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 2953 (ν CH); 2873 (ν N-CH ₂); 1721 (ν C=O); 1607 (ν C=C); 1570 (δ NH); 1451 (δ CH ₂); 1218 (ν C-O); 793 und 697 (δ CH)
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 315,0
¹ H-NMR (CDCl ₃):	Base δ = 7,70 (s; 1H; CH-2'); 7,54 (d; J = 7,3 Hz; 1H; CH-4'); 7,39 (t; J = 7,9 Hz; 1H; CH-5'); 7,28 (d; J = 7,9 Hz; 1H; CH-6'); 7,09 (s; 1H; OC-NH); 4,79-4,86 (m; 1H; CH-3); 3,26 (ddd; J = 2,1 Hz; J = 8,4 Hz; J = 14,5 Hz; 1H; CH ₂ -2); 2,70-2,90 (m; 5H; CH ₂ -2; CH ₂ -6 und CH ₂ -8); 2,07-2,12 (m; 1H; CH ₂ -4); 1,79-1,87 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,66-1,74 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,53-1,62 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,38-1,46 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7)
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	Base δ = 153,11 (C=O); 138,57 (CH-1'); 131,48 (q; J = 32,3 Hz; C-3'); 129,57 (CH-5'); 123,85 (q; J = 272,4 Hz; CF ₃); 121,53 (CH-6'); 119,91 (q; J = 3,57 Hz; CH-4'); 115,34 (CH-2'); 72,56 (CH-3); 55,33 (CH ₂ -2); 47,31 (CH ₂ -8); 46,47 (CH ₂ -6); 25,36 (CH-4); 24,47 (CH ₂ -7); 19,43 (CH ₂ -5)

6.2.26 3-Hydroxy-1-methyl-1-aza-bicyclo[2.2.2]octan-iodid (77)

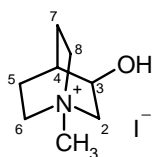


Abbildung 184: 3-Hydroxy-1-methyl-1-aza-bicyclo[2.2.2]octan-iodid (77)

Zur Herstellung von Methylchinuclidinol wird unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit zu einer Lsg. von Chinuclidinol (1,9 mmol; 241,6 mg) in 10 ml Aceton ein 30%iger Überschuss von Methyljodid (2,47 mmol; 0,15 ml) gegeben. Nach 12h Reaktionszeit wird das entstandene Produkt abgetrennt, mit Aceton gewaschen und getrocknet.

Ausbeute:	264,7 mg; 0,98 mmol; 51,8 %	
Smp.:	329,3 °C	
R _f :	Salz	
CHN-Analyse:	C ₈ H ₁₆ NOI (269,12)	ber.: C 35,70 H 5,99 N 5,20 gef.: C 35,67 H 6,01 N 5,35
IR: (KBr)	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3294 (ν OH); 2940(ν CH); 1463 (δ N-CH); 1119 (δ CH ₂); 1014 (ν C-O)	
MS (ESI):	[M+H] ⁺ 141,9	
¹ H-NMR (DMSO):	δ = 5,49 (d; J = 2,1 Hz; 1H; OH); 4,02-4,07 (m; 1H; CH ₂ -2); 3,61-3,67 (m; 1H; CH ₂ -2); 3,31-3,38 (m; 3H; CH ₂ -6 und CH ₂ -8); 3,18-3,26 (m; 1H; CH ₂ -6 oder CH ₂ -8); 3,06 (m; J = 3,0 Hz; J = 12,82 Hz; 1H; CH-3); 2,92 (s; 3H; n-CH ₃); 2,08-2,15 (m; 1H; CH-4); 1,99-2,03 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,87-1,94 (m; 1H; CH ₂ -5 oder CH ₂ -7); 1,67-1,81 (m; 2H; CH-5 oder CH ₂ -7)	
¹³ C-NMR (DMSO):	δ = 64,86 (CH-3); 63,51 (CH ₂ -2); 56,11 (CH-8); 55,13 (CH ₂ -6); 51,12 (N-CH ₃); 25,36 (CH-4); 21,21 (CH ₂ -7); 17,50 (CH ₂ -5)	

6.2.27 (2-Benzhydryloxy-ethyl)-trimethyl-ammoniumiodid (N-Methyl-Diphenhydramin) (47)

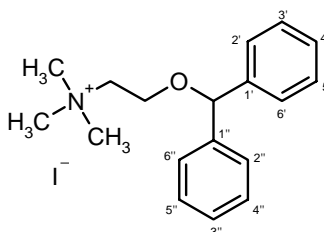


Abbildung 185: (2-Benzhydryloxy-ethyl)-trimethyl-ammoniumiodid (N-Methyl-Diphenhydramin) (47)

Diphenhydramin-HCl **45** (136600, Synopharm GmbH & Co KG, Barsbüttel, Deutschland) (0,98 mmol; 250,7 mg) werden in Wasser gelöst und die Lsg. mit NaOH alkalisiert. Es wird mehrfach mit Dichlormethan ausgeschüttelt und das Extraktionsmittel anschließend mittels wasserfreien Natriumsulfats getrocknet. Die freie Base fällt nach Abrotieren des Dichlormethans als gelblich-weißes Öl an.

Ausbeute: 210,1 mg; 0,82 mmol; 83,7 %

Diphenhydramin **45** (0,78 mmol; 200,0 mg) wird mit einem 30%igen Überschuss von Methyljodid (1 mmol; 0,06ml) in 5 ml Aceton umgesetzt.

Ausbeute: 248,1 mg; 0,63 mmol; 80,1 %

Smp.: 191,8 °C

R_f: 0,471 (DCM/MeOH 80:20)

CHN-Analyse: C₁₈H₂₄NOI (397,30) ber.: C 54,42 H 6,09 N 3,53
gef.: C 54,01 H 6,09 N 3,50

IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3010 (ν CH) ; 2885 (ν N-CH₃); 1600 (ν C=C); 1480 (δ CH₂); 1310 (ν C-O); 806 und 698 (δ CH)

MS (ESI): [M+H]⁺ 270,1

¹H-NMR (DMSO): δ = 7,32-7,40 (m; 8H; CH-2', CH-3', CH-5', CH-6' und CH-2'', CH-3'', CH-5'', CH-6''); 7,24-7,29 (m; 2H; CH-4', CH-4''); 5,60 (s; 1H; O-CH-(Ph)₂); 3,76-3,81 (m; CH₂-O); 3,60-3,65 (m; 2H; N-CH₂); 3,12 (s; 9H; N-CH₃)

¹³C-NMR (DMSO): δ = 141,77 (C-1' und C-1''); 128,62 (C-3', C-3'', C-5' und C-5''); 127,68 (C-4' und C-4''); 126,67 (C-2', C-2'', C-6' und C-6'');

82,88 (CH₂-O); 64,94 (O-CH-(Ph)₂); 62,41 (N-CH₂); 53,38 (N-CH₃)

6.2.28 (RS)-3,4,5,6-Tetrahydro-5,5-dimethyl-1-phenyl-1*H*-2,5-benzoxazocin-5-iumiodid (N-Methyl-nefopam) (48)

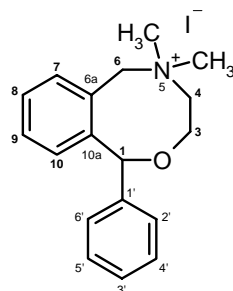


Abbildung 186: (RS)-3,4,5,6-Tetrahydro-5,5-dimethyl-1-phenyl-1*H*-2,5-benzoxazocin-5-iumiodid (N-Methyl-nefopam) (48)

Nefopam-HCl (46) (Schenkung von Krewel Meuselbach GmbH, Eitorf, Deutschland) (1,81 mmol; 500 mg) wird in Wasser gelöst und die Lsg. anschließend wird mit NaOH alkalisiert. Die wässrige Phase wird mehrfach mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Trennung der Phasen erfolgt eine Trocknung des DCM mittels wasserfreien Natriumsulfats. Durch Einrotieren des org. Lösungsmittels erhält man die freie ölige Base.

Ausbeute: 375,9 mg; 1,48 mmol; 81,9 %

Nefopam-Base (46) (1 mmol; 250 mg) wird mit einem Überschuss von 30 % Methyljodid (1,3 mmol; 0,08 ml) in 10ml Aceton über Nacht umgesetzt.

Ausbeute: 211,6 mg; 0,54 mmol; 54,2 %

Smp.: 242,1 °C

R_f: 0,500 (DCM/MeOH 80:20)

CHN-Analyse: C₁₇H₂₀NOI (395,28) ber.: C 54,69 H 5,61 N 3,54

gef.: C 54,18* H 5,68 N 3,50

IR: (KBr) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3440 ; 3005 (ν CH); 2885 (ν N-CH₃); 1600 (ν C=C); 1451 (δ CH₂); 1225 (ν C-O), 780 und 710 (δ CH)

MS (ESI): [M+H]⁺ 268,1

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO): $\delta = 7,41-7,48$ (m; 2H; CH-7 und CH-9); 7,35-7,40 (m; 1H; CH-10); 7,29-7,34 (m; 2H; CH-3' und CH-5'); 7,23-7,29 (m; 3H; CH-4', CH-3' und CH-5'); 7,19 (d, $J = 7,57$ Hz; 1H; CH-8); 5,93 (s; 1H; CH-1); 5,73 (d; $J = 12,61$ Hz; 1H; CH₂-6); 4,44-4,52 (m; 1H; CH₂-4); 4,42 (d; $J = 12,61$ Hz; 1H; CH₂-6); 4,06 (d; $J = 14,19$ Hz; 1H; CH₂-4); 3,37 (s; 3H; N-CH₃); 3,22-3,34 (m; 2H; CH₂-3); 2,93 (s; 3H; N-CH₃)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO): $\delta = 144,44$ (C-10a); 142,53 (C-1'); 135,15 (CH-7); 130,46 (CH-9); 129,12 (CH-10); 128,60 (CH-3' und CH-5'); 127,96 (CH-4'); 127,73 (CH-2' und CH-6'); 127,60 (CH-8); 124,84 (C-6a); 84,70 (CH-1); 66,28 (CH₂-6); 64,53 (CH₂-4); 58,37 (CH₂-3); 52,12 (N-CH₃) 50,99 (N-CH₃)

6.3 Radioligand-Bindungsstudien

6.3.1 Geräte und Materialien

Geräte

Filter:	Whatman GF/B, Brandell, Gaithersburg, MD, USA
Harvester:	Brandell M48, M24, Gaithersburg, MD, USA
Homogenisator:	RW 16 basic, IKA Labortechnik, Deutschland
LSC-Zähler:	Tricarb [®] 2900 TR, Canberra Packard/Perkin Elmer, Dreieich, Deutschland
pH Meter:	WTW, pH-197, mit pH-Elektrode SenTix41, IKA Labortechnik, Deutschland
Photometer:	Beckman DU [®] , 530 Life Science, Deutschland
Pipetten:	Eppendorf Research und Eppendorf Multipipette plus
Ultraschallbad:	Sonorex RK52H, Bandelin, Deutschland
Ultraturrax:	T25 basic, IKA Labortechnik, Deutschland
Vortex:	MS2, Minischaker, IKA Labortechnik, Deutschland
Zentrifuge:	Beckman Avanti [™] , J-20 XP, Beckman Coulter, USA

Chemikalien

Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂)	C 3306, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Ethanol p.a.	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Hepes N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N´[2-ethansulfonsäure]	H 3375, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	P 9541, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂)	M 2670, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Methyllycaconitin Citrat (MLA)	M 168, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	S 7653, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
(S)-(-)-Nicotin Hydrogentartrat	N 5260, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
D-(+)-Saccharose	84097, Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tris[hydroxymethyl]aminomethan (TRIS-Base)	T 1503, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris[hydroxymethyl]aminomethan Hydrochlorid (TRIS · HCl)	T 3253, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Water ELGA Pure Lab ultra	ELGA, Ransbach-Baumbach Deutschland
Ultima Gold™	Perkin Elmer and Analytical Science, MA, USA

Zusammengesetzt aus:	ethoxylitiertes Alkylphenol 10-20 % Bis(2-ethylhexyl)hydrogenphosphat 10-20 % Docusat Natrium $\leq 2.5\%$ Triethylphosphat $\leq 2.5\%$ Diisopropylnaphthalin Isomere 60-80 % 2,5-Diphenyloxazol $\leq 2.5\%$ 1,4-Bis(4-methyl-alpha-styryl)benzen $\leq 2.5\%$
----------------------	--

Radioliganden

(±)-[³ H]Epibatidin (S.A.: 33,3 – 66,6 Ci/mmol)	Perkin Elmer Life Science Products, Köln, Deutschland
[³ H]Methyllycaconitin ([³ H]MLA) (S.A.: 20 – 39,8 Ci/mmol)	TOCRIS Cookson Ltd., Avonmouth, Bristol, UK

Gewebe

gefrorener Torpedo Californica Elektroplax	Marinus Inc., Long Beach, CA, USA
gefrorenes Sprague-Dawley-Rattenhirn	Pel-Freez Biologicals, Rogers, AR, USA
Schweineebenniere	Pel-Freez Biologicals, Rogers, AR, USA
Kalbsnebeniere	Schlachthof, Köln, Deutschland

Puffer

HSS-Puffer (Hepes salt solution):

Inkubations- und Membranpräparations-Puffer

15,0 mM HEPES

120,0 mM NaCl

5,4 mM KCl

0,8 mM MgCl₂ · 6 H₂O

1,8 mM CaCl₂ · 2 H₂O

Einstellung mit gesättigter NaOH-Lsg. auf pH 7,4

TRIS-Puffer:	Saccharose/TRIS-Puffer:
<i>Spülpuffer</i>	<i>Membranpräparations-Puffer</i>
42,0 mM TRIS · HCl	320,0 mM D-(+)-Saccharose
8,0 mM TRIS-Base	25,0 mM TRIS · HCl

6.3.2 Allgemeine Vorbemerkungen zu den Radioligand-Bindungsstudien an nicotinischen Acetylcholinrezeptoren

Alle synthetisierten Verbindungen wurden in Konkurrenzexperimenten auf ihre Affinität zu den Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 3\beta 4^*$, $\alpha 7^*$ und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ des nAChR untersucht. Mittels (\pm) - $[^3\text{H}]$ Epibatidin ((\pm) - $[^3\text{H}]$ Epi) wurde die Affinität für den $\alpha 4\beta 2^*$ -Subtyp in der P2-Fraktion des Vorderhirns von männlichen Sprague-Dawley-Ratten bestimmt. Für die Affinitätsbestimmung am $\alpha 3\beta 4^*$ -Subtyp wurden rohe Membranfraktionen der Nebennieren von Schweinen verwendet; als Radioligand diente ebenfalls (\pm) - $[^3\text{H}]$ Epibatidin. An P2-Fraktionen des Vorderhirns von männlichen Sprague-Dawley-Ratten konnten mit Hilfe von $[^3\text{H}]$ Methyllycaconitin die Affinitäten der untersuchten Substanzen an $\alpha 7^*$ -Rezeptoren bestimmt werden. Am $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ -Rezeptor - dem so genannten muskulären Subtyp - wurde die Affinität durch Verwendung von (\pm) - $[^3\text{H}]$ Epibatidin an Membranfraktionen des elektrischen Organs des Rochens *Torpedo californica* bestimmt.

Als Radioliganden fanden (\pm) - $[^3\text{H}]$ Epibatidin (S.A.: 33,3 – 66,6 Ci/mmol) und $[^3\text{H}]$ Methyllycaconitin (S.A.: 20 – 39,8 Ci/mmol) Verwendung.

Sowohl die für die Experimente verwendeten Sprague-Dawley-Rattenhirne als auch die Schweinenebennieren wurden von der Firma Pel-Freez Biologicals (Arkansas, USA) bezogen. Gefrorenes Gewebe des elektrischen Organs der Rochens *Torpedo californica* wurde von der Firma Marinus Inc. (Long Beach, CA, USA) erworben.

Die gewonnenen Daten der Konkurrenzexperimente wurden mittels nicht-linearer Regression ausgewertet. Die K_i -Werte wurden aus den IC_{50} -Werten und den K_d -Werten der Bindung von (\pm) - $[^3\text{H}]$ Epibatidin an den Subtypen $\alpha 4\beta 2^*$ ($K_d = 10$ pM), $\alpha 3\beta 4^*$ ($K_d = 50$ pM) und $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ ($K_d = 2$ nM) und dem K_d -Wert der Bindung von $[^3\text{H}]$ MLA ($K_d = 1$ nM) am Subtyp $\alpha 7^*$ mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung berechnet³⁷².

6.3.3 Durchführung der Membranpräparationen

Präparation der P2-Membranfraktion von Rattenhirn

Die noch gefrorenen Rattenhirne werden langsam auf Eis lagernd aufgetaut. Im aufgetauten Zustand werden mit einem scharfen Skalpell das Kleinhirn (Cerebellum) und das Riechzentrum (Medulla) entfernt und das restliche Hirnmaterial in ein Gefäß mit Saccharose/TRIS-Puffer kurz gelagert. Nach Bestimmung des Nassgewichtes wird das Hirnmaterial grob zerkleinert und nach Zugabe von 1/10 des Volumens Sucrose/TRIS·HCl-Lösung homogenisiert (RW 16 basic). Nach Zentrifugation bei 4 °C für 20 min bei 1000 x g wird der Überstand (S1) mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und auf Eis aufbewahrt. Das gewonnene Pellet (P1) wird wie oben beschrieben erneut homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand (S1') wird mit S1 vereinigt und nochmals bei 4 °C für 20 min bei 25000 x g zentrifugiert.

Der so erhaltene Überstand S2 wird abdekantiert und das Pellet P2 mit HSS-Puffer auf das doppelte Nassgewicht verdünnt. Die P2-Membranfraktion sollte nach Herstellung bei -80 °C gelagert werden.

Eine Stunde vor Beginn des Konkurrenzexperimentes wird die P2-Membranfraktion aufgetaut, mit dem 30-fachen Volumen an HSS-Puffer homogenisiert und bei 4° C für 10 min bei 35000 x g zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wird in HSS-Puffer suspendiert und dann für die Experimente verwendet.

Präparation einer rohen Membranfraktion von Schweinenebnieren

Die gefrorenen Schweinenebnieren werden langsam auf Eis lagernd aufgetaut und anschließend vom anhaftenden Fett mittels eines scharfen Skalpells befreit. Nach Zerkleinerung des Gewebes wird dieses mit dem 15fachen Volumen an HSS-Puffer versetzt und homogenisiert (Ultraturrax bei 750 rpm). Die gewonnene Suspension wird für 10 min bei 40000 x g zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet in HSS-Puffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang wird zur Entfernung von Verunreinigungen 5mal wiederholt. Die erhaltene Membranfraktion wird ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Eine Stunde vor Beginn des Konkurrenzexperimentes wird die rohe Membranfraktion aufgetaut, mit dem 5-fachen Volumen an HSS-Puffer homogenisiert und bei 4° C für 20

min bei 25000 x g zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wird in Wasser suspendiert und anschließend für die Experimente verwendet.

6.3.4 Präparation einer Membranfraktion vom elektrischen Organ des Rochens *Torpedo californica*

Die gefrorenen elektrischen Organe des Rochens *Torpedo californica* werden langsam auf Eis lagernd aufgetaut und anschließend grob zerkleinert. Nach erfolgter Zerkleinerung wird mit dem 15fachen Volumen an HSS-Puffer aufgefüllt und homogenisiert (Ultraturrax bei 750 rpm). Die Gewebesuspension wird danach für 10 min bei 40000 x g zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das gewonnene Pellet erneut in HSS-Puffer resuspendiert. Durch zweimaliges Rehomogenisieren und Zentrifugieren nach oben genannten Bedingungen wird das Pellet gewaschen. Die so gewonnene Membranfraktion kann bei -80 °C bis zum Verbrauch gelagert werden.

Eine Stunde vor Beginn des Konkurrenzexperimentes sollte die Membranfraktion aufgetaut, mit dem 5-fachen Volumen an HSS-Puffer homogenisiert und bei 4 °C für 20 min bei 25000 x g zentrifugiert werden. Das gewonnene Pellet wird in Wasser suspendiert und kann so für die Experimente verwendet werden.

6.3.5 Durchführung der Konkurrenzexperimente

Konkurrenzexperimente an $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR der Ratte

Die Testsubstanzen werden je nach Löslichkeit zunächst in Ethanol, DMSO oder Acetonitril gelöst. Aus dieser Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe aus 6 bis 9 verschiedenen Konzentrationen in HSS-Puffer erstellt. Alle Konkurrenzexperimente werden in Polypropylen-Reagenzgläsern, mit einem Gesamtvolumen von 500 μ l, als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Versuchsgefäße werden mit 100 μ l HSS-Puffer und mit 200 μ l der jeweiligen Testlösung der Verdünnungsreihe befüllt. Anschließend werden je 100 μ l einer 0,5 nM (\pm)-[3 H]Epibatidin-Lösung und einer Suspension der P2-Membranfraktion vom Rattenhirn (60-70 μ g Protein) hinzugefügt. Die unspezifische Bindung wird mittels einer Lösung von 300 μ M (S)-Nicotin-di-D-tartrat bestimmt. Alle Proben werden für 90 min bei 22 °C inkubiert. Durch Vakuumfiltration durch einen mit

0,5%iger Polyethylenimin-Lösung getränkten Glasfaserfilter wird das Protein von der Lösung abgetrennt. Die Filter werden dreimal mit TRIS-Puffer gewaschen, in Probengefäße überführt und mit je 2 ml Szintillations-Cocktail versetzt. Die im Protein gebundene Radioaktivität kann auf diese Weise mittels LSC-Counter bestimmt werden.

Kompetitionsexperimente an $\alpha 7^*$ -nAChR der Ratte

Die Testsubstanzen werden je nach Löslichkeit zunächst in Ethanol, DMSO oder Acetonitril gelöst. Aus dieser Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe aus 6 bis 9 verschiedenen Konzentrationen in HSS-Puffer erstellt. Alle Kompetitionsexperimente werden in Polypropylen-Reagenzgläsern, mit einem Gesamtvolumen von 250 μ l, als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Versuchsgefäße werden mit 50 μ l der jeweiligen Testlösung der Verdünnungsreihe befüllt. Anschließend werden je 100 μ l einer 1 nM [3 H]MLA-Lösung und einer Suspension der P2-Membranfraktion vom Rattenhirn (60-70 μ g Protein) hinzugefügt. Die unspezifische Bindung wird mittels einer Lösung von 1 μ M MLA bestimmt. Alle Proben werden für 120 min bei 22 °C inkubiert. Durch Vakuumfiltration durch einen mit 1%iger Polyethylenimin-Lösung getränkten Glasfaserfilter wird das Protein von der Lösung abgetrennt. Die Filter werden dreimal mit TRIS-Puffer gewaschen, in Probengefäße überführt und mit je 2 ml Szintillations-Cocktail versetzt. Die im Protein gebundene Radioaktivität kann auf diese Weise mittels LSC-Counter bestimmt werden.

Kompetitionsexperimente an $\alpha 3\beta 4^*$ -nAChR der Schweinenebenniere

Die Testsubstanzen werden je nach Löslichkeit zunächst in Ethanol, DMSO oder Acetonitril gelöst. Aus dieser Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe aus 6 bis 9 verschiedenen Konzentrationen in HSS-Puffer erstellt. Alle Kompetitionsexperimente werden in Polypropylen-Reagenzgläsern, mit einem Gesamtvolumen von 500 μl , als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Versuchsgefäße werden mit 100 μl HSS-Puffer und mit 200 μl der jeweiligen Testlösung der Verdünnungsreihe befüllt. Anschließend werden je 100 μl einer 0,5 nM (\pm)- ^3H Epibatidin-Lösung und einer Suspension der rohen Membranfraktion von Schweinenebennieren (60-70 μg Protein) hinzugefügt. Die unspezifische Bindung wird mittels einer Lösung von 300 μM (S)-Nicotin-di-D-tartrat bestimmt. Alle Proben werden für 90 min bei 22 °C inkubiert. Durch Vakuumfiltration durch einen mit 1%iger Polyethylenimin-Lösung getränkten Glasfaserfilter wird das Protein von der Lösung abgetrennt. Die Filter werden dreimal mit TRIS-Puffer gewaschen, in Probengefäße überführt und mit je 2 ml Szintillations-Cocktail versetzt. Die im Protein gebundene Radioaktivität kann auf diese Weise mittels LSC-Counter bestimmt werden.

Kompetitionsexperimente an $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ -nAChR des *Torpedo californica* Elektroplax

Die Testsubstanzen werden je nach Löslichkeit zunächst in Ethanol, DMSO oder Acetonitril gelöst. Aus dieser Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe aus 6 bis 9 verschiedenen Konzentrationen in HSS-Puffer erstellt. Alle Kompetitionsexperimente werden in Polypropylen-Reagenzgläsern, mit einem Gesamtvolumen von 500 μl , als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Versuchsgefäße werden mit 100 μl HSS-Puffer und mit 200 μl der jeweiligen Testlösung der Verdünnungsreihe befüllt. Anschließend werden je 100 μl einer 0,5 nM (\pm)- ^3H Epibatidin-Lösung und einer Suspension des elektrischen Organs des Rochens *Torpedo californica* (60-70 μg Protein) hinzugefügt. Die unspezifische Bindung wird mittels einer Lösung von 300 μM (S)-Nicotin-di-D-tartrat bestimmt. Alle Proben werden für 90 min bei 22 °C inkubiert. Durch Vakuumfiltration durch einen mit 1%iger Polyethylenimin-Lösung getränkten Glasfaserfilter wird das Protein von der Lösung abgetrennt. Die Filter werden dreimal mit TRIS-Puffer gewaschen, in Probengefäße überführt und mit je 2 ml Szintillations-

Cocktail versetzt. Die im Protein gebundene Radioaktivität kann auf diese Weise mittels LSC-Counter bestimmt werden.

6.4 Zellbiologische Arbeiten & Transfektionsversuche

6.4.1 Geräte und Materialien

Geräte

Autoklave:	HA30, Vertical autoclave, Hirayama Manufacturing Co., Tokyo, Japan
Blotting Maschine:	AE-6677, HorizBlot, Atto Corporation, Tokyo, Japan
Deckgläser:	Micro Cover Glass 12-circle-1, Matsunami Glass Ind. Ltd., Kishiwada City, Osaka, Japan
Eppendorf-Caps:	1,5 ml sampling tube, Fukae Kasei Co. Ltd., Kobe, Hyogo, Japan
Eppendorf Zentrifuge:	Nano Spin, Nippon Genetics Co. Ltd., Tokyo, Japan
Elektroporationsgerät:	Nucleofector I, Amaxa Biosystems, Amaxa Inc. Gaithersburg, MD, USA
Elektroporationszubehör:	Nucleofector™ Kits V, Amaxa Biosystems, Amaxa Inc., Gaithersburg, MD, USA
Elektrophoresezubehör:	AE-6530, mini PAGE Chamber, Atto Corporation, Tokyo, Japan
Film:	RPN1678K, Hyperfilm MP (8x10 inches), Amersham Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan
Filmentwickler:	IX100502, Rendol, Fuji Photo Film Co. Ltd., Tokyo, Japan
Filmfixierer:	IX200402, Renfix, Fuji Photo Film Co. Ltd., Tokyo, Japan
Handultraschall:	Ultrasonic Disruptor UR-20P, Tomy Seiko CC Ltd., Tokyo; Japan
Inkubator:	ACI-165, ASTEC Series Water Jacket CO2/Multi-Gases Incubator, Astec Co. Ltd., Fukuoka, Japan
Kryo-Röhrchen:	375353, CryoTubes™ CryoLine™ System, Nalge Nunc International KK, Tokyo, Japan
Kulturschalen (10 cm):	430167, 100 mm TC-Treated Culture Dish, Corning International K.K., Tokyo, Japan
Kulturschalen (6 cm):	430166, 60 mm TC-Treated Culture Dish, Corning International K.K., Tokyo, Japan
Kulturschalen (3,5 cm):	353001, 35 x 10 mm Easy-Grip Dishes (Falcon), Nippon BD Company Ltd., Tokyo, Japan

Membran:	1PVH00010, Immobilon Transfer Membrane, Nihon Millipore K.K., Tokyo, Japan
Mikrotiterplatte (96fach):	655180, 96 Well Cell Culture Microplates, Greiner Bio-One Co. Ltd., Tokyo, Japan
Mikrotiterplatte (24fach):	662160, 24 Well Tissue Culture Plate, Greiner Bio-One Co. Ltd., Tokyo, Japan
Photometer:	Bio-Rad Model 680 microplate reader, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA
Pipetten:	Eppendorf Researchpipetten
Proteindenaturierung:	BI-515A, Block Incubator, Astec Co. Ltd., Fukuoka, Japan
PVDF-Membranen:	1PVH00010, Immobilon Transfer Membrane, Millipore, Nihon Millipore K.K., Tokyo, Japan
Shaker:	SS-8, Eyelashaker, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan
Ultrazentrifuge:	MRX-150, Refrigerated Microcentrifuges, Tomy Seiko CC Ltd., Tokyo; Japan
Vortex:	G-560, Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA,
Whatman-Filter	3030-917, 3MM Chr paper, Whatman Japan KK, Tokyo, Japan •
Werkbank:	PAU-1300AN, Clean Bench, Dalton Chemical Laboratories Inc., Toronto, ON, Kanada
Zentrifuge:	KN-70, Tabletop Centrifuge, Kubota Corporation, Tokyo, Japan
Zentrifugenröhrchen (15 ml):	430766, 15 ml Plastic Centrifuge Tubes, Corning International K.K., Tokyo, Japan
Zentrifugenröhrchen (50 ml):	430291, 50 ml Plastic Centrifuge Tubes, Corning International K.K., Tokyo, Japan

Chemikalien

Acrylamid:	011-08015, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Ammoniumperoxosulfat (APS):	012-08023, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Antikörperlösung AChR α 7 (H-302): sc-5544 (200 μ g/ml) (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Antikörperlösung AChR α 4 (A-20): sc-1772 (200 μ g/ml) (goat)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Antikörperlösung AChR β 2 (K-20): sc-1770 (200 μ g/ml) (goat)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Antikörperlösung goat anti-rabbit IgG HRP: sc-2054 (200 μ g in 0,5 ml)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Antikörperlösung donkey anti-goat IgG HRP: sc-2056 (200 μ g in 0,5 ml)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Bromophenol Blau	021-02911, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan

Coomassie [®] Protein Assay Reagent	Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA
ECL Western blotting detection reagents:	RPN2106, Amersham Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan
Ethanol	Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan
Ethylenediamine-N, N, N', N'- tetraessigsäure (EDTA)	342-01353, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Ethyleneglycol-bis-(2-aminoethyl)- N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	346-01312, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Fetales Kälberserum (FCS)	04-001-1A, Perkin-Elmer BioSignal Inc., Montreal, Quebec, Kanada
FuGENE [®] 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan
Geneticinsulfat:	16513-84, G418, Disulfate AqueousSolution, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan
D-Glucose	041-00595, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Glycin	077-00735, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Glycerol:	17018-25, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan
Hepes N-[2-Hydroxyethyl]piperazin- N'[2-ethansulfonsäure]	T 1503, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Kaliumchlorid (KCl)	163-03545, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Leupeptin (Hemisulfat Monohydrat):	122-03751, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
2-Mercaptethanol	135-07522, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Methanol (MeOH)	25183-80, Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan
N, N'-Methylen-bis-acrylamid:	138-06032, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Methyllycaconitin Citrat (MLA)	M 168, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Natriumazid (NaN ₃):	37824-25, Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan
Natriumchlorid (NaCl)	191-01665, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Natriumlaurylsulfat (SDS)	28-3284, Katayama Chemical Industries Co. Ltd., Osaka, Japan
Nukleofector [™] Kit V	amaxa biosystems, amaxa Inc. Gaithersburg, MD, USA
(S) (-)-Nicotin Hydrogentartrat Dihydrat	N 5260, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan

Pferdeserum:	16050-130, Gibco [®] , Invitrogen Japan K.K., Tokyo, Japan
Phosphate buffered salts (PBS)	T900, TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan
Penicillin(10000 unit/ml) /Streptomycin-Lösung (10000 µg/ml)	26253-84, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan
Phenylmethylsulfonylfluorid (PSMF)	160-12183, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Protein-Standardmaker:	161-0373, Precision Plus Protein Standards, All Blue, Prestained, Bio-Rad Laboratories Inc., Tokyo, Japan
D-(+)-Saccharose	196-00015, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Skim milk:	198-10605, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin (TEMED)	40529-30, Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan
Trypsin/EDTA-Lösung	25200-772, Trypsin 0,25 %, 1mM EDTA in HBSS, Gibco [®] , Invitrogen Japan K.K., Tokyo, Japan
Tris[hydroxymethyl]aminomethan (TRIS)	207-06275, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Tris[hydroxymethyl]aminomethan- Hydrochlorid (TRIS · HCl)	T 3253, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Triton X-100	168-11805, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Zellbunker-Lösung:	BLC-1, Cell Banker, Juji Field Inc., Minato, Japan
Ziegenserum:	16210-064, Gibco [®] , Invitrogen Japan K.K., Tokyo, Japan

Nährmedien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	D 1145, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Hank's Puffer	H 9269, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Nutrient Mixture F-12 Ham	N 8641, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
RPMI-1640 Medium	R 7509, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan

Puffer und Lösungen

Homo-Puffer:

*Homogenisierungspuffer
zur Proteinbestimmung*250 mM D-(+)-Saccharose
2 mM EDTA
10 mM EGTA
20 mM TRIS · HCl

Lysis-Puffer:

*Lysepuffer zur Proteinbestimmung*13,5 ml Homo-Puffer
15 µl Leupeptin
1,5 ml Triton X-100 Lösung (10%ig in PBS)
30 µl PSMFZusammensetzung des
unteren Acrylamidgels (7,5 %):*Elektrophorese*2 ml unterer Gelpuffer
2 ml Acrylamid-Lösung
4 ml dest. Wasser
30 µl 10%ige APS-Lösung
20 µl TEMEDZusammensetzung des
oberen Acrylamidgels (7,5%):*Elektrophorese*0,625 ml oberer Gelpuffer
0,375 ml Acrylamid-Lösung
3 ml dest. Wasser
15 µl 10%ige APS-Lösung
20 µl TEMEDZusammensetzung des
unterer Gelpuffer:*Elektrophorese*98,8 g TRIS-Base
2,0 g SDS
in 500 ml Wasser (pH 8,8)Zusammensetzung des
oberer Gelpuffer:*Elektrophorese*30,2 g TRIS-Base
2,0 g SDS
in 500 ml Wasser (pH 6,8)

Transferpuffer:

*Elektrophorese*63,6 g TRIS-Base
150 ml MeOH
302,7 g Glycin
in 3000 ml Wasser

Laufpuffer:

*Elektrophorese*18,0 g TRIS-Base
84,0 g Glycin
3,0 g SDS
in ml 3000 Wasser

30%ige Acrylamid-Lösung:

*Elektrophorese*30,0 g Acrylamid
0,8 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid
in 100 ml Wasser

Antikörper-I-Lösung

für den $\alpha 7$ -AChR (1:500):*Western-Blot*16 µl Antikörperlösung AChR $\alpha 7$
8 µl NaN₃-Lösung (20%ig)
80 µl Ziegen Serum
8 ml PBS-T-Lösung 0,01 M

Antikörper-II-Lösung

für den $\alpha 7$ -AChR (1:5000):*Western-Blot*1,6 µl Antikörperlösung goat anti-rabbit
80 µl Ziegen Serum
8 ml PBS-T-Lösung 0,01 M

Antikörper-I-Lösung
für den $\alpha 4\beta 2$ -AChR (1:400):
Western-Blot
20 μ l Antikörperlösung AChR $\alpha 4$
8 μ l NaN₃-Lösung 20%
80 μ l Pferdeserum
8 ml PBS-T-Lösung 0,01 M

Antikörper-II-Lösung
für den $\alpha 4\beta 2$ -AChR (1:5000):
Western-Blot
1,6 μ l Antikörperlösung donkey anti-goat
80 μ l Pferdeserum
8 ml PBS-T-Lösung 0,01 M

6.4.2 Allgemeine zellbiologische Arbeitsmethoden

Zelltypen

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten zellbiologischen Arbeiten und Transfektionsversuche wurden HEK-293, PC-12 und SH-SY5Y-Zellen verwendet. Bei der HEK-293-Zelllinie handelt es sich um transformierte Zellen aus humanen embryonalen Nierenzellen und DNA-Fragmenten des Adenovirus 5⁴⁸⁸. PC-12 Zellen sind Phäochromozytomzellen der Ratte, die erstmals 1976 von Greene und Tischler aus einem Nebennierentumor einer bestrahlten Ratte gewonnen wurden³⁹⁹.

Die dritte verwendete Zellart ist eine humane Neuroblastomzelle, die 1970 als klonale Sub-Zelllinie aus der Neuroepithelioma Zelllinie SK-N-SH erzeugt wurde. Diese stammte ursprünglich aus dem Knochenmark eines vierjährigen kaukasischen Mädchens mit metastasierendem Neuroblastom⁴⁸⁹.

Laut Literatur wurden in Abhängigkeit der verwendeten Subklone die mRNA der Nicotinrezeptor-Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ und $\beta 4$ in SH-SY5Y- und PC12-Zellen nachgewiesen^{383,391,392,393,394}.

Zellkultivierung

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 3, 5, 6, oder 10 cm Kulturschalen bei 37 °C, 5 % CO₂-Begasung und 96 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank. Als Nährmedium für PC-12-Zellen diente DMEM mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (inaktiviert bei 56 °C für 30 min), 100 μ g/ml Streptomycin und 100 IU Penicillin (P/S). Das Nährmedium für die HEK-293-Zelllinien enthielt zusätzlich noch 250 μ g/ml Geneticinsulfat. Die SH-SY5Y-

Zellen wurden durch eine Mischung aus DMEM und F12 (Sigma) im Verhältnis 1:1 unter Zusatz von 10 % FBS und P/S ernährt.

Alle 3-7 Tage nach Erreichen der 80-100%igen Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 und 1:20 auf neue Kulturschalen verteilt. Dies erfolgte in folgenden Schritten:

- Absaugen des alten Mediums
- Spülen des Zellrasens mit warmer PBS-Lösung
- Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung und anschließende Inkubation für 5 min bei 37° C im Brutschrank zur Ablösung der Zellen
- Abspülen der Zellen mittels einer sterilen Pipette und Verteilung der Zellsuspension auf die vorbereiteten, mit Nährmedium gefüllten Kulturschalen

Einfrieren von Zellen

Um einen ausreichenden Vorrat an Zellen zu erhalten und zur Anlegung einer Sicherheitsreserve, wurde von Zeit zu Zeit einige in Kultur befindliche Zellen zur Aufbewahrung eingefroren (Stammlösung). Hierzu wurde zunächst eine Kulturschale (d = 10 cm) angelegt und die Zellen wie unter „**Zellkultivierung**“ beschrieben von der Kulturschale abgelöst. Anschließend wurde wie folgt vorgegangen:

- Aufnahme der Zellen in 5 ml PBS-Lösung
- Überführung der Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml)
- Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min (Tabletop Centrifuge).
- Absaugen der überstehende Lösung und Resuspension des gewonnenen Pellets in 3 ml Zellbunker-Lösung
- Überführung der Suspension in 3 sterile Kryo-Röhrchen und Einfrieren bei -80 °C

Ausfrieren von Zellen

Um eine eingefrorene Zelllinie wieder in Kultur zu nehmen, wurde das tiefgefrorene Kryo-Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und wie folgt bearbeitet:

- Überführung der Zellbunker-Suspension in ein mit 5 ml PBS-Lösung gefülltes Zentrifugenröhrchen (15 ml)
- zweimaliges Spülen des Kryo-Röhrchens mit je 1ml PBS und Vereinigung der Spüllösung mit der Zellsuspension im Röhrchen (15ml)
- Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min (Tabletop Centrifuge).
- Absaugen der überstehende Lösung und Resuspension des gewonnenen Pellets in 8 ml Nährmedium
- Überführung der Suspension auf eine Kulturschale (d= 10 cm)

- nach ausreichender Wachstumszeit (1 bis 4 Tage) splitten der Zellen auf kleinere Kulturschalen (6 cm) (Verdünnung 1/10 und 1/20)

6.4.3 Zellen für Patch-Clamp Experimente:

Die Zellen für die Patch-Clamp Experimente (PC-12, HEK-293 und Hippocampus-Neuronen) wurden in Kulturschalen ($d = 3,5$ cm) auf Deckgläsern ($d = 1$ cm) herangezogen. Vorbereitend wurden zunächst die Deckgläser unter sterilen Bedingungen in die Kulturschalen gelegt und für mindestens 2 h (besser über Nacht) dem UV-Licht der Werkbank ausgesetzt. Die Überführung und Kultivierung der Zellen in den Kulturschalen ($d = 3,5$ cm) erfolgte analog den oben beschriebenen Methoden in den Verdünnungen 1/10 oder 1/20. Nach 24 bis 96 h wurden die Zellen für die Versuche eingesetzt, wobei die besten Bedingungen nach 48-72 h gegeben waren. Unmittelbar vor dem Experiment wurde das Nährmedium entfernt, die Kulturschale mit Perfusionslösung gespült und ebenfalls mit letztgenannter Lösung aufgefüllt.

Differenzierung von PC-12 Zellen:

In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass sich PC-12-Zellen durch Zusatz von NGF im Nährmedium differenzieren lassen und somit die Expression von membranständigen Rezeptoren verändert werden kann. Hierzu wurde dem normalen Nährmedium (DMEM) NGF in einer Konzentration von 2,5 ng/ml zugesetzt³⁹⁹.

Primär kultivierte Hippocampus-Neuronen

Die für Patch-Clamp-Untersuchungen verwendeten Neuronen wurden nach Literaturangaben im Arbeitskreis von Dr. I. Hide (Department of Pharmacology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima 734-8551, Japan) isoliert und kultiviert⁴⁰³.

6.4.4 Transfektion

Lipofektion

Zunächst wurden 10 µl FuGENE[®] 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics)³⁷⁹ in ein autoklaviertes Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl Nährmedium (des jeweiligen Serum- und Geneticinsulfat-frei) verdünnt und für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das fetale Kälberserum und die Antibiotika würden die spätere Bildung der Liposomen-DNA-Komplexe zu Beginn der Transfektionsreaktion stören und müssen deshalb in diesem Schritt weggelassen werden.

In der Zwischenzeit wurde die Zellen einer zu 80 % konfluent bewachsenen Kulturschale (d = 6 cm), wie unter „**Einfrieren von Zellen**“ beschrieben, gewonnen. Das erhaltene Pellet wurde nachfolgend in 5 ml Serum-haltigen, aber Geneticinsulfat-freiem Medium resuspendiert.

Parallel dazu wurde das verwendete Plasmid aufgetaut und die benötigte Menge (5 µg entspricht ca. 3 µl) nach der Inkubationszeit zur FuGENE[®]-Lösung hinzugefügt. Das Gemisch wurde nach intensiver Durchmischung kurz zentrifugiert (Nano Spin). Dies diente der Gewährleistung, dass die kleine DNA-Menge (5 µg) nicht an der Wand des Eppendorf-Caps haftet, sondern im Medium gelöst vorliegt. Daran anschließend erfolgte eine erneute Inkubation für 5 min bei 37 °C. Nach wiederholter Zentrifugation erfolgt die Zugabe des FuGENE[®]/Plasmid-Cocktail zur Zellsuspension, die anschließend in drei Verdünnungen (1 x 1/10, 3 x 1/100, 3 x 1/1000, 3 x 1/5000) auf Kulturschalen (d = 10 cm) mit Geneticinsulfat-freies Nährmedium ausplattiert wurde.

Die negativ geladene DNA des Plasmids bindet während des Lipofektions-Prozesses über elektrostatische Wechselwirkungen an die kationischen FuGENE[®]-Lipide, wodurch sich ein nicht-liposomaler DNA-Lipid-Komplex bildet. Dieser Komplex fusioniert mit der ähnlich aufgebauten Zellmembran. Es kommt dadurch zur Einschleusung der Plasmid-DNA in die Zelle und nachfolgend in den Zellkern, in dem die DNA anschließend exprimiert wird.

Die Kulturschalen der Verdünnungsschritte wurden bis zur Ausbildung von Zellverbänden (20-50 Zellen) bebrütet (ca. 2-5 Tage). Die Zellkolonien wurden anschließend mit einer sterilen Eppendorfpipette vorsichtig mechanisch angelöst,

aufgesaugt (Volumen: 50 μ l) und in eine, mit 1 ml Geneticinsulfat-haltigem Nährmedium befüllt, Vertiefung einer 24fach Mikrotiterplatte überführt. Nachfolgend wurde Mikrotiterplatte bis 80%igen Konfluenz der Vertiefung im Inkubator bei 37 °C aufbewahrt.

Durch das im Nährmedium enthaltene Antibiotikum Geneticinsulfat, das als Selektionsfaktor diente, sollten in der Mikrotiterplatte nur Kolonien wachsen, die erfolgreich transfiziert wurden.

Die Überführung der einzelnen Antibiotika-resistenten Kolonien aus der Mikrotiterplatte auf Kulturschalen (d = 6 cm) erfolgte, wie bereits oben beschrieben, mit Hilfe einer Eppendorfpipette (100 μ l) durch Ablösen der Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung. Es wurden nur solche Kolonien überführt, die eindeutiges Zellwachstum unter Selektionsbedingungen aufwiesen. Zellkolonien, die eine Stagnation oder gar einen Rückgang im Wachstum zeigten, wurden als ungeeignet verworfen.

Alle Kulturschalen (d = 6 cm) wurden zur späteren eindeutigen Identifizierung durchnummeriert.

Die Antibiotika-resistenten Zellkolonien wurden bis zum Erreichen einer ausreichenden Konfluenz im Inkubator aufbewahrt und anschließend nach bereits beschriebener Methode gesplittet (1 x 1/5 und 2 x 2/5). Die 1/5-Verdünnung diente zur Anlegung einer Stammlösung, die beiden anderen Kulturschalen zur weiteren Kultivierung und zur Proteingewinnung für die anschließenden Western-Blot Experimente. Zellkolonien, die in den Kulturschalen (d = 6 cm) nur ein sehr langsames Wachstum zeigten, wurden als ungeeignet aussortiert

Elektroporation

Zur Elektroporation der PC-12- und SH-SY5Y-Zellen kam ein Nucleofector I der Firma „amaxa biosystems“ mit dem dazugehörigen „Nucleofector™ Kit V“ zur Anwendung. Das verwendete Programm U-29 wurde dem Nucleofector™ Manual (Section 2.5) entnommen.

Die Zellen zur Elektroporation wurden wie unter **Lipofektion** beschrieben als Pellet gewonnen und in 1 ml PBS-Lösung resuspendiert. Nach erfolgter Bestimmung der Zellzahl wurden etwa 2×10^6 Zellen in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und

zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 100 μ l Nukleofector™ Solution V resuspendiert und mittels einer Einmalpipette in die Spezialkuvette des Nukleofector™ Kits V überführt. Nach erfolgter Elektroporation wurde die Zellsuspension aus der Kuvette in eine vorbereitete Kulturschale (d = 6 cm) mit Geneticin-haltigen Nährmedium gegeben und bis zur 80%igen Konfluenz inkubiert.

Die weiterführenden Schritte der Zellselektion entsprechen denen unter **Lipofektion** beschriebenen Vorgehensweisen.

6.4.5 Proteinuntersuchung mittels Immunoblotting

Zellernte

Das Nährmedium einer Kulturschale (d = 6 cm) der zu untersuchenden Kolonie wurde zunächst abgesaugt und der Zellrasen mit 1 ml Homo-Puffer gespült. Anschließend erfolgte eine erneute Zugabe von 1 ml dieses Puffers und Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschale mit Hilfe eines Zellschabers. Der zellhaltige Homopuffer wurde nach Überführung in ein Eppendorf-Cap bei 3000 rpm für 5 min ultrazentrifugiert. Das gewonnene Pellet konnte nachfolgend, auf Eis lagernd, in 100-200 μ l Lysispuffer mit Hilfe des Ultrasonic Disruptor UR-20P gelöst werden. Die klare Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert bzw. bei -80 °C tiefgefroren.

Zur Gewinnung der Mäusemakrophagen für die Western-Blot Experimente wurden die frisch isolierten Zellen zunächst in eine Kulturschale (d = 10 cm) mit RPMI-Medium gegeben und zum Anwachsen der Zellen auf dem Schalenboden für 2h bei 37 °C inkubiert. Die Gewinnung des Proteins erfolgte dann analog der oben aufgeführten Beschreibung.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte UV-spektrometrisch mittels Coomassie® Protein Assay Reagent nach der Methode von Bradford⁴⁹⁰. Zur Messung wurde ein Bio-Rad Model 680 microplate reader verwendet. Zum Nullabgleich diente reiner Lysispuffer, als Standardproteinkonzentration wurden 0, 250, 500, 750 und 1000 ng/ μ l benutzt. Die Proteinkonzentrationen der gemessenen Proben wurden in μ g/ μ l angegeben.

Immunoblotting:

Proteinvorbereitung:

Jede Probe des Western-Blots sollte ca. 24 µg Protein enthalten. Das für diese Menge benötigte Volumen der tiefgefrorenen Proteinlösung wurde nach dem Auftauen (auf Eis lagernd) in einem Eppendorf-Cap mit Lysispuffer bis auf 12 µl verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 6 µl Sample Puffer und die Denaturierung der Proteine in einem „block incubator“ für 3 min bei 95 °C.

Vorbereitung zur Elektrophorese:

Die Vorbereitung zur Elektrophorese erfolgte nach folgendem Schema:

- Innenseite der Glasgießformen mit Ethanol säubern und das „miniPAGE Chamber“ Elektrophoresezubehör zusammensetzen
- Frisch hergestellten „unteren Acrylamidgels“ (Füllhöhe ca. 7,5 cm) einfüllen, Gel mit 99%igem Ethanol überschichten und für 15 min aushärten
- Ethanol entfernen, frisch hergestelltes „oberes Acrylamidgel“ blasenfrei einfüllen; spezielle Kämmen in das noch flüssige obere Gel zur Ausbildung der Probenkammern einbringen, bevor dieses für 15 min aushärtet
- Elektrophorese-Tanks zu ca. 1/3 mit Laufpuffer blasenfrei befüllen
- Glasformen nach vorsichtiger Entnahme des Kamms in die Haltevorrichtung des Elektrophorese-Tanks einspannen
- Zwischen den Glasformen befindlichen Raumes mit Laufpuffer blasenfrei befüllen

Das untere Acrylamidgel dient bei der Elektrophorese zur eigentlichen Auftrennung der Zellproteine anhand ihres Molekulargewichts, während durch obere Gel eine Ausrichtung der Proben erfolgt, so dass alle Proteinlösungen gleichzeitig das untere Gel erreichen.

Auftragen der Proben:

Die denaturierten Proteinproben sollten einzeln, nach einem zuvor ausgearbeiteten Schema mittels einer Eppendorfpipette (15 µl) in die vierzehn, durch den Kamm ausgebildeten Taschen im Acrylamidgel einpipettiert werden. Die äußersten beiden Taschen des Gels blieben dabei unberücksichtigt, da diese in der Regel, durch die Herstellung bedingt, zu klein ausfallen. Die erste und falls möglich die letzte befüllbare Gel-Aussparung war für den Molekulargewichts-Marker (Precision Plus Protein Standards) vorgesehen. Die Positiv-Kontrolle, die das zu transfizierende

Rezeptorprotein enthielt, wurde in die zweite und falls möglich in die vorletzte Kammer im Elektrophorese-Gel pipettiert. Die Proben der verschiedenen transfizierten Kolonien wurden folglich auf die restlichen Taschen verteilt.

Elektrophorese:

Nach der Probenauftragung wurde der Tank verschlossen und an die Elektroden der „miniPAGE Chamber“ folgende Spannungen und Stromstärken angelegt:

für 1 Gel: 25 mA und 300V für 60 min

für 2 Gele: 50 mA und 300V für 60 min

Transfer auf PVDF-Membran:

Der Transfer der Proteinbanden auf die PVDF-Membranen (Immobilon Transfer Membrane) erfolgte nach folgendem Schema:

- PVDF-Membranen mit Methanol für 30 s befeuchten und anschließend für 5 min in Transferpuffer einweichen (schüttelnd auf einem Eyelashaker)
- Zwischenzeitlich den Transfer-Blocks (HorizBlot) mit Transferpuffer befeuchten und drei Puffer durchtränkte Whatman-Filter pro Acrylamidgel aufbringen
- PVDF-Membranen auf die Filter überführen und erneut befeuchten
- Währenddessen Elektrophorese-Gele den Formen entnehmen, überschüssiges Acrylamidgel entfernen und in eine Schale mit Transferpuffer überführen
- Gele auf die PVDF-Membranen auflegen und mit Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren bedecken
- Zwischen den Filtern eingeschlossene Luftblasen entfernen

Nach Verschließen des Blotting-Gerätes wurden für 90 min folgende Spannungen und Stromstärken angelegt:

für 1 Gel: 300V und 120 mA

für 2 Gele: 300V und 240 mA

Nach dem Blotting erfolgte die Überführung der PVDF-Membran in PBS-T- Lösung, in der diese für 5 min gewaschen wurde.

Skim-Milk Verfahren:

Zur Verringerung der unspezifischen Bindung und somit des Backgrounds bei der Filmentwicklung wurde die PVDF-Membran bei 22 °C für 30-60 min (bei 4 °C über

Nacht) in einer Skim-Milk-Lösung (5g Skim-Milk-Pulver in 100 ml PBS-T Lösung) schüttelnd gelagert.

Antikörperreaktion:

Die Membran wurde zunächst aus der Skim-Milk-Lösung genommen, viermal mit PBS-T-Lösung gewaschen und dann für 5 min in der letztgenannten Lsg schüttelnd aufbewahrt. Nachfolgend wurde die PBS-T-Lösung gegen die Antikörper-I-Lösung ausgetauscht und die Membran für mindestens 1 h bei 22 °C (bei 4 °C über Nacht) in letzter gelagert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Entfernung der Antikörper-I-Lösung. Nach ausreichendem Spülen mit PBS-T-Lösung wurde die Membran in die Lösung des zweiten Antikörpers, der die für den Filmentwicklungsprozess so wichtige HRP trug, überführt. Die Einwirkzeit für den zweiten Antikörper betrug 60 min bei RT (bei 4 °C über Nacht). Nach den Immunopräzipitationsschritten wurde die Membran mit PBS-T-Lösung gewaschen.

ECLTM-Reaktion:

Je 1 ml des Zweikomponentenreagenzes „ECLTM Western blotting detection reagents“ wurde in einer Schale gemischt und die PVDF-Membran von beiden Seiten für 30 s in die Flüssigkeit gelegt. Das ECLTM-Substrat reagiert dabei mit der HRP des 2. Antikörpers zu einem Licht emittierenden Produkt, das bei der Entwicklung den Film schwarz färbt.

Filmentwicklung:

Die Entwicklungszeit der Filme (Hyperfilm MP) betrug je nach Bedingungen 30-120 Sekunden. Als Entwickler und Fixierer fanden „Rendol“ und „Renfix“ der Firma „Fuji Film“ Anwendung.

6.5 Patch-Clamp Experimente

6.5.1 Geräte und Materialien

Geräte

Patch-Pipetten:	Borsilikatglas Rohlinge, Glaspipetten mit Filament, Model GD 1,5; 1,5 x 90 mm; Narishige Scientific Instruments Lab., Tokyo, Japan
Verstärker:	Axopatch 200A, Axon instruments, Inter Medical Co. Ltd. Nagoya, Japan
Deckgläschen:	Micro Cover Glass 12-circle-1, Matsunami Glass Ind. Ltd., Kishiwada City, Osaka, Japan
Impulsgeber:	SEN-3301, Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan
Kamera	CCD camera C2400, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan
pH Meter:	PerpHect LogR meter model 330, Thermo Orion, Beverly, MA, USA
Elektrodenziehgerät:	Flaming Brown Micropipette Puller, Model P-87, Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA
Vortex:	G-560, Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Mikromanipulator:	MX-3, Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan
Mikroskop:	Axiovert 100, Carl Zeiss,
Oszilloskop:	VC-10, Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan
Software:	pClamp6, Axon Instruments, Foster City, CA, USA
	Origin 6.0, OriginLab Corp., Northampton, MA, USA
	Microsoft Excel 2002, Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
	Microsoft Windows 95/ Windows XP, Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

Chemikalien

Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂)	Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Cäsiumchlorid (CsCl)	C 3032, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Cäsiumfluorid (CsF)	C 5330, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Cäsiumhydroxid Monohydrat (CsOH)	C 8518, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Dihydro-β-erythroidinhydrobromid (DHβE)	D 6628, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan

Dimethylsulfoxid (DMSO)	D 8418, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Ethyleneglycol-bis-(2-aminoethyl)- N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	346-01312 Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
D-Glucose	041-00595 Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Hepes N-[2-Hydroxyethyl]piperazin- N'[2-ethansulfonsäure]	T 1503, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Kaliumchlorid (KCl)	163-03545 Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
Methyllycaconitin Citrat (MLA)	M 168, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Natriumchlorid (NaCl)	191-01665 Wako Pure Chemicals Ind. Ltd., Osaka, Japan
(S)-(-)-Nicotin Hydrogentartrat Dihydrat	N 5260, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan

Lösungen

Perfusionslösung:

externe Standardlösung

165 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM CaCl₂

5 mM HEPES

10 mM Glucose

Einstellung mit gesättigter

NaOH-Lsg. auf pH 7,3

Pipettenlösung:

interne Standardlösung

80,0 mM CsCl

10,0 mM CsF

10,0 mM EGTA

10,0 mM HEPES

Einstellung mit gesättigter

CsOH-Lsg. auf pH 7,3

Nicotinlösung:

100 µM (S)-(-)-Nicotin

in Perfusionslösung

DHβE-Lösung:

1 µM DHβE

in Perfusionslösung

MLA-Lösung:

1 µM MLA

in Perfusionslösung

Substanz-Lösungen:

Lösungen der hergestellten Verbindungen wurden in Konzentrationen von 100 µM und 1 mM eingesetzt. Nach Lösen der Verbindung in DMSO (Endkonzentration max. 3,5 mmol) wurde mit Perfusionslösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

6.5.2 Allgemeine Vorbemerkungen zu Patch-Clamp Experimenten

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die zu untersuchenden Zellen (PC-12-, HEK-293- und Hippocampus-Neuronen) auf Deckgläschen (cover slips) in die Aufnahmekammer (recording chamber) eingebracht. Eine kontinuierliche Perfusion in der Aufnahmekammer (Volumen < 1 ml) bei einer Rate von 3-5 ml/min wurde mittels Schwerkraft gewährleistet.

Alle Experimente wurden bei 22 °C durchgeführt.

Der Pipettenwiderstand betrug ca. 8,33 MΩ (Sollwert 5-10 MΩ). Bei allen „whole-cell“ Aufnahmen wurden die Zellen bei einem Potential von -60 mV gehalten.

Applikation von Lösungen

Substanzlösungen wurden für die Dauer von zwei Sekunden appliziert; zwischen den einzelnen Applikationen lag ein Zeitraum von 90 Sekunden, um einen vollständigen Austausch der die Zelle umgebenden Lösung zu gewährleisten.

Nach einmaliger Nicotin-Applikation zur Feststellung eines erfolgreich erzeugten Patches, wurden drei Applikation der zu untersuchenden Substanz angeschlossen. Anschließend wurden die Zellen erneut drei Mal mit Nicotin **1** stimuliert, um eine Auswaschung der Testsubstanz und die Rückkehr zu ursprünglichen Bedingungen für die nächste Substanzuntersuchung zu gewährleisten.

Datenanalyse

Die Aufzeichnung der durch Nicotin **1** und Testsubstanz induzierten Ströme erfolgte mittels eines PC und der pClamp 6.0 Software. Die Digitalisierungsrate betrug 50 kHz und die Tiefpass-Filterfrequenz 2 kHz. Die Ströme wurden auf der Festsplatte des Rechners gespeichert und anschließend mittels der pClamp Software ausgewertet.

Zur Datenanalyse erfolgte hauptsächlich durch Vergleich der maximalen Peak-Amplituden, wobei die Ergebnisse der Testsubstanzen jeweils in ein prozentuales Verhältnis zu einem Signal, das durch eine 100 µM Nicotinlösung induziert wurde, gesetzt wurden (Effekt in %). Die aufgeführten Werte sind die Mittelwerte von mindestens 3 verschiedenen Zellen derselben Kultur. Zur Identifizierung des jeweiligen das Stromsignal vermittelnden Nicotinrezeptor-Subtyps wurden außerdem die

Stromanstiegszeit (10-90% rise time) und exponentielle „decay-time“-Konstante (τ) herangezogen. Diese Konstante gibt die Zeit an, in der der Stromtransient auf $1/3$ seiner ursprünglichen Amplitude absinkt. Unter Stromanstiegszeit versteht man die Zeit, in der das Stromsignal von 10% auf 90% ihrer maximalen Amplitude ansteigt.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test und ANOVA Analyse ermittelt.

6.6 Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ in Makrophagen

6.6.1 Geräte und Material

Geräte:

Autoklave:	HA-300, Hirayama Manufacturing Co., Tokyo, Japan
Eppendorf-Caps:	1,5 ml sampling tube, Fukae Kasei Co. Ltd., Kobe, Hyogo, Japan
Eppendorf Zentrifuge:	Nano Spin, Nippon Genetics Co. Ltd., Tokyo, Japan
Flexiperm [®] -Schablonen:	Milian AG, Basel, Schweiz
Inkubator (CO ₂):	TBA-110, Tabai Espec Co. Ltd., Osaka, Japan
Kamera	HiSCA CCD Kamera; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan
Kamera Controller:	HiSCA CCD Kamera Controller; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan
Kamera Verstärker:	Hamamatsu High Speed gated Image intensive unit; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan
Kanüle	Angiocath. 24GA; 3/4; 0,7 mm; 1,9 cm; Nippon BD Company Ltd., (BD Medical - Pharmaceutical Systems), Tokyo, Japan
Kulturschale (10 cm):	430167, 100 mm TC-Treated Culture Dish, Corning International K.K., Tokyo, Japan
Mikroskop 1:	Eclipse TE 300 mit integriertem Incubator Warmer, Nikon Instech Co. Ltd., Kawasaki, Kanagawa, Japan
Mikroskop 2:	DIA PHOT 300, Nikon Instech Co. Ltd., Kawasaki, Kanagawa, Japan
Objektträger:	microscope slides, Matsunami Glass Ind. Ltd., Kishiwada City, Osaka, Japan
Pipetten:	Eppendorf Researchpipetten,
Shaker:	Automatic mixer S-100, Taitec Co., Tokyo, Japan
Software:	Argus HiSCA Software; Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan
	Origin 6.0/7.0, OriginLab Corp., Northampton, MA, USA
	Microsoft Excel 2002, Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
	Microsoft Windows 95/ Windows XP, Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Vortex:	G-560, Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA

Werkbank:	PAU-1600GB, Clean Bench, Dalton Co. Ltd., Tokyo, Japan
Zentrifuge	Kubota 2010, Kubota Corporation, Tokyo, Japan
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	430291, 50 ml Plastic Centrifuge Tubes, Corning International K.K., Tokyo, Japan

Chemikalien

α -Bgt:	T 5644, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Dihydro- β -erythroidinhydrobromid (DH β E)	D 6628, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D 8418, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
FCS	04-001-1A, Perkin-Elmer BioSignal Inc., Montreal, Quebec, Kanada,
Fura-2:	Molecular Probes; Eugene, OR, USA (Invitrogen K.K., Tokyo, Japan)
Hank's Puffer	H 9269, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Methyllycaonitin Citrat (MLA)	M 168, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Nerve growth factor (NGF)	N 0513, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
(S)-(-)-Nicotin (Hydrogentartrat Dihydrat)	N 5260, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Poly-L-Lysin:	P 1524, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
RPMI-1640 Medium	R 7509, Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan
Thioglycollate Medium	“Thioglycollate Medium I »Daigo« for JP general test“, Wako Pure Chemicals Ind. Ltd., Osaka, Japan

Versuchstiere:

Mäuse:	C57BL/6 male 8-10 weeks, Shimizu Laboratory Supplies Co. Ltd., Kyoto, Japan
--------	--

6.6.2 Vorarbeiten

Stimulation mit Thioglycollate-Medium

Zur Stimulation des Immunsystems der Versuchstiere und somit zur Verbesserung der Ausbeute an Makrophagen wurde den Mäusen 72 h vor dem Experiment 3 ml steriles Thioglycollate Medium in das Abdomen injiziert. Der im Medium enthaltene Hefeextrakt und das Caseinpepton sind für die Immunstimulation verantwortlich⁴⁹¹.

Coating mit Poly-L-Lysin

Die im Experiment benötigten Flexiperm[®]-Schablonen wurden vor der Verwendung mit Poly-L-Lysin gecoatet, um ein Anwachsen der Makrophagen an der Flexiperm[®]-Wand zu verhindern. Hierzu wurde zunächst eine autoklavierte Schablone unter sterilen Bedingungen so auf einen keimfreien Objektträger gedrückt, dass 2 der 4 Kammern abgedichtet wurden und sich kein Blasen mehr zwischen Glasobjektträger und dem Kunststoff der Schablone befanden. In die abgedichteten Kammern wurden je 400 µl Poly-L-Lysin Lösung (10 µg/ml) eingefüllt, die zuvor durch Verdünnung einer Stammlösung (10 mg/ml) hergestellt wurde. Die Einwirkzeit der Lösung betrug 1-3 h. Anschließend wurde die Coating-Lösung entfernt und die Kammern zweimal mit dest. Wasser gespült. Aus Transportgründen wurde die Schablone vor den nachfolgenden Schritten in eine Kulturschale (10 cm) überführt.

6.6.3 Isolation der Mäusemakrophagen

Die Makrophagen wurden aus männlichen C57BL/6-Mäusen (8-10 Wochen) nach folgenden Schritten gewonnen.

- Entfernung des Bauchfells der getöteten Mäuse unter keimarmen Bedingungen, (ohne Beschädigung der eigentlichen Bauchdecke)
- Injektion von 5-6 ml FCS-freie RPMI-Lösung mittels einer normalen 10 ml Spritze mit spezieller Kanüle in den Bauchraum des Nagers (ohne Verletzung des Darms oder größerer Blutgefäße der Bauchdecke)
- Massieren der Mäuseflanken zur besseren Verteilung der Lösung im Abdomen des Nagers
- Aufziehen des RPMI-Medium aus der Bauchhöhle der Maus mittels der 10 ml Spritze und Überführung des gewonnenen Mediums in ein auf Eis gelagertes, mit FCS-gecoatetes 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Wiederholung der letzten beiden Schritte mit 4-5 ml RPMI-Medium
- Zentrifugation (1200 rpm, 5 min, Kubota 2010) der gewonnenen Zellsuspension zur Verringerung der Verunreinigung der Makrophagen durch Mastzellen und Erythrozyten
- Absaugen der überstehende Lsg. und Resuspension des Pellet in 12 ml FCS-freiem Medium
- zweimalige Wiederholung des Waschvorgangs und anschließende Aufnahme des Pellets in 10 ml RPMI-Medium (1 % FCS)

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde diejenige Menge Medium, die ca. 0,5 Mio. Makrophagen enthielt, in jeweils zwei von vier Flexiperm[®]-Kammern, die durch einen

Objektträger abgedichtet wurden, gegeben und das Gesamtvolumen mit RPMI-Lösung auf 400 μM aufgefüllt. Die Inkubationszeit (bei 37 °C und 5 % CO_2 -Atmosphäre) zum Anwachsen der Makrophagen auf den Glasboden der Kammern betrug 2h. Kurz vor Beginn der eigentlichen Messung wurde das Medium nach 2-3 Spülvorgängen durch HBSS ersetzt.

6.6.4 Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Makrophagen

Vor dem eigentlichen Experiment mussten die Zellen zunächst mit dem Fluoreszenzmarker Fura-2 **89** geladen werden. Hierzu wurde der Hank's Puffer (HBSS) unter Lichtschutz gegen 400 μl einer 2,5 μM Fura-2-Lösung ausgetauscht, die Kulturschalen in Alufolie verpackt und für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (CO_2 freie Atmosphäre). Unmittelbar vor der Messung wurde die Fura-2-Lösung entfernt, die Kammern mit 2 x 400 μl HBSS gespült und mit 450 μl des gleichen Puffers aufgefüllt. Nach vorsichtiger Überführung der Flexiperm[®]-Schablone auf den Objektträgertisch des invertierten Mikroskops, wurde zunächst ein geeignet Bereich des Zellrasens, der halbwegs isoliert liegenden oder kleine Zellverbände von Makrophagen aufwies, ausgewählt. Nach Auswahl mittels Argus HiSCA Software von circa 30 Zellen, deren Fluoreszenzverhalten während des Versuches aufgezeichnet werden sollte, erfolgte die Stimulation der Zellen mit 50 μl der jeweiligen Substanzlösung. Im Fall der Zellstimulation in Anwesenheit eines Antagonisten der nAChR wurde die Fura-2-Lösung gegen 450 μl einer Lösung des entsprechenden Antagonisten in HBSS ausgetauscht. Für die Antagonisten MLA **14** und DH β E **29** wurden 10 min Inkubationszeit, für α -Bgt **4** 30 min und für alle anderen Substanzlösungen 20 min Inkubationszeit eingehalten.

6.6.5 Kamerasystem

Das zur Anregung des Fluoreszenzmarkers benötigte Licht wurde von einer „Xenon arc Lampe“ mit nachgeschalteten Monochromator erzeugt. Die Anregungswellenlänge alternierte zwischen 340 und 380 nm. Die im ausgewählten Bereich der Makrophagen-Zellschicht von Fura-2 **89** emittierte Wellenlänge (510 nm) wurde gefiltert und alle 5 s

über eine HiSCA CCD Kamera mit dem dazugehörigen HiSCA CCD Kamera Kontroller aufgenommen und über eine Hamamatsu High Speed gated Image intensive unit verstärkt. Die Umsetzung und Auswertung der Signale erfolgte über eine Argus HiSCA Software auf einem PC mit Win 95 Betriebssystem.

6.6.6 Versuchsauswertung

Zur Versuchsauswertung wurde zunächst die von der Argus HiSCA Software erstellte Textdatei in Microsoft Excel übertragen. Die Daten von Zellen, die keine Reaktion auf den Stimulus durch die Testsubstanz zeigten, wurden aus dem Datensatz des jeweiligen Einzelexperimentes entfernt. Anschließend erfolgte eine Mittelwertbildung der Fluoreszenzintensitäten der verbleibenden Zellen für den jeweils gleichen Messzeitpunkt (Datenaufzeichnung aller 5s). Verschiedene Datensätze eines Versuchstages für die gleiche Testsubstanz wurden nach Angleichung des jeweiligen Startzeitpunktes gemittelt. Dies ist lediglich für Einzelexperimente mit gleichem Versuchsablauf eines Tages möglich, da die Ergebnisse aus einer einheitlichen Makrophagen-Population erzeugt wurden. Daten, die aus Experimenten mit Makrophagen aus verschiedenen Mäusen entstammten, können aufgrund möglicher unterschiedlicher Zelleigenschaften nicht zusammengefasst werden.

Die bearbeiteten Daten wurden in das Programm Origin 6.0 bzw. 7.5 übertragen und ihr Kurvenverlauf graphisch dargestellt. Die Kurven wurde mit Hilfe der Origin-Funktion „Smoothing: Adjacent Averaging“ geglättet.

Ein Vergleich der Einzelexperimente ist lediglich über die Ermittlung der maximalen Änderung der Fluoreszenzintensität möglich ($\text{ratio}_{\max} - \text{ratio}_{\min}$). Diese Werte werden in Bezug zu der maximalen Änderung der Fluoreszenzintensität einer Nicotinlösung (1 mM) gesetzt und als Werte in Prozent der Nicotinkontrolle angegeben.

7 Abkürzungsverzeichnis

(±)-[³ H]-Epi	Tritium markiertes (±)-Epibatidin
5-HT ₃ R	5-Hydroxytryptamin-Typ 3-Rezeptor (Serotoninrezeptor)
α-Bgt	α-Bungarotoxin
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AM	Acetoxymethylester (von Fura-2)
APL	allosterisch potenzierende Liganden
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumperoxosulfat
b	breit
BAPTA	[(2-{2-[2-(Bis-carboxymethyl-amino)-phenoxy]-ethoxy}-phenyl)-carboxymethyl-amino]-essigsäure
BBB	Blut-Hirnschranke (Blood-brain barrier)
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
C	Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphate
CCh	Carbachol (Carbamoylcholin)
Ch	Cholin
CHCl ₃	Chloroform
ChE	Cholinesterase
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
d	Duplett
δ	Verschiebung, Deformationsschwingung
DC	Dünnschichtchromatographie
dt	Duplett vom Triplett
DiBoc	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat

DH β E	Dihydro- β -erythroidin
DMCC	N,N-Dimethylcarbamoylcholin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Semimaximale Hemmkonzentration (funktioneller Assay)
ECL	enhanced chemiluminescence
EGTA	Ethyleneglycol-bis-(2-aminoethyl)- N, N, N', N'-tetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisierung (electron impact)
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
F12	Nutrient mixture F12 ham
FBS	Fetales Rinderserum (fetal bovine serum) = FCS
FCS	Fetales Kalbsserum (fetal calf serum) = FBS
FDA	United States Food and Drug Administration
GABA _A	γ -Aminobuttersäure-Typ A-Rezeptor
GABA _B	γ -Aminobuttersäure-Typ B-Rezeptor
gef.	gefunden
GTS-21	3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)-anabasein
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser, Kristallwasser
[³ H]-MLA	[³ H]-Methyllycaconitin
HBA	Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor (hydrogenbond acceptor)
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure, Hydrochlorid
HEK	Humane embryonale Nierenzelle (human embryonic kidney cells)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
Hz	Hertz (SI-Einheit für Frequenz)
IBD	entzündliche Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease)
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
IP ₃	Inositoltriphosphat
IR	Infrarotspektrum, Infrarotspektroskopie

IU	international units (internationale Einheiten)
i.v.	intravenös
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kelvin
k.A.	keine Angaben (z.B. in der Literatur)
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
k_d	Dissoziationskonstante
k_i	Inhibitionskonstante
LSC	Flüssigkeits-Szintillations-Messung (liquid scintillation counting)
Lsg	Lösung
M	Molar
m	Multiplett
mA	Milliampere
mAChR	muskarinische Acetylcholinrezeptor(en)
MAO	Monoaminoxidase
max.	maximal
MCC	N-Methylcarbamoylcholin
Me	Methyl-
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLA	Methyllycaconitin
mmol	Millimol
mOsm	Milliosmol
Mr	relative Molekülmasse
MS	Massenspektrum, Massenspektroskopie
mV	Millivolt
MWG	Massenwirkungsgesetz
n	Anzahl durchgeführter Versuche

N	Normal
nAChR	nicotinsche Acetylcholinrezeptor(en)
NaOH	Natronlauge
NaN ₃	Natriumazid
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
n.b.	nicht bestimmt
NCB	nicht kompetitive Blocker
ng	Nanogramm
NGF	nerve growth factor
nm	Nanometer
NMR	Nuklear Magnetische Resonanz
NP	Norio Plasmid (Prof. Norio Sakai)
NSAR	nicht steroidale Antirheumatika
OPA	Operationsverstärker (operation amplifier)
org.	organisch
PBS	Phosphat gepufferte Salze (Phosphate buffered salts)
PBS-T	Phosphat gepufferte Salze plus Triton X-100
PC-12	Zelllinie: rat adrenal phaeochromocytoma cell
Ph	Phenyl-
PIP ₂	Phosphatidyl-inosit-4,5-Diphosphat
PLC	Phosphorlipase C
pM	Pikomolar
PNS	peripheres Nervensystem
P/S	Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100µg/ml
PSMF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Serin-Protease-Inhibitor)
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
q	Quartett
quin	Quintett
rel. Ak.	relative Enzymaktivität
R _f	Rückkopplungswiderstand
Rf	Ratio of fronts
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett/ Sekunde(n)
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehungen
SEM	standard error of the mean
SDS	Natriumlaurylsulfat
SH-SY5Y	humane Neuroblastom-Zelllinie
Smp.	Schmelzpunkt
ssp.	Subspezies
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-ammonium
TTR	Enzym Transthyretin
TTX	Tetrodotoxin
U_{aus}	Ausgangsspannung
U_{pip}	Pipettenpotential (Pipettenspannung)
U_{soll}	Sollspannung (Kommandospannung)
V	Volt
ν	Valenzschwingung
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
VOCC	spannungs-abhängige Calciumkanäle (voltage-operated calcium channels)
VTA	ventrales tegmentales Areal
μM	mikromolar
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

-
- ¹ Mutschler E. Arzneimittelwirkung **2001**, 8. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart
- ² Langley J.N. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curare. *J Physiol.* **1905**, 33, 347-413
- ³ Langley J.N. On nerve endings and on special excitable substances in cells. *Proc R Soc London Ser. B*, **1906**, 78, 170-84
- ⁴ Dale H.H. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther.* **1914**, 6, 147-90
- ⁵ <http://www.ebi.ac.uk/compneur-srv/LGICdb/LGICdb.php>
- ⁶ Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience* **2002**, 3, 102-13
- ⁷ Changeux J.-P.; Edelstein S.J. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* **1998**, 21, 959-80
- ⁸ Kao P.N.; Karlin A. Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem.* **1986**, 261, 8085-88
- ⁹ Humphrey P.P.A.; Barnard E.A. International union of pharmacology XIX. The IUPHAR receptor code: a proposal for an alphanumeric classification system. *Pharmacol Rev.* **1998**, 50, 271-7
- ¹⁰ Ortells M.O.; Lund G.G. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* **1995**, 18, 121-7
- ¹¹ the ligand gated ion channel database <http://www.pasteur.fr/units7neubiomol/LGIC.html>
- ¹² Arias H.R. Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochem Int.* **2000**, 36, 595-645
- ¹³ Stroud R.M.; McCartly M.P.; Shuster M. Nicotinic acetylcholine receptor superfamily of ligand-gated ion channels. *Biochemistry* **1990**, 29, 11009-23
- ¹⁴ Karlin A.; Akabas M.H. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptor and their cousins. *Neuron* **1995**, 15, 1231-44
- ¹⁵ Unwin N. Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the α subunit. *J Mol Biol.* **1996**, 257, 586-96
- ¹⁶ Bertrand D.; Changeux J.-P. Nicotinic receptor: an allosteric protein specialized for intercellular communication. *The Neuroscience* **1995**, 7, 75-90
- ¹⁷ Valor L.M.; Mulet J.; Sala F.; Sala S.; Ballesta J.J.; Criado M. Role of the large cytoplasmic loop of the alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit in receptor expression and function. *Biochemistry* **2002**, 41, 7931-8
- ¹⁸ Sakmann B. Nobel Lecture: Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Neuron* **1992**, 8, 613-29
- ¹⁹ Levitan I.B. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Ann Rev*

Physiol. **1994**, 56, 193-212

²⁰ Itier V.; Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Lett.* **2001**, 504, 118-25

²¹ <http://de.wikipedia.org/wiki/Fliegenpilz>

²² Anand R.; Conroy W.G.; Schoepfer R.; Whiting P.; Lindstrom J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J Biol Chem.* **1991**, 266, 11192-98

²³ Cooper S.T.; Millar N.S. Host cell-specific folding and assembly of neuronal nicotinic receptor $\alpha 7$ subunit. *J Neurochem.* **1997**, 68, 2140-51

²⁴ Utsugisawa K.; Nagane Y.; Obara D.; Tohgi H. Overexpression of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor prevents G1-arrest and DNA fragmentation in PC12 cells after hypoxia. *J Neurochem.* **2002**, 81, 497-505

²⁵ Corringer P.J.; Le Novère N.; Changeux J.-P. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2000**, 40, 431-58

²⁶ Decker M.; Brioni J.; Bannon A.; Arneric S. Diversity of neuronal nicotinic Acetylcholine Receptors: Lessons from Behaviour and Implications for CNS Therapeutics. *Life Sci.* **1995**, 56, 545-70

²⁷ Paterson D.; Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol.* **2000**, 61, 75-111

²⁸ Le Novère N.; Changeux J.-P. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: An example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol.* **1995**, 40, 155-72

²⁹ Changeux J.-P. Der Acetylcholin-Rezeptor. Goody R. S., Proteine. **1995**, Spektrum Akadem. Verlag, Heidelberg Berlin Oxford

³⁰ Silvilotti L.; Colquhoun D. Acetylcholine receptors: too many channels, too few functions. *Science* **1995**, 269, 1681-82

³¹ Reynolds J.A.; Karlin A. Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* **1978**, 17, 2035-38

³² Role L.W. Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. *Curr Opin Neurobiol.* **1992**, 2, 254-62

³³ Lloyd G.K.; Williams M. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as novel drug targets. *J Pharmacol Exp Ther.* **2000**, 292, 461-7

³⁴ Sargent P.B. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci.* **1993**, 16, 403-43

³⁵ Goldner F.M.; Dineley K.T.; Patrick J.W. Immunohistochemical localization of the nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 6$. *Neuroreport* **1997**, 8, 2739-42

³⁶ McGehee D.S.; Role L.W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Ann Rev Physiol.* **1995**, 57, 521-46

³⁷ Garzanich V.; Anand R.; Lindstrom J. Homomers of $\alpha 8$ and $\alpha 7$ subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrast binding site properties. *Mol Pharmacol.* **1994**, 45, 212-20

³⁸ Paterson D.; Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol.* **2000**, 61,

- ³⁹ Lindstrom J. Nicotinic Acetylcholine Receptors. Encyclopedia of Life Sci. **2001**, Nature publishing group: www.els.net, Macmillan Publishers Ltd.
- ⁴⁰ Ortells M.O.; Lund G.G. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* **1995**, 18, 121-7
- ⁴¹ Gotti C.; Fornasari D.; Clementi F. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol.* **1997**, 53, 199-237
- ⁴² Palma E.; Bertrand S.; Binzoni T.; Bertrand D. Neuronal nicotinic alpha 7 receptor expressed in *Xenopus* oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine. *J Physiol.* **1996**, 491, 151-61
- ⁴³ Clarke P.B.; Schwartz R.D.; Paul S.M.; Pert C.B.; Pert A. Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [³H]acetylcholine, [³H]nicotine, and [¹²⁵I]-alpha-bungarotoxin. *J Neurosci.* **1985**, 5, 1307-15
- ⁴⁴ Orr-Urteger A.; Goldner F.M.; Saeki M.; Lorenzo I.; Goldberg L.; DeBaisi M.; Dani J.A.; Patrick J.W.; Beaudet A. Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J Neurosci.* **1997**, 17, 9165-71
- ⁴⁵ Reiter M.J.; Cowburn D.A.; Prives J.M.; Karlin A. Affinity labelling of the acetylcholine receptor in the electroplax: electrophoretic separation in sodium dodecyl sulphate. *Proc Natl Acad Sci. USA* **1972**, 69, 1168-72
- ⁴⁶ Kao P.N.; Dwork A.J.; Kaldany R.R.; Silver M.L.; Wideman J.; Stein S.; Karlin A. Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J Biol Chem.* **1984**, 259, 1662-5
- ⁴⁷ Galzi J.L.; Revah F.; Black D.; Goeldner M.; Hirth C.; Changeux J.-P. Identification of a novel amino acid alpha-tyrosine 93 within the cholinergic ligands-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligands-binding sites. *J Biol Chem.* **1990**, 265, 10430-7
- ⁴⁸ Middleton R.E.; Cohen J.B. Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: [³H]nicotine as an agonist photoaffinity label. *Biochemistry* **1991**, 30, 6987-97
- ⁴⁹ Schmitt J.D.; Sharples C.G.V.; Caldwell W.S. Molecular recognition in nicotinic acetylcholine receptors: the importance of π -cation interactions. *J Med Chem.* **1999**, 42, 3066-74
- ⁵⁰ Kurosaki T.; Fukuda K.; Konno T.; Mori Y.; Tanaka K.; Mishina M.; Numa S. Functional properties of nicotinic acetylcholine receptor subunits expressed in various combinations. *FEBS Lett.* **1987**, 214, 253-8
- ⁵¹ Blount P.; Merlie J.P. Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* **1989**, 3, 349-57
- ⁵² Sine S.M.; Claudio T. Gamma- and delta-subunits regulate the affinity and the cooperativity of ligand binding to the acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* **1991**, 266, 19369-77
- ⁵³ Sine S.M. Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of residues that determine curare selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**, 90, 9436-40
- ⁵⁴ Grutter T.; Changeux J.-P. Nicotinic receptors in wonderland. *Trends Biochem Sci.* **2001**, 26, 459-63

-
- ⁵⁵ Papke R.L. The kinetic properties of neuronal nicotinic receptors: genetic basis of functional diversity. *Prog Neurobiol.* **1993**, 41, 509-31
- ⁵⁶ Samochocki M.; Zerlin M.; Jostock R.; Groot Kormelink P.J.; Luyten W.H.; Albuquerque E.X.; Maelicke A. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of the human alpha4/beta2 nAChR. *Acta Neurol Scand Suppl.* **2000**, 176, 68-73
- ⁵⁷ Krause R.M.; Buisson B.; Bertrand S.; Corringer P.J.; Galzi J.L.; Changeux J.-P.; Bertrand D. Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* **1998**, 53, 283-94
- ⁵⁸ Buisson B.; Bertrand D. Allosteric modulation of neuronal nicotinic acetylcholine-receptors. *J Physiol. (Paris)* **1998**, 92, 89-100
- ⁵⁹ Maelicke A.; Albuquerque E.X. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 165-70
- ⁶⁰ Maelicke A.; Schrattenholz A.; Samochocki M.; Radina M.; Albuquerque E.X. Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* **2000**, 113, 199-206
- ⁶¹ Hogg R.C.; Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors and epilepsy, from genes to possible therapeutic compounds. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004**, 14, 1859-61
- ⁶² Valenzuela C.F.; Dowding A.J.; Arias H.R.; Johnson D.A. Antibody-induced conformational changes in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: a fluorescence study. *Biochemistry* **1994**, 33, 6586-94
- ⁶³ Pereira E.F.; Reinhardt-Maelicke S.; Schrattenholz A.; Maelicke A.; Albuquerque E.X. Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* **1993**, 265, 1474-91
- ⁶⁴ Pereira E.F.; Hilmas C.; Santos M.D.; Alkondon M.; Maelicke A.; Albuquerque E.X. Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *J Neurobiol.* **2002**, 53, 479-500
- ⁶⁵ Lena C.; Changeux J.-P. Allosteric modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Neurosci.* **1993**, 16, 181-6
- ⁶⁶ Nishizaki T.; Ikeuchi Y.; Matsuoka T.; Sumikawa K. Short-term depression and long-term enhancement of ACh-gated channel currents induced by linoleic and linolenic acid. *Brain Res.* **1997**, 751, 253-8
- ⁶⁷ Garbus I.; Bouzat C.; Barrantes F.J. Steroids differentially inhibit the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroreport* **2001**, 12, 227-31
- ⁶⁸ Gentry C.L.; Lukas R.J. Local anaesthetics noncompetitively inhibit function of four distinct nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* **2001**, 299, 1038-48
- ⁶⁹ Lopez M.G.; Fonteriz R.I.; Gandia L.; de la Fuente M.; Villarroya M.; Garcia-Sancho J.; Garcia A.G. The nicotinic acetylcholine receptor of the bovine chromaffin cell, a new target for dihydropyridines. *Eur J Pharmacol.* **1993**, 247, 199-207
- ⁷⁰ Miwa J.M.; Ibanez-Tallon I.; Crabtree G.W.; Sanchez R.; Sali R.; Role L.W.; Heintz N. Lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron*

1999, 23, 105-14

⁷¹ Han Z.Y.; Le Novere N.; Zoli M.; Hill J.A. Jr.; Champtiaux N.; Changeux J.-P. Localisation of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta*. *Eur J Neurosci.* **2000**, 12, 2664-74

⁷² Schröder H.; Wevers A. Nicotinic Acetylcholine Receptors in Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Disease Review* **1998**, 3, 20-27

⁷³ Chen S.J.; Spathis R.; Schmidt J. Binding sites for [3H]-acetylcholine and 125I-alpha-bungarotoxin in the optic ganglion of *Loligo pealii*. *Comp Biochem Physiol C.* **1988**, 90, 317-23

⁷⁴ Salpeter M.M.; Loring, R.H. Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Prog Neurobiol.* **1985**, 25, 297-325

⁷⁵ Raftery M.A.; Vandlen R.L.; Reed K.L.; Lee T. Characterization of *Torpedo californica* acetylcholine receptor: its subunit composition and ligand-binding properties. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **1976**, 40, 193-202

⁷⁶ Sharples C.G.V.; Wonnacott S. Neuronal nicotinic receptors. *Tocris reviews* **2001**, 19

⁷⁷ www.sanctuaries.nos.noaa.gov/pgallery/pgchannel/living/living_30.html

⁷⁸ Romano S.J.; Pugh P.C.; McIntosh J.M.; Berg D.K. Neuronal-type acetylcholine receptors and regulation of $\alpha 7$ gene expression in vertebrate skeletal muscle. *J Neurobiol.* **1997**, 32, 69-80

⁷⁹ Grando S.A. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc.* **1997**, 2, 41-8

⁸⁰ Maus A.D.; Pereira E.F.; Karachunski P.I.; Horton R.M.; Navaneetham D.; Macklin K.; Cortes W.S.; Albuquerque E.X.; Conti-Fine B.M. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* **1998**, 54, 779-88

⁸¹ Flora A.; Schulz R.; Benfante R.; Battaglioli E.; Terzano S.; Clementi F.; Fornasario D. Transcriptional regulation of the human $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit gene in neuronal and non-neuronal tissues. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 85-95

⁸² De Baisi M.; Nigro F.; Xu W. Nicotinic acetylcholine receptors in the autonomic control of bladder function. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 137-40

⁸³ Nguyen V.T.; Hall L.L.; Gallacher G.; Ndoeye A.; Jolkovsky D.L.; Webber R.J.; Buchli R.; Grando S.A. Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res.* **2000**, 79, 939-49

⁸⁴ Skok M.V.; Kalashnik E.N.; Koval L.N.; Tsetlin V.I.; Utkin Y.N.; Changeux J.-P.; Grailhe R. Functional nicotinic acetylcholine receptors are expressed in B lymphocyte-derived cell lines. *Mol Pharmacol.* **2003**, 64, 885-9

⁸⁵ Wang H.; Yu M.; Ochani M.; Amella C.A.; Tanovic M.; Susarla S.; Li J.H.; Wang H.; Yang H.; Uilola L.; Al-Abed Y.; Czura C.J.; Tracey K.J. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* **2003**, 421, 384-8

⁸⁶ Elgoyhen A.B.; Johnson D.S.; Boulter J.; Vetter D.E.; Heinemann S. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* **1994**, 79, 705-15

⁸⁷ Lustig L.R.; Peng H.; Hiel H.; Yamamoto T.; Fuchs P.A. Molecular cloning and mapping of the human

nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 10$ (CHRNA10). *Genomics* **2001**, 73, 272-83

⁸⁸ Baker E.R.; Zwart R.; Sher E.; Millar N.S. Pharmacological properties of $\alpha 9/\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors revealed by heterologous expression of subunit chimeras. *Mol Pharmacol.* **2004**, 65, 453-60

⁸⁹ Macklin K.D.; Maus A.D.; Pereira E.F.; Albuquerque E.X.; Conti-Fine B.M. Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **1998**, 287, 435-9

⁹⁰ Wang N.; Orr-Urtreger A.; Chapman J.; Rabinowitz R.; Nachman R.; Korczyn A.D. Autonomic function in mice lacking $\alpha 5$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit. *J Physiol.* **2002**, 542, 347-54

⁹¹ Poth K.; Nutter T.J.; Cuevas J.; Parker M.J.; Adams D.J.; Luetje C.W. Heterogeneity of nicotinic receptor class and subunit mRNA expression among individual parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia. *J Neurosci.* **1997**, 17, 586-96

⁹² Xu W.; Gelber S.; Orr-Urtreger A.; Armstrong D.; Lewis R.A.; Ou C.N.; Patrick J.; Role L.; De Biasi M.; Beaudet A.L. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the $\alpha 3$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, 96, 5746-51

⁹³ Xu W.; Orr-Urtreger A.; Nigro F.; Gelber S.; Sutcliffe C.B.; Armstrong D.; Patrick J.W.; Role L.W.; Beaudet A.L.; De Biasi M. Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the $\beta 2$ and the $\beta 4$ subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* **1999**, 19, 9298-305

⁹⁴ Ji S.; Tosaka T.; Whitfield B.H.; Katchman A.N.; Kandil A.; Knollmann B.C.; Ebert S.N. Differential rate responses to nicotine in rat heart: evidence for two classes of nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002**, 301, 893-9

⁹⁵ Richardson C.E.; Morgan J.M.; Jasani B.; Green J.T.; Rhodes J.; Williams G.T.; Lindstrom J.; Wonnacott S.; Thomas G.A.; Smith V. Megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome and the absence of the $\alpha 3$ nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Gastroenterology* **2001**, 121, 350-7

⁹⁶ Zoli M.; Lena C.; Picciotto M.R.; Changeux J.-P. Identification of four classes of brain nicotinic receptors using $\beta 2$ mutant mice. *J Neurosci.* **1998**, 18, 4461-72

⁹⁷ Marks M.J.; Stitzel J.A.; Romm E.; Wehner J.M.; Collins A.C. Nicotinic binding sites in rat and mouse brain: comparison of acetylcholine, nicotine, and α -bungarotoxin. *Mol Pharmacol.* **1986**, 30, 427-36

⁹⁸ Clarke P.B.; Hamill G.S.; Nadi N.S.; Jacobowitz D.M.; Pert A. ^3H -nicotine- and ^{125}I - α -bungarotoxin-labeled nicotinic receptors in the interpeduncular nucleus of rats. II. Effects of habenular deafferentation. *J Comp Neurol.* **1986**, 251, 407-13

⁹⁹ Clarke P.B.; Schwartz R.D.; Paul S.M.; Pert C.B.; Pert A. Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of ^3H acetylcholine, ^3H nicotine, and ^{125}I - α -bungarotoxin. *J Neurosci.* **1985**, 5, 1307-15

¹⁰⁰ Wang, D.X.; Abood L.G. Expression and characterization of the rat $\alpha 4 \beta 2$ neuronal nicotinic cholinergic receptor in baculovirus-infected insect cells. *J Neurosci Res.* **1996**, 44, 350-4

¹⁰¹ Conroy W.G.; Berg D.K. Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors

distinguished by different subunit compositions. *J Biol Chem.* **1995**, 270, 4424-31

¹⁰² Perry E.; Martin-Ruiz C.; Lee M.; Griffiths M.; Johnson M.; Piggott M.; Haroutunian V.; Buxbaum J.D.; Nasland J.; Davis K.; Gotti C.; Clementi F.; Tzartos S.; Cohen O.; Soreq H.; Jaros E.; Perry R.; Ballard C.; McKeith I.; Court J. Nicotinic receptor subtypes in human brain aging, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 215-22

¹⁰³ Le Novere N.; Zoli M.; Changeux J.-P. Neuronal nicotinic receptor alpha 6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur J Neurosci.* **1996**, 8, 2428-39

¹⁰⁴ Champtiaux N.; Gotti C.; Cordero-Erausquin M.; David D.J.; Przybylski C.; Lena C.; Clementi F.; Moretti M.; Rossi F.M.; Le Novere N.; McIntosh J.M.; Gardier A.M.; Changeux J.-P. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci.* **2003**, 23, 7820-9

¹⁰⁵ Flores C.M.; DeCamp R.M.; Kilo S.; Rogers S.W. Hargreaves K.M. Neuronal nicotinic receptor expression in sensory neurons of the rat trigeminal ganglion: demonstration of alpha3beta4, a novel subtype in the mammalian nervous system. *J Neurosci.* **1996**, 16, 7892-901

¹⁰⁶ Ramirez-Latorre J.; Yu C.R.; Qu X.; Perin F.; Karlin A. Role L. Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* **1996**, 380, 347-51

¹⁰⁷ Wada E.; Wada K.; Boulter J.; Deneris E.; Heinemann S.; Patrick J.; Swanson L.W. Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol.* **1989**, 284, 314-35

¹⁰⁸ Jackson M.B. Single channel currents in the nicotinic acetylcholine receptor: a direct demonstration of allosteric transitions. *Trends Biochem Sci.* **1994**, 19, 396-99

¹⁰⁹ Galzi J.L.; Changeux, J.-P. Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* **1995**, 34, 563-82

¹¹⁰ Auerbach A.; Akk G. Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two gate mechanism. *J Gen Physiol.* **1998**, 112, 181-97

¹¹¹ Quik M.W.; Lester R.A.J. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol.* **2002**, 53, 457-78

¹¹² Léna C.; Changeux J.-P. Allosteric nicotinic receptors, human pathologies. *J Physiol.* **1998**, 92, 63-74

¹¹³ Buisson B.; Bertrand D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends Pharmacol Sci.* **2002**, 23, 130-6

¹¹⁴ Picciotto M.R.; Caldarone B.J.; King S.L.; Zachariou V. Nicotinic receptors in the brain: Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology* **2000**, 22, 451-65

¹¹⁵ Newhouse P.A.; Kelton M. Nicotinic systems in central nervous systems disease: degenerative disorders and beyond. *Pharm Acta Helv.* **2000**, 74, 91-101

¹¹⁶ Collerton D. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **1986**, 19, 1-28

¹¹⁷ Pschyrembel, Medizinisches Wörterbuch, 257. Aufl., **1994**, Nikol Verlagsgesellschaft mbH, Hamburg

¹¹⁸ Bartus R.T.; Dean R.L.D.; Beer B.; Lippa A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory

dysfunction. *Science* **1982**, 217, 408-14

¹¹⁹ Terry A.V. Jr.; Buccafusco J.J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther.* **2003**, 306, 821-7

¹²⁰ Warpman U.; Nordberg A. Epibatidine and ABT 418 reveal selective losses of alpha 4 beta 2 nicotinic receptors in Alzheimer brains. *Neuroreport* **1995**, 6, 2419-23

¹²¹ Whitehouse P.J.; Martino A.M.; Wagster M.V.; Price D.L.; Mayeux R.; Atack J.R.; Kellar K.J. Reductions in [3H]nicotinic acetylcholine binding in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: an autoradiographic study. *Neurology* **1988**, 38, 720-3

¹²² Hellström-Lindahl E.; Mousavi M.; Zhang X.; Ravid R.; Nordberg A. Regional distribution of nicotinic receptor subunit mRNAs in human brain: comparison between Alzheimer and normal brain. *Mol Brain Res.* **1999**, 66, 94-103

¹²³ van Duijn C.M.; Hofman A. Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease. *BMJ* **1991**, 302, 1491-94

¹²⁴ Brenner D.E.; Kukull W.A.; van Belle G.; Bowen J.D.; McCormick W.C.; Teri L.; Larson E.B. Relationship between cigarette smoking and Alzheimer's disease in a population-based case-control study. *Neurology* **1993**, 43, 293-300

¹²⁵ Li M.D.; Kane J.K.; Matta S.G.; Blaner W.S.; Sharp B.M. Nicotine enhances the biosynthesis and secretion of transthyretin from the coroid plexus in rats: implications for β -amyloid formation. *J Neurosci.* **2000**, 20, 1318-23

¹²⁶ Wang H.-Y.; Lee D.H.S.; D'Andrea M.R.; Peterson P.A.; Shank R.P.; Reitz A.B. β -Amyloid₁₋₄₂ binds to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. *J Biol Chem.* **2000**, 275, 5626-32

¹²⁷ Pettit D.L.; Shao Z.; Yakel J.L. β -Amyloid₁₋₄₂ peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci.* **2001**, 21, 1-5

¹²⁸ Mustazza C.; Borioni A.; Del Giudice M.R.; Gatta F.; Ferretti R.; Meneguz A.; Volpe M.T.; Lorenzini P. Synthesis and cholinesterase activity of phenylcarbamates related to Rivastigmine, a therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* **2002**, 37, 91-109

¹²⁹ Hughes J.R.; Hatsukami D.K.; Mitchell J.E.; Dahlgren L.A. Prevalence of smoking among psychiatric outpatients. *Am J Psychiatry* **1986**, 143, 993-7

¹³⁰ Lohr J.B.; Flynn K. Smoking and schizophrenia. *Schizophr Res.* **1992**, 8, 93-102

¹³¹ Dalack G.W.; Meador-Woodruff J.H. Smoking, smoking withdrawal and schizophrenia: case reports and a review of the literature. *Schizophr Res.* **1996**, 22, 133-41

¹³² Dalack G.W.; Healy D.J.; Meador-Woodruff J.H. Nicotine dependence in schizophrenia: Clinical phenomena and laboratory findings. *Am J Psychiatry* **1998**, 155, 1490-1501

¹³³ Luntz-Leybman V.; Bickford P.; Freedman R. Cholinergic gating of response to auditory stimuli in rat hippocampus. *Brain Res.* **1992**, 587, 130-6

¹³⁴ Freedman R.; Hall M.; Adler L.E.; Leonard S. Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry* **1995**, 38, 22-33

-
- ¹³⁵ Leonard S.; Breese C.; Adams C.; Benhammou K.; Gault J.; Stevens K.; Lee M.; Adler L.; Olincy A.; Ross R.; Freedman R. Smoking and schizophrenia: abnormal nicotinic receptor expression. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 237–42
- ¹³⁶ Freedman R.; Coon H.; Myles-Worsley M.; Orr-Urteger A.; Olincy A.; Davis A.; Polymeropoulos M.; Holik J.; Hopkins J.; Hoff M.; Rosenthal J.; Waldo M.C.; Reinherr F.; Wender P.; Yaw J.; Young D.A.; Breese C.R.; Adams C.; Patterson D.; Adler L.E.; Kruglyak L.; Leonard S.; Byerley W. Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc Natl Acad Sci. USA* **1997**, 94, 587-92
- ¹³⁷ Ryan R.E.; Loiacono R.E. Nicotinic receptor subunit mRNA in the thalamus of the rat: relevance to schizophrenia? *Neuroreport* **2000**, 11, 3693-8
- ¹³⁸ Silver A.A.; Sandberg P.R. Transdermal nicotine patch and potentiation of haloperidol in Tourette's syndrome. *Lancet* **1995**, 342, 182-3
- ¹³⁹ McConville B.J.; Sandberg P.R.; Fogelson H.M.; King J.; Cirino P.; Parker K.W. The effects of nicotine plus haloperidol compared to nicotine only and placebo nicotine only in reducing tic severity and frequency in Tourette's disorder. *Biol Psychiatry* **1992**, 31, 832-40
- ¹⁴⁰ Olale F.; Gerzanich V.; Kuryatov A.; Wang F.; Lindstrom J. Chronic nicotine exposure differentially affects the function of human alpha3, alpha4, and alpha7 neuronal nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* **1997**, 283, 675-83
- ¹⁴¹ Paterson D.; Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol.* **2000**, 61, 75-111
- ¹⁴² Sanberg P.R.; Shytle R.D.; Silver A.A. Treatment of Tourette's syndrome with mecamylamin *Lancet* **1998**, 352, 705-6
- ¹⁴³ Levin E.D.; Rezvani A.H. Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 141-6
- ¹⁴⁴ Pomerlau O.F.; Downey K.K.; Stelson F.W.; Pomerlau C.S. Cigarette smoking in adult patients diagnosed with attention deficit hyperactivity disorder. *J Subst Abuse* **1995**, 7, 373-8
- ¹⁴⁵ Wilens T.E.; Biederman J.; Spencer T.J.; Bostic J.; Prince J.; Monuteaux M.C.; Soriano J.; Fine C.; Abrams A.; Rater M.; Polisner D. A pilot controlled clinical trial of ABT-418, a cholinergic agonist, in the treatment of adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* **1999**, 156, 1931-7
- ¹⁴⁶ Phillips H.A.; Scheffer I.E.; Berkovic S.F.; Hollway G.E.; Sutherland G.R.; Mulley J.C. Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q 13.2. *Nat Genet.* **1995**, 10, 117–8
- ¹⁴⁷ Phillips H.A.; Favre I.; Kirkpatrick M.; Zuberi S.M.; Goudie D.; Heron S.E.; Scheffer I.E.; Sutherland G.R.; Berkovic S.F.; Bertrand D.; Mulley J.C. CHRN2 is the second acetylcholine receptor subunit associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Am J Hum Genet.* **2001**, 68, 225–31
- ¹⁴⁸ Marubio L.M.; Changeux, J.-P. Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 113-21
- ¹⁴⁹ Steinlein O.K.; Deckert J.; Nothen M.M.; Franke P.; Maier W.; Beckmann H.; Propping P. Neuronal

nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit (CHRNA4) and panic disorder: an association study. *Am J Med Genet.* **1997**,74, 199-201

¹⁵⁰ Steinlein O.K.; Magnusson A.; Stoodt J.; Bertrand S.; Weiland S.; Berkovic S.F.; Nakken K.O.; Propping P.; Bertrand D. An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Hum Mol Genet.* **1997**, 6, 943-7

¹⁵¹ Steinlein O.K. Neuronal nicotinic receptors in human epilepsy. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 243-7

¹⁵² Raggenbass M.; Bertrand D. Nicotinic receptors in circuit excitability and epilepsy. *J Neurobiol.* **2002**, 53, 580-9

¹⁵³ Barrantes F.J.; Aztiria E.; Rauschemberger M.B.; Vasconsuelo A. The neuronal nicotinic acetylcholine receptor in some hereditary epilepsies. *Neurochem Res.* **2000**, 25, 583-90

¹⁵⁴ Lang A.E.; Lozano A.M. Parkinson's disease. *N Eng. J Med.* **1998**, 339,1130-43

¹⁵⁵ Baron J.A. Cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology* **1986**, 36, 1490-6

¹⁵⁶ Quik M.; Jeyarasasingam G. Nicotinic receptors and Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 223-30

¹⁵⁷ Moll H. The Treatment of postencephalitic Parkinsonism by nicotine. *Br Med J.* **1926**, 1, 1079-81

¹⁵⁸ Kulak J.M.; McIntosh J.M.; Quik M. Loss of nicotinic receptors in monkey striatum after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment is due to a decline in α -conotoxin MII sites. *Mol Pharmacol.* **2002**, 61, 230-8

¹⁵⁹ Champiaux E.; Han Z.-Y.; Bessis A.; Rossi F.M.; Zoli M.; Marubio L.; McIntosh J.M.; Changeux J.-P. Distribution and pharmacology of $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice. *J Neurosci.* **2002**, 22, 1208-17

¹⁶⁰ Charpentier E.; Barneoud P.; Moser P.; Besnard F.; Sgard F. Nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroreport* **1998**, 9, 3097-101

¹⁶¹ Quik M.; Polonskaya Y.; McIntosh J.M.; Kulak J.M. Differential nicotinic receptor expression in monkey basal ganglia: effects of nigrostriatal damage. *Neuroscience* **2002**, 112, 619-30

¹⁶² Fowler J.S.; Logan J.; Wang G.J.; Volkow N.D.; Telang F.; Zhu W.; Franceschi D.; Pappas N.; Ferrieri R.; Shea C.; Garza V.; Xu Y.; Schlyer D.; Gatley S.J.; Ding Y.S.; Alexoff D.; Warner D.; Netusil N.; Carter P.; Jayne M.; King P.; Vaska P. Low monoamine oxidase B in peripheral organs in smokers. *PNSA* **2003**, 20, 11600-5

¹⁶³ Arroyo-Jimenez M.M.; Bourgeois J.P.; Marubio L.M.; Le Sourd A.M.; Ottersen O.P.; Rinvik E.; Fairen A.; Changeux J.-P. Ultrastructural localization of the alpha4-subunit of the neuronal acetylcholine nicotinic receptor in the rat substantia nigra. *J Neurosci.* **1999**, 19, 6475-87

¹⁶⁴ Schneider J.S.; Tinker J.P.; Van Velson M.; Menzaghi F.; Lloyd G.K. Nicotinic acetylcholine receptor agonist SIB-1508Y improves cognitive functioning in chronic low-dose MPTP-treated monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* **1999**, 290, 731-9

¹⁶⁵ Potter A.; Corwin J.; Lang J.; Piasecki M.; Lenox R.; Newhouse P.A. Acute effects of the selective cholinergic channel activator (nicotinic agonist) ABT-418 in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology*

(Berl) **1999**, 142, 334-42

¹⁶⁶ Covey L.S.; Glassman A.H.; Stetner F. Cigarette smoking and major depression. *J Addict Dis.* **1998**, 17, 35-46

¹⁶⁷ Davis L.; Pollock L.J.; Stone T.T. Visceral pain. *Surg Gynecol Obstet.* **1932**, 55, 418-27

¹⁶⁸ Daly J.W.; Garraffo H.M.; Spande T.F.; Decker M.W.; Sullivan J.P.; Williams M. Alkaloids from frog skin: the discovery of epibatidine and the potential for developing novel non-opioid analgesics. *Nat Prod Rep.* **2000**, 17, 131-5

¹⁶⁹ Badio B.; Daly J.W. Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. *Mol Pharmacol.* **1994**, 45, 563-9

¹⁷⁰ Sullivan J.P.; Decker M.W.; Brioni J.D.; Donnelly-Roberts D.L.; Anderson D.A.; Bannon A.W.; Kang C.-H.; Adams P.; Piattoni-Kaplan M.; Buckley M.J.; Gopalakrishna M.; Williams M.; Arneric S.P. (\pm)-Epibatidine elicits a diversity of in vitro and in vivo effects mediated by nicotinic acetylcholine receptors *J Pharmacol Exp Ther.* **1994**, 271, 624-31

¹⁷¹ Damaj M.I.; Glassco W.; Aceto M.D.; Martin B.R. Antinociceptive and pharmacological effects of metanicotine, a selective nicotinic agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* **1999**, 291, 390-8

¹⁷² Bannon A.W.; Decker M.W.; Holladay M.W.; Curzon P.; Donnelly-Roberts D.; Puttfarcken P.S.; Bitner R.S.; Diaz A.; Dickenson A.H.; Porsolt R.D.; Williams M.; Arneric S.P. Broad-spectrum, non-opioid analgesic activity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Science* **1998**, 279, 77-81

¹⁷³ Decker M.W.; Curzon P.; Holladay M.W.; Nikkel A.L.; Bitner R.S.; Bannon A.W.; Donnelly-Roberts D.L.; Puttfarcken P.S.; Kuntzweiler T.A.; Briggs C.A.; Williams M.; Arneric S.P. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in antinociception: effects of ABT-594. *J Physiol. Paris* **1998**, 92, 221-4

¹⁷⁴ Marubio L.M.; del Mar Arroyo-Jimenez M.; Coredero-Erausquin M.; Léna C.; Le Novère N.; de Kerchove d'Exaerde A.; Huchet M.; Damaj M.I.; Changeux J.-P. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature* **1999**, 398, 805-10

¹⁷⁵ Holladay M.W.; Bai H.; Li Y.; Lin N.H.; Daanen J.F.; Ryther K.B.; Wasicak J.T.; Kincaid J.F.; He Y.; Hettinger A.M.; Huang P.; Anderson D.J.; Bannon A.W.; Buckley M.J.; Campbell J.E.; Donnelly-Roberts D.L.; Gunther K.L.; Kim D.J.; Kuntzweiler T.A.; Sullivan J.P.; Decker M.W.; Arneric S.P. Structure-activity studies related to ABT-594, a potent nonopioid analgesic agent: effect of pyridine and azetidine ring substitutions on nicotinic acetylcholine receptor binding affinity and analgesic activity in mice. *Bioorg Med Chem Lett.* **1998**, 8, 2797-802

¹⁷⁶ Peto R.; Lopez A.D.; Boreham J.; Thun M.; Heath C. Jr.; Doll R. Mortality from smoking worldwide. *Br Med Bull.* **1996**, 52, 12-21

¹⁷⁷ Hausteil K.O. Smoking tobacco, microcirculatory changes and the role of nicotine. *Int. J Clin Pharmacol Ther.* **1999**, 37, 76-85

¹⁷⁸ Rose J.E.; Corrigan W.A. Nicotine self-administration in animals and humans – similarities and differences. *Psychopharmacology* **1997**, 130, 24-40

¹⁷⁹ Henningfield J.E.; Miyasato K.; Jasinski D.R. Abuse liability and pharmacodynamic characteristics of intravenous and inhaled nicotine. *J Pharmacol Exp Ther.* **1985**, 234, 1-12

-
- ¹⁸⁰ Gentry C.L.; Lukas R.J. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord.* **2002**, 1, 359-85
- ¹⁸¹ Nordberg A.A. comparison of the (S)(-) and (R)(+) enantiomers of nicotine with respect to pharmacological and behavioral effects and receptor binding properties in experimental animal and man. *Med Chem Res.* **1993**, 2, 522-9
- ¹⁸² Mansvelter H.D.; McGehee D.S. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol.* **2002**, 53, 606-17
- ¹⁸³ Laviolette S.R.; van der Kooy D. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci.* **2004**, 5, 55-65
- ¹⁸⁴ Picciotto M.R.; Zoli M.; Rimondini R.; Léna C.; Marubio L.M.; Merlo Pich E.; Fuxe K.; Changeux J.-P. Acetylcholine receptors containing the beta-2 subunit are involved in the reinforcement properties of nicotine. *Nature* **1998**, 391, 173-7
- ¹⁸⁵ Gutzweiler F.; Bucher H. Rauchen und Rauchentwöhnung. *Ther. Umschau* **1994**, 51, 683-7
- ¹⁸⁶ Jick H.; Walker A.M. Cigarette smoking and ulcerative colitis. *N Engl J Med.* **1983**, 308, 261-3
- ¹⁸⁷ Guslandi M. Nicotine treatment for ulcerative colitis. *Br J Clin Pharmacol.* **1999**, 48, 481-4
- ¹⁸⁸ Thomas G.A.; Rhodes J.; Green J. Nicotine and gastrointestinal disease. *QJM* **1996**, 89, 485-8
- ¹⁸⁹ Galeazzi F.; Blennerhassett P.A.; Qiu B.; O'Byrne P.M.; Collins S.M. Cigarette smoke aggravates experimental colitis in rats. *Gastroenterology* **1999**, 117, 877-83
- ¹⁹⁰ Thomas G.A.; Rhodes J.; Green J.T.; Richardson C. Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Postgrad Med J.* **2000**, 76, 273-9
- ¹⁹¹ Bernik T.R.; Friedman S.G.; Ochani M.; DiRaimo R.; Ulloa L.; Yang H.; Sudan S.; Czura C.J.; Ivanova S.M.; Tracey K.J. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med.* **2002**, 195, 781-8
- ¹⁹² de Fiebre C.M.; Meyer E.M.; Henry J.C.; Muraskin S.I.; Kem W.R.; Papke R.L. Characterization of a series of anabaseine-derived compounds reveals that the 3-(4)-dimethylaminocinnamylidene derivative (DMAC) is a selective agonist at neuronal $\alpha 7/[^{125}\text{I}]\alpha$ -bungarotoxin receptor subtypes. *Mol Pharmacol.* **1995**, 47, 164-71
- ¹⁹³ Whiteaker P.; Sharples C.G.; Wonnacott S. Agonist-induced up-regulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in M10 cells: pharmacological and spatial definition. *Mol Pharmacol.* **1998**, 53, 950-62
- ¹⁹⁴ Dunn S.M.; Raftery M.A. Agonist binding to the Torpedo acetylcholine receptor. 2. Complexities revealed by association kinetics. *Biochemistry* **1997**, 36, 3854-63
- ¹⁹⁵ Alkondon M.; Pereira E.F.; Cortes W.S.; Maelicke A.; Albuquerque E.X. Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci.* **1997**, 9, 2734-42
- ¹⁹⁶ Papke R.L.; Bencherif M.; Lippiello P. An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neurosci Lett.* **1996**, 213, 201-4
- ¹⁹⁷ Jensen A.A.; Mikkelsen I.; Frølund B.; Bräuner-Osborne H.; Falch E.; Krogsgaard-Larsen P.

Carbamoylcholine homologs: Novel and potent agonists at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* **2003**, 64, 865-75

¹⁹⁸ Søkilde B.; Mikkelsen I.; Stensbøl T.B.; Andersen B.; Ebdrup S.; Krogsgaard-Larsen P.; Falch E. Analogues of carbacholine: synthesis and relationship between structure and affinity for muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors. *Arch. Pharm.* **1996**, 329, 95-104

¹⁹⁹ Falch E.; Mikkelsen I.; Krogsgaard-Larsen P. Carbamoyloxy amine compounds. **1996**, WO9608468

²⁰⁰ Hänsel R.; Sticher O.; Steinegger E. Pharmakognosie-Phytopharmazie. *Springer-Verlag*; 6. Aufl., **1999**

²⁰¹ Eiden F. Zur Geschichte der Tabakalkaloide. *Pharmaziein unserer Zeit* **1976**, 5, 1-18

²⁰² Wang D.X.; Booth H.; Lerner-Marmarosh N.; Osdene T.S.; Abood L. Structure-Activity relationships for nicotine analogs comparing competition for [3H]-nicotine binding and psychotropic potency. *Drug Dev Res.* **1998**, 45, 10-16

²⁰³ Gündisch D.; London E.D.; Terry P.; Hill G.R.; Mukhin A.G. High affinity binding of [3H]epibatidine to rat brain membranes. *Neuroreport* **1999**, 10, 1631-6

²⁰⁴ Mukhin A.G.; Gündisch D.; Horti A.G.; Koren A.O.; Tamagnan G.; Kimes A.S.; Chambers J.; Vaupel D.B.; King S.L.; Picciotto M.R.; Innis R.B.; London E.D. 5-Iodo-A-85380, an alpha4beta2 subtype-selective ligand for nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* **2000**, 57, 642-9

²⁰⁵ London E.D.; Ball M.J.; Waller S.B. Nicotinic binding sites in cerebral cortex and hippocampus in Alzheimer's dementia. *Neurochem Res.* **1989**, 14, 745-50

²⁰⁶ Damaj M.I.; Glassco W.; Dukat M. Pharmacology of Novel Nicotinic Analogs. *Drug Development Research* **1996**, 38, 177-187

²⁰⁷ Bunnelle W.H.; Dart M.J.; Schrimpf M.R. Design of ligands for the nicotinic acetylcholine receptor: the quest for selectivity. *Curr Top Med Chem.* **2004**, 4, 299-334

²⁰⁸ Dukat M.; Damaj I.M.; Young R.; Vann R.; Collins A.C.; Marks M.J.; Martin B.R.; Glennon R.A. Functional diversity among 5-substituted nicotine analogs; in vitro and in vivo investigations. *Eur J Pharmacol.* **2002**, 435, 171-80

²⁰⁹ Cosford N.D.P.; Bleicher L.; Vernier J.-M.; Chavez-Noriega L.; Rao T.S.; Siegel R.S.; Suto C.; Washburn M.; Lloyd G.K.; McDonald I.A. Recombinant human receptors and functional assays in the discovery of altinicline (SIB-1508Y), a novel acetylcholine-gated ion channel (nAChR) agonist. *Pharma Acta Helv.* **2000**, 74, 125-130

²¹⁰ Vernier J.M.; Holsenback H.; Cosford N.D.; Whitten J.P.; Menzaghi F.; Reid R.; Rao T.S.; Sacaan A.I.; Lloyd G.K.; Suto C.M.; Chavez-Noriega L.E.; Washburn M.S.; Urrutia A.; McDonald I.A. Conformationally restricted analogues of nicotine and anabasine. *Bioorg Med Chem Lett.* **1998**, 8, 2173-8

²¹¹ Acheson R.M.; Ferris M.J.; Sinclair N.M. Transformations involving the pyridine ring of nicotine. *J Chem Soc. Perkin Trans I.* **1980**, 579-85

²¹² Bencherif M.; Byerd G.; Caldwell W.S.; Hayers J.R.; Lippiello P.M. Pharmacological characterization of RJR-2403: a nicotinic agonist with potential therapeutic benefit in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Reviews* **1997**, 3, 325-45

-
- ²¹³ Bencherif M.; Lovette M.E.; Fowler K.W.; Arrington S.; Reeves L.; Caldwell W.S.; Lippiello P.M. RJR-2403: a nicotinic agonist with CNS selectivity. *J Pharmacol Exp Ther.* **1996**, 279, 1413-21
- ²¹⁴ Virginia Commonwealth Univ.: WO9907369, **1999**
- ²¹⁵ Damaj M.I.; Glassco W.; Aceto M.D.; Martin B.R. Antinociceptive and pharmacological effects of metanicotine, a selective nicotinic agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* **1999**, 291, 390-8
- ²¹⁶ Targacept: US20020052497, **2002**
- ²¹⁷ Bencherif M.; Bane A.J.; Miller C.H.; Dull G.M.; Gatto G.J. TC-2559: a novel orally active ligand selective at neuronal acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 409, 45-55
- ²¹⁸ Donnelly-Roberts D.L.; Xue I.C.; Arneric S.P.; Sullivan J.P. In vitro neuroprotective properties of the novel cholinergic channel activator (ChCA), ABT-418. *Brain Res.* **1996**, 719, 36-44
- ²¹⁹ Garvey D.S.; Wasicak J.T.; Decker M.W.; Brioni J.D.; Buckley M.J.; Sullivan J.P.; Carrera G.M.; Holladay M.W.; Arneric S.P.; Williams M. Novel isoxazoles which interact with brain cholinergic channel receptors have intrinsic cognitive enhancing and anxiolytic activities. *J Med Chem.* **1994**, 37, 1055-9
- ²²⁰ Papke R.L.; Thinschmidt J.S.; Moulton B.A.; Meyer E.M.; Poirier A. Activation and inhibition of rat neuronal nicotinic receptors by ABT-418. *Br J Pharmacol.* **1997**, 120, 429-38
- ²²¹ Lin N.H.; Gunn D.E.; Ryther K.B.; Garvey D.S.; Donnelly-Roberts D.L.; Decker M.W.; Brioni J.D.; Buckley M.J.; Rodrigues A.D.; Marsh K.G.; Anderson D.J.; Buccafusco J.J.; Prendergast M.A.; Sullivan J.P.; Williams M.; Arneric S.P.; Holladay M.W. Structure-activity studies on 2-methyl-3-(2(S)-pyrrolidinylmethoxy) pyridine (ABT-089): an orally bioavailable 3-pyridyl ether nicotinic acetylcholine receptor ligand with cognition-enhancing properties. *J Med Chem.* **1997**, 40, 385-90
- ²²² Decker M.W.; Bannon A.W.; Curzon P.; Gunther K.L.; Brioni J.D.; Holladay M.W.; Lin N.-H.; Li Y.; Daanen J.F.; Buccafusco J.J.; Prendergast M.A.; Jackson W.J.; Arneric S.P. ABT-089 [2-methyl-3-(2(S)-pyrrolidinylmethoxy)pyridine dihydro-chloride]: II. A novel cholinergic channel modulator with effects on cognitive performance in rats and monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* **1997**, 283, 247-58
- ²²³ Abreo M.A.; Lin N.H.; Garvey D.S.; Gunn D.E.; Hettinger A.M.; Wasicak J.T.; Pavlik P.A.; Martin Y.C.; Donnelly-Roberts D.L.; Anderson D.J.; Sullivan J.P.; Williams M.; Arneric S.P.; Holladay M.W.J. Novel 3-Pyridyl ethers with subnanomolar affinity for central neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem.* **1996**, 39, 817-25
- ²²⁴ Sullivan J.P.; Donnelly-Roberts D.; Briggs C.A.; Anderson D.J.; Gopalakrishnan M.; Piattoni-Kaplan M.; Campbell J.E.; McKenna D.G.; Molinari E.; Hettinger A.M.; Garvey D.S.; Wasicak J.T.; Holladay M.W.; Williams M.; Arneric S.P. A-85380 [3-(2(S)-azetidylmethoxy) pyridine]: in vitro pharmacological properties of a novel, high affinity alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptor ligand. *Neuropharmacology* **1996**, 35, 725-34
- ²²⁵ Boyce S.; Webb J.K.; Shephard S.L.; Russell M.G.; Hill R.G.; Rupniak N.M. Analgesic and toxic effects of ABT-594 resemble epibatidine and nicotine in rats. *Pain* **2000**, 85, 443-50
- ²²⁶ Kem W.R.; Mahnir V.M.; Papke R.L.; Lingle C.J. Anabaseine is a potent agonist on muscle and neuronal alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **1997**, 283, 979-92

-
- ²²⁷ Kem W.R. Worm toxins. In handbook of natural toxins and venoms (A.T. Tu, ed.), S. 253, M. Decker, New York, **1988**
- ²²⁸ Kem W.R. Structure and action of nemertine toxins. *Amer Zool.* **1985**, 25, 99
- ²²⁹ Wheeler J.W.; Olubajo O.; Storm C.B.; Duffield R.M. Anabaseine: venom alkaloid of *Aphaenogaster* ants. *Science* **1981**, 211, 1051
- ²³⁰ <http://www.beachwatchers.wsu.edu/ezidweb/parane01.htm>
- ²³¹ <http://biodiversity.georgetown.edu/searchfiles/picture.cfm?IDnumber=65&image=1>
- ²³² Meyer E.M.; Kuryatov A.; Gerzanich V.; Lindstrom J.; Papke R.L. Analysis of 3-(4-hydroxy, 2-Methoxybenzylidene)anabaseine selectivity and activity at human and rat alpha-7 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **1998**, 287, 918-25
- ²³³ Arendash G.W.; Sengstock G.J.; Sanberg P.R.; Kem W.R. Improved learning and memory in aged rats with chronic administration of the nicotinic receptor agonist GTS-21. *Brain Res.* **1995**, 646, 252-9
- ²³⁴ Kem W.R.; Mahnir V.M.; Prokai L.; Papke R.L.; Cao X.; LeFrancois S.; Wildeboer K.; Prokai-Tatrai K.; Porter-Papke J.; Soti F. Hydroxy metabolites of the Alzheimer's drug candidate 3-[(2,4-dimethoxy)benzylidene]-anabaseine dihydrochloride (GTS-21): their molecular properties, interactions with brain nicotinic receptors, and brain penetration. *Mol Pharmacol.* **2004**, 65, 56-67
- ²³⁵ Flammia D.; Dukat M.; Damaj M.I.; Martin B.; Glennon R.A. Lobeline: structure-affinity investigation of nicotinic acetylcholinergic receptor binding. *J Med Chem.* **1999**, 42, 3726-31
- ²³⁶ Glennon R.A.; Dukat M. Central nicotinic receptor ligands and pharmacophores. *Pharm Acta Helv.* **2000**, 74, 103-14
- ²³⁷ Damaj M.I.; Patrick G.S.; Creasy K.R.; Martin B.R. Pharmacology of lobeline, a nicotinic receptor ligand. *J Pharmacol Exp Ther.* **1997**, 282, 410-9
- ²³⁸ Miller D.K.; Crooks P.A.; Dvoskin L.P. Lobeline inhibits nicotine-evoked [(3)H]dopamine overflow from rat striatal slices and nicotine-evoked (86)Rb(+) efflux from thalamic synaptosomes. *Neuropharmacology* **2000**, 39, 2654-62
- ²³⁹ <http://www.ct-botanical-society.org/galleries/lobeliainfl.html>
- ²⁴⁰ Spande T.F.; Garraffo H.M.; Edwards M.W.; Yeh H.J.C.; Pannell L.; Daly J.W. Epibatidine: a novel (chloropyridyl)azabicycloheptane with potent analgesic activity from an ecuadoran poison frog. *J Am Chem Soc.* **1992**, 114, 3475-78
- ²⁴¹ Müller C.E. Epibatidin – ein nicotinartiges, analgetisch wirksames Alkaloid aus Pfeilgiftfröschen. *Pharmazie in unserer Zeit* **1996**, 25, 85- 92
- ²⁴² Mebs D. Gifttiere: ein Handbuch für Biologen, Toxikologen, Ärzte und Apotheker. **2000**, 2.Aufl., Wiss. Verl.-Ges. Stuttgart
- ²⁴³ Hecker T.; Nieber K. Epibatidin - ein altes Wirkprinzip wird neu entdeckt. *MMP* **1999**, 8, 226-32
- ²⁴⁴ Gündisch D.; London E.D.; Terris P.; Hill G.R.; Mukhin A.G. High affinity binding of [³H]epibatidine to rat brain membranes. *NeuroReport* **1999**, 10, 1631-36
- ²⁴⁵ Daly J.W.; Garraffo H.M.; Spande T.F.; Decker M.W.; Sullivan J.P.; Williams M. Alkaloids from frog skin: the discovery of epibatidine and the potential for developing novel non-opioid analgesics. *Nat Prod*

Rep. **2000**, 17, 131-5

²⁴⁶ Rupniak N.M.; Patel S.; Marwood R.; Webb J.; Traynor J.R.; Elliott J.; Freedman S.B.; Fletcher S.R.; Hill R.G. Antinociceptive and toxic effects of (±)-epibatidine oxalate attributable to nicotinic agonist activity. *Br J Pharmacol.* **1994**, 113, 1487-93

²⁴⁷ Dehmlow E.V. Synthesewettlauf zum Epibatidin, einem neuartigen Naturstoff mit hoher analgetischer Wirkung. *J prakt Chem.* **1995**, 337, 167-74

²⁴⁸ Bai D.; Xu R.; Zhu X. Epibatidine. *Drugs of the future* **1997**, 22, 1210-20

²⁴⁹ Decker M.W.; Meyer M.D. Therapeutic potential of neuronal nicotinic acetylcholine agonists as novel analgesics. *Biochem Pharmacol.* **1999**, 58, 917-23

²⁵⁰ Imming P.; Klaperski P.; Stubbs M.T.; Seitz G.; Gündisch D. Syntheses and evaluation of halogenated cytosine derivatives and of bioisosteric thiocytosine as potent and selective nAChR ligands. *Eur J Med Chem.* **2001**, 36, 375-88

²⁵¹ Free R.B.; Bryant D.L.; McKay S.B.; Kaser D.J.; McKay D.B. [³H]-Epibatidine binding to bovine adrenal medulla: evidence for $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptors. *Neuroscience Letters* **2002**, 318, 98-102

²⁵² Whiteaker P.; Sharples C.G.; Wonnacott S. Agonist-induced up-regulation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in M10 cells: pharmacological and spatial definition. *Mol Pharmacol.* **1998**, 53, 950-62

²⁵³ Whiteaker P.; Marks M.J.; Grady S.R.; Lu Y.; Picciotto M.R.; Changeux J.-P.; Collins A.C. Pharmacological and null mutation approaches reveal nicotinic receptor diversity. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 123-35

²⁵⁴ Seeger R. Cytisin. *Deutsche Apotheker Zeitung* **1992**, 132, 303

²⁵⁵ <http://www.botanikus.de/missing.html>

²⁵⁶ Papke R.L.; Heinemann S.F. Partial agonist properties of cytosine on neuronal nicotinic receptors containing the beta 2 subunit. *Mol Pharmacol.* **1994**, 45, 142-9

²⁵⁷ Houlihan L.M.; Slater Y.; Guerra D.L.; Peng J.H.; Kuo Y.P.; Lukas R.J.; Cassels B.K.; Bermudez I. Activity of cytosine and its brominated isosteres on recombinant human $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurochem.* **2001**, 78, 1029-43

²⁵⁸ Pfizer: WO9818798, **1998**

²⁵⁹ Fitch R.W.; Kaneko Y.; Klaperski P.; Daly J.W.; Seitz G.; Gündisch D. Halogenated and isosteric cytosine derivatives with increased affinity and functional activity at nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorg Med Chem Lett.* **2005**, 15, 1221-4

²⁶⁰ Imming P.; Klaperski P.; Stubbs M.T.; Seitz G.; Gündisch D. Syntheses and evaluation of halogenated cytosine derivatives and of bioisosteric thiocytosine as potent and selective nAChR ligands. *Eur J Med Chem.* **2001**, 36, 375-88

²⁶¹ Ralph I.; Bick C.; Gillard J.W.; Leow H.-M. Alkaloids of *Darlingia darlingiana*. *Aust J Chem.* **1979**, 32, 2523-36

²⁶² Ralph I.; Bick C.; Gillard J.W.; Leow H.-M. Alkaloids of *Darlingia ferruginea*. *Aust J Chem.* **1979**, 32, 2537-43

-
- ²⁶³ Gündisch D.; Harms K.; Schwarz S.; Seitz G.; Stubbs M.T.; Wegge T. Synthesis and evaluation of diazine containing bioisosteres of (-)-ferruginine as ligands for nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorg Med Chem.* **2001**, 9, 2683-91
- ²⁶⁴ http://www.anbg.gov.au/cgi-bin/apx?taxon_id=25811
- ²⁶⁵ Carmichael W.W.; Biggs D.F.; Gorham P.R. Toxicology and pharmacology action of anabaena flos-aqua toxin. *Science* **1975**, 187, 542-4
- ²⁶⁶ Macallan D.R.E.; Lunt G.G.; Wonnacott S.; Swanson K.L.; Rapoport H.; Albuquerque E.X. Methyllycaconitine and (+)-anatoxin-a differentiate between nicotinic receptors in vertebrate and invertebrate nervous system. *J Neurochem.* **1993**, 60, 2308-11
- ²⁶⁷ Thomas P.; Brough P.A.; Gallagher T.; Wonnacott S. Alkyl-modified side chain variants of (-)-atoxin-a: a series of potent nicotinic agonists. *Drug Dev Res.* **1994**, 31, 147-56
- ²⁶⁸ Wright E.G.T.; Sharples C.G.V.; Wonnacott S. Synthesis of UB 165: A novel nicotinic ligand and Anatoxin-a /Epibatidine Hybrid. *Bioorg Med Chem Lett.* **1997**, 7, 2867-70
- ²⁶⁹ Gohlke H.; Gündisch D.; Schwarz S.; Tilotta M.C.; Seitz G.; Wegge T. Synthesis and receptor binding studies of novel enantiopure diazine bioisosteres of UB-165. *J Med Chem.* **2002**, 45, 1064-72
- ²⁷⁰ Sharples C.G.V.; Karig G.; Simpson G.L.; Spencer J.A.; Wright E.; Millar N.S.; Wonnacott S.; Gallagher T. Synthesis and pharmacological characterisation of novel analogues of the nicotinic acetylcholine receptor agonist (-)-UB 165. *J Med Chem.* **2002**, 45, 3235-45
- ²⁷¹ Stone C.A.; Torchiana M.L.; Navarro A.; Beyer K.H. Ganglionic blocking properties of 3-methylaminoisocamphane hydrochloride (mecamylamine): a secondary amine. *J Pharmacol.* **1956**, 117,169-83
- ²⁷² www.laytonbio.com
- ²⁷³ www.inversine.com
- ²⁷⁴ Young E.M.; Mahler S.; Chi H.; de Wit H. Mecamylamine and ethanol preference in healthy volunteers. *Alcohol Clin Exp Res.* **2005**, 29, 58-65
- ²⁷⁵ Williams M.; Robinson J.L. Binding of the nicotinic cholinergic antagonist, Dihydro- β -erythroidine, to rat brain tissue. *J Neurosci.* **1984**, 4, 2906-11
- ²⁷⁶ Chavez-Noriega L.E.; Crona J.H.; Washburn M.S.; Urrutia A.; Elliott K.J.; Johnson E.C. Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h alpha 2 beta 2, h alpha 2 beta 4, h alpha 3 beta 2, h alpha 3 beta 4, h alpha 4 beta 2, h alpha 4 beta 4 and h alpha 7 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* **1997**, 280, 346-56
- ²⁷⁷ <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/page10.htm>
- ²⁷⁸ Manske R.H. *Can J Res.* **1938**, 16B, 57
- ²⁷⁹ Goodson J.A. *J Chem Soc.*, **1943**, 139
- ²⁸⁰ Coates P.A.; Blagbrough I.S.; Hardick D.J.; Rowan M.G.; Wonnacott S.; Potter B.V.L. Rapid and efficient isolation of the nicotinic antagonist methyllycaconitine from *Delphinium*: assignment of the methylsuccinimide absolute stereochemistry as S. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8701-4
- ²⁸¹ Ward J.M.; Cockcroft V.B.; Lunt G.G.; Smillie F.S.; Wonnacott S. Methyllycaconitin: a selective

probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites. *FEBS Lett.* **1990**, 270, 45-8

²⁸² Yum L.; Wolf K.M.; Chiappinelli V.A. Nicotinic acetylcholine receptors in separate brain regions exhibit different affinities for methyllycaconitine. *Neuroscience* **1996**, 72, 545-55

²⁸³ Bergmeier S.C.; Lapinsky D.J.; Free R.B.; McKay D.B. Ring E analogs of methyllycaconitine (MLA) as novel nicotinic antagonists. *Bioorg Med Chem Lett.* **1999**, 9, 2263-6

²⁸⁴ Mogg A.J.; Whiteaker P.; McIntosh J.M.; Marks M.; Collins C.A.; Wonnacott S. Methyllycaconitin is a potent antagonist of α -conotoxin-MII-sensitive presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002**, 302, 197-204

²⁸⁵ <http://www.swcoloradowildflowers.com/>

²⁸⁶ Lee C.Y. Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins and snake venoms. *Annu Rev Pharmacol.* **1972**, 12, 265-81

²⁸⁷ Davies A.R.L.; Hardick D.J.; Blagbrough I.S.; Potter B.V.L.; Wolstenholme A.J.; Wonnacott S. Characterisation of the binding of [³H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling $\alpha 7$ -type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **1999**, 38, 679-90

²⁸⁸ Gotti C.; Ogando A.E.; Hanke W.; Schlue R.; Moretti M.; Clementi F. Purification and characterization of an alpha-bungarotoxin receptor that forms a functional nicotinic channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**, 88, 3258-62

²⁸⁹ Halstead B.W. Poisonous and venomous marine animals of the world, **1988**, 2nd rev. ed., Darwin Press, Princeton

²⁹⁰ Jones R.M.; Bulaj G. Conotoxins - new vistas for peptide therapeutics. *Curr Pharm Des.* **2000**, 6, 1249-85

²⁹¹ McIntosh J.M.; Olivera B.M.; Cruz L.J. Conus peptides as probes for ion channels. *Methods Enzymol.* **1999**, 294, 605-24

²⁹² Olivera B.M. E.E. Just Lecture, 1996. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell.* **1997**, 8, 2101-9

²⁹³ Beers W.H.; Reich E. Structure and activity of acetylcholine. *Nature* **1970**, 228, 917-22

²⁹⁴ Sheridan R.P.; Nilakantan R.; Dixon J.S.; Venkataraghavan R. The ensemble approach to distance geometry: application to the nicotinic pharmacophore. *J Med Chem.* **1986**, **29**, 899-906

²⁹⁵ Glennon R.A.; Dukat M. $\alpha 4\beta 2$ nACh receptor pharmacophore models. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004**, 14, 1841-4

²⁹⁶ Holladay M.W.; Dart M.J.; Lynch J.K. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as targets for drug discovery. *J Med Chem.* **1997**, 40, 4169-94

²⁹⁷ Tønder J.E.; Hansen J.B.; Begtrup M.; Pettersson I.; Rimvall K.; Christensen B.; Ehrbar U.; Olesen P.H. Improving the nicotinic pharmacophore with a series of (Isoxazole)methylene-1-azacyclic compounds: synthesis, structure-activity relationship, and molecular modeling. *J Med Chem.* **1999**, 42, 4970-80

²⁹⁸ Tønder J.E.; Olesen P.H.; Hansen J.B.; Begtrup M.; Pettersson I. An improved nicotinic pharmacophore and a stereoselective CoMFA-model for nicotinic agonists acting at the central nicotinic

acetylcholine receptors labelled by. *J Comput Aided Mol Des.* **2001**, 15, 247-58

²⁹⁹ Tønder J.E.; Olesen P.H. Agonists at the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors: structure-activity relationships and molecular modelling. *Curr Med Chem.* **2001**, 8, 651-74

³⁰⁰ Carroll F.I.; Liang F.; Navarro H.A.; Brieady L.E.; Abraham P.; Damaj M.I.; Martin B.R. Synthesis, nicotinic acetylcholine receptor binding, and antinociceptive properties of 2-exo-2-(2'-substituted 5'-pyridinyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptanes. Epibatidine analogues. *J Med Chem.* **2001**, 44, 2229-37

³⁰¹ Glennon R.A.; Dukat M.; Liao L. Musings on alpha4beta2 nicotinic acetylcholine (nACh) receptor pharmacophore models. *Curr Top Med Chem.* **2004**, 4, 631-44

³⁰² Lee M.; Dukat M.; Liao L.; Flammia D.; Damaj M.I.; Martin B.R.; Glennon R.A. A comparison of the binding of three series of nicotinic ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* **2002**, 12, 1989-92

³⁰³ Schmitt J.D. Exploring the nature of molecular recognition in nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Med Chem.* **2000**, 7, 749-800

³⁰⁴ Picciotto M.R.; Zoli M.J. Nicotinic receptors in aging and dementia. *Neurobiol.* **2002**, 53, 641-55

³⁰⁵ Jones S.; Sudweeks S.; Yakel J.L. Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci.* **1999**, 22, 555-61

³⁰⁶ Hogg R.C.; Raggenbass M.; Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **2003**, 147, 1-46

³⁰⁷ Bertrand D.; Changeux J.-P. *Sem in the Neurosci.* **1995**, 7, 75

³⁰⁸ Sargent P.B. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci.* **1993**, 16, 403-43

³⁰⁹ Renshaw R.R.; Armstrong W.D. Basis for the physiological activity of onium compounds. *J Biol Chem.* **1933**, 103, 187-9

³¹⁰ Brown B.G.; Hey P. Choline phenyl ethers as inhibitors of amine oxidase. *Br J Pharmacol.* **1956**, 11, 58-65

³¹¹ Hey P. On relationship between structure and nicotine-like stimulant activity in choline esters and ethers. *Br J Pharmacol.* **1952**, 7, 117

³¹² Abood, L. G.; Grassi S. [3H]methylcarbamylcholine, a new radioligand for studying brain nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol.* **1986**, 35, 4199-202

³¹³ Punzi J.S.; Banerjee S.; Abood L.G. Structure-activity relationships for various N-alkylcarbamyl esters of choline with selective nicotinic cholinergic properties. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 41, 465-7

³¹⁴ Naito R.; Takeuchi K.; Morihira K.; Hayakawa M.; Ikeda K.; Shibamura T.; Isomura Y. Selective muscarinic antagonists. II. Synthesis and antimuscarinic properties of biphenylcarbamate derivatives. *Chem Pharm Bull.* **1998**, 46, 8, 1286-94

³¹⁵ Smith W.W.; Sancilio L.F.; Owerá-Atepo J.B.; Naylor R.J.; Lambert L. Zacopride, a potent 5-HT₃ antagonist. *J Pharm Pharmacol.* **1988**, 40, 301-2

³¹⁶ Akerman B.; Lars J.; Nilsson G.; Sievertsson H.; Dahlbom R. Studies on carbanilic acid esters of cyclic amino alcohols. 4. Esters of pyrrolidinols and piperidinols as local anesthetics. *J Med Chem.* **1971**, 14, 710-2

-
- ³¹⁷ Gregan F.; Durinda J.; Racanska E.; Zamocka J. Synthesis and local anaesthetic activities of 3-(2-alkoxyphenylcarbamoyloxy)chinuclidinium chlorides. *Pharmazie* **1993**, *48*, 465-6
- ³¹⁸ Duschinsky R. German Patent 931 653, **1955**; *Chem Abstr.* *49*, P 1823d
- ³¹⁹ Judd C.I.; U.S. Patent 3,185,692, **1965**; *Chem Abstr.* *65*, P 2275b
- ³²⁰ Mullen G.; Napier J.; Balestra M.; DeCory T.; Hale G.; Macor J.; Mack R.; Loch J. 3rd; Wu E.; Kover A.; Verhoest P.; Sampognaro A.; Phillips E.; Zhu Y.; Murray R.; Griffith R.; Blosser J.; Gurley D.; Machulskis A.; Zongrone J.; Rosen A.; Gordon J. (-)-Spiro[1-azabicyclo[2.2.2]octane-3;5'-oxazolidin-2'-one]; a conformationally restricted analogue of acetylcholine; is a highly selective full agonist at the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor. *J Med Chem.* **2000**, *43*, 4045-50
- ³²¹ Macor J.; Wu E.; PCT Int Appl **2001**, 35 (WO 97/30998), *Chem Abstr.* **1997**, *127*, 1804p
- ³²² Macor J.E.; Gurley D.; Lanthorn T.; Loch J.; Mack R.A.; Mullen G.; Tran O.; Wright N.; Gordon J.C. The 5-HT₃ antagonist Tropicsetron (ICS 205-930) is a potent and selective $\alpha 7$ nicotinic receptor partial agonist. *Bioorg Med Chem Lett.* **2001**, *11*, 319-21
- ³²³ Rote Liste[®] Service GmbH, Rote Liste[®] **2004**, ECV Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH
- ³²⁴ University of Kansas Research Foundation **1959**, U.S. Patent 863,197
- ³²⁵ Zielinsky J.; Kenilworth N.J.; U.S. Patent 3.535.328; **1970**, *Chem Abstr.* *73*, P 130899t
- ³²⁶ Simsek R.; Chang-Fong J.; Lee M.; Dukat M.; Damaj M.I.; Martin B.R.; Glennon R.A. Quaternary ammonium 3-(aminoethoxy)pyridines as antinociceptive agents. *Bioorg Med Chem Lett.* **2003**, *13*, 2917
- ³²⁷ Elliott R.L.; Kopecka H.; Gunn D.E.; Nan-Hornig L.; Garvey D.S.; Ryther K.B. 2-(Aryloxymethyl) azacyclic analogues as novel nicotinic acetylcholine receptor (nA ChR) ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* **1996**, *6*, 2283-8
- ³²⁸ Andrä M.; Tilotta C.M.; Gündisch D. Phenylcarbamates and cholinethers: Synthesis and in vitro evaluation as ligands for nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). *Drugs Fut.* **2002**, *27* (Suppl. A), P113
- ³²⁹ Gündisch D.; Andrä M.; Munoz L.; Tilotta M.C. Phenylcarbamates and cholinethers: Synthesis and in vitro evaluation as ligands for nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) *Bioorg Med Chem.* **2004**, *12*, 4953-62
- ³³⁰ Sokilde B.; Mikkelsen I.; Stensbol T.B.; Andersen B.; Ebdrup S.; Krogsgaard-Larsen P.; Falch E. Analogues of carbacholine: synthesis and relationship between structure and affinity for muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors. *Arch Pharm. (Weinheim)* **1996**, *329*, 95-104
- ³³¹ Römpf Lexikon, 10. Auflage, **1997**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- ³³² Beyer H. & Walter W. Lehrbuch der organischen Chemie **1998**, 23. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart Leipzig
- ³³³ Abraham D.J. Burger's Medicinal Chemistry and Drug discovery **2003**, 6th edition, Wiley-VCH., Weinheim
- ³³⁴ McKay F.C.; Albertson N.F. New amine-masking groups for peptide synthesis. *J Am Chem Soc.* **1957**, *79*, 4686

-
- ³³⁵ Greene T.W.; Wuts P.G.M. Protective groups in organic synthesis. **1999**, 3rd edition, Wiley-VCH, Weinheim
- ³³⁶ Carpino L.A.; Han G.Y. The 9-flourenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *J Am Chem Soc.* **1970**, 92, 5748-9
- ³³⁷ Fields G.B.; Noble R.L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-flourenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Peptide Protein Res.* **1990**, 35, 161-214
- ³³⁸ Bergmann M.L.; Zervas L. Ber. *Dtsch Chem Ges.* **1932**, 65, 1192
- ³³⁹ Sakaitani M.; Hori K.; Ohfune Y. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 2983
- ³⁴⁰ Nilsson J.L.G.; Sievertsson H.; Dahlbom R. Studies on carbanilic acid esters of cyclic amino alcohols. 4. Esters of pyrrolidinols and piperidinols as local anesthetics. *J Med Chem.* **1971**, 8, 710-4
- ³⁴¹ Nilsson J.L.G.; Sievertsson H.; Dahlbom R. Studies on carbanilic acid esters of cyclic amino alcohols. 2. Esters of pyrrolidinyl and piperidyl as local anesthetics. *Acta Pharm Suecica* **1968**, 5, 219-26
- ³⁴² Abood L.G.; Shahid Salles K.; Maiti A. Structure-activity studies of Carbamate and other esters: agonists and antagonists to nicotine. *Pharmacol Biochem Behav.* **1988**, 30, 403-8
- ³⁴³ Astra Aktiebolag **1997**, WO 9730998
- ³⁴⁴ Hommel G. Handbuch der gefährlichen Güter **2000**, 3. Aufl., Springer –Verlag GmbH, Heidelberg
- ³⁴⁵ Martindale, The Extra Pharmacopoeia **1993**, 30th edition, The Pharmaceutical Press, London
- ³⁴⁶ Allen D.D.; Smith Q.R. Characterization of the blood-brain barrier choline transporter using the in situ rat brain perfusion technique. *J Neurochem.* **2001**, 76, 1032-41
- ³⁴⁷ Allen D.D.; Lockmann P.R. The blood-brain barrier choline transporter as a brain drug delivery vector. *Life Sci.* **2003**, 73, 1609-15
- ³⁴⁸ Sarter M.; Parikh V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci.* **2005**, 6, 48-56
- ³⁴⁹ Geldenhuys W.J.; Lockman P.R.; McAfee J.H.; Fitzpatrick K.T.; Van der Schyf C.J.; Allen D.D. Molecular modeling studies on the active binding site of the blood-brain barrier choline transporter. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004**, 14, 3085-92
- ³⁵⁰ Romanelli M.N.; Manetti D.; Scapecchi S.; Borea P.A.; Dei S.; Bartolini A.; Ghelardini C.; Gualtieri F.; Guandalini L.; Varani K. Structure-activity relationship of a unique nicotinic ligand: N'-Dimethyl-N⁴-phenylpiperazinium Iodide (DMPP). *J Med Chem.* **2001**, 44, 3946-55
- ³⁵¹ Brioni J.D.; Decker M.W.; Sullivan J.P.; Arneric S.P. The pharmacology of (-)-nicotine and novel cholinergic channel modulators. *Adv Pharmacol.* **1997**, 37, 153-214
- ³⁵² Saccaan A.I. Pharmacological characterization of SIB-1765F: a novel cholinergic ion channel agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* **1997**, 280, 373-83
- ³⁵³ Menzaghi F.; Whelan K.T.; Risbrough V.B.; Rao T.S.; Lloyd G.K. Effects of a novel cholinergic ion channel agonist SIB-1765F on locomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **1997**, 280, 384-92
- ³⁵⁴ Rao T.S.; Reid R.T.; Correa L.D.; Santori E.M.; Gardner M.F.; Saccaan A.I.; Lorrain D.; Vernier J.M. In vivo pharmacological characterization of (+/-)-4-[2-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)ethyl]thiophenol hydrochloride (SIB-1553A), a novel cholinergic ligand: microdialysis studies. *Brain Res.* **2003**, 986, 71-

-
- ³⁵⁵ Hagermann H. Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl), Band E4 Kohlensäure-Derivate, **1983**, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, New York
- ³⁵⁶ Kem W.R.; Mahnir V.M.; Papke R.L.; Lingle C.J. Anabaseine is a potent agonist on muscle and neuronal alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **1997**; 283; 979-92
- ³⁵⁷ Papke R.L.; Meyer E.; Nutter T.; Uteshev V.V. Alpha7 receptor-selective agonists and modes of alpha7 receptor activation. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 393, 179-95
- ³⁵⁸ Kem W.R. A study of the occurrence of anabaseine in paranemertes and other nemertines. *Toxicon.* **1971**, 9, 23-32
- ³⁵⁹ AstraZeneca **2001**; WO0136417
- ³⁶⁰ Pharmacia & Upjohn **2002**, WO0216357 & US6486172
- ³⁶¹ Novartis **2001**, WO0185727
- ³⁶² Brunelle W.H.; Decker M.W. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor ligands as potential analgesics. *Expert Opin Ther Patents* **2003**, 13, 1003-21
- ³⁶³ Jacobsen E.J.; Walker D.P.; Myers J.K.; Piotrowski D.W.; Groppi V. Substituted azabicyclic moieties for the treatment of disease (nicotinic acetylcholine receptor antagonist). PCT Int Appl **2002** (WO 02085901)
- ³⁶⁴ Bodnar A.L.; Cortes-Burgos L.A.; Cook K.K.; Dinh D.M.; Groppi V.E.; Hajos M.; Higdon N.R.; Hoffmann W.E.; Hurst R.S.; Myers J.K.; Rogers B.N.; Wall T.M.; Wolfe M.L.; Wong E. Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem.* **2005**, 48, 905-8
- ³⁶⁵ Hesse M.; Meier H.; Zeeh B. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. **2002**; 5. Aufl.; Georg Thieme Verlag; Stuttgart
- ³⁶⁶ Fresenius P. Organisch-chemische Nomenklatur. **1983**, 2. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart
- ³⁶⁷ Roth H.J.; Müller C.E.; Folkers G. Stereochemie & Arzneistoffe **1998**; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart
- ³⁶⁸ Yamamura H.I.Y.; Hulme R.L. Receptor-ligand interactions: a practical approach. **1992**, Oxford University Press, New York
- ³⁶⁹ Bylund D.B. Graphic presentation and analysis of inhibition data from ligand-binding experiments. *Anal Biochem.* **1986**, 159, 50-7
- ³⁷⁰ Barlow R.; Blake J. Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci.* **1989**, 10, 440-1
- ³⁷¹ Hill A. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol. (Proc)* **1910**, 40, iv-vii
- ³⁷² Cheng Y.C.; Prusoff W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* **1973**, 22, 3099-108
- ³⁷³ Bylund D.B. Basic principles and techniques for Receptor Binding. *Tocris Reviews* **2002**, 18, 1-8

-
- ³⁷⁴ Mazurov A.; Klucik J.; Miao L.; Seamans A.; Phillips T.; Schmitt J.D.; Miller C.H. 3-Substituted-2(arylalkyl)-1-azabicycloalkanes and methods of use thereof. **2004**, US2004002513
- ³⁷⁵ Dolle F.; Valette H.; Hinnen F.; Vaufrey F.; Demphel S.; Coulon C.; Ottaviani M.; Bottlaender M.; Crouzel C.C. Synthesis and preliminary evaluation of a carbon-11-labelled agonist of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *J Labelled Cpd Radiopharm.* **2001**, 44, 785-95
- ³⁷⁶ Jander Blasius Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie. **2002**, S. Hirzel Verlag Stuttgart Leipzig
- ³⁷⁷ Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie **2002**, 3. Aufl., Spektrum, Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin
- ³⁷⁸ Felgner P.L.; Gadek T.R.; Holm M.; Roman R.; Chan H.W.; Wenz M.; Northrop J.P.; Ringold G.M.; Danielsen M. Lipofection: A highly efficient, lipid mediated DNA/transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* **1987**, 84, 7413-7
- ³⁷⁹ FuGene™ 6 Transfection Reagent Revolution in transfection of eukaryotic cells. *Biochemica*, **1997**, 3, 9-11 (CAS-No. 64-17-5)
- ³⁸⁰ Dower W.J.; Miller J.F.; Ragsdale C.W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res.* **1988**, 16, 6127-45
- ³⁸¹ Couturier S.; Bertrand D.; Matter J.-M.; Hernandez M.-C.; Bertrand S.; Millar N.; Valera S.; Barkas T.; Ballivet M. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX. *Neuron* **1990**, 5, 847-56
- ³⁸² Delbono O.; Gopalakrishnan M.; Renganathan M.; Monteggia L.M.; Messi M.L.; Sullivan J.P. Activation of the recombinant human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor significantly raises intracellular calcium. *JPET* **1997**, 280, 428-38
- ³⁸³ Lukas R.J.; Norman S.A.; Lucero L. Characterisation of nicotinic acetylcholine receptors expressed by cells of the SH-SY5Y human neuroblastoma clonal line. *Mol Cell Biol.* **1993**, 4, 1-12
- ³⁸⁴ Amy C.M.; Bennett E.L. Increased sodium ion conductance through nicotinic acetylcholine receptor channels in PC12 cells exposed to nerve growth factors. *J Neurosci.* **1983**, 3, 1547-53
- ³⁸⁵ Fitch R.W.; Xiao Y.; Kellar K.J.; Daly J.W. Membrane potential fluorescence: a rapid and highly sensitive assay for nicotinic receptor channel function. *PNAS* **2003**, 100, 4909-14
- ³⁸⁶ Lewis T.M.; Harkness P.A.; Sivilotti L.G.; Colquhoun D.; Millar N.S. The ion channel properties of a rat recombinant neuronal nicotinic receptor are dependant on the host cell type. *J Physiol.* **1997**, 505, 299-306
- ³⁸⁷ Schroeder K.M.; Wu J.; Zhao L.; Lukas R.J. Regulation by cycloheximide and lowered temperature of cell-surface $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor expression on transfected SH-EP1 cells. *J Neurochem.* **2003**, 85, 581-91.
- ³⁸⁸ Senguela P.; Wadiche J.; Dineley-Miller K.; Dani J.A.; Patrick J.W. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable for calcium. *J Neurosci.* **1993**, 13, 596-604
- ³⁸⁹ Covernton P.J.O.; Kojima H.; Sivilotti L.G.; Gibb A.J.; Colquhoun D. Comparison of neuronal

nicotinic receptors in rat sympathetic neurones with subunit pairs expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* **1994**, 500, 123-38

³⁹⁰ Sivilotti L.G.; McNeil D.K.; Lewis T.M.; Nassar M.A.; Schoepfer R.; Colquhoun D. Recombinant nicotine receptors, expressed in *Xenopus* oocytes, do not resemble native rat sympathetic ganglion receptors in single-channel behaviour. *J Physiol.* **1997**, 500, 123-38

³⁹¹ Dajas-Bailador F.A.; Mogg A.J.; Wonnacott S. Intracellular Ca^{2+} signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} stores. *J Neuro Chem.* **2002**, 81, 606-14

³⁹² Peng X.; Katz M.; Gerzanich V.; Anand R.; Lindstrom J. Human $\alpha 7$ acetylcholine receptor: cloning of the $\alpha 7$ subunit from SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional $\alpha 7$ homomers expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol.* **1994**, 45, 546-554

³⁹³ Wang F.; Gerzanich V.; Wells G.B.; Anand R.; Peng X.; Keyser K.; Lindstrom J. Assembly of human neuronal nicotinic receptors $\alpha 5$ subunits with $\alpha 3$, $\beta 2$ and $\beta 4$ subunits. *J Biol Chem.* **1996**, 271, 17656-65

³⁹⁴ Ridley D.L.; Rogers A.; Wonnacott S. Differential effects of chronic drug treatment on $\alpha 3$ and $\alpha 7$ nicotinic receptor binding sites, in hippocampal neurones and SH-SY5Y cells. *Br J Pharmacol.* **2001**, 133, 1286-95

³⁹⁵ Takahashi T.; Yamashita H.; Nakamura S.; Ishiguro H.; Nagatsu T.; Kawakami H. Effects of nerve growth factor and nicotine on the expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in PC12 cells. *Neurosci Res.* **1999**, 35, 175-81

³⁹⁶ Henderson L.P.; Gdovin M.J.; Liu C.; Gardner P.D.; Maue R.A. Nerve growth factor increases nicotinic Ach receptor gene expression and current density in wild-type and protein kinase A-deficient PC12 cells. *J Neurosci.* **1994**, 14, 1153-63

³⁹⁷ Rogers S.W.; Mandelzys A.; Deneris E.S.; Cooper E.; Heinemann S. The expression of nicotinic acetylcholine receptors by PC12 cells treated with NGF. *J Neurosci.* **1992**, 12, 4611-23

³⁹⁸ Blumenthal E.M.; Conroy W.G.; Romano S.J.; Kassner P.D.; Berg D.K. Detection of functional nicotinic receptors blocked by α -Bungarotoxin on PC12 cells and dependence on their expression on post-translational events. *J Neurosci.* **1997**, 17, 6094-104

³⁹⁹ Greene L.A.; Tischler A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Sci. USA* **1976**, 73, 2424-28

⁴⁰⁰ Greene L.A.; Rein G. Release of $^3[H]$ norepinephrine from a clonal line of pheochromocytoma cells (PC12) by nicotinic cholinergic stimulation. *Brain Res.* **1977**, 138, 521-28

⁴⁰¹ Gunning P.W.; Landreth G.E.; Layer P.; Ignatius M.; Shooter M. Nerve growth factor induced differentiation of PC12 cells: Evaluation of changes in RNA and DNA metabolism. *J Neurosci.* **1981**, 1, 368-79

⁴⁰² Avila A.M.; Davila-Garcia M.I.; Ascarrunz V.S.; Xiao Y.; Kellar K.J. Differential regulation of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells by nicotine and nerve growth factor. *Mol Pharmacol.* **2003**, 64, 974-86

⁴⁰³ Alkondon M.; Albuquerque E.X. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat Hippocampal

-
- neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* **1993**, 265, 1455-73
- ⁴⁰⁴ Kassner P.D.; Berg D.K. Differences in the fate of neuronal acetylcholine receptor protein expressed in neurons and stably transfected cells. *J Neurobiol.* **1997**, 33, 968-82
- ⁴⁰⁵ Nicke A.; Thureau H.; Sadtler S.; Rettinger J.; Schmalzing G. Assembly of nicotinic alpha 7 subunits in *Xenopus* oocytes is partially blocked at the tetramer level. *FEBS Lett.* **2004**, 575, 52-8
- ⁴⁰⁶ Devreotes P.N.; Gardner J.M.; Fambrough D.M. Kinetics of biosynthesis of acetylcholine receptor and subsequent incorporation into plasma membrane of cultured chick skeletal muscle. *Cell* **1977**, 10, 365-73
- ⁴⁰⁷ Neher E.; Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, **1976**, 260, 799-802
- ⁴⁰⁸ Hamill O.P.; Marty A.; Neher E.; Sakmann B.; Sigworth F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch.* **1981**, 391, 85-100
- ⁴⁰⁹ Cole K.S. Mostly membranes. *Ann Rev Physiol.* **1979**, 41, 1-24
- ⁴¹⁰ Numberger M.; Draguhn A. Patch-Clamp-Technik. **1996**, *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford*
- ⁴¹¹ Pusch M.; Neher E. Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pfluegers Arch.* **1988**, 411, 204-11
- ⁴¹² Sakmann B.; Neher E. Single-channel Recording. **1997**, 2 Aufl., *Kluwer Academic/Plenum Publishers*
- ⁴¹³ Alkondon M.; Albuquerque E.X. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat Hippocampal neurons. II. The rundown and inward rectification of agonist-elicited whole-cell currents and identification of receptor subunits by in situ hybridization. *J Pharmacol Exp Ther.* **1994**, 271, 494-506
- ⁴¹⁴ Alkondon M.; Albuquerque E.X. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat Hippocampal neurons. III. Agonist actions of the novel alkaloid epibatidine and analysis of type II current. *J Pharmacol Exp Ther.* **1995**, 274, 771-782
- ⁴¹⁵ Boyd R.T. The molecular biology of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Toxicol.* **1997**, 27, 299-318
- ⁴¹⁶ Bunnelle W.H.; Decker M.W. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor ligands as potential analgesics. *Expert Opin Ther Patents* **2003**, 13, 1003-21
- ⁴¹⁷ Toma L.; Barlocco D.; Gelain A. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Expert Opin Ther Patents* **2004**, 14, 1029-40
- ⁴¹⁸ Truong A.; Xing X.; Forsayeth J.R.; Dwoskin L.P.; Crooks P.A.; Cohen B.N. Pharmacological differences between immunoisolated native brain and heterologously expressed rat alpha4beta2 nicotinic receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* **2001**, 96, 68-76
- ⁴¹⁹ Grutter T.; Bertrand S.; Kotziba-Hibert F.; Bertrand D.; Goeldner M. Structural reorganization of the acetylcholine binding site of the torpedo nicotinic receptor as revealed by dynamic photoaffinity labeling. *Chembiochem.* **2002**, 3, 652-8.
- ⁴²⁰ Stauderman K.A.; Mahaffy L.S.; Akong M.; Velicelebi G.; Chavez-Noriega L.E.; Crona J.H.; Johnson

E.C.; Elliott K.J.; Gillespie A.; Reid R.T.; Adams P.; Harpold M.M.; Corey-Naeve J. Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations alpha2beta4, alpha3beta4 and alpha4beta4 stably expressed in HEK293 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **1998**, 284, 777-89

⁴²¹ Macor J.; Wu E. Preparation of azabicyclic esters of carbamic acids for use of nicotinic acetylcholine receptor agonists. PCT Int Appl **1997**, WO 9730998

⁴²² Welfide Corp.: WO0166546 **2001**

⁴²³ Pharmacia & Upjohn: WO0215662, WO0216355 und WO0217358 **2002**

⁴²⁴ De Filippi G.; Broad L.M.; Zwart R. et al. Pharmacological profiling and in vitro physiological effects of new $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Soc Neurosci. Meeting* **2002**, Abstr. 137.5

⁴²⁵ O'Neill M.J.; Moore N.A.; McKinzie D.L. et al. Behavioural profiling of two potent $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Soc Neurosci. Meeting* **2002**, Abstr. 137.6

⁴²⁶ Rücker G.; Neugebauer M.; Willems G.G. Instrumentelle pharmazeutische Analytik **1992**, 2. Aufl., *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*

⁴²⁷ Grynkiewicz G.; Poenie M.; Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* **1985**, 260, 3440-50

⁴²⁸ Takahashi A.; Camacho P.; Lechleiter J.D.; Herman B. Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev.* **1999**, 79, 1089-1125

⁴²⁹ Molecular Probes[®], Product Information **2002 & 2003**; <http://www.probes.com/>

⁴³⁰ <http://probes.invitrogen.com/handbook/sections/1908.html>

⁴³¹ Malgaroli A.; Milani D.; Meldolesi J.; Pozzan T. Fura-2 measurement of cytosolic free Ca^{2+} in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J Cell Biol.* **1987**, 105, 2145-55

⁴³² Williams D.A.; Fay F.S. Intracellular calibration of the fluorescent calcium indicator Fura-2. *Cell Calcium* **1990**, 11, 75-83

⁴³³ Petr M.J.; Wurster R.D. Determination of in situ dissociation constant for Fura-2 and quantitation of background fluorescence in astrocyte cell line U373-MG. *Cell Calcium* **1997**, 21, 233-40

⁴³⁴ Borovikova L.V.; Ivanova S.; Zhang M.; Yang H.; Botchkina G.I.; Watkins L.R.; Wang H.; Abumrad N.; Eaton J.W.; Tracey K.J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* **2000**, 45, 458-62

⁴³⁵ Wang H.; Yu M.; Ochani M.; Amella C.A.; Tanovic M.; Susarla S.; Li J.H.; Wang H.; Yang H.; Uilola L.; Al-Abed Y.; Czura C.J.; Tracey K.J. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* **2003**, 421, 384-8

⁴³⁶ Simpson P.B.; Challiss R.A.; Nahorski S.R. Neuronal Ca^{2+} stores: activation and function. *Trends Neurosci.* **1995**, 18, 299-306

⁴³⁷ Yule D.I.; Williams J.A. U73122 inhibits Ca^{2+} oscillations in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* **1992**, 267, 13830-35

⁴³⁸ Smallridge R.C.; Kiang J.G.; Gist I.D.; Fein H.G.; Galloway R.J. U-73122, an aminosteroid phospholipase C antagonist, noncompetitively inhibits thyrotropin-releasing hormone effects in GH3 rat

pituitary cells. *Endocrinology* **1992**, 131, 1883-8

⁴³⁹ Bleasdale J.E.; Thakur N.R.; Gremban R.S.; Bundy G.L.; Fitzpatrick F.A.; Smith R.J.; Bunting S. Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther.* **1990**, 255, 756-68

⁴⁴⁰ Tsien, R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* **1980**, 27, 19, 2396-404

⁴⁴¹ Chiancone E.; Thulin E.; Boffi A.; Forsen S.; Brunori M. Evidence for the interaction between the calcium indicator 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid and calcium-binding proteins. *J Biol Chem.* **1986**, 261, 16306-8

⁴⁴² Coutinho-Silva R.; Ojcius D.M.; Gorecki D.C.; Persechini P.M.; Bisaggio R.C.; Mendes A.N.; Marks J.; Burnstock G.; Dunn P.M. Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. *Biochem Pharmacol.* **2005**, 69, 641-55

⁴⁴³ Hanley P.J.; Musset B.; Renigunta V.; Limberg S.H.; Dalpke A.H.; Sus R.; Heeg K.M.; Preisig-Muller R.; Daut J. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci. USA* **2004**, 101, 9479-84

⁴⁴⁴ Bowler J.W.; Bailey R.J.; North R.A.; Surprenant A. P2X4, P2Y1 and P2Y2 receptors on rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol.* **2003**, 140, 567-75

⁴⁴⁵ Katz E.; Verbitsky M.; Rothlin C.V.; Vetter D.E.; Heinemann S.F.; Elgoyhen A.B. High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hear Res.* **2000**, 141, 117-28

⁴⁴⁶ ErosteGUI C.; Norris C.H.; Bobbin R.P. In vitro pharmacologic characterization of a cholinergic receptor on outer hair cells. *Hear Res.* **1994**, 74, 135-47

⁴⁴⁷ Rothlin C.V.; Katz E.; Verbitsky M.; Elgoyhen A.B. The alpha9 nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A gamma-aminobutyric acid, glycine, and type 3 serotonin receptors. *Mol Pharmacol.* **1999**, 55, 248-54

⁴⁴⁸ Verbitsky M.; Rothlin C.V.; Katz E.; Elgoyhen A.B. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology* **2000**, 39, 2515-24

⁴⁴⁹ Vijayaraghavan S.; Pugh P.C.; Zhang Z.W.; Rathouz M.M.; Berg D.K. Nicotinic receptors that bind α -bungarotoxin on neurons raise intracellular free Ca²⁺. *Neuron* **1992**, 8, 353-62

⁴⁵⁰ Rathouz M.M.; Berg D.K. Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *J Neurosci.* **1994**, 14, 6935-45

⁴⁵¹ Shoop R.D.; Chang K.T.; Ellisman M.H.; Berg D.K. Synaptically driven calcium transients via nicotinic receptors on somatic spines. *J Neurosci.* **2001**, 21, 771-81

⁴⁵² Tsuneki H.; Klinik R.; Lena C.; Korn H.; Changeux J.-P. Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci.* **2000**, 12, 2475-85

⁴⁵³ Brain K.L.; Trout S.J.; Jackson V.M.; Dass N.; Cunnane T.C. Nicotine induced Ca²⁺ spikes in single nerve terminal varicosities: a role for intracellular Ca²⁺ stores. *Neurosci.* **2001**, 106, 395-403

-
- ⁴⁵⁴ Emptage N.J.; Reid C.A.; Fine A. Ca²⁺ stores in Hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* **2001**, 29, 197-208
- ⁴⁵⁵ Sharma G.; Vijayaraghavan S. Nicotinic cholinergic signalling receptors in hippocampal astrocytes involves Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci. USA* **2001**, 98, 4148-53
- ⁴⁵⁶ Gray R.; Rajan A.S.; Radcliffe K.A.; Yakehiro M.; Dani J.A. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentration of nicotine. *Nature* **1996**, 383, 713-6
- ⁴⁵⁷ Soliakov L.; Wonnacott S. Voltage-sensitive Ca²⁺ channels involved in nicotinic receptor-mediated [³H]-dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Neurosci.* **1996**, 67, 163-70
- ⁴⁵⁸ Kulak J.M.; McIntosh J.M.; Yoshikami D.; Olivera B.M.; Soliakov L.; Wonnacott S. Nicotine-evoked transmitter release from synaptosomes: functional association of specific pre-synaptic acetylcholine receptors and voltage-gated calcium channels. *J Neurochem.* **2001**, 77, 1581-89
- ⁴⁵⁹ Dajas-Bailador F.A.; Lima P.A.; Wonnacott S. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor mediates nicotinic protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca²⁺-dependant mechanism. *Neuropharmacol.* **2000**, 39, 2799-807
- ⁴⁶⁰ Mansvelder H.D.; McGehee D.S. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* **2000**, 27, 349-57
- ⁴⁶¹ Matsuyama S.; Matsumoto A.; Enomoto T.; Nishizaki T. Activation of nicotinic acetylcholine receptors induced long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* **2000**, 12, 3741-7
- ⁴⁶² Role L.W.; Berg D.K. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* **1996**, 16, 1077-85
- ⁴⁶³ Messing R.O.; Stevens A.M.; Kiyasu E.; Sneade A.B. Nicotinic and muscarinic agonists stimulate rapid protein kinase C translocation in PC12 cells. *J Neurosci.* **1989**, 9, 507-12
- ⁴⁶⁴ Berridge M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **1993**, 361, 315-25
- ⁴⁶⁵ Garnier M.; Lamacz M.; Tonon M.C.; Vaudry H. Functional characterization of a nonclassical nicotine receptor associated with inositolphospholipid breakdown and mobilization of intracellular calcium pools. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, 91, 11743-7
- ⁴⁶⁶ Meissner G. Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol.* **1994**, 56, 485-508
- ⁴⁶⁷ Barnes N.M.; Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **1999**, 38, 1083
- ⁴⁶⁸ Gurley D.A.; Lanthorn T. Nicotinic agonists competitively antagonize serotonin at mouse 5-HT₃ receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett.* **1998**, 247, 107-10
- ⁴⁶⁹ Yan D.; Schulte M.K.; Bloom K.E.; White M.M. Structural features of the ligand-binding domain of the serotonin 5-HT_{3A} receptor. *J Bio Chem.* **1999**, 274, 5537-41
- ⁴⁷⁰ Eisele J.L.; Bertrand S.; Galzi J.L.; Devillers-Thiery A.; Changeux J.-P.; Bertrand D. Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* **1993**, 366, 479-83

-
- ⁴⁷¹ Palma E.; Miledi A.M.; Eusebi F.; Miledi R. Threonine-for-leucine mutation within domain M2 of the neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor converts 5-hydroxytryptamine from antagonists to agonist. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, 93, 11231-35
- ⁴⁷² Astra Aktiebolag: WO9903859, **1999**
- ⁴⁷³ Broad L.M.; Felthouse C.; Zwart R.; McPhie G.I.; Pearson K.H.; Craig P.J.; Wallace L.; Broadmore R.J.; Boot J.R.; Keenan M.; Baker S.R.; Sher E. PSAB-OFP, a selective alpha 7 nicotinic receptor agonist, is also a potent agonist of the 5-HT₃ receptor. *Eur J Pharmacol.* **2002**, 452,137-44
- ⁴⁷⁴ Hibert M.F.; Hoffmann R.; Miller R.C.; Carr A.A. Conformation-activity relationship study of 5-HT₃ receptor antagonists and a definition of a model for this receptor site. *J Med Chem.* **1990**, 33, 1594-600
- ⁴⁷⁵ Gaster L.M.; King F.D. Serotonin 5-HT₃ and 5-HT₄ receptor antagonists. *Med Res Rev.* **1997**, 17, 163-214
- ⁴⁷⁶ modifiziert nach Mutschler E. Arzneimittelwirkung **2001**, 8. Aufl.,Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart
- ⁴⁷⁷ Coyle J.T.; Price C.L.; De Long M.R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervations. *Science* **1983**, 219, 1184-90
- ⁴⁷⁸ Gualtieri F. Cholinergic receptors and neurodegenerative disease. *Pharm. Acta Helv.* **2000**, 74, 85-9
- ⁴⁷⁹ Ellman G.L.; Courtney K.D.; Andres V.Jr.; Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95
- ⁴⁸⁰ Bar-On P.; Millard C.B.; Harel M.; Dvir H.; Enz A.; Sussman J.L.; Silman I. Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry* **2002**, 41, 3555-64
- ⁴⁸¹ <http://pd-beta.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1gqr>
- ⁴⁸² Atack J.R.; Yu Q.S.; Soncrant T.T.; Brossi A.; Rapoport S.I. Comparative inhibitory effects of various physostigmine analogs against acetyl- and butyrylcholinesterases. *J Pharmacol Exp Ther.* **1989**, 249, 194-202
- ⁴⁸³ Iijima S.; Greig N.H.; Garofalo P.; Spangler E.L.; Heller B.; Brossi A.; Ingram D.K. Phenserine: a physostigmine derivative that is a long-acting inhibitor of cholinesterase and demonstrates a wide dose range for attenuating a scopolamine-induced learning impairment of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology (Berl).* **1993**, 112, 415-20.
- ⁴⁸⁴ Greig N.H.; Pei X.F.; Soncrant T.T.; Ingram D.K.; Brossi A. Phenserine and ring C hetero-analogues: drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Res Rev.* **1995**,15, 3-31
- ⁴⁸⁵ DC-Atlas. Dünnschichtchromatographie in der Apotheke. **2002**, 5.Ergänzung, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*,
- ⁴⁸⁶ Organikum organisch-chemisches Grundpraktikum **2004**, 22. Aufl., *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaH*
- ⁴⁸⁷ Hunt R., Renshaw R.R. *J Pharmacol.* **1929**, 35, 99.31
- ⁴⁸⁸ Graham F.L.; Smiley J.; Russell W.C.; Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* **1977**, 36, 59-74

⁴⁸⁹ Biedler JL, Helson L, Spengler BA, Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* **1973**, 33, 2643-52

⁴⁹⁰ Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem.* **1976**, 72, 248-254.

⁴⁹¹ Beppu M.; Hora M.; Watanabe T.; Watanabe M.; Kawachi H.; Mishima E.; Makino M.; Kikugawa K. Substrate-bound fibronectin enhances scavenger receptor activity of macrophages by calcium signaling. *Arch Biophys.* **2001**, 390, 243-52

Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Originalarbeiten:

Gündisch D.; Andrä M.; Munoz L.; Tilotta M.C. Phenylcarbamates as ligands for nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) *Bioorg Med Chem.* **2004**, 12, 4953–62

Matsubayashi H.; Amano T.; Seki T.; Andrä M.; Sakai N. Inhibitory effect of nicotine on rat catalepsy induced by haloperidol. *Jpn J Neuropsychopharmacol.* **2003**, 23, 342

Abstrakta/Kongressmitteilungen:

Andrä M.; Munoz L.; Tilotta C.; Pietsch M.; Seleshi M.; Gonzalez C.; Suzuki T.; Matsubara A.; Hide I.; Matsubayashi H.; Sakai N.; Bönisch H.; Gütschow M.; Gündisch D. Synthesis and evaluation of phenylcarbamates and choline phenyl ether derivatives for nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). 2nd UK Nicotinic Receptor Club Meeting **2005**; Harlow, Essex, UK

Munoz L.; Andrä M.; Tilotta M.C.; Gündisch D. Synthesis and evaluation of phenylcarbamates and choline phenyl ether derivatives for nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Soc Neurosci Abstr **2003**, New Orleans, USA

Andrä M.; Tilotta M.C.; Gündisch D. Phenylcarbamates and Choline Phenyl Ethers as Subtype-Selective Ligands for Nicotinic Acetylcholine Receptors (nAChRs). AIMECS 2003, 5th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium **2003**, Kyoto, Japan

Gündisch D.; Seitz G.; Tilotta M.C.; Schwarz S.; Wegge T.; Klaperski P.; Seifert S.; Stehl A.; Eichler G.; Munoz L.; Andrä M.; Limbeck M. Synthesis and in vitro evaluation of structural variants of choline; cytosine; ferruginine; anatoxin-a; diazabicyclononane- and quinuclidin-2-ene based ligands for nicotinic acetylcholine receptors. 14th Camerino-Noordwijkerhout Symposium **2003**, Camerino, Italy

Gündisch D.; Seitz G.; Tilotta M.C.; Schwarz S.; Wegge T.; Klaperski P.; Seifert S.; Stehl A.; Eichler G.; Munoz L.; Andrä M.; Limbeck M. Synthesis and In Vitro Evaluation of Novel Ligands for Nicotinic Acetylcholine Receptors (nAChRs): Structural Variants of Choline and Alkaloidal Toxins and 3;9-Diazabicyclo[4.2.1]nonane and Quinuclidin-2-ene based Derivatives. 1st UK Nicotinic Receptor Club Meeting **2003**, Lilly Research Centre, Erl Wood Manor, Windlesham, UK

Andrä M.; Tilotta M.C.; and Gündisch D. Phenylcarbamates and cholinethers: synthesis and in vitro evaluation as ligands for nicotinic acetylcholine receptors. *Drugs Fut* 27 (Suppl. A): P113, **2002**