

**Affinität und intrinsische Aktivität von zwei Gruppen
neu synthetisierter Substanzen an β -Adrenozeptoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vorgelegt von
Andreas Reutelsterz
aus Dernbach

2009

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. E. Schlicker

2. Gutachter:

PD Dr. rer. nat. M. Barann

Tag der Mündlichen Prüfung:

09.06.2009

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. A. Pfeifer

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

Meinen Eltern,
meiner Schwester
und Julia

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	β -Adrenozeptoren.....	7
1.2	β -Adrenozeptoren-Blocker.....	11
1.3	β -Sympathomimetika	15
1.4	Ziele der Arbeit / Fragestellung	17
2	Methoden und Material.....	19
2.1	Radioligandbindungsstudien	19
2.1.1	Membranpräparation des zerebralen Kortex der Ratte	20
2.1.2	Proteinbestimmung nach Bradford	21
2.1.3	Sättigungsbindung.....	21
2.1.4	Kompetitionsexperimente	25
2.2	Superfusion	28
2.2.1	Versuchsordnung der Superfusionsexperimente	28
2.2.2	Berechnung der basalen und stimulierten Tritiumfreisetzung	29
2.2.3	Berechnung pharmakologischer Wirkstärken	30
2.3	Statistik.....	30
2.4	Verwendete Substanzen und Puffer	32
2.5	Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software	34
2.6	Tiere	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien	36
3.1.1	Ergebnisse der Sättigungsbindung	36
3.1.2	Ergebnisse der Kompetitionsexperimente.....	38
3.2	Ergebnisse der Superfusionsexperimente	45
3.2.1	Effekt von Procaterol auf die stimulierte Noradrenalinfreisetzung an der Niere.....	46

3.2.2	Modulation der Wirkung von Procaterol an der Niere durch die β_2 - bzw. β_1 -selektiven Antagonisten ICI 118.551 und CGP 20712A	47
3.2.3	Effekt unterschiedlicher Bupranolol-Analoga auf die stimulierte Noradrenalin-freisetzung an der Niere	48
4	Diskussion	51
4.1	Charakterisierung der Methoden.....	51
4.1.1	Charakterisierung der Radioligandbindungsstudien	51
4.1.2	Charakterisierung der Superfusionsexperimente	53
4.2	Kompetitionsexperimente	55
4.2.1	Affinität einer Reihe am Beta-Blocker-Grundgerüst aliphatisch substituierter Substanzen zu β -Adrenozeptoren.....	56
4.2.2	Affinität einer Reihe von Bupranolol-Analoga zu β -Adrenozeptoren.....	60
4.3	Funktionelle Experimente an β_2 -Adrenozeptoren in Nierenkortexschnitten der Ratte und der Maus	67
4.3.1	Effekt von Procaterol auf die stimulierte Noradrenalinfreisetzung an der Niere.....	67
4.3.2	Modulation der Wirkung von Procaterol an der Niere durch die β_2 - bzw. β_1 -selektiven Antagonisten ICI 118.551 und CGP 20712A	69
4.3.3	Effekt unterschiedlicher Bupranolol-Analoga auf die stimulierte Noradrenalin-freisetzung an der Niere	69
5	Zusammenfassung.....	73
6	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	75
7	Literaturverzeichnis.....	77
8	Danksagung	91
9	Lebenslauf.....	92

1 Einleitung

Zellen in einem multizellulären Organismus wie dem menschlichen Körper können untereinander mittels chemischer Botenstoffe (Hormone und Neurotransmitter) kommunizieren. Über die Bindung eines Botenstoffes an zellmembranständige Rezeptorproteine der Zielzelle wird ein Signal in das Zellinnere übertragen, welches dann die Aktivität der Zielzelle beeinflusst. Die Botenstoffe besitzen also eine bestimmte Bindungsneigung zu ihren Rezeptoren (Affinität) und induzieren einen rezeptorvermittelten Effekt (intrinsische Aktivität).

1.1 β -Adrenozeptoren

Adrenalin und Noradrenalin vermitteln ihre Hormon- oder Neurotransmittereffekte über eine Aktivierung membrangebundener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, den Adrenozeptoren. Bereits 1906 stellte Sir Henry Dale die Theorie auf, dass die sympathischen Reaktionen über Rezeptoren („receptive substances“) vermittelt werden, die in den Erfolgsorganen lokalisiert sind und spezifische Haftstrukturen für hochspezifische Pharmaka darstellen. Er beobachtete, dass ein Extrakt aus Mutterkorn die gefäßkontrahierende Wirkung des Adrenalins imitiert, jedoch im Gegensatz zu diesem keine Wirksamkeit am Herzen besitzt. Dale führte dies darauf zurück, dass Adrenalin zwei unterschiedliche Wirkungsarten („unterschiedliche aktive Prinzipien“) besitzt (Dale, 1906). Raymond Ahlquist stellte 1948 die Hypothese auf, dass die unterschiedlichen biologischen Wirkungen der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin durch zwei verschiedene Typen von Rezeptoren, den α - und β -Adrenozeptoren vermittelt werden (Ahlquist, 1948).

1967 konnte durch Lands und Mitarbeiter und 1972 durch Furchgott festgestellt werden, dass die β -Adrenozeptoren eine heterogene Population darstellen und dass demzufolge eine weitere Unterteilung in zwei Subtypen, in β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren, notwendig wurde. Ein Grund für die erforderliche Differenzierung der Subtypen war ihre Beobachtung, dass sich die Empfindlichkeit der β -Rezeptoren verschiedener Gewebe für Noradrenalin deutlich unterschied. An β -Rezeptoren des Herzens führte Noradrenalin in gleichem Maße wie Adrenalin zur Steigerung der Herzfrequenz (β_1 -Sympathikus-Wirkung), an β -Rezeptoren der Bronchialmuskulatur wirkte

Noradrenalin im Gegensatz zu Adrenalin nur sehr schwach bronchospasmolytisch (β_2 -Sympathikus-Wirkung). Vorrangig über Rezeptoren des β_1 -Subtyps vermittelt der Sympathikus am Herzen eine Steigerung der Kontraktilität und Schlagfrequenz und die Ausschüttung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere (Tabelle 1). Die β -Rezeptoren, die vorwiegend auf glatten Muskelzellen zu finden sind und dort eine Vaso- und Bronchodilatation sowie die Relaxation der Uterusmuskulatur bewirken, die ferner von wesentlicher Bedeutung bei der Glykogenolyse, der Glukagon- und Insulinsekretion sind, sind dem β_2 -Adrenozeptor-Subtyp zuzuordnen (Tabelle 1). Die β_2 -Adrenozeptoren können im sympathischen Nervensystem sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sein, wobei sie präsynaptisch die Noradrenalinfreisetzung fördern (Göthert, 1985; Majewski, 1983). Die postsynaptischen β -Adrenozeptoren dienen der Signalübertragung auf die Zelle bei Aktivierung des Sympathikus.

Der genetische Code eines weiteren β -Adrenozeptor-Subtyps, des β_3 -Adrenozeptors, wurde 1989 aufgeschlüsselt (Emorine et al., 1989). Die Stimulation von β_3 -Adrenozeptoren des Fettgewebes bewirkt eine Steigerung des Energieumsatzes, der Thermogenese und Lipolyse (Emorine et al., 1994; Zdrojewicz und Sztuka-Pietkiewicz, 2001) (Tabelle 1). Beobachtungen der erhöhten Expression von β_3 -Adrenozeptoren bei fettleibigen Menschen stützen die Suche nach möglichen Therapieformen gegen Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 mit Hilfe von β_3 -Adrenozeptoragonisten (De Matteis et al., 2002). Einige Autoren zeigten, dass eine Stimulation von β_3 -Adrenozeptoren durch selektive β_3 -Agonisten in Mäusen, Ratten und Hunden eine lang andauernde Reduktion des Blutdrucks und des totalen peripheren Widerstandes bewirken, was auf eine mögliche Beteiligung von β_3 -Adrenozeptoren bei der vaskulären Relaxation hindeutet (z.B. Rohrer et al., 1999, Tavernier et al., 1992). Seit einiger Zeit wird dem β_3 -Adrenozeptor, der von Gauthier et al. (1996) auch am menschlichen Herzen gefunden wurde, eine wichtige Rolle in der Regulation der Herzkontraktion im Sinne einer Feineinstellung zugeschrieben. Es wird diskutiert, ob der stickoxidabhängige negativ inotrope Effekt, vermittelt durch den β_3 -Adrenozeptor, einen gegenregulierenden Schutzmechanismus darstellt, der möglichen, durch exzessive β_1 - und β_2 -Aktivität verursachten Myokardschäden vorbeugt (Gauthier et al., 1998). In diesem Kontext wird der β_3 -Adrenozeptor auch als neues Ziel für die pharmakologische Therapie der Herzinsuffizienz diskutiert (Pott et al., 2006). Aktuell ist auch die Suche nach klinisch einsetzbaren β_3 -Adrenozeptoragonisten zur Behandlung der Urge-Inkontinenz, da es Hinweise

gibt, dass die Aktivierung der β_3 -Adrenozeptoren die Relaxation des Detrusormuskels an der Harnblase vermittelt (Furuta et al., 2006).

Organsystem		Vorherrschender β -Adrenozeptor-Subtyp	Wirkung
Kardiovaskuläres System			
	Sinusknoten	β_1	pos. chronotrop
	AV-Knoten	β_1	pos. dromotrop / bathmotrop
	Purkinje-Fasern	β_1	pos. bathmotrop
	Arbeitsmyokard	β_1	pos. inotrop / lusitrop
	Blutgefäße	β_2	Vasodilatation
	Thrombozytenaggregation	β_2	Hemmung
	Myokard	β_3	neg. inotrop
Bronchialsystem			
	Glatte Muskulatur	β_2	Relaxation
	Flimmerepithel	β_2	Zilienschlag
	Mastzellen	β_2	Mediatorauschüttung ↓
Magen-Darm-Trakt			
	Glatte Muskulatur	β_2	Relaxation
	Gallenwege	β_2	Relaxation M.sphincter Oddi
	Pankreas	β_2	Insulinausschüttung
Urogenitalsystem			
	M. detrusor vesicae	β_2	Relaxation
	Ductus deferens	β_2	Relaxation
	Uterus	β_2	Relaxation
	Niere	β_1	Reninfreisetzung
Stoffwechsel			
	Fettgewebe	β_3	Lipolyse / Thermogenese
	Leber	β_2	Glykogenolyse ↑ / Glukoneogenese ↑
	Skelettmuskel	β_2	Glykogenolyse ↑ / Tremor / Na^+/K^+ -ATPase ↑

Tabelle 1 Organverteilung der β -adrenergen Subtypen und Effekte bei Aktivierung der Rezeptoren (modifiziert nach Starke, 2001)

Eine zunehmende Anzahl an Hinweisen liegt heute für einen vierten Typ von β -Adrenozeptoren vor, für den positiv inotrope und chronotrope Effekte am menschlichen Herzen (Kaumann, 1996; Sarsero et al., 2003), am Herzen der Ratte (Malinowska und Schlicker, 1996) und der Maus (Kaumann et al., 1998), sowohl in vitro (Kaumann, 1996; Kaumann et al., 1998; Sarsero et al., 2003) als auch in vivo (Malinowska und Schlicker, 1996) gefunden wurden. Nicht-konventionelle partielle Agonisten wie CGP 12177, Cyanopindolol oder Pindolol, die in höheren Konzentrationen auch den β_3 -Adrenozeptor stimulieren, aktivieren den neuartigen Rezeptor. Klassische Beta-Blocker wie etwa Propranolol besitzen nur eine geringe Potenz zur Antagonisierung der durch die nicht-konventionellen partiellen Agonisten ausgelösten kardiostimulierenden Effekte (Kaumann, 1996; Malinowska und Schlicker, 1996). Der Rezeptor wird durch hohe Konzentrationen des nichtselektiven β -Adrenozeptorantagonisten Bupranolol und des selektiven β_1 -Adrenozeptorantagonisten CGP 20712A (Kaumann und Molenaar, 1997; Malinowska und Schlicker, 1996; 1997; Malinowska et al., 2003) blockiert. Die Tatsache, dass die kardiostimulierenden Effekte dieser Agonisten in β_2 -Knockout-Mäusen erhalten bleiben, in β_1/β_2 -Knockout Mäusen jedoch aufgehoben werden, lässt eine obligate Rolle des β_1 -Adrenozeptors vermuten (Kaumann et al., 2001). Andere Studien demonstrieren, dass der gefundene Rezeptor trotz einiger pharmakologischer Ähnlichkeiten vom β_3 -Adrenozeptor verschieden ist: CGP 12177 zeigt die kardialen Effekte (Preitner et al., 1998), während selektive β_3 -Agonisten (z.B. BRL 37344 oder CL 316243) diese Effekte nicht aufweisen (Kaumann und Molenaar, 1996; Malinowska und Schlicker, 1996; 1997). In Anbetracht dieser Fakten wird inzwischen davon ausgegangen, dass der Rezeptor, der zuvor auch „atypischer kardiostimulierender β -Adrenozeptor“ (Malinowska et al., 2003) oder „vermeintlicher β_4 -Adrenozeptor“ (Kaumann und Molenaar, 1997) genannt wurde, eine zweite Form des kardiostimulierenden β_1 -Adrenozeptors darstellt, welcher als „niedrig-affiner Zustand des klassischen β_1 -Adrenozeptors“ bezeichnet wird (Alexander et al., 2004).

Es gibt einige Berichte, die eine potentielle klinische Bedeutung des „niedrig-affinen Zustandes des β_1 -Adrenozeptors“ andeuten. Es wurde gezeigt, dass sowohl β_1 -Adrenozeptoren als auch die atypischen β -Adrenozeptoren bei Herzinsuffizienz des Menschen herunterreguliert und desensitiviert werden (Sarsero et al., 2003). Freestone et al. (1999) und Sarsero et al. (1999) berichteten über das Auslösen von Vorhof- und Kammerarrhythmien durch Aktivierung der atypischen β -Adrenozeptoren. Mallem et al. (2004) fanden eine vom Endothel und von einer Stickoxid-Freisetzung unabhängige Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur nicht-hypertensiver

Ratten unter dem Einfluss von CGP 12177 und führten diesen Effekt auf die Vermittlung durch den „niedrig-affinen Zustand des β_1 -Adrenozeptors“ zurück. Bezüglich ihrer Ergebnisse vermuteten Mallem und Mitarbeiter, dass die Aktivierung des „niedrig-affinen Zustandes des β_1 -Adrenozeptors“ einen anderen möglichen Mechanismus der vasorelaxierenden Eigenschaft von Beta-Blocker der 3. Generation (siehe Kapitel 1.2) darstellen könnte. Für Carvedilol etwa wurde bereits eine agonistische Wirkung auf den „niedrig-affinen Zustand des β_1 -Adrenozeptors“ beschrieben (Baker et al., 2003). Dieser Unterschied im Wirkmechanismus gegenüber anderen Beta-Blockern könnte die größere Wirksamkeit von Carvedilol in der Behandlung der dekompensierten Herzinsuffizienz erklären (Metra et al., 2005).

1.2 β -Adrenozeptoren-Blocker

β -Adrenozeptorantagonisten (Beta-Blocker) gehören zu den am häufigsten eingesetzten Pharmaka im Klinikalltag. Die Beta-Blocker blockieren kompetitiv und reversibel die β -Rezeptoren der mit Adrenozeptoren ausgestatteten Organe und hemmen so die adrenerge Stimulation.

1958, zehn Jahre nach der Formulierung der Rezeptorhypothese durch Ahlquist (1948), begann die Geschichte der Beta-Blocker, als Powell und Slater Dichlorisoprenalin entwickelten (Powell und Slater, 1958). Diese vom β -Sympathomimetikum Isoprenalin abgeleitete Substanz zeigte antagonistische Eigenschaften an β -Adrenozeptoren, erlangte jedoch wegen seiner stark ausgeprägten intrinsischen sympathomimetischen Aktivität nie therapeutische Bedeutung. Pronethanol und Propranolol waren die ersten Beta-Blocker ohne partiell agonistische Eigenschaften (Black und Stephenson, 1962). 1965 wurde Propranolol (Dociton[®]) zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit und von Herzrhythmusstörungen zugelassen. Propranolol senkte den Blutdruck (Prichard und Gillam, 1964), reduzierte die Häufigkeit von Angina-Pectoris-Attacken (Prichard, 1976) und erniedrigte die Mortalität von Patienten nach einem Herzinfarkt signifikant (Lambert, 1976).

Einen neuen Bereich für den Einsatz von Beta-Blockern erforschten Waagstein und Mitarbeiter im Jahre 1975, indem sie erstmals Beta-Blocker bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz

anwendeten (Waagstein et al., 1975). Lange Zeit galten Beta-Blocker in diesem Behandlungsgebiet als absolut kontraindiziert, bis sich das Konzept Mitte der neunziger Jahren auf der Basis von Forschungsberichten durchzusetzen begann, in denen gezeigt werden konnte, dass Beta-Blocker die Mortalität von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz deutlich senken (CIBIS-II, 1999; COMET, 2003; Packer et al., 1996). Die sympatho-adrenerge Stimulation wird heute als entscheidender pathophysiologischer Faktor in der Progression der myokardialen Dysfunktion, dem fortschreitenden Zellverlust und dem daraus resultierenden Remodelling bei der Herzinsuffizienz angesehen (Weil und Schunkert, 2006).

Therapeutisch verwendet werden Beta-Blocker gegenwärtig außerdem in der Behandlung des Glaukoms, der Migräne, des Hyperthyreoidismus, von Tremor und innerer Unruhe (Feely und Peden, 1984; Limmroth und Michel, 2001; Peet und Yates, 1981; Stamper et al., 2002; Uitti, 1998).

Die Hauptnebenwirkung der nicht subtyp-selektiven Beta-Blocker der 1. Generation wie Propranolol ist die Auslösung eines Bronchospasmus durch die Blockade von β_2 -Adrenozeptoren der Luftwege. Diese Tatsache führte zur Entwicklung von Beta-Blockern, die β_1 -adrenerge Rezeptoren in niedrigerer Konzentration blockieren als β_2 -Adrenozeptoren. Der therapeutische Einsatz dieser kardioselektiven Beta-Blocker der 2. Generation hat sich allerdings nicht als entscheidender klinischer Vorteil erwiesen, da die β_1 -Selektivität nie absolut ist (Wehling, 2003). Eine weitere Subgruppe bilden die Beta-Blocker mit intrinsischer sympathomimetischer Aktivität (ISA, z.B. Pindolol, Acebutolol). Sie wurden mit dem Ziel entwickelt, die Ruheherzfrequenz und die Kontraktilität des Myokardgewebes weniger stark zu reduzieren als Substanzen ohne ISA, um besonders in Zeiten sympathischer Minderaktivität bedrohlichen Bradykardien vorzubeugen. Diese Gruppe von Beta-Blockern sollte jedoch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und linksventrikulärer Dysfunktion nach Myokardinfarkt nicht eingesetzt werden, da klinische Studien keine prognoseverbessernde Wirkung zeigen (u.a. BEST-Studie, 2001).

Tabelle 2 stellt die Entwicklung vom ersten synthetischen β -Adrenozeptoragonisten, Isoprenalin, zum ersten Beta-Blocker, Propranolol, und den Blockern der 2. und 3. Generation dar.

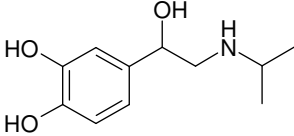
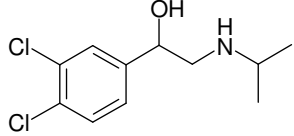
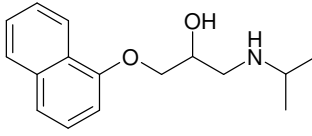
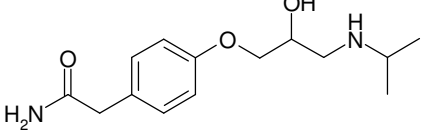
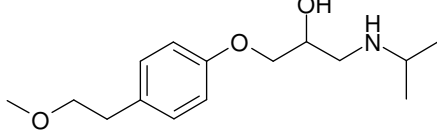
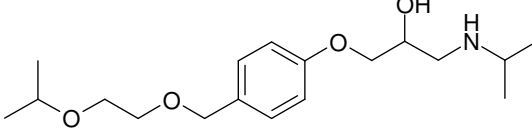
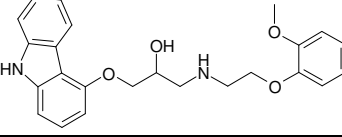
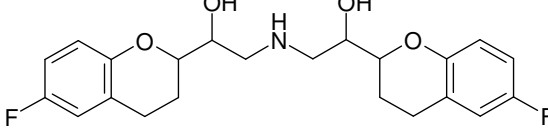
Jahr	Substanz	Strukturformel	
1940	Isoprenalin		Agonist
1958	Dichlorisoprenalin		partieller Agonist
Beta-Blocker – 1. Generation – unselektiv			
1962	Propranolol		
Beta-Blocker – 2. Generation – β_1 -selektiv			
1974	Atenolol		
1976	Metoprolol		
1984	Bisoprolol		
Beta-Blocker – 3. Generation – vasodilatierend			
1984	Carvedilol		α_1 -Blockade
1985	Nebivolol		NO-Freisetzung

Tabelle 2 Zeittafel der Entwicklung adrenerger Antagonisten anhand einiger ausgewählter Beispiele.

Obwohl zurzeit ein Angebot von zahlreichen verschiedenen Beta-Blockern zur Verfügung steht – subtyp-selektive, kardioselektive und Substanzen mit intrinsischer sympathomimetischer Aktivität – besteht weiterhin großes Interesse an der Beta-Blocker-Forschung. Vor allem solche Substanzen werden entwickelt und untersucht, welche über die β -Adrenozeptoren-Blockade

hinausgehende Wirkungen besitzen. Diese Substanzen werden als Beta-Blocker der 3. Generation bezeichnet (Tabelle 2).

Besonders die initiale periphere Vasokonstriktion, bei kardioselektiven Blockern noch ausgeprägt vorhanden, bietet Nachteile bei Patienten mit reduzierter kardialer Auswurfraction (Rosendorff, 1993). Neue Substanzen mit zusätzlichem peripheren vasodilatatorischen Effekt werden entwickelt, ein Effekt, der durch unterschiedliche pharmakologische Mechanismen erreicht wird:

Nebivolol ist ein selektiver β_1 -Blocker, der durch eine *endotheliale Freisetzung von Stickoxid* (NO), vermittelt durch die *Stimulation von β_3 -Adrenozeptoren*, einen zusätzlichen vasodilatierenden Effekt besitzt, und sowohl deshalb als auch durch einen antioxidativen Mechanismus, das Fortschreiten der endothelialen Dysfunktion zu verhindern vermag (Mason et al., 2006). Nebivolol könnte somit, abgesehen davon, dass es nachweislich den kardialen Auswurf erhält und den peripheren Widerstand im Blutkreislauf senkt, mit seiner Wirkung gegen die Entwicklung der Artherosklerose an therapeutischer Bedeutung gewinnen (Zanchetti, 2004). Viele Forschungsgruppen beschäftigten sich zuletzt mit den potentiell *antioxidativen Eigenschaften* der sich im klinischen Gebrauch befindlichen, aber auch neu synthetisierter Beta-Blocker. Als Beispiel seien an dieser Stelle Gomes et al. (2006) und Huang et al. (2001) genannt.

Chiu et al. (2004) beschrieben antihypertensive und vasodilatierende Effekte an Ratten durch Vanylidilol, einem neu synthetisierten α - und β -Adrenozeptorantagonisten mit *endothelialer NO-Freisetzung*.

Für Carvedilol, einen nicht selektiven Beta-Blocker mit zusätzlicher vasodilatierender Eigenschaft, vermittelt durch α_1 -Blockade und einer *Aktivierung des „niedrig-affinen Zustandes des β_1 -Adrenozeptors“* (Baker et al., 2003), wurden günstige Effekte auf die Behandlung der Hypertonie aufgezeigt. Es offenbarten sich außerdem vorteilhafte hämodynamische, antiproliferative, antiarrhythmische, antioxidativ neuro- und kardioprotektive Effekte (Coats, 2006; Palazzuoli et al., 2002; Savitz et al., 2000). Kveiborg et al. (2006) zeigten im Vergleich zu Metoprolol günstigere Effekte von Carvedilol auf den Glucose-Metabolismus, von denen Patienten mit Diabetes mellitus profitieren könnten.

Mit Celiprolol und Dilevalol sind bereits Beta-Blocker mit vasodilatierender *β_2 -partial-agonistischer* Eigenschaft auf dem Markt. Andere Arbeitsgruppen untersuchten mit Vanidilol (Sheu et al., 1997), Vanidipinedilol (Yeh et al., 2000) und Eugenodilol (Huang et al., 1999) nicht-selektive Beta-Blocker mit zusätzlichem vaso- und trachealrelaxierenden β_2 -Partialagonismus an Gewebepreparaten von Versuchstieren.

Liang et al. (2002) synthetisierten Moleküle, die sowohl ein Phenoxypropanolamin (Beta-Blocker-Grundgerüst) als auch ein Dihydropyridin (Ca^{2+} -Kanal-Blocker-Grundgerüst) beinhalten, und erreichten so eine α - und β -Adrenozeptor-Blockade und eine vasorelaxierende Wirkung.

1.3 β -Sympathomimetika

Die körpereigenen Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin sind die natürlich aktivierenden Liganden des beta-adrenergen Systems. Noradrenalin wird zum größten Teil in den Nervenendigungen gebildet und ist als Neurotransmitter von postganglionären Synapsen des sympathischen Nervensystems von Bedeutung. Adrenalin wird als so genanntes Stresshormon aus dem Nebennierenmark ausgeschüttet.

In Anästhesie und Intensivmedizin werden die Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und das kardioselektive Dobutamin in der Pharmakotherapie des Schocks und der Kreislaufunterstützung verwendet. Dabei werden, neben den beta-adrenerg vermittelten kardialen Wirkungen der Pharmaka, die alpha-adrenerg vermittelte Erweiterung großer zentraler und die Konstriktion kleiner peripherer Blutgefäße ausgenutzt (Schwertz et al., 2004). Der bisher alleinige Einsatz von Adrenalin als klassisches Medikament zur medikamentösen Reanimation wird nach aktueller Studienlage neu diskutiert (Wenzel et al., 2004). Adrenalin wird ferner als Vasokonstriktoren-Zusatz bei der Verwendung von Lokalanästhetika eingesetzt.

Die selektiv den β_2 -Adrenozeptor aktivierenden, so genannten β_2 -Sympathomimetika werden wegen ihrer bronchodilatierenden Wirkung heute in der Behandlung der bronchokonstriktorisches Komponenten von obstruktiven Atemwegserkrankungen wie dem Asthma bronchiale und der chronisch obstruktiven Bronchitis (COPD) eingesetzt.

Die β_2 -Agonisten leiten sich von den natürlich vorkommenden, vom Körper selbst synthetisierten Katecholaminen Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin ab. Bereits 1910 beschrieb Melland beeindruckende Erfolge in der Behandlung therapieresistenten Asthmas durch subkutane Adrenalin-Injektionen. Die inhalative Asthmatherapie unter Verwendung von Adrenalin begann etwa 20 Jahre später. Adrenalin und auch das von Konzett erstmals synthetisch hergestellte Isoprenalin (Konzett, 1940) hatten jedoch als durchaus potente Bronchodilatoren, aufgrund

ihrer mangelnden Selektivität für den β_2 -Adrenozeptor-Subtyp, dramatische unerwünschte Nebenwirkungen wie Tachykardie, Blutdruckanstieg und Erhöhung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs, die sogar mit Todesfällen einhergingen (Fraser et al., 1971). Der Nachweis zweier unterschiedlicher Typen von β -Adrenozeptoren (β_1 überwiegend am Herzmuskel anzutreffen, β_2 überwiegend an der glatten Bronchialmuskulatur zu finden) durch Lands et al. (1967) ermöglichte anfang der 70er Jahre die Entwicklung von selektiveren, potenteren und besser verträglicheren Therapeutika zur Behandlung der obstruktiven Atemwegserkrankungen. Die selektiven β_2 -Sympathomimetika weisen bei inhalativer Applikation kaum mehr systemische Nebenwirkungen auf:

Zunächst kamen Salbutamol, Terbutalin und Fenoterol in den Handel, allesamt kurzwirksame Substanzen (3–6 Stunden), bei denen die bronchodilatatorische Wirkung rasch eintritt. Verwendet werden diese Präparate wegen ihres schnellen Wirkungsbegins hauptsächlich als Bedarfsmedikamente zur Symptomlinderung im akuten Asthmaanfall; Fenoterol wird auch, bei Gefährdung des Kindes während der Geburt, zur (Notfall-) Tokolyse genutzt, da es durch Aktivierung von β_2 -Adrenozeptoren die Kontraktion der Uterusmuskulatur hemmt. Beim chronischen Asthma ist zu beobachten, dass diese Präparate in der Langzeittherapie zu einer Toleranzentwicklung bezüglich der antikonstriktorischen Wirkung, zu Hypersensibilitätszunahme gegen Allergene und in einigen Fällen zu verminderter Kontrollierbarkeit des Asthmas führen können (Sears, 1998).

Durch die Entwicklung von Salmeterol und Formoterol (durch chemische Modifikation von Salbutamol und Fenoterol) zu Beginn der 90er Jahre wurde ein Fortschritt in der Langzeittherapie des chronischen, auf alleinige niedrig dosierte inhalative Glukokortikoidgabe refraktären Asthmas und der COPD möglich. Die langwirksamen Präparate (> 12 Stunden) mit verzögertem Wirkungseintritt, kombiniert mit inhalativen Glukokortikoiden, verbessern bei Asthma- und COPD-Patienten die Lungenfunktion, reduzieren die Asthma- und COPD-Symptome, schützen gegen Belastungsasthma, vermindern das Risiko für schwere Asthma-Exazerbationen und verbessern die Lebensqualität; eine gewisse Toleranzentwicklung gegen bronchodilatatorische Wirkung ist möglicherweise klinisch vernachlässigbar (Sovani et al., 2004). Salmeterol besitzt eine geringere intrinsische Aktivität als Formoterol und ist ein *partieller Agonist* am β_2 -Adrenozeptor, so kann bei regelmäßiger Anwendung von Salmeterol die Wirkung von kurzwirksamen β_2 -Mimetika im akuten Asthmaanfall unter Umständen blockiert sein (van Veen et al., 2003).

1.4 Ziele der Arbeit / Fragestellung

Die einleitend dargestellten Fakten machen deutlich wie breit das Indikationsspektrum für Pharmaka ist, die das beta-adrenerge System modulieren. Hauptsächlich finden sich Erkrankungen mit hoher Prävalenz und sozioökonomischer Bedeutung, was das große Interesse der Forschung durch Mediziner und Pharmazeuten nach selektiver wirksamen Substanzen erklärt.

Untersuchung der Affinität zweier Substanzenreihen zu β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren in Radioligandbindungsstudien

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, im Sinne einer Grundlagenarbeit die Affinitäten der von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen neu synthetisierten Substanzenreihen zum β_1 - und β_2 -Adrenozeptor mit Hilfe eines Radioligand-Kompetitions-Modells mit Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte zu untersuchen. Dabei sollte diskutiert werden, ob und inwieweit die chemische Struktur der Substanzen und die Position der Substituenten Einfluss auf die Affinität zu den untersuchten β -Adrenozeptoren besitzt:

- a) Die erste Substanzenreihe, eine Reihe Bupranolol-Analoga, wurde von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Katarzyna Kieć-Kononowicz aus Krakau synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Kieć-Kononowicz und Mitarbeiter untersuchen den „niedrig-affinen Zustand des β_1 -Adrenozeptors“ und forschen nach selektiveren und affineren Substanzen an diesem β -Adrenozeptor. Malinowska et al. (2003) zeigten, dass Bupranolol selbst pharmakologische Effekte stereoselektiv antagonisiert, die durch Aktivierung dieses „atypischen“ β -Adrenozeptors durch CGP 12177 vermittelt werden; einige bereits untersuchten Bupranolol-Analoga zeigten hingegen am „niedrig-affinen Zustand des β_1 -Adrenozeptors“ keinen derartigen Effekt.
- b) Die zweite Substanzenreihe, eine Reihe potentieller β -Adrenozeptorliganden mit atypischer chemischer Struktur, wurde von Frau Anna Wojciechowska aus Warschau synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die Substanzen besitzen als Substituenten am Isopropanolamin-Grundgerüst ein aliphatisches Ringsystem statt des für klassische β -Adrenozeptorantagonisten typischen Aromaten.

Es ist denkbar und wird über diese Arbeit hinausgehend zu überprüfen sein, ob die potentiellen Beta-Blocker interessant bezüglich weiteren therapeutisch nutzbaren Zusatzeffekten sind, wie denen von Blockern der 3. Generation oder der Bindung an andere Rezeptoren. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst einmal die Frage beantwortet werden, wie hoch die Bindungsaffinitäten der neuartigen Substanzen zu β -Adrenozeptoren überhaupt sind.

Untersuchung der intrinsischen Aktivität einer Substanzenreihe (Bupranolol-Analoga) am β_2 -Adrenozeptor in Superfusionsexperimenten

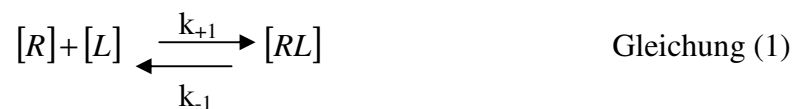
Des Weiteren sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob die Bupranolol-Analoga eine intrinsische Aktivität am β_2 -Adrenozeptor zeigen. Zur Klärung dieser Frage wurde ein Superfusionsmodell verwendet, in dem in Anwesenheit der jeweiligen Bupranolol-Analoga die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus mit [^3H]-Noradrenalin vorinkubierten Nierenkortexschnitten der Ratte gemessen und mit der Kontrolle verglichen wurde. Zunächst sollte das Superfusionsmodell jedoch auf seine Validität überprüft werden. Es sollte gezeigt werden, dass es während der elektrischen Stimulation des Nierenkortexgewebes tatsächlich zu einer physiologischen Ausschüttung von Noradrenalin kommt und dass eine Aktivierung der im Gewebe vorhandenen präsynaptischen β_2 -Adrenozeptoren durch den bekannten β_2 -Agonisten Procaterol tatsächlich zu einer gesteigerten Noradrenalin-Ausschüttung führt.

2 Methoden und Material

2.1 Radioligandbindungsstudien

Grundprinzip

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Radioligandbindungsexperimente mit [³H]-CGP-12177 wurden unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt. Da die eingesetzten Liganden, wenn sie denn Bindungen eingingen, jeweils reversibel an den Rezeptor banden, folgte die Bildung von Ligand-Rezeptor-Komplexen [RL] aus Ligand [L] und Rezeptor [R] dem Massenwirkungsgesetz (Bennett und Yamamura, 1985):



[R]	Konzentration des freien Rezeptors
[L]	Konzentration des freien Liganden
[RL]	Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes
k_{+1}	Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion
k_{-1}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion

Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, d.h. die Assoziations- und Dissoziationsreaktion laufen mit gleicher Geschwindigkeit ab, so gilt nach dem Massenwirkungsgesetz:

$$k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] = k_{-1} \cdot [RL] \quad \text{Gleichung (2)}$$

k_{+1} und k_{-1} können unter der Gleichgewichtsbedingung zu neuen Konstanten zusammengefasst werden:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad \text{Gleichung (3)}$$

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

K_D Gleichgewichts-Dissoziationskonstante

K_A Gleichgewichts-Assoziationskonstante

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D ist definiert als die Ligandkonzentration, bei der die halbmaximale Rezeptorbesetzung vorliegt, und stellt ein Maß für die Affinität des Liganden zu seinem Rezeptor dar. Diese ist umso höher, je kleiner der K_D -Wert ist.

2.1.1 Membranpräparation des zerebralen Kortex der Ratte

Männliche Wistar-Ratten (200-425 g) wurden durch Dekapitation getötet. Die Hirne wurden anschließend sofort entnommen und in 4 °C kalten Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (Tris 50 mM, EDTA 5 mM) gelegt. Die zerebralen Kortizes wurden sofort präpariert, in ein tariertes Becherglas überführt und ausgewogen (Gewicht der Kortizes: 600-1000 mg). Nach dem Zusatz von 25 ml Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, Saccharose 10,27 %) pro 2 Ratten-Kortizes wurden die Gewebestücke dann zusammen mit dem Puffer mit Hilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators mit 10 Hüben eine Minute lang auf Eis bei 1200 U/min homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit 5 ml Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 nachgespült und 10 Minuten bei 4 °C mit 1500 × g in der Beckman Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 25 Minuten bei 4 °C mit 25000 × g erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das gewonnene P2-Pellet zum Waschen zweimal in je 10 ml 4 °C kaltem Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 mit Hilfe eines Spatels resuspendiert und anschließend jeweils 10 Minuten bei 4 °C mit 25000 × g zentrifugiert. Nach beiden Waschschrritten wurde der Überstand verworfen. Das gewaschene Pellet wurde schließlich mit 8 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5, 4 °C versetzt, resuspendiert und mit 10 Hüben in einer

Minute bei 1200 U/min auf Eis homogenisiert. Die Suspension wurde in 15 ml Greiner Röhren abgefüllt (Endvolumen zirka 1 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 pro 200 mg zerebralen Kortex) und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) basiert auf der Ausbildung eines blauen Komplexes aus dem Protein und dem roten Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250. Zur Proteinbestimmung wurden folgende Lösungen angesetzt:

Stammlösung: 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G 250 wurden in 50 ml 50%igem Ethanol (v/v) gelöst, mit 100 ml 85%iger ortho-Phosphorsäure versetzt und mit Aqua dem. auf 250 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Stammlösung sollte vor dem Erstgebrauch etwa vier Wochen bei 4 °C stehen.

Arbeitslösung: 1 Volumenanteil Stammlösung wurde mit 16 Volumenanteilen Aqua dem. gemischt und durch einen Faltenfilter filtriert.

0,15 ml der zu untersuchenden Proteinsuspension wurden mit 2 ml der frisch hergestellten Arbeitslösung versetzt. Anschließend wurde die Absorption im Beckman Spektralphotometer bei 595 nm nach 5 bis maximal 30 min gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibriergeraden, die im Bereich von 1 bis 15 µg Protein mit Rinderserumalbumin als Standard aufgenommen wurde. Zur Bestimmung des Leerwertes wurden 0,15 ml Aqua dem. mit 2 ml Arbeitslösung gemischt.

2.1.3 Sättigungsbindung

2.1.3.1 Prinzip und Auswertung der Sättigungsbindung

Die Sättigungsbindung ist eine Methode zur Bestimmung der Bindungsparameter, wie der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D) eines Radioliganden und der maximalen Anzahl

der Bindungsstellen (B_{\max}) einer Rezeptorpopulation in einem Proteinhomogenat. Es wird dabei eine konstante Rezeptorkonzentration mit aufsteigenden Konzentrationen des Radioliganden versetzt und nach erfolgter Gleichgewichtseinstellung die Gesamtbindung gemessen. Die unspezifische Bindung, die der Radioligand neben der spezifischen Bindung am Rezeptor selbst aufweist, entsteht durch die Interaktion des Liganden mit anderen Membranproteinen, Membranlipiden oder mit dem verwendeten Versuchsmaterial (z.B. Filter). Sie wird durch Zusatz einer Überschuss-Konzentration (ca. $1000 \times K_i$; Erklärung von K_i , s. unten) eines unmarkierten Liganden bestimmt, der an den gleichen Rezeptor wie der Radioligand bindet und somit diesen aus den Rezeptorbindungsstellen vollständig verdrängt. Aus der Differenz zwischen der totalen Bindung und der unspezifischen Bindung ergibt sich die spezifische Bindung des Radioliganden. Die spezifische Bindung des Radioliganden $[RL]$ pro mg Protein aufgetragen gegen die Radioligandkonzentration $[L]$ ergibt eine hyperbolische Sättigungsisotherme (Abb. 1), die mit folgender Gleichung beschrieben werden kann:

$$[RL] = \frac{B_{\max} \cdot [L]}{[L] + K_D} \quad \text{Gleichung (5)}$$

Mit zunehmender Radioligandkonzentration erreicht die Sättigungsisotherme ein Plateau, welches der maximalen Bindung (B_{\max}) entspricht. Die Radioligandkonzentration, die genau zu einer 50%igen Besetzung der Bindungsstellen führt, ergibt den K_D -Wert des Radioliganden. Die Gleichung (5) wurde zur computergestützten nicht-linearen Regression sowie zur Ermittlung der K_D - und B_{\max} -Werte mit Hilfe der Software GraphPad Prism[®] zur Auswertung der Sättigungsbindungsexperimente herangezogen.

Eine andere mathematische Methode zur Bestimmung von K_D und B_{\max} bietet die lineare Regressionsanalyse nach Scatchard (Scatchard, 1949). Durch die lineare Transformation der Gleichung (5) erhält man die Scatchard-Gleichung:

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{B_{\max} - [RL]}{K_D} \quad \text{Gleichung (6)}$$

Trägt man den Quotienten aus der spezifischen Bindung des Radioliganden und der freien Radioligandkonzentration $[RL]/[L]$ gegen die spezifische Bindung des Radioliganden $[RL]$ auf, so ergibt sich eine Gerade (Abb. 1), wenn eine einheitliche Rezeptorpopulation vorliegt. Aus dem Abszissenabschnitt der Geraden kann dann der B_{\max} -Wert abgelesen werden, der negative Reziprokwert der Steigung der Geraden beschreibt den K_D -Wert. Zur Ermittlung der Bindungsparameter K_D und B_{\max} ist allerdings die nicht-lineare Regression gegenüber der Transformation in eine linearisierte Form vorzuziehen, da sie genauere Ergebnisse liefert (Motulsky und Christopoulos, 2003). Die Scatchard-Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit in Ergänzung zur Erstellung der Sättigungsisothermen, zum Zweck der Plausibilitätsprüfung der Ergebnisse, durchgeführt.

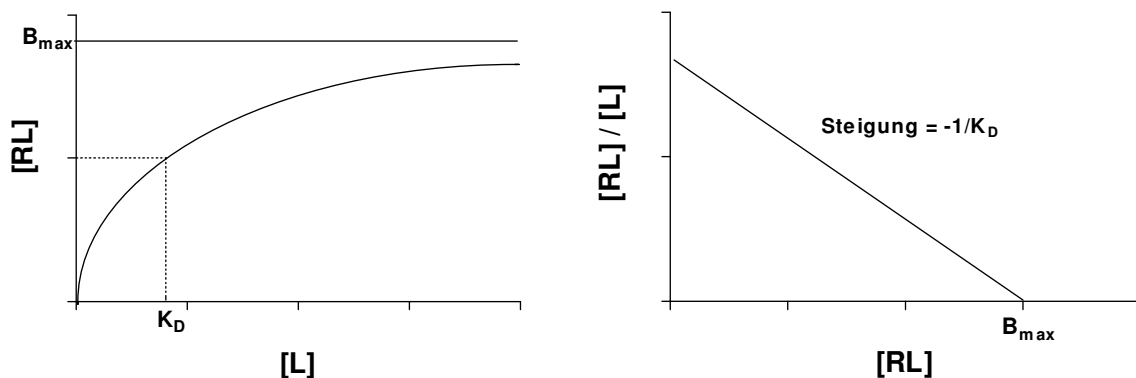


Abb. 1 Darstellung einer hyperbolischen Sättigungsbindungsisothermen durch Auftragung der spezifischen Bindung des Radioliganden $[RL]$ gegen die freie Radioligandkonzentration $[L]$ (links). Der Scatchard-Plot ergibt sich aus der Auftragung des Quotienten aus der spezifischen Bindung des Radioliganden und der freien Radioligandkonzentration $[RL]/[L]$ gegen die spezifische Bindung des Radioliganden $[RL]$ (rechts).

2.1.3.2 Versuchsanordnung der Sättigungsbindung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Sättigungsbindungsexperimente die Bindungsparameter des Radioliganden [³H]-CGP-12177 sowohl für den β_1 - (durchgeführt von Herrn K. Flau aus unserer Arbeitsgruppe, siehe auch Malinowska et al., 2003) als auch für den β_2 -Adrenozeptor bestimmt. Für die Untersuchung des jeweiligen Rezeptor-Subtyps wurden zwei unterschiedliche Versuchsanordnungen mit unterschiedlichen Volumina der zugegebenen Substanzen und Puffer gewählt, die im Folgenden dargestellt sind (der eingeklammerte Volumenwert stellt jeweils die für die Sättigungsbindung am β_2 -Adrenozeptor eingesetzte Menge dar):

Die Reaktionsansätze von je 500 μ l Gesamtvolumen für die Sättigungsbindung am β_1 -Adrenozeptor (und 1000 μ l für die Sättigungsbindung am β_2 -Adrenozeptor) wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipettiert und in für den Inotech Cell-Harvester passende 24er-Lochplatten (4 Reihen mit je 6 Bohrungen) gesteckt. Jeder Reaktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt [alle angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen im 500 μ l (1000 μ l) Reaktionsansatz]:

- 50 μ l (100 μ l) [³H]-CGP-12177 in Aqua dest.
- 50 μ l ICI 118.551 in Aqua dest. (70 nM; Blockade des β_2 -Adrenozeptors) **oder** (100 μ l) CGP 20712A in Aqua dest. (100 nM; Blockade des β_1 -Adrenozeptors)
- 50 μ l (100 μ l) Propranolol in Aqua dest. (10 μ M; unspezifische Bindung) **oder** 50 μ l (100 μ l) Aqua dest. (totale Bindung)
- 250 μ l (300 μ l) Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5
- 100 μ l (400 μ l) Proteinhomogenat in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5

Der Radioligand [³H]-CGP-12177 (spez. Aktivität 33 Ci/mmol) wurde in acht aufsteigenden Endkonzentrationen (0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 nM) eingesetzt. Die Inkubationszeit von 30 min bei 30 °C im Wasserbad startete durch die Zugabe des Proteinhomogenats. Im Anschluss an die Proteinzugabe wurden die Proben mit Parafilm[®] abgedeckt und gründlich gemischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben durch Vakuumfiltration mit Hilfe des Inotech Cell-Harvesters auf mit 0,3 % Polyethylenimin vorbehandelte Whatman GF/C Filter mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten drei Waschschrte mit je 2 ml eines 4 °C kalten Tris-HCl-EDTA-

Puffers pH 7,5. Die zu den Proben gehörigen Filter wurden mit der Pinzette in Poly-Q-Vials[®] überführt, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumagel[®] Safe) bedeckt und mit Schraubdeckel verschlossen. Nach mindestens 12 Stunden auf dem Schüttler wurde die Radioaktivität der inzwischen aufgelösten Filter durch Flüssigkeitsszintillationszählung (Beckman LS 6000TA) gemessen. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben mit Hilfe der Software GraphPad Prism[®].

2.1.4 Konkurrenzexperimente

2.1.4.1 Prinzip und Auswertung der Konkurrenzexperimente

Bei den Konkurrenzexperimenten wird ein Radioligand in einer konstant gehaltenen Konzentration eingesetzt und mit aufsteigenden Konzentrationen eines unmarkierten Liganden von seinen spezifischen Bindungsstellen verdrängt. Die daraus resultierende Gesamtbindung des Radioliganden wird gemessen. Wenn der unmarkierte Ligand, auch Kompetitor, Inhibitor oder Displacer genannt, mit dem Radioliganden um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptorprotein konkurriert, handelt es sich um eine orthosterische Interaktion bzw. kompetitive Hemmung; wenn er an eine andere Bindungsstelle des Rezeptorproteins bindet und durch eine Änderung der Raumstruktur des Rezeptor-Proteins eine Veränderung des Bindungsgleichgewichts herbeiführt, wird dies als allosterische Interaktion bzw. nicht-kompetitive Hemmung bezeichnet. Wird nun die gemessene spezifische Bindung des Radioliganden gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Inhibitors aufgetragen, resultiert ein sigmoider Kurvenverlauf, der mit der Hill-Gleichung beschrieben wird:

$$B_{Ges} - MIN = \frac{MAX - MIN}{1 + \left[\frac{IC_{50}}{I} \right]^{n_H}} \quad \text{Gleichung (7)}$$

B_{Ges}	Gesamtbindung des Radioliganden
MIN	Radioligandbindung in Anwesenheit einer hohen Konzentration des Inhibitors (unteres Kurvenplateau)
MAX	Radioligandbindung in Abwesenheit des Inhibitors (oberes Kurvenplateau)
IC_{50}	Konzentration des Inhibitors, die die spezifische Bindung des Radioliganden auf 50 % reduziert; entspricht dem Wendepunkt des Sigmoids
[I]	Konzentration des Inhibitors
n_H	Hill-Koeffizient (Maß für die Steilheit der sigmoiden Kurve; im Falle einer kompetitiven Hemmung ergibt sich ein Wert nicht signifikant verschieden von -1)

Ein signifikant von -1 unterschiedlicher Hill-Koeffizient deutet auf eine nicht-kompetitive Interaktion oder eventuell auf das Vorhandensein unterschiedlicher Rezeptor-Konformationen hin, die unterschiedliche Affinitäten der Liganden zur Folge haben. Da Substanzen mit unterschiedlichen Affinitäten zu vorhandenen Bindungsstellen nicht gleichförmig aus ihrer Rezeptorbindung verdrängt werden, entstehen biphasische Kurvenverläufe. Ob es sich im Einzelfall um eine kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung handelte, wurde für jedes Experiment durch Bestimmung der Genauigkeit von zwei Kurvenanpassungen überprüft. Dies geschah jeweils durch Vergleich der Hill-Gleichungen, einmal mit einem eingesetzten konstanten Hill-Koeffizienten von -1 und einmal mit einem eingesetzten variablen Hill-Koeffizienten (siehe Kapitel 2.3). Die computergestützte nicht-lineare Regression wurde unter Verwendung der Gleichung (7) mit der Software GraphPad Prism[®] durchgeführt.

Die Bestimmung der Affinität eines heterologen Kompetitors zum Rezeptor (K_i) erfolgt nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad \text{Gleichung (8)}$$

K_i	Verdrängungskonstante
[L]	Konzentration des Radioliganden

2.1.4.2 Versuchsanordnung der Konkurrenzexperimente

Die Reaktionsansätze von je 500 µl Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipettiert und in für den Inotech Cell-Harvester passende 24er-Lochplatten (4 Reihen mit je 6 Bohrungen) gesteckt. Jeder Reaktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt (alle angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen im 500 µl Reaktionsansatz):

- 50 µl einer von zehn aufsteigenden Konzentrationen (1×10^{-10} ; 3×10^{-10} ; 1×10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 1×10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 1×10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 1×10^{-6} ; 3×10^{-6} M) des auf seine Affinität zu untersuchenden *Liganden* in Aqua dest. **oder**
50 µl *Propranolol* in Aqua dest. (10 µM; unspezifische Bindung) **oder**
50 µl *Aqua dest.* (Kontrolle)
- 50 µl [3H]-CGP-12177 in Aqua dest. (0,07 nM bei Bestimmung der Affinität des Liganden zum β_1 -Adrenozeptor, 0,14 nM bei Bestimmung der Affinität des Liganden zum β_2 -Adrenozeptor)
- 50 µl *ICI 118.551* in Aqua dest. (70 nM; Blockade des β_2 -Adrenozeptors) **oder**
50 µl *CGP 20712A* in Aqua dest. (100 nM; Blockade des β_1 -Adrenozeptors)
- 250 µl *Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5*
- 100 µl *Proteinhomogenat* in *Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5*

Die Inkubationszeit von 30 min bei 30 °C im Wasserbad startete durch die Zugabe des Proteinhomogenats. Im Anschluss an die Proteinzugabe wurden die Proben mit Parafilm[®] abgedeckt und gründlich gemischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben durch Vakuumfiltration mit Hilfe des Inotech Cell-Harvesters auf mit 0,3 % Polyethylenimin (PEI) vorbehandelte Whatman GF/C Filter mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten drei Waschschrte mit je 2 ml eines 4 °C kalten Tris-HCl-EDTA-Puffers pH 7,5. Die zu den Proben gehörigen Filter wurden mit der Pinzette in Poly-Q-Vials[®] überführt, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumagel[®] Safe) bedeckt und mit Schraubdeckel verschlossen. Nach mindestens 12 Stunden auf dem Schüttler wurde die Radioaktivität der inzwischen aufgelösten Filter durch Flüssigkeitsszintillationszählung (Beckman LS 6000TA) gemessen. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.1.4.1 beschrieben mit Hilfe der Software GraphPad Prism[®].

2.2 Superfusion

2.2.1 Versuchsanordnung der Superfusionsexperimente

Männliche Wistar Ratten (170-470 g) oder männliche Mäuse wurden dekapitiert und die Nieren entnommen. Mit Hilfe eines Skalpell wurden aus dem Nierenkortex würfelförmige Schnitte mit einer Kantenlänge von 1 mm präpariert. Diese Gewebeschnitte wurden anschließend 60 Minuten lang mit 25 nM [³H]-Noradrenalin (spezifische Aktivität 49,7 – 56,3 Ci/mmol) bei 37 °C unter ständiger Zufuhr von Carbogen (Gasgemisch bestehend aus 95% O₂ und 5% CO₂) in modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (KH) inkubiert. Die KH ist eine dem menschlichen Blutserum ähnliche physiologische Kochsalzlösung, deren Zusammensetzung aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist:

NaCl	118	NaHCO ₃	25	KCl	4,8
CaCl ₂	1,3 ¹ / 3,25 ²	KH ₂ PO ₄	1,2	MgSO ₄	1,2
Glucose	10	Ascorbinsäure	0,06	Na ₂ EDTA	0,03

Tabelle 3 Zusammensetzung der verwendeten physiologischen Salzlösung (mM); ¹ Inkubationsmedium der Nierenkortexschnitte; ² Superfusionsmedium der [³H]-Noradrenalin-vorinkubierten Nierenkortexschnitte.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Gewebeschnitte in Superfusionskammern auf Polypropylnetzen zwischen zwei Platinelektroden platziert und 110 Minuten lang mit KH superfundiert. Als Hilfspharmaka enthielt das Superfusionsmedium Desipramin (1 µM) und Tetraethylammoniumchlorid (TEA, 320 µM). Die Superfusion erfolgte bei 37 °C mit einem Durchlauf von 0,5 ml/min unter permanenter Begasung mit Carbogen. Ab der 35. Minute wurde das Superfusat kontinuierlich in 5-Minuten-Fractionen gesammelt und mit 1,2 ml Volumenanteilen Lumagel[®] Safe, einem Szintillationscocktail mit hoher Wasseraufnahmekapazität gemischt. Unmittelbar nach Versuchsende wurden die Nierenkortexschnitte in 0,5 ml Soluene[®] aufgelöst und dann mit einem selbst hergestellten Szintillationscocktail mit geringer Wasser-

aufnahmekapazität (6 mg PPO und 100 µg POPOP in 1 ml Toluol) versetzt. Der Tritiumgehalt der aufgefangenen Superfusatproben sowie der aufgelösten Gewebeschnitte wurde im Anschluss mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers bestimmt.

Die Tritiumabgabe wurde während zwei 2-minütigen Perioden (S_1 ; S_2) durch Rechteckimpulse stimuliert. Die elektrische Reizung (3 Hz, 200 mA, 2 ms) erfolgte nach 40 min (S_1) und 90 min (S_2). Ab der 62. Minute waren dem Superfusionsmedium die zu untersuchenden Substanzen zugesetzt; in einigen Versuchen wurde Ca^{2+} ab der 62. Minute aus dem Medium entfernt.

2.2.2 Berechnung der basalen und stimulierten Tritiumfreisetzung

Die Tritiumabgabe (Tritiumefflux) wurde berechnet als Anteil des Tritiums, das zu Beginn der einzelnen 5-Minuten-Sammelperioden im Schnitt vorhanden war. Die spontane, ohne Stimulation gemessene Tritiumabgabe (basaler Efflux) wurde in den Sammelperioden zwischen der 55. und 60. Minute (t_1) und zwischen der 85. und 90. Minute (t_2) bestimmt.

Die stimulierte Tritiumfreisetzung wurde als Differenz zwischen der totalen und der basalen Tritiumfreisetzung während der Stimulation und der nachfolgenden 13 Minuten berechnet. Für den basalen Tritiumefflux wurde hierbei ein linearer Abfall zwischen der 5-Minuten-Fraktion vor und der 5-Minuten-Fraktion 15-20 Minuten nach der Stimulation angenommen. Die Angabe der stimulierten Tritiumabgabe erfolgte in Prozent des zu Beginn der Stimulation in den Nierenkortexschnitten enthaltenen Tritiums.

Zur Quantifizierung der Pharmakoneffekte auf die stimulierte Tritiumfreisetzung wurde der Quotient aus der durch S_2 und der durch S_1 stimulierten Abgabe gebildet und mit dem entsprechenden Quotienten der Kontrollen verglichen.

2.2.3 Berechnung pharmakologischer Wirkstärken

Als Maß für die Wirkstärke eines Agonisten dient der pEC_{50} -Wert. Er ist definiert als negativer dekadischer Logarithmus der Agonistenkonzentration, die eine halbmaximale Wirkung hervorruft.

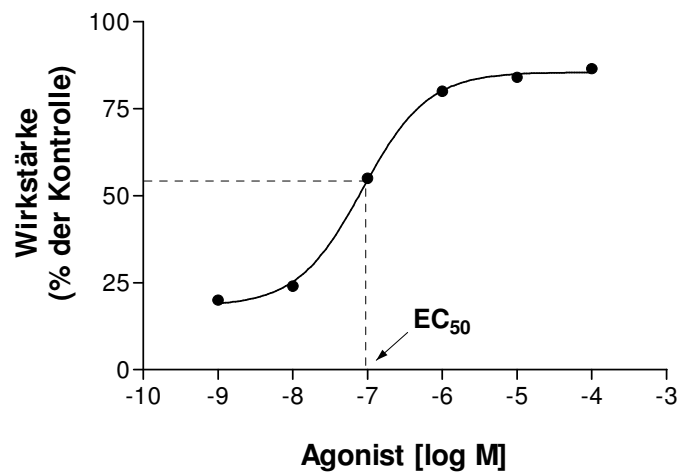


Abb. 2 Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve eines Agonisten durch Auftragung der Konzentration des Agonisten gegen die Wirkung des Agonisten in % der Kontrolle. EC_{50} -Wert als Maß für die halbmaximale Wirkstärke des Agonisten.

2.3 Statistik

Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n Messwerten (Experimenten). Das arithmetische Mittel ist wie folgt definiert:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Gleichung (9)

\bar{x}	Arithmetischer Mittelwert
x_i	Einzelmesswert (Einzelexperiment)
n	Anzahl der Messwerte (Experimente)

Die Standardabweichung (s) wurde aus dem Mittelwert folgendermaßen berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Gleichung (10)}$$

Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurde wie folgt errechnet:

$$\text{SEM} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung (11)}$$

Zur Überprüfung der besseren Eignung unterschiedlicher Kurvenanpassungen mittels computer-gestützter Regression wurde ein F-Test durchgeführt. Der F-Test basiert auf der folgenden Gleichung:

$$F = \frac{\frac{SS_1 - SS_2}{df_1 - df_2}}{\frac{SS_2}{df_2}} \quad \text{Gleichung (12)}$$

SS_1	Summe der Abweichungsquadrate der Kurvenanpassung 1
SS_2	Summe der Kurvenanpassungsquadrate der Kurvenanpassung 2
df_1	Anzahl der Freiheitsgrade der Kurvenanpassung 1
df_2	Anzahl der Freiheitsgrade der Kurvenanpassung 2

Zum Vergleich von Mittelwerten aus unterschiedlichen Versuchsreihen wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt. Bei allen statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Beim Vergleich von zwei oder mehreren Versuchswerten mit der gleichen Kontrolle wurde der t-Test der Bonferroni-Korrektur unterzogen.

2.4 Verwendete Substanzen und Puffer

Die in dieser Studie untersuchten sechs Bupranolol-Analoga wurden von der Arbeitsgruppe um K. Kieć-Kononowicz synthetisiert (Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, Poland). Ihre Strukturformeln und Molekulargewichte sind aus Tabelle 5 ersichtlich.

Die sieben potentiellen β -Adrenozeptorliganden mit atypischer chemischer Struktur wurden von A. Wojciechowska synthetisiert (Chair and Department of Medical Chemistry, The Medical University of Warsaw, Oczki Street 3, 02-007 Warsaw, Poland). Ihre Strukturformeln und Molekulargewichte zeigt Tabelle 6.

L(+)-Ascorbinsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland

Carbogen, Linde Gas Therapeutics, Unterschleißheim, Deutschland

(-)-[5,7-³H]-CGP-12177 (spez. Aktivität 33 Ci/mmol), PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, USA

([±]-2-Hydroxy-5-[2-([2-hydroxy-3(4-[1-methyl-4-(trifluoromethyl)-1H-imidazol-2-yl]-phenoxy)propyl]amino)ethoxy]benzamidmethansulfonat (CGP 20712A), Sigma, München, Deutschland

Coomassie Brilliant Blue G 250, Serva, Heidelberg, Deutschland

Desipraminhydrochlorid, Ciba-Geigy, Wehr, Deutschland

Ethanol, Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumhydrat ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$), Sigma, München, Deutschland

D(+)-*Glucose*-Monohydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland

(±)-1-[2,3-(Dihydro-7-methyl-1H-inden-4-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol (*ICI 118.551*), Imperial Chemical Industries PLC (Pharmaceuticals Division), Macclesfield, GB

Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kalziumchlorid-Dihydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland

Lumagel[®] Safe, Lumac*LSC B.V., Groningen, Niederlande

Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumhydrogencarbonat, Merck, Darmstadt, Deutschland

R(-)-(Ring-2,5,6-[³H])-*Noradrenalin* (spez. Aktivität 51,8-56,3 Ci/mmol), NEN, Zaventem, Belgien

ortho-*Phosphorsäure* 85 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Polyethylenimin (PEI) 50% (m/V), Sigma, München, Deutschland

*Procaterol*hydrochlorid, Sigma, München, Deutschland

1,4-Di-[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzol (*POPOP*), Paesel, Frankfurt, Deutschland

2,5-Diphenyloxazol (*PPO*), Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland

(±)-*Propranolol*hydrochlorid, Sigma, München, Deutschland

Rinderserumalbumin, Sigma, München, Deutschland

Saccharose, Merck, Darmstadt, Deutschland

Salzsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland

Soluene[®]-350, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, USA

Tetraethylammoniumchlorid (*TEA*), Sigma, München, Deutschland

Tetrodotoxin (TTX), Roth, Karlsruhe, Deutschland

Toluol, Merck, Darmstadt, Deutschland

Trizma[®] Base (*Tris*), Sigma, München, Deutschland

Tris-HCl-Puffer pH 7,5

Trizma[®] Base 50 mM, pH-Wert-Einstellung mit *HCl* 18%

Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5

Trizma[®] Base 50 mM, *Na₂-EDTA* 5 mM, *Saccharose* 10,27%, pH-Wert-Einstellung mit *HCl* 18%

2.5 Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Analysenwaage DMS GR-202-EC, Heinsberg, Deutschland

Cell Harvester Inotech ICH 120, Wohlen, Schweiz

Dispensette[®] III Brand, Wertheim, Deutschland

Flüssigkeitsszintillationszähler Beckman LS 6000 TA, Fullerton, USA

Fraktionssammler LKB 2111 Multirac, Bromma, Schweden

GF/C Filter Whatman Nr.1822915, Maidstone, England

GraphPad Prism[®] 3.0, San Diego, USA

Greiner Röhrchen, Greiner Bio-One Cellstar, Kremsmünster, Österreich
Homogenisator Potter-Elvehjem Braun 853302/4, Melsungen, Deutschland
Kühlzentrifuge Beckman Typ J2-21 GJ 2559, München, Deutschland
Küvetten Sarstedt 67.741, Nümbrecht, Deutschland
Laborwaage Sartorius L 610 D, Göttingen, Deutschland
Latexhandschuhe puderfrei und nicht-steril, Ansell, München, Deutschland
Magnetrührer Heidolph MR 82, München, Deutschland
Magnetrührer IKA RH 464995, Staufen i. Br., Deutschland
Messzylinder Blaubrand® und Blaubrand®-Eterna, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pumpe Inotech F 923, Dottikon, Schweiz
Pumpe KF Neuberger VDE 0530, Freiburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 2 ml Biozym 710075, Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße 2 ml Eppendorf Nr. 2343, Hamburg, Deutschland
Schüttler Köttermann 4010, Hänigsen, Deutschland
Spektralphotometer Beckman Typ DU®-64, München, Deutschland
Stimulator Hugo Sachs Elektronik Typ 215/II, March-Hugstetten, Deutschland
Superfusionsanlage mit Rollerpumpe, Eigenbau der Werkstatt des Pharmakologischen Instituts, Universität Bonn, Deutschland
Thermostat Typ MS Messgeräte-Werk Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Vakuum Controller Inotech ICH 195, Wohlen, Schweiz
Vortex Mixer Heidolph Reax 2000, München, Deutschland
Wasserbad GFL 1083, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad Memmert WB 10, Schwabach, Deutschland

2.6 Tiere

Männliche *Wistar-Ratten*, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
 Männliche *NMRI-Mäuse*, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien

3.1.1 Sättigungsbindung: Bestimmung der Bindungsparameter von [³H]-CGP-12177 am β_1 - und β_2 -Adrenozeptor des zerebralen Kortex der Ratte

Die Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D und der maximalen Anzahl der spezifischen Bindungsstellen B_{max} erfolgte mit Hilfe von Sättigungsbindungsexperimenten, wie unter 2.1.3 in Methoden und Material beschrieben. Dazu wurde der Radioligand [³H]-CGP-12177 in aufsteigenden Konzentrationen eingesetzt. Zur Bestimmung der Bindungsparameter (einerseits für den β_1 -, andererseits für den β_2 -Adrenozeptor) des Radioliganden wurde jeweils entsprechend der selektive β_2 -Adrenozeptorantagonist ICI 118.551 oder der selektive β_1 -Adrenozeptorantagonist CGP 20712A zur Blockade des betreffenden β_2 - bzw. des β_1 -Adrenozeptors zugegeben. Die Affinität von ICI 118.551 ist an β_2 -Adrenozeptoren etwa 500fach höher verglichen mit β_1 -Adrenozeptoren, die von CGP 20712A zirka 500fach höher an β_1 - als an β_2 -Adrenozeptoren (Baker, 2005). Die computergestützte nicht-lineare Regression ergab eine einseitige Sättigungsbindungsisotherme, aus der die Bindungsparameter K_D und B_{max} nach den in Abschnitt 2.1.3.1 beschriebenen Gleichungen berechnet wurden. Zusätzlich wurde auch die Auswertung nach Scatchard durchgeführt und die dabei erhaltenen charakteristischen Bindungsparameter wurden mit denen aus den Sättigungsbindungsisothermen verglichen.

Die Abb. 3 zeigt die Sättigungsbindungsisothermen und die entsprechenden Scatchard-Plots der spezifischen Bindung von [³H]-CGP-12177 am β_1 - und β_2 -Adrenozeptor, die jeweils als Gesamtkurven aus drei Experimenten in Dreifachbestimmung erhalten wurden.

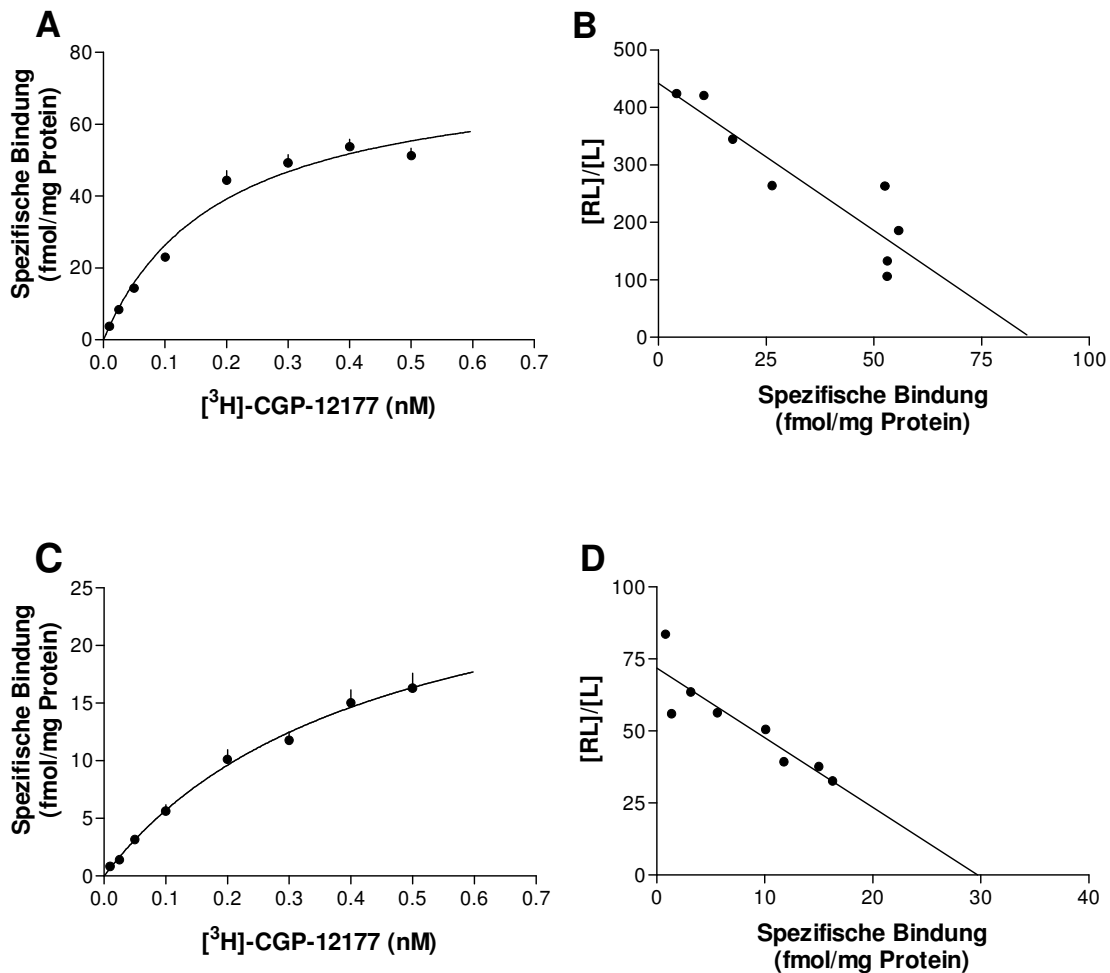


Abb. 3 Sättigungsbindungsisotherme der spezifischen Bindung von $[^3\text{H}]\text{-CGP-12177}$ am β_1 -Adrenozeptor (A) und am β_2 -Adrenozeptor (C) in einer Membransuspension des zerebralen Kortex der Ratte und lineare Regressionsanalyse nach Scatchard für den β_1 - (B) und den β_2 -Adrenozeptor (D). Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten mit Dreifachbestimmung. $[\text{RL}]/[\text{L}]$, der Quotient aus dem rezeptorgebundenen und dem freien Radioliganden.

Die Bestimmung der Bindungsparameter K_D und B_{max} erfolgte nicht aus der Gesamtkurve der Einzelexperimente, sondern als Mittelwerte der für die einzelnen Experimente ermittelten K_D - und B_{max} -Werte (drei Experimente mit Dreifachbestimmung). Tabelle 4 fasst die mit den beiden erwähnten Auswertverfahren berechneten Bindungsparameter zusammen.

	Sättigungsbindungsisotherme		Scatchard	
	K_D (nM)	B_{max} (fmol/mg Protein)	K_D (nM)	B_{max} (fmol/mg Protein)
β_1 - Adrenozeptor	$0,20 \pm 0,05$	$78,7 \pm 8,1$	$0,25 \pm 0,04$	$88,1 \pm 6,4$
β_2 - Adrenozeptor	$0,38 \pm 0,01$	$27,4 \pm 3,4$	$0,40 \pm 0,01$	$28,4 \pm 4,1$

Tabelle 4 Bindungsparameter von [3 H]-CGP-12177 am β_1 - und β_2 -Adrenozeptor in einer Membransuspension des zerebralen Kortex der Ratte, ermittelt aus der Sättigungsbindungsisothermen und aus dem Scatchard-Plot. Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten mit Dreifachbestimmung.

Die mittlere Proteinmenge betrug während der Sättigungsbindungsexperimente zur Bestimmung der Bindungsparameter am β_1 -Adrenozeptor $183 \pm 37 \mu\text{g}$ (pro 500 μl Reaktionsansatz), am β_2 -Adrenozeptor $674 \pm 63 \mu\text{g}$ (pro 1000 μl Reaktionsansatz). Im Mittel lag die unspezifische Bindung des Radioliganden in der Versuchsreihe am β_1 -Adrenozeptor bei $19,7 \pm 3,3 \%$, am β_2 -Adrenozeptor bei $32,2 \pm 1,2 \%$ der totalen Bindung.

3.1.2 Konkurrenzexperimente: Bestimmung der Affinitäten zweier in ihrer Struktur unterschiedlicher Reihen von Liganden zum β_1 - und β_2 -Adrenozeptor

3.1.2.1 Affinität von sechs Bupranolol-Analoga zum β_1 - und β_2 -Adrenozeptor

Zur Bestimmung der Affinitäten der zu untersuchenden Liganden zu β -Adrenozeptor-Subtypen von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte wurden, wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, Konkurrenzexperimente mit dem für β_1 - und β_2 -Rezeptoren selektiven Radioliganden [3 H]-CGP-12177 ($0,07 \text{ nM}$ bei Bestimmung der Affinität der Liganden zum β_1 -

Adrenozeptor, 0,14 nM bei Bestimmung der Affinität der Liganden zum β_2 -Adrenozeptor) durchgeführt. Dabei wurden die unmarkierten Liganden, die alle eine andere chemische Struktur als der Radioligand aufwiesen (heterologe Konkurrenz), in zehn aufsteigenden Konzentrationen im Abstand einer halben log-Stufe eingesetzt (-10,0 bis -5,5, log M). Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde 10 μ M Propranolol eingesetzt. Im Mittel lag die unspezifische Bindung in dieser Versuchsreihe für 0,07 nM [3 H]-CGP-12177 bei 21 ± 2 %, für 0,14 nM [3 H]-CGP-12177 bei 48 ± 2 % der Kontrolle.

Zur computergestützten nicht-linearen Regression mit der Software GraphPad Prism[®] wurde die Funktion der einseitigen Konkurrenz verwendet, die in allen Fällen zu signifikant besseren Kurvenanpassungen führte als die Funktion der sigmoiden Dosis-Wirkungs-Kurve mit variabler Steigung. Abb. 4 zeigt die Verdrängungskurven am β_1 -Adrenozeptor-Subtyp, die darauf folgende Abb. 5 zeigt die Verdrängungskurven am β_2 -Adrenozeptor. Die Kurven wurden aus drei Konkurrenzexperimenten in Dreifachbestimmung erhalten (außer ICI 118.551, bei dieser Substanz gilt $n = 4$).

Die IC_{50} -Werte wurden aus der nicht-linearen Regression ermittelt. Aus den IC_{50} -Werten wurden die Bindungsaffinitäten (K_i -Werte) mit Hilfe der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) durch Einsetzen der für den jeweiligen β -Adrenozeptor-Subtyp ermittelten Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D (siehe Tabelle 4) berechnet.

In Tabelle 5 sind die untersuchten Substanzen und Referenzsubstanzen zusammen mit ihren zugehörigen Strukturformeln und den in den Konkurrenzexperimenten mit [3 H]-CGP-12177 an den β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte ermittelten pK_i -Werten ($-\log K_i$) dargestellt. Außerdem wird in der Tabelle 5 der Quotient aus den K_i -Werten der Liganden für β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren aufgeführt, damit Aussagen über die Selektivität der untersuchten Substanzen zu den Rezeptor-Subtypen gemacht werden können. Verglichen mit den Referenzsubstanzen CGP 20712A und ICI 118.551 waren die sechs Testsubstanzen am jeweiligen β -Adrenozeptor-Subtyp schwächer wirksam, führten aber in einer Konzentration von < 3 μ M zu einer vollständigen Hemmung der Bindung. Keine der Testsubstanzen zeigte eine ausgeprägte Selektivität für einen der beiden β -Adrenozeptor-Subtypen. Die höchste β_1 -Selektivität wurde bei DZ-25 (Faktor 10) und die höchste β_2 -Selektivität wurde bei BK-29 (Faktor 7,6) beobachtet (Tabelle 5).

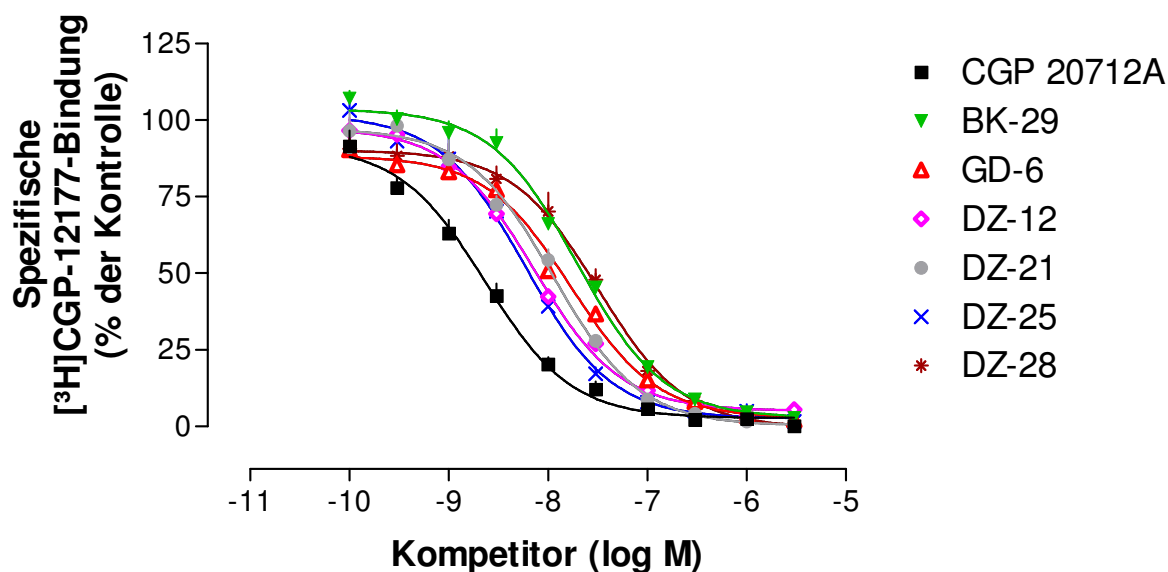


Abb. 4 Verdrängung von 0,07 nM [³H]-CGP-12177 vom β₁-Adrenozeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte durch Substanzen der Serie Kieć-Kononowicz und der Referenzsubstanz CGP 20712A. Spezifische Bindung in % der Kontrolle ± SEM.

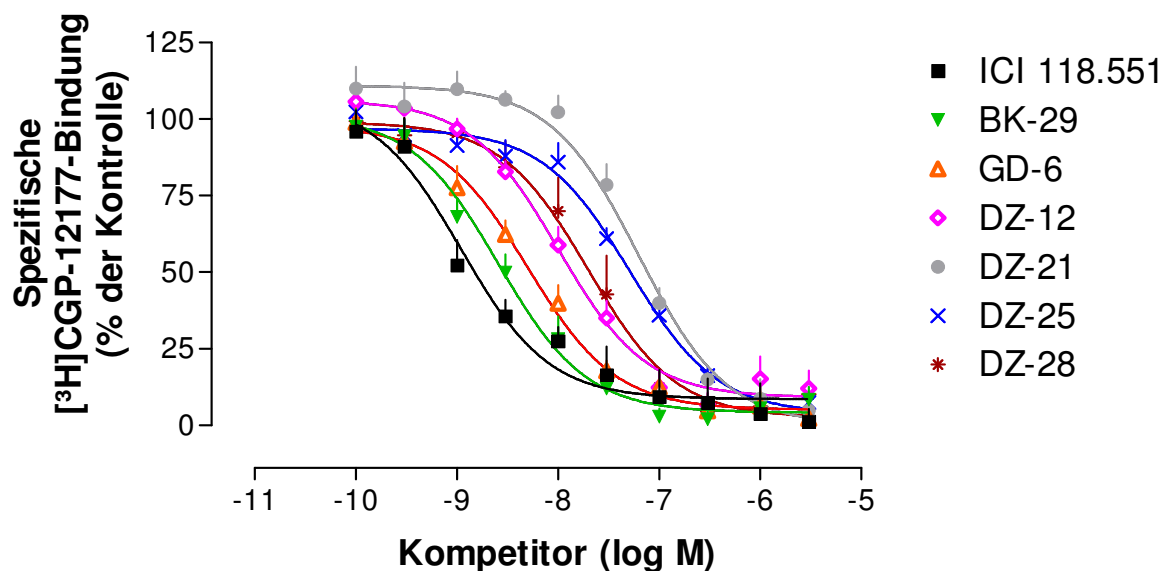


Abb. 5 Verdrängung von 0,14 nM [³H]-CGP-12177 vom β₂-Adrenozeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte durch Substanzen der Serie Kieć-Kononowicz und der Referenzsubstanz ICI 118.551. Spezifische Bindung in % der Kontrolle ± SEM.

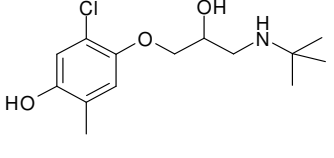
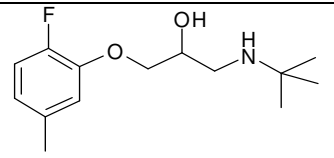
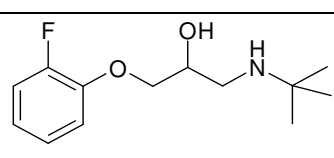
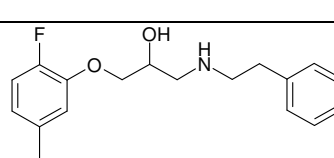
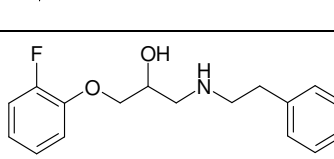
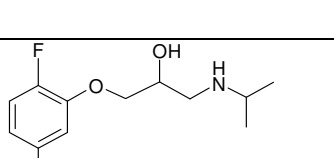
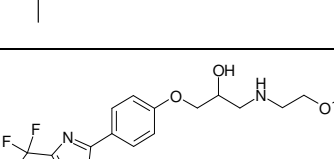
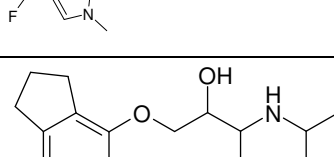
Symbol	Strukturformel	Molekulargewicht (g/mol)	β_1 (pK _i)	β_2 (pK _i)	β_1/β_2
BK-29	 x HCl	324,24	7,83 ± 0,04	8,71 ± 0,22	7,6
GD-6	 x HCl	291,79	7,91 ± 0,03	8,50 ± 0,17	3,9
DZ-12	 x HCl	277,76	8,28 ± 0,04	8,15 ± 0,17	0,7
DZ-21	 x HCl	399,88	8,06 ± 0,08	7,33 ± 0,12	0,2
DZ-25	 x HCl	385,86	8,36 ± 0,06	7,37 ± 0,04	0,1
DZ-28	 x HCl	277,76	7,62 ± 0,12	7,87 ± 0,29	1,8
CGP 20712A	 x HCl	494,46	8,76 ± 0,11		
ICI 118.551	 x HCl	277,40		9,14 ± 0,40	

Tabelle 5 Strukturformeln, Molekulargewichte und die aus den Konkurrenzexperimenten mit 0,07 nM (β_1) bzw. 0,14 nM (β_2) [³H]-CGP-12177 ermittelten pK_i-Werte ± SEM der untersuchten Substanzen (Serie Kieć-Kononowicz), sowie der Referenzsubstanzen CGP 20712A und ICI 118.551. Quotient aus den K_i-Werten (β_1/β_2).

3.1.2.2 Affinität von sieben an einem Beta-Blocker-Grundgerüst aliphatisch substituierter Liganden zum β_1 - und β_2 -Adrenozeptor

Um die Affinität einer zweiten Reihe potentieller β -Adrenozeptor-Liganden zu β -Adrenozeptor-Subtypen zu untersuchen, wurden erneut Konkurrenzexperimente mit 0,07 nM (β_1) und 0,14 nM (β_2) [^3H]-CGP-12177 an den β_1 - und β_2 -Rezeptoren von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte durchgeführt (siehe Kapitel 2.1.4). In Tabelle 6 sind die untersuchten Substanzen zusammen mit ihren zugehörigen Strukturformeln und Molekulargewichten aufgeführt. Für die Untersuchung der Affinität der Substanzen zum β_1 -Adrenozeptor wurden zehn aufsteigende Konzentrationen im Abstand einer halben log-Stufe eingesetzt (-10,0 bis -5,5, log M). Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde wie in den Konkurrenzexperimenten zuvor 10 μM Propranolol eingesetzt.

Bei der Auswertung der Konkurrenzexperimente konnte zwischen den Mittelwerten der bei den eingesetzten Konzentrationen registrierten Aktivitäten (dpm) von jeder der untersuchten Substanzen und der Kontrolle, die aus zwei Versuchen in Dreifachbestimmung erhalten wurden, kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (außer bei der Referenzsubstanz CGP 20712A). Dies ließ den Schluss zu, dass es in der untersuchten Konzentrationsspanne (bis höchstens 3 μM ; Abb. 6A, niedrigere Konzentrationen nicht gezeigt) zu keiner kompetitiven Verdrängung des Radioliganden [^3H]-CGP-12177 am β_1 -Adrenozeptor gekommen war. Da nach den Ergebnissen der Experimente am β_1 -Adrenozeptor vermutet werden konnte, dass auch am β_2 -Adrenozeptor keine Verdrängung des Radioliganden stattfinden würde, wurde die Versuchsanordnung der Konkurrenzexperimente an diesem Rezeptor-Subtyp modifiziert. Statt der zehn aufsteigenden Konzentrationen der Substanzen, wurde in vier Experimenten in Dreifachbestimmung nur noch die in den übrigen Versuchen verwendete höchste Konzentration 3 μM aller sieben Substanzen eingesetzt. Keine der Substanzen (mit Ausnahme der Referenzsubstanz ICI 118.551) hatte einen signifikanten Effekt auf die Bindung am β_2 -Adrenozeptor (Abb. 6B).

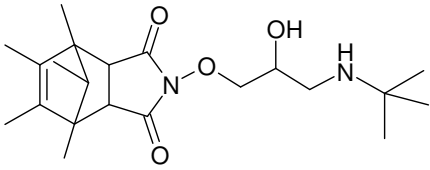
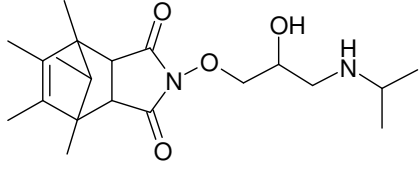
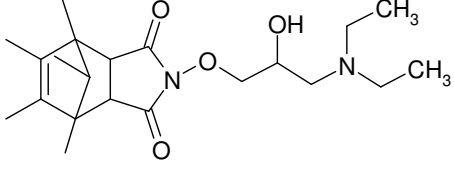
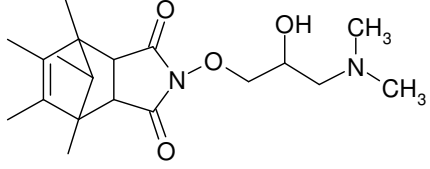
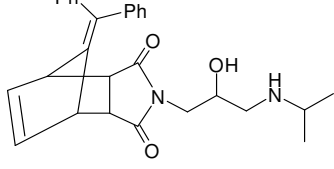
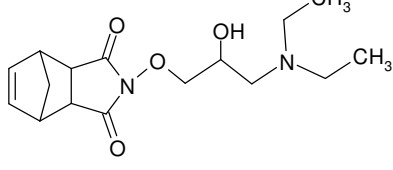
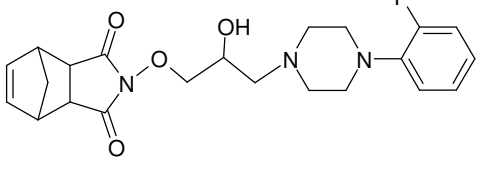
Symbol	Strukturformel	Molekulargewicht (g/mol)
A1	 x HCl	403,97
A2	 x HCl	387,92
A3	 x HCl	403,97
A5	 x HCl	375,5
AW6B	 x HCl	479,03
W2D	 x HCl	344,85
W2H	 x HCl	488,40

Tabelle 6 Strukturformeln und Molekulargewichte der in den Konkurrenzexperimenten mit 0,07 nM (β_1) bzw. 0,14 nM (β_2) [^3H]-CGP-12177 untersuchten Substanzen (Serie Wojciechowska).

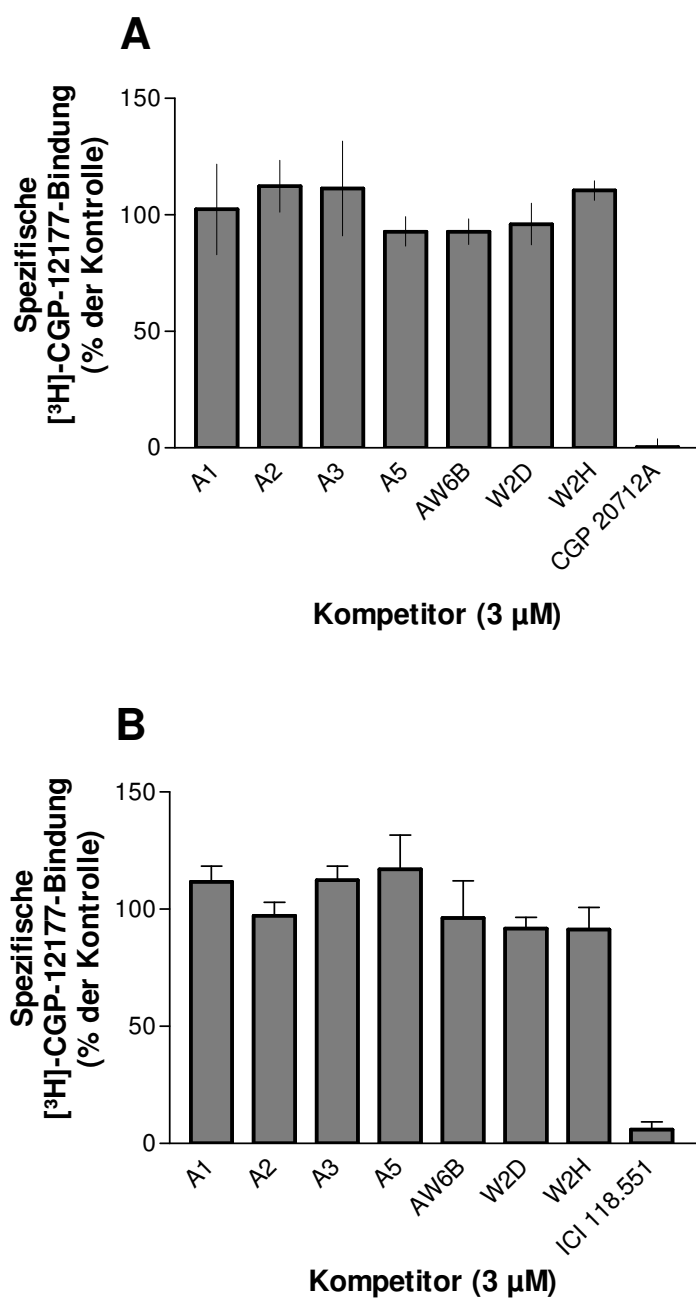


Abb. 6 Spezifische Bindung von 0,07 nM $[^3\text{H}]$ -CGP-12177 am β_1 -Adrenozeptor (**A**) und von 0,14 nM $[^3\text{H}]$ -CGP-12177 am β_2 -Adrenozeptor (**B**) in Anwesenheit der untersuchten Substanzen (3 μM) (Serie Wojciechowska). Spezifische Bindung in % der Kontrolle als Mittelwert mit Spanne zwischen größerem und kleinerem Wert von zwei Experimenten in Dreifachbestimmung (**A**) bzw. als Mittelwert \pm SEM aus vier Experimenten in Dreifachbestimmung (**B**).

3.2 Ergebnisse der Superfusionsexperimente

Die basale Tritiumabgabe in der 5-Minuten-Sammelperiode von der 55. bis 60. Minute (t_1 , also vor Zufuhr der Testpharmaka; angegeben als Fraktion des Gewebetritiums) betrug $0,0037 \pm 0,0003$ ($n = 9$) und $0,0039 \pm 0,0003 \text{ min}^{-1}$ ($n = 10$) in Nierenkortexgewebe der Ratte bzw. der Maus. Der Quotient aus der Tritiumabgabe in t_2 (Sammelperiode von der 85. bzw. 90. Minute) und in t_1 betrug $0,55 \pm 0,02$ ($n = 9$) in Kontrollexperimenten der Ratte und $0,57 \pm 0,03$ ($n = 10$) in Kontrollversuchen der Maus. Pharmaka, die dem Medium ab der 62. Minute beigelegt wurden, sowie Kalziumentzug ab der 62. Minute beeinflussten diesen Wert nicht; Ausnahmen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Die durch die erste elektrische Stimulationsperiode (S_1 , von der 40. bis 42. Minute) hervorgerufene Tritiumabgabe betrug $3,38 \pm 0,36 \%$ ($n = 9$) und $4,66 \pm 0,17 \%$ ($n = 10$) des Gewebetritiums in Nierenkortexgewebe der Ratte bzw. der Maus. Der Quotient der stimulierten Tritiumabgabe bei S_2 (Reizperiode von der 90. bis 92. Minute) und S_1 unter Kontrollbedingungen betrug etwa 1; dies ist in Abb. 7 und Abb. 8 gezeigt.

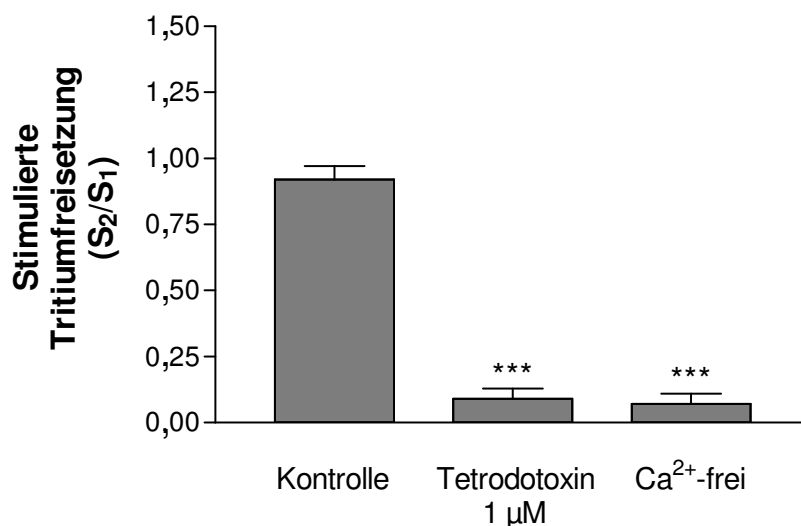


Abb. 7 Effekt der Zugabe von TTX und des Entzugs von Kalzium auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus [^3H]-Noradrenalin vorinkubiertem Nierenkortexgewebe der Ratte. Mittelwerte \pm SEM aus 4 Experimenten. *** $p < 0,001$, verglichen mit der Kontrolle.

Zunächst sollte überprüft werden, ob die stimulierte Tritiumabgabe einer quasi-physiologischen Transmitterfreisetzung entspricht. Zum einen wurde dafür der Effekt von Tetrodotoxin (TTX, 1 μ M), einem Blocker spannungsabhängiger Natriumkanäle, auf die stimulierte Tritiumfreisetzung (S_2/S_1) und zum anderen die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Tritiumabgabe geprüft. Dabei war das TTX dem Superfusionsmedium ab der 62. Minute zugesetzt, das Kalzium wurde der Superfusionslösung ab der 62. Minute entzogen. Abb. 7 zeigt die annähernd totale Hemmung der elektrisch stimulierten Tritiumfreisetzung bei Anwesenheit von TTX im Superfusionsmedium und bei Kalziumentzug.

3.2.1 Effekt von Procaterol auf die stimulierte Noradrenalinfreisetzung an der Niere

Die Abb. 8 zeigt die Wirkung des selektiven β_2 -Adrenozeptoragonisten Procaterol auf die stimulierte Tritiumfreisetzung (S_2/S_1) aus [3 H]-Noradrenalin vorinkubiertem Nierenkortexgewebe der Maus und der Ratte. Procaterol war ab der 62. Minute im Superfusionsmedium enthalten. An der Mausniere wurde die Procaterolkonzentration von 100 nM untersucht und mit der Kontrolle verglichen; die Steigerung der Tritiumfreisetzung lag bei $26 \pm 7 \%$. In den Versuchen an der Rattennierniere lag die Steigerung bei dieser Konzentration bei $21 \pm 8 \%$ im Vergleich zur Kontrolle. Die maximale Zunahme der Tritiumfreisetzung durch Procaterol und der pEC_{50} -Wert von Procaterol am Rattenniernierenkortex wurden mit einer nicht-linearen Kurvenanpassung aus der Spanne zwischen dem unteren und oberen Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (nicht graphisch dargestellt) ermittelt. Die maximale Zunahme der Tritiumfreisetzung lag bei $22 \pm 5 \%$; der pEC_{50} -Wert bei $8,44 \pm 0,20$.

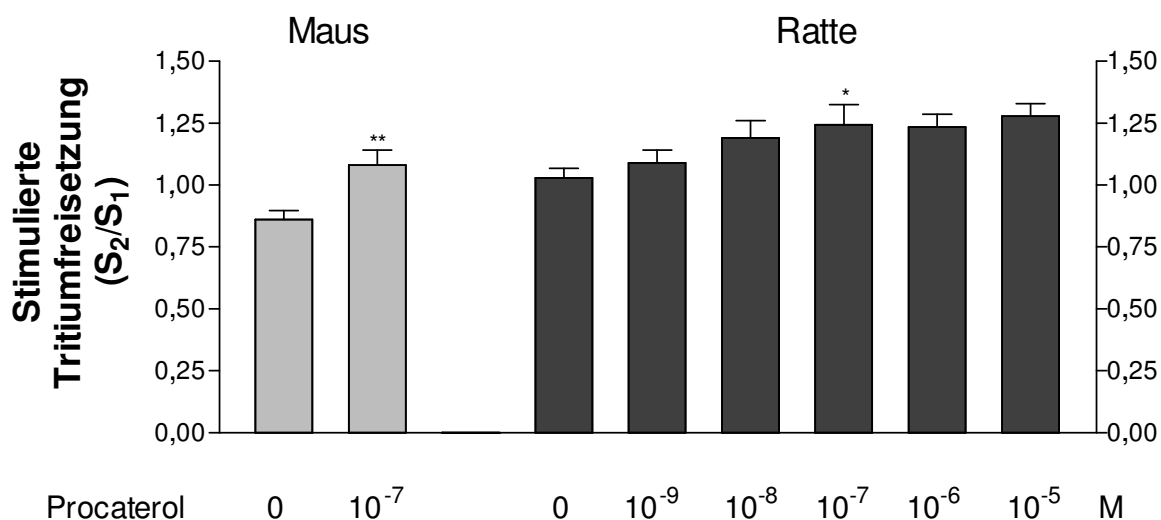


Abb. 8 Effekt von steigenden Konzentrationen von Procaterol auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus [³H]-Noradrenalin vorinkubiertem Nierenkortexgewebe der Maus und der Ratte. Mittelwerte ± SEM aus 6-8 Experimenten. *p < 0,05, **p < 0,01, verglichen mit der Kontrolle.

3.2.2 Modulation der Wirkung von Procaterol an der Niere durch die β₂- bzw. β₁-selektiven Antagonisten ICI 118.551 und CGP 20712A

Zum näheren Verständnis, ob sich die Steigerung der elektrisch stimulierten Tritiumfreisetzung aus mit [³H]-Noradrenalin vorinkubiertem Rattennierenkortexgewebe durch Procaterol tatsächlich auf präsynaptische β₂-Adrenozeptoren zurückführen lässt, wurde eine Versuchsreihe in An- und Abwesenheit des selektiven β₂-Adrenozeptorantagonisten ICI 118.551 und des selektiven β₁-Adrenozeptorantagonisten CGP 20712A durchgeführt. Dabei waren jeweils ICI 118.551 (5,4 × 10⁻⁸ M) oder CGP 20712A (10⁻⁶ M) oder keine der beiden Substanzen von Beginn an im Superfusionsmedium enthalten. 1 μM Procaterol wurde der Superfusionslösung ab der 62. Minute zugesetzt.

Abb. 9 zeigt den Effekt von 0,1 μM Procaterol auf die elektrisch stimulierte Noradrenalinfreisetzung in Abwesenheit der beiden selektiven Antagonisten und in Anwesenheit eines der beiden Antagonisten. Procaterol steigerte ähnlich wie in den dargestellten Versuchsreihen 3.2.1

und 3.2.3 die stimulierte Tritiumfreisetzung signifikant auf $122 \pm 6 \%$ gegenüber der Kontrolle. ICI 118.551 hob den Effekt von Procaterol vollständig auf, wohingegen CGP 20712A keinen Einfluss auf den freisetzungsteigernden Effekt des Procaterols hatte. Die beiden Antagonisten hatten per se keine Wirkung auf die stimulierte Tritiumabgabe (S_1).

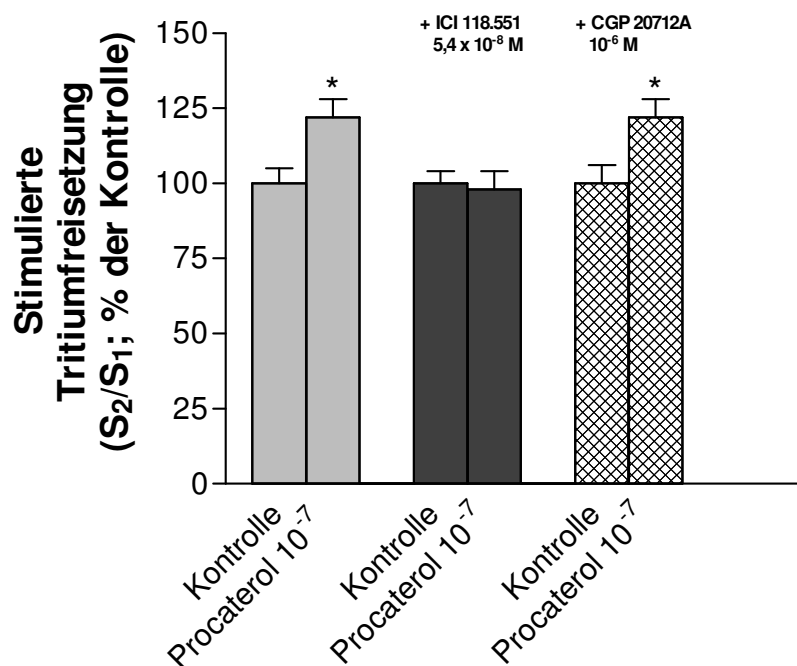


Abb. 9 Effekt von 100 nM Procaterol auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus [³H]-Noradrenalin vorinkubiertem Nierenkortexgewebe der Ratte in An- und Abwesenheit von ICI 118.551 bzw. CGP 20712A. Mittelwerte von S₂/S₁ in % der Kontrolle ± SEM aus 5-8 Experimenten. *p < 0,05, verglichen mit der entsprechenden Kontrolle.

3.2.3 Effekt unterschiedlicher Bupranolol-Analoga auf die stimulierte Noradrenalinfreisetzung an der Niere

Ziel der Versuchsreihe war es, nach der Bestimmung der Affinitäten zum β₂-Adrenozeptor durch Radioligandbindungsstudien (Tabelle 5), eine eventuelle intrinsische Aktivität der neu synthetisierten Bupranolol-Analoga an diesem Rezeptor-Subtyp zu ermitteln. Dafür wurde die Verän-

derung der elektrisch stimulierten Tritiumfreisetzung aus [^3H]-Noradrenalin vorinkubiertem Rattennierenkortex gemessen. Neben den sechs in ihrer intrinsischen Aktivität unbekanntem Liganden wurde Procaterol (1 μM) als Vergleichssubstanz untersucht. Alle untersuchten Substanzen waren dem Superfusionsmedium ab der 62. Minute zugesetzt. Um eine vollständige Besetzung der in den Nierenrindenschnitten vorhandenen β_2 -Adrenozeptoren sicherzustellen, wurde bei jedem der sechs Testpharmaka eine Konzentration gewählt, die 25fach höher als der in den Bindungsstudien ermittelte K_i -Wert ist (Tabelle 5). Die entsprechenden Konzentrationen sind aus Tabelle 7 ersichtlich.

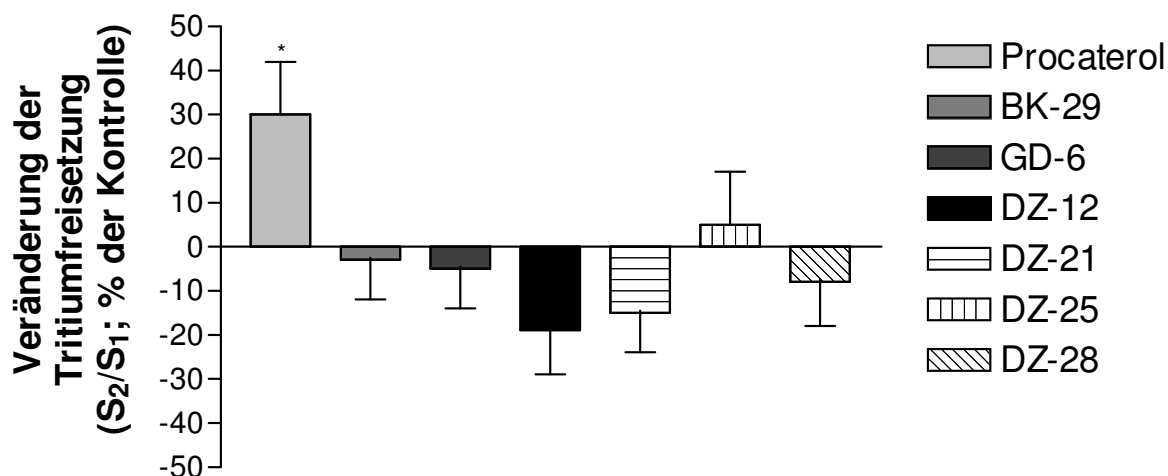


Abb. 10 Effekt von verschiedenen Bupranolol-Analoga auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus [^3H]-Noradrenalin vorinkubiertem Nierenkortexgewebe der Ratte im Vergleich zu Procaterol (1 μM). Mittelwerte S_2/S_1 in Prozent der Kontrolle \pm SEM aus 8-9 Experimenten. * $p < 0,05$, verglichen mit der Kontrolle.

Abb. 10 stellt die Veränderung der Tritiumfreisetzung (S_2/S_1) in Prozent der Kontrolle dar. Keine der untersuchten Substanzen steigerte die Tritiumfreisetzung signifikant, abgesehen von der bekanntermaßen am β_2 -Adrenozeptor agonistisch wirkenden Vergleichssubstanz Procaterol, die in dieser Versuchsreihe eine Steigerung von 30 ± 12 % bewirkte. BK-29, GD-6, DZ-12, DZ-21 und DZ-28 zeigten der Tendenz nach sogar eine Hemmung der Tritiumfreisetzung aus den Nierenkortexschnitten, die jedoch als nicht signifikant angesehen wurde ($p > 0,05$).

Die basale Tritiumfreisetzung (t_2/t_1) wurde – wie oben schon erwähnt – in der Regel durch die untersuchten Pharmaka nicht beeinflusst. Aus Tabelle 7 ist zu ersehen, dass allerdings DZ-21 und DZ-25 eine hoch signifikante Steigerung der basalen Tritiumabgabe bewirkten. Unter DZ-21 kam es zu einer Steigerung von $82 \pm 8 \%$, und DZ-25 bewirkte eine Steigerung von $67 \pm 9 \%$.

Ligand	Konzentration (nM)	t_2/t_1	Signifikanz	n
Kontrolle	-	$0,55 \pm 0,021$	-	9
Procaterol	1000	$0,58 \pm 0,031$	ns	9
BK-29	50	$0,58 \pm 0,014$	ns	8
GD-6	80	$0,53 \pm 0,018$	ns	8
DZ-12	190	$0,59 \pm 0,016$	ns	9
DZ-21	1300	$1,00 \pm 0,042$	*** $p < 0,001$	9
DZ-25	1200	$0,92 \pm 0,047$	*** $p < 0,001$	9
DZ-28	300	$0,57 \pm 0,015$	ns	9

Tabelle 7 Basaler Efflux (t_2/t_1) aus Nierenschnitten der Ratte in Anwesenheit verschiedener Liganden. Mittelwerte \pm SEM aus n Messwerten. *ns* nicht signifikant, *** $p < 0,001$, verglichen mit der Kontrolle.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Methoden

4.1.1 Charakterisierung der Radioligandbindungsstudien

Radioligandbindungsexperimente stellen eine sensible Messmethode dar, mit deren Hilfe die Größe einer Rezeptorpopulation sowie die Affinität zwischen Rezeptor und Radioligand bzw. Rezeptor und nicht radioaktiv markiertem Ligand bestimmt werden können. Dazu wird ein Ligand, der chemisch stabil und möglichst hydrophil ist, mit einem spontan zerfallenden und empfindlich detektierbaren Isotop, z.B. wie in dieser Arbeit dem [³H]-Tritium-Isotop (HWZ 12 Jahre, β -Strahler), markiert. Durch den Austausch eines [¹H]- gegen das [³H]-Isotop werden die physikochemischen Eigenschaften des Liganden nur unmaßgeblich verändert, was bedeutet, dass sich idealerweise die Radioliganden in den Bindungsexperimenten so verhalten wie die entsprechenden unmarkierten Liganden. Ein Radioligand sollte möglichst affin zum Rezeptor sein, da so eine geringere Konzentration eingesetzt werden kann, aus der eine geringere nicht-spezifische Bindung resultiert (Bylund und Yamamura, 1990). Bei ansteigender Ligandkonzentration sollte der Radioligand als Folge der begrenzten Anzahl von Membranrezeptoren ein Sättigungsverhalten zeigen. Damit sich nach einer definierten Inkubationszeit ein Bindungsgleichgewicht einstellt, in dem gleichzeitig Assoziations- und Dissoziationsvorgänge stattfinden können, muss der Radioligand reversibel an den untersuchten Rezeptor binden. Somit kann der Ligand vom eingesetzten Displacer aus seiner Rezeptorbindung verdrängt werden.

In den Bindungsexperimenten dieser Arbeit wurde der Radioligand [³H]-CGP-12177 eingesetzt, der zuvor bereits in vergleichbaren Bindungsexperimenten an β -Adrenozeptoren von unserer Arbeitsgruppe verwendet wurde (Malinowska et al., 2003). [³H]-CGP-12177 ist ein Radioligand, der alle oben genannten Eigenschaften aufweist (Riva und Creese, 1989; Staehelin et al., 1983). [³H]-CGP-12177 ist ein nicht-selektiver Ligand an β -Adrenozeptoren: Antagonist an β_1 und β_2 , partieller Agonist an β_3 und Agonist am niedrig-affinen Zustand des β_1 -Adrenozeptors. Zur

Markierung des β_3 -Adrenozeptors ist der Radioligand wegen seiner geringen Affinität zum Rezeptor ungeeignet (Niclaß et al., 2006). Für die Bindungsstudien in dieser Arbeit, in denen der β_1 - und der β_2 -Adrenozeptor-Subtyp markiert werden sollte, ist der Radioligand allerdings günstig, da die Affinitäten von [^3H]-CGP-12177 zu beiden Subtypen ähnlich hoch sind (Niclaß et al., 2006). Die antagonistische Natur von [^3H]-CGP-12177 bringt zusätzlich den Vorteil, dass der Radioligand generell alle verfügbaren Rezeptoren markiert und nicht wie Agonisten möglicherweise nur einen aktiven Zustand des Rezeptors (Bylund und Yamamura, 1990).

Die Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D und der maximalen Anzahl der spezifischen Bindungsstellen B_{max} von [^3H]-CGP-12177 erfolgte mit Hilfe von Sättigungsbindingsexperimenten an Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte (Malinowska et al., 2003; Tadokoro et al., 1997). Die Ermittlung der Bindungsparameter, einerseits für den β_1 - (Malinowska et al., 2003), andererseits für den β_2 -Adrenozeptor, geschah in Anwesenheit von hoch selektiven Antagonisten in der Lösung. Es wurde jeweils entsprechend der hochselektive β_2 -Adrenozeptorantagonist ICI 118.551 oder der hochselektive β_1 -Adrenozeptorantagonist CGP 20712A zur Blockade des β_2 - bzw. des β_1 -Adrenozeptors eingesetzt (Beer et al., 1988). Die Konzentrationen beider Antagonisten wurden so hoch gewählt, dass der Radioligand von dem zu blockierenden Subtyp verdrängt, der jeweils andere, zu untersuchende Subtyp aufgrund der geringen Affinität der Antagonisten jedoch nicht beeinflusst wurde. Die computergestützte Regression für die spezifische Bindung von [^3H]-CGP-12177 ergab jeweils eine signifikant bessere Kurvenanpassung für eine einseitige gegenüber einer zweiseitigen Sättigungsbindingisothermen. Dies und die Tatsache, dass die Scatchard-Plots eine Gerade zeigten, deuten auf eine sättigbare Bindung an nur einer Bindungsstelle hin und zeigen damit ferner die erfolgreiche Blockierung der jeweils anderen Bindungsstelle des Radioliganden [^3H]-CGP-12177.

Die in den Sättigungsbindingsexperimenten ermittelten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D lagen für den β_1 -Adrenozeptor bei $0,20 \pm 0,05$ nM und für den β_2 -Adrenozeptor bei $0,38 \pm 0,01$ nM. Beide Werte belegen sowohl eine hohe Affinität des Radioliganden zu den β -Adrenozeptor-Subtypen als auch das Fehlen einer signifikanten Subtypenselektivität. Die mit der Scatchard-Analyse erhaltenen K_D -Werte waren vergleichbar ($0,25 \pm 0,04$ nM für β_1 ; $0,40 \pm 0,01$ nM für β_2). Morin et al. (1992) ermittelten in Verdrängungsstudien mit der β_1 -selektiven Substanz CGP 20712A als Displacer am zerebralen Kortex der Ratte K_D -Werte für [^3H]-CGP-12177 an β -

Adrenozeptoren, die in ihrer Größenordnung mit denen in dieser Arbeit ermittelten K_D -Werten vergleichbar sind: Der K_D -Wert für den β_1 -Adrenozeptor ist nahezu gleich (0,13 nM), der Wert für den β_2 -Adrenozeptor liegt etwas niedriger (0,08 nM). Die leichten Schwankungen könnten mit Verfahrensunterschieden (etwas andere Methode, abweichende Proteinkonzentrationen und Pufferzusammensetzungen) beider Studien zusammenhängen. Eine mögliche Vergleichbarkeit mit den K_D -Werten aus der vorliegenden Arbeit besteht durchaus auch mit einer Studie, die an Myokardgewebe der Ratte durchgeführt wurde: Tsuchihashi et al. (1989) erhielten in Verdrängungsstudien mit Propranolol und Metoprolol als Displacer K_D -Werte für [3 H]-CGP-12177 am β_1 -Adrenozeptor (0,24 nM) und am β_2 -Adrenozeptor (0,44 nM), die tatsächlich annähernd mit denen aus der vorliegenden Arbeit übereinstimmen.

Im zerebralen Kortex ist die β_2 -Adrenozeptordichte deutlich niedriger als die der β_1 -Adrenozeptoren ($\beta_1:\beta_2 \triangleq 80:20$; Minneman et al., 1979; $\beta_1:\beta_2 \triangleq 87:13$, Morin et al., 1992). Daher wurde für die Bestimmung der Bindungsparameter am β_2 -Adrenozeptor-Subtyp eine etwa 4-mal höhere Proteinmenge ($674 \pm 63 \mu\text{g}$) als am β_1 -Adrenozeptor ($183 \pm 37 \mu\text{g}$) eingesetzt, damit ausreichend viele Rezeptor-Radioliganden-Komplexe entstehen und gemessen werden konnten, und somit eine valide Auswertung der Bindungsparameter für den β_2 -Adrenozeptor möglich wurde. Die Anzahl der spezifischen β_2 -Bindungsstellen für [3 H]-CGP-12177 im zerebralen Kortex der Ratte ergab lediglich etwa ein Drittel des B_{max} am β_1 -Adrenozeptor ($27,38 \pm 3,41$ versus $78,66 \pm 8,14 \text{ fmol/mg Protein}$). Die höhere Proteinmenge war auch Ursache für die erhöhte unspezifische Bindung während der Sättigungsbindungsexperimente am β_2 -Adrenozeptor: im Mittel $32,2 \pm 1,2 \%$ der totalen Bindung; im Vergleich dazu lag der Mittelwert in der Versuchsreihe am β_1 -Adrenozeptor lediglich bei $19,7 \pm 3,3 \%$ der totalen Bindung.

4.1.2 Charakterisierung der Superfusionsexperimente

Superfusionsversuche dienen der Untersuchung von präsynaptischen Mechanismen. Mit Hilfe dieser Methode (Starke, 1977) kann die Modulierbarkeit der Transmitterfreisetzung durch an präsynaptisch lokalisierten Rezeptoren angreifende Substanzen beurteilt werden. Um den Transmitter detektieren zu können, wird die Gewebepräparation in einer Lösung des radioaktiv

markierten Neurotransmitters vorinkubiert. Anschließend wird die Transmitterfreisetzung durch elektrische Stimulation ausgelöst und die in eine physiologische Salzlösung abgegebene Radioaktivität gemessen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Noradrenalinfreisetzung im sympathischen Nervensystem untersucht. Dabei wurde das radioaktiv markierte [^3H]-Noradrenalin verwendet, welches das gleiche chemische Verhalten zeigt wie sein nicht markiertes Analogon. Das [^3H]-Noradrenalin wird während der Inkubation über den neuronalen Noradrenalin-Transporter aufgenommen, und nach erfolgter Speicherung in Vesikeln und geeigneter elektrischer Stimulation als solches exozytotisch wieder freigesetzt. Dieser elektrische Stimulus bewirkt also, dass Aktionspotentiale entlang der Axone in die Nervenendigung gelangen, dort zu einem Ca^{2+} -Einstrom und zur Freisetzung des Transmitters in den synaptischen Spalt führen. Der Entzug von Kalzium und andererseits die Zugabe von Tetrodotoxin, welches das Fortleiten des Aktionspotentials durch Hemmung spannungsabhängiger Natriumkanäle verhindert, unterbindet die Freisetzung des Neurotransmitters (Narahashi et al., 1964). In Kapitel 3.2.1 wurde die Ca^{2+} -Abhängigkeit und Tetrodotoxin-Sensitivität der Noradrenalinfreisetzung aus Nervenendigungen des renalen Kortex der Ratte unter den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen aufgezeigt und damit der Nachweis erbracht, dass die in-vitro-Freisetzung mit der physiologischen Transmitterfreisetzung vergleichbar ist; dies wird als „quasi-physiologische“ Transmitterfreisetzung bezeichnet. In der Arbeit von Rump et al. (1992) ist die quasi-physiologische Noradrenalinfreisetzung aus elektrisch stimulierten Nierenkortexpräparationen der Ratte ebenfalls beschrieben. Der entsprechende Nachweis wurde auch für Nierenpräparationen der *Maus* erbracht (Schultheiß, 2005), an denen in der vorliegenden Arbeit eine kleine Versuchsserie durchgeführt wurde.

Die Wahl der Parameter für den elektrischen Reiz und die Kalziumkonzentration im Superfusionsmedium mussten so getroffen werden, dass einerseits eine ausreichende Tritiummenge freigesetzt wurde, andererseits eine gute Modulierbarkeit der Transmitterfreisetzung erhalten blieb. Eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz und der Kalziumkonzentration hat zwar eine höhere Tritiumfreisetzung zur Folge, bewirkt allerdings eine Abnahme der Modulierbarkeit (Starke, 1977), weshalb angestrebt wurde, beide Parameter so gering wie möglich zu halten. Das gleiche gilt für den zusätzlich eingesetzten Kaliumkanalblocker Tetraethylammoniumchlorid (TEA), der die Repolarisationsphase im Rahmen eines Aktionspotentials verlangsamt, dadurch

die Dauer des Aktionspotentials verlängert und letztendlich die Noradrenalinfreisetzung steigert. Um die Rückaufnahme des Transmitters in die Nervenendigung und damit die Abnahme der Transmitterkonzentration nach seiner Ausschüttung im synaptischen Spalt zu verhindern, wurde dem Superfusionsmedium Desipramin als Hemmstoff des Noradrenalin-Rückaufnahme-Transporters hinzugefügt.

Im verwendeten Versuchsmodell sollte durch die Aktivierung präsynaptischer β_2 -Adrenozeptoren eine pharmakoninduzierte Modulation der Noradrenalinfreisetzung sichtbar gemacht werden. Zur Frage des Vorkommens von Adrenozeptoren des β_2 -Subtyps sei an dieser Stelle auf die Arbeit von Lakhani et al. (1994) verwiesen, in der durch Radioligandbindung und Autoradiographie kombiniert mit chirurgischer Denervation die Existenz von β_2 -Adrenozeptoren auf Nervenendigungen des Sympathikus in der Rattenniere aufgezeigt wurde.

4.2 Konkurrenzexperimente zur Bestimmung der Affinitäten zweier Substanzenreihen zu β -Adrenozeptoren im zerebralen Kortex der Ratte

Diverse β -Adrenozeptor-bindungsfähige Liganden wurden in der Vergangenheit synthetisiert und in den Handel gebracht, dies waren sowohl Substanzen mit agonistischen oder partialagonistischen als auch mit antagonistischen Eigenschaften. Eine gewisse chemische Grundstruktur ist ihnen jedoch fast allen gemeinsam: die β -Adrenozeptoragonisten und einige wenige β -Adrenozeptorantagonisten (z.B. Dichlorisoprenalin, Sotalol) besitzen als chemisches Grundgerüst ein Phenylethanolamin-Molekül und leiten sich somit direkt von den endogenen Agonisten Adrenalin und Noradrenalin ab, nahezu alle übrigen handelsüblichen Beta-Blocker weisen eine Phenoxypropanolamin-Grundstruktur auf, die eine Modifikation des Phenylethanolamin-Moleküls darstellt, welche den Liganden durch Einschub einer $-O-CH_2$ -Brücke eine größere antagonistische Wirkung am β -Adrenozeptor verleiht. Die Grundstruktur der Liganden (Abb. 11) besitzt bereits alle chemischen Bestandteile, damit eine Interaktion mit dem β -Adrenozeptor möglich ist: die protonierte Form des sekundären aliphatischen Amins geht eine ionische Wechselwirkung mit dem Rezeptor ein, die aliphatische Hydroxylgruppe am chiralen β -

Kohlenstoff-Atom, die nicht substituiert sein darf, bildet Wasserstoffbrückenbindungen aus und der Arylrest tritt in Wechselwirkung mit Arylresten von bestimmten Aminosäuren des Rezeptorproteins (Griffin et al., 2004; Ruffolo et al., 1995). Weitere Substituenten, entweder am Arylrest, an der Aminogruppe oder am α -C-Atom beeinflussen die Rezeptoraktivität, Affinität und Subtypenselektivität im chemischen Zusammenspiel. Es ist deshalb schwer möglich, einzelne Substituenten und Komponenten des Moleküls direkt und zweifelsfrei mit spezifischen Eigenschaften der Liganden zu verknüpfen. Da einzelne Substituenten jedoch durchaus auf Eigenschaften der Substanzen am Rezeptor hindeuten können, wurde nachfolgend auch die Art und Position der Substitutionen im Einzelnen diskutiert.

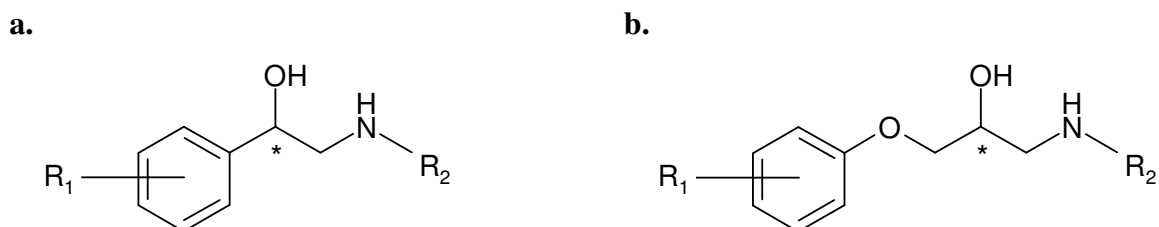


Abb. 11 Chemische Grundstruktur klassischer β -Adrenozeptorliganden; a. Phenylethanolamin; b. Phenoxyisopropanolamin

4.2.1 Affinität einer Reihe am Beta-Blocker-Grundgerüst aliphatisch substituierter Substanzen zu β -Adrenozeptoren

Ziel dieser Studie war es, eine Reihe von neu synthetisierten Substanzen auf ihre Affinität zu β -Adrenozeptoren hin zu untersuchen. Die Substanzen, als potentielle Beta-Blocker hergestellt, unterscheiden sich allerdings in ihrer Grundstruktur von klassischen Phenoxypropanolamin- und Phenylethanolamin-Derivaten. Statt des für klassische β -Adrenozeptorantagonisten typischen und nach gängiger wissenschaftlicher Meinung wesentlichen Arylrestes besitzen die neuartigen Substanzen ein aliphatisches Isoindol-1,3-dion-Ringsystem. Untereinander unterscheiden sich die chemischen Strukturen der sieben Substanzen durch die Substitution am aliphatischen Ringsystem und an der Aminogruppe des Beta-Blocker-Grundgerüsts. Tabelle 8 zeigt die chemischen Strukturen der sieben auf ihre Affinität hin untersuchten neuartigen Substanzen.

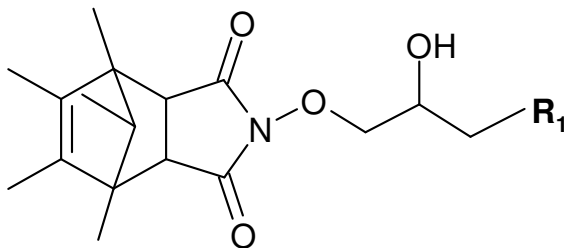
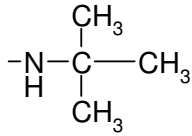
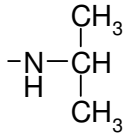
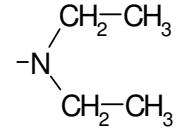
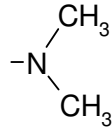
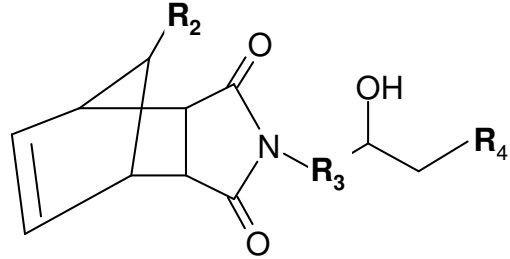
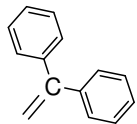
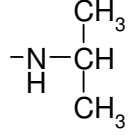
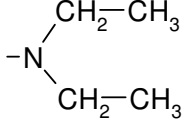
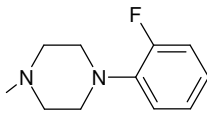
				
Substanz	A1	A2	A3	A5
Rest				
R₁				
				
Substanz	AW6B	W2D	W2H	
Rest				
R₂		H	H	
R₃	-CH ₂ -	-O-CH ₂ -	-O-CH ₂ -	
R₄				

Tabelle 8 Chemische Strukturen der sieben am Ethanolamin-Grundgerüst aliphatisch substituierten Substanzen.

Bei den klassischen Beta-Blockern und Beta-Mimetika ist ein Aromat üblicher Bestandteil des Moleküls und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Interaktion mit dem β -Adrenozeptor-Protein (z.B. Petrongolo et al., 1977). Es gibt jedoch Arbeitsgruppen, die bereits mit Hilfe von experimentellen und theoretischen Studien widerlegten, dass der Besitz eines Phenyl- bzw. Phenoxymethylrestes für die Aktivität von Liganden am β -Adrenozeptor essentiell ist: Macchia et al. synthetisierten komplett aliphatische Oximether-Derivate und stellten die Hypothese auf, dass der [(Methylenamino)oxy]methylrest (1985, Abb. 12 **A**) und der [(Methyloxy)imino]methylrest (1994, Abb. 12 **B**) der neu entwickelten Substanzen einen Teil des aromatischen Ringes von β -Adrenozeptorliganden strukturell und elektronisch simulieren können. Alle Verbindungen zeigten tatsächlich einen ausgeprägten Antagonismus an β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren mit tendenzieller Bronchoselektivität. Nachdem Leclerc et al. (1980) an analogen Oximether-Verbindungen ähnliche Beobachtungen machten, synthetisierten sie diverse aliphatische Etherverbindungen (Abb. 12 **C**) und verwarfen ihrerseits, in Anbetracht der bei den neuartigen Substanzen beobachteten β -antagonistischen Potenz, die Hypothese, dass die Imin-Bindung der Oximether mittels einer Nachahmung von Teilen des aromatischen Ringes für eine Aktivität am β -Adrenozeptor verantwortlich sein könnte. Sie zeigten ferner, dass sogar eine ausschließlich mit einer Hydroxylgruppe substituierte Isopropanolamin-Verbindung noch geringe β -adrenerge Wirksamkeit aufweist (Leclerc et al., 1980).

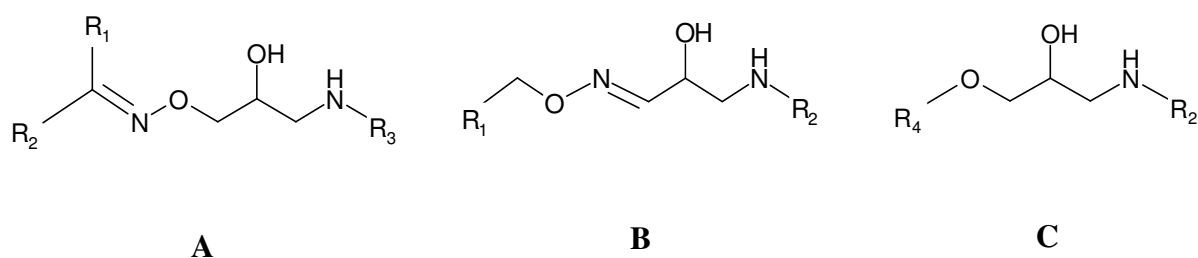


Abb. 12 Drei Klassen rein aliphatischer β -Adrenozeptorantagonisten: Oximether-Verbindung mit [(Methylenamino)oxy]methylrest (**A**), Oximether-Verbindung mit [(Methyloxy)imino]methylrest (**B**), Ether-Derivat (**C**); R_{1-3} entsprechen Alkylgruppen, R_4 entspricht Alkylgruppe oder N-Alkylgruppe

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Affinität der zyko-aliphatisch substituierten Substanzen Konkurrenzexperimente (siehe Kap. 2.1.4) an β -Adrenozeptoren in Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte durchgeführt, in denen zehn aufsteigende Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz zur Verdrängung eines Radioliganden vom gefragten β -Adrenozeptor-Subtyp eingesetzt wurden. Zur Blockade des β_2 - bzw. des β_1 -Adrenozeptors wurde wiederum jeweils entsprechend der selektive β_2 -Adrenozeptorantagonist ICI 118.551 oder der selektive β_1 -Adrenozeptorantagonist CGP 20712A eingesetzt (Beer et al., 1988).

Es wurde festgestellt, dass die Substanzen in der untersuchten Konzentrationsspanne (bis höchstens 3 μ M), keine Verdrängung des Radioliganden [3 H]-CGP-12177 weder aus der Rezeptorbindung am β_1 - noch am β_2 -Adrenozeptor bewirkten. Eine mögliche Verdrängung des Radioliganden durch eine noch höhere Konzentration der Substanz wurde nicht überprüft, da dies im Hinblick auf einen späteren therapeutischen oder experimentellen Nutzen der Substanzen wenig interessant war. Die neu synthetisierten Substanzen mit atypischer Beta-Blocker-Struktur besitzen letztendlich keine relevante Bindungsaffinität zu β_1 - und β_2 -Adrenozeptor-Subtypen.

Leclerc und Mitarbeiter (1980) ersetzten im Verlauf ihrer Struktur-Wirkungs-Studien das Ether-Sauerstoff-Atom der rein aliphatischen Beta-Blocker durch ein Stickstoff-Atom, was zu inaktiven Substanzen führte. Die Molekülstrukturen der Verbindungen waren dabei mit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanz AW6B vergleichbar. Das Ether-Sauerstoff-Atom scheint offenbar für die adrenerge Aktivität der Substanzen von großer Bedeutung zu sein (Leclerc et al., 1980), was auch eine mögliche Erklärung für die fehlende Bindungsaffinität von AW6B sein könnte. Struktur-Wirkungs-Studien zeigten außerdem die Wichtigkeit des Protons am Stickstoff-Atom der Aminofunktion für die β -adrenerge Aktivität einer Verbindung. Eine tertiäre Aminosubstitution, wie in den Substanzen A3, A5, W2D und W2H vorhanden, eliminiert gewöhnlich die Affinität an β -Adrenozeptoren (Ruffolo et al., 1995). Sie ist vielmehr bei einer Reihe von α -Adrenozeptorantagonisten zu finden.

Die Substanzen A1, A2, A3, A5, W2D und W2H ähneln in ihrer Molekülstruktur im Wesentlichen den aliphatischen Ether-Derivaten von Leclerc et al. (1980). Eine Bindung der Substanzen am β -Adrenozeptor, insbesondere von A1 und A2, deren sekundäre Aminogruppe mit

einem tertiären Butylrest bzw. einem iso-Propylrest versehen ist, schien daher prinzipiell möglich. Balsamo et al. (1994) und Leclerc et al. (1980) prüften auch einige Verbindungen mit zyklischen aliphatischen Substituenten, die β -antagonistische Aktivität zeigten. Dies waren allerdings im Gegensatz zu den relativ sperrigen Isoindol-1,3-dion-Substituenten der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen kleinere Propan- oder Hexanringstrukturen. Letztlich passen die untersuchten inaktiven Verbindungen vermutlich aufgrund ihrer räumlichen Konformation und der elektronischen Verteilung innerhalb des Molekülrestes der Substituenten nicht in die Rezeptortasche des β -Adrenozeptors. Es ist bekannt, dass vielfach verzweigte Alkylgruppen funktionelle Gruppen durch ihren Raumbedarf beeinflussen und durch diese sterische Hinderung deren Reaktivität hemmen können.

4.2.2 Affinität einer Reihe von Bupranolol-Analoga zu β -Adrenozeptoren

Ziel dieser Teilstudie war es, die Bindungsaffinitäten zum β_1 - und β_2 -Adrenozeptor von sechs neu synthetisierten Phenoxypropanolamin-Derivaten, deren chemische Strukturen sich vom Bupranolol-Molekül ableiten, zu untersuchen. Untereinander unterscheiden sich die Moleküle der sechs Substanzen durch ihre Substitution am Phenoxyrest und der Aminogruppe des Beta-Blocker-Grundgerüsts. Es sollte diskutiert werden, ob und inwieweit die chemische Struktur der Substanzen sowie die Art und Position ihrer Substitutionen Einfluss auf die Affinität zu den untersuchten β -Adrenozeptor-Subtypen besitzt. Ähnliche Substanzen wurden bereits in der Vergangenheit von unserer Arbeitsgruppe auf ihre Aktivität hin untersucht (Malinowska et al., 2003). Genau wie in dieser Arbeit wurden auch hier zur Ermittlung der Affinitäten Kompetitions-experimente durchgeführt.

Die Tabelle 9 zeigt die chemischen Strukturen von Bupranolol und den untersuchten Bupranolol-Analoga; die Strukturen des β_1 -selektiven Antagonisten CGP 20712A und des β_2 -selektiven Antagonisten ICI 118.551 sind Tabelle 5 zu entnehmen.

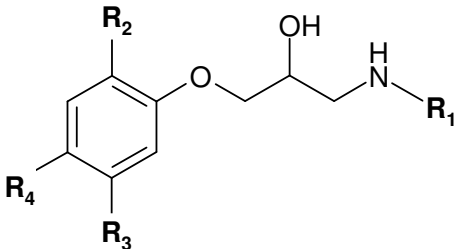
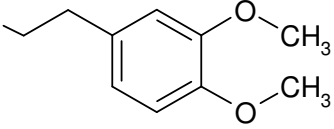
				
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>X</p> $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ </div> <div style="text-align: center;"> <p>Z</p>  </div> </div>				
<div style="text-align: center;"> <p>Y</p> $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ </div>				
Substanz \ Rest	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Bupranolol	X	Cl	CH ₃	H
BK-29	X	Cl	CH ₃	OH
GD-6	X	F	CH ₃	H
DZ-12	X	F	H	H
DZ-21	Z	F	CH ₃	H
DZ-25	Z	F	H	H
DZ-28	Y	F	CH ₃	H

Tabelle 9 Chemische Strukturen von Bupranolol und den sechs untersuchten Analoga.

4.2.2.1 Affinität am β_1 -Adrenozeptor

Rangfolge	CGP 20712A >> DZ-25 > DZ-12 > DZ-21 > GD-6 > BK-29 > DZ-28						
pK _i -Wert	8,76	8,36	8,28	8,06	7,91	7,83	7,62

Tabelle 10 Affinität der untersuchten Substanzen am β_1 -Adrenozeptor

Alle sechs neu synthetisierten Substanzen zeigten eine niedrigere Bindungsaffinität zum β_1 -Adrenozeptor als die Referenzsubstanz, der selektive β_1 -Adrenozeptorantagonist CGP 20712A. Zum Erreichen der halbmaximalen Besetzung der im Proteinhomogenat vorhandenen Rezeptorbindungsstellen war demzufolge eine geringere Konzentration von der Referenzsubstanz als von den neuen potentiellen Beta-Blockern nötig. Für die Bindung von CGP 20712A am β_1 -Adrenozeptor wurde ein pK_i -Wert von $8,76 \pm 0,11$ bestimmt. Der Wert ist annähernd gleich mit dem Literaturwert $8,81 \pm 0,03$ von Baker (2005). Die Substanz DZ-28 zeigte die geringste Affinität der untersuchten Substanzen zum β_1 -Adrenozeptor. Sie erreichte eine halbmaximale Besetzung der Bindungsstellen in einer Konzentration, die in etwa eine Zehnerpotenz höher lag als die der Referenzsubstanz ($pK_i_{DZ-28} = 7,62 \pm 0,12$).

Den Substanzen mit der höchsten Affinität zum β_1 -Adrenozeptor (CGP 20712A, DZ-25, DZ-12) ist das Fehlen des Methyl-Substituenten am Phenoxyrest in meta-Position gemeinsam. Offenbar rief diese Methylgruppe eine Bindungsabschwächung am β_1 -Rezeptor-Subtyp hervor und schien den größten Einfluss aller Substituenten auf die Affinität zu haben. Es offenbarte sich bereits in früheren Struktur-Wirkungs-Studien unserer Arbeitsgruppe an Bupranolol-Analoga eine durch die meta-Methyl-Substituenten hervorgerufene, geringe Verminderung der Affinität am β_1 -Adrenozeptor (siehe Malinowska et al., 2003; vgl. BK-23 und BK-28 (Bevantolol), sowie Desmethylbupranolol und Bupranolol).

Ein großer Substituent an der Aminofunktion der Beta-Blocker-Grundstruktur, bei den Substanzen CGP 20712A (5-Ethoxysalicylamidrest), DZ-25 und DZ-21 (3,4-Dimethoxyphenylethylrest) zu finden, führte ferner zu einer erhöhten Affinität im Vergleich zu den an der Aminogruppe mit einer iso-Propyl oder tertiären Butylgruppe versehenen analogen Substanzen. Die Studie von Bilezikian et al. (1978 a) demonstrierte die Bedeutung des Substituenten an der Aminofunktion als bestimmenden Faktor für die Affinität zum β -Adrenozeptor: Je sperriger der Substituent, desto größer war in der Regel die Affinität der untersuchten Analoga zum Rezeptor. Die Substanzen mit verzweigten Isopropyl- und tertiären Butylgruppen waren auch bei Bilezikian und Mitarbeitern etwas weniger affin als Substanzen mit längerer Alkylgruppe, die, wie auch bei DZ-25 und DZ-21 zu sehen, zusätzlich eine Phenylgruppe trug.

Der Einfluss des Substituenten an der Aminofunktion auf die β_1 -Affinität steht jedoch anscheinend hinter dem der Methylgruppe in meta-Position zurück, da die experimentell bestimmte Affinität von DZ-21 (pK_i $8,06 \pm 0,08$) geringer ist als die der Substanz DZ-12 (pK_i $8,28 \pm 0,04$), welcher der meta-Methyl-Substituent fehlt.

Die geringste Affinität am β_1 -Adrenozeptor wurde für die Substanz DZ-28 ermittelt. DZ-28 besitzt genau wie die Substanzen GD-6 und BK-29 eine bindungsabschwächende meta-Methylgruppe am Phenoxyrest, hat jedoch genauso wie der selektive β_2 -Adrenozeptorantagonist ICI 118.551 (niedriger pK_i -Wert am β_1 -Adrenozeptor: $6,52 \pm 0,02$ [Baker, 2005]) einen Iso-Propyl-Substituenten an der Aminogruppe statt eines tertiären Butylrestes wie GD-6 und BK-29. Die tertiäre Butylgruppe bewirkt offenbar aufgrund der ausgedehnteren Verzweigung des Substituenten einen leichten Affinitätsvorteil am β_1 -Adrenozeptor gegenüber dem Iso-Propylrest.

Zusammenfassung der Molekülstrukturen, die die untersuchten Substanzen offenbar affiner zum β_1 -Adrenozeptor machen:

- **Fehlen eines Substituenten in meta-Position des Arylrestes**
- **je sperriger und verzweigter der Substituent an der Aminofunktion, desto affiner**

4.2.2.2 Affinität am β_2 -Adrenozeptor

Rangfolge	ICI 118.551 >> BK-29 > GD-6 >> DZ-12 > DZ-28 >> DZ-25 \geq DZ-21						
pK_i -Wert	9,14	8,71	8,50	8,15	7,87	7,37	7,33

Tabelle 11 Affinität der untersuchten Substanzen am β_2 -Adrenozeptor

Die höchste Bindungsaffinität am β_2 -Adrenozeptor wurde für die bekannte Referenzsubstanz, den selektiven β_2 -Adrenozeptorantagonist ICI 118.551, gefunden (pK_i ICI 118.551 $9,14 \pm 0,40$). Baker (2005) ermittelte mit $9,26 \pm 0,03$ einen ähnlich hohen pK_i -Wert für die Substanz ICI 118.551, die ihre hohe β_2 -Affinität und β_2 -Selektivität durch eine Methyl-Substitution am α -Carbon-Atom erhält. Diese Substitution reduziert zwar generell die Rezeptoraffinität, allerdings wesentlich mehr die Affinität zum β_1 - als jene zum β_2 -Adrenozeptor (Ruffolo, 1993).

Im Vergleich zur Referenzsubstanz erreichten die beiden untersuchten Substanzen mit der niedrigsten β_2 -Affinität (DZ-21, DZ-25) die halbmaximale Rezeptorbindung erst in einer Konzentration, die knapp zwei Zehnerpotenzen höher lag (pK_i DZ-21 $7,33 \pm 0,12$; pK_i DZ-25 $7,37 \pm 0,04$). Auffallend ist, dass DZ-21 und DZ-25, die beiden Substanzen mit der geringsten Affinität am β_2 -Adrenozeptor, im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Substanzen einen großen Aryl-Substituenten an der Aminofunktion des Beta-Blocker-Grundgerüst besitzen. Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass der 3,4-Dimethoxyphenylethyl-Substituent eine Bindungsabschwächung am β_2 -Adrenozeptor bewirkt.

In der Literatur wurde beschrieben, dass das N-tert-butyl-Analogon von Noradrenalin eine leichte Selektivität zum β_2 -Adrenozeptor besitzt (Ruffolo et al., 1995). Auch in der vorliegenden Studie verfügten die Substanzen mit einem tertiären Butylrest an der Aminogruppe (BK-29, GD-6, DZ-12) offenbar über einen leichten Bindungsvorteil gegenüber der Substanz mit iso-Propylrest (DZ-28), wengleich in Anbetracht der Tatsache, dass die affinste Substanz ICI 118.551 ebenfalls mit einem iso-Propylrest substituiert ist, die Wichtigkeit des unterschiedlichen Einflusses dieser beiden Substituenten auf die β_2 -Affinität relativiert werden muss.

Die höchste Affinität der Bupranolol-Analoga wurde für BK-29 ermittelt (pK_i BK-29 $8,71 \pm 0,22$), die Substanz, deren Arylrest mit einer para-Hydroxygruppe, einem ortho-Chlor-Atom und einen meta-Methyl-Substituenten versehen ist. Insgesamt zeigen sich die Substanzen mit einem meta-Methyl-Substituenten (BK-29, GD-6) affiner zum β_2 -Adrenozeptor als die Substanzen, denen diese Gruppe fehlt; ein zu verallgemeinernder Zusammenhang zwischen diesem Substituenten und der β_2 -Affinität lässt sich jedoch nicht ableiten, da beispielsweise DZ-21, die Substanz mit der niedrigsten ermittelten Affinität, auch einen solchen Methylrest besitzt.

Zusammenfassung der Molekülstrukturen, die die untersuchten Substanzen offenbar affiner zum β_2 -Adrenozeptor machen:

- **N-Butyl-Substituent affiner als N-3,4-Dimethoxyphenylethyl-Substituent**
- **Methyl-Substituent in meta-Position des Arylrestes**
- **evtl. para-Hydroxy- und/oder ortho-Chlor-Substituent am Arylrest**

4.2.2.3 Selektivität zu β_1 - oder β_2 -Adrenozeptor

Rangfolge β_1 -Selektivität	DZ-25 > DZ-21 > DZ-12 > DZ-28 > GD-6 > BK-29					
$K_i \beta_1 / K_i \beta_2$	0,1	0,2	0,7	1,8	3,9	7,6
Rangfolge β_2 -Selektivität	BK-29 > GD-6 > DZ-28 > DZ-12 > DZ-21 > DZ-25					
$K_i \beta_1 / K_i \beta_2$	7,6	3,9	1,8	0,7	0,2	0,1

Tabelle 12 Selektivität der untersuchten Substanzen zum β_1 - bzw. β_2 -Adrenozeptor

Mit den Substanzen DZ-25 und DZ-21 zeigten sich jene Substanzen als die β_1 -selektivsten Bupranolol-Analoga, welche an der Aminogruppe der Beta-Blocker-Grundstruktur mit einem vergleichsweise großen 3,4-Dimethoxyphenylethyl-Substituenten versehen sind. Die Erhöhung der β_1 -Selektivität durch einen solchen 3,4-Dimethoxyphenylethylrest wurde bereits von Hoefle et al. (1975) beschrieben. Um eine halbmaximale Besetzung der vorhandenen β_2 -Adrenozeptor-Bindungsstellen zu erreichen, musste von DZ-25 eine 10fach höhere Konzentration eingesetzt werden als zur halbmaximalen Besetzung der β_1 -Adrenozeptor-Bindungsstellen; von DZ-21 musste die Konzentration 5mal höher sein ($K_i \beta_1 \text{ DZ-25} / K_i \beta_2 \text{ DZ-25} = 0,1$; $K_i \beta_1 \text{ DZ-21} / K_i \beta_2 \text{ DZ-21} = 0,2$). Auch CGP 20712A, der bekannte hochselektive β_1 -Adrenozeptorantagonist, besitzt einen sperrigen Substituenten an der Aminofunktion. Eine sehr schwache β_1 -Selektivität wurde für die Substanz DZ-12 ermittelt ($K_i \beta_1 \text{ DZ-12} / K_i \beta_2 \text{ DZ-12} = 0,7$). Der Substanz DZ-12 und der β_1 -selektivsten Substanz DZ-25 fehlt der meta-Methyl-Substituent; DZ-21 und die übrigen β_2 -selektiveren Substanzen besitzen hingegen diesen Substituenten. Es lässt sich daher vermuten, dass das Fehlen der Gruppe einen Einfluss auf die erhöhte β_1 -Selektivität hat, der Effekt jedoch hinter dem Einfluss des großen Substituenten an der Aminogruppe zurücksteht.

Handelsübliche kardi selektive Beta-Blocker erlangen gewöhnlich ihre β_1 -Selektivität durch einen verhältnismäßig großen para-Substituenten (mit z.B. Carbamoyl-, Amido-, Ureido-, Acylamino-Bestandteilen) am Arylrest, der für die Abnahme der β_2 -Affinität verantwortlich gemacht werden kann (Ijzerman et al., 1985). Hoefle et al. (1975) fanden die größte Kardio-

selektivität bei Substanzen mit eher polaren Gruppen (Methoxy, Acetyl) in para- (oder meta-) Position des Arylrestes und mit eher unpolaren Gruppen (Halogen, Alkyl) in ortho- (oder meta-) Position des Arylrestes. Die Substanz BK-29, deren Arylrest eine para-Hydroxygruppe und ein ortho-Chlor-Atom aufweist, ist nun jedoch entgegen der Erwartung nicht β_1 -selektiv, sondern die β_2 -selektivste Substanz der Bupranolol-Analoga ($K_i \beta_1 \text{ BK-29} / K_i \beta_2 \text{ BK-29} = 7,6$). Diese Substanz hat, wie die beiden anderen, etwas weniger selektiven Substanzen GD-6 und DZ-28, einen kleineren Substituenten an der Aminogruppe und einen meta-Methyl-Substituenten am Phenoxyrest der Molekül-Grundstruktur.

Ebenfalls nicht ganz zwanglos lässt sich die Substanz Bupranolol in die Struktur-Wirkungs-Studien dieser Arbeit einordnen. Die Affinitäten am β_1 - und β_2 -Adrenozeptor sind mit pK_i -Werten von 8,66 und 8,51 (an β_1 : Malinowska, 2003; Baker 2005) und 9,85 (an β_2 : Baker, 2005) deutlich höher als die der hier untersuchten Bupranolol-Analoga. Die hohe β_2 -Selektivität von Bupranolol [$K_i \beta_1 \text{ Bup} / K_i \beta_2 \text{ Bup} = 22$ (Baker, 2005)] wurde von keiner Substanz erreicht; am ehesten noch von BK-29, das sich nur durch die para-Hydroxygruppe am Arylrest von Bupranolol unterscheidet. Die strukturelle Nähe des BK-29-Moleküls zum Bupranolol-Molekül erklärt zwar nicht die insgesamt relativ geringe Affinität der neuen Substanz zu den beiden β -Adrenozeptor-Subtypen, könnte aber dann doch die eher unerwartete β_2 -Selektivität erklären.

Zusammenfassung der Molekülstrukturen, die die untersuchten Substanzen offenbar selektiver zum β_1 -Adrenozeptor machen:

- sperriger, verzweigter Substituent an der Aminofunktion
- Fehlen eines Substituenten in meta-Position des Arylrestes

Zusammenfassung der Molekülstrukturen, die die untersuchten Substanzen offenbar selektiver zum β_2 -Adrenozeptor machen:

- evtl. para-Hydroxy- und/oder ortho-Chlor-Substituent am Arylrest
- weniger sperriger Substituent am Arylrest
- Methyl-Substituent in meta-Position des Arylrestes

4.3 Funktionelle Experimente an β_2 -Adrenozeptoren in Nierenkortexschnitten der Ratte und der Maus

4.3.1 Effekt von Procaterol auf die stimulierte Noradrenalinfreisetzung an der Niere

Das renale sympathische Nervensystem spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der renovaskulären Hypertonie, was ein erhöhter Noradrenalin Spiegel in Plasma und Urin bei Patienten mit essentieller Hypertonie belegt (Oparil, 1986). Überdies hat es über die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und die Steigerung der Natriumretention Einfluss auf den Blutdruck (DiBona, 1985). Die nähere pharmakologische Charakterisierung der modulierenden Eigenschaften präsynaptischer, fazilitatorischer β -Adrenozeptoren ist daher interessant im Hinblick auf eine Therapie des Bluthochdrucks durch einen möglichen Einfluss über diese Rezeptoren auf die Aktivität des renalen noradrenergen Nervensystems.

Die Aktivierung von präsynaptisch lokalisierten β_2 -Adrenozeptoren steigert die Noradrenalinfreisetzung in sympathisch innervierten Geweben (Majewski, 1983). Dies erfolgt über eine Aktivierung der Adenylatcyclase und einen Anstieg an cAMP (Johnston et al., 1987). Für Adrenalin bei gleichzeitiger Blockierung präsynaptischer α -Adrenozeptoren durch Phentolamin (Steenberg et al., 1983), Isoprenalin (Steenberg et al., 1983; Verbeuren und Herman, 1986), Salbutamol (Ekas et al., 1983) und Procaterol (Lakhlani et al., 1994) wurde eine Steigerung der Noradrenalinfreisetzung in der Rattenniere gezeigt. Neuronal freigesetztes Noradrenalin aktiviert die präsynaptischen β -Adrenozeptoren nicht, da weder ICI 118.551 und der β_1 -selektive Antagonist Atenolol in der Rattenniere (Rump et al., 1992), noch der unselektive β -Adrenozeptorenblocker Propranolol im narkotisierten Hund (Chen et al., 1984) die renale Noradrenalinfreisetzung hemmten. Adrenalin ist höchstwahrscheinlich der physiologische Aktivator von präsynaptischen β_2 -Adrenozeptoren (Majewski und Rand, 1986).

Ziel dieser Teilstudie war es nun, mit Hilfe des in Kapitel 4.1.2 charakterisierten Superfusionsmodells den Einfluss des pharmakologisch bekannten selektiven β_2 -Adrenozeptoragonisten Procaterol auf die elektrisch stimulierte Noradrenalinfreisetzung aus Nierenkortexpräparationen

der Ratte und der Maus darzustellen und zu vergleichen. Die Versuchsreihe diene zusätzlich der Validitätsprüfung des Superfusionsmodells im Hinblick auf die nachfolgende experimentelle Bestimmung der intrinsischen Aktivität einiger Bupranolol-Analoga am β_2 -Adrenozeptor.

An der Mausniere wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits eine durch Procaterol hervorgerufene Zunahme der Noradrenalin-Ausschüttung festgestellt (Schultheiß, 2005). Diese Zunahme der Noradrenalin-Ausschüttung konnte in der vorliegenden Arbeit erneut gezeigt werden; 100 nM Procaterol steigerte die Transmitterabgabe an der Mausniere um 26 % im Vergleich zur Kontrolle. Die hier gewählten Versuchsbedingungen unterschieden sich allerdings von denen von Schultheiß (2005), bei dem das Testpharmakon während der gesamten Versuchsdauer im Superfusionsmedium enthalten war und die stimulierte Tritiumabgabe in Gegenwart des Pharmakons mit der stimulierten Abgabe in Abwesenheit verglichen wurde.

Des Weiteren wurde die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von fünf ansteigenden Procaterolkonzentrationen bezüglich der stimulierten Tritiumfreisetzung aus mit [^3H]-Noradrenalin vorinkubiertem Nierenkortexgewebe der Ratte aufgezeigt. Die für die eingesetzte Procaterolkonzentration von 100 nM ermittelten Zunahmen der Transmitterausschüttung aus der Niere von Ratte und Maus korrelieren gut miteinander (Maus 26 % versus Ratte 21 %). In der Ratte war die stimulierte Tritiumfreisetzung konzentrationsabhängig steigerbar bis zu einem Maximaleffekt von 22 % im Vergleich zur Kontrolle. Lakhani et al. (1994) beobachteten eine Steigerung der stimulierten Tritiumfreisetzung sogar bis zu einem Maximaleffekt von 96 %. Ein Grund für den erheblichen Unterschied könnte die unterschiedliche Versuchsdurchführung der Arbeitsgruppe um Lakhani sein, die ihre Werte an der isoliert perfundierten Rattenniere erhielt. Der ermittelte pEC_{50} -Wert lag in unserer Versuchsreihe bei $8,44 \pm 0,20$. Lakhani und Mitarbeiter (1994) ermittelten mit 8,62 einen ähnlich hohen pEC_{50} -Wert für Procaterol.

4.3.2 Modulation der Wirkung von Procaterol an der Niere durch die β_2 - bzw. β_1 -selektiven Antagonisten ICI 118.551 und CGP 20712A

Ein Hinweis dafür, dass die Aktivierung von Adrenozeptoren des β_2 -Subtyps für die Steigerung der Transmitterausschüttung durch Procaterol an der Rattenniere verantwortlich war, gaben Versuchsreihen, in denen dem Superfusionsmedium neben Procaterol einmal der β_1 -selektive Antagonist ICI 118.551 und ein anderes Mal der β_2 -selektive Antagonist CGP 20712A zugesetzt war. ICI 118.551 (in einer Konzentration, die etwa 75mal höher als der K_D -Wert am β_2 - und 7mal niedriger als der K_D -Wert am β_1 -Adrenozeptor ist; Baker, 2005; Tabelle 5) hob den freisetzungsteigernden Effekt von Procaterol vollständig auf. Lakhiani et al. (1994) zeigten diesen antagonisierenden Effekt bereits an der isoliert perfundierten Rattenniere. Rump et al. (1992) antagonisierten mit ICI 118.551 erfolgreich die durch Isoprenalin gesteigerte Transmitterausschüttung in Nierenkortexpräparationen der Ratte.

CGP 20712A (in einer Konzentration, die etwas mehr als 500mal höher als der K_D -Wert am β_1 -Adrenozeptor ist und damit schon im Bereich des K_D -wertes am β_2 -Adrenozeptor liegt; Baker, 2005; Tabelle 5) hatte keinen modulierenden Einfluss auf die durch Procaterol gesteigerte Tritiumfreisetzung. Die Ergebnisse stützen die These, dass die Aktivierung präsynaptischer, fazilitatorischer β_2 -Adrenozeptoren für die Zunahme der Noradrenalinfreisetzung aus Nervenendigungen des sympathischen Systems der Niere verantwortlich ist, wohingegen eine Beteiligung von β_1 -Adrenozeptoren als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

4.3.3 Effekt unterschiedlicher Bupranolol-Analoga auf die stimulierte Noradrenalinfreisetzung an der Niere

Dieser Teil der Arbeit hatte das Ziel, mit Hilfe funktioneller Experimente herauszuarbeiten, ob die neu synthetisierten Bupranolol-Analoga eine intrinsische Aktivität an β -Adrenozeptoren zeigen. Zunächst sollten die Substanzen im Rahmen dieser Arbeit auf einen potentiellen Partialagonismus am β_2 -Adrenozeptor-Subtyp hin untersucht werden. Zwei weitere Versuchsreihen zur Ermittlung der Aktivität der Substanzen am β_1 -Adrenozeptor und am „niedrig-affinen

Zustand des β_1 -Adrenozeptors“ stehen noch aus und werden von der kooperierenden polnischen Arbeitsgruppe um Frau Malinowska durchgeführt.

Um Aussagen über die Aktivität der Substanzen am β_2 -Adrenozeptor machen zu können, wurde ihr Effekt auf die elektrisch stimulierte Noradrenalinfreisetzung aus Nierenkortexgewebepräparaten der Ratte geprüft und mit dem freisetzungsteigernden Effekt des selektiven β_2 -Agonisten Procaterol und der Kontrolle verglichen. Es wurde darauf geachtet, dass die Bupranolol-Analoga dem Superfusionsmedium in einer Konzentration hinzugefügt wurden, die zwar eine vollständige Sättigung der β_2 -Adrenozeptorpopulation bewirkten, jedoch so gering war, dass sie möglichst keinen Einfluss auf den basalen Tritiumefflux hatte. Nach elektrischer Feldstimulation zeigte keines der sechs Bupranolol-Analoga eine signifikante Steigerung der Noradrenalinfreisetzung aus den Nierenschnitten im Vergleich zur Kontrolle, während Procaterol die Transmitterfreisetzung steigerte.

Die Ergebnisse machen eine agonistische Aktivität der Substanzen am β_2 -Adrenozeptor unwahrscheinlich, demzufolge muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den neu synthetisierten Bupranolol-Analoga um reine Antagonisten am β_2 -Adrenozeptor-Subtyp handelt, deren antagonistische Potenz noch zu analysieren ist. Auf der anderen Seite ist der mit dem vollen Agonisten Procaterol erzielbare maximale Effekt mit 20 bis 30 % relativ gering, und die Möglichkeit besteht, dass eine geringe Ausprägung der intrinsischen Aktivität nicht detektiert wurde.

Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin sind Phenylethylamine und besitzen als körpereigene Agonisten der β -Adrenozeptoren eine ortho-Diphenolfunktion in meta- und para-Position, die auch als Katecholgruppe bezeichnet wird. Diese 3,4-Dihydroxyl-Substituenten des Aromaten bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu bestimmten Aminosäuren (Serine) des Rezeptorproteins aus, die möglicherweise eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins und damit eine Aktivierung des G_s -Proteins bewirken. Es wird vermutet, dass Liganden, die diese Bindung mit Serin nicht eingehen, keine Konformationsänderung und damit antagonistische Rezeptoreigenschaften hervorrufen (Strader et al., 1989). Adrenerge Substanzen, die eine Katecholgruppe und eine nicht-substituierte β -Hydroxylgruppe besitzen, zeigen eine maximale intrinsische Aktivität (Bilezikian et al., 1978 a). Die zahlreichen künstlich hergestellten Sympathomimetika, wie beispielsweise die als Bronchodilatoren eingesetzten β_2 -selektiven Substanzen, belegen allerdings, dass die Katecholgruppe nicht essentiell für die agonistische Funktion ist. Einige β_2 -

Mimetika besitzen eine 3,5-Dihydroxyl-Substitution, die für die entstandene Selektivität zum β_2 -Subtyp, aber auch für eine gewisse Einschränkung der agonistischen Wirkung ursächlich ist. Generell zeigen Substanzen mit der Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen am aromatischen System wahrscheinlicher agonistische bzw. partiell agonistische als reine antagonistische Eigenschaften, meist sind dies Substitutionen (-OH, -COH, -NH₂, -NHCO) in meta- und/oder para-Position (Griffin et al., 2004).

In Anbetracht dessen war ein partieller Agonismus bei den untersuchten Substanzen am β_2 -Adrenozeptor mit Ausnahme der Substanz BK-29 eher nicht zu erwarten. Außer BK-29 besitzt keine der untersuchten Substanzen einen Substituenten am Phenylrest, der fähig wäre, eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rezeptorprotein auszubilden, um zu einer Konformationsänderung des Proteins zu führen. Denkbar wäre gewesen, dass BK-29 mit der Hydroxyl-Funktion in para-Position des Arylrestes eine solche Wasserstoffbrückenbindung bildet und damit agonistische Aktivität erlangt, ähnlich wie dies bereits in einigen Fällen bei Substanzen mit einer 4-OH-Substitution berichtet wurde: Nach der Entfernung der OH-Gruppe aus der meta-Position von Noradrenalin beispielsweise, behält das Molekül mit seiner verbliebenen 4-OH-Gruppe seine agonistische Eigenschaft an β -Adrenozeptoren, wenn auch mit weitaus geringerer intrinsischer Aktivität (Ruffolo et al., 1995). Bilezikian et al. (1978 b) untersuchten Phenylethanolamine, deren Phenylgruppe unter anderem 4-OH-substituiert war, und stellten teils agonistische, aber auch antagonistische Eigenschaften bei ihnen fest. Dagegen ist die bekannte Substanz CGP 20712A, die eine 4-Hydroxy- und 3-Carbamoylgruppe besitzt, genauso wie BK-29 ein reiner Antagonist. Zum einen wird hieraus deutlich, dass die Phenylgruppe der β -Adrenozeptorliganden eine Art identitätsweisende Komponente darstellt, die zum Teil agonistische und zum Teil antagonistische Funktion definiert (Bilezikian et al., 1978 b). Zum anderen zeigt sich – wie oben bereits erwähnt –, dass einzelne Substituenten, wie hier die 4-OH-Gruppe, allenfalls Hinweise auf die Eigenschaften der Stoffe geben können, weshalb ein Substituent alleine im Hinblick auf die Aktivität am Rezeptor nicht einzeln zu betrachten ist, sondern diverse Einflüsse verschiedener funktioneller Gruppen zusammen, beispielsweise auch des Aminorestes, berücksichtigt werden müssen. Der Substituent an der Aminogruppe der β -Adrenozeptorliganden ist jedoch scheinbar für die intrinsische sympathomimetische Aktivität weniger wichtig. Er hat größeren Einfluss auf die Affinität der Substanzen (Bilezikian et al., 1978 a). Crowther et al. (1969) berichteten, dass Phenoxypropanolamine besonders durch die Substitution des ortho- (oder meta-) Wasserstoffes

des Arylrestes mit Halogenen wie Chlor oder Fluor sehr große antagonistische Potenz erlangen, eine Entdeckung, die die fehlende intrinsische Aktivität der in dieser Arbeit untersuchten, allesamt ortho-Halogen-substituierten Bupranolol-Analoga am β_2 -Adrenozeptor noch plausibler macht.

Fünf der neuen Beta-Blocker (BK-29, GD-6, DZ-12, DZ-21, DZ-28) hemmten sogar der Tendenz nach (nicht signifikant), die Tritiumfreisetzung aus elektrisch stimuliertem Nierenkortexgewebe im Vergleich zur Kontrolle. Dies kann nicht auf die Blockade der präsynaptischen, fazilitatorischen β_2 -Adrenozeptoren zurückzuführen sein, da neuronal freigesetztes Noradrenalin diese Rezeptoren nicht aktiviert (Chen et al., 1984; Rump et al., 1992). Denkbar wäre eine schwach agonistische Wirkung an präsynaptischen inhibitorischen Rezeptoren. An der Niere konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung von präsynaptisch lokalisierten α_2 -Adrenozeptoren, Muskarin- (M_2), Prostaglandin- (EP_3), Adenosin- (A_1), Dopamin- (D_2) und Serotoninrezeptoren ($5-HT_1$) die Noradrenalinfreisetzung vermindert (Rump und Schollmeyer, 1989; Schultheiß, 2005). Eine zukünftige Studie an den genannten Rezeptor-Subtypen könnte diese Hypothese prüfen. Zumindest bei DZ-21 könnte die hemmende Tendenz aber auch damit zusammenhängen, dass diese Substanz zu einer ausgeprägten Steigerung des basalen Efflux führte. Im Falle einer basalen Effluxsteigerung sind Veränderung der stimulierten Transmitterfreisetzung immer mit Zurückhaltung zu bewerten (z.B. Göthert et al., 1981).

5 Zusammenfassung

β -Adrenozeptorliganden gehören zu den am häufigsten eingesetzten Pharmaka im Klinikalltag. Beta-Sympathomimetika, verwendet zur Behandlung des Kreislaufschocks oder chronischer Atemwegserkrankungen, sind die aktivierenden Substanzen des beta-adrenergen Systems. Dagegen blockieren die β -Adrenozeptorantagonisten kompetitiv und reversibel die β -Rezeptoren und hemmen so die adrenerge Stimulation; sie werden hauptsächlich zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt.

In dieser Arbeit sollten die Affinitäten von zwei Substanzenreihen, die als potentielle Beta-Blocker neu synthetisiert wurden, zu β -Adrenozeptoren mit Hilfe eines Radioligand-Kompetitions-Modells an Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte untersucht werden. Dabei sollte diskutiert werden, ob und inwieweit die chemische Struktur der Substanzen und die Position der Substituenten Einfluss auf die Affinität zu den untersuchten β -Adrenozeptoren besitzt.

Im Hinblick auf eine eventuelle antagonistische Eigenschaft am „niedrig-affinen Zustand des β_1 -Adrenozeptors“ wurde von einer kooperierenden polnischen Arbeitsgruppe eine Reihe von sechs Bupranolol-Analoga synthetisiert, da Bupranolol selbst pharmakologische Effekte stereoselektiv antagonisiert, die durch Aktivierung dieses „atypischen“ Rezeptors vermittelt werden (Malinowska et al., 2003). In dieser Arbeit sollten zunächst im Sinne einer Grundlagenarbeit die Affinitäten der Substanzen zum (hoch-affinen) β_1 - sowie zum β_2 -Adrenozeptor untersucht werden: Alle Substanzen zeigten eine niedrigere Bindungsaffinität an den β -Adrenozeptor-Subtypen als Bupranolol selbst (β_1 und β_2) und die jeweiligen Referenzsubstanzen CGP 20712A (β_1) und ICI 118.551 (β_2). Am affinsten und selektivsten zum β_1 -Adrenozeptor offenbarten sich Verbindungen, die keine Methylgruppe in meta-Position des Phenoxyrestes hatten und/oder eine verzweigte und sperrige Gruppe an der Aminofunktion (N-3,4-Dimethoxyphenylethylrest) trugen. Die Substanzen mit meta-Methylrest und/oder kleinerem Aminosubstituenten (N-Isopropyl-, N-Butylrest) waren hingegen affiner und selektiver zum β_2 -Adrenozeptor. Die höchste Selektivität für β_1 -Adrenozeptoren wurde bei der Substanz DZ-25 (10fach) und die höchste Selektivität für β_2 -Adrenozeptoren bei BK-29 (8fach) gefunden.

Des Weiteren wurde eine Reihe von aliphatischen, potentiellen β -Adrenozeptorliganden auf ihre Affinität zu β -Adrenozeptoren hin untersucht. Die Substanzen besaßen als Substituenten

am Isopropanolamin-Grundgerüst ein (aliphatisches) Isoindol-1,3-dion-Ringsystem statt einer für klassische β -Adrenozeptorantagonisten typischen (aromatischen) Phenylgruppe. In der Literatur finden sich einige Belege dafür, dass Liganden ohne Aromat durchaus β -blockierende Eigenschaften aufweisen können (z.B. Leclerc et al., 1980; Macchia et al., 1985). Die neu synthetisierten, in der vorliegenden Arbeit getesteten Substanzen mit atypischer Beta-Blocker-Struktur besaßen jedoch keine Bindungsaffinität zu β_1 - und β_2 -Adrenozeptor-Subtypen. Offenbar scheinen die Substanzen aufgrund einiger Merkmale ihrer chemischen Struktur als β -Adrenozeptorliganden ungeeignet zu sein: 1) Das Ether-Sauerstoffatom, welches bei einer der sieben untersuchten Substanzen fehlt, scheint für die Aktivität von aliphatischen Liganden am β -Adrenozeptor obligat zu sein. 2) Eine tertiäre Aminosubstitution, wie in vier der Substanzen vorhanden, eliminiert gewöhnlich die Affinität an β -Adrenozeptoren. 3) Die Substanzen passen möglicherweise aufgrund ihrer sperrigen räumlichen Konformation und der Elektronen-Verteilung innerhalb des Molekülrestes der Substituenten nicht in die Rezeptortasche des β -Adrenozeptors.

Zur Klärung einer eventuellen intrinsischen Aktivität der Bupranolol-Analoga am β_2 -Adrenozeptor wurde ein Superfusionsmodell verwendet, in dem in Anwesenheit der jeweiligen Substanzen die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus mit [^3H]-Noradrenalin vorinkubierten Nierenkortexschnitten der Ratte gemessen wurde. Der β_2 -selektive Agonist Procaterol, der in dieser Studie als Referenzpharmakon diente, steigerte die Noradrenalin-freisetzung. ICI 118.551 hob diesen Effekt auf, CGP 20712A hatte dagegen keinen modulierenden Einfluss. Anders als Procaterol steigerten die Bupranolol-Analoga die Noradrenalin-freisetzung nicht; demzufolge muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den neu synthetisierten Substanzen um reine Antagonisten am β_2 -Adrenozeptor-Subtyp handelt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die sechs neu synthetisierten Bupranolol-Analoga in Radioligandbindungsstudien hohe Affinitäten zu β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren aufweisen, allerdings nicht ganz an Bupranolol heranreichen. Die Substanzen zeigen eine bis zu 10fache Selektivität zum β_1 - bzw. bis zu 8fache Selektivität zum β_2 -Adrenozeptor. Eine partialagonistische Wirkung am β_2 -Adrenozeptor konnte für alle sechs Substanzen in einem funktionellen Modell ausgeschlossen werden. Anders als die Bupranolol-Analoga zeigten sieben neu synthetisierte Substanzen, bei denen der für β -Blocker typische Aromat durch ein Isoindol-1,3-dion-Ringsystem ersetzt ist, in Radioligandbindungsstudien keine Affinität zu β_1 - oder β_2 -Adrenozeptoren.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Darstellung einer hyperbolischen Sättigungsbindungsisothermen durch Auftragung der spezifischen Bindung des Radioliganden gegen die freie Radioligandkonzentration. Der Scatchard-Plot ergibt sich aus der Auftragung des Quotienten aus der spezifischen Bindung des Radioliganden und der freien Radioligandkonzentration gegen die spezifische Bindung des Radioliganden23
- Abb. 2 Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve eines Agonisten durch Auftragung der Konzentration des Agonisten gegen die Wirkung des Agonisten.....30
- Abb. 3 Sättigungsbindungsisotherme der spezifischen Bindung von [³H]-CGP-12177 am β_1 -Adrenozeptor und am β_2 -Adrenozeptor in einer Membransuspension des zerebralen Kortex der Ratte und lineare Regressionsanalyse nach Scatchard für den β_1 - und den β_2 -Adrenozeptor37
- Abb. 4 Verdrängung von 0,07 nM [³H]-CGP-12177 vom β_1 -Adrenozeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte durch Substanzen der Serie Kieć-Kononowicz und der Referenzsubstanz CGP 20712A.....40
- Abb. 5 Verdrängung von 0,14 nM [³H]-CGP-12177 vom β_2 -Adrenozeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte durch Substanzen der Serie Kieć-Kononowicz und der Referenzsubstanz ICI 118.55140
- Abb. 6 Spezifische Bindung von 0,07 nM [³H]-CGP-12177 am β_1 -Adrenozeptor und von 0,14 nM [³H]-CGP-12177 am β_2 -Adrenozeptor in Anwesenheit der untersuchten Substanzen (3 μ M) (Serie Wojciechowska)44
- Abb. 7 Effekt der Zugabe von TTX und des Entzugs von Kalzium auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus [³H]-Noradrenalin vorinkubiertem Nierenkortexgewebe der Ratte45
- Abb. 8 Effekt von steigenden Konzentrationen von Procaterol auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus [³H]-Noradrenalin vorinkubiertem Nierenkortexgewebe der Maus und der Ratte47

Abb. 9	Effekt von 100 nM Procaterol auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus [³ H]-Noradrenalin vorinkubiertem Nierenkortexgewebe der Ratte in An- und Abwesenheit von ICI 118.551 bzw. CGP 20712A.....	48
Abb. 10	Effekt von verschiedenen Bupranolol-Analoga auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus [³ H]-Noradrenalin vorinkubiertem Nierenkortexgewebe der Ratte im Vergleich zu Procaterol (1 µM).....	49
Abb. 11	Chemische Grundstruktur klassischer β-Adrenozeptorliganden	56
Abb. 12	Drei Klassen rein aliphatischer β-Adrenozeptorantagonisten	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Organverteilung der β-adrenergen Subtypen und Effekte bei Aktivierung der Rezeptoren	9
Tabelle 2	Zeittafel der Entwicklung adrenerger Antagonisten anhand einiger ausgewählter Beispiele	13
Tabelle 3	Zusammensetzung der verwendeten physiologischen Salzlösung	28
Tabelle 4	Bindungsparameter von [³ H]-CGP-12177 am β ₁ - und β ₂ -Adrenozeptor in einer Membransuspension des zerebralen Kortex der Ratte, ermittelt aus der Sättigungsbindungsisothermen und aus dem Scatchard-Plot	38
Tabelle 5	Strukturformeln, Molekulargewichte und die aus den Kompetitionsexperimenten ermittelten pK _i -Werte der untersuchten Substanzen, sowie der Referenzsubstanzen CGP 20712A und ICI 118.551 (Serie Kieć-Kononowicz) ...	41
Tabelle 6	Strukturformeln und Molekulargewichte der in den Kompetitionsexperimenten mit 0,07 nM (β ₁) bzw. 0,14 nM (β ₂) [³ H]-CGP-12177 untersuchten Substanzen (Serie Wojciechowska)	43
Tabelle 7	Basaler Efflux (t ₂ /t ₁) aus Nierenschnitten der Ratte in Anwesenheit verschiedener Liganden	50
Tabelle 8	Chemische Strukturen der sieben am Ethanolamin-Grundgerüst aliphatisch substituierten Substanzen	57
Tabelle 9	Chemische Strukturen von Bupranolol und den sechs untersuchten Analoga	61
Tabelle 10	Affinität der untersuchten Substanzen am β ₁ -Adrenozeptor	61
Tabelle 11	Affinität der untersuchten Substanzen am β ₂ -Adrenozeptor	63
Tabelle 12	Selektivität der untersuchten Substanzen für den β ₁ - bzw. β ₂ -Adrenozeptor	65

7 Literaturverzeichnis

Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 1948; 153: 586-600

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. *Guide to Receptors and Channels*, 1st Edition. *Br J Pharmacol* 2004; 141 (Suppl 1): 1-126

Baker JG, Hall IP, Hill SJ. Agonist actions of 'β-blockers' provide evidence for two agonist activation sites or conformations of the human β₁-adrenoceptor. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1312-1321

Baker JG. The selectivity of beta-adrenoceptor antagonists at the human beta1, beta2 and beta3 adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 317-322

Balsamo A, Gentili D, Lapucci A, Macchia M, Martinelli A, Orlandini E, Ferni G, Pinza M. Synthesis and β-adrenergic activity of new completely aliphatic 3-(methyleaminoxy)-propanolamine derivatives. *Farmaco* 1994; 49: 759-766

Beer M, Richardson A, Poat J, Iversen LL, Stahl SM. In vitro selectivity of agonists and antagonists for beta 1- and beta 2-adrenoceptor subtypes in rat brain. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 1145-1151

Bennett JP, Yamamura HI. Neurotransmitter, hormone or drug receptor binding methods. In: Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ, Hrsg. *Neurotransmitter Receptor Binding*. New York: Raven Press, 1985: 61-89.

BEST: Beta-blocker Evaluation of Survival Trial investigators. A trial of the beta-adrenergic blocker bucindolol in patients with advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 344: 1659-1667

Bilezikian JP, Dornfeld AM, Gammon DE. Structure-binding-activity analysis of beta-adrenergic amines – I. Binding to the beta receptor and activation of adenylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 1978 a; 27: 1445-1454

Bilezikian JP, Dornfeld AM, Gammon DE. Structure-binding-activity analysis of beta-adrenergic amines – II. Binding to the beta receptor and inhibition of adenylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 1978 b; 27: 1455-1461

Black JW, Stephenson JS. Pharmacology of new adrenergic beta-receptor-blocking compound (Nethalide). *Lancet* 1962; 2: 311-314

Bradford MM. 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.

Bylund DB, Yamamura HI. Methods for receptor binding. In: Yamamura HI, Hrsg. *Methods in neurotransmitter receptor analysis*. New York: Raven Press, 1990: 1-25

Chen YH, Blair ML, Izzo JL Jr. Renal norepinephrine overflow during graded renal nerve stimulation before and after beta-adrenoceptor blockade. *J Auton Nerv Syst* 1984; 11: 285-295

Cheng YC, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22: 3099-3108

Chiu CC, Wu JR, Lee CH, Liou SF, Dai ZK, Chen IJ, Yeh JL. Anti-hypertension effect of vanylidilol: a phenylaldehyde alpha/beta-adrenoceptor blocker with endothelium-dependent and K^+ channels opening-associated vasorelaxant activities. *Pharmacology* 2004; 70: 140-151

CIBIS-II: Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999; 353: 9-13

Coats AJ. Beta-adrenoceptor antagonists in elderly patients with chronic heart failure: therapeutic potential of third-generation agents. *Drugs Aging* 2006; 23: 93-99

COMET: Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, Lubsen J, Lutiger B, Metra M, Remme WJ, Torp-Pedersen C, Scherhag A, Skene A and Carvedilol und Metoprolol Trial Investigators. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 362: 7-13

Crowther AF, Gilman DJ, McLoughlin BJ, Smith LH, Turner RW, Wood TM. Beta-adrenergic blocking agents. V. 1-Amino-3-(substituted phenoxy)-2-propanols. *J Med Chem* 1969; 12: 638-642

Dale HH. On some physiological actions of ergot. *J Physiol* 1906; 34: 163-206

De Matteis R, Arch JR, Petroni ML, Ferrari D, Cinti S, Stock MJ. Immunohistochemical identification of the beta(3)-adrenoceptor in intact human adipocytes and ventricular myocardium: effect of obesity and treatment with ephedrine and caffeine. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: 1442-1450

DiBona GF. The kidney in the pathogenesis of hypertension: the role of renal nerves. *Am J Kidney Dis* 1985; 5: A27-31

Ekas RD Jr., Steenberg ML, Woods MS, Lokhandwala MF. Presynaptic alpha- and beta-adrenoceptor stimulation and norepinephrine release in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1983; 5: 198-204

Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren M, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 1989; 246: 1118-1121

Emorine L, Blin N, Strosberg AD. The human β_3 -adrenoceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 3-7

Feely J, Peden N. Use of beta-adrenoceptor blocking drugs in hyperthyroidism. *Drugs* 1984; 27: 425-446

Fraser PM, Speizer FE, Waters SD, Doll R, Mann NM. The circumstances preceding death from asthma in young people in 1968 to 1969. *Br J Dis Chest* 1971; 65: 71-84

Freestone NS, Heubach JF, Wettwer E, Ravens U, Brown D, Kaumann AJ. β_4 -Adrenoceptors are more effective than β_1 -adrenoceptors in mediating arrhythmic Ca^{2+} transients in mouse ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 360: 445-456

Furchgott RF. The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. In: Blaschko H, Muscholl E, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin - New York: Springer Verlag, 1972: 283-335

Furuta A, Thomas CA, Higaki M, Chancellor MB, Yoshimura N, Yamaguchi O. The promise of beta3-adrenoceptor agonists to treat the overactive bladder. *Urol Clin North Am* 2006; 33: 539-543

Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H. Functional beta 3-adrenoceptor in human heart. *J Clin Invest* 1996; 98: 556-562

Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H. The negative inotropic effect of beta 3- adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 1998; 102: 1377-1384

Gomes A, Costa D, Lima JL, Fernandes E. Antioxidant activity of beta-blockers: an effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species? *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 4568-4577

Göthert M, Huth H, Schlicker E. Characterization of the receptor subtype involved in alpha-adrenoceptor-mediated modulation of serotonin release from rat brain cortex slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1981; 317: 199-203

Göthert M. Role of autoreceptors in the function of the peripheral and central nervous system. *Arzneimittelforschung* 1985; 35: 1909-1916

Griffin PP, Schubert-Zsilavecz M, Stark H. Gemeinsamkeiten und Unterschiede: Hemmstoffe von Beta-Adrenozeptoren. *Pharm Unserer Zeit* 2004; 33: 442-449

Hoefle ML, Hastings SG, Meyer RF, Corey RM, Holmes A, Stratton CD. Cardioselective beta-adrenergic blocking agents. 1.1-((3,4-Dimethoxyphenethyl)amino)-3-aryloxy-2-propanols. *J Med Chem* 1975; 18: 148-152

Huang YC, Wu BN, Lin YT, Chen SJ, Chiu CC, Cheng CJ, Chen IJ. Eugenodilol: a third-generation beta-adrenoceptor blocker, derived from eugenol, with alpha-adrenoceptor blocking and beta 2-adrenoceptor agonist-associated vasorelaxant activities. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 10-20

Huang YC, Wu BN, Yeh JL, Chen SJ, Liang JC, Lo YC, Chen IJ. A new aspect of view in synthesizing new type beta-adrenoceptor blockers with ancillary antioxidant activities. *Bioorg Med Chem* 2001; 9: 1739-1746

Ijzerman AP, Dorlas R, Aué GH, Bultsma T, Timmerman H. Factors controlling beta 1-adrenoceptor affinity and selectivity. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 2883-2890

Johnston H, Majewski H, Musgrave IF. Involvement of cyclic nucleotides in prejunctional modulation of noradrenaline release in mouse atria. *Br J Pharmacol* 1987; 91: 773-781

Kaumann AJ. (-)-CGP 12177-induced increase of human atrial contraction through a putative third β -adrenoceptor. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 93-98

Kaumann AJ, Molenaar P. Differences between the third cardiac β -adrenoceptor and the colonic β_3 -adrenoceptor in the rat. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 2085-2098

Kaumann AJ, Molenaar P. Modulation of human cardiac function through 4 β -adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 355: 667-681

Kaumann AJ, Preitner F, Sarsero D, Molenaar P, Revelli JP, Giacobino JP. (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative β_4 -adrenoceptors in both wild-type and β_3 -adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 670-675

Kaumann AJ, Engelhardt S, Hein L, Molenaar P, Lohse M. Abolition of (-)-CGP 12177-evoked cardiostimulation in double β_1/β_2 -adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of β_1 -adrenoceptors for putative β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 363: 87-93

Konzett H. Neue broncholytisch hochwirksame Körper der Adrenalinreihe. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1940; 197: 27-40

Kveiborg B, Christiansen B, Major-Petersen A, Torp-Perdersen C. Metabolic effects of beta-adrenoceptor antagonists with special emphasis on carvedilol. *Am J Cardiovasc Drugs* 2006; 6: 209-217

Lakhlani PP, Amenta F, Napoleone P, Felici L, Eikenburg DC. Pharmacological characterization and anatomical localization of prejunctional beta-adrenoceptors in the rat kidney. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 1296-1308

Lambert DM. Effect of propranolol on mortality in patients with angina. *Postgrad Med J* 1976; 52 (Suppl 4): 57-60

Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG Jr. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 1967; 214: 597-598

Leclerc G, Bieth N, Schwartz J. Synthesis and β -adrenergic blocking activity of new aliphatic oxime ethers. *J Med Chem* 1980; 23: 620-624

Liang JC, Yeh JL, Wang CS, Liou SF, Tsai CH, Chen IJ. The new generation dihydropyridine type calcium blockers, bearing 4-phenyl oxypropanol-amine, display α -/ β -adrenoceptor antagonist and long-acting antihypertensive activities. *Bioorg Med Chem* 2002; 10: 719-730

Limmroth V, Michel MC. The prevention of migraine: a critical review with special emphasis on β -adrenoceptor blockers. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52: 237-243

Macchia B, Balsamo A, Lapucci A, Martinelli A, Macchia F, Breschi MC, Fantoni B, Martinotti E. An interdisciplinary approach to the design of new structures active at the β -adrenergic receptor. Aliphatic oxime ether derivatives. *J Med Chem* 1985; 28: 153-160

Macchia B, Balsamo A, Breschi MC, Chiellini G, Macchia M, Martinelli A, Martini C, Nardini C, Nencetti S, Rossello A, Scatizzi R. The [(methyloxy)imino]methyl moiety as a bioisoster of aryl. A novel class of completely aliphatic β -adrenergic receptor antagonists. *J Med Chem* 1994; 37: 1518-1525

Majewski H. Modulation of noradrenaline release through activation of presynaptic β -adrenoceptors. *J Auton Pharmacol* 1983; 3: 47-60

Majewski H, Rand MJ. A possible role of epinephrine in the development of hypertension. *Med Res Rev* 1986; 6: 467-486

Malinowska B, Kieć-Kononowicz K, Flau K, Godlewski G, Kozłowska H, Kathmann M, Schlicker E. Atypical cardiostimulant β -adrenoceptor in the rat heart: stereoselective antagonism by bupranolol but lack of effect by some bupranolol analogues. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 1548-1554

Malinowska B, Schlicker E. Mediation of the positive chronotropic effect of CGP 12177 and cyanopindolol in the pithed rat by atypical β -adrenoceptors, different from β_3 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 943-949

Malinowska B, Schlicker E. Further evidence for differences between cardiac atypical β -adrenoceptors and brown adipose tissue β_3 -adrenoceptors in the pithed rat. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1307-1314

Mallem MY, Toumaniantz G, Serpillon S, Gautier F, Gogny M, Desfontis JC, Gauthier C. Impairment of the low-affinity state beta 1-adrenoceptor-induced relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 599-605

Mason RP, Kubant R, Jacob RF, Walter MF, Boychuk B, Malinski T. Effect of nebivolol on endothelial nitric oxide and peroxynitrite release in hypertensive animals: Role of antioxidant activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 48: 862-869

Melland B. The treatment of spasmodic asthma by the hypodermic injection of adrenalin. *Lancet* 1910; 175: 1407-1411

Metra M, Torp-Pedersen C, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Komajda M, Remme WJ, Lutiger B, Scherhag A, Lukas MA, Charlesworth A, Poole-Wilson PA. Influence of heart rate, blood pressure, and beta-blocker dose on outcome and the differences in outcome between Carvedilol and Metoprolol tartrate in patients with chronic heart failure: results from the COMET trial. *Eur Heart J* 2005; 26: 2259-2268

Minneman KP, Hegstrand LR, Molinoff PB. Simultaneous determination of beta-1 and beta-2-adrenergic receptors in tissues containing both receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 1979; 16: 34-46

Morin D, Zini R, Urien S, Sapena R, Tillement JP. Labelling of rat brain beta-adrenoceptors: [3 H]-CGP-12177 or [125 I]-iodocyanopindolol? *J Recept Res* 1992; 12: 369-387

Motulsky H, Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. GraphPad Prism® Manual Version 4.0, 2003

Narahashi T, Moore JW, Scott WR. TTX-blockade of sodium conductance increase in lobster axons. *J Gen Physiol* 1964; 47: 965-974

Niclauß N, Michel-Reher MB, Alewijnse AE, Michel MC. Comparison of three radioligands for the labelling of human beta-adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 374: 99-105

Oparil S. The sympathetic nervous system in clinical and experimental hypertension. *Kidney Int* 1986; 30: 437-452

Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 1349-1355

Palazzuoli A, Calabria P, Verzuri MS, Auteri A. Carvedilol: something else than a simple betablocker? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2002; 6: 115-126

Peet M, Yates RA. Beta-blockers in the treatment of neurological and psychiatric disorders. *J Clin Hosp Pharm* 1981; 6: 155-171

Petrongolo C, Macchia B, Macchia F, Martinelli A. Molecular orbital studies on the mechanism of drug-receptor interaction. 2. Beta-adrenergic drugs. An approach to explain the role of the aromatic moiety. *J Med Chem* 1977; 20: 1645-1653

Pott C, Brixius K, Bloch W, Ziskoven C, Napp A, Schwinger RH. Beta 3-adrenergic stimulation in the human heart: signal transduction, functional implications and therapeutic perspectives. *Pharmazie* 2006; 61: 255-260

Powell CE, Slater IH. Blocking of inhibitory adrenergic receptors by a dichloro analog of isoproterenol. *J Pharmacol Exp Ther* 1958; 122: 480-488

Preitner F, Muzzin P, Revelli JP, Seydoux J, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M, Giacobino JP. Metabolic response to various beta-adrenoceptor agonists in beta 3-adrenoceptor knockout mice: evidence for a new beta-adrenergic receptor in brown adipose tissue. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 1684-1688

Prichard BN, Gillam PM. Use of propranolol (inderal) in treatment of hypertension. *Br Med J* 1964; 2: 725-727

Prichard BN. Propranolol in the treatment of angina: a review. *Postgrad Med J* 1976; 52 (Suppl 4): 35-41

Riva MA, Creese I. Comparison of two putatively selective radioligands for labelling central nervous system beta-adrenergic receptors: inadequacy of [³H]dihydroalprenolol. *Mol Pharmacol* 1989; 36: 201-210

Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, Kobilka BK. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta 1- and beta 2- adrenergic receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 16701-16708

Rosendorff C. Beta-blocking agents with vasodilator activity. *J Hypertens Suppl* 1993; 11: 37-40

Ruffolo RR Jr. Medicinal chemistry of adrenoceptor agonists. *Drug Des Discov* 1993; 9: 351-367

Ruffolo RR Jr., Bondinell W, Hieble JP. α - and β -adrenoceptors: From the gene to the clinic. 2. Structure-activity relationships and therapeutic applications. *J Med Chem* 1995; 38: 3681-3716

Rump LC, Schollmeyer P. Modulation of renal transmitter release by presynaptic receptors. *Klin Wochenschr* 1989; 67: 865-869

Rump LC, Schuster MJ, Schollmeyer P. Activation of beta 2-adrenoceptors by isoprenaline and adrenaline enhances noradrenaline release in cortical kidney slices of young spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1992; 345: 25-32

Sarsero D, Molenaar P, Kaumann AJ, Freestone NS. Putative β_4 -adrenoceptors in rat ventricle mediate increases in contractile force and cell Ca^{2+} : comparison with atrial receptors and relationship to (-)-[^3H]-CGP 12177 binding. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1445-1460

Sarsero D, Russel FD, Lynham JA, Rabnott G, Yang I, Fong KM, Li L, Kaumann AJ, Molenaar P. (-)-CGP 12177 increases contractile force and hastens relaxation of human myocardial preparations through a propranolol-resistant state of the β_1 -adrenoceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 367: 10-21

Savitz SI, Erhardt JA, Anthony JV, Gupta G, Li X, Barone FC, Rosenbaum DM. The novel beta-blocker, carvedilol, provides neuroprotection in transient focal stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1197-1204

Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* 1949; 51: 660-666.

Schultheiß T. Modulation der Neurotransmitterfreisetzung durch Cannabinoide und andere präsynaptisch angreifende Liganden. Dissertationsschrift, Medizinische Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2005

Schwartz H, Müller-Werdan U, Prondzinsky R, Werdan K, Buerke M. Katecholamine im kardiogenen Schock: hilfreich, nutzlos, gefährlich? *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129: 1925-1930

Sears MR. Asthma treatment: inhaled beta-agonists. *Can Respir J* 1998; 5: 54-59

Sheu MM, Wu BN, Ho WC, Hong SJ, Chen SJ, Lin YT, Chen IJ. Vanidilol: a vanilloid-type vasorelaxant and ocular hypotensive beta-adrenoceptor blocker with partial beta 2-agonist activity. *Pharmacology* 1997; 54: 211-224

Sovani MP, Whale CI, Tattersfield AE. A benefit-risk assessment of inhaled long acting beta 2-agonists in the management of obstructive pulmonary disease. *Drug Saf* 2004; 27: 689-715

Staehein M, Simons P, Jaeggi K, Wigger N. CGP-12177. A hydrophilic beta-adrenergic receptor radioligand reveals high affinity binding of agonists to intact cells. *J Biol Chem* 1983; 258: 3496-3502

Stamper RL, Wigginton SA, Higginbotham EJ. Primary drug treatment for glaucoma: beta-blocker versus other medications. *Surv Ophthalmol* 2002; 47: 63-67

Starke K. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1977; 77: 1-124

Starke K. Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K, Hrsg. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München – Jena: Urban & Fischer Verlag, 2001: 184-185

Steenberg ML, Ekas RD Jr., Lokhandwala MF. Effect of epinephrine on norepinephrine release from rat kidney during sympathetic nerve stimulation. *Eur J Pharmacol* 1983; 93: 137-148

Strader CD, Candelore MR, Hill WS, Sigal IS, Dixon AF. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 13572-13578

Tadokoro C, Kiuchi Y, Yamazaki Y, Nara K, Oguchi K, Kamijima K. Behavioral stimulation without alteration of beta and 5-HT receptors and adenylate cyclase activity in rat brain after chronic sertaline administration. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 130: 124-130

Tavernier G, Galitzky J, Bousquet-Melou A, Montrastruc JL, Berlan M. The positive chronotropic effect induced by BRL 37344 and CGP 12177, two beta 3- adrenergic agonists, does not involve cardiac beta adrenoceptors but baroreflex mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 1083-1090

Tsuchihashi H, Nagotomo T, Imai S. Selectivity of bunitrolol for beta 1- and beta 2-adrenergic receptors and 5-HT_{1B}-receptors: assessment by biphasic Scatchard plots and biphasic displacement curve analysis with ¹²⁵I-iodocyanopindolol and ³H-CGP-12177. *Jpn J Pharmacol* 1989; 50: 93-100

Uitti RJ. Tremor: how to determine if the patient has Parkinson's disease. *Geriatrics* 1998; 53: 30-36

Van Veen A, Weller FR, Wierenga EA, Jansen HM, Jonkers RE. A comparison of salmeterol and formoterol in attenuating airway responses to short-acting beta 2-agonists. *Pulm Pharmacol Ther* 2003; 16: 153-161

Verbeuren TJ, Herman AG. Study of prejunctional beta-adrenoceptors in kidneys of normotensive and hypertensive rats using the new beta-adrenoceptor blocking drug tertatolol. *Am J Nephrol* 1986; 6 (Suppl 2): 30-35

Waagstein F, Hjalmarson A, Varnauskas E, Wallentin E. Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Brit Heart J* 1975; 37: 1022-1036

Wehling M. Sind alle Beta-Blocker gleich? *J Kardiol* 2003; 10: 20-23

Weil J, Schunkert H. Pathophysiology of chronic heart failure. *Clin Res Cardiol* 2006; 95 (Suppl 4): 1-17

Wenzel V, Krismer AC, Arntz HR, Sitter H, Stadlbauer KH, Lindner KH. European Resuscitation Council Vasopressor during Cardiopulmonary Resuscitation Study Group.

A comparison of vasopressin and epinephrine for out-of-hospital cardiopulmonary resuscitation. *N Engl J Med* 2004; 350:105-113

Yeh JL, Liou SF, Liang JC, Huang YC, Chiang LC, Wu JR, Li YT, Chen IJ. Vanidipinedilol: a vanilloid-based beta-adrenoceptor blocker displaying calcium entry blocking and vasorelaxant activities. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: 51-63

Zanchetti A. Clinical pharmacodynamics of nebivolol: new evidence of nitric oxide-mediated vasodilating activity and peculiar haemodynamic properties in hypertensive patients. *Blood Press Suppl* 2004; 1: 17-32

Zdrojewicz Z, Sztuka-Pietkiewicz A. The role of beta 3-adrenergic receptors in the human organism. *Przegl Lek* 2001; 58: 788-791