

**Adenosin-Rezeptoren und
neurodegenerative Erkrankungen:
Untersuchung des Einflusses von Cholesterol und
Evaluierung neuer funktionalisierter Liganden
als pharmakologische Werkzeuge**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andrea Behrenswerth (geb. Themann)

aus

Vechta

Bonn 2008

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

1. Referent: Prof. Dr. Christa E. Müller

2. Referent: PD Dr. Daniela Gündisch

Tag der Promotion: 26. Februar 2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn <http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss-online> elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2004 bis Februar 2008 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, die mir nach Absolvierung des Qualifizierungsjahres für Fachhochschulabsolventen die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit anzufertigen. Ich danke ihr für die freundliche Betreuung und Unterstützung während dieses Qualifizierungsjahres und der anschließenden Promotion.

Frau PD Dr. Daniela Gündisch danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates sowie Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr und Herrn Prof. Dr. Stefan Bräse für die Mitwirkung in meiner Promotionskommission.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums für die Heranführung an die Doktorarbeit und eines Promotionsstipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK 804 „Analyse von Zellfunktionen durch kombinatorische Chemie und Biochemie“ sowie ihre finanzielle Unterstützung von Kongressreisen und meines Forschungsaufenthaltes in Coimbra (Portugal).

Meinem Mann Martin
und
meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1. Cholesterol als Modulator der Funktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	1
1.1. Biologische Funktion und Biosynthese von Cholesterol.....	1
1.2. Lipoprotein-Stoffwechsel.....	4
1.3. Cholesterol-Metabolismus im Gehirn.....	6
1.4. „Membrane Rafts“ und Caveolae: Cholesterol- und sphingolipidreiche Mikrodomänen in der Zellmembran.....	7
1.4.1. Historische Definition der „Lipid Rafts“.....	7
1.4.2. Aktuelle Definition der „Membrane Rafts“.....	8
1.4.3. Struktureller Aufbau der „Membrane Rafts“ und Caveolae.....	8
1.4.4. Zerstörung und Isolierung der „Membrane Rafts“.....	10
1.4.5. Lokalisation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in „Membrane Rafts“.....	14
1.5. Aufbau und Funktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	18
1.6. Adenosin-Rezeptoren.....	21
1.6.1. Adenosin-A ₁ -Rezeptoren.....	24
1.6.2. Adenosin-A _{2A} -Rezeptoren.....	25
1.7. Zusammenhang zwischen der Cholesterol-Konzentration im Körper und dem Auftreten von Erkrankungen.....	27
1.7.1. Hyperlipoproteinämie.....	27
1.7.2. Einsatz von Statinen als Hemmstoffe der Cholesterol-Synthese.....	27
1.7.3. Morbus Alzheimer.....	29
1.7.3.1. Pathophysiologie und Verlauf des Morbus Alzheimer.....	29
1.7.3.2. Statine als therapeutischer Ansatz bei Morbus Alzheimer.....	31
1.7.4. Morbus Parkinson.....	32
1.7.4.1. Pathophysiologie des Morbus Parkinson.....	32
1.7.4.2. Therapie des Morbus Parkinson.....	36
1.7.4.3. Adenosin-A _{2A} -Rezeptoren als neue Zielstrukturen bei der Behandlung des Morbus Parkinson.....	37
1.8. Aufgabenstellung.....	41
2. Striatale Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren: Cholesterol-Gehalt der Membranen und „Membrane Rafts“.....	45
2.1. Einleitung.....	45

2.2. Einfluss des Cholesterol-Gehaltes auf die spezifische Radioligand-Rezeptor-Bindung an Adenosin-A ₁ - und A _{2A} -Rezeptoren.....	49
2.2.1. Verringerung des Cholesterol-Gehaltes einer Rattenstriatum-Membranpräparation.....	49
2.2.2. Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Rattenstriatum-Membranpräparationen mit vermindertem Cholesterol-Gehalt.....	50
2.2.3. Sättigungsexperimente an Rattenstriatum-Membranpräparationen mit vermindertem Cholesterol-Gehalt.....	53
2.2.4. Kinetikexperimente an Rattenstriatum-Membranpräparationen mit vermindertem Cholesterol-Gehalt.....	59
2.2.5. Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen Striatum-Membranpräparationen mit vermindertem Cholesterol-Gehalt.....	63
2.3. Rückführung von Cholesterol in Rattenstriatum-Membranpräparationen mit vermindertem Cholesterol-Gehalt.....	66
2.3.1. Rückführung von Cholesterol durch den Einsatz von cholesterolhaltigen Liposomen.....	66
2.3.1.1. Zeitabhängigkeit der Rückführung von Cholesterol durch Liposomen.....	67
2.3.1.2. Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Rattenstriatum-Membranpräparationen nach Rückführung von Cholesterol (1).....	69
2.3.2. Rückführung von Cholesterol durch den Einsatz eines M β CD-Cholesterol-Komplexes.....	70
2.3.2.1. Herstellung und Optimierung des M β CD-Cholesterol-Komplexes.....	70
2.3.2.2. Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Rattenstriatum-Membranpräparationen nach Rückführung von Cholesterol (2).....	72
2.4. Erhöhung des Cholesterol-Gehaltes einer Rattenstriatum-Membranpräparation.....	76
2.5. Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin und Triton X-100 auf Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien.....	78
2.5.1. Untersuchungen zum Einfluss von M β CD und Triton X-100 auf die spezifische Radioligand-Rezeptor-Bindung.....	78
2.5.2. Konkurrenzexperimente mit M β CD und Triton X-100.....	80
2.6. Nachweis von Methyl- β -Cyclodextrin in einer Rattenstriatum-Membranpräparation....	84
2.6.1. UV-photometrischer Assay zur Bestimmung von Methyl- β -Cyclodextrin.....	84
2.6.2. UV-Photometrische Bestimmung von Methyl- β -Cyclodextrin in einer Rattenstriatum-Membranpräparation.....	86
2.7. [³⁵ S]GTP γ S-Bindungsstudien an Membranpräparationen mit vermindertem Cholesterol-Gehalt.....	88

2.7.1. [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an Adenosin-A ₁ -Rezeptoren	88
2.7.2. Entwicklung eines [³⁵ S]GTPγS-Bindungs-Assays an striatalen Adenosin-A _{2A} - Rezeptoren	91
2.7.3. [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an Membranpräparationen mit vermindertem Cholesterol-Gehalt	93
2.7.4. [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an Rattenstriatum-Membranpräparationen nach Rückführung von Cholesterol	100
2.8. Exkurs: Entwicklung eines [³⁵ S]GTPγS-Bindungs-Assays an corticalen Rattenhirn- Adenin-Rezeptoren	102
2.9. Isolierung und Untersuchung von „Detergent Resistant Membranes“ durch eine Sucrose- Gradienten-Zentrifugation	106
2.9.1. Sucrose-Gradienten-Zentrifugation unter Verwendung von Triton X-100 als Detergens	107
2.9.2. Sucrose-Gradienten-Zentrifugation unter Verwendung von CHAPS als Detergens	114
2.9.3. Sucrose-Gradienten-Zentrifugation ohne Verwendung eines Detergens	116
2.10. Zusammenfassung	118
3. Funktionelle Charakterisierung neuer Adenosin-Rezeptor-Liganden	123
3.1. Einleitung	123
3.2. Charakterisierung von 4-Aminopyrimidin-Derivaten als neue nicht-nukleosidische Adenosin-Rezeptor-Liganden	125
3.2.1. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin-A ₁ -, A _{2A} - und A ₃ - Rezeptoren: Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen	126
3.2.2. Natrium-Shift-Experimente an Ratten-Adenosin-A _{2A} -Rezeptoren	143
3.2.3. Funktionelle [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an humanen Adenosin-A ₁ - und Ratten- Adenosin-A _{2A} -Rezeptoren	145
3.2.4. Zusammenfassung und Ausblick	150
3.3. Charakterisierung von 2-Thioadenosin-Derivaten als Adenosin-Rezeptor-Agonisten ..	153
3.3.1. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin-A ₁ -, A _{2A} - und A ₃ - Rezeptoren: Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen	153
3.3.2. Zusammenfassung und Ausblick	156
3.4. Charakterisierung von 2-Phenylpurin-6,8-dionen, 2,8-Diphenylpurin-6-dionen, 1,2,3- Triazolpyrimidinen und 7-Amino-Oxazolpyrimidinen als neue Adenosin-Rezeptor- Liganden	157

3.4.1. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen Adenosin-A ₃ -Rezeptoren: Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen	157
3.4.2. Zusammenfassung und Ausblick	162
4. Evaluierung von Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten für den Einsatz in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	163
4.1. Einleitung	163
4.2. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin-A ₁ -, A _{2A} - und A ₃ -Rezeptoren: Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen	166
4.3. GTP-Shift- und Agonist-Shift-Experimente an Ratten-Adenosin-A ₁ -Rezeptoren	170
4.4. Zusammenfassung und Ausblick	173
5. Funktionelle Charakterisierung neuer fluoreszenzmarkierter Adenosin-Rezeptor-Liganden.....	175
5.1. Einleitung	175
5.2. Charakterisierung von fluoreszenzmarkierten Xanthin-Derivaten als Adenosin-A _{2B} -Rezeptor-Liganden.....	177
5.2.1. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin-A ₁ -, A _{2A} -, A _{2B} - und A ₃ -Rezeptoren: Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen	178
5.2.2. Zusammenfassung und Ausblick	182
5.3.1. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin-A ₁ -, A _{2A} - und A ₃ -Rezeptoren: Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen	185
5.3.2. Funktionelle [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an humanen Adenosin-A ₁ -Rezeptoren	187
5.3.3. Zusammenfassung und Ausblick	188
6. Charakterisierung des Pflanzenextrakts STW5 (Iberogast®) und seiner Bestandteile durch [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Adenosin-Rezeptoren.....	191
6.1. Einleitung	191
6.2. [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an Adenosin-A ₁ - und A _{2A} -Rezeptoren	196
6.3. Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	199
7. Funktionelle Charakterisierung neuer Cannabinoid- Rezeptor-Liganden.....	201
7.1. Einleitung	201

7.2. Übertragung der Kompetitionsexperimente an Cannabinoid-CB ₁ - und CB ₂ -Rezeptoren vom Standard- auf das High-Throughput-Verfahren	208
7.3. Charakterisierung von Imidazothiazepinonen als neue Cannabinoid-CB ₁ - und CB ₂ -Rezeptor-Liganden.....	211
7.3.1. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Ratten-Cannabinoid-CB ₁ - und humanen Cannabinoid-CB ₂ -Rezeptoren: Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	213
7.3.2. [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an humanen und Ratten-Cannabinoid-CB ₁ und humanen CB ₂ -Rezeptoren	215
7.3.3. Zusammenfassung.....	220
7.4. Charakterisierung von 3-Alkylcumarinen und 2 <i>H</i> -Chromen-Derivaten als neue Cannabinoid-CB ₁ - und CB ₂ -Rezeptor-Liganden	221
7.4.1. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Ratten-Cannabinoid-CB ₁ - und humanen Cannabinoid-CB ₂ -Rezeptoren: Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	223
7.4.2. [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an humanen und Ratten-Cannabinoid-CB ₁ -Rezeptoren	230
7.4.3. Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	232
8. Zusammenfassung.....	235
9. Experimenteller Teil	243
9.1. Geräte und Materialien.....	243
9.2. Substanzen und Reagenzien	245
9.2.1. Kommerziell erhältliche Chemikalien	245
9.2.2. Nicht-kommerziell erhältliche Chemikalien.....	246
9.2.3. Radioliganden.....	247
9.2.4. Zellkulturbedarf und Nährmedien.....	247
9.2.5. Kultivierte Zelllinien	248
9.3. Pufferlösungen.....	249
9.4. Zellkultur	251
9.4.1. Auftauen von Zellen.....	251
9.4.2. Splitten von Zellen.....	251
9.4.3. Einfrieren von Zellen	251
9.4.4. Verwendete Nährmedien.....	252

9.5. Rattencortex- und Rattenstriatum-Membranpräparation.....	253
9.6. Proteinbestimmung nach Bradford	255
9.7. Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin-Rezeptoren.....	256
9.7.1. Verdünnungsschemata	256
9.7.2. Konkurrenzexperimente	257
9.7.3. Sättigungsexperimente	262
9.7.4. Kinetikexperimente.....	264
9.7.5. [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an Adenosin- bzw. Adenin Rezeptoren.....	266
9.8. Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Cannabinoid-Rezeptoren.....	268
9.8.1. Verdünnungsschemata	268
9.8.2. Konkurrenzexperimente	269
9.8.3. [³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien an Cannabinoid-Rezeptoren	271
9.9. Verringerung des Cholesterolgehaltes von Membranpräparationen durch Behandlung mit Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD)	271
9.10. Cholesterol-Bestimmung.....	272
9.11. Rückführung von Cholesterol in eine Rattenstriatum-Membranpräparation mit einem verminderten Cholesterolgehalt.....	272
9.11.1. Herstellung eines MβCD-Cholesterol-Komplexes	272
9.11.2. Rückführung von Cholesterol durch einen MβCD-Cholesterol-Komplex	273
9.11.3. Rückführung von Cholesterol durch den Einsatz von cholesterolreichen Liposomen	274
9.12. Fraktionierung der Zellmembran (Rattenstriatum) durch den Einsatz eines Sucrose-Dichte-Gradienten.....	274
9.13. Photometrischer Assay zur Bestimmung von MβCD	275
9.14. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (Vorversuche).....	275
10. Abkürzungsverzeichnis.....	277
11. Literaturverzeichnis.....	285

1. CHOLESTEROL ALS MODULATOR DER FUNKTION G-PROTEIN-GEKOPPELTER REZEPTOREN

1.1. BIOLOGISCHE FUNKTION UND BIOSYNTHESE VON CHOLESTEROL

Cholesterol (5-Cholesten-3 β -ol) ist ein wichtiger Bestandteil der eukaryotischen Zellmembranen und ist neben dem normalen Zellwachstum auch für die Struktur und Funktion biologischer Membranen verantwortlich.^{1, 2}

Das Gehirn ist reich an diesen membranären Strukturen und besitzt aus diesem Grund einen hohen Cholesterol-Gehalt. Das zentrale Nervensystem (ZNS) macht zwar nur 2 % des Körpergewichtes aus, es enthält jedoch 23 % des frei im Körper verfügbaren Cholesterols.^{3, 4} Des Weiteren stellt Cholesterol

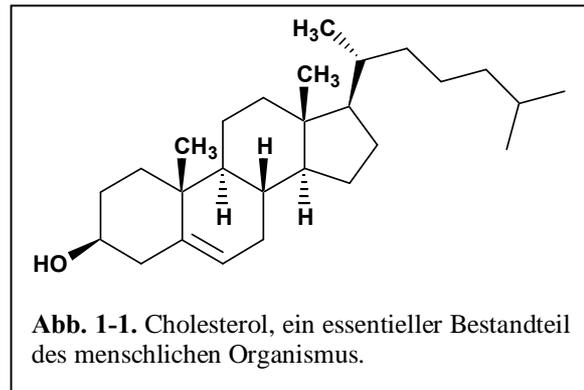


Abb. 1-1. Cholesterol, ein essentieller Bestandteil des menschlichen Organismus.

ein Grundbaustein für Steroidhormone und die Gallensäure dar und spielt bei der Synthese des Vitamins D eine große Rolle.^{1, 2} Im Jahre 1784 zum ersten Mal aus Gallensteinen isoliert, übt Cholesterol seitdem eine große Faszination auf Forscher unterschiedlichster naturwissenschaftlicher und medizinischer Disziplinen aus. Nobel-Preise in Physiologie und Medizin gingen im Jahre 1963 an K. Bloch und 1985 an M.S. Brown und J.L. Goldstein für ihre Arbeiten zum Metabolismus von Cholesterol. Viele historische Übersichtsartikel befassen sich seitdem detailliert mit der Entdeckung von Cholesterol und der Aufklärung des Wirkmechanismus.⁵⁻⁷

Der erste Schritt bei der Synthese von Cholesterol (siehe Abb. 1-2) ist die Bildung von Isopentenyl-5-pyrophosphat aus Acetyl-CoA. Diese Reaktionskette beginnt mit der Bildung von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) aus Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA. Die Synthese von Mevalonat ist die Schrittmacherreaktion der Cholesterolsynthese.⁸ Das Enzym, das diesen irreversiblen Vorgang katalysiert, die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase, ist ein wichtiger Kontrollpunkt der Cholesterolproduktion. Mevalonat wird durch drei ATP-abhängige Reaktionen in Isopentenyl-5-pyrophosphat umgewandelt.

Squalen (C₃₀) wird aus sechs Molekülen Isopentenylpyrophosphat synthetisiert. Diese Phase der Cholesterolsynthese beginnt mit der Isomerisierung von Isopentenylpyrophosphat zu Dimethylallylpyrophosphat. Diese isomeren C₅-Einheiten kondensieren zu einer C₁₀-Verbindung. Ein aus dem Dimethylallylpyrophosphat gebildetes Allylcarbeniumion wird von Isopentenylpyrophosphat angegriffen und es entsteht Geranylpyrophosphat. Die gleiche Art von

Reaktion findet noch einmal statt. Das Geranylpyrophosphat wird in ein Allylcarbeniumion verwandelt, das von Isopentenylpyrophosphat angegriffen wird. Die entstehende C₁₅-Verbindung heißt Farnesylpyrophosphat. Der letzte Schritt der Squalensynthese ist eine reduktive Kondensation von zwei Molekülen Farnesylpyrophosphat. Die Squalen-Synthase, ein spezifisches Enzym der Cholesterol-Biosynthese, katalysiert eine 2-Stufen-Synthese, die die Kondensation von zwei Farnesylpyrophosphat-Molekülen zum Presqualen-Pyrophosphat beinhaltet.⁹ Der letzte Akt der Cholesterinbiosynthese beginnt mit der Reduktion von Presqualen-Pyrophosphat zum Squalen. Ein detaillierter Mechanismus dieser enzymatischen Reaktion wurde bereits beschrieben.¹⁰ Das reaktive Zwischenprodukt Squalenepoxid wird anschließend durch eine Cyclase in Lanosterol überführt.¹¹ Letztendlich wird Lanosterol über mehrere Zwischenschritte in Cholesterol umgewandelt.¹²

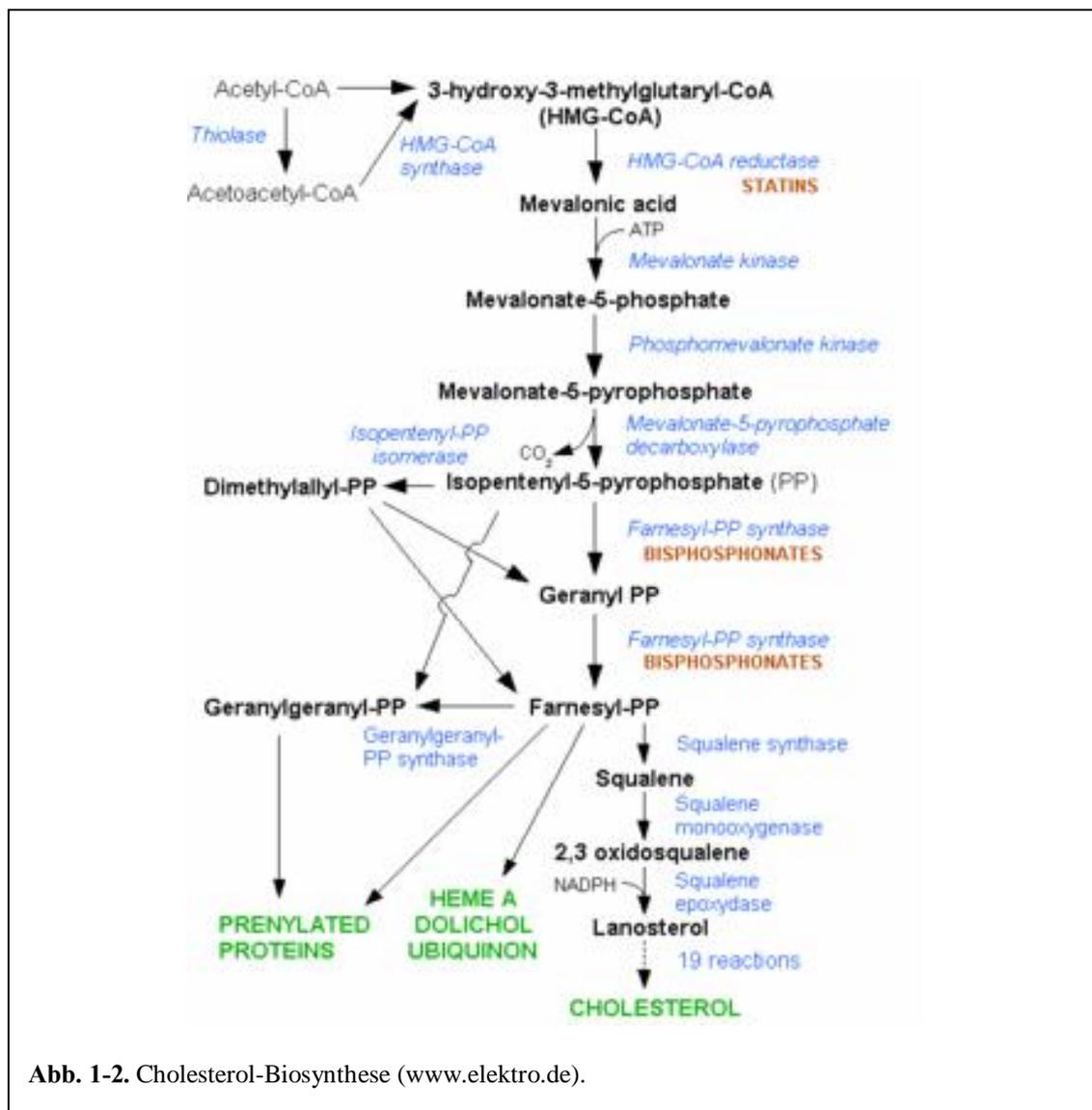


Abb. 1-2. Cholesterol-Biosynthese (www.elektro.de).

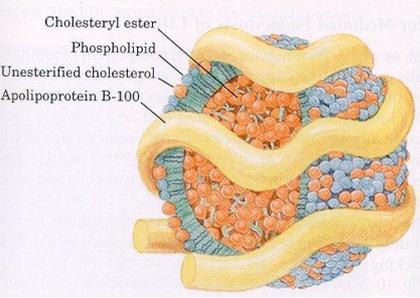
Cholesterol kann mit der Nahrung aufgenommen oder *de novo* synthetisiert werden. Der Hauptsyntheseort bei Säugern ist die Leber. Auch im Darm entstehen beträchtliche Cholesterolmengen. Ein Erwachsener synthetisiert bei cholesterinarter Ernährung ca. 800 mg pro Tag. Wenn auch alle Körperzellen grundsätzlich Cholesterol herstellen können, so sind sie doch auf das in der Leber produzierte und mittels der Lipoproteine (siehe Kap. 1.2.) antransportierte Cholesterol angewiesen. Die Leberzellen geben Cholesterol verpackt in die Lipoproteine, die die Transportform für wasserunlösliche Lipide im wässrigen Blut darstellen, in das Blut ab und sezernieren es zusammen mit den Gallensäuren in die Gallenflüssigkeit.

Die Gallensäuresalze sind polare Abkömmlinge des Cholesterins. Diese Verbindungen sind hocheffektive Detergenzien, da sie neben polaren auch unpolare Regionen besitzen. Sie werden in der Leber gebildet, in der Gallenblase gespeichert und aufkonzentriert und von dort in den Dünndarm abgegeben. Sie sind Hauptbestandteile der Gallenflüssigkeit und machen die Lipide in der Nahrung löslich.^{5, 13-16}

1.2. LIPOPROTEIN-STOFFWECHSEL

Die einzelnen Lipoproteine unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung aus Triglyceriden, Cholesterol, Phospholipiden und Apolipoproteinen (siehe Tab. 1-1). Diese Einteilung der Lipoproteine wurde durch die Arbeit mehrerer Arbeitsgruppen zwischen 1950 und 1960 festgelegt.^{17, 18} Basierend darauf werden Lipoproteine nach steigender Dichte klassifiziert: Chylomikronen, Lipoproteine sehr geringer Dichte (*very-low-density lipoproteins*, VLDL), Lipoproteine geringer Dichte (*low-density lipoproteins*, LDL) und Lipoproteine hoher Dichte (*high-density lipoproteins*, HDL). Ein Lipoprotein ist ein Partikel mit einem Kern aus hydrophoben Lipiden, wie den Triglyceriden und dem Cholesterol, der von einer Hülle aus polaren Lipiden und Apoproteinen umgeben ist. Sie werden von Leber und Dünndarm synthetisiert und sezerniert (siehe Abbildung in Tab. 1-1).

Tab. 1-1. Eigenschaften und Aufbau von Plasmalipoproteinen.^{13,16}

	Lipoprotein	Zusammensetzung [%]				Dichte (d) [g/cm ³]
		TG	CH	PL	Protein	
 <p>(nach www.walzemlab.tamu.edu)</p>	Chylomikronen	90	5	4	1	< 0,94
	VLDL (very-low-density lipoprotein)	60	15	15	10	< 1,006
	LDL (low-density lipoprotein)	10	42	22	26	1,019 < d < 1,063
	HDL (high-density lipoprotein)	5	20	30	45	1,063 < d < 1,21

TG = Triglyceride, CH = Cholesterol, PL = Phospholipide

Triglyceride, Cholesterol und andere Lipide aus der Nahrung werden mit großen Chylomikronen vom Darm zum Fettgewebe und zur Leber transportiert (siehe Abb. 1-3). Chylomikronen haben eine sehr geringe Dichte, da sie reich an Triglyceriden sind. Die äußere Schicht dieser Hülle ist sehr hydrophil. Die Triglyceride werden durch die auf der Oberfläche der Endothelzellen lokalisierte Lipoprotein-Lipase, die in den Auskleidungen der Blutgefäße im Muskel und anderen peripheren Geweben vorhanden ist, gespalten. Sie dienen dort als Brennstoffe und Vorstufen für endogen synthetisierte Lipide. Der cholesterolreiche Rest wird von den Leberzellen vollständig abgebaut. Von der Leber nicht benötigte Triglyceride und

Cholesterole werden in Form des Lipoproteins VLDL in das Blut abgegeben. Die Triglyceride in den VLDLs werden ebenfalls von Lipasen an den Gefäßwänden von Blutkapillaren hydrolysiert. Dadurch nehmen die Dichte und der relative Cholesterolgehalt dieser Partikel zu. Auf diese Weise werden über die Zwischenstufe der „intermediate-density lipoproteins“ (IDL) aus VLDL die cholesterolreichen LDL-Partikel gebildet. Diese Partikel sind die wichtigsten Cholesterol-Carrier des Blutes. Der stark hydrophobe Kern ist von einer Hülle aus Phospholipiden und unverestertem Cholesterol umgeben. Die Funktion der LDL-Partikel besteht darin, Cholesterole zu peripheren Geweben zu transportieren und dort die *De-novo*-Cholesterolsynthese zu kontrollieren. Die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) nehmen das Cholesterole auf, das von absterbenden Zellen und abgebauten Membranen an das Blutplasma abgegeben wird. Eine Acyltransferase der HDL-Partikel verestert das Cholesterole, das von einem Transportprotein rasch an VLDL oder LDL abgegeben wird (siehe Abb. 1-3).^{5, 13-16}

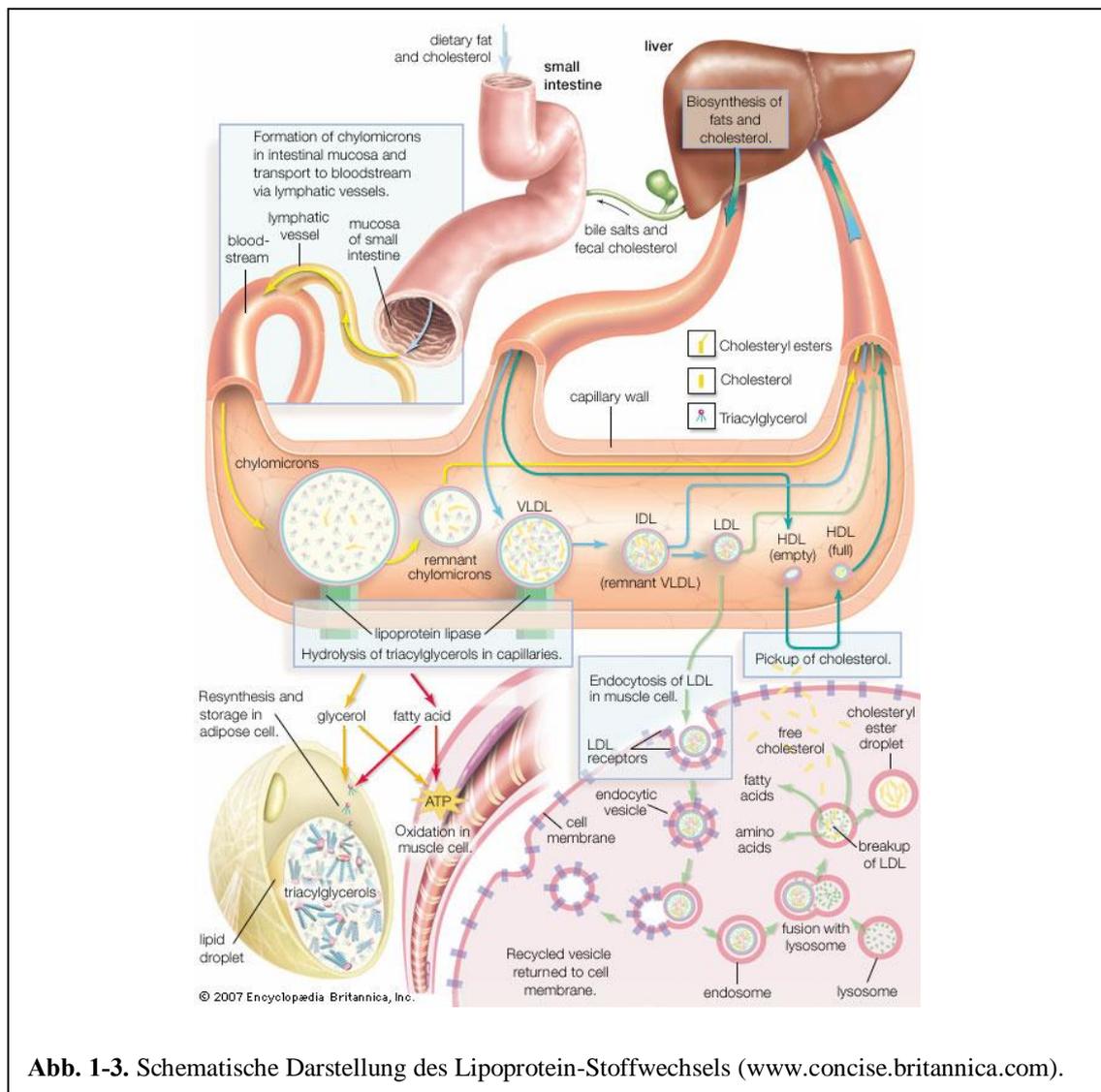


Abb. 1-3. Schematische Darstellung des Lipoprotein-Stoffwechsels (www.concise.britannica.com).

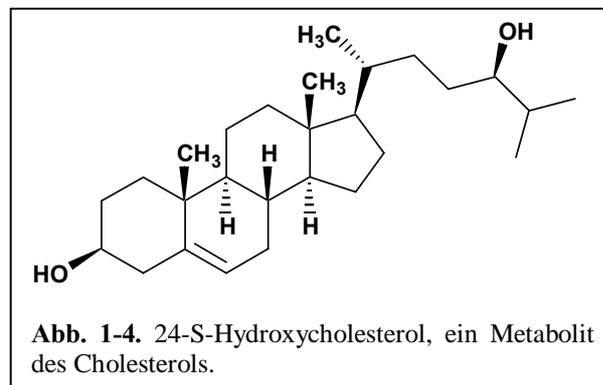
1.3. CHOLESTEROL-METABOLISMUS IM GEHIRN

In den vergangenen Jahren hat das Interesse am Metabolismus von Cholesterol im Gehirn immer weiter zugenommen, da gezeigt worden ist, dass Cholesterol eine wichtige Rolle beim Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. bei Morbus Alzheimer, aber auch bei Morbus Parkinson, zu spielen scheint (siehe Kap. 1.7.). Wie bereits in Kap. 1.1. erwähnt, enthält das zentrale Nervensystem (ZNS) nahezu ein Viertel des gesamten körpereigenen freien Cholesterols, obgleich es nur 2 % der totalen Körpermasse ausmacht.^{3, 4} Der tägliche Turnover des zentralen Cholesterols beträgt im Menschen nur 0,02 % und ist damit um etwa den Faktor 100 langsamer als der Cholesterol-Flux im gesamten menschlichen Körper.¹⁹

Die zentrale Stoffwechsel-Homöostase ist durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) vom peripheren Metabolismus getrennt. Diese Barriere trennt gleichfalls den zentralen Cholesterol-Pool vom Plasma-Pool ab. Bisher gibt es keinen Hinweis darauf, dass Lipoprotein-Cholesterol vom Plasma über die BHS in das ZNS penetriert.⁴ Nahezu der gesamte Bedarf an Cholesterol im ZNS wird durch *in situ* Synthese selbst gedeckt, wobei die initial sehr hohe Synthese-Rate im Laufe des Entwicklungsprozesses abnimmt.²⁰

Unter Steady-State-Bedingungen verlässt überschüssiges ZNS-Cholesterol das zentrale Kompartiment primär durch geregelte Exkretion des Cholesterol-Metaboliten 24-S-Hydroxycholesterol.^{21, 22}

Die neuronale Sterol-Hydroxylase CYP46 (ein Mitglied aus der CYP450-Familie) katalysiert diese Sterol-Derivatisierung.²³ Da im Steady-State die Output-Rate von 24-S-Hydroxycholesterol die Synthese-Rate von ZNS-Cholesterol nicht vollständig kompensiert, müssen zudem noch andere Exkretionssysteme für den Sterol-Flux aus dem ZNS verantwortlich sein.⁴ Neue Befunde zeigen, dass der Flux von 24-S-Hydroxycholesterol bei Morbus Alzheimer erhöht ist.^{4, 24} Der Plasma-24-S-Hydroxycholesterol-Spiegel scheint dabei mit der Schwere der Demenz von Alzheimer-Patienten zu korrelieren (siehe Kap. 1.7.3.2.).²⁴



1.4. „MEMBRANE RAFTS“ UND CAVEOLAE: CHOLESTEROL- UND SPHINGOLIPIDREICHE MIKRODOMÄNEN IN DER ZELLMEMBRAN

1.4.1. HISTORISCHE DEFINITION DER „LIPID RAFTS“

Kai Simons und Elina Ikonen beschrieben im Jahre 1997 in *Nature* zum ersten Mal die Existenz von cholesterol- und sphingolipidreichen Mikrodomänen in der Zellmembran, die sie damals als „Lipid Rafts“ bezeichneten.²⁵ Seitdem waren die „Lipid Rafts“ Thema zahlreicher Übersichtsartikel.²⁶⁻⁴⁶ Aufgrund ihres Verhaltens gegenüber Detergenzien wurden sie als unlöslich im Detergens Triton X-100 bei 4°C charakterisiert und aus diesem Grund auch als *detergent-insoluble membranes*, *detergent-resistant membranes* (DRMs), *glycosphingolipid-enriched membranes*, *detergent-insoluble glycosphingolipid membranes* (DIGs) oder *Triton-insoluble floating fractions* bezeichnet.³¹

Die „Lipid Rafts“ konnten durch einem Sucrose-Gradienten isoliert werden, da sich die an die Rafts gebundenen Lipide und Proteine nach Solubilisierung der Membranen mit Triton X-100 bei 4°C im Bereich geringer Dichte (5-30% Sucrose) anreicherten.⁴⁷ Diese Unlöslichkeit wurde folgendermaßen begründet. Die Detergenzien liegen in einer wässrigen Lösung sowohl als Mizellen als auch als Monomere vor. Kommen sie mit einer Phospholipid-Doppelschicht in Berührung, so lagern sich die Monomere in die Doppelschicht ein. Wird die kritische Mizellbildungs-Konzentration überstiegen, so werden die Lipide in die Mizellen eingeschlossen. Die Unlöslichkeit der „Lipid Rafts“ soll nach Vorstellungen von Shogomori et al. auf der dichteren Packung der Lipide, verursacht durch die gesättigten Seitenketten der Raft-Sphingolipide und Raft-Phospholipide, basieren (vgl. Kapitel 1.4.3.).⁴⁸ Aufgrund der van-der-Waals-Kräfte zwischen den Acyl-Seitenketten der Lipide, können sich die Detergenzien nicht in die Membran einlagern. Somit wird nur die „non-raft-Phase“ solubilisiert.^{49, 50} Um die „Lipid Rafts“ effizient zu isolieren, muss die Extraktion auf Eis stattfinden. Die Rafts setzen sich aus vielen verschiedenen Proteinen und Lipiden zusammen, die durch die niedrige Temperatur stabilisiert werden, was zu dem gewünschten Ausschluss der Detergenzien führen soll.⁴⁸

Aufgrund der kontroversen Diskussion darüber, ob die Existenz dieser cholesterolreichen Mikrodomänen („Lipid Rafts“) auf einem Artefakt beruht und die Verwendung von Detergenzien, wie z.B. Triton X-100, zur Isolierung der Rafts mit Hilfe eines Sucrose-Gradienten die Bildung dieser Mikrodomänen erst hervorrufen könnte,⁵¹⁻⁵⁶ wurde die Definition der „Lipid Rafts“ neu festgelegt. Auf dem „Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function“, welches vom 23.-28. März 2006 in Steamboat Springs (CO, USA) stattfand, hat man sich schließlich darauf geeinigt, die Bezeichnung „Lipid Rafts“ durch „Membrane Rafts“ zu ersetzen.⁵⁷

1.4.2. AKTUELLE DEFINITION DER „MEMBRANE RAFTS“

Auf dem „Keystone Symposium“ kam man zu dem Entschluss die „Membrane Rafts“ als kleine (10-200 nm große), heterogen aufgebaute und sehr bewegliche Domänen innerhalb der Plasma-Membran zu definieren, die reich an Sterolen und Sphingolipiden sind und sich bei Bedarf zu größeren Domänen durch Protein-Protein oder Protein-Lipid-Interaktionen zusammenschließen können.⁵⁷

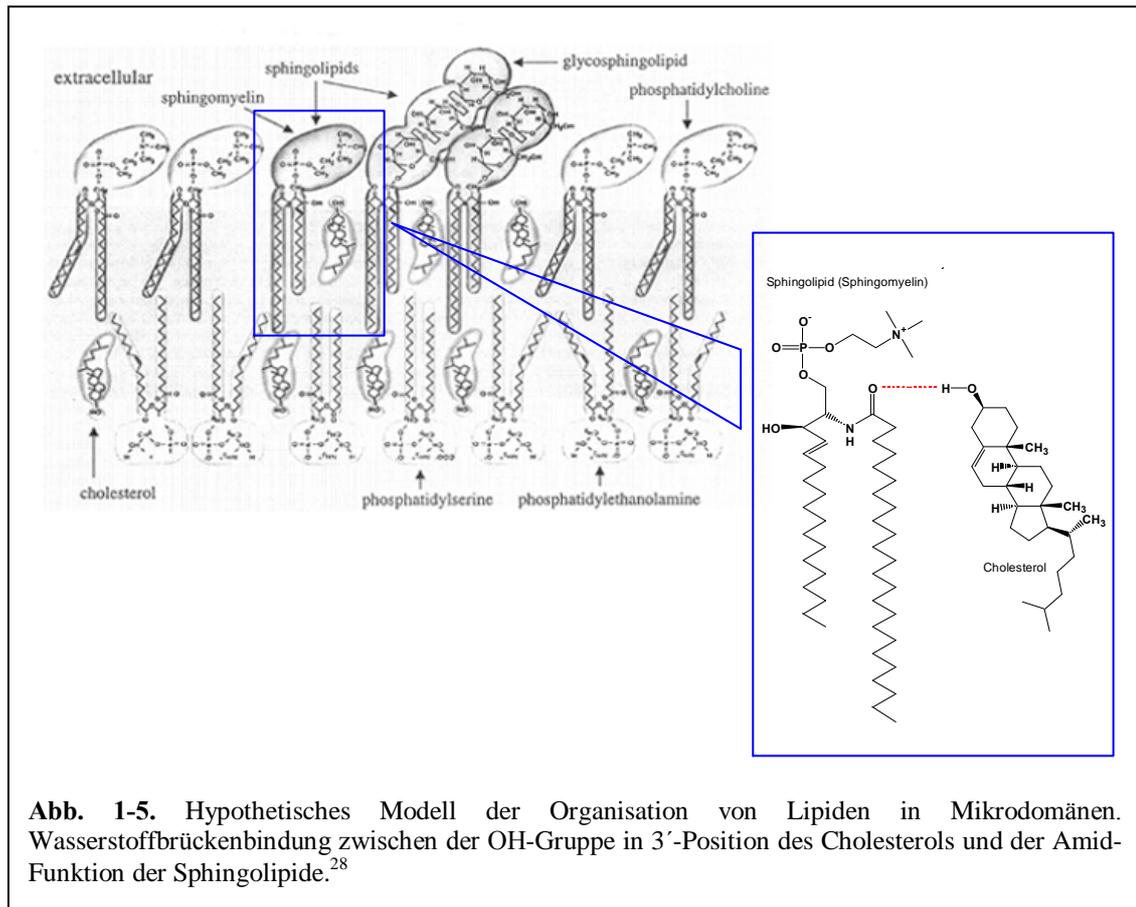
Nicht nur Lipide sind an der Entstehung der Rafts in der Plasma-Membran beteiligt, sondern auch Proteine. Aus diesem Grund war der Begriff der „Lipid Rafts“ inadäquat. Da die Rafts nicht nur in der Plasma-Membran zu finden sind, sondern auch intrazellulär in den Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum vorkommen, konnte man auch nicht von „Plasma Membrane Rafts“ sprechen. Über die Existenz dieser „Non-Plasma Membranes Rafts“ ist allerdings noch nicht viel bekannt. Aber man wollte sich durch die eher allgemeine Bezeichnung „Membrane Rafts“ dafür noch ein Türchen offen halten. Bisher galt die Anreicherung von Cholesterol in sphingolipidreichen Domänen als ein sicheres Kriterium für die „Lipid Rafts“. Die intrazellulären Membranen weisen allerdings einen recht geringen Gehalt an diesen beiden Lipiden auf. Während des Symposiums wurde ferner darüber diskutiert, ob der Entzug von Cholesterol die Bildung dieser Domänen erst hervorruft. Diese Vermutung stützte sich allerdings nur auf eine Veröffentlichung von Hao et al. im Jahre 2001.⁵⁸ Kriterien wie „liquid ordered“ und „detergent resistant“ wurden vollständig verworfen, da davon ausgegangen wurde, dass die Verwendung von Detergenzien die Bildung von Artefakten induziert.^{57, 59}

1.4.3. STRUKTURELLER AUFBAU DER „MEMBRANE RAFTS“ UND CAVEOLAE

„Membrane Rafts“ bzw. die früher als „Lipid Rafts“ bezeichneten cholesterol- und sphingolipidreichen Mikrodomänen in der Zellmembran spielen nicht nur eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, Rezeptor-Desensibilisierung und im intrazellulären Trafficking,^{26, 27, 30} sondern nehmen auch an zellulären Prozessen, wie z.B. Transzytose, Photozytose, Endozytose, Internalisierung von Toxinen, Bakterien und Viren, Cholesterol-Transport, Calcium-Homöostase und Sortierung von Proteinen teil.⁴¹

Das Cholesterol und die Sphingolipide spielen eine wichtige Funktion beim Aufbau der „Membrane Rafts“. Innerhalb der Plasma-Membran befinden sich die cholinhaltigen Lipide, wie Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, eher im extrazellulären Bereich, während die aminhaltigen Lipide, wie Phosphatidylethanolamin und -serin, im intrazellulären Bereich zu finden sind (siehe Abb. 1-5).

Durch die Sphingolipide, wie das Sphingomyelin, die Glycosphingolipide und das Cholesterol wird eine Art Mikrodomäne in einer eher flüssigen Phosphatidyl-Umgebung gebildet. Cholesterol hat hierbei die Aufgabe eines *Spacers*, der wie eine Art Klebstoff, die Mikrodomänen zusammenhält.



Die Assoziation von Cholesterol mit den Sphingolipiden basiert auf einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der OH-Gruppe in 3'-Position des Steroids und der Amidfunktion der ceramidischen Struktur der Sphingolipide (siehe Abb. 1-5).²⁹ Somit sind Sphingolipide und Cholesterol im extrazellulären Bereich der Lipid-Doppelmembran mit Cholesterol und den Phospholipiden im intrazellulären Bereich verbunden. Der Grund für die dichtere Packung ist in den gesättigten Seitenketten der Raft-Sphingolipide und Raft-Phospholipide im Vergleich zu den ungesättigten Fettsäuren der Phospholipide in der flüssigen Phase zu finden. Die Größe der Rafts (10-200 nm) hängt von der Konzentration an Cholesterol und Sphingolipiden ab.^{28, 29, 32, 34}

Die Caveolae werden in allen Zelltypen gebildet und können als eine Art Untergruppe zu den „Membrane Rafts“ gezählt werden. Caveolae sind kurze kugel- bis eiförmige (= alveoläre) oder

schlauchartige (= tubuläre) Einstülpungen in der Außenmembran von Zellen, die von einem elektronenmikroskopisch kaum erkennbaren Gerüst des auf der Cytoplasma-Seite der Zellmembran vorhandenen integralen Membranproteins Caveolin umgeben sind. Durch die Expression dieses Proteins unterscheiden sich die Caveolae von den „Membrane Rafts“. Beim Caveolin lassen sich Typ 1 und 2, die ubiquitär vorkommen, vom Typ 3, der auf Knorpel und quergestreifte Muskulatur beschränkt ist, unterscheiden. Das Caveolin ist für die Bildung der Caveolae verantwortlich. Im Bereich von Caveolae sind viele verschiedene Rezeptorproteine und eine spezielle Lipidzusammensetzung der Zellmembran vorhanden.

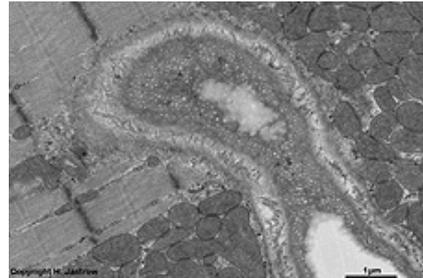


Abb. 1-6. Alveoläre Caveolae einer Endothelzelle an Ratten-Skelettmuskeln (www.uni-mainz.de).

Hier findet man analog zu den „Membrane Rafts“ eine hohe Konzentration an Glycolipiden mit ihren Ankerproteinen, Glycosphingolipiden, Cholesterol und Sphingomyelin. Alveoläre Caveolae reichen meist nur 80-150 nm ins Zellinnere hinein, tubuläre Caveolae können aber auch über 1000 nm lang sein.

Tubuläre Caveolae verlaufen typischerweise parallel zur Außenmembran in 30-50 nm Abstand. Die alveolären Caveolae erinnern an sich bildende mikropinocytische Bläschen, die aber keinen für endocytotische Bläschen typischen Clathrin-Mantel aufweisen.^{60, 61}

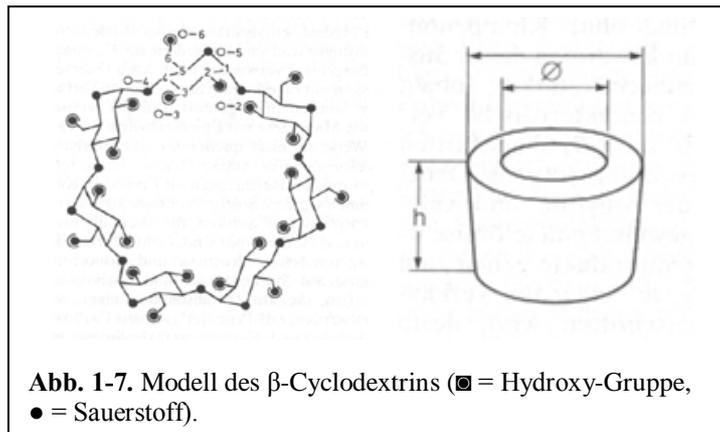
Analog zu den „Membrane Rafts“ hat Cholesterol für die Funktion der Caveolae eine große Bedeutung. Auch sie wurden bis dato als unlöslich im Detergens Triton X-100 bei 4°C charakterisiert. Trotz ihrer engen Verwandtschaft gelang es Schnitzer et al. bereits im Jahre 1995 nachzuweisen, dass es sich bei DIGs (detergent-insoluble glycosphingolipid membranes) und Caveolae nicht um identische Strukturen in der Plasma-Membran handelt.⁶²

1.4.4. ZERSTÖRUNG UND ISOLIERUNG DER „MEMBRANE RAFTS“

Wird Cholesterol aus der Phospholipid-Doppelmembran entfernt, so führt dies zu einer Dissoziation der Raft-Proteine von den Lipiden und geht mit einer Zerstörung der Rafts einher.²⁶ Es gibt viele Methoden, um den Cholesterol-Gehalt in der Plasma-Membran zu vermindern, allerdings hat sich Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) als die Methode der Wahl erwiesen.⁶³ Während des „Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function“ wurde darüber diskutiert, dass der Entzug von Cholesterol aus der Zellmembran die Bildung dieser Domänen erst hervorrufen könnte. Diese Hypothese stützte sich allerdings nur auf eine einzige

Veröffentlichung.⁵⁸ Die Arbeitsgruppe um Morris et al. verwendeten diese Methode, um die Lokalisation des α_{1A} -adrenergen Rezeptors in den „Membrane Rafts“ nachzuweisen. Die Verringerung des Cholesterol-Gehaltes durch M β CD führte zur Zerstörung der „Membrane Rafts“.⁶⁴

Cyclodextrine sind natürliche 1,4- α -glykosidisch verknüpfte, ringförmige Oligosaccharide, die sich biotechnologisch durch den Abbau von Stärke mit Cyclodextrin-Glycosyl-Transferasen



gewinnen lassen. Je nach Reaktionsführung und je nachdem, welche Enzyme eingesetzt werden, bilden sich vorwiegend α -, β - oder γ -Cyclodextrine, deren Ringe aus 6, 7 oder 8 Glucose-Einheiten bestehen können. Sie haben die Fähigkeit, im gelösten und

häufig auch im festen Zustand durch einfaches, intensives Mischen, andere Moleküle in ihren Hohlraum aufzunehmen.⁶⁵ Dies lässt sich auf die Hydrophobie dieses Hohlraumes zurückführen. Die Außenseite der Cyclodextrin-Moleküle ist hingegen hydrophil.^{66, 67} Im Vergleich zu anderen Lipiden haben die β -Cyclodextrine eine hohe Affinität zu Sterolen⁶⁷⁻⁷⁰ und eine hohe Spezifität gegenüber Cholesterol.^{66, 68, 69, 71, 72} Untersuchungen haben ergeben, dass β -Cyclodextrin und 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin zwar ebenfalls Cholesterol entfernen, allerdings war M β CD effizienter als die anderen beiden Cyclodextrine.^{71, 73} α - und γ -Cyclodextrine vermochten hingegen den Cholesterol-Gehalt einer Membran nicht zu verringern.⁷⁴ Toxizitätsuntersuchen haben gezeigt, dass Cyclodextrine erst bei längeren Inkubationszeiten (2 h) zytotoxisch wirken.⁷¹

Das Antibiotikum Filipin ist ein cholesterolbindendes Fluorochrom, das selektiv Cholesterol in der Plasmamembran bindet und es so aus der Membran entfernt.^{75, 76} Weitere Antibiotika, die auf die gleiche Art das Cholesterol an sich binden, sind das fungizide Nystatin^{77, 78} und Amphotericin.²⁶ Saponin, Digitonin und Streptolysin O werden zu den Poren-bildenden Agenzien gezählt und bilden mit dem Cholesterol Komplexe aus.^{26, 50, 79, 80} Das Enzym Cholesterol-Oxidase katalysiert die Reaktion von Cholesterol zum 4-Cholesten-3-on, einem funktionell inaktivem Steroid, in Bezug auf den Aufbau von „Membrane Rafts“.⁷⁴ Dieser basiert auf einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der OH-Gruppe in 3'-Position des Cholesterols und der Amid-Funktion der ceramidischen Struktur der Sphingolipide.²⁹

HMG-Co-A-Reduktase-Inhibitoren, wie Lovastatin, Pravastatin, Fluvastatin, Squalestin oder Compactin inhibieren die Cholesterol-Biosynthese (Vergleich siehe Kap. 1.1.).^{81, 82}

Da Sphingolipide einen großen Bestandteil der „Membrane Rafts“ darstellen, könnten Inhibitoren der Sphingolipid-Synthese als Alternative eingesetzt werden, um Rafts zu zerstören.⁸³ Dazu gehören ISP-1, ein Inhibitor der Palmitoyltransferase,⁸⁴ D-threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP), ein Inhibitor der Glycosphingolipid-Synthese,⁸⁵ und Sulfamisterin, ein Inhibitor der Serin-Palmitoyltransferase.⁸³ Lysenin ist ein Toxin des Regenwurmes und bindet spezifisch Sphingomyelin,^{86, 87} allerdings stellt die Zytotoxizität der Verbindung ein Problem dar.⁸³ Das Enzym Sphingomyelinase hydrolysiert Sphingomyelin zu Ceramid and Phosphocholin.⁸³

Nach Verringerung des Cholesterol-Gehaltes in der Plasma-Membran ist es möglich, diesen durch den Einsatz von Cholesterol-Cyclodextrin-Komplexen wieder auf sein ursprüngliches Niveau zu bringen.^{63, 88, 89}

Wie bereits in Kap. 1.4.1. dargestellt, wurde die Unlöslichkeit im Detergens Triton X-100 bei 4°C als eine charakteristische Eigenschaft der „Lipid Rafts“ betrachtet. Diese wurde bisher herangezogen, um die „Lipid Rafts“ zu isolieren und zu charakterisieren.^{25, 47} Wie bereits dargestellt, produzieren Detergenzien Artefakte und eignen sich nicht zur Isolierung der „Membrane Rafts“.⁵⁹

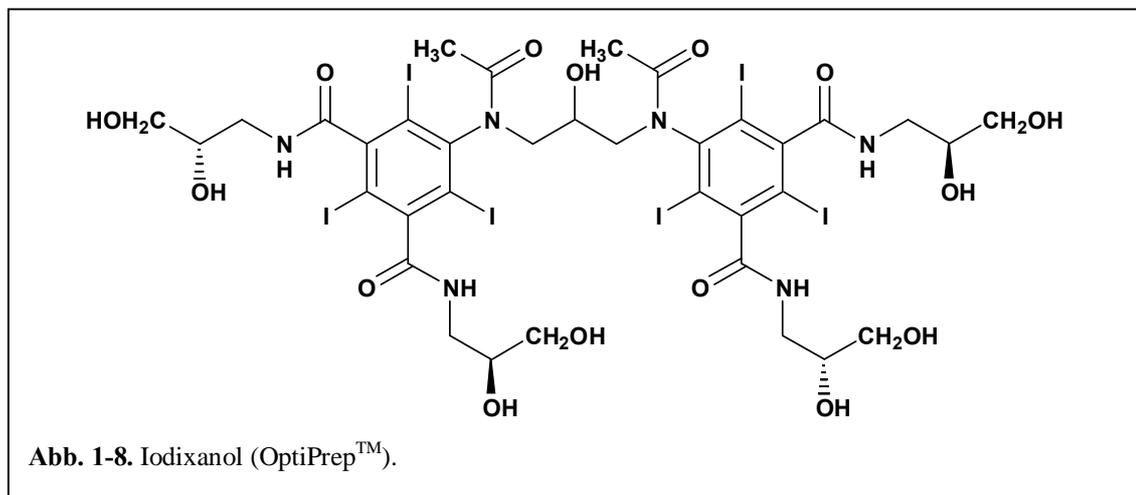
Bisher ging man davon aus, dass sich die an die Rafts gebundenen Lipide und Proteine nach Solubilisierung der Membranen mit Triton X-100 bei 4°C in einem Sucrose-Gradienten im Bereich geringer Dichte anreichern (5-30% Sucrose).⁴⁷ Wurden die einzelnen Fraktionen durch einen Western Blot analysiert, so zeigte sich, dass die integralen Membranproteine Flotillin-1 und Flotillin-2 (45-kDa) Komponenten der „Lipid Rafts“ darstellen. Aus diesem Grund wurde Flotillin-2 als Marker für die „Lipid Rafts“ verwendet.^{90, 91} Durch ihre Spezifität zum Antikörper Flotillin-2 unterschieden sich die „Lipid Rafts“ ganz klar von den Caveolae. Diese können zwar auch durch den Einsatz von Sucrose-Dichte-Gradienten isoliert werden, lassen sich aber durch spezifische Antikörper für die Proteine Caveolin-1 bis 3 charakterisieren.⁹²

Zur Isolierung der Rafts konnten verschiedene Detergenzien eingesetzt werden, allerdings erwiesen sich nicht alle als gleichermaßen geeignet.^{79, 93} Detergenzien, wie Tween 20, Brij 58, Lubrol WX, Brij 98, Brij 96, Triton X-100 und CHAPS solubilisierten alle einen Teil der verwendeten Membran, aber Detergenzien wie Tween 20, Brij 58 und Lubrol WX waren nicht selektiv. Eine Analyse des Cholesterol- und Sphingolipid-Gehaltes hatte ergeben, dass durch die Verwendung von Triton X-100 und CHAPS sich diese Lipide in der Raft-Fraktion anreicherten.

Die anderen verwendeten Detergenzien führten nicht zu solch einer Anreicherung, allerdings waren Brij 98 und Brij 96 effektiver im Vergleich zu Tween 20, Brij 58 und Lubrol WX.^{48, 79, 94, 95} CHAPSTEROL, ein neues Detergens, welches auf Cholesterol basiert, ist ebenso wie Triton X-100 und CHAPS in der Lage, cholesterolreiche Mikrodomänen zu isolieren.⁹⁶ Ferner wurde auch die Möglichkeit aufgezeigt, Nonidet P40 und Octylglucosid als Detergenzien einzusetzen.⁹⁷

Macdonald et al. und Smart et al. publizierten aufgrund der kontroversen Diskussionen eine Detergens-freie Methode zur Isolierung der „Lipid Rafts“, indem sie OptiPrepTM (Iodixanol) verwendeten.^{97, 98} Die OptiPrepTM-Methode wurde später von Morris et al. aufgegriffen, um „Membrane Rafts“ zu isolieren.⁶⁴ Bereits Luria et al. und Eckert et al. verglichen Sucrose-Dichte-Zentrifugationen, die mit und ohne den Zusatz von Triton X-100 durchgeführt wurden.^{99,}

100



Bei Iodixanol handelt es sich um ein Medium für den Aufbau eines nichtionischen Gradienten. Iodixanol ist im Prinzip ein Dimer von Nycodenz, das ebenfalls bei nichtionischen Gradienten eingesetzt werden kann. Es weist die Vorteile von Nycodenz, aber auch von Percoll auf, ohne deren Nachteile zu besitzen. Percoll besteht aus Silikagel-Partikeln, die mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschichtet sind. Die Auftrennung basiert auf der unterschiedlichen Dichte der Percoll-Lösungen. Iodixanol zeigte keine zytotoxischen Eigenschaften und keinen negativen Einfluss auf die Funktion von Enzymen, so dass es im Gegensatz zu den anderen Medien im Reaktionsansatz verbleiben kann.^{101, 102}

1.4.5. LOKALISATION G-PROTEIN-GEKOPPELTER REZEPTOREN IN „MEMBRANE RAFTS“

Für zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde bereits ein Zusammenhang zwischen dem Einfluss von Cholesterol auf die Rezeptorfunktion und einer Lokalisation in den früher als „Lipid Rafts“ bezeichneten cholesterolreichen Mikrodomänen nachgewiesen.¹⁰³⁻¹⁰⁹ In Tab. 1-2 ist eine Übersicht über diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dargestellt. Die Angabe der Veröffentlichung soll einen Hinweis darauf geben, welche Auswirkungen Cholesterol bzw. die Lokalisation dieser Rezeptoren in den „Lipid Rafts“ auf die Rezeptorfunktion hat, worauf im Text näher eingegangen wird. Somit wurde die Annahme von R.R. Neubig bestätigt, der bereits im Jahre 1994 darauf hinwies, dass GPCR und G-Proteine innerhalb der Membran auf eine komplexe Weise organisiert sind.¹¹⁰ Die Signaltransduktion der GPCR geschieht unter Vermittlung eines G-Proteins, wobei die α -Untereinheit dieses G-Proteins verantwortlich für die spezifische Aktivierung der nachgeschalteten Effektorsysteme ist (siehe Kap. 1.5.). Oh et al. haben gezeigt, dass G_q -Proteine vorzugsweise in den Caveolae zu finden sind, G_i und G_s hingegen in den „Lipid Rafts“.¹¹¹ Allerdings war die Lokalisation von G_s in den „Lipid Rafts“ nicht Voraussetzung für die Signaltransduktion.¹¹² G_t soll in einer sog. kubischen Lipid-Phase lokalisiert sein.¹¹³ Das G_t -Protein wird auch als Transducin bezeichnet, da es essentiell für die Lichtwahrnehmung ist und in der Retina des Auges vorkommt. Es wird durch den Photorezeptor Rhodopsin aktiviert.^{114, 115} Für eine Reihe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wurde der Nachweis für eine Lokalisation in den Caveolae, einer spezifischen Untergruppe der „Lipid bzw. Membrane Rafts“, erbracht.^{103, 106}

Tab. 1-2a. Lokalisation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in „Lipid Rafts“ (1).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	
Cannabinoid- CB_1 -Rezeptor ^{116, 117}	Barnett-Norris et al. Lipid, lipid raft and caveolae: Their importance for GPCR signaling and their centrality to the endocannabinoid system. <i>Life Sci.</i> 2005 , <i>77</i> , 1625-1639 Bari et al. Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. <i>J. Biol. Chem.</i> 2005 , <i>280</i> , 12212-12220
Chemokin-Rezeptor (CD4) ¹¹⁸	Nguyen, D.H. et al. Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement. <i>Exp. Cell Res.</i> 2005 , <i>304</i> , 559-569
Cholecystokinin-Rezeptor (CCKK) ⁷⁵	Harikumar et al. Differential effects of modification of membrane cholesterol and sphingolipids on the conformation, function, and trafficking of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. <i>J. Biol. Chem.</i> , 2005 , <i>280</i> , 2176-2185
Neurokinin-1-Rezeptor (NK1) ¹¹⁹	Monastyrskaya et al. The NK1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is dependent on lipid raft integrity. <i>J. Biol. Chem.</i> 2005 , <i>280</i> , 7135-7146

Tab. 1-2b. Lokalisation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in „Lipid Rafts“ (2).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	
Nogo66-Rezeptor (NgR) ¹²⁰	Yu, W. Segregation of Nogo66 receptors into lipid rafts in rat brain and inhibition of Nogo66 signaling by cholesterol depletion. <i>FEBS Lett.</i> 2004 , <i>577</i> , 87-92
Oxytocin-Rezeptor ^{120, 121}	Klein et al. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. <i>Biochemistry</i> , 1995 , <i>34</i> , 13784-13793 Reversi, A. Effects of cholesterol manipulation of the signaling of the human oxytocin receptor. <i>Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.</i> 2006 , <i>291</i> , R861-R869
P2Y ₁₂ -Rezeptor ^{122, 123}	Savi, P. et al. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y ₁₂ receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 2006 , <i>103</i> , 11069-11074 Quinton, T. M. et al. Lipid rafts are required in Galpha(i) signaling downstream of the P2Y ₁₂ receptor during ADP-mediated platelet activation. <i>J. Thromb. Haemost.</i> 2005 , <i>3</i> , 1036-1041
P2Y ₁ -Rezeptor ¹²⁴	Vial, C. et al. Differential sensitivity of human platelet P2X ₁ and P2Y ₁ receptors to disruption of lipid rafts. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 2006 , <i>343</i> , 415-419
Serotonin _{1A} -Rezeptor (5-HT _{1A}) ^{74, 77, 80, 88, 125-127}	Scanlon, S. M. et al. Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. <i>Biochemistry</i> 2001 , <i>40</i> , 10507-10513 Pucadyil, T. J. et al. The sterol-binding antibiotic nystatin differentially modulates ligand binding of the bovine hippocampal serotonin _{1A} receptor. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 2004 , <i>320</i> , 557-562 Paila, Y. D. et al. The cholesterol-complexing agent digitonin modulates ligand binding of the bovine hippocampal serotonin _{1A} receptor. <i>Mol. Membr. Biol.</i> 2005 , <i>22</i> , 241-249 Pucadyil, T. J. et al. Cholesterol modulates ligand binding and G-protein coupling to serotonin(1A) receptors from bovine hippocampus. <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 2004 , <i>1663</i> , 188-200 Pucadyil, T. J. et al. Cholesterol modulates the antagonist-binding function of hippocampal serotonin _{1A} receptors. <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 2005 , <i>1714</i> , 35-42 Chattopadhyay, A. et al. Role of cholesterol in ligand binding and G-protein coupling of serotonin _{1A} receptors solubilized from bovine hippocampus. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 2005 , <i>327</i> , 1036-1041 Pucadyil, T. J. et al. Membrane cholesterol oxidation inhibits ligand binding function of hippocampal serotonin(1A) receptors. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 2005 , <i>331</i> , 422-427
Sigma-2-Rezeptor ⁹⁰	Gebreselassie, D. et al. Sigma-2 receptors are specifically localized to lipid rafts in rat liver membranes. <i>Eur. J. Pharmacol.</i> 2004 , <i>493</i> , 19-28
α_{1A} -Adreno-Rezeptor ⁶⁴	Morris, D. P. et al. The α_{1A} -adrenergic receptor occupies membrane rafts with its G protein effectors but internalizes via clathrin coated pits. <i>J. Biol. Chem.</i> 2007 , in press
β -Adreno-Rezeptor ¹²⁸	Allen, J. A. et al. Beta-adrenergic receptor stimulation promotes G alpha s internalization through lipid rafts: a study in living cells. <i>Mol. Pharmacol.</i> 2005 , <i>67</i> , 1493-1504

Die Arbeitsgruppe um Pucadyil und Chattopadhyay et al. wiesen den Einfluss von Cholesterol auf die Funktion des Serotonin_{1A}-Rezeptors (5-HT_{1A}) nach, indem sie den Cholesterol-Gehalt einer Rinder-Hippocampus-Membranpräparation auf verschiedene Weise (Einsatz von Nystatin⁷⁷, Digitonin,⁸⁰ M β CD^{88, 125, 126} und Cholesterol-Oxidase¹²⁷) verminderten. Anschließend untersuchten sie durch den Einsatz von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien, ob und inwiefern Cholesterol einen Einfluss auf den Serotonin_{1A}-Rezeptor ausübt. Dabei hatte sich gezeigt, dass ein verminderter Cholesterol-Gehalt eine Verringerung der spezifischen Radioligand-Rezeptor-Bindung nach sich zieht. Durch einen M β CD-Cholesterol-Komplex konnten sie zuvor entferntes Cholesterol zurückführen und so die spezifische Bindung wieder herstellen (vgl. Kap. 2.2.1 – 2.2.3).^{77, 80, 88, 95, 125-127}

Die Arbeitsgruppe um Klein et al. ging auf die gleiche Weise vor, allerdings konnten sie den Einfluss des Cholesterol-Gehaltes auf die Funktion des Oxytocin-Rezeptors noch nicht direkt mit den „Lipid Rafts“ in Verbindung bringen. Die Publikation ist im Jahre 1995 erschienen, bevor Simons und Ikonen die Existenz der „Lipid Rafts“ im Jahre 1997 postulierten (vgl. Kap. 2.2.1 – 2.2.3).^{25, 63} Sie stellen fest, dass die Veränderung des Cholesterol-Gehaltes eines Meerschweinchen-Myometriums einen modulierenden Effekt auf die Bindungsaffinität des Oxytocin-Rezeptors ausübt.

Gebreselassie et al. verwendeten hingegen eine Sucrose-Dichte-Zentrifugation mit verschiedenen Detergenzien (M β CD und CHAPS), um die „Lipid Rafts“ zu isolieren. Die Fraktionen dieses Gradienten wurden in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit Sigma-1 und Sigma-2-selektiven Radioliganden untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass nur dem Sigma-2-Rezeptor eine Lokalisation in Lipid Rafts zugeschrieben werden konnte (vgl. Kap. 2.9.1.).⁹⁰

Ebenso wie Gebrellassie et al. verwendeten Monastyrskaya et al. sowohl den Sucrose-Dichte-Gradienten als auch M β CD zur Verringerung des Cholesterol-Gehaltes von Mäuse- oder Schweine-Hirn, um den Nachweis der Lokalisation des NK1-Rezeptors in „Plasma Membrane Microdomains“ zu erbringen (vgl. Kap. 2.9.1.).¹¹⁹ Yu et al. haben gezeigt, dass Nogo66-Rezeptoren und der Neurotrophin-Rezeptor (p75) in den „Lipid Rafts“ kolokalisiert sind. Wurden die Rafts durch Cholesterolentzug (M β CD) zerstört, so hatte das zur Folge, dass die Kolokalisation dieser beiden Rezeptoren verloren ging. Diese Abnahme an Nogo66- und Neurotrophin-Rezeptoren könnte sich auf die Signaltransduktion der Nogo66-Rezeptoren auswirken.¹²⁰ Im Prinzip gingen die in Tab. 1-2 genannten Arbeitsgruppen immer auf eine ähnliche Weise vor.

Um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in Zusammenhang mit Caveolae zu bringen, wurde neben dem Sucrose-Gradienten eine weitere Methode eingesetzt. Es wurde z.B. durch Einsatz

spezifischer Antikörper untersucht, ob der Endothelin-Rezeptor mit dem Protein Caveolin kolokalisiert ist.¹²⁹

Der aktivierte cardiale Adenosin-A₁-Rezeptor befindet sich nach Befunden von Lasley et al. nicht in den Caveolae,¹³⁰ diese spielen jedoch bei der Agonist-induzierten Internalisierung des A₁-Rezeptors eine Rolle.^{131, 132} Nicht nur die nukleosidischen P₁-Rezeptoren, sondern auch die nukleotidischen P₂-Rezeptoren (siehe Kap. 1.5.) können in Zusammenhang mit cholesterolreichen Mikrodomänen gebracht werden. Der durch den Liganden ATP stimulierte P₂X₁- und der durch ADP stimulierte P₂Y₁-Rezeptor sind an der Blutplättchen-Aggregation beteiligt. Zerstört man die cholesterolreichen Mikrodomänen, so hat dies zwar einen Einfluss auf die Funktion von P₂X₁- nicht aber von P₂Y₁-Rezeptoren.¹²⁴ Ein ähnlicher Effekt wurde bei der arteriellen Vasokonstriktion, bei der ebenfalls P₂X₁-Rezeptoren beteiligt sind, beobachtet.¹³³ Die Signaltransduktionskaskade des P₂Y₁₂-Rezeptors, der ebenfalls bei der Aggregation von Blutplättchen eine Rolle spielt, und der durch ADP stimuliert wird, findet ebenfalls in „Lipid Rafts statt“.¹²² Allerdings können P₂Y₁₂-Rezeptor-Oligomere durch den aktiven Metaboliten von Clopidogrel zerstört werden, was dazu führt, dass dieser Rezeptor nicht mehr in den „Lipid Rafts“ lokalisiert ist.¹²³ Somit wurde die Annahme von Kaiser et al., dass einige P₂Y-Rezeptoren in „Lipid Rafts“ organisiert sind, bestätigt.¹³⁴ Neben dem P₂X₁-Rezeptor ist ferner der P₂X₃-Rezeptor aus der Familie der P₂X-Rezeptoren, bei denen es sich um Ionenkanal-Rezeptoren handelt, in den cholesterolreichen Mikrodomänen zu finden.¹³⁵

1.5. AUFBAU UND FUNKTION VON G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN

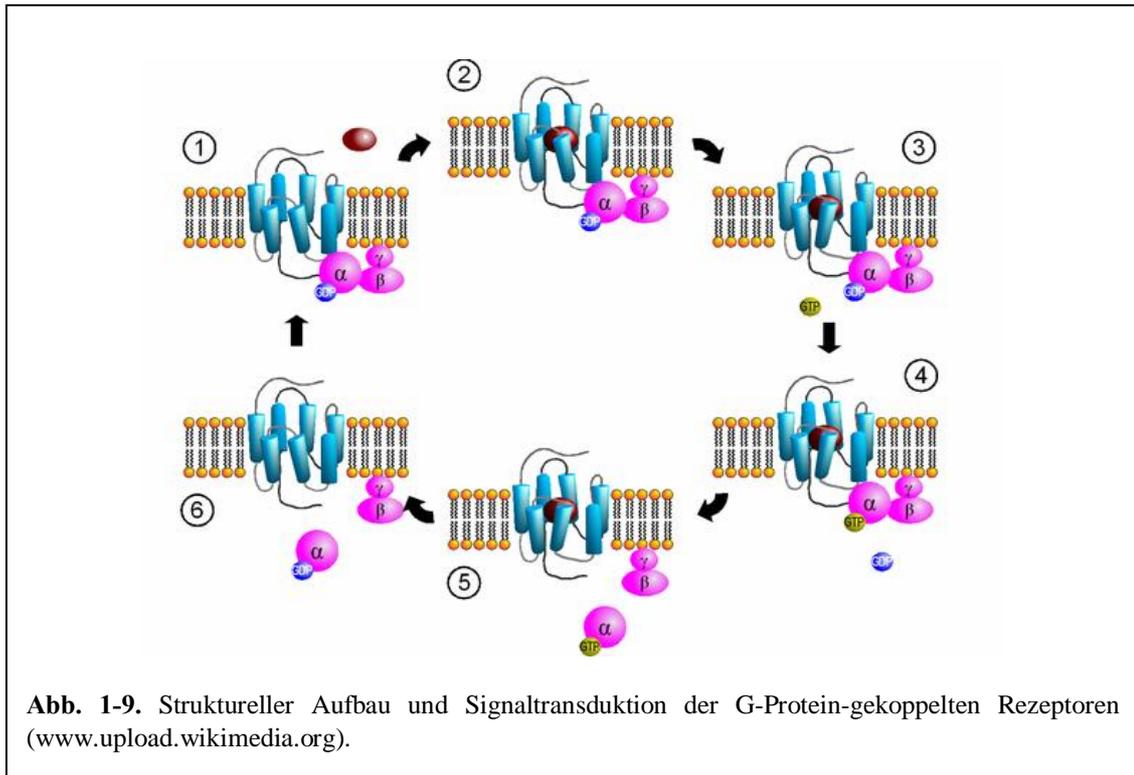
Ein Wirkstoff muss sich an einen Reaktionspartner im Organismus binden, um eine Wirkung hervorzurufen. Dabei handelt es sich bei vielen Arzneistoffen um Proteine, häufig um Rezeptorproteine oder Rezeptoren. Diese verfügen meist über eine spezifische Bindungsstelle, die nur einem bestimmten Überträgerstoff die Anlagerung erlaubt. Infolge dessen ändert sich die Konformation bzw. der Funktionszustand des Rezeptors und die Bindung eines Signalstoffes wird in eine Änderung der Zellfunktion übersetzt. Hinsichtlich des Aufbaus des Rezeptorproteins und der „Signaltransduktion“ lassen sich vier Arten von Rezeptoren unterscheiden: Ligand-gesteuerte Ionenkanäle, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität und DNA-Transkriptions-regulierende Rezeptoren.¹⁶

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) stellen eine der größten Proteinfamilien im Genom der Säugetiere dar.^{136, 137} Beim Menschen sind derzeit über 800 verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Sequenzen bekannt. Aus diesem Grund stellen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermutlich die wichtigsten Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Therapeutika dar und über 30 % der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe wirken bereits über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Sie sind durch das Vorhandensein von sieben α -helikalen transmembranären Helices gekennzeichnet, weshalb sie auch als Sieben-Transmembran-Rezeptoren (7TM) bezeichnet werden.

Obwohl alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren über diese transmembranären Helices verfügen und die Fähigkeit besitzen ein heterotrimeres G-Protein zu aktivieren, unterscheiden sie sich deutlich in ihren Gensequenzen voneinander. Die erste systematische Klassifizierung der GPCR erfolgte Anfang der 1990er Jahre anhand funktioneller Merkmale in die Rezeptorklassen A-F.^{138, 139} Zur Klasse A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören die mit Rhodopsin verwandten Rezeptoren, zu denen auch die Adenosin-Rezeptoren (siehe Kap. 1.6.) gezählt werden. Diese Klasse stellt die größte und somit wichtigste Rezeptorklasse dar. Die Klasse B bezeichnet man auch als „Secretin-ähnliche Rezeptoren“, da die Glycoprotein-Rezeptoren durch große Peptid-Moleküle, wie Secretin und Glucagon aktiviert werden. Die Klasse C wird durch die metabotropen Glutamat-Rezeptoren und die Familie der GABA_B-Rezeptoren repräsentiert. Die Rezeptoren der Klassen D und E fungieren als Pheromon-Rezeptoren in Hefen bzw. als cAMP-Rezeptoren in Nematoden. Die Klasse F spielt eine eher untergeordnete Rolle, da sie die Rhodopsine von Archaeobakterien beinhaltet.^{140, 141}

Ein neues System zur Klassifizierung von GPCR wurde von Fredriksson et al. vorgeschlagen und wird als GRAFS- oder Fredriksson-System bezeichnet. Die Einteilung der Rezeptoren beruht auf phylogenetischen Untersuchungen und es werden 5 Hauptgruppen voneinander

unterschieden: Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, Frizzled/Taste2- und Secretin-Rezeptoren. Die Rhodopsin-Familie beinhaltet mit Abstand die größte Anzahl von Rezeptoren und wird aus diesem Grund weiter in vier Hauptgruppen eingeteilt (α , β , γ , δ), wobei die Adenosin-Rezeptoren zur α -Gruppe gezählt werden.^{142, 143}



Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besitzen einen extrazellulären N-Terminus, drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen und einen intrazellulären C-Terminus.¹⁴⁴ Die Helices sind kreisförmig angeordnet und enthalten in der Mitte eine von außen zugängliche Tasche, in deren Tiefe sich die Bindungsstelle des Überträgerstoffes befindet. Die Signaltransduktion geschieht unter Vermittlung eines Guanylnucleotid-bindenden Proteins (G-Protein), welches aus drei Untereinheiten α , β und γ , die sich an der Innenseite der Zellmembran befinden, zusammensetzt (siehe Abb. 1-9). Die α -Untereinheit hat im Ruhezustand GDP gebunden (Schritt 1). Die Bindung eines Agonisten führt zu einer Umstrukturierung der α -helikalen Transmembran-Domänen und resultiert somit in einer Konformationsänderung des Rezeptors (Schritt 2). Der Rezeptor kann nun mit der α -Untereinheit des G-Proteins interagieren und bewirkt eine Abschwächung der Affinität der α -Untereinheit für GDP, welches gegen GTP ausgetauscht wird (Schritt 3 bis 4). Die GTP-tragende Untereinheit dissoziiert von der $\beta\gamma$ -Untereinheit ab und bewegt sich entlang der Zellmembran, um mit den dort lokalisierten Effektorsystemen zu interagieren (Schritt 5). Die Reaktion wird beendet, indem die α -Untereinheit, welche GTPase-

Aktivität besitzt, das GTP zu GDP und anorganischem Phosphat spaltet. Die nun wieder GDP-tragende Untereinheit löst sich vom Zielprotein ab, reassoziert mit einer $\beta\gamma$ -Untereinheit und kehrt somit in den inaktiven Zustand zurück (Schritt 6).

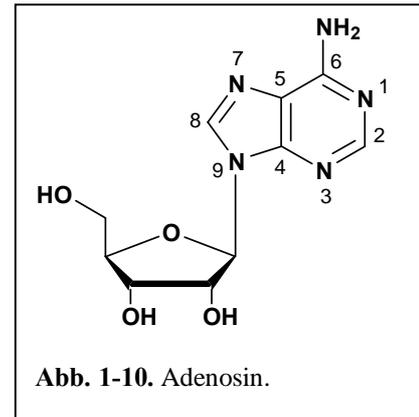
Die α -Untereinheit des G-Proteins ist verantwortlich für die spezifische Aktivierung der nachgeschalteten Effektorsysteme. Da es signifikante Unterschiede in der Struktur der einzelnen α -Untereinheiten gibt, werden die G-Proteine basierend auf der Sequenz der α -Untereinheiten in verschiedene G-Protein-Familien eingeteilt (siehe Tab. 1-3).^{16, 114, 115}

Tab. 1-3. Klassifizierung der G-Proteine nach den verschiedenen α -Untereinheiten.^{16, 114, 115}

Untereinheit	Effektorprotein/Funktion
G_t	Stimulation der Phosphodiesterase (PDE6)
G_s	Stimulation der Adenylatcyclase (AC), cAMP \uparrow
G_{olf}	Stimulation der Adenylatcyclase (AC) des Riechepithels, cAMP \uparrow
$G_{i/o}$	Inhibition der Adenylatcyclase (AC), cAMP \downarrow Aktivierung spannungsabhängiger Ionenkanäle, z.B. K^+ Hemmung spannungsabhängiger Ionenkanäle, z.B. Ca^+
$G_{q/11/14/15/16}$	Stimulation der Phospholipase C (PLC), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) \uparrow und Diacylglycerol (DAG) \uparrow
$G_{12/13}$	Aktivierung des Proteins Rho

1.6. ADENOSIN-REZEPTOREN

Das Nukleosid Adenosin ist im Körper weit verbreitet und an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen beteiligt. Unter anderem entfaltet es seine Effekte als physiologischer Agonist an membranständigen Rezeptorproteinen, den Adenosin-Rezeptoren, die zur Gruppe der Purin-Rezeptoren gezählt werden.¹⁴⁵ Innerhalb dieser Gruppe unterscheidet man zwei große Familien, die P1-Rezeptoren (Nukleosid-Rezeptoren) und die P2-Rezeptoren (Nukleotid-Rezeptoren), wobei die Adenosin-Rezeptoren aufgrund ihres endogenen Liganden zu den P1-Rezeptoren gehören. Bei den Adenosin-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Sie werden anhand ihrer pharmakologischen Eigenschaften in vier Subtypen, die Adenosin-A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren, unterteilt.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷



Ursprünglich wurden die Adenosin-Rezeptoren Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts nach ihrer inhibitorischen bzw. stimulierenden Wirkung auf die Adenylatcyclase in Adenosin-A₁- und A₂-Rezeptoren eingeteilt. Basierend auf der Entdeckung von hochaffinen A₂-Rezeptoren im Rattens triatum und niedrigaffinen, im Gehirn weit verbreiteten A₂-Rezeptoren, die beide in der Lage waren, die Adenylatcyclase zu stimulieren, wurden die A₂-Rezeptoren 1983 in zwei Subtypen klassifiziert. Dabei wurde der hochaffine A₂-Rezeptor als A_{2A}- und der niedrigaffine als A_{2B}-Rezeptor bezeichnet. In den frühen 90er Jahren wurde schließlich der vierte Adenosin-Rezeptor-Subtyp, der Adenosin-A₃-Rezeptor, identifiziert und kloniert, der ebenso wie der A₁-Subtyp eine Inhibition der Adenylatcyclase vermittelt. Der endogene Ligand Adenosin bindet mit hoher Affinität an Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren, wohingegen die Aktivierung von Adenosin-A_{2B}- und A₃-Rezeptoren in der Regel erst in Gegenwart höherer Adenosin-Konzentrationen im mikromolaren Bereich erfolgt.¹⁴⁵

Alle Adenosin-Rezeptor-Subtypen können über ein G-Protein an die Adenylatcyclase (AC) als Effektorprotein gekoppelt sein, aber sie besitzen z.T. gegensätzliche Wirkungen (siehe Tab. 1-4). A₁- und A₃-Rezeptoren sind über ein inhibitorisches G-Protein (G_i) an die Adenylatcyclase gekoppelt, wobei es zu einer Inhibition dieses Enzyms verbunden mit einer Senkung des cAMP-Spiegels kommt.¹⁴⁶ Ein G₀-Protein oder auch „anderes („other“) Protein“ genannt führt hingegen über die Freisetzung der βγ-Untereinheit unter anderem zur Hemmung bzw. Aktivierung von Ionenkanälen. Die Aktivierung der Phospholipase C durch Stimulation eines G_{q/11}-gekoppelten Rezeptors resultiert in der Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

(PIP₂) zu den Botenstoffen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ stimuliert anschließend die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern, aktiviert zusammen mit DAG das Enzym Proteinkinase C (PKC) und bewirkt die Phosphorylierung weiterer Proteine. Die beiden verschiedenen α -Untereinheiten der G-Proteine G_q und G₁₁ aktivieren jeweils unterschiedliche Isoenzyme der Phospholipase C.¹¹⁴

Tab. 1-4. Pharmakologisches Profil der Adenosin-Rezeptoren.^{145, 148, 149}

Adenosin-Rezeptoren				
Subtyp	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
G-Protein	G _i /G ₀	G _s /G _{olf}	G _s /G _q	G _i /G _q
Effektorprotein/Funktion	cAMP ↓ K ⁺ ↑ Ca ²⁺ ↓	cAMP ↑	cAMP ↑ IP ₃ ↑	cAMP ↓ IP ₃ ↑

A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren bewirken über die Stimulation der Adenylatcyclase (G_s- oder G_{olf}-gekoppelt) einen Anstieg des cAMP-Spiegels.¹⁴⁶ Der in dieser Kaskade aus ATP entstandene Botenstoff cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) kann abhängig von seiner Konzentration das Enzym Proteinkinase A (PKA) aktivieren, welches zu weiteren biologischen Effekten führt. G_{olf} wird häufig auch als olfaktorisches G-Protein bezeichnet und stimuliert u.a. die AC des Riechepithels.¹¹⁴

Tab. 1-5. Übersicht über die Purin- und Pyrimidin-Rezeptoren.^{145, 148, 149}

P1-Rezeptoren (Adenosin-Rezeptoren) (Nukleosid-Rezeptoren)	P2-Rezeptoren (Nukleotid-Rezeptoren)
Subtypen:	Subtypen:
A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃	P2X ₁₋₇
(G-Protein-gekoppelte Rezeptoren)	(Ligand-gesteuerte Ionenkanäle)
	P2Y ₁₋₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁₋₁₄
	(G-Protein-gekoppelte Rezeptoren)

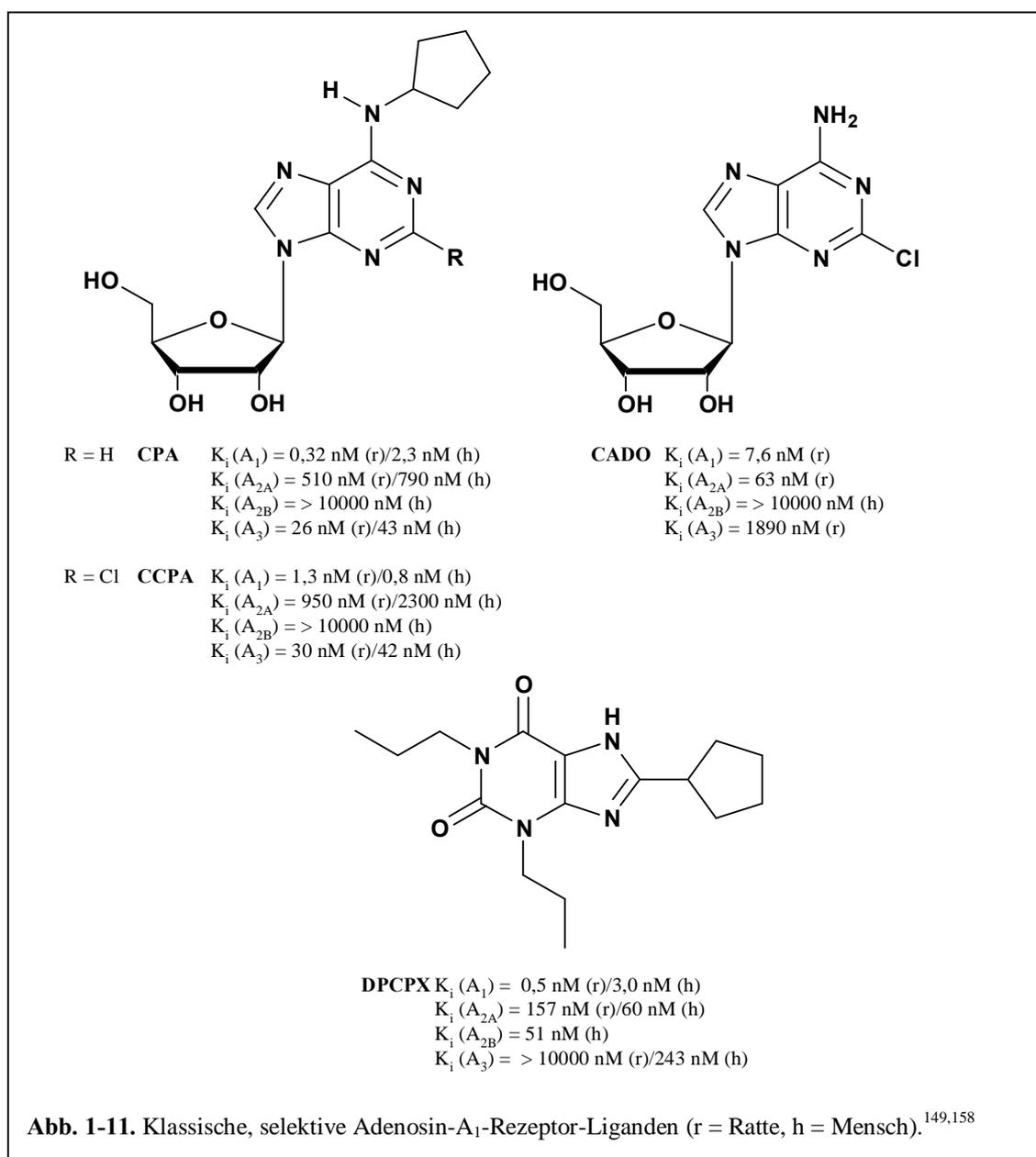
Während die P1-Rezeptoren nur das Adenosin als endogenen Agonisten besitzen, weist die Familie der P2-Rezeptoren eine Vielzahl von Nukleotiden und Dinukleotiden auf, die agonistische Wirkung auf diese Rezeptoren haben können. Dabei handelt es sich um ADP, ATP, UDP, UTP, UDP-Glukose und Adenin-Dinukleotide, wie z.B. Ap₄A.^{146, 150} Bei den P2-Rezeptoren unterscheidet man anhand von Signaltransduktionswegen zwei Gruppen von

Rezeptoren. Bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um Ligand-gesteuerte Ionenkanäle (Agonist: ATP), bei den P2Y-Rezeptoren um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Agonisten: verschiedene Nukleotide, je nach Subtyp).¹⁴⁶

Über die Existenz eines weiteren Nukleosid-Rezeptors für Guanosin wird derzeit diskutiert.¹⁵¹ Die kürzlich identifizierten und klonierten Adenin-Rezeptoren lassen sich ebenfalls in die Gruppe der Purin-Rezeptoren einordnen (siehe Kap. 2.8.) und wurden von Brunschweiler und Müller als P0-Rezeptoren bezeichnet.¹⁵²⁻¹⁵⁵

1.6.1. ADENOSIN-A₁-REZEPTOREN

Der Adenosin-A₁-Rezeptor ist der am besten untersuchte Adenosin-Rezeptor. Er ist ubiquitär im zentralen Nervensystem zu finden und wird vor allem in der Hirnrinde (Cortex), im Cerebellum und im Hippocampus in hoher Dichte exprimiert. Des Weiteren ist eine ausgeprägte Expression der A₁-Rezeptoren im Rückenmark, im Auge, in den Drüsen der Nebenniere und in den Herzvorhöfen zu finden.¹⁴⁵ Die pharmakologische Forschung auf dem Gebiet der Adenosin-Rezeptoren hat in den letzten Jahrzehnten viele Anhaltspunkte geliefert, dass diese Rezeptoren in zahlreiche Krankheitsprozesse involviert sind (siehe Kap. 3.1.) und damit viel versprechende Zielstrukturen für Arzneistoffe darstellen.¹⁵⁶



Bis heute wurden zahlreiche Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten identifiziert. Dabei leiten sich die Agonisten strukturell vom physiologischen Agonisten Adenosin ab, während sich viele Antagonisten an der Struktur der Xanthin-Derivate (Coffein und Theophyllin) orientieren.^{148, 149, 157-162}

CPA (*N*⁶-Cyclopentyladenosin), **CCPA** (2-Chlor-*N*⁶-cyclopentyladenosin) und **CADO** (2-Chloradenosin) stellen die klassischen Vertreter der A₁-Agonisten dar, während **DPCPX** (1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthin) einen Prototyp der A₁-Antagonisten darstellt (siehe Abb. 1-11). [³H]CCPA und [³H]DPCPX werden als Standard-Radioliganden in *in-vitro*-pharmakologischen Studien u.a. zur Charakterisierung von Liganden eingesetzt.¹⁶³⁻¹⁶⁵

1.6.2. ADENOSIN-A_{2A}-REZEPTOREN

Die A_{2A}-Rezeptoren sind in hoher Dichte im Striatum (Nucleus accumbens, Caudate-Putamen, Tuberculum olfactorium) enthalten, während sie in anderen Gehirnregionen kaum zu finden sind. Des Weiteren ist dieser Rezeptor in der Milz, in der Thymusdrüse, in den Leukozyten (Lymphozyten und Granulozyten) und in den Blutplättchen hoch exprimiert. Der A_{2B}-Rezeptor kommt nur in geringer Dichte, jedoch ubiquitär im Gehirn vor. Dies trifft auch auf den Adenosin-A₃-Rezeptor zu.

Striatale Neuronen exprimieren A_{2A}-Rezeptoren zusammen mit Dopamin-D₂-Rezeptoren und eine Stimulierung von A_{2A}-Rezeptoren bewirkt eine Verringerung der dopaminergen Neurotransmission, was sie im Hinblick auf Morbus Parkinson zu attraktiven Arzneistoff-Targets macht (siehe Kap. 1.6.4.).^{166, 167}

Bei der Mehrheit der bereits identifizierten Adenosin-A_{2A}-Agonisten handelt es sich einerseits um Adenosin-Derivate, die in Position 2 substituiert sind, andererseits ist eine Modifikation der 5'-Position der Ribose durch eine N-Alkylcarboxamido-Funktion möglich, wie im Falle von **NECA** (N-Ethylcarboxamidoadenosin). Der erste potente A_{2A}-selektive Agonist war **CGS21680**, ein **NECA**-Derivat, welches in Position 2 mit einer Phenylethylamino-Funktion substituiert ist (siehe Abb. 1-12).^{149, 162}

Xanthin-Derivate, wie **MSX-2** (3-(3-Hydroxypropyl)-8-*m*-methoxystyryl)-7-methyl-1-propargylxanthin), oder Nicht-Xanthin-Derivate, wie **ZM241385** (4-(2-((7-Amino-2-(furyl)-1,2,4-triazolo[2,3-*a*]-1,3,5-triazin-5-yl)amino)ethyl)phenol), stellen A_{2A}-selektive Antagonisten dar.^{159, 161, 168} Sie werden in tritiiertem Form neben dem Agonist-Radioliganden [³H]CGS21680, als Standard-Radioliganden in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien eingesetzt.¹⁶⁹⁻¹⁷³ [³H]NECA wird aufgrund mangelnder Selektivität in Bindungsstudien an Adenosin-A_{2A}-

Rezeptoren in Anwesenheit einer A_1 -blockierenden Substanz verwendet.¹⁷⁴

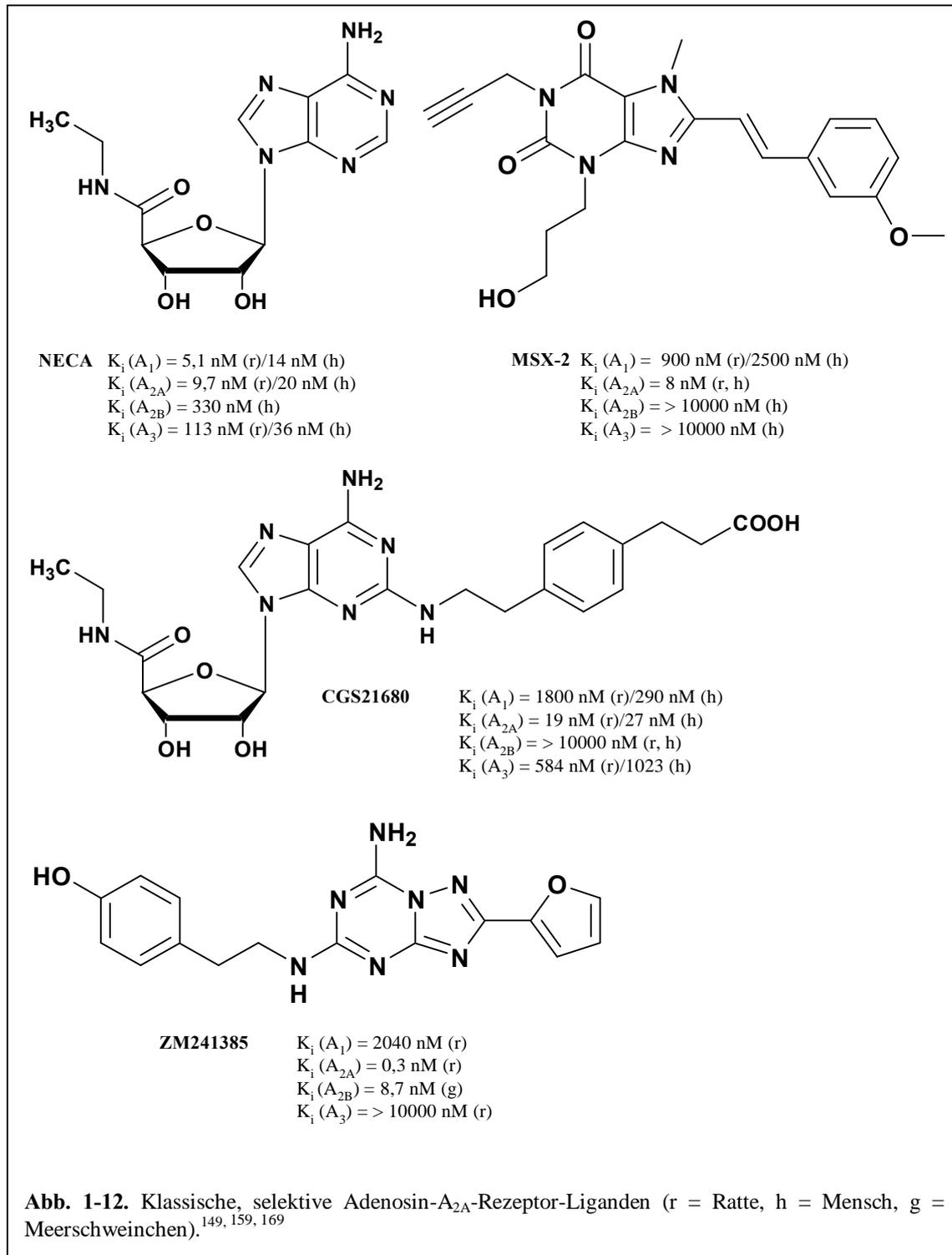


Abb. 1-12. Klassische, selektive Adenosin- A_{2A} -Rezeptor-Liganden (r = Ratte, h = Mensch, g = Meerschweinchen).^{149, 159, 169}

1.7. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DER CHOLESTEROL-KONZENTRATION IM KÖRPER UND DEM AUFTRETEN VON ERKRANKUNGEN

1.7.1. HYPERLIPOPROTEINÄMIE

Zwar ist Cholesterol als Bestandteil aller eukaryotischen Plasma-Membranen für das Wachstum und die Funktionsfähigkeit der Zellen höherer Organismen unerlässlich, aber eine hohe Cholesterol-Konzentration im Serum ist die Ursache für viele Krankheiten. Eine Zunahme der Cholesterol-Konzentration im Blut bedeutet in der Regel einen Anstieg des LDL-Spiegels, eine Zunahme der Triglycerid-Konzentration und einen Anstieg des VLDL-Spiegels. Eine pathologische Erhöhung der LDL-Konzentration ist von einem gesteigerten Risiko für koronare Herzerkrankungen als Ausdruck einer arteriosklerotischen Gefäßerkrankung begleitet. Auch bei erniedrigter HDL-Konzentration ist das Arteriosklerose-Risiko erhöht.

So können Hyperlipoproteinämien mit einem erhöhten Krankheitsrisiko einhergehen und werden als behandlungsdürftig betrachtet. Pathogenetisch ist zu unterscheiden zwischen den genetisch bedingten, seltenen, primären Formen und den viel häufigeren sekundären Hyperlipoproteinämien, die auftreten können bei verschiedenen Grunderkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, Hypothyreose oder bei Überernährung. Bei der genetisch bedingten familiären Hypercholesterinämie fehlen funktionsfähige Rezeptoren, so dass LDL nicht mehr ausreichend von den Zellen inkorporiert werden kann (siehe Kap. 1.7.2.).¹⁷⁵ Unter diesen Bedingungen nehmen dann Makrophagen LDL-Partikel in größerem Ausmaß auf. Diese Makrophagen („Schaumzellen“) sollen zur Ausbildung der Arteriosklerose beitragen. In Haut und Sehnen können Cholesterolknoten, sog. Xanthome, auftreten.

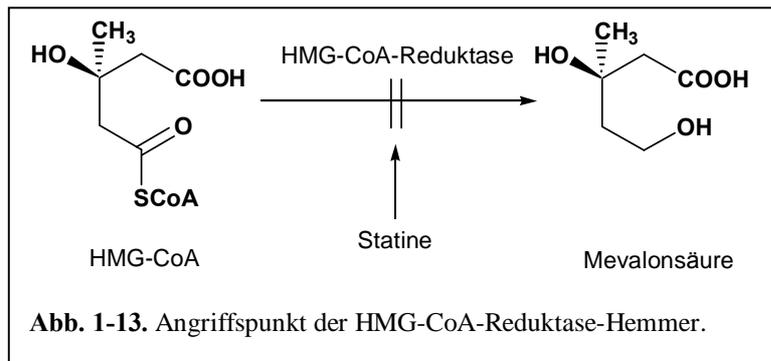
Therapeutisch kann neben einer Gewichtsreduktion, sofern Übergewicht vorliegt, durch den Einsatz von „lipidsenkenden“ Pharmaka interveniert werden.^{13, 16}

1.7.2. EINSATZ VON STATINEN ALS HEMMSTOFFE DER CHOLESTEROL-SYNTHESE

Wie bereits in Kap. 1.1. ausführlich dargestellt, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cholesterol-Synthese die Überführung der aktivierten 3-Hydroxy-3-methyl-glutarsäure (HMG-CoA) in die Mevalonsäure. Dieser Schritt wird von der HMG-CoA-Reduktase katalysiert. Das Enzym kann durch Substanzen, die dem Substrat strukturell ähnliche Gruppen enthalten, gehemmt werden. Infolge der verminderten Cholesterol-Synthese durch die Reduktase-Hemmstoffe steigt die Ausstattung der Leberzellen mit LDL-Rezeptoren, so dass vermehrt LDL-Cholesterol aus dem Blut aufgenommen werden kann. Die Dichte der membranständigen LDL-Rezeptoren nimmt mit steigendem Cholesterol-Gehalt der Zellen im Sinne einer negativen

Rückkopplung ab.

Beim LDL-Rezeptor handelt es sich um einen transmembranären Rezeptor mit fünf

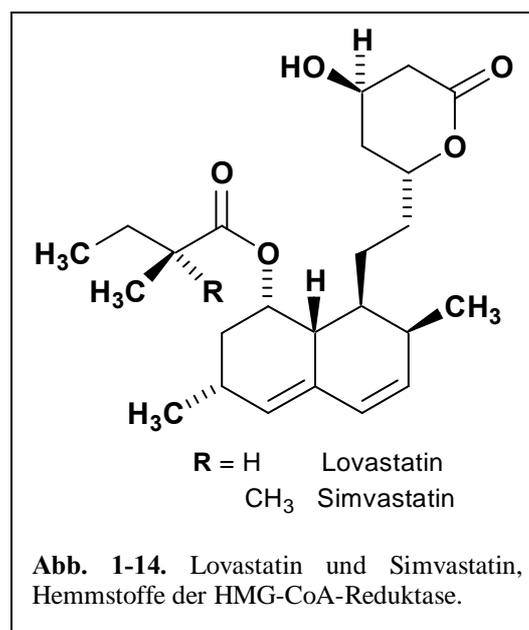


verschiedenen funktionellen Domänen. LDL bindet an diesen spezifischen Rezeptor und der Rezeptor-LDL-Komplex wird durch Endozytose aufgenommen. Die entstandenen LDL-haltigen Endocytosevesikel

verschmelzen anschließend mit den Lysosomen, die zahlreiche Verdauungsenzyme enthalten. Der LDL-Rezeptor selbst kehrt meistens unversehrt in die Plasma-Membran zurück.¹⁷⁶

Neben den Statinen, die Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase darstellen, stehen noch weitere Pharmaka mit Cholesterolspiegel-senkender Wirkung zur Verfügung. Hier ist zu unterscheiden zwischen systemischen Wirkstoffen, die direkt in den Cholesterol-Stoffwechsel eingreifen und solchen, die die für den Cholesterol-Transport verantwortlichen Lipoproteine beeinflussen,

sowie nicht absorbierbaren Stoffen, die den enterohepatischen Kreislauf von Cholesterol modifizieren. Zu den zuerst eingeführten HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoffen gehören Lovastatin und Simvastatin. Es handelt sich dabei um Vorstufen, aus denen nach oraler Applikation in der Leber der eigentliche Wirkstoff durch Aufspaltung des Lacton-Ringes entsteht. Durch Hydrolyse wird eine β -Hydroxysäure gebildet, die Ähnlichkeit mit dem Substrat der HMG-CoA-Reduktase aufweist. Die aktiven Metabolite von Lovastatin und Simvastatin besitzen eine höhere Affinität zur HMG-CoA-



Reduktase als das physiologische Substrat, so dass dieses vom Enzym verdrängt wird. Je nach Auswahl und Dosierung der einzelnen Statine kann das Gesamtcholesterol um 20-35 %, das LDL-Cholesterol um 20-40 % gesenkt werden. Für HDL-Cholesterol ist eine Zunahme von max. 10 % möglich.¹⁷⁷

In ausgedehnten klinischen Studien hat sich die Anwendung der Cholesterol-Synthese-Hemmer

zur Senkung der Hypercholesterinämie überzeugend darstellen lassen. Als Folge dieses Effektes konnte eine Prävention koronarer Herzerkrankungen demonstriert werden. Die Statine haben sich außerdem zur Prävention von Reinfarkten sowie zur „Offenhaltung“ von koronaren Bypässen als günstig erwiesen.¹⁶ Aktuelle Daten von epidemiologischen Studien legen eine Schutzwirkung von Statinen bei Alzheimer-Demenz nahe (siehe Kap. 1.7.3.).¹⁷⁸ Des Weiteren belegen mehrere klinische Studien, dass Statine zerebrovaskuläre Ereignisse, wie z.B. Schlaganfall, signifikant senken. Es wurde unter anderem gezeigt, dass Statine aufgrund pleiotroper Effekte die Bildung der NO-Synthase im Endothel der Blutgefäße stimulieren. Dieses Enzym produziert in den Gefäßwandzellen des Gehirns unter anderem den Botenstoff Stickstoffmonoxid, der zu einer Relaxation der Blutgefäße führt. Ferner sind Statine bei Multipler Sklerose (MS) therapeutisch wirksam, was *In-vivo*- und auch *In-vitro*-Studien mit MS-Tiermodellen und humanen Immunzellen gezeigt haben.^{179, 180}

1.7.3. MORBUS ALZHEIMER

1.7.3.1. PATHOPHYSIOLOGIE UND VERLAUF DES MORBUS ALZHEIMER

Die Alzheimer'sche Krankheit gehört zur wichtigsten Form der primär degenerativen Demenz. Die dementiellen Symptome können aufgrund unterschiedlicher morphologischer Veränderungen entstehen. Mit einer Prävalenz von rund 5 % in der Altersgruppe ab 65 Jahren und bis zu 30 % in der Altersgruppe ab 85 Jahren stellt Morbus Alzheimer die häufigste Demenzform dar. Sie verläuft chronisch progredient mit einer durchschnittlichen Dauer von ca. 4-8 Jahren nach „gesicherter“ Diagnose. Erste Symptome zeigen sich in Form von langsam einsetzenden neuropsychologischen Defiziten, wie Merkfähigkeitsstörungen, Beeinträchtigung des abstrakten Denkens, gestörtem Urteilsvermögen, Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus und Persönlichkeitsveränderungen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung treten Sprachdefizite, Orientierungsprobleme, Störungen des Gangbildes und selbst einfacher Handlungsabläufe sowie Kontinenzprobleme hinzu. Im terminalen Stadium sind die Patienten nicht mehr in der Lage, einfachste Verrichtungen durchzuführen und sind vollständig pflegebedürftig.¹⁸¹

Die Symptome werden durch eine fortschreitende Degeneration der Hirnrinde hervorgerufen, die das Gewicht des Gehirns um rund 20 % verringern kann und bei der bis zu einem Drittel der normalen cholinergen Neuronen verloren gehen können. Durch den Einsatz von Cholinesterase-Hemmstoffen, wie dem Donepezil, lässt sich die kognitive Wirkung bei Patienten leicht verbessern. Neben „oxidativem Stress“ sollen eine lokale Entzündung und eine überschießende Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zur Degeneration der cholinergen Neuronen beitragen. Für

den NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin wurde ebenfalls eine Verzögerung der Progredienz nachgewiesen. Die Prognose für die Patienten bleibt aber weiterhin schlecht.¹¹⁵

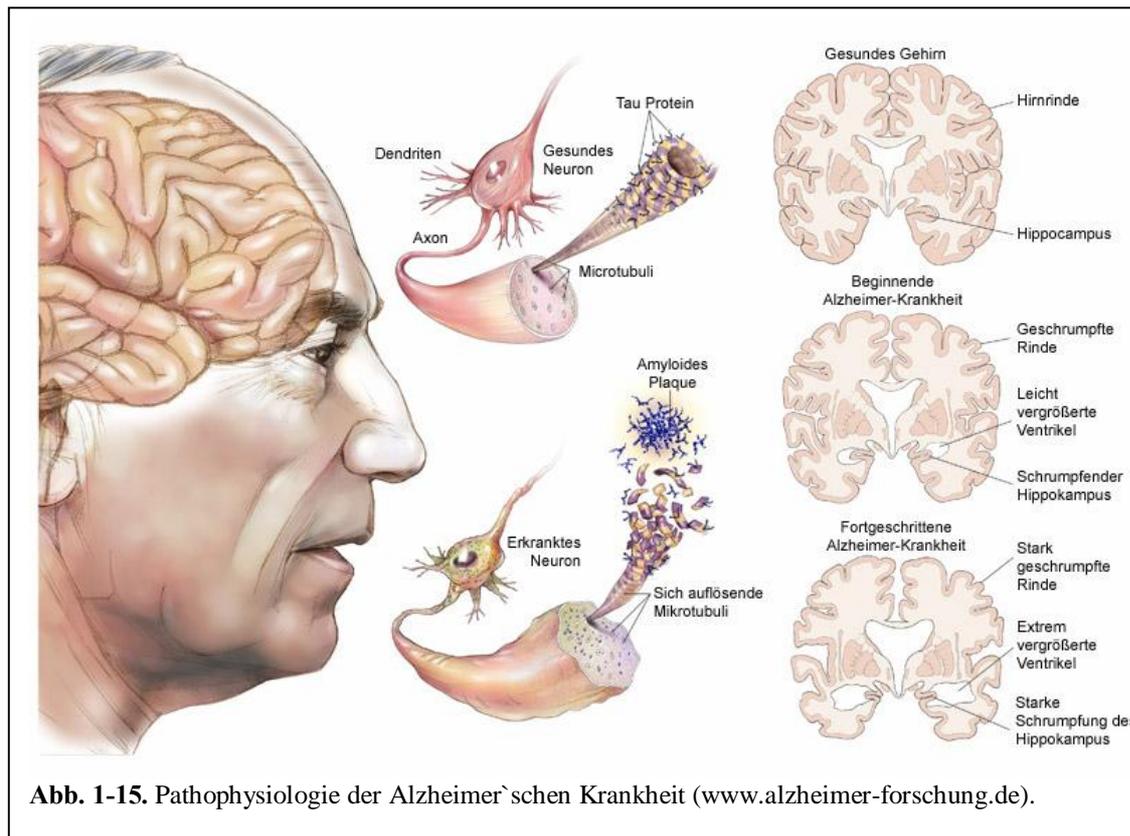


Abb. 1-15. Pathophysiologie der Alzheimer'schen Krankheit (www.alzheimer-forschung.de).

Mitverantwortlich für den der Erkrankung zugrunde liegenden Zelluntergang ist das β -Amyloid-Peptid ($A\beta$),¹⁸² welches aus einem größeren Amyloid-Vorläuferprotein (APP) gebildet wird, das in Zellmembranen vieler Zellen im menschlichen Körper vorkommt.¹⁸³ Das β -Amyloid-Peptid lagert sich extrazellulär als senile Plaques in kortikalen und subkortikalen Strukturen des Gehirns ab.¹⁸⁴ Neben den Plaques zeigen sich im Gehirn eines Alzheimer-Patienten fibrilläre Ablagerungen, die neurofibrillären Tangles, die im Wesentlichen aus dem Tau-Protein bestehen. Das Tau-Protein aggregiert zu Fibrillen, wenn es stärker als normal phosphoryliert ist (Hyperphosphorylierung).¹⁸⁵ Neben der extrazellulären β -Amyloid-Ablagerung scheint auch intraneuronal gebildetes β -Amyloid von Bedeutung zu sein. APP wird von Sekretasen gespalten, wodurch es zur Freisetzung des $A\beta$ -Peptids aus dem Vorläuferprotein kommen kann. Dabei unterscheidet man zwischen dem nicht-amyloiden und dem amyloiden Weg. Wird APP durch eine α -Sekretase gespalten, findet der Schnitt innerhalb des APP statt, der $A\beta$ enthält. $A\beta$ wird auf diese Weise nicht gebildet. Durch die Spaltung des APP durch eine β -Sekretase und nachfolgend durch eine γ -Sekretase, kommt es zur Freisetzung von $A\beta$.¹⁸⁶ Es werden zwei Isoformen des $A\beta$ gebildet, $A\beta_{40}$ und das um zwei Aminosäuren längere $A\beta_{42}$. $A\beta_{42}$ stellt den

Risiko-Faktor für die Alzheimer'sche Krankheit dar.¹⁸⁰

Seit im Jahre 1906 der Arzt Alois Alzheimer an der Patientin Auguste Deter erstmals diese Erkrankung als physiologischen, nicht psychologischen Ursprungs diagnostizierte, beschäftigt sich die Forschung mit der ursächlichen Entstehung dieses neurotoxischen β -Amyloid-Peptids. Den ersten Hinweis, dass Cholesterol an diesem Prozess beteiligt ist, lieferte die Tatsache, dass Träger der ApoE4-Isoform des ApoE-Genes ein größeres Risiko haben, an Alzheimer zu erkranken, als solche, die das ApoE2- oder ApoE3-Allel tragen.¹⁸⁷ Ein Lipoprotein, welches Cholesterol und Triglyceride in Körperflüssigkeiten transportiert, ist aus einer Hülle aus polaren Lipiden und Apolipoproteinen umgeben (siehe Kap. 1.2.). Zehn Hauptapolipoproteine wurden isoliert und charakterisiert: A1, A2, A4, B48, B100, C1, C2, C3, D und E. VLDL-Partikel werden von ApoB100 und ApoE stabilisiert,¹³ aus welchen über eine Zwischenstufe die cholesterolreichen LDL-Partikel gebildet werden. Die Anwesenheit der ApoE4-Allele geht mit einem erhöhten Serum-Cholesterol-Spiegel der Alzheimer-Patienten einher¹⁸⁸ und es wurde gezeigt, dass ApoE4 und somit ein erhöhter Cholesterol-Gehalt im Gehirn die Bildung von A β -Fibrillen fördert.^{189, 190} Allerdings ist unabhängig vom Genotyp des Apolipoproteins ein hoher LDL-Cholesterol- und ein niedriger HDL-Cholesterol-Gehalt mit einem Risiko an Alzheimer zu erkranken assoziiert.¹⁹¹ Interessant ist zudem die Entdeckung, dass der Cholesterol-Gehalt in der Plasma-Membran mit zunehmendem Alter ansteigt.¹⁹² Somit scheint Cholesterol bei Alzheimer eine wichtige Rolle zu spielen.^{178, 193, 194}

1.7.3.2. STATINE ALS THERAPEUTISCHER ANSATZ BEI MORBUS ALZHEIMER

Der Zusammenhang zwischen Cholesterol und der Alzheimer'schen Krankheit stieß auf wachsendes Interesse, könnten doch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) bei dieser Krankheit Einsatz finden.¹⁹⁵⁻¹⁹⁸ Es wird angenommen, dass die Bildung des β -Amyloid-Peptid (A β) aus dem größeren Amyloid-Vorläuferprotein (APP) in den cholesterolreichen Mikrodomänen (siehe Kap. 1.4.) stattfindet.^{199, 200} Eine Veränderung des Cholesterol-Gehaltes soll ferner einen Einfluss auf die Verteilung der an der Spaltung des APP beteiligten Enzyme haben. Des Weiteren sollen die Rafts am Abbau der β -Amyloid-spaltenden Enzyme beteiligt sein.^{201, 202}

Ausgedehnte Studien haben gezeigt, dass durch den Einsatz von Statinen das Risiko an Alzheimer zu erkranken um 70 % vermindert ist, allerdings nur bei jüngeren Probanden (65-79 Jahre).^{203, 204} Dabei wurden Patienten-Daten im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Medikamenten, speziell auf LLA (Lipid Lowering Agents), und einer Erkrankung an Alzheimer miteinander verglichen.^{203, 204} Die Gabe von Simvastatin verringerte

z.B. die Konzentration der β -Amyloid-Peptide A β 40 und A β 42 *in-vitro* und *in-vivo*²⁰⁵ und auch den Cholesterol-Turnover im menschlichen Gehirn (siehe Kap. 1.3.).²⁰⁶

Der Gehalt von 24-S-Hydroxycholesterol, einem Metaboliten des Cholesterols (siehe Kapitel 1.3.),^{21, 22} wurde bei 18 Patienten, bei denen eine Hypercholesterinämie diagnostiziert worden war und die mit Simvastatin behandelt wurden, enzymatisch bestimmt.²⁰⁶ Es hat sich gezeigt, dass die Konzentration von 24-S-Hydroxycholesterol im Plasma von Alzheimer-Patienten erhöht ist.^{4, 24} Der Plasma-24-S-Hydroxycholesterol-Spiegel scheint dabei mit der Schwere der Demenz von Alzheimer-Patienten zu korrelieren.²⁴

An dieser Stelle muss allerdings zwischen Statinen unterschieden werden, denen es aufgrund ihrer Lipophilie möglich ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (z.B. Lovastatin, Simvastatin) und solchen, denen eine Passage durch die Blut-Hirn-Schranke wegen der ausgeprägten Hydrophilie verwehrt ist (z.B. Atorvastatin, Fluvastatin).^{207, 208} Allerdings wird davon ausgegangen, dass Statine womöglich eher zur Vorbeugung als zur Heilung einer Alzheimer-Demenz nützlich sind.¹⁹⁶

Eine andere Arbeitsgruppe wies hingegen nach, dass die Bildung des β -Amyloid-Peptid durch die Gabe von Statinen nicht vermindert werden konnte.²⁰⁹ Bei weibliche Mäusen induzierten Statine sogar eine Degeneration von Neuronen, die mit einer Erhöhung der β -Amyloid-Peptid-Produktion einherging.²¹⁰ Somit bedarf es noch weiterer Untersuchungen, ob Statine bei der Behandlung bzw. Vorbeugung von Morbus Alzheimer eingesetzt werden können.²¹¹

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der unselektive Adenosin-Rezeptor-Antagonist Coffein und der A_{2A}-selektive Adenosin-Rezeptor-Antagonist ZM241385 die Aggregation des β -Amyloid-Peptids reduzieren. Der neuronale Zelltod, der durch Inkubation von kultivierten neutrophilen Granulozyten des Ratten-Cerebellums mit einem Fragment des β -Amyloid-Proteins verursacht worden ist, konnte durch die Antagonisten verhindert werden.²¹²

1.7.4. MORBUS PARKINSON

1.7.4.1. PATHOPHYSIOLOGIE DES MORBUS PARKINSON

Das Parkinson-Syndrom, an dem in Deutschland ca. 3 % aller mehr als 70-Jährigen leiden, ist die häufigste Erkrankung der Basalganglien. Dieses Syndrom wurde nach James Parkinson, der es im Jahre 1817 zum ersten Mal beschrieben hatte, benannt. Man unterscheidet zwischen zwei Arten der Erkrankung, dem weitaus häufigeren primären (idiopathischen) Syndrom, bei dem die Herkunft unbekannt ist, und dem sekundären (symptomatischen) Syndrom, das als Folge von Atherosklerose der Hirngefäße, Enzephalitiden (Hirnentzündungen), Traumen, Vergiftungen

oder Tumoren auftritt. Ein medikamentös bedingtes Parkinson-Syndrom, z.B. durch die Einnahme von Neuroleptika, ist reversibel. Die bei Drogen-Konsumenten gelegentlich auftretenden irreversiblen Parkinson-Syndrome sind auf Verunreinigungen mit MPTP (Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) zurückzuführen.²¹³ Die Entdeckung, dass MPTP als Neurotoxin wirkt und vorzugsweise einen Effekt auf dopaminerge Neuronen in der *Substantia nigra* (Pars compacta) ausübt, machte es zum wichtigsten und meist verwendeten Toxin in Parkinson-Tiermodellen. Die Toxizität dieser Verbindung beruht auf der enzymatischen Oxidation durch das Enzym Monoaminoxidase B zum 1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion MPP⁺.²¹⁴⁻²¹⁶

Unabhängig von der Ursache liegt dem Parkinson-Syndrom in den meisten Fällen (Ausnahme: Neuroleptika-Einnahme) eine beidseitige Degeneration der von der *Substantia nigra* (Pars compacta) zum Corpus Striatum ziehenden dopaminergen Neuronen zugrunde.

Als Folge davon kommt es zu

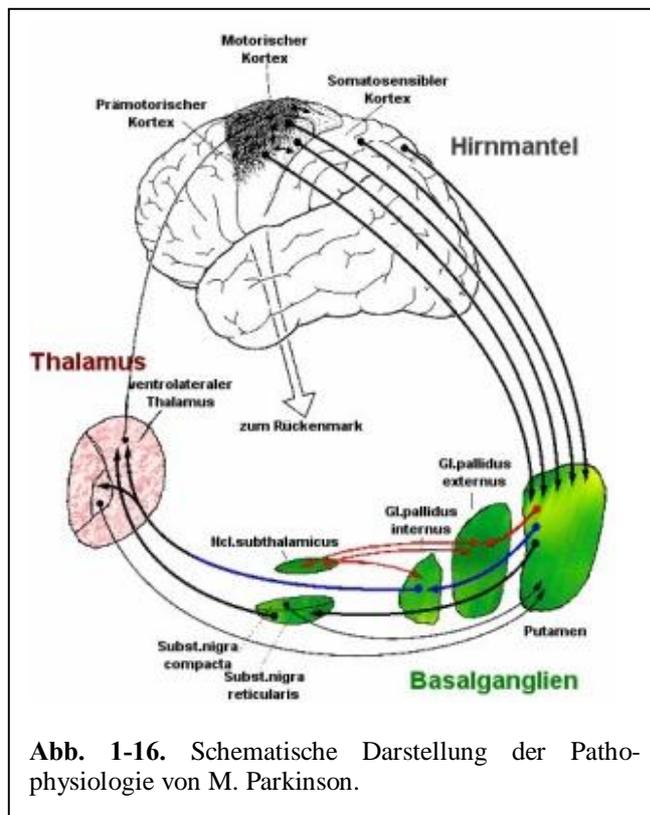
- *motorischen Störungen* mit den *Plus-Symptomen*
Rigor, Ruhetremor, Sprachstörungen
und den *Minus-Symptomen*
Hypo- bzw. Akinesie (Bewegungsverlangsamung, Maskengesicht)
- *vegetativen Störungen*
vermehrter Speichel- und Tränenfluss, überhöhte Talgproduktion (Salbengesicht), gestörte Wärme- und Schweißregulation, erniedrigter Blutdruck, Funktionsstörungen von Blase und Darm
- *psychischen Störungen*
depressive Verstimmungen, verlangsamte Denkabläufe und in Spätstadien Bradyphrenie und Demenz.

Die Symptome, insbesondere die motorischen Störungen, treten erst dann auf, wenn bereits mehr als 80 % der dopaminergen Neuronen degeneriert sind.^{213, 217} Mit den dopaminergen Neuronen verschwindet das in ihnen enthaltene Pigment Neuromelanin, das aus oxidativen Abbauprodukten von Dopamin entsteht. Die Depigmentierung ist ein pathologisch anatomisches Zeichen des Zelluntergangs in der *Substantia nigra*. Ein weiteres Merkmal ist das Auftreten der sog. Lewis-Körperchen. Dabei handelt es sich um eosinophile, cytoplasmatische Einschlüsse in den zugrunde gehenden Neuronen der *Substantia nigra*, des *Locus coeruleus*, des dorsalen Vaguskerne und anderer Kerngebiete. Die Degeneration von Neuronen im *Locus coeruleus* und im dorsalen Vaguskerne ist also ebenfalls an der Pathogenese des M. Parkinson

beteiligt und für vegetative Störungen verantwortlich. Diese Kerne beeinflussen den Sympathikus und Parasympathikus.

Die Degeneration der Dopamin-Neurone versucht man mit der Hypothese der Autotoxizität von Dopamin zu erklären. Beim ersten Schritt des Dopaminabbaus entsteht unter Katalyse der Monoaminoxidase (MAO) neben 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd auch Wasserstoffperoxid, woraus sich wiederum ein Hydroxylradikal bilden kann. Neuromelanin begünstigt u.a. die Entstehung von Hydroxylradikalen. Diese Radikale sind sehr reaktive und zytotoxische Moleküle und nach dieser Hypothese die eigentlich schädlichen Agenzien. Die Konzentration von Glutathion, welches Wasserstoffperoxid entgiftet, ist in der *Substantia nigra* von Parkinson-Patienten erniedrigt.¹¹⁵

Die oben genannten Symptome sind Ausdruck eines gestörten Gleichgewichts zwischen den neurohumoralen Überträgerstoffen Dopamin (\downarrow), Glutamat (\uparrow), GABA (\downarrow) und Acetylcholin



(\uparrow). Die dopaminergen Neurone der Substantia nigra haben normalerweise einen aktivierenden Einfluss auf die GABA-Neurone im Striatum. Die Ausschüttung von Dopamin wird über zwei Dopamin-Rezeptor-Subtypen, den D₁- und den D₂-Rezeptor, kontrolliert.²¹⁸ Bei Dopaminmangel kommt es zu einer reduzierten Aktivierung der GABA-Neurone, was wiederum hemmend auf den ventrolateralen Thalamus einwirkt. Ferner wird durch eine starke tonische Hemmung der thalamischen Schaltkerne der Erregungsfluss zu den motorischen Arealen der Hirnrinde vermindert. Infolge der verringerten

thalamo-kortikalen Rückkopplung kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von Glutamat im *Corpus Striatum*. Die cholinergen Zwischenneurone im Striatum werden durch glutamaterge Axone aus der Hirnrinde aktiviert und über das dopaminerge System inhibitorisch beeinflusst. Aufgrund der zunehmenden Glutamat- und der verminderten Dopamin-Freisetzung, nimmt die cholinerge Transmission zu, was in einem erhöhten Acetylcholin-Spiegel resultiert. Diese qualitative Veränderung des Gleichgewichtes zwischen dopaminergem, cholinergem und

glutamaterger Transmission im Striatum liefert zahlreiche pharmakologische Ansätze in der Parkinson-Therapie (siehe Kap. 1.7.4.2.).^{217, 219, 220}

Die „Lipid Rafts“ und die Raft-Proteine wurden, wie bereits erwähnt, in Verbindung mit diversen Krankheiten gebracht (siehe Kap. 1.4.).^{200, 202, 221} Anhand von Morbus Alzheimer wurde gezeigt, dass Cholesterol bei dieser Erkrankung eine wichtige Rolle spielt (siehe Kap. 1.7.3.). Während bei Alzheimer-Patienten ein erhöhter Serum-Cholesterol-Spiegel diagnostiziert worden ist, ist die Cholesterol-Biosynthese bei der Parkinson'schen Krankheit verringert, was mit einem geringeren Serum-Cholesterol-Gehalt einhergeht.²²²⁻²²⁶ Musanti et al. haben gezeigt, dass die Cholesterol-Biosynthese in Fibroblasten von Parkinson-Patienten reduziert ist, indem sie den Einbau von ¹⁴C-Acetat-Einheiten in das Cholesterol dieser Fibroblasten untersucht haben. Man geht nun davon aus, dass dieser geringe Cholesterol-Gehalt am Niedergang der dopaminergen Neuronen beteiligt sein könnte. Angaben ob sich eine verringerte Cholesterol-Biosynthese auch auf den Cholesterol-Gehalt im Gehirn ausübt, konnten leider noch nicht gemacht werden.²²²

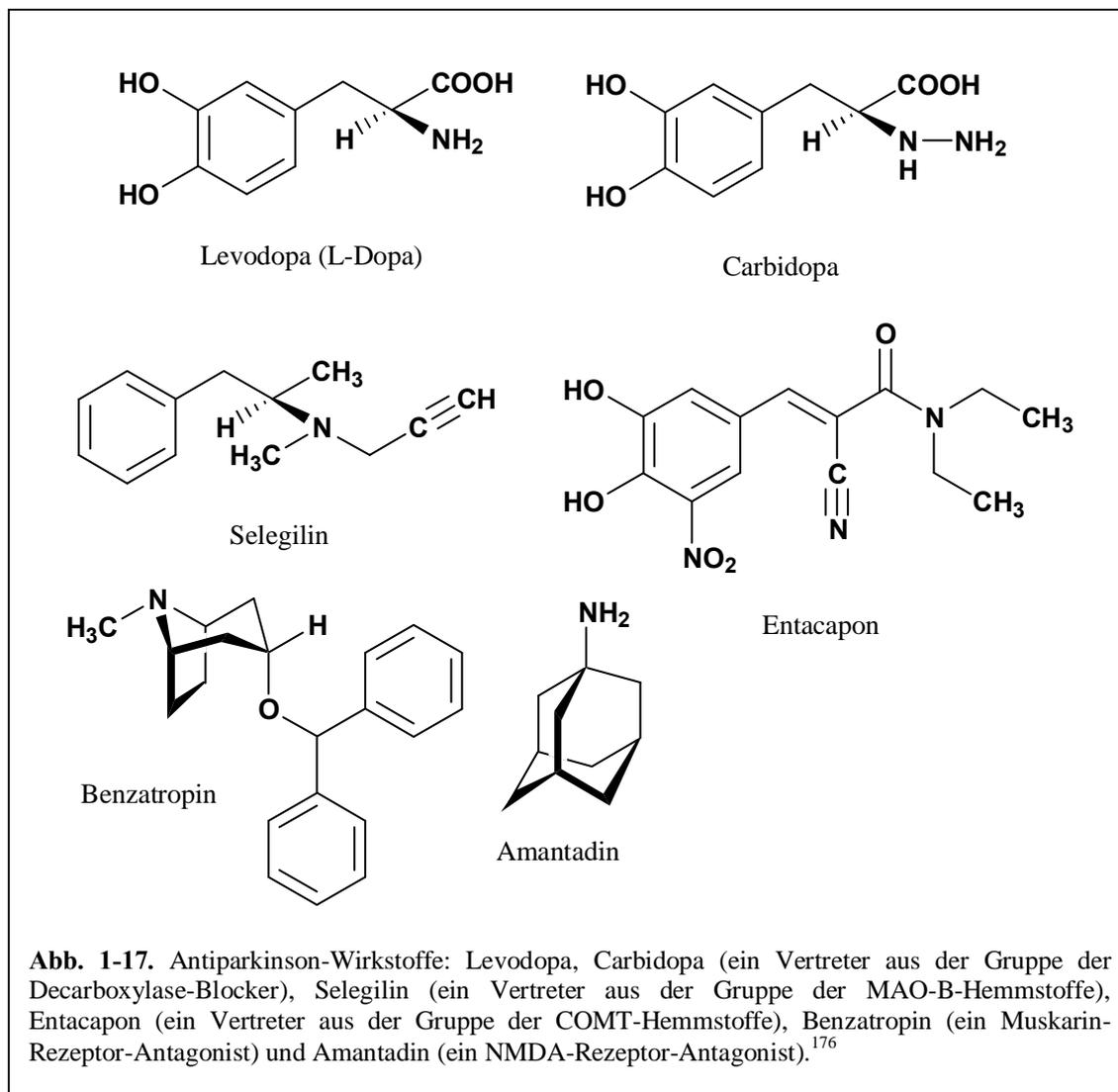
Bei der Alzheimer'schen Krankheit wurde gezeigt, dass Träger der ApoE4-Isoform des Apolipoproteins, allerdings nicht der ApoE2-Isoform, ein größeres Risiko besitzen, diese Krankheit zu bekommen, da diese Isoform die Bildung von A β -Fibrillen fördert (siehe Kap. 1.7.3.).^{187, 189} Bei Morbus Parkinson ist hingegen das E2-Allel, nicht das E4-Allel, mit einer größeren Prävalenz an Parkinson zu erkranken verbunden.²²⁷ Demnach ist das ApoE4-Allel mit einer höheren Konzentration an LDL-Cholesterol, das ApoE2-Allel hingegen mit einem niedrigen LDL-Cholesterol-Spiegel verbunden. Allerdings wurde kein Zusammenhang zwischen dem Einsatz von Statinen und einem erhöhten Risiko an Parkinson zu erkranken, gefunden.^{225, 226}

Eine mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress sollen an der Entstehung von M. Parkinson beteiligt sein.^{228, 229} In den Mitochondrien, die aus Blutplättchen von Parkinson-Patienten isoliert worden sind, wurde ein verringerter Gehalt an Coenzym Q₁₀, einem starken Antioxidans und mitochondrialen Elektronen-Akzeptor, gefunden.²³⁰ Die orale Gabe dieses Coenzym besaß nicht nur einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Parkinson'schen Krankheit,²³¹ sie reduzierte sogar den Niedergang dopaminergen Neuronen.²³² Eine Gabe der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Pravastatin und Atorvastatin war nicht mit einem verminderten Q₁₀-Gehalt verbunden. Somit ist die Gabe des Coenzym Q₁₀ bei einer Therapie mit Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase nicht notwendig, um einer Erkrankung an M. Parkinson vorzubeugen.²³³

1.7.4.2. THERAPIE DES MORBUS PARKINSON

Mit der Einführung des „Gold-Standards“ Levodopa (L-Dopa), einer physiologischen Vorstufe des Dopamins, konnte ein entscheidender Fortschritt in der Therapie des Parkinson-Syndroms erreicht werden. Für Levodopa existiert ein aktiver Transportmechanismus durch die Blut-Hirn-Schranke und durch Einwirkung der Dopa-Decarboxylase entsteht die eigentliche Wirksubstanz Dopamin. Bei alleiniger Gabe von Levodopa werden allerdings über 90 % der applizierten Dosis bereits in der Peripherie decarboxyliert. Um die Decarboxylierung außerhalb des Zentralnervensystems zu verhindern, wurden peripher wirkende, die Blut-Hirn-Schranke nicht passierende Decarboxylase-Blocker, wie z.B. das Carbidopa, entwickelt.

Eine weitere Möglichkeit, die Dopamin-Konzentration zu erhöhen, besteht in der Unterdrückung des Dopaminabbaus durch eine selektive Hemmung der Monoaminoxidase B, z.B. durch Selegilin oder Rasagilin.



L-Dopa wird nicht nur durch die Dopa-Decarboxylase und die Monoaminoxidase abgebaut, sondern auch durch das Enzym Catechol-O-methyltransferase (COMT) biologisch inaktiviert. Die COMT-Hemmstoffe, wie z.B. Entacapon, wirken sich therapeutisch günstig bei der Behandlung von Morbus Parkinson aus.

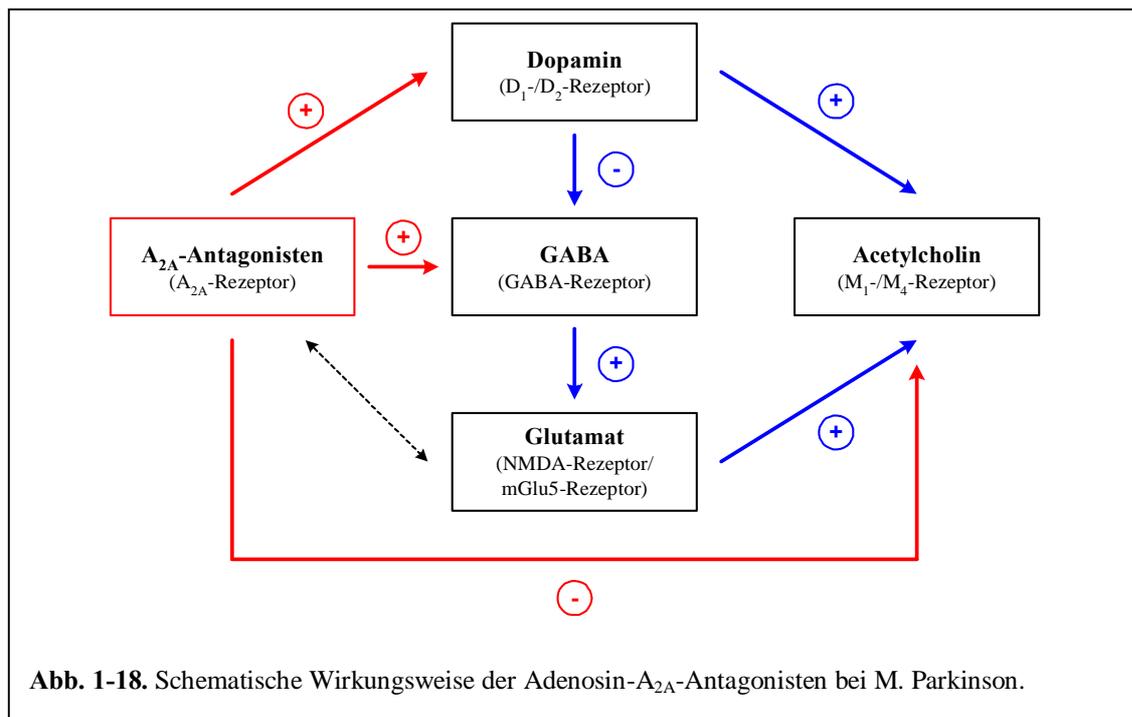
Die gesteigerte Übertragung in den enthemmten cholinergen Synapsen des Striatums kann dadurch reduziert werden, dass ein Teil der postsynaptischen, muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren durch Muskarin-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. Benztropin, blockiert werden. NMDA-Antagonisten, wie z.B. Amantadin, wirken mit Levodopa funktionell synergistisch.^{16, 115}

1.7.4.3. ADENOSIN-A_{2A}-REZEPTOREN ALS NEUE ZIELSTRUKTUREN BEI DER BEHANDLUNG DES MORBUS PARKINSON

Da angenommen wird, dass Levodopa selbst neurotoxische Eigenschaften hat,^{234, 235} und der therapeutische Erfolg anderer symptomatischer Wirkstoffe, wie der MAO-B- und COMT-Hemmstoffe, der Dopamin-Rezeptor-Agonisten und der Muskarin- und NMDA-Rezeptor-Antagonisten (siehe Kap. 1.7.4.2.) limitiert ist, stellen Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Antagonisten allein oder in Kombination mit bereits eingeführten Medikamenten eine therapeutische Alternative dar.^{236, 237}

Bei einem gesunden Menschen haben die dopaminergen Neurone über Dopamin-D₁- und D₂-Rezeptoren einen aktivierenden Einfluss auf GABA-Neurone im Striatum (siehe Kap. 1.7.4.1.). Bei Dopaminmangel, wie im Falle des M. Parkinson, ist dieser Effekt entsprechend vermindert. Die Freisetzung von GABA aus striatalen Synaptosomen könnte durch die Gabe von Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Antagonisten wieder erhöht werden, da A_{2A}-Agonisten die Freisetzung von GABA verringern.^{238, 239} Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Agonisten inhibieren nicht nur die Freisetzung von GABA, sondern sie stimulieren auch die Acetylcholin-Freisetzung.²³⁸⁻²⁴⁰

Des Weiteren reduzieren Agonisten an Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren die Bindungsaffinität von Dopamin-D₂-Rezeptoren.²⁴¹ Die Inhibition des A_{2A}-Rezeptors könnte demnach auch an dieser Stelle einen positiven Einfluss auf den Verlauf des M. Parkinson haben, da hier die Dopamin-Konzentration im Striatum vermindert ist. Diese und weitere Effekte lassen sich u.a. damit erklären, dass A_{2A}-Rezeptoren mit anderen Rezeptoren heteromere Komplexe bilden können. Dazu gehören nicht nur die D₂- und D₃-Rezeptoren, sondern auch die mGlu5-Rezeptoren.^{166, 242-}
²⁴⁵ Im Gegensatz zu klassischen Therapeutika (Dopamin-Rezeptor-Agonisten und Muskarin-Rezeptor-Antagonisten) besitzen die A_{2A}-Antagonisten daher mehrere Ansatzpunkte bei der Parkinson-Therapie, was sie zu wertvollen Arzneistoffen machen könnte.²⁴⁶



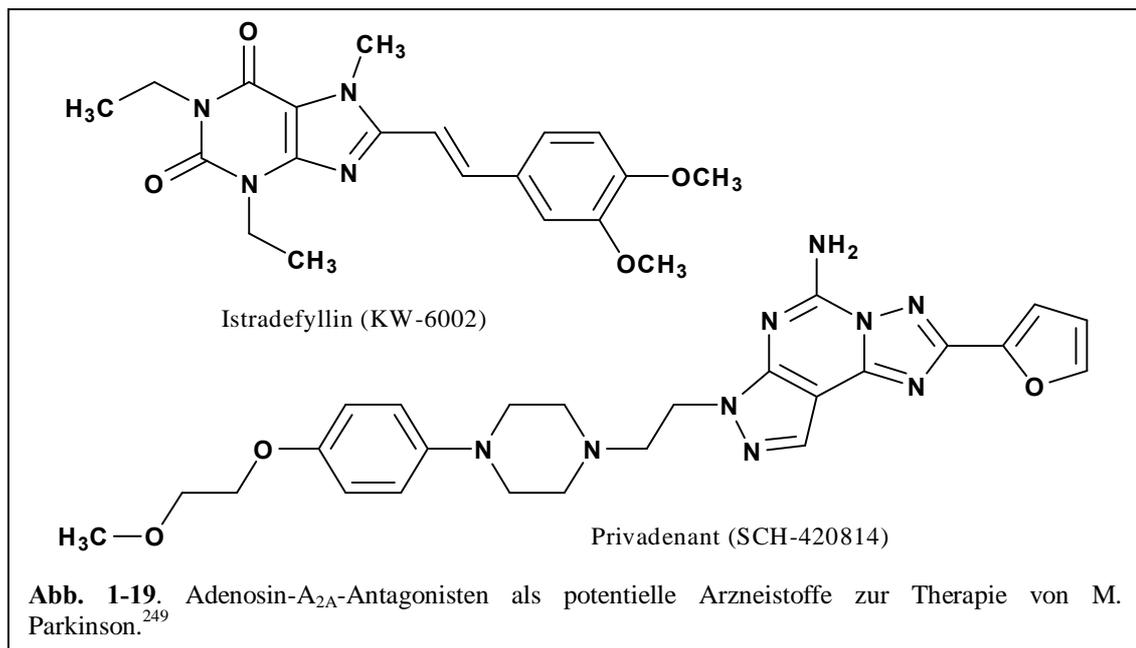
Bisher wurden zahlreiche A_{2A} -Antagonisten mit unterschiedlichsten chemischen Strukturen synthetisiert und in Bezug auf ihre Affinität zu Adenosin- A_{2A} -Rezeptoren und ihre Wirksamkeit in Parkinson-Tiermodellen untersucht.²⁴⁷ Zurzeit befinden sich vier Adenosin- A_{2A} -Antagonisten in der klinischen Entwicklung.

- 1) Istradefyllin (KW-6002), Kyowa Hakko, Japan
- 2) Privadenant (SCH-420814), Schering-Plough, USA
- 3) BIIB014/V2006, Biogen Idec, USA
- 4) Lu AA47070, Lundbeck, Schweden

Die klinische Prüfung wird üblicherweise in vier Phasen (Phase I bis IV) unterteilt. Unter Phase I versteht man die erste Anwendung eines Wirkstoffes am Menschen, die in der Regel an gesunden Probanden mittleren Alters erfolgt. Bei der Phase II werden erste Prüfungen zur Wirksamkeit und relativen Ungefährlichkeit an einer begrenzten Anzahl von meist stationären Patienten durchgeführt, die an der Krankheit leiden, für deren Therapie das Prüfpräparat vorgesehen ist. Wird nach Abschluss der Phase II entschieden, dass eine weitere Entwicklung des Prüfpräparates erfolgen soll, schließt sich die Phase III an, bei der der Nachweis der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit mit einer größeren Patientenzahl erbracht werden soll. Die Phase IV beginnt nach der Zulassung des Arzneimittels. Diese dient u.a. dem Nachweis der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Pharmakons bei größeren Patientenkollektiven.²¹³

Istradefyllin (KW-6002) hat bereits die Phasen II und III der klinischen Prüfung durchlaufen. Für die Kombinationstherapie mit Levodopa/Carbidopa wurde eine Dosis von 20 mg/Tag festgesetzt.⁷ Diese Studien haben gezeigt, dass Istradefyllin sehr gut toleriert wird und den therapeutischen Erfolg von Levodopa verbessert. Es zeichnet sich besonders durch geringe Nebenwirkungen aus. Die Wirkung von Levodopa und den Decarboxylase-Hemmern lässt nach ca. 3-5 Jahren nach und es kommt zu Fluktuationen in der Wirkung und zu Dyskinesien.²⁴⁸ Die Wirkungsfluktuation zeigt sich in sog. On-off-Phasen. Dabei kommt es tagsüber wiederholt zu plötzlichem Wirkungsverlust und, nach unterschiedlichen Zeitintervallen, zu einer abrupten Wirkungsrückkehr. Diese On-off-Phasen und auch die Dyskinesien, die sich in schnellen, unwillkürlichen Bewegungen äußern, sind bei der Gabe von Istradefyllin vermindert.²⁴⁹ Allerdings sind zurzeit noch keine Daten vorhanden, ob Istradefyllin in der Monotherapie eingesetzt werden kann.²⁵⁰

Der potente und selektive A_{2A} -Antagonist Privadenant (SCH-420814) befindet sich in der Phase II der klinischen Prüfung.⁷ In der Phase I wurde gezeigt, dass Privadenant in Dosen von 5 – 200 mg gut vertragen wird. In Kombinationstherapie mit Levodopa verbessert Privadenant die Symptome des M. Parkinson. Neben seiner antikataleptischen Wirkung zeigte Privadenant einen antidepressiven Effekt. Dieser antidepressive Effekt von A_{2A} -Antagonisten würde sich in der Therapie als günstig erweisen, da bei Parkinson-Patienten neben motorischen und vegetativen Störungen auch psychische Probleme auftreten.²⁵¹ Neben dem Einsatz als Parkinson-Therapeutikum schlug Schering-Plough den Einsatz von Privadenant beim Aufmerksamkeitsdefizit-Syndrom (ADS) und dem Restless-Legs-Syndrom (RLS) vor.²⁵⁰



BIIB014 (alte Bezeichnung: V2006) befindet sich in der klinischen Entwicklung der Firma Biogen Idec. Die Phase I ist abgeschlossen und hat gezeigt, dass BIIB014 gut vertragen wird. Es kann in Dosen bis zu 100 mg/Tag eingesetzt werden.⁷ Die Struktur dieser Verbindung wurde noch nicht veröffentlicht, man weiß aber, dass es sich um ein Thieno- oder Furopyrimidin handelt.²⁵⁰

Bei Lu AA47040 handelt es sich um eine neue Verbindung der Firma Lundbeck, die in der Phase I der klinischen Prüfung auf ihre Sicherheit, Verträglichkeit und Pharmakokinetik hin untersucht werden soll.⁹

1.8. AUFGABENSTELLUNG

Bei den Adenosin-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Sie werden anhand ihrer pharmakologischen Eigenschaften in vier Subtypen, die Adenosin-A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren, unterteilt.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Adenosin-Rezeptoren gelten besonders im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, als interessante Zielstrukturen.^{158, 159}

Seit gezeigt worden ist, dass Cholesterol sowohl bei M. Parkinson als auch bei M. Alzheimer eine Rolle spielt, stellt sich die Frage, inwiefern sich Cholesterol auf die Funktion von Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren auswirkt. Während bei Alzheimer-Patienten ein erhöhter Serum-Cholesterol-Spiegel diagnostiziert worden ist, ist die Cholesterol-Biosynthese bei der Parkinson'schen Krankheit verringert, was mit einem geringeren Serum-Cholesterol-Gehalt einhergeht.²²²⁻²²⁶

Der Einfluss von Cholesterol auf die Rezeptorfunktion wurde bereits für zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gezeigt. Man nimmt an, dass diese Rezeptoren in cholesterol- und sphingolipidreichen Mikrodomänen („Membrane Rafts“) lokalisiert sind und diese Lokalisation einen Einfluss auf die Rezeptorfunktion ausübt.¹⁰³⁻¹⁰⁹ Um diesen Einfluss nachzuweisen, wurden diverse Methoden eingesetzt. Man hat festgestellt, dass die „Membrane Rafts“ durch Cholesterol-Entzug zerstört werden können.²⁶ Zur Verminderung des Cholesterol-Gehalts einer Plasma-Membran können verschiedene Substanzen eingesetzt werden, allerdings hat sich Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) aufgrund seiner hohen Spezifität und Selektivität für Cholesterol als die Methode der Wahl erwiesen.⁶³ Der Einfluss des Cholesterol-Gehaltes auf die Funktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wurde bisher hauptsächlich durch den Einsatz von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien nachgewiesen.

Aufbauend auf den bisher bekannten Methoden soll nun die Bedeutung von Cholesterol auf die Funktion von Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren untersucht werden. Zunächst soll der Einfluss des Cholesterol-Gehaltes einer Rattenstriatum-Membranpräparation auf die spezifische Bindung des A₁-selektiven Agonist-Radioliganden [³H]CCPA¹⁶⁴ und dem Antagonist-Radioliganden [³H]DPCPX¹⁶³ sowie dem A_{2A}-selektiven Agonist-Radioliganden [³H]CGS21680^{172, 173} und dem Antagonist-Radioliganden [³H]MSX-2¹⁶⁹ untersucht werden. Der Cholesterol-Gehalt dieser Membranpräparationen soll durch die Verwendung von M β CD verringert werden. Des Weiteren soll eine geeignete Methode etabliert werden, um den ursprünglichen Cholesterol-Gehalt wieder herzustellen. Sättigungs- und Kinetikexperimente sowie [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an beiden Adenosin-Rezeptor-Subtypen sollen weitere Aufschlüsse darüber geben, inwiefern der Cholesterol-Gehalt die Rezeptoren und deren Funktion beeinflusst.

Sucrose-Gradienten-Zentrifugationen mit und ohne Einsatz eines Detergenzes und die anschließende Untersuchung der Fraktionen in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien, sollen ferner zeigen, ob sich die Rezeptoren in cholesterolreichen Fraktionen anreichern.

Obwohl in den letzten Jahren eine Vielzahl von Adenosin-Rezeptor-Liganden entwickelt worden sind, lässt die Markteinführung eines selektiven Adenosin-Rezeptor-Antagonisten nach wie vor auf sich warten. Ein Grund für den langsamen Fortschritt in der Entwicklung von Arzneistoffen, die selektiv Adenosin-Rezeptoren blockieren, stellen womöglich die ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften und die geringe Wasserlöslichkeit sowie die damit einhergehende schlechte Bioverfügbarkeit vieler dieser meist sehr lipophilen Verbindungen dar.^{148, 158}

Auf der Suche nach potenten und selektiven Adenosin-Rezeptor-Liganden mit neuartigen Strukturen wurden in unserem Arbeitskreis von Dr. H. Phuoc Le, Dr. Ali El- Tayeb und von Dr. Alexander Bauer Serien neuer 4-Aminopyrimidin-Derivate, 2-Thioadenosin-Derivate, 2-Phenylpurin-6,8-dione, 2,8-Diphenylpurin-6-dione, 1,2,3-Triazolpyrimidine und *N*⁷-substituierter Oxazolpyrimidine synthetisiert, die im Hinblick auf ihre Affinität zu den Adenosin-Rezeptor-Subtypen charakterisiert werden sollen. Zur Evaluation der Struktur-Wirkungsbeziehungen sollen *in-vitro*-pharmakologische Untersuchungen in Form von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Ratten- bzw. humanen Adenosin-Rezeptoren durchgeführt werden. Zusätzlich soll die intrinsische Aktivität ausgewählter Verbindungen durch Natrium-Shift-Experimente und [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien ermittelt werden. Dabei gilt es, einen Assay zur Durchführung von [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an Ratten-Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren zu etablieren. Im Hinblick auf den vor einiger Zeit identifizierten und klonierten Adenin-Rezeptor soll das für [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an nativen Ratten-Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren entwickelte Protokoll auf den nativen Adenin-Rezeptor übertragen werden.^{153, 154}

Da Adenosin-Rezeptoren eine große pathophysiologische und pharmakologische Bedeutung besitzen, macht sie dies zu attraktiven *Targets* für die Positronen-Emissions-Tomographie. Da es sich bei den Adenosin-Rezeptor-Liganden, die sich bisher in der Entwicklung zu PET-Liganden befinden, ausschließlich um Antagonisten handelt, die bis auf eine Ausnahme mit dem radioaktiven Isotop des Kohlenstoffs (¹¹C) markiert sind,²⁵² wurden von Dr. H. Phuoc Le in unserem Arbeitskreis 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin-Derivate synthetisiert, die in mit ¹⁸F radioaktiv markierter Form als A₁-Agonisten in der PET-Diagnostik Verwendung finden sollen. In Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien sollen die potentiellen Adenosin-A₁-Agonisten auf

ihre Bindungsneigung zum Adenosin-A₁-Rezeptor untersucht werden. Zusätzlich sollen die Affinitäten zu anderen Rezeptor-Subtypen ermittelt werden, um Aussagen über die Selektivität dieser Verbindungen treffen zu können. In GTP-Shift-Experimenten soll ferner die intrinsische Aktivität hochaffiner A₁-Liganden bestimmt werden.

Fluoreszenzmarkierte Adenosin-Rezeptor-Liganden stellen ebenso wie Radioliganden pharmakologische Werkzeuge zur Charakterisierung von Rezeptoren dar. Auf der Suche nach potenten und selektiven fluoreszenzmarkierten A_{2B}-Antagonisten und A₁-Agonisten synthetisierte Dr. Fabian Heisig eine Serie von Xanthin- und N⁶-substituierten Adenosin-Derivaten, die mit funktionalisierten BODIPY-Derivaten unterschiedlicher Kettenlänge gekoppelt wurden. Die Bindungsneigung dieser BODIPY-markierten Verbindungen soll im Hinblick auf ihre Affinität zu Adenosin-A_{2B}- bzw. A₁-Rezeptoren untersucht werden. Darüber hinaus soll zur Analyse der Selektivität auch die Haftungsneigung der Verbindungen zu den anderen Adenosin-Rezeptor-Subtypen bestimmt werden. Die intrinsische Aktivität der potentiellen und selektiven fluoreszenzmarkierten A₁-Agonisten soll in funktionellen [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien ermittelt werden.

Iberogast[®] (STW5) ist ein Pflanzenextrakt, der sich aus vielen Einzelkomponenten zusammensetzt und bei der funktionellen Dyspepsie (Verdauungsstörung), die zu den häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen gehört, angewendet wird.²⁵³ Der Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Karin Nieber aus Leipzig wies für diesen und einen weiteren Extrakt STW6 (Schöllkraut) einen entzündungshemmenden Effekt nach. Da das Nukleosid Adenosin beim Entzündungsgeschehen freigesetzt wird,²⁵⁴ untersuchte Herr Sebastian Michael diese und weitere Extrakte auf ihre Affinität zu Adenosin-Rezeptoren. Durch weiterführende [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien soll die intrinsische Aktivität der potenten Extrakte bestimmt werden.

Bei neurodegenerativen Erkrankungen spielen nicht nur die Adenosin-Rezeptoren und der Einsatz von Adenosin-Rezeptor-Antagonisten eine Rolle. Es wird auch der Einsatz von CB₁-Antagonisten bei Morbus Parkinson diskutiert.²⁵⁵ Auf der Suche nach neuen, potentiellen und selektiven Cannabinoid-Rezeptor-Liganden wurde im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Kiec-Konowicz aus Krakau (Polen) eine Serie von Imidazothiazepinonen und von Dr. Jakob Törang aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. S. Bräse aus Karlsruhe eine Reihe von 3-Alkylcumarinen und 2*H*-Chromen-Derivaten synthetisiert. Ausgehend von dem von Frau Dr. Kerstin Atzler entwickelten Standardverfahren für die Durchführung von

Kompetitionsexperimenten an Cannabinoid-Rezeptoren soll ein High-Throughput-Verfahren zum effizienteren Wirkstoffscreening entwickelt werden. Mit diesem Verfahren soll die Bindungsneigung dieser Verbindungen zu Ratten- und humanen Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptoren bestimmt werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen zu analysieren. Des Weiteren soll in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptoren die intrinsische Aktivität dieser Verbindungen ermittelt werden.

2. STRIATALE ADENOSIN-A₁- UND A_{2A}-REZEPTOREN: CHOLESTEROLGEHALT DER MEMBRANEN UND „MEMBRANE RAFTS“

2.1. EINLEITUNG

Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargestellt, wurde die von Kai Simons und Elina Ikonen im Jahre 1997 in *Nature* beschriebene Definition der cholesterolreichen Mikrodomänen („Lipid Rafts“) auf dem „Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function“ (2006) präzisiert.⁵⁷ Simons und Ikonen hatten postuliert, dass es sich bei den „Lipid Rafts“ um Mikrodomänen in der Plasma-Membran handelt, die reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind.²⁵ Aufgrund der kontroversen Diskussion darüber, ob die Existenz dieser cholesterolreichen Mikrodomänen („Lipid Rafts“) auf einem Artefakt aufgrund der eingesetzten Methoden zu ihrer Isolierung beruhen (siehe Kap. 1.4.1.), musste die Definition der „Lipid Rafts“ neu überdacht werden. Man vermutete, dass die Verwendung von Detergenzien, wie z.B. Triton X-100, zur Isolierung der Rafts mit Hilfe eines Sucrose-Gradienten die Bildung dieser Mikrodomänen erst hervorruft.^{51-56, 59} Auf dem „Keystone Symposium“ hatte man sich schließlich darauf geeinigt, die Bezeichnung „Lipid Rafts“ durch „Membrane Rafts“ zu ersetzen (siehe Kap. 1.4.2.).

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Cholesterolgehaltes in der Plasma-Membran auf striatale Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren zu untersuchen. Die Adenosin-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (siehe Kap. 1.5.-1.6.). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde ein Einfluss von Cholesterol auf die Rezeptorfunktion bereits für zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nachgewiesen. Dieser Einfluss wurde auf der Lokalisation dieser Rezeptoren in den „Membrane Rafts“, die zu dem Zeitpunkt noch als „Lipid Rafts“ bezeichnet wurden, zurückgeführt (siehe Kap. 1.4.5). Im Zusammenhang mit Adenosin-Rezeptoren hat man zudem herausgefunden, dass der aktivierte kardiale Adenosin-A₁-Rezeptor sich nicht in den Caveolae, einer Untergruppe der „Membrane Rafts“, befinden soll,¹³⁰ die Caveolae aber bei der durch Agonisten induzierten Internalisierung des A₁-Rezeptors eine Rolle spielen.^{131, 132}

Um zu untersuchen, inwieweit Cholesterol einen Einfluss auf striatale Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren ausübt, sollte der Cholesterolgehalt in den Zellmembranen verringert werden. Durch Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien, wie Kompetitions-, Sättigungs- oder Kinetikexperimente und [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien, sollte herausgefunden werden, ob eine zielgerichtete Zerstörung der Rafts durch Cholesterolentzug (siehe Kap. 1.4.4.) striatale Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren beeinflusst.

Mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten kann im Allgemeinen die Affinität einer Testsubstanz

zu einem bestimmten Rezeptor ermittelt werden. Dazu wird eine Gewebepräparation mit einer gleich bleibenden Konzentration des Radioliganden und unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Substanz inkubiert. Der Konzentrationsbereich dieser Substanz sollte sich dabei über mehrere Zehnerpotenzen erstrecken. Der Radioligand und die Testsubstanz konkurrieren im Falle einer kompetitiven Hemmung um die Bindungsstelle des Rezeptors. Nach Einstellung des Gleichgewichtes wird der gebildete Radioligand-Rezeptor-Komplex durch Filtration vom freien Radioliganden getrennt und vermessen. Zur Auswertung trägt man die spezifische Bindung, die, da sie nicht direkt messbar ist, aus der Differenz der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung errechnet wird, über die Konzentration der Testsubstanz halblogarithmisch auf. Der Wendpunkt der auf diese Weise erhaltenen sigmoiden Kurve entspricht dem IC₅₀-Wert. Mit Hilfe der „Cheng-Prusoff-Korrektur“ lässt sich aus den versuchsabhängigen Parametern, dem IC₅₀-Wert und dem K_D-Wert, die versuchsunabhängige Gleichgewichtsinhibitionskonstante K_i berechnen.²⁵⁶ Im Rahmen dieses Projektes sollte durch den Einsatz von kompetitiven Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien die spezifische Bindung verschiedener Radioliganden von Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren in Abhängigkeit vom Cholesterol-Gehalt einer Rattenstriatum-Membranpräparation, der durch Inkubation mit Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) bzw. mit einem MβCD-Cholesterol-Komplex verändert wurde, ermittelt werden.

Sich anschließende Sättigungsexperimente sollten Aufschluss über den Einfluss des Cholesterol-Gehaltes auf die Konzentration der Rezeptoren im Gewebe (B_{Max}) und der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D geben. Der K_D-Wert ist diejenige Konzentration eines Liganden, bei der 50% der maximal möglichen Bindungsstellen besetzt sind. Um eine Sättigungskurve zu erhalten, von der der B_{Max}- und der K_D-Wert abgelesen werden können, wird die gleiche Menge an Gewebepräparation mit steigenden Konzentrationen des Radioliganden inkubiert.²⁵⁷⁻²⁶⁰

Weiterführende Kinetikexperimente sollten zeigen, ob der veränderte Cholesterol-Gehalt die Geschwindigkeit einer Ligand-Rezeptor-Interaktion beeinflusst. Bei Kinetikexperimenten werden sowohl die Rezeptor- als auch die Radioligandkonzentration konstant gehalten und nur die Inkubationszeit variiert. In den sog. Assoziationsexperimenten wird die zeitabhängige Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes untersucht und die Assoziationskonstante k_{on} bestimmt. Die Dissoziationsexperimente dienen der Untersuchung des Zerfalls des Ligand-Rezeptor-Komplexes, der durch die Dissoziationskonstante k_{off} charakterisiert wird. Aus den kinetischen Konstanten der Assoziation und Dissoziation kann die kinetische Gleichgewichtskonstante K_D berechnet werden.

Durch den Einsatz von [³⁵S]GTPγS-Radioligand-Bindungsstudien sollte zusätzlich die Funktionalität der Rezeptoren in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Plasma-Membran untersucht werden.²⁶¹ Die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor wird durch den Zusatz von GTP moduliert (siehe Kap. 4.3.).²⁶²⁻²⁶⁴ In den [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien misst man die Affinität des hydrolysestabilen, radioaktiv markierten GTP-Analogen GTPγS zur Gα-Untereinheit des G-Proteins. Voll-Agonisten führen konzentrationsabhängig zu einer maximalen Stimulierung der [³⁵S]GTPγS-Bindung, während Partial-Agonisten einen im Gegensatz zu Voll-Agonisten abgeschwächten stimulierenden Effekt vermitteln. Neutrale Antagonisten zeigen hingegen keinen Effekt auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung. Inverse Agonisten inhibieren sogar konzentrationsabhängig die Radioligand-Bindung und senken diese unter den Basalwert ab.^{261, 265} Es ist wichtig, dass das Verhältnis von Rezeptoren in der R- und der R*-Form in den [³⁵S]GTPγS-Experimenten ausbalanciert ist, wobei R die inaktive, R* die aktive Rezeptorkonformation darstellt. Solch ein Konformations-Gleichgewicht kann dadurch erreicht werden, dass zum Inkubationsansatz sowohl Magnesium- und Natrium-Ionen, als auch GDP hinzugefügt werden. Magnesium-Ionen binden allosterisch an das trimere G-Protein, begünstigen die Dissoziation von GDP, fördern die Bindung von GTP an die α-Untereinheit und begünstigen den aktiven Zustand des Rezeptors, von dem aus nachgeschaltete Effektorsysteme aktiviert werden können.²⁶⁶⁻²⁶⁸ Die Zusätze von Natrium-Ionen und GDP fördern hingegen die Bildung des Gα-Gβγ-GDP-Komplexes, der die inaktive Form des G-Proteins darstellt, über die keine Signaltransduktion ausgelöst werden kann. Das Gleichgewicht wird von der R*-Form zugunsten der R-Form verschoben (siehe Kap. 3.2.2.).²⁶⁹⁻²⁷¹

Agonisten binden bevorzugt an die aktive Rezeptorkonformation. Dadurch wird die Aktivierung des G-Proteins induziert, was zur Dissoziation des GDP von der Gα-Untereinheit und zur Abdissoziation von der dimeren βγ-Untereinheit führt. GDP wird gegen GTP ausgetauscht (siehe Kap. 1.5.). GTP bzw. sein hydrolysestabiles Analogon GTPγS besitzt eine höhere Affinität zur „freien“ Gα-Untereinheit als zu dem als Trimer vorliegenden gesamten G-Protein.²⁶⁸ Durch das Thio-Analoge des GTP unterbleiben die nachgeschalteten Reaktionsschritte und GTPγS bleibt an die α-Untereinheit des G-Proteins gebunden, da es in γ-Stellung statt des Sauerstoffatoms ein Schwefelatom trägt. Somit kann die endständige Phosphat-Gruppe nicht auf das Effektor-Protein übertragen werden. Abhängig von der Konzentration des eingesetzten Agonisten wird eine unterschiedliche Zahl an G-Proteinen angesprochen, die in ihrer Gesamtheit betrachtet zu einem Anstieg der GTPγS-Bindung führen und so den beobachteten stimulierenden Effekt ausmachen.

Antagonisten mit negativ-intrinsischer Aktivität (inverse Agonisten) binden hingegen an die

inaktive Konformation des Rezeptors und stabilisieren somit den inaktiven Zustand des G-Proteins, das in der GDP-gebundenen Form vorliegt. Durch ihre der Aktivierung des Effektor-Proteins entgegen gerichtete Aktivität wird der Anteil der Rezeptoren, die in der R^{*}-Form vorliegen einschließlich des Anteils an spontanaktiven Rezeptoren, in die R-Form überführt. Somit nimmt im Vergleich zum Basalwert die Bindung des Radioliganden [³⁵S]GTPγS ab. Neutrale Antagonisten besitzen hingegen keine intrinsische Aktivität. Sie binden sowohl an die R- als auch an die R^{*}-Form des Rezeptors und beeinflussen die Kopplung des Gα-GTP-Komplexes an das Effektorprotein nicht. Ihre „Aktivität“ ist mit dem in den [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien ermittelten Basalwert zu vergleichen, der in Abwesenheit eines Liganden bestimmt wird.^{265, 272}

Durch die vorliegende Arbeit sollte erstmals untersucht werden, ob der Adenosin-A_{2A}-Rezeptor, der eine große Rolle bei Morbus Parkinson spielt und hinsichtlich dieser Erkrankung ein wertvolles therapeutisches Target darstellt, in Zusammenhang mit den „Membrane Rafts“ gebracht werden kann. Das Gleiche gilt für den A₁-Rezeptor, der bisher nur in Verbindung mit Caveolae untersucht worden ist.^{130-132, 273}

2.2. EINFLUSS DES CHOLESTEROL-GEHALTES AUF DIE SPEZIFISCHE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNG AN ADENOSIN-A₁- UND A_{2A}-REZEPTOREN

2.2.1. VERRINGERUNG DES CHOLESTEROL-GEHALTES EINER RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATION

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit (siehe Kap. 1.4.4.) umfassend dargestellt, gibt es viele Möglichkeiten, um Cholesterin aus Zellmembranen zu entfernen. Dabei wurden auch die Vor- und Nachteile der Verbindungen aufgezeigt, die für diesen Einsatz in Frage kommen. Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) hat sich dabei nicht nur hinsichtlich seiner hohen Spezifität gegenüber Cholesterin,⁶⁷⁻⁷⁰ sondern auch aufgrund seiner Effizienz als die Verbindung der Wahl herausgestellt.^{71, 73}

Verwendet wurde eine Rattenstriatum-Membranpräparation, die sowohl den Adenosin-A₁- als auch den Adenosin-A_{2A}-Rezeptor nativ exprimiert.²⁷⁴ Durch den Einsatz steigender Konzentrationen an M β CD (10, 20 und 40 mM) sollte untersucht werden, ob sich der Cholesterin-Gehalt der verwendeten Membranpräparation in Abhängigkeit von der eingesetzten M β CD-Konzentration verringert. Zunächst wurde eine 80 mM M β CD-Stammlösung in 50 mM Tris-Puffer hergestellt und die gewünschten Konzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnungsschritte erhalten. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln wurde das Rattenstriatum pelletiert und drei Mal mit Tris-Puffer gewaschen.⁸⁸ Membranpräparationen von CHO-Zellen, die den A₁-Rezeptor rekombinant exprimieren (siehe Kap. 2.7.3.), und von humanem Striatum (siehe Kap. 2.2.5.) wurden auf die gleiche Weise behandelt.

Durch eine anschließende Cholesterin-Bestimmung mit einem Kit der Firma Rolf Greiner BioChemica, Deutschland, konnte gezeigt werden, dass der Cholesterin-Gehalt einer Rattenstriatum-Membranpräparation, die mit 10 mM M β CD behandelt worden ist, im Vergleich zur unbehandelten Membranpräparation auf 50 % des Ausgangswertes gesenkt werden konnte. Bei einer anfänglichen Cholesterin-Konzentration von 2,77 mmol/g Protein, betrug diese nach der M β CD-Behandlung nur noch 1,37 mmol/g Protein. Eine Inkubation mit 20 bzw. 40 mM M β CD führte zu einer weiteren Verminderung des Cholesterin-Gehaltes auf 27 % (0,75 mmol/g Protein) bzw. 13 % (0,45 mmol/g Protein). Die Proteinbestimmung erfolgte jeweils vor und nach Behandlung mit M β CD.

Diese Abhängigkeit in der Abnahme des Cholesterin-Gehaltes von der M β CD-Konzentration deckt sich mit den von der Arbeitsgruppe um Pucadyil et al. veröffentlichten Daten.⁸⁸ Durch den Einsatz von 10 mM M β CD reduzierten sie den Cholesterin-Gehalt einer Rinder-Hippocampus-

Membran auf 75 % des Ausgangswertes. Bei einer Behandlung mit 40 mM M β CD konnte der Cholesterol-Gehalt auf 12 % verringert werden.⁸⁸ Pucadyil et al. konnten zwar eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit ableiten, allerdings wurde der Cholesterol-Gehalt nicht linear zur eingesetzten M β CD verringert. Dies wurde in eigenen Experimenten bestätigt und in Abb. 2-1 des nachfolgenden Kapitels verdeutlicht.

In der Literatur wurde vielfach beschrieben, dass M β CD das Cholesterol spezifisch aus der Plasma-Membran entfernt.^{66, 68, 69, 71, 72} Pucadyil et al. und Klein et al. konnten dies bestätigen, blieb doch der Gesamtphospholipid-Gehalt nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an M β CD konstant.^{63, 88}

2.2.2. RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATIONEN MIT VERMINDERTEM CHOLESTEROL-GEHALT

In Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit dem A₁-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CCPA¹⁶⁴ und dem antagonistischen Radioliganden [³H]DPCPX¹⁶³ sowie dem A_{2A}-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CGS21680^{172, 173} und dem antagonistischen Radioliganden [³H]MSX-2¹⁶⁹ sollte der Einfluss des Cholesterol-Gehaltes auf die spezifische Bindung dieser tritium-markierten Adenosin-Rezeptor-Liganden untersucht werden (Strukturformeln siehe Kap. 1.6.1. und Kap. 1.6.2.). In Tab. 2-1 ist die spezifische Bindung dieser Radioliganden an eine Rattenstriatum-Membranpräparation dargestellt, die zuvor mit verschiedenen Konzentrationen an M β CD behandelt worden war.

Die Kompetitionsexperimente wurden jeweils an der mit M β CD behandelten und unbehandelten Rattenstriatum-Membranpräparation durchgeführt. 30 μ g dieser Membranpräparationen wurden mit 10 nM [³H]CCPA, 0,4 nM [³H]DPCPX, 10 nM [³H]CGS21680 oder 1 nM [³H]MSX-2 inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 μ M CADO (A₁), 10 μ M DPCPX (A₁), 800 μ M CADO (A_{2A}) oder 50 μ M NECA (A_{2A}) bestimmt. Die Konzentrationen der Radioliganden entsprachen dabei Standard-Bedingungen, die bereits in unserem Arbeitskreis etabliert waren. Die eingesetzte Konzentration von 10 nM [³H]CCPA wich allerdings von diesen Bedingungen (1 nM) ab, da die höhere Konzentration aufgrund höherer Counts zu einer besseren Auswertbarkeit der Ergebnisse führte. Des Weiteren wurden die Daten des in Sättigungsexperimenten eingesetzten antagonistischen A_{2A}-Radioliganden [³H]ZM241385 mit einbezogen (siehe Kap. 2.2.3.). Die spezifische Bindung der Radioliganden ist in Tab. 2-1 jeweils in cpm \pm SEM und in % \pm SEM (bezogen auf die Kontrolle) angegeben.

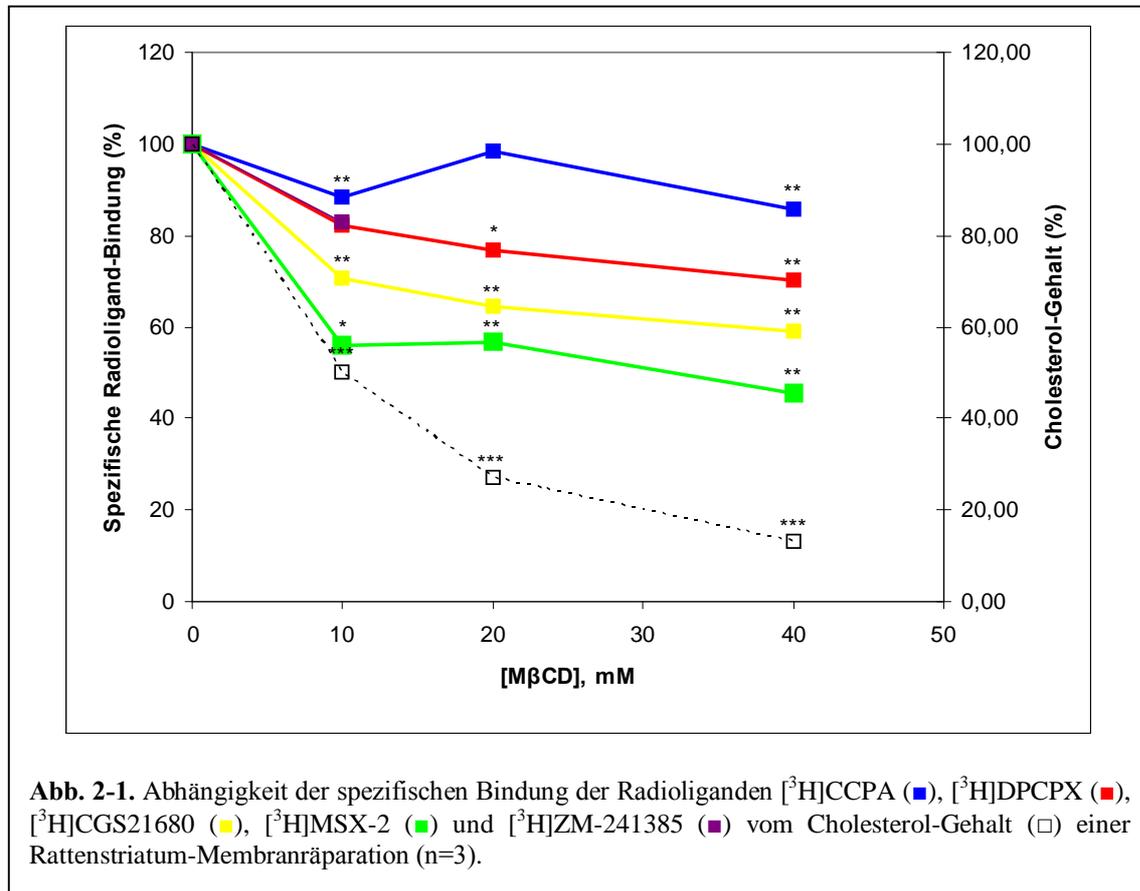
Tab. 2-1. Abhängigkeit der spezifischen Bindung der Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX, [³H]CGS21680, [³H]MSX-2 und [³H]ZM241385 vom Cholesterol-Gehalt einer Rattenstriatum-Membranpräparation (n=3).

Membran- präparation	Chol. - Gehalt [%]	Spezifische Bindung % ± SEM bzw. cpm ± SEM			
		[³ H]CCPA [10 nM]	[³ H]DPCPX [0,4 nM]	[³ H]CGS21680 [10 nM]	[³ H]MSX-2 [1 nM] bzw. [³ H]ZM241385 [1 nM]
Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	100	100 1370 ± 100	100 463 ± 32	100 2350 ± 250	100 5020 ± 1510 100 410 ± 97
RS + 10 mM MβCD	50	86 ± 2** (P = 0,0016) (n = 6)	82 ± 3^{ns} (P = 0,0525)	75 ± 4** (P = 0,0078) (n = 6)	56 ± 7* (P = 0,0211) 83 ± 9^{ns} (P = 0,3620)
RS + 20 mM MβCD	27	98 ± 0^{ns} (P = 0,1351)	77 ± 8* (P = 0,0203)	65 ± 4** (P = 0,0047)	57 ± 13** (P = 0,0073)
RS + 40 mM MβCD	13	86 ± 1** (P = 0,0071)	70 ± 2** (P = 0,0061)	59 ± 5** (P = 0,0024)	45 ± 5** (P = 0,0085)

** (0,001 < P < 0,01), * (0,01 < P < 0,05), ns (P > 0,05) vs. Kontrolle

Wie in Tab. 2-1 und Abb. 2-1 deutlich zu erkennen ist, geht der geringere Cholesterol-Gehalt mit einer Verringerung der spezifischen Bindung der ausgewählten Radioliganden einher. Die Daten sind dabei auf die spezifische Bindung der Kontrolle (unbehandelte Rattenstriatum-Membranpräparation) bezogen, die gleich 100 % wurde. Die *counts per minute* (cpm) sinken parallel zum Cholesterol-Gehalt. Eine genauere Betrachtung der Rohdaten ergab, dass sich nur die Gesamtbindung veränderte, die unspezifische Bindung blieb hingegen stabil.

Bereits der Einsatz von 10 mM MβCD senkte die spezifische Bindung der A₁- und A_{2A}-selektiven Radioliganden ab. Dabei wurde die spezifische Bindung der A_{2A}-Liganden stärker beeinflusst als die der A₁-Liganden. Der stärkste Effekt wurde beim A_{2A}-Antagonisten [³H]MSX-2 beobachtet. Im Vergleich zur Kontrolle wurde die spezifische Bindung des Radioliganden [³H]MSX-2 um mehr als 40 % auf 56 ± 7 % und die des Agonist-Radioliganden [³H]CGS21680 um fast 30 % auf 75 ± 4 % gesenkt. Es ist ein Trend zu einer weiteren leichten Reduzierung der Bindung der Radioliganden mit abnehmendem Cholesterol-Gehalt zu beobachten, mit Ausnahme des Agonist-Radioliganden [³H]CCPA.



Bisher hat nur die Arbeitsgruppe um Pucadyil et al. die spezifische Bindung eines agonistischen und eines antagonistischen Radioliganden in Abhängigkeit vom Cholesterol-Gehalt untersucht. Sie verwendeten den Agonist-Radioliganden [³H]8-OH-DPAT und den Antagonist-Radioliganden [³H]*p*-MPPF am Serotonin_{1A}-Rezeptor (5-HT_{1A}). Durch den Einsatz von 20 mM MβCD konnte die spezifische Rezeptor-Bindung von [³H]8-OH-DPAT auf 88 % im Vergleich zur Kontrolle und die spezifische Bindung von [³H]*p*-MPPF auf 78 % gesenkt werden.^{88, 126} Durch eine Erhöhung der MβCD-Konzentration auf 40 mM konnte die spezifische Bindung weiter gesenkt werden. Die spezifische Bindung des Agonist-Radioliganden verminderte sich auf 47 % und die des Antagonist-Radioliganden auf 61 %.⁸⁸ Während bei einer geringeren Konzentration die spezifische Bindung des Antagonist-Radioliganden stärker beeinflusst wurde, führte eine Erhöhung der MβCD-Konzentration zu einer etwas stärkeren Abnahme der spezifischen Bindung des Agonist-Radioliganden.

Klein et al. verwendeten das Myometrium (Schicht aus glatter Muskulatur der Gebärmutter) eines Meerschweinchens. Sie konnten die spezifische Bindung von [³H]Oxytocin durch den Einsatz einer 100 mg/ml MβCD-Stammlösung (≈ 75 mM) um ca. 93 % auf ca. 7 % vermindern.⁶³

Aus diesen ersten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Verminderung des Cholesterol-Gehaltes einen Effekt auf die spezifische Bindung von Liganden an Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren ausübt. Im Allgemeinen wurde die spezifische Bindung der antagonistischen Radioliganden stärker beeinflusst als die der agonistischen Radioliganden. Dieser Einfluss war an A_{2A}-Rezeptoren deutlich stärker ausgeprägt als an A₁-Rezeptoren. Die beobachteten Effekte können auf Auswirkungen des Cholesterol-Entzugs auf die Affinität und/oder auf die Anzahl der Bindungsstellen, die markiert werden, zurückgeführt werden.

2.2.3. SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE AN RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATIONEN MIT VERMINDERTEM CHOLESTEROL-GEHALT

Nachdem erste Hinweise unter Verwendung einer einzelnen Radioligand-Konzentration vorlagen, sollten im Folgenden Sättigungsexperimente Aufschluss darüber geben, ob der Cholesterol-Gehalt einen Einfluss auf die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D , die ein Maß für die Affinität eines Radioliganden zum Rezeptor darstellt, oder den B_{Max} -Wert, der die max. Anzahl von Rezeptorbindungsstellen beschreibt, ausübt.

Die Sättigungsexperimente wurden entsprechend zu den Konkurrenzexperimenten sowohl an einer mit M β CD behandelten als auch an einer unbehandelten Rattenstriatum-Membranpräparation durchgeführt. Für die Verminderung des Cholesterol-Gehaltes der Membranpräparationen wurde eine M β CD-Konzentration von 10 mM ausgewählt, da durch den Einsatz dieser M β CD-Konzentration bereits eine signifikante Änderung sowohl im Cholesterol-Gehalt als auch in der spezifischen Radioligand-Bindung beobachtet worden war (siehe Kap. 2.2.1. und 2.2.2.). Dadurch sollte untersucht werden, ob bereits der Einsatz einer geringen M β CD-Konzentration einen Einfluss ausüben kann.

Die Sättigungsexperimente wurden jeweils mit 12 verschiedenen Radioligand-Konzentrationen von 0,05 – 10 nM [³H]CCPA, von 0,125 – 40 nM [³H]DPCPX, von 0,5 – 150 nM [³H]CGS21680 und von 0,25 – 30 nM [³H]ZM241385 durchgeführt. Der Radioligand [³H]MSX-2 wurde aufgrund seiner hohen unspezifischen Bindung durch den ebenfalls A_{2A}-selektiven antagonistischen Radioliganden [³H]ZM241385 ersetzt (Strukturformel siehe Kap. 1.6.2.).^{170, 171} Die Bestimmung der unspezifischen Bindung der Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX und [³H]CGS21680 wurde, wie in Kap. 2.2.2. beschrieben, durchgeführt. Für die Ermittlung der unspezifischen Bindung des Radioliganden [³H]ZM241385 wurden 800 μ M NECA eingesetzt.

Die Ergebnisse aus den durchgeführten Sättigungsexperimenten sind in Tab. 2-2

zusammengefasst und die Sättigungskurven in Abb. 2-2 dargestellt. Abb. 2-3 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse.

Es wird deutlich, dass die Verminderung des Cholesterol-Gehaltes zu einer Reduzierung der max. Anzahl von Bindungsstellen (B_{Max}) und einer Veränderung der Affinität der Radioliganden (K_D) zum jeweiligen Rezeptor führt.

Tab. 2-2. K_D - und B_{Max} -Werte der Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]ZM241385 an unbehandelten Rattenstriatum-Membranpräparationen (Kontrollen) im Vergleich zu mit 10 mM M β CD behandelten Membranpräparationen (n=3).

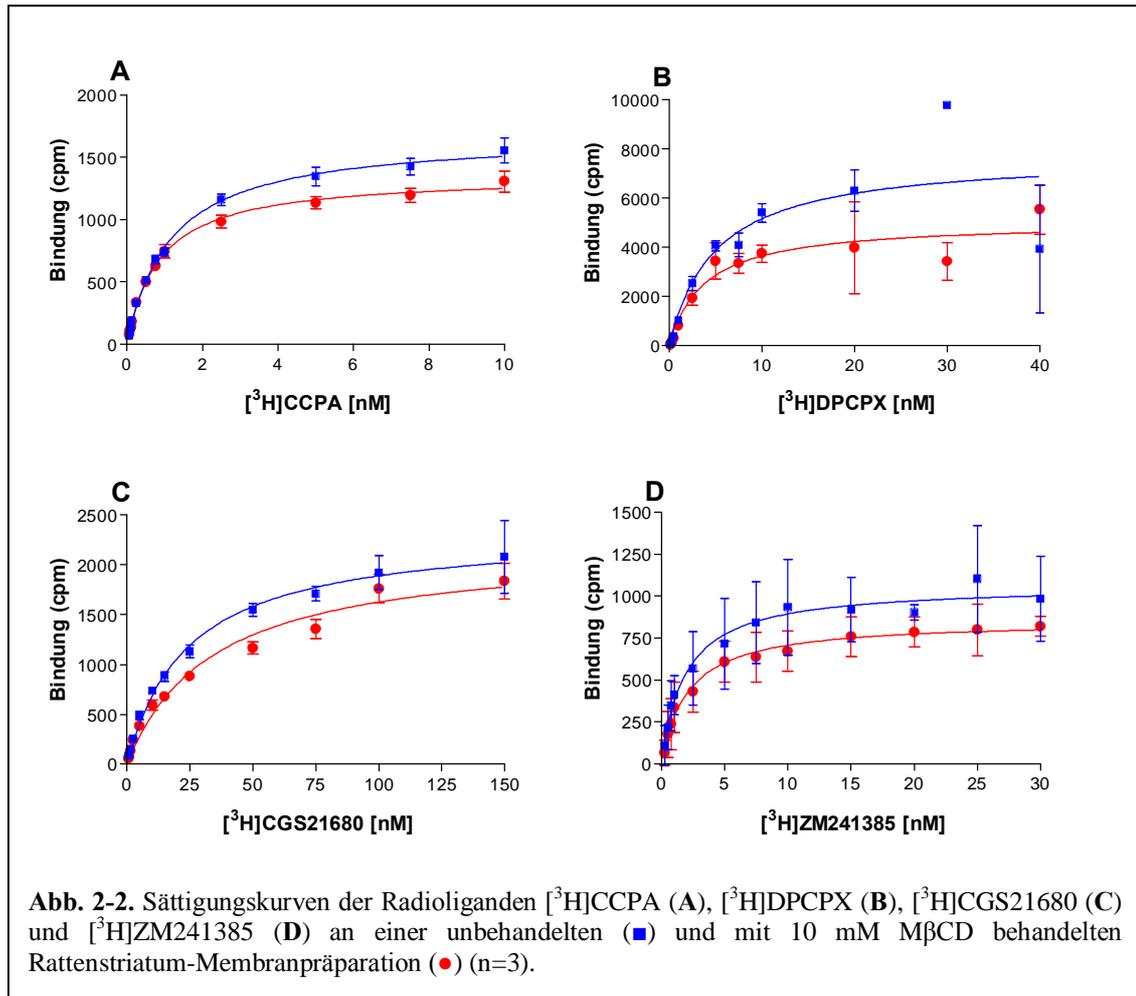
Radioligand	K_D -Wert \pm SEM [nM]		B_{Max} -Wert \pm SEM [fmol/mg Protein]		Reduktion B_{Max} [% \pm SEM]
	Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	RS + 10 mM M β CD	Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	RS + 10 mM M β CD	
[³ H]CCPA	1,17 \pm 0,03	0,87 \pm 0,03** (P = 0,0031)	846 \pm 39	685 \pm 20* (P = 0,0219)	81 \pm 2
[³ H]DPCPX	6,2 \pm 1,0	3,9 \pm 0,7 ^{ns} (P = 0,1187)	1570 \pm 65	933 \pm 15*** (P = 0,0007)	59 \pm 2
[³ H]CGS21680	24,7 \pm 2,7	34,3 \pm 1,5* (P = 0,0356)	1210 \pm 63	1120 \pm 42 ^{ns} (P = 0,330)	93 \pm 4
[³ H]ZM241385	2,2 \pm 0,6	2,4 \pm 0,8 ^{ns} (P = 0,8115)	1530 \pm 79	1230 \pm 26* (P = 0,028)	81 \pm 6

*** (P < 0,001), ** (0,001 < P < 0,01), * (0,01 < P < 0,05), ns (P > 0,05) vs. Kontrolle

Analog zu den Ergebnissen aus Kap. 2.2.2. lässt sich ein Unterschied zwischen den Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren erkennen. Während die Affinität der A₁-selektiven Radioliganden zum Rezeptor zunimmt – ausgedrückt in einer Abnahme des K_D -Wertes – sinkt die Affinität der A_{2A}-selektiven Radioliganden. Für den tritiierten A₁-Agonisten [³H]CCPA wurde vor der Behandlung mit M β CD ein K_D -Wert von 1,17 nM ermittelt. Die Arbeitsgruppe um Klotz et al. gab für [³H]CCPA einen K_D -Wert von 0,2 nM, allerdings am ganzen Rattenhirn, an.¹⁶⁴ Ein direkter Vergleich mit Literaturdaten, die im gleichen System ermittelt wurden, ist an dieser Stelle leider nicht möglich. Frau Dr. Ulrike Reith bestimmte in Sättigungsexperimenten am humanen Cortex-Gewebe für [³H]CCPA einen K_D -Wert von 3,8 nM.²⁷⁵ Nach der Behandlung mit M β CD sank der am Rattenstriatum ermittelte K_D -Wert von 1,17 nM auf einen Wert von 0,87 nM in statistisch signifikanter Weise (**, P = 0,0031).

Diese Absenkung des K_D -Wertes nach Inkubation mit M β CD traf auch auf den Antagonisten [³H]DPCPX zu, allerdings erreichte die Veränderung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante aufgrund hoher Standardabweichungen keine statistische Signifikanz (6,2 nM gegenüber 3,9 nM). Lohse et al. publizierten für [³H]DPCPX einen K_D -Wert von 0,18 nM und Lopes et al.

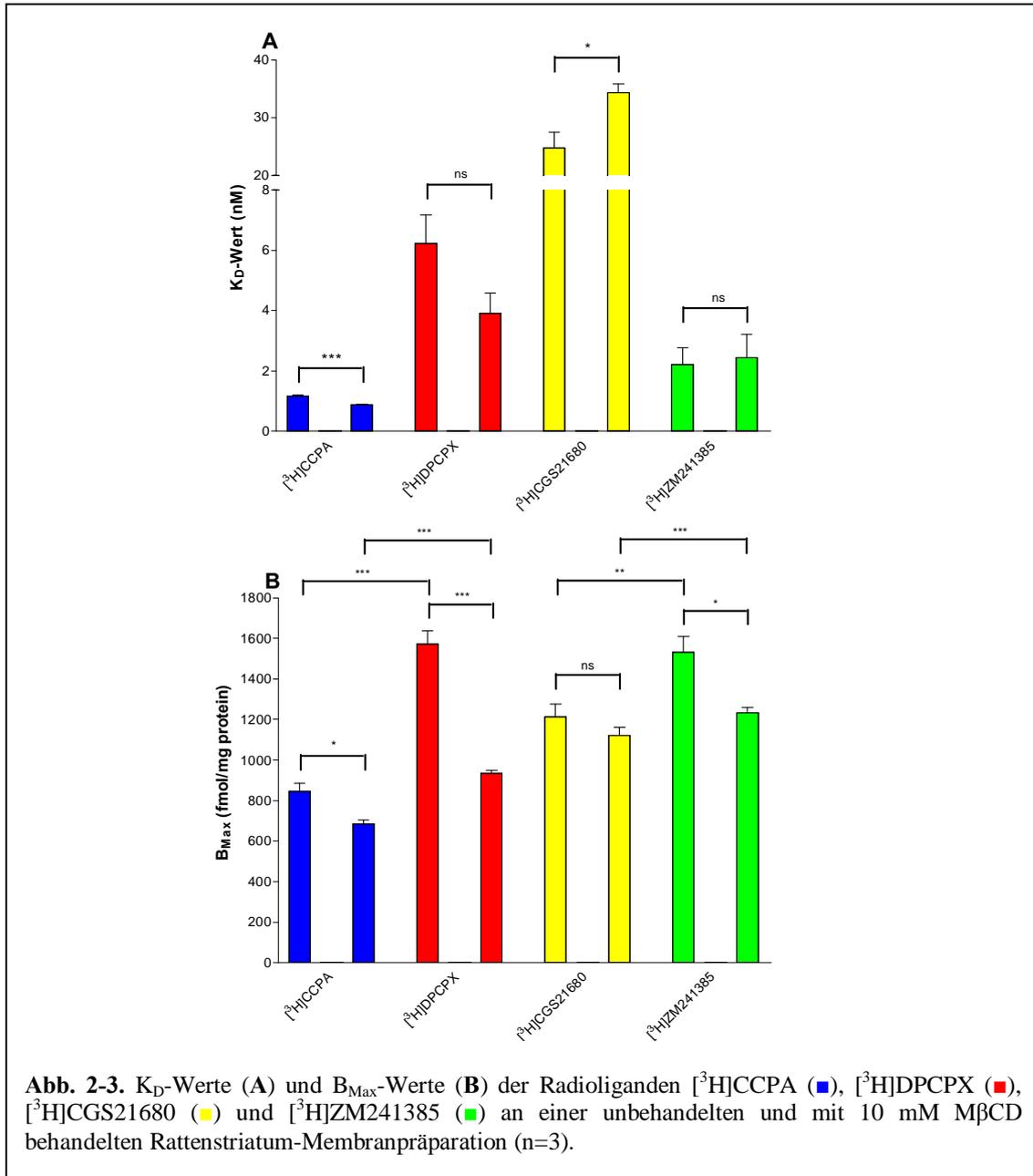
einen K_D -Wert von 2,9 nM.¹⁶³ Allerdings wurden die Sättigungsexperimente von Lohse et al. ebenfalls nicht am Rattenstriatum, sondern am ganzen Rattenhirn durchgeführt. Lopes et al. verwendeten hingegen Mauscortex-Membranpräparationen.



Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante der A_{2A}-selektiven Radioliganden [³H]CGS21680 und [³H]ZM241385 erhöhten sich von 24,7 nM auf 34,3 nM bzw. von 2,2 nM auf 2,4 nM, allerdings war nur die Zunahme des K_D -Wertes des agonistischen Radioliganden statistisch signifikant. Verglichen mit den Literaturdaten waren die K_D -Werte von [³H]CGS21680 und [³H]ZM241385 ein wenig höher. Jarvis et al. gaben für [³H]CGS21680 einen K_D -Wert von 15,5 nM (Rattenstriatum), Alexander et al. für [³H]ZM241385 einen K_D -Wert von 0,84 nM (Rattenstriatum) an.^{171, 173} Frau Dr. Ulrike Reith ermittelte für den Radioliganden [³H]ZM241385 einen geringfügig höheren K_D -Wert von 1,2 nM am humanen Striatum-Gewebe (Caudate und Putamen).²⁷⁵

Die max. Anzahl der Bindungsstellen wurde unabhängig vom Rezeptor und der intrinsischen

Aktivität der Radioliganden vermindert. Dabei fiel allerdings auf, dass die B_{Max}-Werte der antagonistischen Radioliganden nach Cholesterol-Entzug in größerem Maße verringert wurden. Der B_{Max}-Wert von [³H]DPCPX wurde auf 59 % des Ausgangswertes abgesenkt und der B_{Max}-Wert von [³H]ZM241385 auf 81 %.



Der mit dem Agonist-Radioliganden [³H]CCPA ermittelte B_{Max} für A₁-Rezeptoren von 846 fmol/mg Protein sank nach MβCD-Behandlung in statistisch signifikanter Weise um fast 20 % auf einen Wert von 685 fmol/mg Protein. Der mit dem A₁-Antagonisten [³H]DPCPX ermittelte B_{Max}-Wert von 1570 fmol/mg Protein verringerte sich signifikant um mehr als 40 % auf 933

fmol/mg Protein. Die B_{Max}-Werte der A_{2A}-selektiven Radioliganden verminderten sich um fast 10 % von 1210 auf 1120 fmol/mg Protein ([³H]CGS21680) bzw. um fast 20 % von 1530 auf 1230 fmol/mg Protein ([³H]ZM241385), wobei sich allerdings nur die B_{Max}-Werte von [³H]ZM241385 statistisch signifikant unterschieden.

Betrachtet man die Abb. 2-3 genauer, so wird deutlich, dass die Anzahl an A₁- und A_{2A}-Rezeptoren im Rattenstriatum ähnlich hoch ist. Von den Antagonist-Radioliganden [³H]DPCPX und [³H]ZM241385 wird in etwa die gleiche Anzahl von Rezeptoren erkannt (933 ± 15 fmol/mg Protein bzw. 1230 ± 26 fmol/mg Protein). Durch die Agonist-Radioliganden [³H]CCPA und [³H]CGS21680 wird eine deutlich geringere Zahl von Rezeptoren markiert (685 ± 20 fmol/mg Protein bzw. 1120 ± 42 fmol/mg Protein). Der Cholesterol-Entzug führt zu einer starken Verminderung der durch Antagonist-Radioliganden erkannten Rezeptoren. Es wurde in etwa der Wert erreicht, der für die Agonist-Radioliganden vor der MβCD-Behandlung ermittelt wurde. Nun stellt sich die Frage, warum Antagonisten wesentlich mehr Bindungsstellen erkennen als Agonisten. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass Agonisten nur an die aktive Rezeptorkonformation (R*) binden, während Antagonisten sowohl eine Affinität zur aktiven als auch zur inaktiven Konformation (R) des Rezeptors aufweisen.²⁷⁶ Eine Verschiebung des Gleichgewichts von R* nach R kann nicht als Grund angeführt werden, warum nun die Anzahl der mit Antagonisten detektierten Rezeptoren nach Cholesterol-Entzug auf das Niveau der Agonist-Radioliganden absinkt. Sonst würde sich der B_{Max}-Wert nur für den Agonisten, aber nicht für den Antagonisten ändern. Möglicherweise liegen die Rezeptoren in Clustern zusammen. Ein Antagonist erkennt sowohl die ungeclusterten als auch die geclusterten Rezeptoren, während Agonisten nur an die ungeclusterten Rezeptoren binden. Cholesterol-Entzug könnte sich in größerem Maße auf die Clusterbildung auswirken als auf die ungeclusterten Rezeptoren. Womöglich spielt Cholesterol dort eine größere Rolle. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum die max. Anzahl an Bindungsstellen, die von Antagonisten erkannt werden, in stärkerer Weise abnimmt.

Die B_{Max}-Werte der agonistischen und antagonistischen Radioliganden sowohl des A₁- als auch des A_{2A}-Rezeptors unterscheiden sich in statistisch signifikanter Weise, sowohl vor als auch nach Behandlung mit MβCD (vgl. Abb. 2-3). Während die Affinität der A₁-selektiven Radioliganden nach Cholesterolentzug zunahm, sank die max. Anzahl der A₁-Bindungsstellen und zwar in stärkerem Maße als die der A_{2A}-Rezeptoren. Die Affinität der A_{2A}-selektiven Radioliganden nahm hingegen ab. Die geringere Anzahl an Rezeptoren, die durch A₁-Liganden erkannt werden, wird zumindest teilweise durch eine erhöhte Rezeptoraffinität kompensiert. Bei den A_{2A}-Rezeptoren beobachtet man hingegen diese Kompensation nicht, weshalb Cholesterol-Entzug in Bindungsstudien einen sehr viel stärkeren Effekt auf striatale A_{2A}-Rezeptoren ausübt

als auf A₁-Rezeptoren (siehe Abb. 2-1). Somit kann für Cholesterol ein allosterischer Effekt postuliert werden, der sich in einer veränderten Rezeptoraffinität für Agonisten auswirkt. Dies wurde bereits von Klein et al. vermutet (siehe unten).⁶³ Vermutlich kommt es zu einer Änderung der Rezeptorkonformation durch Entzug des Cholesterols.

Die Arbeitsgruppe um Pucadyil et al. fanden für den 5-HT_{1A}-selektiven Agonist-Radioliganden [³H]8-OH-DPAT und den Antagonist-Radioliganden [³H]p-MPPF ebenfalls eine Reduktion in der max. Anzahl von Bindungsstellen nach MβCD-Behandlung (40 mM MβCD). Der B_{Max}-Wert von [³H]8-OH-DPAT am Meerschweinchen-Myometrium verringerte sich um 29 % von 124 ± 13 fmol/mg Protein auf 88 ± 5 fmol/mg Protein und der B_{Max}-Wert von [³H]p-MPPF um 31 % von 302 ± 8 fmol/mg Protein auf 208 ± 10 fmol/mg Protein. Auch hier zeigte sich, dass durch den antagonistischen Radioliganden mehr Bindungsstellen erfasst werden als durch den Agonisten. Eine Begründung dafür wurde hingegen nicht geliefert. Des Weiteren nimmt analog zu unseren Daten die max. Anzahl an Bindungsstellen des antagonistischen Radioliganden in größerem Maße ab als die des Agonisten. Die Abnahme des B_{Max}-Wertes des antagonistischen Radioliganden [³H]p-MPPF war statistisch signifikant (*, P < 0,05).

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante wurde kaum beeinflusst. Sowohl die Affinität des Agonisten [³H]8-OH-DPAT als auch des Antagonisten [³H]p-MPPF zum Rezeptor verringerte sich nach Verminderung des Cholesterol-Gehaltes einer Rinder-Hippocampus-Membranpräparation. Der K_D-Wert des agonistischen Radioliganden erhöhte sich von 0,39 nM auf 0,53 nM, der K_D-Wert des antagonistischen Radioliganden von 0,94 nM auf 1,08 nM.^{88, 126}

Monastyrskaya et al. führten Sättigungsexperimente mit dem Neurokinin-1-Rezeptor-selektiven Antagonist-Radioliganden [³H]SR-14033 an ganzen HEK-Zellen durch, die den NK1-Rezeptor stabil exprimierten. Nach Inkubation mit 2 % MβCD konnten sie eine Abnahme des B_{Max}-Wertes von 1248 ± 70 fmol/mg Protein auf 1080 fmol/mg Protein detektieren. Analog zu den Experimenten von Pucadyil et al. wurde die Affinität des Antagonist-Radioliganden zum Rezeptor verringert (0,36 ± 0,08 nM vor Behandlung im Vergleich zu 0,78 ± 0,12 nM).¹¹⁹

Welche Unterschiede allerdings zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestehen können, zeigen unter anderem die Untersuchungen von Bari et al.. Sättigungsexperimente mit dem agonistischen Cannabinoid-Rezeptor-Radioliganden [³H]CP55,940 an Membranpräparationen von Ratten-C6-Glioma-Zellen, die mit 2,5 mM MβCD behandelt worden waren, zeigten eine Verdoppelung der max. Anzahl an Bindungsstellen, während der K_D-Wert nicht beeinflusst wurde.¹¹⁷ Klein et al. führten Sättigungsexperimente mit dem Agonist-Radioliganden [³H]Oxytocin am Meerschweinchen-Myometrium durch und fanden bei Verwendung einer mit MβCD behandelten Membran (75 mM), eine Verringerung der Affinität des Radioliganden zum

Oxytocin-Rezeptor ($1,5 \pm 0,1$ nM gegenüber 131 ± 9 nM). Die max. Anzahl der Bindungsstellen wurde hingegen nicht beeinflusst.⁶³

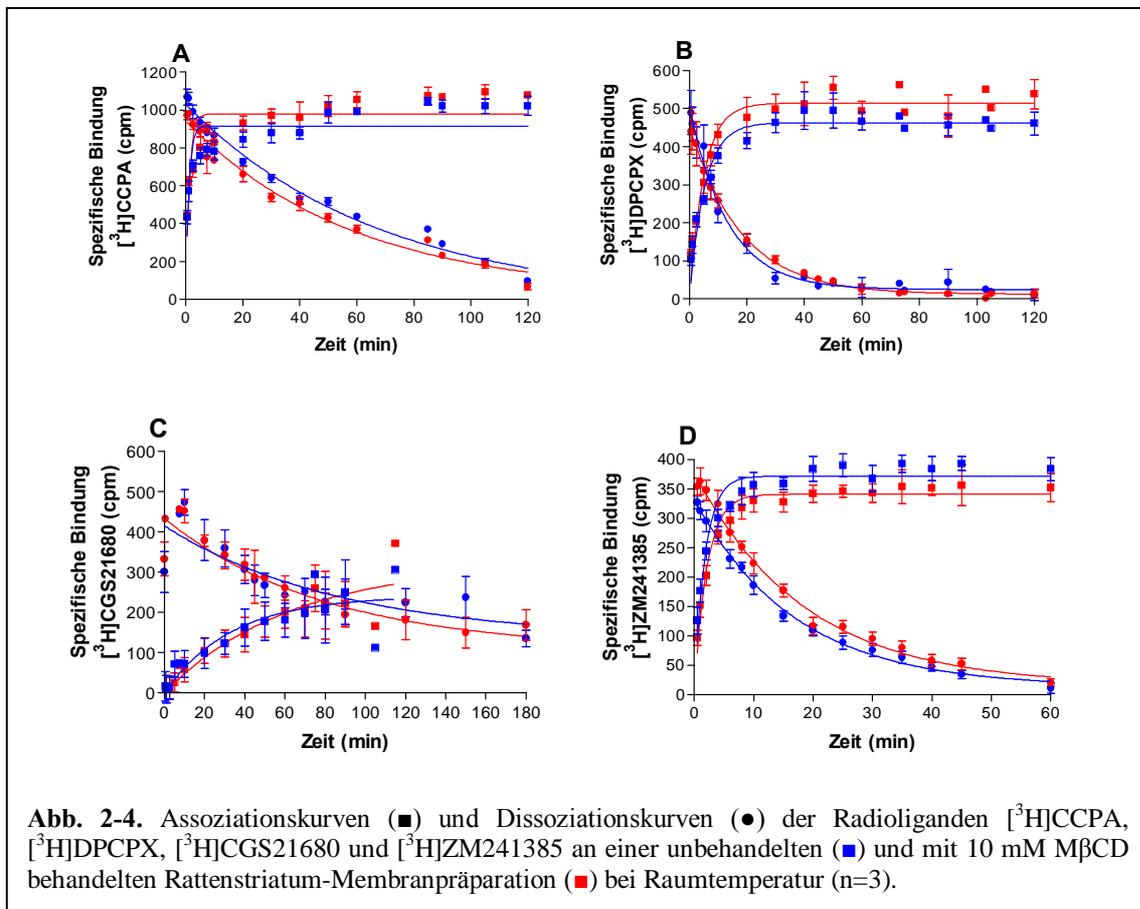
Somit kann der Einfluss des Cholesterolgehaltes auf den K_D -Wert bzw. den B_{Max} -Wert an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nicht verallgemeinert werden, sondern muss für jeden Rezeptor separat untersucht und betrachtet werden. Es kann allerdings festgehalten werden, dass der Cholesterolgehalt der Zellmembranen modulatorische Effekte auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auszuüben scheint. Dabei macht es offenbar keinen Unterschied, ob ganze Zellen oder Membranpräparationen von Zellen oder von nativem Gewebe verwendet werden.

2.2.4. KINETIKEXPERIMENTE AN RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATIONEN MIT VERMINDERTEM CHOLESTEROL-GEHALT

In der Literatur ist bis dato ein Effekt von Cholesterolgehalt auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vor allem anhand von Kompetitions- und Sättigungsexperimenten untersucht worden. Aus diesem Grund sollte im Folgenden durch kinetische Experimente ermittelt werden, ob der verminderte Cholesterolgehalt neben einem Einfluss auf die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D und der max. Anzahl von Rezeptorbindungsstellen B_{Max} auch einen Effekt auf die Geschwindigkeit der Radioligand-Rezeptor-Interaktion besitzt. Diese wird durch den kinetischen K_D -Wert ausgedrückt. Um die Ergebnisse aus Sättigungsexperimenten mit denen aus Kinetikexperimenten vergleichen zu können, wurde eine Rattenstriatum-Membranpräparation ebenfalls mit 10 mM M β CD behandelt und es wurden dieselben Radioliganden ($[^3H]$ CCPA, $[^3H]$ DPCPX, $[^3H]$ CGS21680 und $[^3H]$ ZM241385) verwendet.

Bei Kinetik-Experimenten soll die eingesetzte Radioligand-Konzentration in etwa den in Sättigungsexperimenten ermittelten K_D -Werten entsprechen. Aus diesem Grund wurden $[^3H]$ CCPA und $[^3H]$ DPCPX in einer Konzentration von 0,5 nM, $[^3H]$ CGS21680 in einer Konzentration von 16 nM und $[^3H]$ ZM241385 in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt (vgl. Literaturdaten).^{163, 164, 169, 172} Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei den Assoziationsexperimenten wird der Radioligand zeitversetzt zum Reaktionsansatz pipettiert und somit die zeitabhängige Bindung des Radioliganden zum Rezeptor beobachtet. Die Assoziation der Radioliganden $[^3H]$ CCPA und $[^3H]$ DPCPX wurde über einen Zeitraum von 120 min beobachtet, die des Radioliganden $[^3H]$ CGS21680 über 90 min und die des $[^3H]$ ZM241385 über einen Zeitraum von 60 min. Aus den Dissoziationsexperimenten lässt sich der zeitabhängige Zerfall eines Radioligand-Rezeptor-Komplexes, der sich nach einer festgelegten Vorinkubationszeit gebildet hat, durch die Zugabe eines Kaltliganden ermitteln.

Nach einer Vorinkubationszeit von 60 min wurde der [³H]CCPA-Rezeptor-Komplex durch die Zugabe von 10 μM CADO und der [³H]CGS21680-Rezeptor-Komplex durch die Zugabe von 800 μM CADO über einen Zeitraum von 120 bzw. 180 min dissoziiert. Die Vorinkubationszeit, in der sich der Radioligand-Rezeptor-Komplex mit [³H]DPCPX bilden kann, betrug 90 min. Zur Dissoziation dieses Komplexes wurden 10 μM DPCPX zu verschiedenen Zeitpunkten hinzu gegeben und die Dissoziation über einer Zeitdauer von 120 min betrachtet. Der Zerfall des [³H]ZM241385-Rezeptor-Komplexes wurde nach einer Vorinkubationszeit von 10 min durch die Zugabe von 800 μM NECA über einen Zeitraum von 60 min beobachtet.



Wie in Abb. 2-4. deutlich zu erkennen ist, stellt sich das Gleichgewicht der Radioligand-Rezeptor-Bindung bei dem Radioliganden [³H]CCPA bereits nach ca. 10 min ein und bleibt für mindestens 120 min stabil. Kinetikexperimente mit dem Radioliganden [³H]ZM241385 zeigten, dass dieser ebenso schnell an den Rezeptor bindet; das Gleichgewicht wurde für mindestens 60 min beibehalten. Beim [³H]DPCPX und [³H]CGS21680 trat das Gleichgewicht erst nach 40 bzw. 80 min ein, blieb aber auch über einen Zeitraum von mindestens 120 bzw. 90 min stabil.

Die nach einer Vorinkubation gebildeten Radioligand-Rezeptor-Komplexe konnten durch die

Zugabe des Kaltliganden wieder zerstört werden. Die Dissoziation der antagonistischen Radioliganden erfolgte schneller als die der agonistischen Radioliganden. Nach einem Zeitraum von 60 min waren [³H]DPCPX und [³H]ZM241385 vollständig vom Rezeptor dissoziiert, während [³H]CCPA und [³H]CGS21680 teilweise bis zu 180 min benötigten.

Tab. 2-3. Vergleich der K_D-Werte aus Sättigungsexperimenten mit den kinetischen K_D-Werten aus Kinetikexperimenten der Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]ZM241385, ermittelt an einer unbehandelten Rattenstriatum-Membranpräparation (Kontrolle) und einer mit 10 mM MβCD behandelten Membranpräparation (n=3).

Radioligand	K _D -Wert ± SEM [nM] aus Sättigungsexperimenten		kin. K _D -Wert ± SEM [nM] mit K _{on} ± SEM [min ⁻¹ *nM ⁻¹] und K _{off} ± SEM [min ⁻¹] aus Kinetikexperimenten	
	Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	RS + 10 mM MβCD	Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	RS + 10 mM MβCD
[³ H]CCPA	1,17 ± 0,03	0,87 ± 0,03** (P = 0,0031)	0,18 ± 0,05 K _{on} : 0,073 ± 0,001 K _{off} : 0,013 ± 0,003	0,17 ± 0,06 ^{ns} (P = 0,8700) K _{on} : 0,079 ± 0,003 K _{off} : 0,013 ± 0,002
[³ H]DPCPX	6,2 ± 1,0	3,9 ± 0,7 ^{ns} (P = 0,1187)	0,18 ± 0,22 K _{on} : 0,342 ± 0,047 K _{off} : 0,060 ± 0,006	0,22 ± 0,02 ^{ns} (P = 0,3812) K _{on} : 0,356 ± 0,036 K _{off} : 0,078 ± 0,002
[³ H]CGS21680	24,7 ± 2,7	34,3 ± 1,5* (P = 0,0356)	28,4 ± 10,6 K _{on} : 0,0007 ± 0,0002 K _{off} : 0,018 ± 0,0007	40,5 ± 15,2 ^{ns} (P = 0,4687) K _{on} : 0,0005 ± 0,0002 K _{off} : 0,018 ± 0,0017
[³ H]ZM241385	2,2 ± 0,6	2,4 ± 0,8 ^{ns} (P = 0,8115)	0,14 ± 0,03 K _{on} : 0,374 ± 0,017 K _{off} : 0,054 ± 0,002	0,19 ± 0,015* (P = 0,0405) K _{on} : 0,308 ± 0,014 K _{off} : 0,059 ± 0,003

*** (P < 0,001), ** (0,001 < P < 0,01), * (0,01 < P < 0,05), ns (P > 0,05) vs. Kontrolle

Im Allgemeinen lieferten die kinetischen Experimente geringere K_D-Werte als die Sättigungsexperimente (siehe Tab. 2-3), mit Ausnahme des Radioliganden [³H]CGS21680. Für diesen war der kinetische K_D-Wert fast identisch mit dem aus Sättigungsexperimenten. Man könnte die Inkubationszeit von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]CCPA auf 20 min, mit [³H]DPCPX auf 30 min und mit [³H]ZM241385 auf 10 min verkürzen. Das Gleichgewicht des [³H]CGS21680-Rezeptor-Komplexes hat sich hingegen nach 60 min noch nicht vollständig ausgebildet. Somit sollte die Inkubationszeit von [³H]CGS21680 auf 90 min verlängert werden.

Die Veränderungen im kinetischen K_D-Wert nach Behandlung der Rattenstriatum-

Membranpräparationen waren nicht so ausgeprägt wie bei den Sättigungsexperimenten. Es konnte in den meisten Fällen kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Es hat sich gezeigt, dass sich die K_{on} -Werte der A₁-Radioliganden nach M β CD-Behandlung erhöhten, die der A_{2A}-Radioliganden sich aber verminderten. Die K_{off} -Werte der Agonist-Radioliganden zeigten keine Veränderung, die K_{off} -Werte der antagonistischen Radioliganden stiegen hingegen an.

Die für [³H]CCPA ermittelten kinetischen K_D -Werte betragen $0,18 \pm 0,05$ nM ($K_{on} = 0,073 \pm 0,001$ min⁻¹*nM⁻¹, $K_{off} = 0,013 \pm 0,003$ min⁻¹) bzw. $0,17 \pm 0,06$ nM ($K_{on} = 0,079 \pm 0,003$ min⁻¹*nM⁻¹, $K_{off} = 0,013 \pm 0,002$ min⁻¹). Die Affinität des A₁-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CCPA nahm nur geringfügig zu. Die Affinität des A₁-selektiven antagonistischen Radioliganden [³H]DPCPX verringerte sich nur leicht. Für diesen Radioliganden wurden kinetische K_D -Werte von $0,18 \pm 0,22$ nM ($K_{on} = 0,342 \pm 0,047$ min⁻¹*nM⁻¹, $K_{off} = 0,060 \pm 0,006$ min⁻¹) bzw. $0,22 \pm 0,02$ nM ($K_{on} = 0,356 \pm 0,036$ min⁻¹*nM⁻¹, $K_{off} = 0,078 \pm 0,002$ min⁻¹) ermittelt. Die Affinitäten der A_{2A}-selektiven Radioliganden [³H]CGS21680 und [³H]ZM241385 wurden leicht vermindert. In Kinetikexperimenten mit dem agonistischen Radioliganden [³H]CGS21680 wurden kinetische K_D -Werte von $28,4 \pm 10,6$ nM ($K_{on} = 0,0007 \pm 0,0002$ min⁻¹*nM⁻¹, $K_{off} = 0,018 \pm 0,0007$ min⁻¹) bzw. $40,5 \pm 15,2$ nM ($K_{on} = 0,0005 \pm 0,0002$ min⁻¹*nM⁻¹, $K_{off} = 0,018 \pm 0,0017$ min⁻¹) ermittelt. In Experimenten mit dem antagonistischen Radioliganden [³H]ZM241385 wurden kinetische K_D -Werte von $0,14 \pm 0,03$ nM ($K_{on} = 0,374 \pm 0,017$ min⁻¹*nM⁻¹, $K_{off} = 0,054 \pm 0,002$ min⁻¹) bzw. $0,19 \pm 0,02$ nM ($K_{on} = 0,308 \pm 0,014$ min⁻¹*nM⁻¹, $K_{off} = 0,059 \pm 0,003$ min⁻¹) bestimmt. Die Änderung der kinetischen K_D -Werte, ebenso wie der Assoziations- und Dissoziationskonstanten (K_{on} und K_{off}), durch die Verminderung des Cholesterol-Gehaltes waren bis auf die K_D -Werte (sowie K_{on} -Werte, * ($P = 0,0428$)) des Radioliganden [³H]ZM241385 nicht statistisch signifikant.

Aus den Kurvenverläufen der Assoziation und Dissoziation lässt sich zwar eine Änderung in der spezifischen Bindung der Radioliganden erkennen, allerdings hatte diese kaum einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Radioligand-Rezeptor-Interaktion. Da noch keine Publikationen zu Kinetikexperimenten an Membranpräparationen mit einem veränderten Cholesterol-Gehalt erschienen sind, können an dieser Stelle keine Vergleiche durchgeführt werden.

2.2.5. RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN HUMANEN STRIATUM-MEMBRANPRÄPARATIONEN MIT VERMINDERTEM CHOLESTEROL-GEHALT

Um zu untersuchen, ob M β CD nicht nur den Cholesterol-Gehalt einer Rattenstriatum-Membranpräparation, sondern auch den einer Membranpräparation von humanem Striatum vermindert, wurden die in Kap. 2.2.1. und 2.2.2. dargestellten Versuchsreihen zusätzlich an Humanhirn durchgeführt. Ferner sollte überprüft werden, ob ein möglicherweise geringerer Cholesterol-Gehalt im humanen Striatum im Vergleich zum Rattenstriatum ebenfalls einen Einfluss auf die spezifische Bindung der Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 besitzt. Bei dem verwendeten humanen Striatum handelte es sich um Postmortem-Gewebe eines 79 Jahre alten Mannes. Es stellte Material aus dem Nucleus Caudate und Putamen dar. Svenningsson et al. zeigten durch Autoradiographie-Studien, dass in den Basalganglien, im Nucleus Caudate und Putamen, Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren gleichermaßen exprimiert sind.²⁷⁴ Analog zum Kap. 2.2.2. wurden die kompetitiven Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an einer unbehandelten und einer mit M β CD behandelten Membranpräparation (30 μ g) durchgeführt. Allerdings wurde nur eine einzige Konzentration von 40 mM M β CD eingesetzt.

Tab. 2-4. Vergleich der spezifischen Bindung der Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 an unbehandelten und mit 40 mM behandelten humanen und Rattenstriatum-Membranpräparationen (n=3).

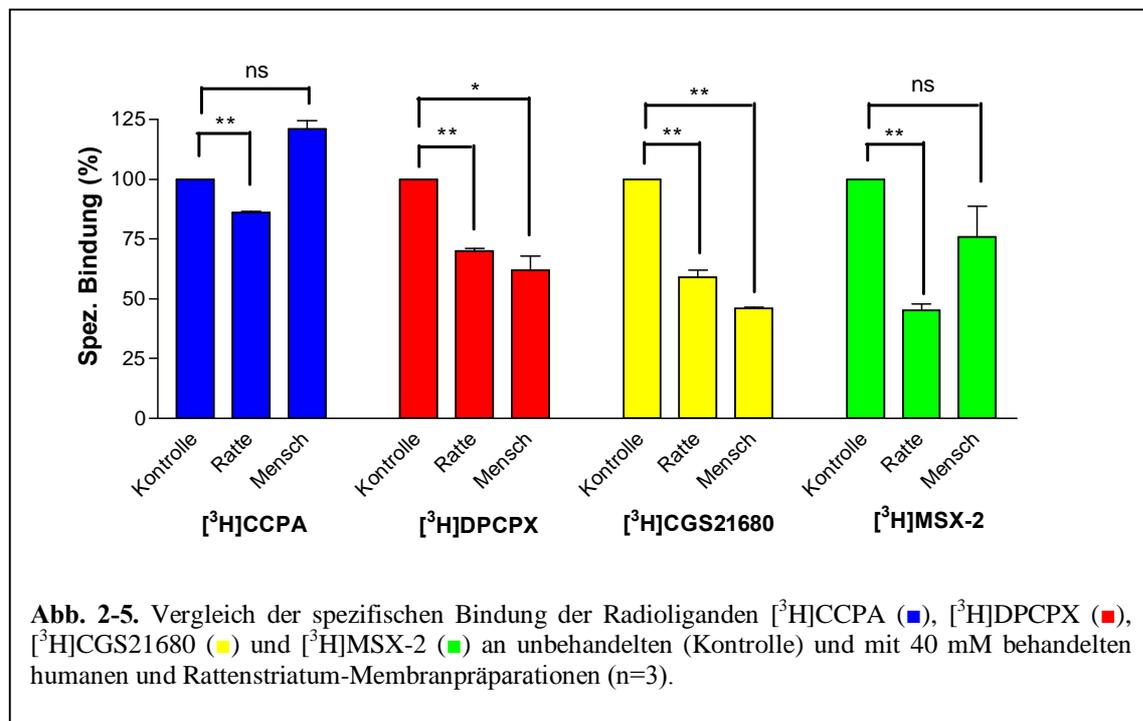
Membranpräparation	Chol.-Gehalt [%]	Spezifische Bindung % \pm SEM bzw. <i>cpm</i> \pm SEM			
		[³ H]CCPA [10 nM]	[³ H]DPCPX [0,4 nM]	[³ H]CGS21680 [10 nM]	[³ H]MSX-2 [1 nM]
Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	100	100 1370 \pm 100	100 463 \pm 32	100 2350 \pm 250	100 5020 \pm 1510
RS + 40 mM M β CD	16	86 \pm 1** (P = 0,0071)	70 \pm 2** (P = 0,0061)	59 \pm 5** (P = 0,0024)	45 \pm 5** (P = 0,0085)
Humanstriatum (HS) (Kontrolle)	100	100 205 \pm 55	100 295 \pm 41	100 96 \pm 14	100 160 \pm 106
HS+ 40 mM M β CD	51	121 \pm 6^{ns} (P = 0,4586)	62 \pm 10* (P = 0,0494)	46 \pm 1** (P = 0,0053)	76 \pm 22^{ns} (P = 0,6238)

** (0,001 < P < 0,01), * (0,01 < P < 0,05), ns (P > 0,05) vs. Kontrolle

In Tab. 2-4 und Abb. 2-5 ist die spezifische Bindung der Radioliganden in Abhängigkeit vom Cholesterol-Gehalt an der humanen und der Rattenstriatum-Membranpräparation dargestellt.

Verglichen mit der Rattenstriatum-Membranpräparation besitzt die Membranpräparation von

humanem Striatum bezogen auf den Gesamt-Protein-Gehalt einen geringen Cholesterol-Gehalt. Ein anfänglicher Cholesterol-Gehalt von 1,94 mmol/g Protein wurde durch Inkubation mit 40 mM M β CD um fast 50 % auf 1 mmol/g Protein verringert. Die Rattenstriatum-Membranpräparation besaß zu Anfang einen Cholesterol-Gehalt von 2,77 mmol/g Protein, der um mehr als 80 % auf 0,45 mmol/g Protein vermindert wurde. Demnach konnte der Rattenstriatum-Membranpräparation durch den Einsatz von 40 mM mehr Cholesterol entzogen werden. Ein Vergleich mit Literaturdaten erwies sich an dieser Stelle als recht schwierig. Meist wurde der Cholesterol-Gehalt im Serum und nicht im Gehirn, z.B. bei Statin-Behandlung, angegeben.^{206, 277-282} Im Ganzhirn mittelalter Mäuse wurde z.B. ein Cholesterol-Gehalt von ca. 85 μ g/mg Protein (210 mmol/g Protein) gefunden.²⁸³ Joseph et al. ermitteln für Striatum-Schnitte ein Cholesterol/Protein-Verhältnis von 0,26.²⁸⁴ Dabei bestimmten sie den Cholesterol-Gehalt der einzelnen Proben und dividierten diesen durch den Protein-Gehalt.²⁸⁴ Eine Umrechnung auf mmol/ g Protein ist an dieser Stelle leider nicht möglich, da Joseph et al. keine Rohdaten angeben haben.



Der unterschiedliche Cholesterol-Gehalt zwischen humanen und Rattenstriatum-Membranpräparationen spiegelte sich teilweise auch in der ermittelten spezifischen Bindung wieder. Die Untersuchungen ergaben, dass die spezifische Bindung der Radioliganden [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 im Rattenstriatum nach Verringerung des Cholesterol-Gehaltes geringfügig stärker abnahm als im humanen Striatum. Die spezifische

Bindung von [³H]CCPA wurde hingegen nur an der Rattenstriatum-Membranpräparation, nicht am humanen Striatum beeinflusst.

Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass am Tier (Ratte) gewonnene Daten zum Einfluss des Cholesterol-Gehaltes auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf den Menschen übertragbar sind. Dies sind die ersten Untersuchungen dieser Art an nativem menschlichem Gewebe.

2.3. RÜCKFÜHRUNG VON CHOLESTEROL IN RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATIONEN MIT VERMINDERTEM CHOLESTEROL-GEHALT

Im vorhergehenden Kapitel wurde der Einfluss eines verminderten Cholesterol-Gehaltes einer Rattenstriatum-Membranpräparation auf die spezifische Bindung von A₁- und A_{2A}-selektiven Radioliganden ausführlich dargestellt. Darauf aufbauend sollte untersucht werden, auf welche Weise Cholesterol in Rattenstriatum mit vermindertem Cholesterol-Gehalt wieder zurückgeführt werden kann und welche Auswirkungen dies auf die spezifische Bindung von tritium-markierten A₁- und A_{2A}-Liganden besitzt.

2.3.1. RÜCKFÜHRUNG VON CHOLESTEROL DURCH DEN EINSATZ VON CHOLESTEROLHALTIGEN LIPOSOMEN

Vom Arbeitskreis von Prof. Dr. Rolf Schubert, Universität Freiburg, Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, wurden uns durch Herrn Dr. Martin Holzer Liposomen zur Verfügung gestellt. Sie setzten sich aus 55 % Ei-Phosphatidyl-Cholin (EPC) und 45 % Cholesterol zusammen. Der Cholesterol-Gehalt der Liposomen-Lösung betrug 22,5 mM in 8 ml Puffer (50 mM Tris-Puffer, pH 7,4).

Liposomen sind kolloidale, kugelförmige Lipidvesikel mit einem wässrigen Kern. Die kleineren Liposomen bestehen meistens nur aus einer Phospholipidschicht, während die größeren mehrere Doppelschichten aufweisen.

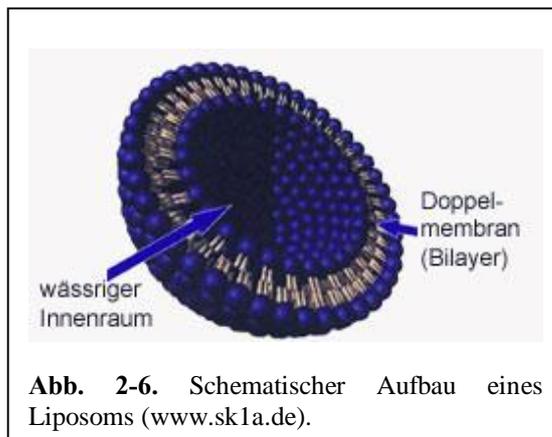


Abb. 2-6. Schematischer Aufbau eines Liposoms (www.sk1a.de).

Sie sind pharmazeutisch interessant, da hydrophile Arzneistoffe in das wässrige Innenvolumen wie auch in die wässrigen Zwischenschichten und hydrophobe Arzneistoffe in die Lipidschicht eingebaut werden können. Cholesterol wird oft zur Stabilisierung hinzugefügt, aber auch um die Arzneistoffliberation zu beeinflussen.^{65, 285} In diesem Fall wurden die Vorteile, die Liposomen als Trägersystem ausmachen, genutzt, um Cholesterol wieder in die Phospholipid-Doppelschicht der Biomembran einzubauen.

2.3.1.1. ZEITABHÄNGIGKEIT DER RÜCKFÜHRUNG VON CHOLESTEROL DURCH LIPOSOMEN

Zunächst wurde der Cholesterol-Gehalt einer Rattenstriatum-Membranpräparation durch Inkubation mit 40 mM M β CD vermindert. Bezogen auf den Cholesterol-Gehalt der behandelten Membranpräparation wurden die Liposomen im 10fachen Überschuss zugesetzt, was einem Cholesterol-Gehalt von 14 mM entspricht (absoluter Cholesterol-Gehalt des behandelten Rattenstriatums: 1,4 mM). Um den genauen Zeitpunkt zu ermitteln, wann die max. Menge an Cholesterol zurückgeführt worden ist, wurden zunächst kinetische Experimente zur Rückführung von Cholesterol durchgeführt. Die behandelte Rattenstriatum-Membranpräparation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit den Liposomen inkubiert (siehe Tab. 2-5). Die Inkubationszeit wurde durch einen Pelletiervorgang abgebrochen. Um sicherzustellen, dass keine Liposomen in der Membranpräparation verblieben sind, die die anschließende Cholesterol-Bestimmung verfälschen könnten, wurde die Präparation drei Mal mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 gewaschen.

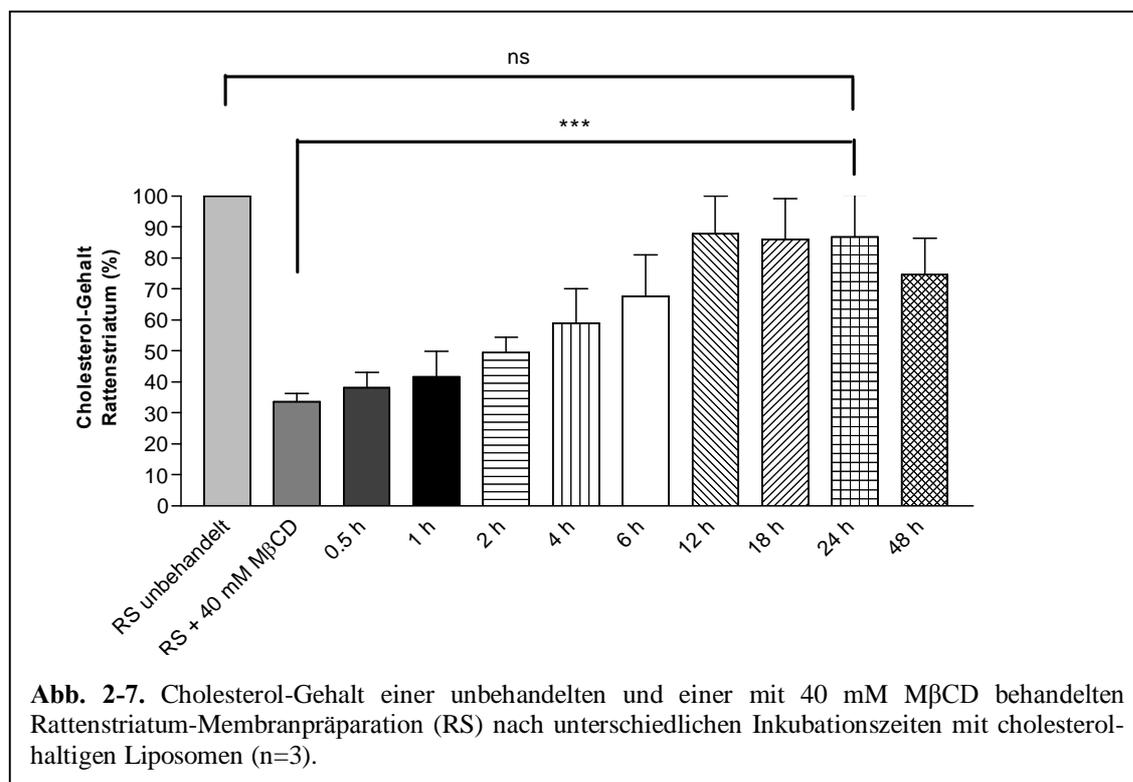
Tab. 2-5. Cholesterol-Gehalt einer mit 40 mM M β CD behandelten Rattenstriatum-Membranpräparation nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit cholesterolhaltigen Liposomen (n=3).

Inkubationszeit [h]	absolute Cholesterol-Konzentration \pm SEM (Rattenstriatum) [mmol/l]*	Cholesterol-Konzentration \pm SEM (Rattenstriatum) [%]
Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	4,3 \pm 0,7	100 \pm 0
RS + 40 mM M β CD (Kontrolle)	1,4 \pm 0,2	33,6 \pm 2,6
0,5	1,6 \pm 0,1	38,2 \pm 4,9
1	1,7 \pm 0,2	41,7 \pm 8,1
2	2,1 \pm 0,2	49,5 \pm 4,9
4	2,4 \pm 0,3	59,0 \pm 11,0
6	2,7 \pm 0,1	67,6 \pm 13,4
12	3,6 \pm 0,2	87,8 \pm 12,2
18	3,5 \pm 0,1	86,0 \pm 13,2
24	3,5 \pm 0,1	86,9 \pm 13,5
48	3,0 \pm 0,2	74,6 \pm 11,9

*Um Verdünnungen zu vermeiden, die eine Abnahme des Cholesterol-Gehaltes imitieren würden, wurde das Rattenstriatum immer mit dem gleichen Volumen an Tris-Puffer gewaschen und im gleichen Volumen resuspendiert.

Aus Tab. 2-5 und Abb. 2-7 geht deutlich hervor, dass bereits nach einer Inkubationszeit von 0,5 h geringe Mengen an Cholesterol in das zuvor cholesterolabgereicherte Rattenstriatum zurückgeführt worden sind ($38,2 \pm 4,9$ % gegenüber $33,6 \pm 2,6$ %). Bei den Angaben zum Cholesterol-Gehalt (mmol/l) handelt es sich um Konzentrationen der hergestellten Suspensionen, die später auf den Protein-Gehalt bezogen werden (siehe Kap. 2.3.1.2.). Um versuchsbedingte Verdünnungen zu vermeiden, die zu einer Abnahme des Cholesterol-Gehaltes führen würden, wurde das eingesetzte Rattenstriatum immer mit dem gleichen Volumen an Tris-Puffer gewaschen und resuspendiert.

Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit konnte der Cholesterol-Gehalt der behandelten Membranpräparation weiter erhöht werden. Nach 24 h wurde allerdings kein Cholesterol mehr zurückgeführt und der Cholesterol-Gehalt von $86,9 \pm 13,5$ % konnte auch durch eine längere Inkubationszeit von 48 h nicht mehr weiter gesteigert werden.

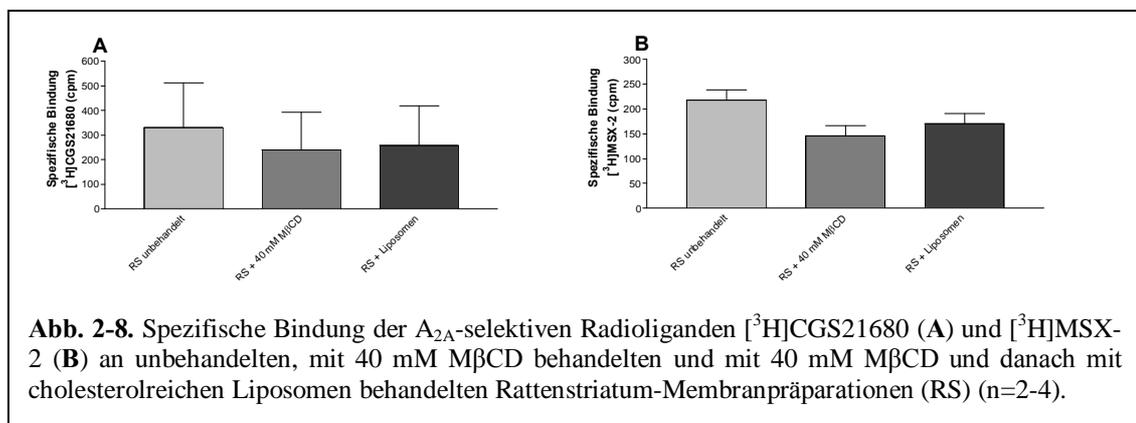


Statistische Untersuchungen haben ergeben, dass Cholesterol quantitativ zurückgeführt wurde, da sich der Cholesterol-Gehalt des unbehandelten und des behandelten Striatums, welches für 24 h mit Liposomen inkubiert worden ist, nicht signifikant unterscheiden. Somit kann eine Inkubationszeit von 24 h für weitere Versuche festgesetzt werden.

2.3.1.2. RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATIONEN NACH RÜCKFÜHRUNG VON CHOLESTEROL (1)

Eine Rattenstriatum-Membranpräparation, welche zuvor mit 40 mM M β CD versetzt worden ist, wurde für 24 h mit den cholesterolhaltigen Liposomen inkubiert, um vorher entferntes Cholesterol wieder zurückzuführen. Bezogen auf den Protein-Gehalt wurde der Cholesterol-Gehalt der unbehandelten Membranpräparation nach Inkubation mit 40 mM M β CD von 1,22 mmol/g Protein auf 0,37 mmol/g Protein verringert. Die geringen Abweichungen zum im Kapitel 2.2.2. angegebenen Cholesterol-Gehalt können damit begründet werden, dass es sich bei der in diesem Versuch verwendeten Membranpräparation um eine andere Rattenhirn-Charge handelt. Durch den Einsatz der cholesterolhaltigen Liposomen konnte der Cholesterol-Gehalt der behandelten Membranpräparation wieder auf seinen ursprünglichen Cholesterol-Gehalt gebracht werden (1,24 mmol/g Protein).

Daraufhin wurden an diesen Membranpräparationen Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit den A_{2A}-selektiven Radioliganden [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 durchgeführt.



Erste Vorversuche haben gezeigt, dass die spezifische Bindung in einer Rattenstriatum-Membranpräparation mit vermindertem Cholesterol-Gehalt sinkt (Vergleich siehe Kap. 2.2.2.). Wird Cholesterol zurückgeführt, so hat dies wiederum einen leichten Anstieg der spezifischen Bindung zur Folge. Da aber befürchtet wurde, dass die lange Inkubationszeit von 24 h bei RT einen Einfluss auf die Membranpräparation und somit auch auf die Rezeptoren haben könnte, wurde noch eine weitere Methode, um Cholesterol zurückzuführen, untersucht (siehe Kap. 2.3.2.). Prinzipiell eignen sich jedoch cholesterolhaltige Liposomen, um Cholesterol in Membranen wieder zurückzuführen; allerdings sind lange Inkubationszeiten erforderlich.

2.3.2. RÜCKFÜHRUNG VON CHOLESTEROL DURCH DEN EINSATZ EINES M β CD-CHOLESTEROL-KOMPLEXES

2.3.2.1. HERSTELLUNG UND OPTIMIERUNG DES M β CD-CHOLESTEROL-KOMPLEXES

Um einen M β CD-Cholesterol-Komplex herzustellen, wurden zwei verschiedene Methoden untersucht. Zunächst wurde die Methode, die von Pucadyil et al. im Jahre 2004 veröffentlicht worden ist, eingesetzt.⁸⁸ Diese stellten den M β CD-Komplex her, indem sie Cholesterol und M β CD in einem Verhältnis von 1:10 (mol/mol) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 unter Rühren bei RT lösten. Mit diesem Komplex war es ihnen möglich, Cholesterol quantitativ zurückzuführen. Der Versuch, einen Komplex nach diesem Protokoll herzustellen, scheiterte bereits im Ansatz. Das wasserlösliche M β CD löste sich zwar in dem verwendeten Tris-Puffer, allerdings war es dem M β CD nicht möglich, Cholesterol in seinen Hohlraum aufzunehmen, um es später wieder abzugeben. Das Cholesterol fiel aus und auch durch Erwärmen der M β CD-Cholesterol-Suspension konnte keine klare Lösung erhalten werden. Spätere Versuche, Cholesterol durch Verwendung dieses „Komplexes“ zurückzuführen, resultierten in einer weiteren Abnahme des Cholesterol-Gehaltes.

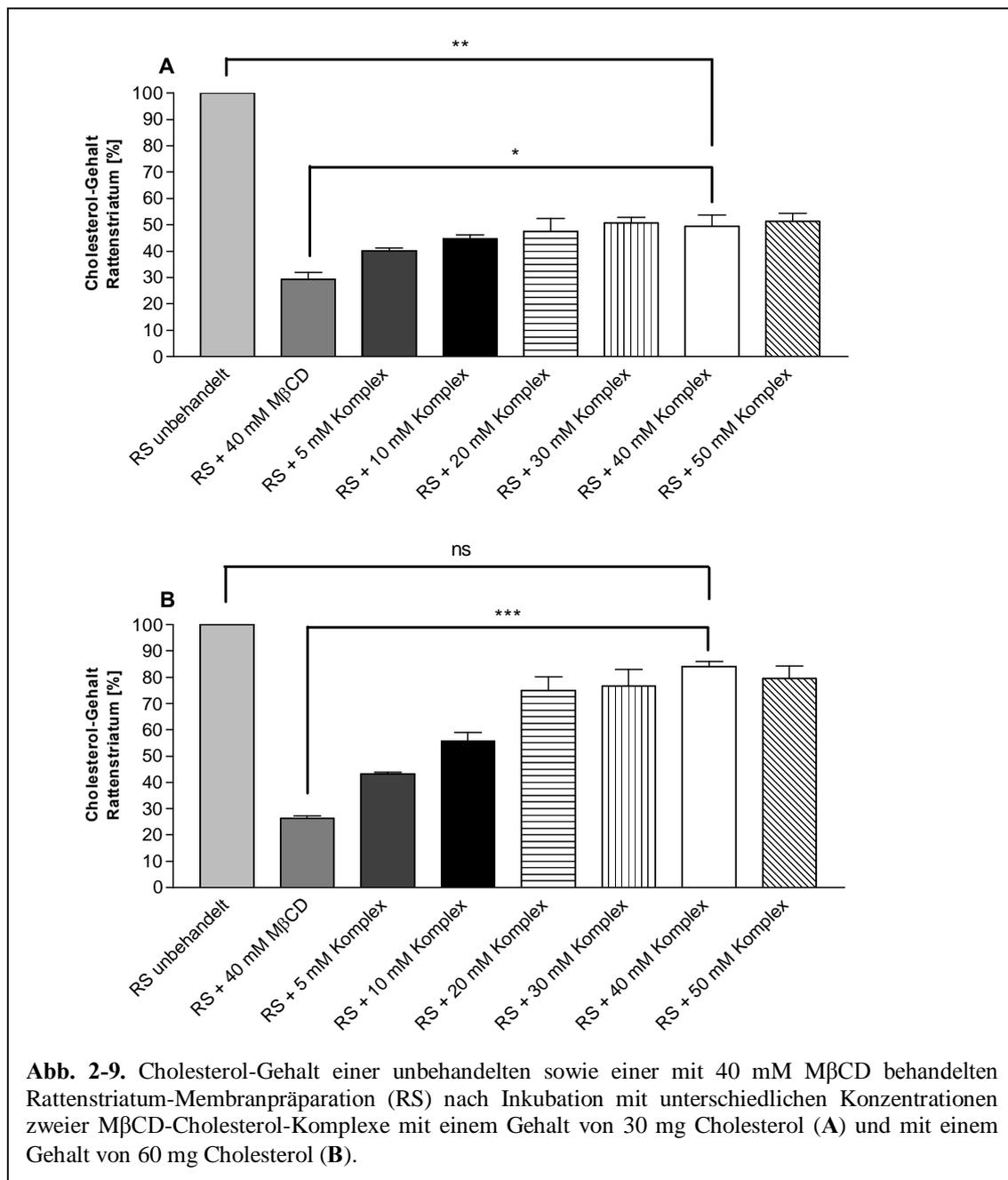
Aus diesem Grund wurde auf die von Klein et al. beschriebene Methode ausgewichen, die im Jahre 1995 in *Biochemistry* veröffentlicht worden war.⁶³ Bei dieser Methode wurde Cholesterol zunächst in Isopropanol gelöst und anschließend langsam zu einer 5%igen M β CD-Lösung getropft, die zuvor auf einem Wasserbad auf 80 °C erhitzt worden war. Auf 1000 mg M β CD kamen 30 mg Cholesterol. Der auf diese Weise hergestellte Komplex bildete eine klare Lösung, die anschließend durch weiteres Erhitzen langsam eingedampft wurde. Der erhaltene Bodensatz wurde in 50 mM Tris-Puffer aufgenommen, so dass eine 100 mM Stammlösung des M β CD-Cholesterol-Komplexes entstand. Um den Cholesterol-Gehalt des Komplexes zu erhöhen, wurde neben dem in der Publikation beschriebenen Komplex ein Komplex mit einem erhöhten Cholesterol-Gehalt hergestellt (60 mg Cholesterol auf 1000 mg M β CD). Der Cholesterol-Gehalt konnte nicht weiter erhöht werden, da die beschränkte Wasserlöslichkeit dies nicht erlaubte.

Um herauszufinden, welcher Komplex (30 oder 60 mg Cholesterol auf 1000 mg M β CD) in welcher Konzentration wie viel Cholesterol in eine Rattenstriatum-Membranpräparation zurückführt, wurde Rattenstriatum, welches zuvor mit 40 mM M β CD behandelt worden war, mit 5, 10, 20, 30, 40 und 50 mM des jeweiligen Komplexes für 0,5 h inkubiert. Bei den Angaben zum Cholesterol-Gehalt (mM) handelt es sich analog zum Kap. 2.3.1.1. um die Konzentrationen der hergestellten Suspensionen, die später auf den Protein-Gehalt bezogen werden (siehe Kap. 2.3.2.2.). Auch an dieser Stelle wurde darauf geachtet, das behandelte Striatum mit einem gleichen Volumen an Tris-Puffer zu waschen und zu resuspendieren.

Tab. 2-6. Cholesterol-Gehalt einer mit 40 mM M β CD behandelten Rattenstriatum-Membranpräparation nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des M β CD-Cholesterol-Komplexes (n=3).

Komplex [mM]	Cholesterol-Gehalt \pm SEM			
	Cholesterol-M β CD (30:1000)		Cholesterol-M β CD (60:1000)	
	[mmol/l]	[%]	[mmol/l]	[%]
Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	4,2 \pm 0,2	100,0 \pm 0,0	4,3 \pm 0,3	100,0 \pm 0,0
RS + 40 mM M β CD (Kontrolle)	1,2 \pm 0,1	29,4 \pm 2,5	1,1 \pm 0,0	26,4 \pm 0,8
5	1,7 \pm 0,1	40,1 \pm 1,1	1,9 \pm 0,1	43,3 \pm 0,5
10	1,9 \pm 0,1	44,7 \pm 1,5	2,4 \pm 0,0	55,9 \pm 3,2
20	2,0 \pm 0,3	47,5 \pm 5,0	3,2 \pm 0,0	75,1 \pm 5,1
30	2,1 \pm 0,2	50,7 \pm 2,2	3,3 \pm 0,0	76,7 \pm 6,2
40	2,1 \pm 0,3	49,4 \pm 4,4	3,6 \pm 0,2	84,0 \pm 2,0
50	2,2 \pm 0,2	51,4 \pm 2,9	3,4 \pm 0,2	79,5 \pm 4,6

Die Tab. 2-6 und die Abb. 2-8 zeigen deutlich, dass der Komplex mit dem höheren Cholesterol-Gehalt mehr Cholesterol in vorbehandeltes Rattenstriatum zurückführt. Durch die Behandlung mit 40 mM M β CD wurde der Cholesterol-Gehalt zunächst auf 29,4 bzw. 26,4 % verringert, was sich mit bisherigen Ergebnissen deckt. (vgl. Kap. 2.3.1.1.: 33,6 %) Die Inkubation mit 50 mM des Komplexes mit geringerem Cholesterol-Gehalt erhöhte diesen wieder auf 51,4 %. 50 mM des Komplexes mit dem doppelten Cholesterol-Gehalt führten 50 % des entzogenen Cholesterols zurück und steigerten den Cholesterol-Gehalt auf 79,5 %. Es wurde ferner gezeigt, dass bereits durch den Einsatz von geringeren Konzentrationen des Komplexes (5 mM) der Cholesterol-Gehalt der behandelten Rattenstriatum-Membranpräparation auf 40,1 % bzw. 43,3 % erhöht werden konnte. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu keiner weiteren Steigerung des Cholesterol-Gehaltes. Statistische Untersuchungen haben ergeben, dass sich der Cholesterol-Gehalt des mit 40 mM behandelten Rattenstriatums nicht signifikant vom ursprünglichen Cholesterol-Gehalt der Membranpräparation vor dem Entzug von Cholesterol unterscheidet. Somit kann Cholesterol durch den Einsatz eines M β CD-Cholesterol-Komplexes mit einem Gehalt von 60 mg Cholesterol pro 1000 mg M β CD praktisch quantitativ wieder zurückgeführt werden. Diese Methode wurde in den nachfolgenden Versuchen der Liposomen-Methode vorgezogen, da die Inkubationszeit nur 0,5 h im Vergleich zu 24 h für Liposomen beträgt.



2.3.2.2. RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATIONEN NACH RÜCKFÜHRUNG VON CHOLESTEROL (2)

Anhand der in Kap. 2.3.2.1. ermittelten Bedingungen wurde Cholesterol in eine durch den Einsatz einer 40 mM M β CD-Stammlösung im Cholesterol-Gehalt reduzierten Rattenstriatum-Membranpräparation durch Inkubation mit 40 mM eines M β CD-Cholesterol-Komplexes (60 mg

Cholesterol pro 1000 mg M β CD) zurückgeführt. Analog Kap. 2.2.2. wurden mit diesen Membranpräparationen Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit den A₁-selektiven Radioliganden [³H]CCPA und [³H]DPCPX und den A_{2A}-selektiven Radioliganden [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 durchgeführt. Auf diese Weise wurde die spezifische Bindung der Radioliganden in Abhängigkeit vom Cholesterol-Gehalt ermittelt.

Tab. 2-7. Abhängigkeit der spezifischen Bindung der Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 vom Cholesterol-Gehalt einer Rattenstriatum-Membranpräparation (n=3-6).

Membran- präparation		Chol.- Gehalt [%]	Spezifische Bindung % \pm SEM bzw. <i>cpm</i> \pm SEM			
			[³ H]CCPA [10 nM]	[³ H]DPCPX [0,4 nM]	[³ H]CGS21680 [10 nM]	[³ H]MSX-2 [1 nM]
Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	A	100	100 1710 \pm 130	100 938 \pm 95	100 800 \pm 227	100 853 \pm 237
RS + 40 mM M β CD	B	31	89 \pm 5^{ns} (P = 0,1062) ^a	65 \pm 3^{***} (P = 0,0003) ^a	70 \pm 6[*] (P = 0,0195) ^a	53 \pm 8^{**} (P = 0,0084) ^a
RS + 40 mM M β CD + 40 mM Komplex	C	114	103 \pm 2^{ns/ns} (P = 0,3116) ^b (P = 0,0769) ^c	80 \pm 5^{*/ns} (P = 0,0176) ^b (P = 0,0677) ^c	81 \pm 2^{**/ns} (P = 0,0013) ^b (P = 0,2433) ^c	92 \pm 8^{ns/*} (P = 0,3750) ^b (P = 0,0337) ^c

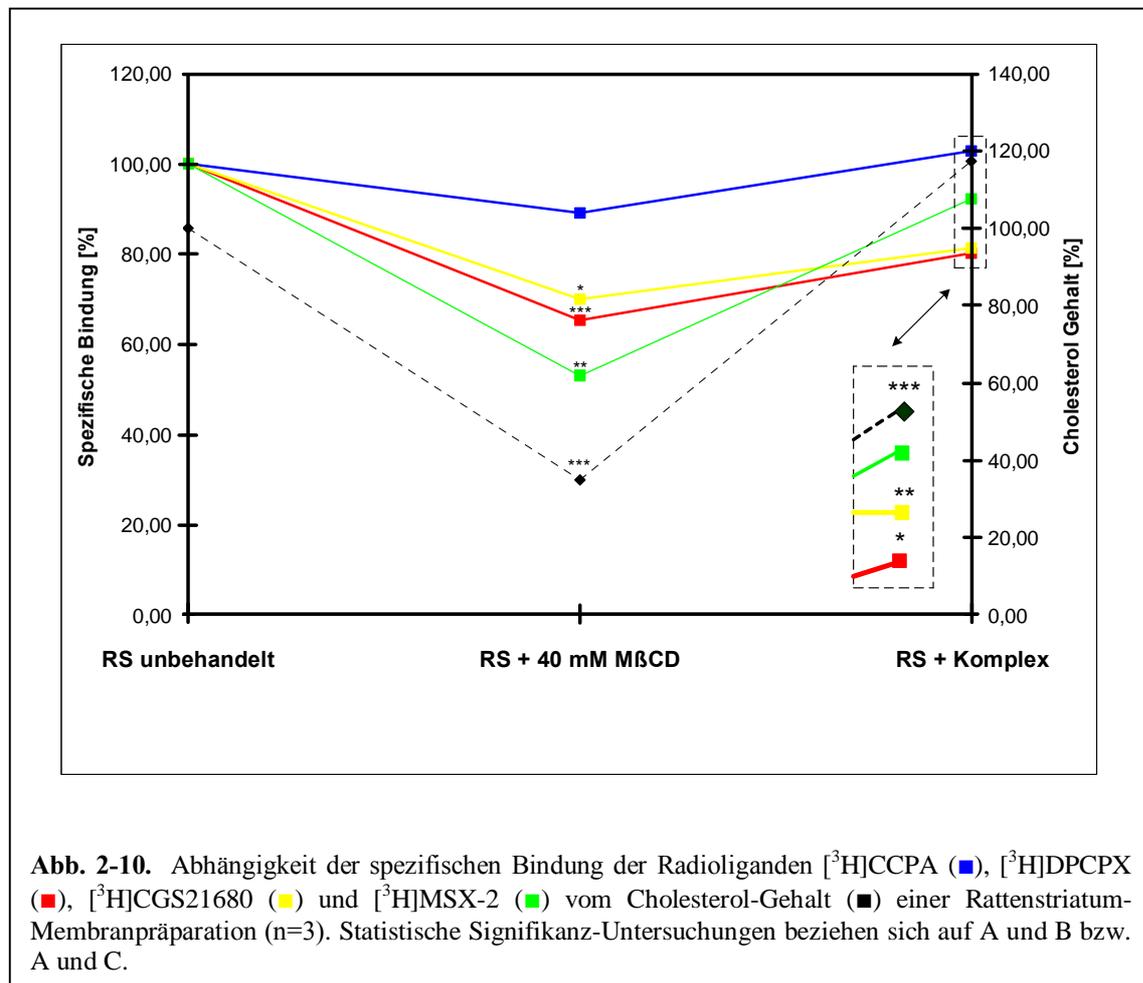
** (0,001 < P < 0,01), * (0,01 < P < 0,05), ^{ns} (P > 0,05) vs. Kontrolle, ^a Statistische Signifikanzuntersuchen zwischen A und B, ^b Statistische Signifikanzuntersuchen zwischen A und C, ^c Statistische Signifikanzuntersuchen zwischen B und C

Die in Tab. 2-7 dargestellten Ergebnisse stimmen mit den bisher ermittelten Daten zur spezifischen Bindung gut überein (siehe Kap. 2.2.2.). Der Cholesterol-Gehalt der Rattenstriatum-Membranpräparation wurde nach Inkubation mit 40 mM M β CD von 1,26 mmol/g Protein um fast 70 % auf 0,39 mmol/g Protein verringert und liegt somit in sehr guter Übereinstimmung mit den in Kap. 2.3.1.2. dargestellten Werten. Eine Inkubation der behandelten Rattenstriatum-Membranpräparation mit 40 mM des M β CD-Komplexes führte zu einer Erhöhung des Cholesterol-Gehaltes auf 1,44 mmol/g Protein. Im Vergleich zu den Vorversuchen konnte hier etwas mehr Cholesterol zurückgeführt werden (114 % im Vergleich zu 84 %), was an dem größeren Probenvolumen liegen mag.

Diese Tabelle sowie Abb. 2-10 zeigen, dass nach Rückführung von Cholesterol die spezifische Bindung im Allgemeinen wieder ansteigt. Es lässt sich ein Unterschied zwischen agonistischen und antagonistischen Radioliganden erkennen, allerdings nicht zwischen A₁- und A_{2A}-Rezeptoren. Ein verminderter Cholesterol-Gehalt hat nicht nur einen größeren Einfluss auf die Bindung der Antagonisten ([³H]DPCPX und [³H]MSX-2) zu Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren, sondern die spezifische Bindung regeneriert sich nach Rückführung des

Cholesterols in größerem Maße, vergleicht man dies mit der spezifischen Bindung der agonistischen Radioliganden [³H]CCPA und [³H]CGS21680.

Zwar wurde die spezifische Bindung nicht komplett wieder hergestellt, was statistische Signifikanzuntersuchungen gezeigt haben (Vergleich von A und C), es ist aber eine Tendenz erkennbar (siehe Abb. 2-10). Dies könnte mit den Versuchsbedingungen zusammen hängen. Während der Behandlung sowohl mit M β CD als auch mit dem M β CD-Cholesterol-Komplex unterlag die Rattenstriatum-Membranpräparation vielen Inkubations-, Zentrifugations- und Vortexschritten, die über einige Stunden bei Raumtemperatur hinweg einen negativen Einfluss auf die Membranpräparation und die Rezeptoren ausüben könnten. Bei allen Versuchen wurde jedoch die unbehandelte Membran den gleichen Schritten unterzogen, um sicherzustellen, dass die Versuchsbedingungen nicht für die Veränderung in der spezifischen Bindung verantwortlich sind.



Klein et al. konnten die spezifische Bindung von [³H]Oxytocin an einer mit 75 mM M β CD behandelten Meerschweinchen-Myometrium-Membran durch die Verwendung eines M β CD-

Cholesterol-Komplexes mit einem geringeren Cholesterol-Gehalt (30 mg Cholesterol auf 1000 mg M β CD) auf 95 % des Ausgangswertes wiederherstellen. Zuvor war die spezifische Bindung um ca. 93 % auf 7 % gesenkt worden. Ein Grund, warum nur 95 % der anfänglichen spezifischen Bindung erreicht werden konnten, wurde nicht genannt. Ferner wurden keine quantitativen Angaben zum Cholesterol-Gehalt gemacht.⁶³

Die Arbeitsgruppe um Pucadyil et al. konnten durch den Einsatz eines M β CD-Cholesterol-Komplexes mit 1 mM Cholesterol bezogen auf 10 mM M β CD (vgl. Kap. 2.3.2.1.) 72 % des Ausgangscholesterol-Gehaltes erreichen. Sie hatten den Cholesterol-Gehalt einer Rinder-Hippocampus-Membran zuvor durch Inkubation mit 40 mM M β CD auf 12 % gesenkt. Die spezifische Bindung des 5-HT_{1A}-Rezeptor Agonisten [³H]8-OH-DPAT konnte teilweise wieder hergestellt werden (69 % im Vergleich zu 47 %).⁸⁸ Es wurden allerdings keine statistischen Signifikanz-Untersuchungen durchgeführt.

Im Vergleich zu den von Pucadyil et al. publizierten Daten konnte in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz eines nach der Methode von Klein et al. hergestellten M β CD-Cholesterol-Komplexes (60 mg Cholesterol auf 1000 mg M β CD) nicht nur mehr Cholesterol zurückgeführt, sondern auch die spezifische Bindung des Agonist-Radioliganden in höherem Maße wiederhergestellt werden. Wie bereits in Kap. 2.3.2.1. diskutiert, scheiterte die Herstellung des M β CD-Cholesterol-Komplexes nach Pucadyil et al. bereits im Ansatz. Analoge Experimente mit dem Antagonist-Radioliganden des 5-HT_{1A}-Rezeptors [³H]*p*-MPPF zeigten, dass die spezifische Bindung von 59 % auf 81 % erhöht werden konnte.¹²⁶ Dies deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen, konnte doch die spezifische Bindung der Antagonist-Radioliganden ebenfalls in größerem Maße regeneriert werden.

2.4. ERHÖHUNG DES CHOLESTEROL-GEHALTES EINER RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATION

Wie bereits in der Einleitung (Kap. 1.7.3.) ausführlich dargestellt, soll Cholesterol an der Entstehung des für eine Erkrankung an Morbus Alzheimer mitverantwortlichen β -Amyloid-Peptids (A β), beteiligt sein. Ein hoher LDL-Cholesterol- und ein niedriger HDL-Cholesterol-Gehalt ist mit einem erhöhten Risiko an Alzheimer zu erkranken assoziiert.^{187, 191} Erste klinische Studien mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) lieferten allerdings kontroverse Ergebnisse,^{209, 210} so dass es noch weiterer Untersuchungen bedarf, ob Statine bei der Behandlung bzw. Vorbeugung von Morbus Alzheimer eingesetzt werden können.²¹¹

Um diesen erhöhten Cholesterol-Gehalt zu simulieren wurde versucht, den Cholesterol-Gehalt einer Rattenstriatum-Membranpräparation durch den Einsatz eines M β CD-Cyclodextrin-Komplexes zu erhöhen. Der Einsatz einer 40 mM Stammlösung dieses Komplexes erhöhte den Cholesterol-Gehalt um mehr als 80 % auf 182 % im Vergleich zur Kontrolle (1,22 mmol/g Protein gegenüber 2,22 mmol/g Protein). Damit liegt der Cholesterol-Gehalt in guter Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen (siehe Kap. 2.3.1.2. und 2.3.2.2.).

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit den A₁-selektiven Radioliganden [³H]CCPA und [³H]DPCPX und den A_{2A}-selektiven Radioliganden [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 analog Kap. 2.2.2. zeigten allerdings, dass ein erhöhter Cholesterol-Gehalt nicht mit einer signifikanten Änderung der spezifischen Radioligand-Bindung einhergeht.

Tab. 2-8. Abhängigkeit der spezifischen Bindung der Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 vom Cholesterol-Gehalt einer Rattenstriatum-Membranpräparation (n=3-6).

Membran- präparation	Chol.- Gehalt [%]	Spezifische Bindung % \pm SEM bzw. <i>cpm</i> \pm SEM			
		[³ H]CCPA [10 nM]	[³ H]DPCPX [0,4 nM]	[³ H]CGS21680 [10 nM]	[³ H]MSX-2 [1 nM]
Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	100	100 779 \pm 13	100 641 \pm 40	100 331 \pm 18	100 442 \pm 58
RS + 40 mM Komplex	182	102 \pm 4^{ns} (P = 0,7198)	90 \pm 2^{ns} (P = 0,4157)	107 \pm 3^{ns} (P = 0,4982)	96 \pm 14^{ns} (P = 0,9359)

ns (P > 0,05) vs. Kontrolle

Somit konnte gezeigt werden, dass zwar ein verminderter Cholesterol-Gehalt einen Einfluss auf die Bindung der Liganden nehmen kann, ein erhöhter Gehalt an Cholesterol aber zu keiner signifikanten Beeinflussung der Bindung führt. Um jedoch eventuelle Effekte auf die Rezeptorfunktionen zu untersuchen, sind weitere Experimente erforderlich. Da bei M.

Alzheimer insbesondere kortikale und subkortikale Bereiche des Gehirns betroffen sind,¹⁸⁴ ist es von besonderem Interesse, kortikale Adenosin-A₁-Rezeptoren in dieser Hinsicht genauer zu untersuchen.

2.5. EINFLUSS VON METHYL- β -CYCLODEXTRIN UND TRITON X-100 AUF RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN

Beobachtungen während der Durchführung der Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien ließen einen Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin, welches zur Verringerung des Cholesterol-Gehaltes in Membranpräparationen eingesetzt wird, und des Detergenzes Triton X-100, das ursprünglich zur Isolierung von DRMs bzw. „Lipid Rafts“ in einem Sucrose-Gradienten verwendet wurde (siehe Kap. 2.9.), auf die spezifische Bindung von Radioliganden vermuten. Um auszuschließen, dass durch die Verwendung von M β CD und Triton X-100 Artefakte entstanden sind, sollte der Einfluss dieser Substanzen in Bindungsstudien überprüft werden.

2.5.1. UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON M β CD UND TRITON X-100 AUF DIE SPEZIFISCHE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNG

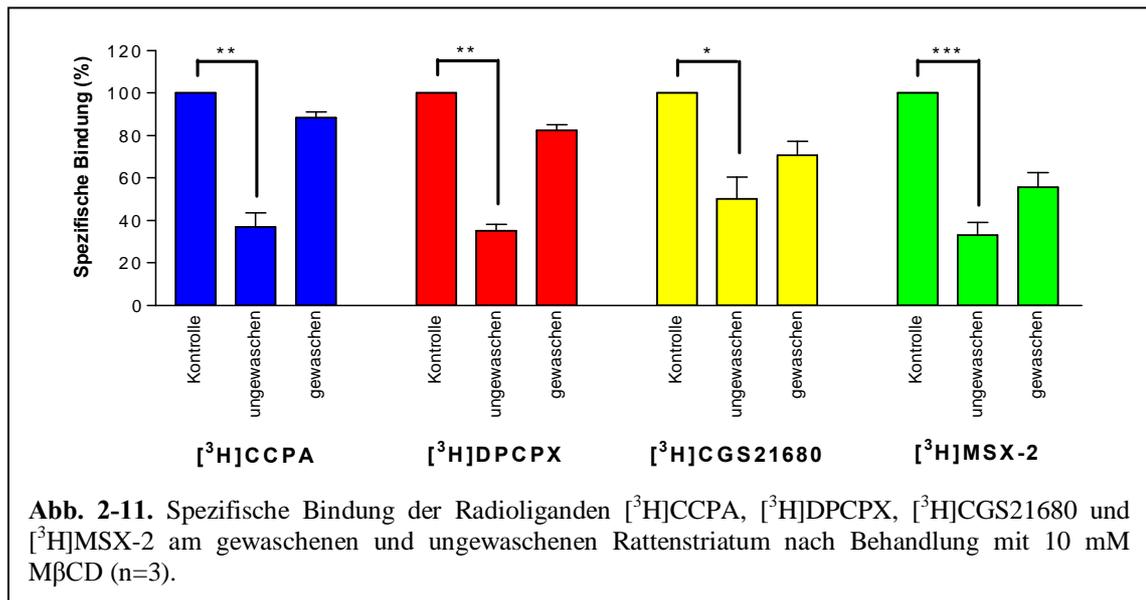
Um den Einfluss von M β CD und Triton X-100 zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt und miteinander verglichen. Zunächst wurde Rattenstriatum mit 10 mM M β CD und 0,4 % Triton X-100 für 1 bzw. 0,5 h, je nach Versuchsvorschrift, inkubiert. Nachdem die Membranpräparationen drei Mal mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 gewaschen worden waren, wurde die spezifische Bindung der Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 analog zu Kap. 2.2.2. bestimmt. Abweichend von diesem Kapitel wurde in Bindungsstudien mit [³H]CCPA eine Konzentration von 1 nM eingesetzt, die der Konzentration im Standard-Protokoll entspricht. Des Weiteren wurden M β CD und Triton X-100 sowie 4 % CHAPS, welches ebenfalls zur Isolierung der früher als „Lipid Rafts“ bezeichneten DRMs („Detergent Resistant Membranes“) eingesetzt werden kann,⁷⁹ dem Reaktionsansatz direkt hinzugefügt. Die Substanzen wurden nicht herausgewaschen und verblieben im Ansatz. Die auf diese Weise ermittelten spezifischen Bindungen der verwendeten Radioliganden sind in Tab. 2-9 und Abb. 2-11 dargestellt.

Es wird deutlich, dass M β CD, Triton X-100 und CHAPS einen sehr großen Einfluss auf die spezifische Bindung der Radioliganden besitzen. Fügt man dem Reaktionsansatz 10 mM M β CD hinzu, so wird die spezifische Bindung von [³H]CCPA um mehr als 60 % auf 37 % gesenkt. Wird das M β CD wieder heraus gewaschen, so verringert sich die spezifische Bindung nur um ca. 10 % auf 88 %. Ein ähnlicher Effekt lässt sich auch bei den Radioliganden [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 beobachten. Die geringere spezifische Bindung nach dem Waschvorgang ist auf den geringeren Cholesterol-Gehalt des Rattenstriatums zurückzuführen (siehe Kap. 2.2.2.).

Tab. 2-9. Spezifische Bindung der Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2 am gewaschenen und ungewaschenen Rattenstriatum nach Behandlung mit 10 mM MβCD, 0,4 % Triton X-100 bzw. 4 % CHAPS (n=3).

Membran- präparation	Spezifische Bindung % ± SEM bzw. cpm ± SEM							
	[³ H]CCPA [1 nM]		[³ H]DPCPX [0,4 nM]		[³ H]CGS21680 [10 nM]		[³ H]MSX-2 [1 nM]	
	gew. ^a	ung. ^b	gew. ^a	ung. ^b	gew. ^a	ung. ^b	gew. ^a	ung. ^b
Rattenstriatum (Kontrolle)	100 1370 ± 100	100 841 ± 97	100 463 ± 32	100 479 ± 55	100 2350 ± 250	100 207 ± 57	100 5020 ± 1510	100 865 ± 187
+ 10 mM MβCD	88 ± 3	37 ± 7	82 ± 3	35 ± 3	71 ± 6	50 ± 10	56 ± 7	33 ± 6
Rattenstriatum (Kontrolle)	100 2980 ± 830	100 1330 ± 100	n.d.	n.d.	100 1490 ± 560	100 978 ± 84	n.d.	n.d.
+ 0,4 % Triton X-100	83 ± 5	6 ± 2	n.d.	n.d.	61 ± 5	3 ± 4	n.d.	n.d.
Rattenstriatum (Kontrolle)	n.d.	100 1350 ± 92	n.d.	n.d.	n.d.	100 1060 ± 100	n.d.	n.d.
+ 4 % CHAPS	n.d.	0 ± 0	n.d.	n.d.	n.d.	2 ± 3	n.d.	n.d.

^agew. = gewaschen (3 x 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4), ^bung. = ungewaschen, n.d. = nicht durchgeführt



Die Detergenzien Triton X-100 und CHAPS haben im Vergleich zum MβCD einen ausgeprägteren Einfluss auf die spezifische Bindung. Die Anwesenheit von 0,4 % Triton im

Reaktionsansatz führte zu einem gänzlichen Verlust der spezifischen Bindung von [³H]CCPA und [³H]CGS21680 an A₁- bzw. A_{2A}-Rezeptoren in Rattenstriatum-Membranpräparationen. Auch geringere Konzentrationen an Triton X-100 von 0,05 bis 0,3 % beeinträchtigten bereits die spezifische Rezeptor-Bindung. Wird das behandelte Rattenstriatum gewaschen, so steigt die spezifische Bindung wieder an, allerdings nicht auf das ursprüngliche Niveau. Dies könnte darin begründet sein, dass Triton X-100 und auch CHAPS aufgrund ihrer Eigenschaften als Detergenzien ebenfalls in der Lage sind, Cholesterol aus einer Plasma-Membran zu entfernen. Darüber hinaus könnten andere Lipide und Proteine solubilisiert und aus der Zellmembran herausgewaschen worden sein.

Um Aussagen über den Mechanismus treffen zu können, nach welchem diese Substanzen die spezifische Rezeptorbindung beeinflussen, wurden mit M β CD und Triton X-100 Konkurrenzexperimente durchgeführt und die Gleichgewichtsinhibitionskonstante K_i bestimmt.

2.5.2. KOMPETITIONSEXPERIMENTE MIT M β CD UND TRITON X-100

Die K_i-Werte der Substanzen M β CD und Triton X-100 wurden in Konkurrenzexperimenten mit den Radioliganden [³H]CCPA und [³H]MSX-2 bestimmt. Zunächst wurden Bindungsstudien mit dem A₁-selektiven Radioliganden [³H]CCPA durchgeführt. In einem Experiment wurden die Substanzen direkt eingesetzt, in einem weiteren wurde das Experiment nach 0,5 bzw. 1 h Inkubation – je nach Versuchsvorschrift – durchgeführt.

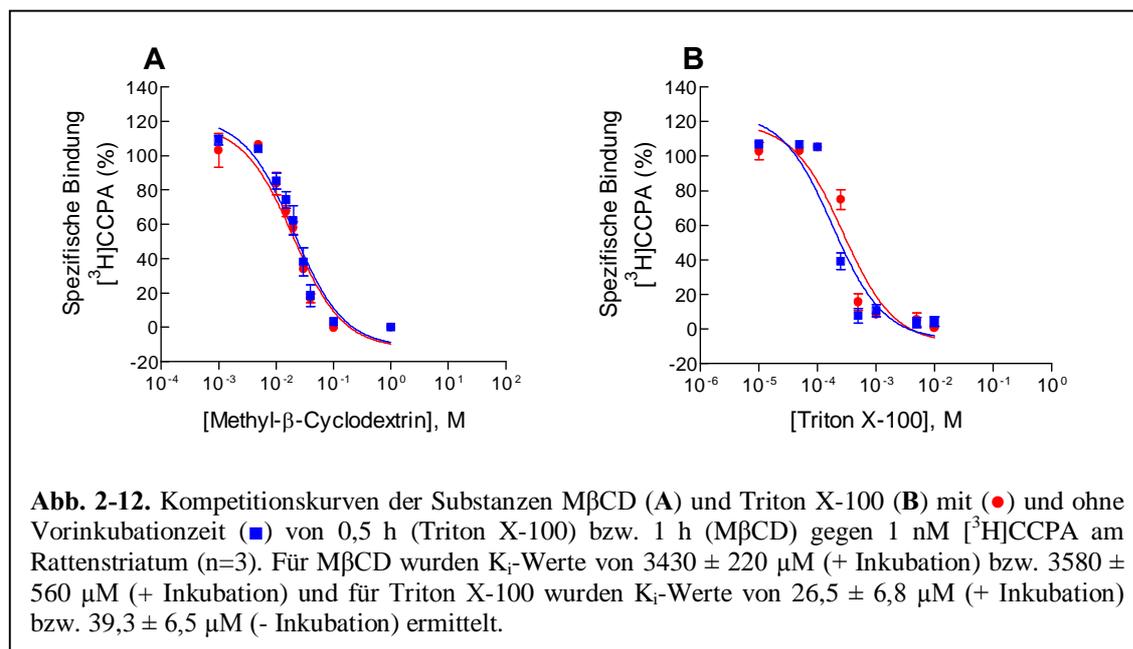
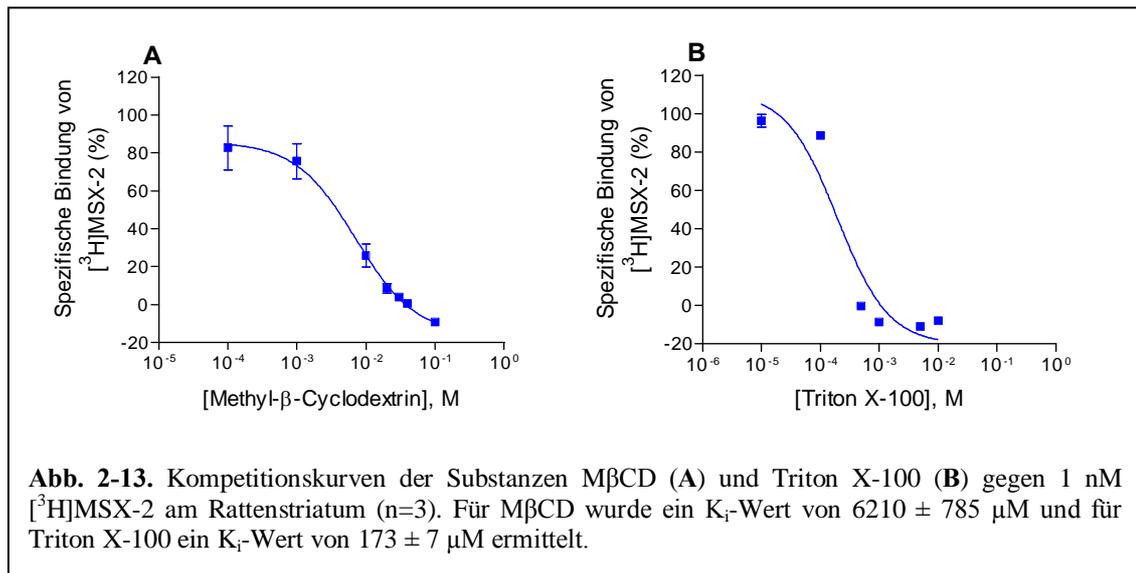


Abb. 2-12 zeigt exemplarisch die Inhibitionskurven der Substanzen M β CD und Triton X-100 – mit und ohne Vorinkubation. Die Kompetitionskurve von M β CD wurde in einem Konzentrationsbereich von 100 – 0,1 mM und die von Triton X-100 in einem Bereich von 10–0,01 mM aufgenommen. Daraus ergaben sich für M β CD K_i-Werte von 3430 ± 220 μM (+ Inkubation) bzw. 3580 ± 560 μM (- Inkubation) und für Triton X-100 26,5 ± 6,8 μM (+ Inkubation) bzw. 39,3 ± 6,5 μM (- Inkubation). Die Vorinkubation hatte demnach keinen Einfluss auf das Ergebnis, wie statistische Signifikanz-Untersuchungen bestätigt haben.

Die unter Verwendung des A_{2A}-selektiven Radioliganden [³H]MSX-2 durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien lieferten höhere K_i-Werte. Sie wurden analog durchgeführt, allerdings wurde auf eine Vorinkubation verzichtet. Für Triton X-100 wurde ein K_i-Wert von 173 ± 7 μM und für Methyl- β -Cyclodextrin ein K_i-Wert von 6210 ± 785 μM ermittelt. Ebenso wie bei den Bindungsstudien mit [³H]CCPA war Triton X-100 die „potentere“ Verbindung. Auf die Frage, warum Triton X-100 und M β CD in Radioligand-Bindungsstudien [³H]CCPA „affiner“ waren als in Studien mit [³H]MSX-2 wird in diesem Kapitel an anderer Stelle noch eingegangen. Statistische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die K_i-Werte von M β CD, bestimmt in Bindungsstudien mit [³H]CCPA (K_i = 3580 ± 560 μM) und mit [³H]MSX-2 (K_i = 6210 ± 785 μM), nicht signifikant voneinander unterscheiden (P = 0,0525). Die Unterschiede der K_i-Werte von Triton X-100 (39,3 ± 6,5 μM ([³H]CCPA)) bzw. 173 ± 7 μM ([³H]MSX-2)) sind jedoch statistisch signifikant (***, P = 0,0001).



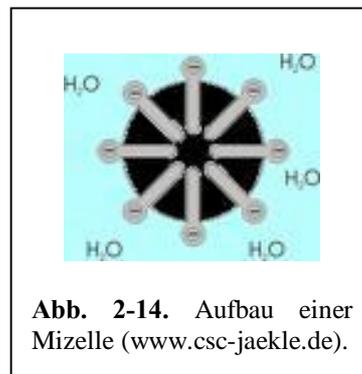
Der Hill-Koeffizient ist ein einheitsloser Kooperativitätsparameter und gibt die Steilheit der Kurve der Bindung eines Inhibitors an. Eine sigmoide Standard-Dosis-Wirkungskurve besitzt einen Hill-Koeffizienten von 1,0. Ist der Hill-Koeffizient < 1, so ist der Kurvenverlauf flacher,

ist der Koeffizient > 1 , so verläuft die Kurve steiler. Konkurrieren ein radioaktiv markierter und ein unmarkierter Ligand um eine Bindungsstelle, folgt der Kurvenverlauf der Kompetitionskurve dem Massenwirkungsgesetz. In vielen Situationen erlaubt der Hill-Koeffizient keine Interpretation in Bezug auf die Chemie bzw. Biologie der Liganden. Ist der Wert des Hill-Koeffizienten allerdings weit von 1 entfernt, so lässt sich daraus schließen, dass die Bindung des Liganden an den Rezeptor nicht dem Massenwirkungsgesetz (MWG) entspricht.²⁶⁰

Für die Kompetitionskurven von M β CD wurden Hill-Koeffizienten von -2,1 ([³H]CCPA) bzw. -1,2 ([³H]MSX-2) und für Triton X-100 Koeffizienten von -3,9 ([³H]CCPA) bzw. -5,4 ([³H]MSX-2) ermittelt. Da die Werte für Triton X-100 weit von einem Hill-Koeffizienten von 1 abweichen, kann daraus geschlossen werden, dass die Ligand-Bindung nicht dem MWG folgt.

Cyclodextrine besitzen die Fähigkeit, im gelösten und häufig auch bereits im festen Zustand durch einfaches, intensives Mischen, andere Moleküle in ihren Hohlraum aufzunehmen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Abnahme der spezifischen Bindung in Anwesenheit von M β CD.^{65, 285}

Die Ausbildung von Mizellen beruht auf der Solubilisationsfähigkeit der Tenside. Eine Mizelle entsteht dadurch, dass eine größere Zahl von Tensidmolekülen zu einem kugelförmigen Gebilde assoziiert. Dabei ordnen sich die Moleküle so an, dass die hydratisierten, polaren Kopfgruppen auf der Kugeloberfläche, die in unmittelbarem Kontakt mit der wässrigen Phase stehen, zu liegen kommen und sich die unpolaren Reste völlig ungeordnet im Inneren dieser Kugel befinden. Mizellen entstehen oberhalb einer bestimmten Konzentration, der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC = critical micelle concentration), die für die einzelnen Tenside unterschiedlich ist.



Triton X-100 besitzt eine CMC von 0,2 mM.²⁸⁶ Betrachtet man nun die Kompetitionskurve, so wird deutlich, dass die Radioligand-Rezeptor-Bindung bei Konzentrationen von 10 bzw. 100 μ M Triton X-100 noch nicht inhibiert wird. Erst ab einer Konzentration von ca. 250 μ M ist eine schlagartige Inhibition zu erkennen, was sich durch die Bildung von Mizellen erklären lässt.

Somit sind M β CD und auch Triton X-100 aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften in der Lage, die Radioligand-Rezeptor-Bindung zu inhibieren, allerdings über unterschiedliche Mechanismen. Die Abweichungen in den ermittelten Hill-Koeffizienten von Triton X-100 und M β CD könnten folgendermaßen begründet werden. M β CD setzt sich aus 7

Glucose-Molekülen zusammen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass der hydrophobe Hohlraum eines jeden M β CD-Moleküls die gleiche Größe besitzt. Mizellen lagern sich hingegen aus einer unterschiedlichen Anzahl von Tensidmolekülen zusammen. Somit werden die Radioliganden durch unterschiedlich aufgebaute Mizellen eingeschlossen, was die stärkere Abweichung der Hill-Koeffizienten von Triton X-100 erklären würde.

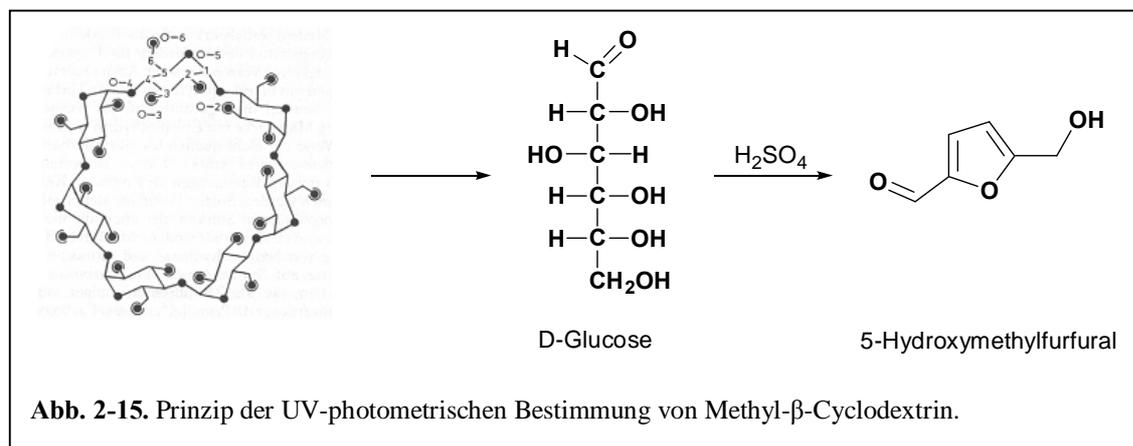
Die Begründung, warum in Bindungsstudien mit [³H]CCPA niedrigere K_i-Werte für Triton X-100 und M β CD gefunden wurden, könnte in der Durchführung der Assays zu finden sein. Während in Radioligand-Bindungsstudien mit [³H]CCPA für 1,5 h inkubiert wird, beträgt die Inkubationszeit in Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 nur 0,5 h. Somit steht M β CD und Triton X-100 in Bindungsstudien mit [³H]CCPA drei Mal mehr Zeit zur Verfügung den Radioliganden in den hydrophoben Hohlraum bzw. in Mizellen einzuschließen, als in Bindungsstudien mit [³H]MSX-2. Weiterführende kinetische Experimente könnten Aufschluss darüber geben.

2.6. NACHWEIS VON METHYL- β -CYCLODEXTRIN IN EINER RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATION

In Kap. 2.5. wurde der Einfluss von M β CD auf die spezifische Bindung von ausgewählten Radioliganden beschrieben. Da Cyclodextrine die Fähigkeit besitzen, andere Moleküle in ihren hydrophoben Hohlraum aufzunehmen, wird angenommen, dass M β CD die Radioliganden auf diese Weise einschließt und somit eine Bindung der Radioliganden an die Rezeptoren verhindert. Wird eine Membranpräparation mit verschiedenen Konzentration an M β CD versetzt, so wird diese anschließend nach der Behandlung 3 Mal mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 gewaschen. Um sicherzustellen, dass nach diesen Waschvorgängen kein M β CD in der Präparation verbleibt, ist es wichtig, eine mögliche Rest-Konzentration an M β CD zu bestimmen.

2.6.1. UV-PHOTOMETRISCHER ASSAY ZUR BESTIMMUNG VON METHYL- β -CYCLODEXTRIN

Christian et al. beschrieben im Jahre 1997 einen UV-photometrischen Assay zur Bestimmung von M β CD, der auf der Spaltung der 1,4- α -glykosidischen Bindung der Glucose-Bausteine durch heiße Säure beruht.⁶⁷ Cyclodextrine sind natürliche 1,4- α -glykosidisch verknüpfte, ringförmige Oligosaccharide. Es bilden sich vorwiegend α -, β - oder γ -Cyclodextrine, deren Ringe aus 6, 7 oder 8 Glucose-Einheiten bestehen.⁶⁵ Heiße, konzentrierte Säuren bilden aus Zuckern unter Wasserabspaltung Furfurale. So wird z.B. aus D-Glucose 5-Hydroxymethylfurfural gebildet, welches kolorimetrisch detektiert werden kann.²⁸⁷



Bei der von Christian et al. veröffentlichten Methode wurden die Proben in dem. Wasser gelöst. Für die Präparation des Rattenstriatum und die Waschvorgänge nach der M β CD-Behandlung

wird im Allgemeinen 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 verwendet. Das Absorptionsmaximum des entstandenen Furfurals ist mit 320 nm angegeben. Um sicherzustellen, dass das Lösungsmittel keine bathochrome oder hypsochrome Verschiebung der Absorptionsbanden verursacht – im Allgemeinen bewirken Pufferlösungen keine Veränderung – wurden UV-Spektren im Bereich von 200–400 nm aufgenommen. Dafür wurde eine 0,3 nM M β CD-Lösung in dem Wasser und in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 hergestellt und diese analog zur Versuchsvorschrift behandelt (siehe Kap. 9.12.).

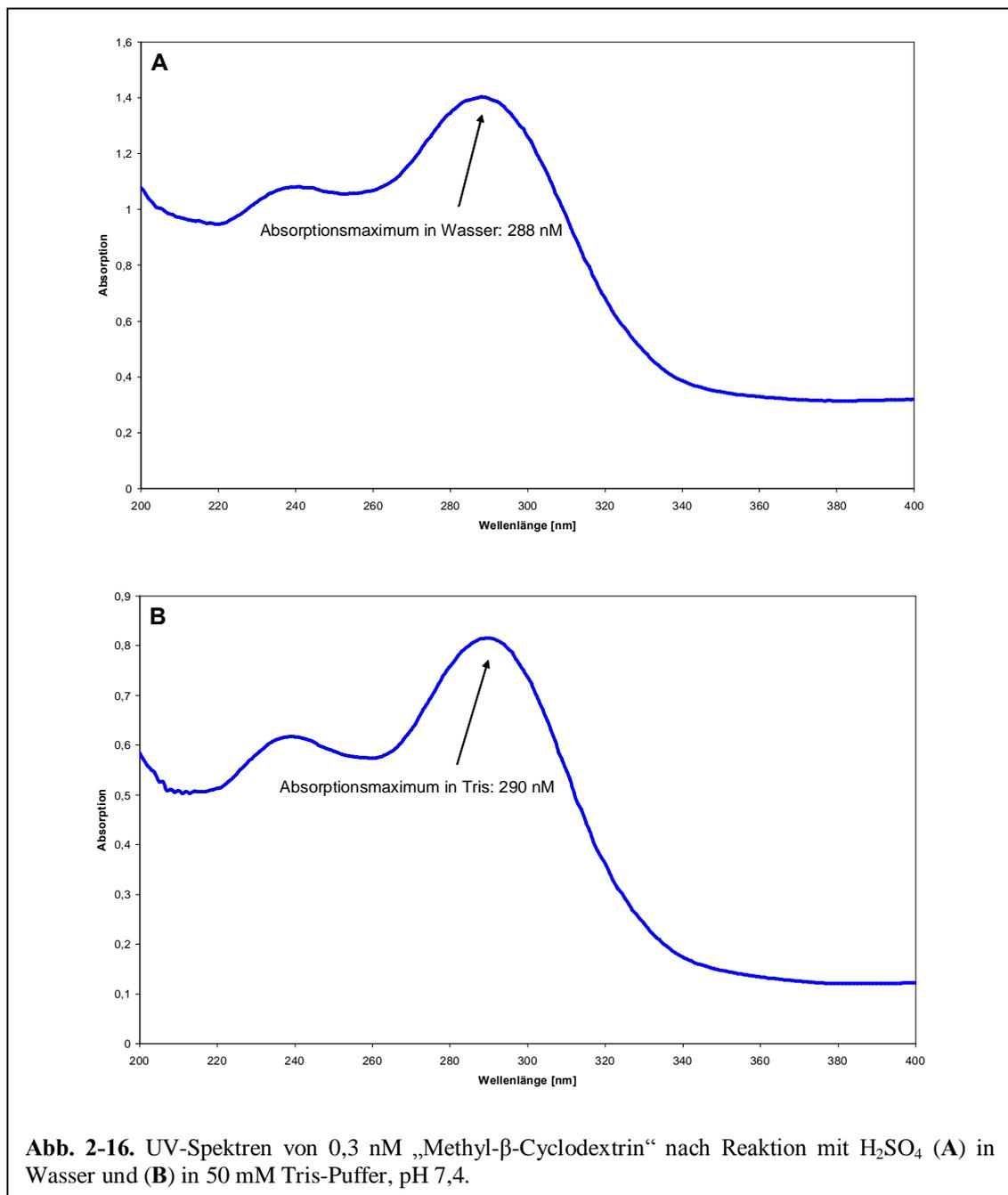


Abb. 2-16. UV-Spektren von 0,3 nM „Methyl- β -Cyclodextrin“ nach Reaktion mit H₂SO₄ (A) in Wasser und (B) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4.

In Abb. 2-16 sind die UV-Spektren von M β CD nach der Reaktion mit heißer Schwefelsäure in Wasser und Tris-Puffer dargestellt. Das Lösungsmittel hat in diesem Fall keinen Einfluss auf die Absorptionsmaxima, allerdings weichen die gemessenen Maxima stark vom Literaturwert (320 nm) ab.

2.6.2. UV-PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON METHYL- β -CYCLODEXTRIN IN EINER RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATION

Die Rattenstriatum-Membranpräparation wurde mit der höchsten eingesetzten M β CD-Konzentration (40 mM) versetzt. Analog zum Versuchsprotokoll zur Verminderung des Cholesterol-Gehaltes von Membranpräparationen (siehe Kap. 9.9.) wurde zunächst 1 h inkubiert. Anschließend wurde pelletiert und die Rattenstriatum-Membranpräparation insgesamt drei Mal gewaschen. Wie in Abb. 2-16 dargestellt, wurde jeweils nach der Pelletierung und den drei Waschvorgängen eine Probe aus Pellet und Überstand entnommen. Der M β CD-Gehalt wurde bestimmt, indem die Proben zunächst mit konz. Schwefelsäure versetzt und für 1 h bei 100°C inkubiert wurden. Die Absorption wurde anschließend bei 290 nm (siehe Kap. 2.6.1.) gemessen, und anhand einer Kalibriergerade konnte die Konzentration an M β CD bestimmt werden. Ein Blindwert sollte Aufschluss darüber geben, ob Rattenstriatum eine Eigenabsorption besitzt und die Messung stört.

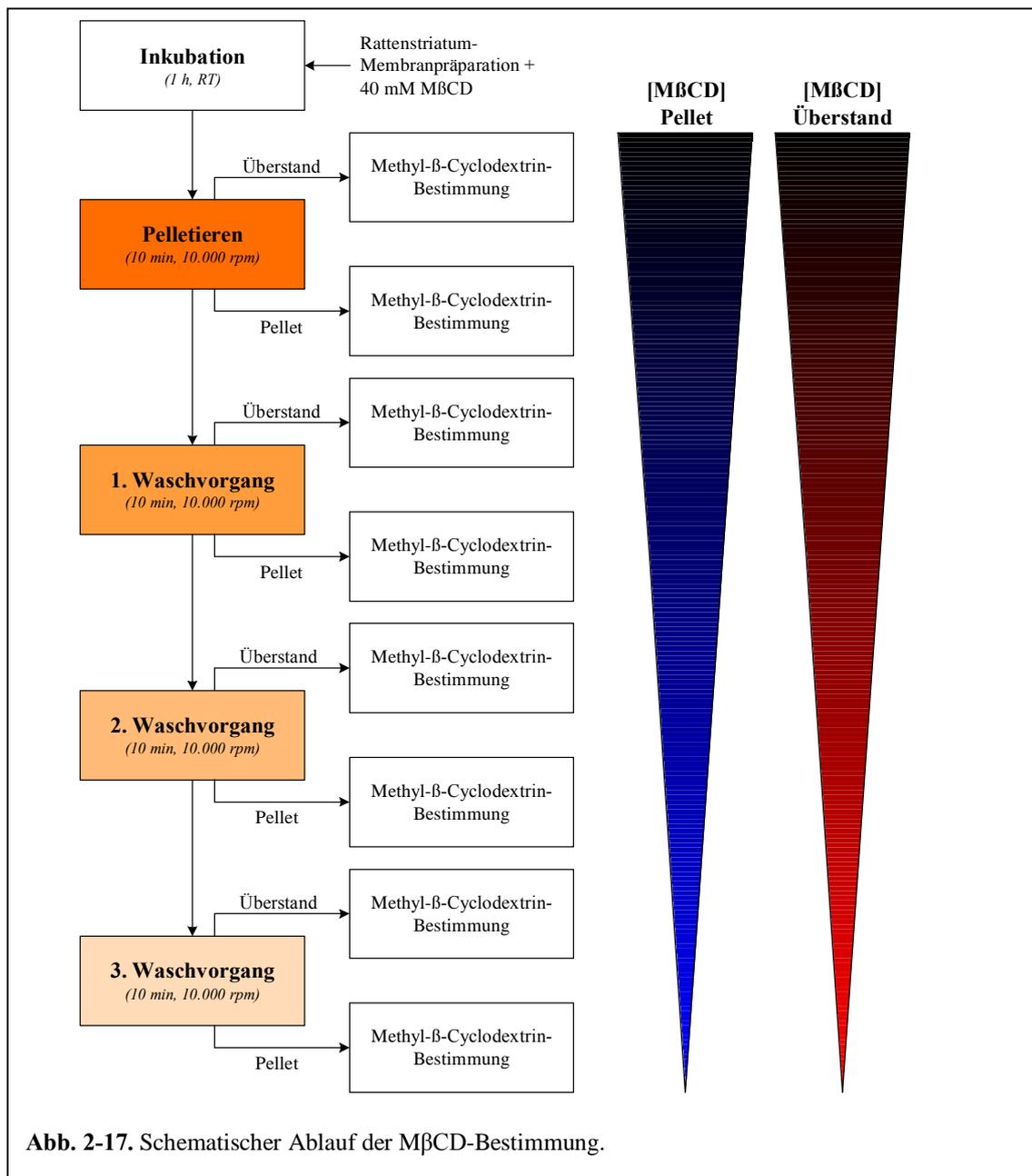
Tab. 2-10. M β CD-Konzentrationsbestimmung einer mit 40 mM M β CD behandelten Rattenstriatum-Membranpräparation nach dem Pelletieren und drei Waschvorgängen im Pellet und im Überstand (n=3).

Vorgang	M β CD-Konzentration (Pellet/Rattenstriatum) [mM]		M β CD-Konzentration (Überstand) [mM]
	vor Abzug des Blindwertes	nach Abzug des Blindwertes	
Pelletieren	13,3 \pm 0,7	0,4 \pm 0,7	38,1 \pm 2,4
1. Waschvorgang	7,5 \pm 1,2	0	1,5 \pm 0,6
2. Waschvorgang	4,2 \pm 0,3	0	0,4 \pm 0,1
3. Waschvorgang	7,6 \pm 0,3	0	0,09 \pm 0,03
Blindwert ^a	12,9 \pm 1,6		n.d.

^aunbehandeltes Rattenstriatum, n.d. = nicht durchgeführt.

Nach dem Pelletieren befand sich das mit einer Konzentration von 40 mM eingesetzte M β CD zum größten Teil im Überstand (38,1 \pm 2,4 mM). Im Pellet war nach Abzug des relativ hohen

Blindwertes nur noch eine sehr geringe M β CD-Konzentration messbar. Somit kann geschlussfolgert werden, dass M β CD bereits nach dem Pelletieren quantitativ entfernt worden ist. Nach den Waschvorgängen wurden zwar vermeintlich noch geringere Konzentrationen gemessen (4-8 mM), diese lassen sich aber durch unvermeidbare Verdünnungen bei den Waschvorgängen mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 erklären. Die geringen M β CD-Konzentrationen im Überstand bestätigen diese Annahme. Somit kann davon ausgegangen werden, dass M β CD quantitativ aus dem in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien eingesetzten Rattenstriatum entfernt worden ist und die Ergebnisse nicht auf Artefakten beruhen.



2.7. [³⁵S]GTPγS-BINDUNGSSTUDIEN AN MEMBRANPRÄPARATIONEN MIT VERMIN- DERTEM CHOLESTEROL-GEHALT

Wie bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel beschrieben, kann durch [³⁵S]GTPγS-Radioligand-Bindungsstudien die Funktionalität eines Liganden in einem Rezeptorsystem untersucht werden. Es sollte herausgefunden werden, ob ein verminderter Cholesterol-Gehalt neben dem Einfluss auf die Affinität verschiedener Radioliganden in Kompetitions-, Sättigungs- und Kinetikexperimenten auch einen Einfluss auf die Funktion der Rezeptoren ausübt.

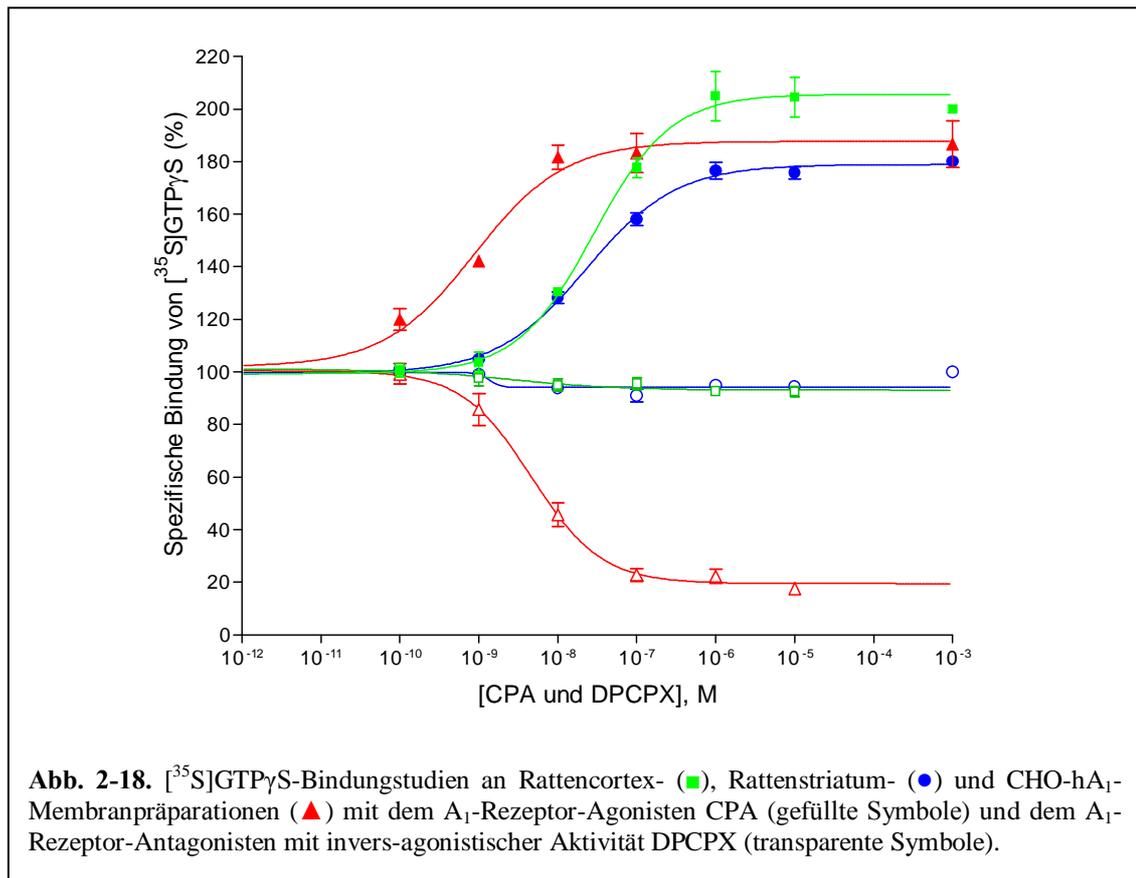
2.7.1. [³⁵S]GTPγS-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN-A₁-REZEPTOREN

In den in Kap. 2.2. beschriebenen Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien wurden Rattenstriatum-Membranpräparationen mit unterschiedlichem Cholesterol-Gehalt eingesetzt. Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit sollten für die [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien ebenfalls Rattenstriatum-Membranpräparationen verwendet werden. Da [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien am Rattenstriatum bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden sind, sollten zunächst vergleichende [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien mit Rattencortex- und CHO-hA₁-Membranpräparationen durchgeführt werden. Es wurden CHO-Zellen eingesetzt, die mit dem humanen A₁-Rezeptor rekombinant transfiziert worden waren. Rattencortex und Rattenstriatum exprimieren den Ratten-Adenosin-A₁-Rezeptor nativ.²⁷⁴ Während die α-Untereinheit des G_s-Proteins in zahlreichen Zell-Typen zu finden ist, scheint die Verteilung der α-Untereinheit des G_{oif}-Proteins nicht so weit verbreitet zu sein. Im Striatum hingegen ist das G_{oif}-Protein höher exprimiert als das G_{αs}-Protein.^{288, 289}

Als Referenzsubstanzen wurden der A₁-selektive Adenosin-Rezeptor-Agonist **CPA** und der A₁-selektive inverse Agonist **DPCPX** verwendet. 5 µg der Membranpräparationen wurden mit 0,2 nM [³⁵S]GTPγS und verschiedenen Konzentrationen der Referenzsubstanzen für 60 min unter den in Kapitel 9.7.5. beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 µM unmarkiertem GTPγS bestimmt.

Wie in Abb. 2-18 deutlich zu erkennen, führt der als Referenzsubstanz verwendete Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonist **CPA** in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Erhöhung der [³⁵S]GTPγS-Bindung unabhängig von der verwendeten Membranpräparation. Der max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung liegt zwischen 176 ± 2 und 204 ± 8 % (Basalwert: 100 %). Der inverse Agonist **DPCPX** senkt die spezifische [³⁵S]GTPγS-Bindung nur bei der CHO-hA₁-Membranpräparation unter den Basalwert ab (auf 17 ± 1 %). In [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien am Rattencortex- und Rattenstriatum besitzt **DPCPX** hingegen nur einen

kaum messbaren schwach invers-agonistischen Effekt (92 ± 2 % bzw. 95 ± 1 % der [³⁵S]GTP γ S-Bindung).



Ein Vorteil der rekombinanten Zellsysteme besteht darin, dass sie durch die hohe Rezeptordichte konstitutive (spontane) Aktivität besitzen, d. h. dass sich ein großer Anteil der Rezeptoren in der aktiven Konformation befindet. Dadurch kann ein deutlicherer Unterschied im Bindungsverhalten zwischen Agonisten, neutralen Antagonisten und vor allem Antagonisten mit invers-agonistischer Aktivität beobachtet werden (Vergleich Abb. 2-18).²⁶⁵ In Tab. 2-11 ist die Rezeptordichte von Rattenstriatum im Vergleich zu den CHO-Zellen dargestellt. Während der antagonistische Radioligand im Striatum mehr Bindungsstellen als der agonistische Radioligand findet, erkennen beide Radioliganden in den CHO-Zellen eine gleiche Anzahl von Bindungsstellen.

Der Unterschied zwischen nativem Gewebe und rekombinanten Zellen spiegelt sich auch in den ermittelten EC₅₀-Werten wieder. Die EC₅₀-Werte des Voll-Agonisten CPA, die in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an nativem Gewebe ermittelt wurden, unterscheiden sich stark von den EC₅₀-Werten aus Bindungsstudien an CHO-Zellen, die den humanen A₁-Rezeptor rekombinant exprimieren. Während sich bei Bindungsstudien am Rattenstriatum und Rattencortex EC₅₀-

Werte von $23,2 \pm 2,0$ nM bzw. $30,0 \pm 3,3$ nM ergaben, lieferten Bindungsstudien an den rekombinanten CHO-Zellen einen 20- bis 30-fach geringeren EC₅₀-Wert ($0,97 \pm 0,28$ nM). Die EC₅₀-Werte des inversen Agonisten **DPCPX** von $6,65 \pm 4,99$ nM (Rattencortex), $2,02 \pm 0,54$ nM (Rattenstriatum) und $5,18 \pm 1,57$ nM (CHO-hA₁-Zellen) unterschieden sich hingegen nur geringfügig voneinander. Somit ließen sich die EC₅₀-Werte der Referenzsubstanzen **CPA** und **DPCPX** aus früheren, in unserem Arbeitskreis durchgeführten [³⁵S]GTPγS-Bindungstudien gut reproduzieren (siehe Tab. 2-11).^{290, 291}

Tab. 2-11. Vergleich der in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Rattenstriatum-, Rattencortex- und an CHO-hA₁-Zell-Membranpräparationen ermittelten EC₅₀-Werte und der maximalen Effekte der A₁-Rezeptor-Liganden CPA und DPCPX (n=3).

Ligand	Rattenstriatum	Rattencortex	CHO-hA ₁ -Zellen
EC₅₀ ± SEM [nM]			
CPA	23,2 ± 2,0	30,0 ± 3,3 16,9 ± 0,20²⁹⁰	0,97 ± 0,28 0,825²⁹¹
DPCPX	2,02 ± 0,54	6,65 ± 4,99 6,03 ± 0,20²⁹⁰	5,18 ± 1,57 2,11²⁹¹
max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung relativ zum Basalwert (= 100 %) ± SEM [%]			
CPA	176 ± 2	204 ± 8 193 ± 12²⁹⁰	183 ± 7 236²⁹¹
DPCPX	95 ± 1	92 ± 2 86 ± 2²⁹⁰	17 ± 1 40²⁹¹
Rezeptordichte ± SEM [fmol/mg Protein]			
[³H]CCPA	846 ± 39	860¹⁶⁴ (*)	1069²⁹²
[³H]DPCPX	1570 ± 65	1080¹⁶³ (*)	1001²⁹²

(*) am ganzen Rattenhirn

Es kann festgehalten werden, dass der Einsatz einer Rattenstriatum-Membranpräparation in [³⁵S]GTPγS-Bindungstudien zur funktionellen Untersuchung von A₁-Rezeptoren problemlos möglich ist.

2.7.2. ENTWICKLUNG EINES [³⁵S]GTPγS-BINDUNGS-ASSAYS AN STRIATALEN ADENOSIN-A_{2A}-REZEPTOREN

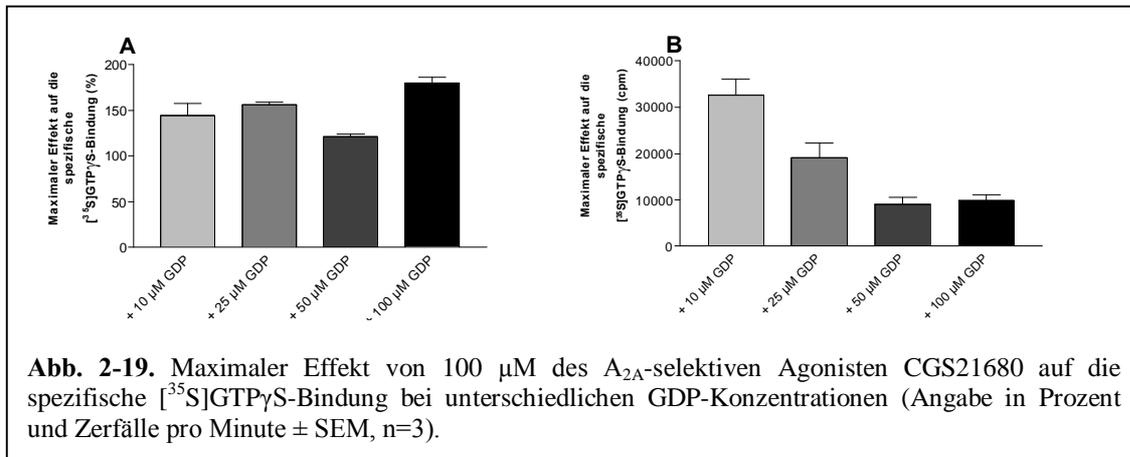
Um ein Testsystem für [³⁵S]GTPγS-Bindungstudien an striatalen Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren zu entwickeln, ging man zunächst von den im Kapitel 9.7.5. beschriebenen Bedingungen für [³⁵S]GTPγS-Bindungstudien an Adenosin-A₁-Rezeptoren aus. Beim „First Joint Italian-German Purine Club Meeting“ in Chieti (Italien) vom 18.-20. September 2005 präsentierten Martini et al. eine Methode zur Durchführung von [³⁵S]GTPγS-Bindungstudien an Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren in Thrombozyten.²⁹³ Basierend auf dieser Posterpräsentation und einer Veröffentlichung von Trincavelli et al. wurde versucht, die Bedingungen für [³⁵S]GTPγS-Bindungstudien an Adenosin-A₁-Rezeptoren auf A_{2A}-Rezeptoren zu übertragen.²⁹⁴

Die Variation bestand zunächst in der sukzessiven Veränderung der GDP-Konzentration. Der Zusatz von GDP fördert die Bildung des Gα-Gβγ-GDP-Komplexes, der die inaktive Form des G-Proteins darstellt, über die keine Signaltransduktion mehr ausgelöst werden kann. In der untenstehenden Tabelle ist der max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung des A_{2A}-selektiven Agonisten **CGS21680** in Abhängigkeit von der GDP-Konzentration dargestellt. 5 μg einer Rattenstriatum-Membranpräparation wurden mit 0,5 nM [³⁵S]GTPγS und 100 μM **CGS21680** 60 min lang unter den in Kapitel 9.7.5. beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 μM unmarkiertem GTPγS bestimmt.

Tab. 2-12. Maximaler Effekt auf die spezifische [³⁵S]GTPγS-Bindung des A_{2A}-selektiven Agonisten CGS21680 in Rattenstriatum-Membranpräparationen bei unterschiedlichen GDP-Konzentrationen (Angabe in Prozent und Zerfälle pro Minute, n=3).

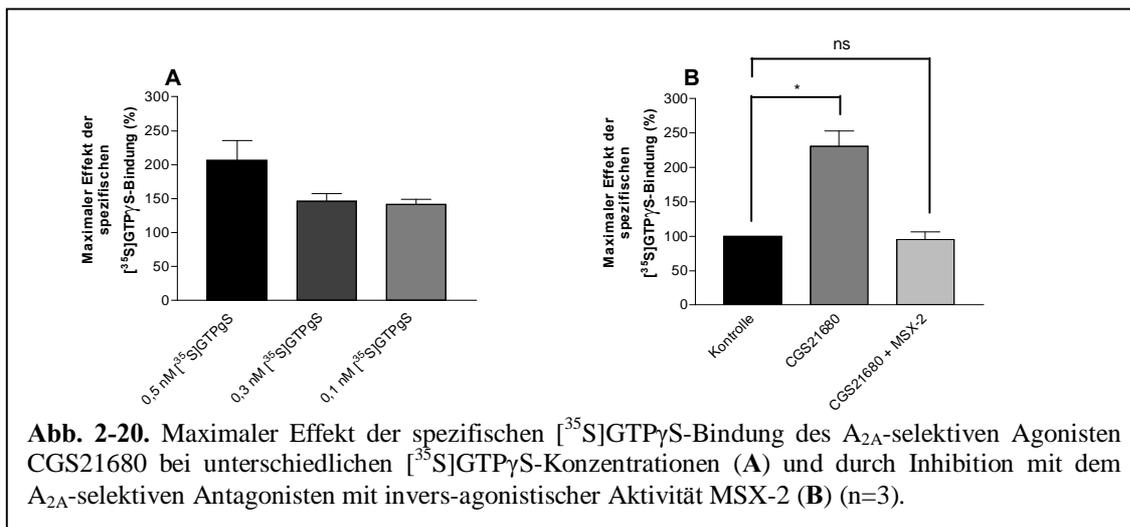
Agonist	GDP [μM]	max. Effekt der spezifischen [³⁵ S]GTPγS-Bindung relativ zum Basalwert (= 100 %)	
		% ± SEM	cpm ± SEM
CGS21680 (100 μM)	100	180 ± 6	9930 ± 1160
	50	121 ± 4	9000 ± 1550
	25	159 ± 2	19100 ± 3130
	10	145 ± 13	32700 ± 3390

Wie in Tab. 2-12 und Abb. 2-19 deutlich zu erkennen ist, sinken zwar die Zerfälle pro Minute bei steigender GDP-Konzentration, allerdings nimmt der max. Effekt relativ zum Basalwert zu. Die geringeren Counts bestätigen die Theorie, dass GDP die inaktive Form des G-Proteins fördert.



Da bei einer eingesetzten Konzentration von 100 μM GDP der max. Effekt mit einem Wert von 180 ± 6 % am höchsten ist, wurde diese Konzentration für künftige [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Ratten-A_{2A}-Rezeptoren gewählt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der höchste max. Effekt bei einer [³⁵S]GTPγS-Konzentration von 0,5 nM auftritt (siehe Abb. 2-19). Diese eingesetzte Radioligand-Konzentration lieferte im Gegensatz zu niedrigeren Konzentrationen (0,1 und 0,3 nM) einen max. Effekt von 209 ± 29 %, während geringere Konzentrationen nur zu max. Effekten von 146 ± 12 bzw. 141 ± 8 % führten.



Um nachzuweisen, dass der von **CGS21680** vermittelte Effekt ausschließlich auf A_{2A}-Rezeptoren zurückzuführen ist, wurde versucht, den max. Effekt dieser Verbindungen mit 10 μM des A_{2A}-selektiven inversen Agonisten **MSX-2** zu blockieren. Während 100 μM **CGS21680** zu einer Erhöhung der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung führte (231 ± 22 %), wurde diese

durch die Anwesenheit von 10 μ M **MSX-2** wieder vollständig aufgehoben (95 ± 11 %).

Das für [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an striatalen Ratten-Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren optimierte Pipettierschema ist in Kap. 9.7.5. dargestellt. Abweichend vom Inkubationspuffer für [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an Adenosin-A₁-Rezeptoren setzt sich der Inkubationspuffer für diese Studien folgendermaßen zusammen: 45 mM Tris-HCl, 90 mM NaCl, 0,9 mM EDTA, 4,5 mM MgCl₂, 0,9 mM DTT, 100 μ M GDP und 0,5 % BSA, pH 7,4. Die Durchführung von Bindungsstudien an CHO-Zellen, die den humanen A_{2A}-Rezeptor rekombinant exprimieren, blieb aufgrund der niedrigen Rezeptordichte der uns zur Verfügung stehenden transfizierten Zellen bisher leider erfolglos.

2.7.3. [³⁵S]GTP γ S-BINDUNGSSTUDIEN AN MEMBRANPRÄPARATIONEN MIT VERMINDERTEM CHOLESTEROL-GEHALT

Die [³⁵S]GTP γ S-Bindungstudien wurden sowohl an Rattenstriatum-Membranpräparationen durchgeführt, die zuvor analog dem Kap. 2.2.1. mit 10, 20 bzw. 40 mM M β CD behandelt worden waren, als auch an Membranpräparationen von CHO-Zellen, die den humanen A₁-Rezeptor rekombinant exprimieren. Letztere wurden nur mit 10 mM M β CD inkubiert. Es wurden die EC₅₀-Werte und die max. Effekte des A₁-selektiven Agonisten **CPA** und des inversen Agonisten **DPCPX** sowie des A_{2A}-selektiven Agonisten **CGS21680** auf die spezifische [³⁵S]GTP γ S-Bindung in Abhängigkeit des Cholesterol-Gehaltes untersucht. Die Ergebnisse aus den [³⁵S]GTP γ S-Bindungstudien sind in Tab. 2-13 am Ende dieses Kapitels zusammenfassend dargestellt.

Wie in Tab. 2-13 und Abb. 2-21 zu erkennen ist, nimmt der max. Effekt des A₁-Agonisten **CPA** mit sinkendem Cholesterol-Gehalt ab. Besitzt **CPA** vor der Behandlung des Rattenstriatums mit M β CD noch einen max. Effekt von 195 ± 9 %, so wird dieser Effekt schon bei einer Inkubation mit 10 mM M β CD signifikant verringert (auf 155 ± 8 %). Eine weitere Erhöhung der M β CD-Konzentration vermochte diesen Effekt nicht weiter zu steigern.

Ebenso wie beim max. Effekt ergaben sich auch bei den ermittelten EC₅₀-Werten Veränderungen. Bei steigender Konzentration des M β CD und einem daraus resultierenden verminderten Cholesterol-Gehalt, stieg der EC₅₀-Wert an. **CPA** besaß an der unbehandelten Membranpräparation einen EC₅₀-Wert von 14,2 nM. Wird das Rattenstriatum mit 10 mM M β CD versetzt, so nahm der EC₅₀-Wert um den Faktor 2 zu (26,7 nM). Eine Erhöhung der M β CD-Konzentration auf 20 bzw. 40 mM, führte zu EC₅₀-Werten von 41,3 bzw. 59,8 nM. Eine Erklärung für diesen Effekt könnte die verringerte Anzahl an Rezeptoren (B_{Max}) durch die

M β CD-Behandlung sein (siehe Kap. 2.2.3.), die trotz erhöhter Affinität der A₁-Liganden zum Rezeptor (siehe Kap. 2.2.3.) zu einem Rechtsshift der Konzentrations-Wirkungskurve des Agonisten führt.

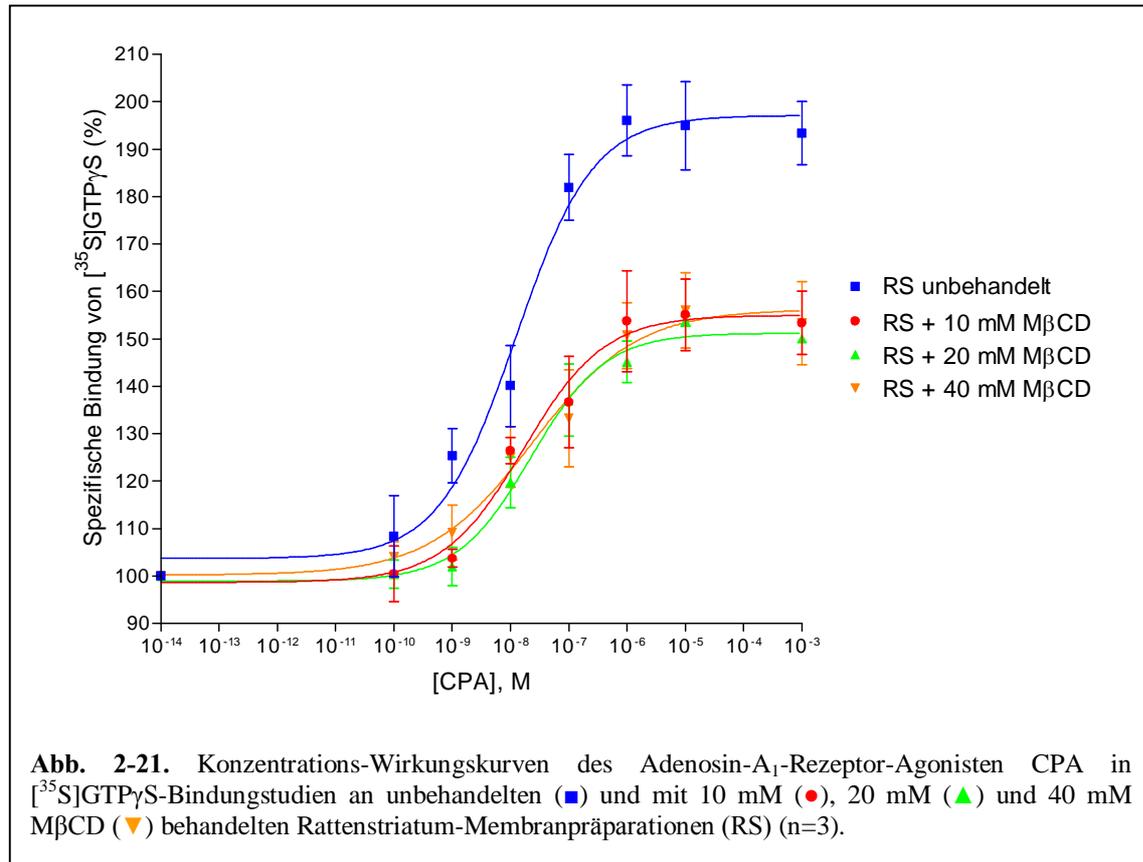


Abb. 2-21. Konzentrations-Wirkungskurven des Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten CPA in [³⁵S]GTPγS-Bindungstudien an unbehandelten (■) und mit 10 mM (●), 20 mM (▲) und 40 mM M β CD (▼) behandelten Rattenstriatum-Membranpräparationen (RS) (n=3).

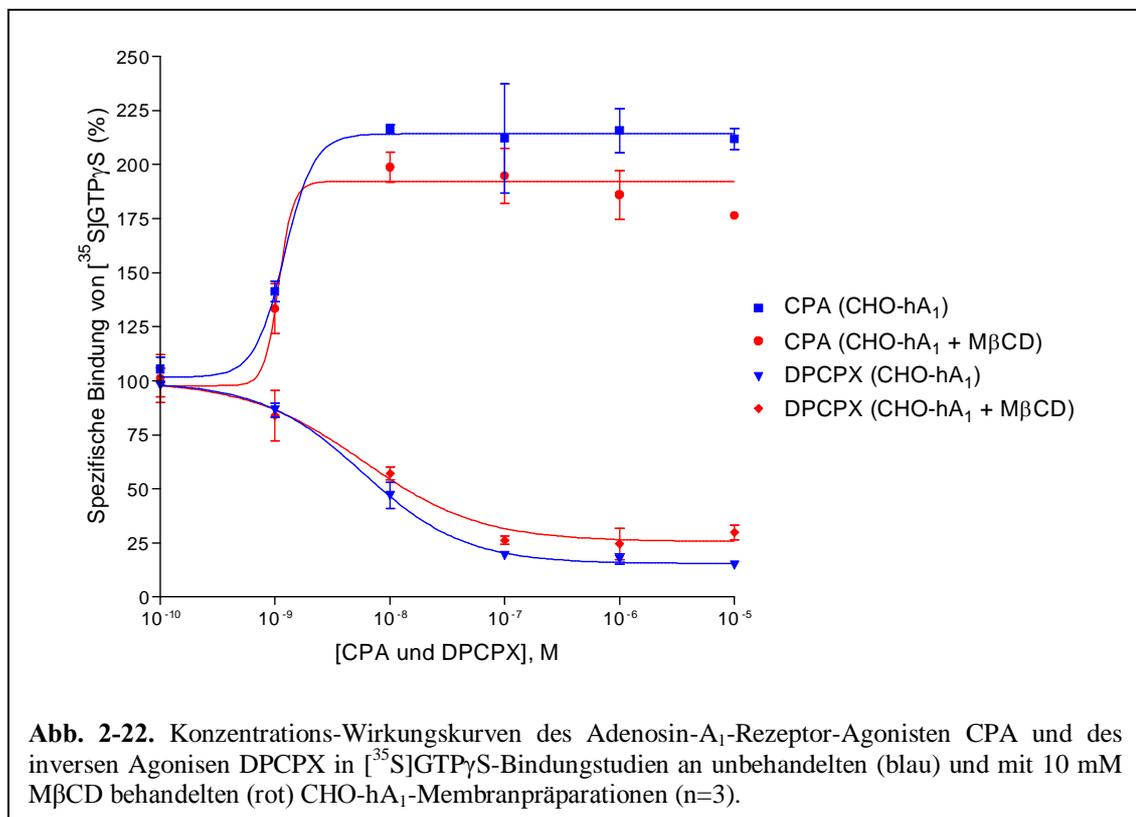
Wie bereits in Kap. 2.4.1. dargestellt, ist im nativen Gewebe zwar eine durch Agonisten vermittelte Stimulierung der [³⁵S]GTPγS-Bindung zu beobachten, allerdings rufen inverse Agonisten wie **DPCPX** keine deutliche Minderung der [³⁵S]GTPγS-Bindung hervor.^{295, 296} Durch den Einsatz von CHO-Zellen, die den humanen A₁-Rezeptor rekombinant exprimieren, sollte untersucht werden, ob der Cholesterol-Gehalt nicht nur Auswirkungen auf die CPA-induzierte Stimulierung der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung besitzt, sondern darüber hinaus auch auf die Effekte des Antagonisten **DPCPX**, der invers agonistische Aktivität besitzt.

Da eine Konzentration von 10 mM M β CD bereits einen statistisch signifikanten Einfluss auf den max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung des Agonisten CPA besaß und dieser durch eine Erhöhung der M β CD-Konzentration auch nicht weiter gesteigert werden konnte, wurde die Membranpräparation der CHO-hA₁-Zellen mit derselben Konzentration (10 mM M β CD) behandelt.

Im Gegensatz zur Rattenstriatum-Membranpräparation, die einen Cholesterol-Gehalt von 2,77

mmol/g Protein (siehe Kap. 2.2.1.) aufwies, wurde für die CHO-hA₁-Membranpräparation ein wesentlich geringerer Cholesterolgehalt von 0,39 mmol/g Protein ermittelt. Eine Behandlung mit 10 mM M β CD senkte diesen um nur 15 % auf 85 % (0,33 mmol/g Protein) gegenüber der unbehandelten Membranpräparation. Der Cholesterolgehalt der Rattenstriatum-Membranpräparation wurde durch Inkubation mit 10 M β CD hingegen um 50 % auf 1,37 mmol/g Protein vermindert (siehe Kap. 2.2.1.).

Dieser niedrige Cholesterolgehalt und die daraus resultierende geringe Diskrepanz zwischen der behandelten und der unbehandelten CHO-hA₁-Membranpräparation könnte als Grund dafür angeführt werden, warum sich die EC₅₀-Werte der Referenzsubstanzen **CPA** und **DPCPX** nach M β CD-Behandlung nur geringfügig verändert haben. Vor der Behandlung wurden für **CPA** und **DPCPX** EC₅₀-Werte von $1,39 \pm 0,20$ bzw. $6,38 \pm 2,41$ nM ermittelt, danach wurden ähnliche Werte erhalten ($1,05 \pm 0,08$ bzw. $6,54 \pm 1,14$ nM).



Während der verminderte Cholesterolgehalt keinen Einfluss auf die EC₅₀-Werte der Referenzsubstanzen zu haben scheint, ist hingegen eine Abnahme des max. Effektes sowohl von **CPA** als auch von **DPCPX** zu erkennen. Der max. Effekt des Agonisten **CPA** verringerte sich von 212 ± 5 % auf 163 ± 14 %. Statistische Signifikanz-Untersuchungen aller Datenpunkte von 10 μ M bis 10 nM haben allerdings ergeben, dass die Abnahme des max. Effektes nicht

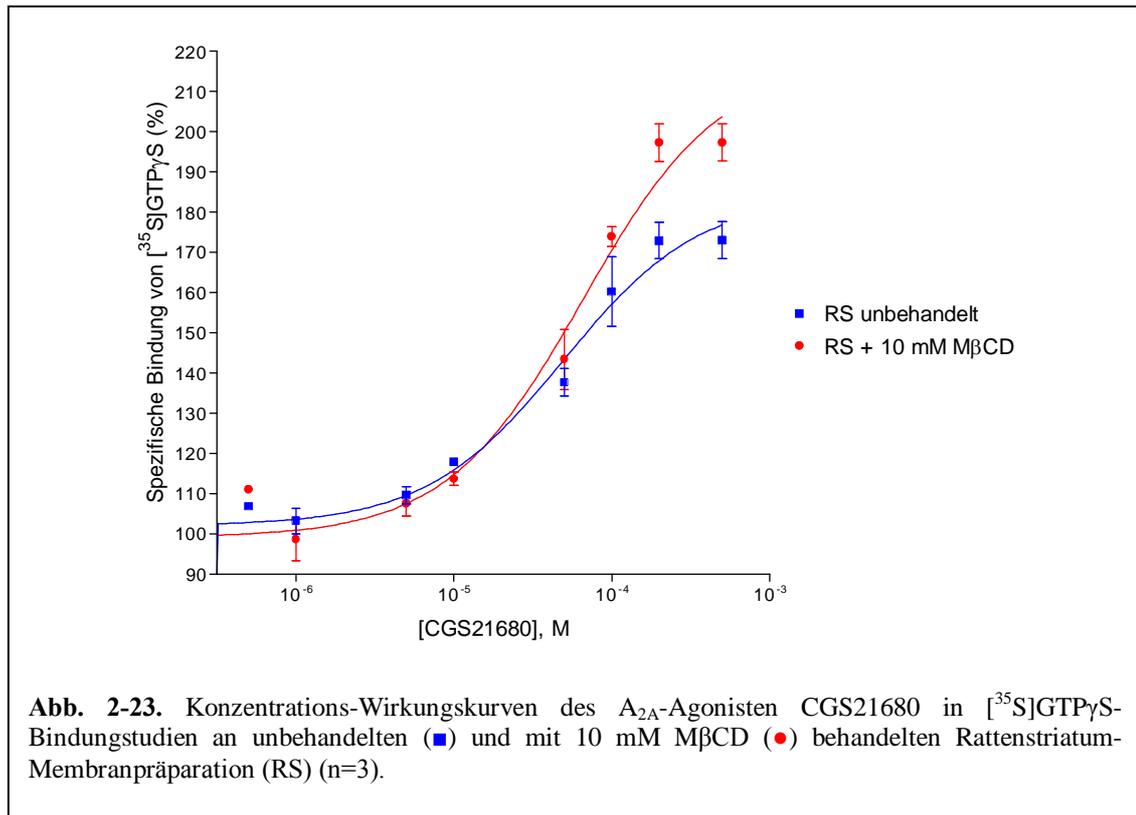
signifikant ist. Bei dem inversen Agonisten **DPCPX** zeigte sich jedoch eine signifikante Verringerung des max. Effektes ($15 \pm 1 \%$ vs. $30 \pm 4 \%$, Basalwert: 100 %).

Vergleicht man nun die Abbildungen 2-21 und 2-22 miteinander, so wird deutlich, dass es bei den [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien am Rattenstriatum zu einem Rechtsshift der Konzentrations-Wirkungskurve des Agonisten CPA kommt. Dieser Rechtsshift ist bei Bindungsstudien mit CHO-hA₁-Membranpräparationen nicht zu beobachten. Nach MβCD-Behandlung wurde der Cholesterol-Gehalt der Rattenstriatum-Membranpräparation um 50 % vermindert, während der Cholesterol-Gehalt der CHO-hA₁-Membranpräparation nur um 15 % abgesenkt wurde. Deshalb ist möglicherweise die max. Anzahl an Rezeptoren in der CHO-hA₁-Membranpräparation nicht in dem Maße verringert, wie bei der Rattenstriatum-Membranpräparation.

Es konnte gezeigt werden, dass der Cholesterol-Gehalt nicht nur für die Funktion des Agonisten **CPA** wichtig ist, sondern auch für die des inversen Agonisten **DPCPX**. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur Ratten-Adenosin-A₁-, sondern auch humane Rezeptoren betroffen sind.

Analog zu den [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an der CHO-hA₁-Membranpräparation wurde für [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren die Rattenstriatum-Membranpräparation nur mit einer Konzentration von 10 mM MβCD behandelt. Diese Bindungsstudien sind zurzeit nur an nativem Gewebe möglich, da die CHO-Zellen, die den humanen A_{2A}-Rezeptor rekombinant exprimieren, eine zu geringe Rezeptordichte aufweisen. Die Untersuchungen wurden mit dem A_{2A}-selektiven Agonisten **CGS21680** an Striatum-Membranen durchgeführt.

Entsprechend zum Adenosin-A₁-Rezeptor nahm der EC₅₀-Wert des verwendeten Agonisten (**CGS21680**) nach Verminderung des Cholesterol-Gehaltes zu. Wurde vor Behandlung mit 10 mM noch ein EC₅₀-Wert von $64,0 \pm 5,0 \mu\text{M}$ ermittelt, so erhöhte sich dieser nach der Behandlung auf einen Wert von $91,8 \pm 11,5 \mu\text{M}$, es konnte allerdings keine statistische Signifikanz erreicht werden. Betrachtet man nun den max. Effekt des Agonisten **CGS21680**, so erhöhte sich dieser im Gegensatz zum max. Effekt des A₁-selektiven Agonisten **CPA** nach Verringerung des Cholesterol-Gehaltes. Der ursprüngliche max. Effekt von $173 \pm 5 \%$ stieg statistisch signifikant um mehr als 20 % auf $197 \pm 5 \%$ an. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von **CGS21680** konnte die Konzentration nicht weiter erhöht werden, was die unzureichende Plateau-Bildung erklärt (vgl. Abb. 2-23).



In der Literatur wurde für **CGS21680** in [³⁵S]GTPγS-Studien an A_{2A}-Rezeptoren von Thrombozyten ein EC₅₀-Wert von 7,3 nM ermittelt.²⁹³ An HEK-293-Zellen, die mit dem humanen A_{2A}-Rezeptor stabil transfiziert worden waren, wurde in cAMP-Studien ein EC₅₀-Wert von 1,0 nM bestimmt.²⁴⁷ Folglich weicht der in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren in einer Rattenstriatum-Membranpräparation bestimmte EC₅₀-Wert mit 64 μM stark vom Literaturwert ab. Milligan fasste in einem Review-Artikel die Grenzen konventioneller [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien zusammen. Sie beschränken sich i.d.R. auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über ein inhibitorisches G-Protein (G_i) an die Adenylatcyclase gekoppelt sind (siehe Kap. 1.5.). Dies wird durch die hohe Expression des G_i-Proteins in Zellmembranen begründet. Will man die Aktivierung der G_s und G_{q/11}-Proteine messen, so stören hohe Basallevel, und die Stimulation dieser G-Proteine wird überdeckt. Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren sind über ein solches stimulatorisches G-Protein (G_s) an die Adenylatcyclase gekoppelt. Zudem ist im Striatum das Gα_{olf}-Protein höher exprimiert als das Gα_s-Protein.^{288, 289} Milligan empfahl die Verwendung von CHO-Zellen, da diese einen hohen Gehalt verschiedener G-Proteine aufweisen und das Problem durch den Einsatz dieser Zellen gelöst werden könnte.²⁶¹ Da aber der durch den A_{2A}-Agonisten **CGS21680** vermittelte Effekt auf die spezifische [³⁵S]GTPγS-Bindung durch den A_{2A}-selektiven inversen Agonisten MSX-2 inhibiert werden konnte (Kap.

2.7.2.), sind diese Effekte eindeutig auf den A_{2A}-Rezeptor zurückzuführen. Weiterführende [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an CHO-Zellen, die den humanen A_{2A}-Rezeptor in hoher Dichte exprimieren, sollten nach Milligan zu besseren Ergebnissen führen.

In Tab. 2-13 sind die Ergebnisse aus den [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an verschiedenen unbehandelten und mit MβCD-behandelten Membranpräparationen zusammenfassend dargestellt.

Ein verringerter Cholesterol-Gehalt übt demnach auf die Funktion des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors ebenso einen Einfluss aus, wie auf die des Adenosin-A₁-Rezeptors. Während die EC₅₀-Werte der verwendeten Agonisten sowohl am A₁- und als auch am A_{2A}-Rezeptor tendenziell zunahm, ohne allerdings Signifikanz zu erreichen, ergaben sich sehr deutliche Veränderungen der max. Effekte. Diese wurden durch Verringerung des Cholesterol-Gehaltes reduziert (A₁) bzw. gesteigert (A_{2A}). Solche entgegengesetzten Effekte waren bereits in Sättigungsexperimenten beobachtet worden. Während sich der B_{Max}-Wert der verwendeten A₁- und A_{2A}-selektiven Radioliganden unabhängig vom Rezeptorsubtyp nach Cholesterol-Entzug verringerte, wurde für den A₁-Rezeptor eine Affinitätssteigerung der Radioliganden verzeichnet. Die Affinität der A_{2A}-Radioliganden wurde hingegen vermindert.

Bisher wurden [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien nur von einer Arbeitsgruppe zur Untersuchung von Einflüssen des Cholesterol-Gehaltes auf die Rezeptorfunktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren verwendet. Bari et al. setzten den Cannabinoid-CB₁-Rezeptor-Agonisten Anandamid (1 μM) ein, der in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an CB₁-Rezeptoren (C6-Zellen) in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Erhöhung der [³⁵S]GTPγS-Bindung führte. Dieser Effekt konnte durch die Gabe des inversen Agonisten SR141716 (0,1 μM) vollständig wieder aufgehoben werden. Durch Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 – 5 mM MβCD) konnte der max. Effekt des Anandamids auf die spezifische [³⁵S]GTPγS-Bindung gesteigert werden. Das Maximum wurde bei einer Konzentration von 2,5 mM MβCD erreicht.¹¹⁷ Die Arbeitsgruppe führt dies auf eine ungehinderte Bewegung und Interaktion der Proteine nach Zerstörung der „Lipid Rafts“ zurück. Pucadyil et al. führten Konkurrenzexperimente mit GTPγS durch. Die spezifische Bindung des Agonist-Radioliganden [³H]8-OH-DPAT am 5-HT_{1A}-Rezeptor wurde durch GTPγS konzentrationsabhängig inhibiert und es konnte ein IC₅₀-Wert von 83 ± 4 nM ermittelt werden. Die Inhibitionskurve von GTPγS erfuhr bei Verwendung einer Rinder-Hippocampus-Membranen mit vermindertem Cholesterol-Gehalt (40 mM MβCD) einen Rechtsshift mit einem IC₅₀-Wert von 206 ± 14 nM. Sie begründeten diesen Effekt mit einer drastischen Verringerung

der Kopplung von G-Proteinen an den Rezeptor in M β CD-behandelten Membranpräparationen und schrieb dem Cholesterin modulatorische Eigenschaften zu.¹²⁵

Tab. 2-13. Vergleich der in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an verschiedenen unbehandelten und M β CD-behandelten Membranpräparationen ermittelten EC₅₀-Werte und max. Effekte der spezifischen [³⁵S]GTP γ S-Bindung (n=3).

Membranpräparation	Chol.-Gehalt [%]	AR	Ligand	EC ₅₀ \pm SEM [nM]	max. spezifische [³⁵ S]GTP γ S-Bindung relativ zum Basalwert (=100 %) \pm SEM [%]
Rattenstriatum (RS) (Kontrolle)	100	A ₁	CPA	14,2 \pm 5,1	195 \pm 9
RS + 10 mM M β CD	50	A ₁	CPA	26,7 \pm 15,4 ^{ns} (P = 0,4858)	155 \pm 8* (P = 0,0285)
RS + 20 mM M β CD	27	A ₁	CPA	41,3 \pm 22,3 ^{ns} (P = 0,3029)	154 \pm 1* (P = 0,0119)
RS + 40 mM M β CD	13	A ₁	CPA	59,8 \pm 45,6 ^{ns} (P = 0,3771)	156 \pm 8* (P = 0,0338)
CHO-hA ₁ (Kontrolle)	100	A ₁	CPA	1,39 \pm 0,20	212 \pm 5
CHO-hA ₁ + 10 mM M β CD	85	A ₁	CPA	1,05 \pm 0,08 ^{ns} (P = 0,1832)	163 \pm 14 ^{ns} (P = 0,0752) ^a
CHO-hA ₁ (Kontrolle)	100	A ₁	DPCPX	6,38 \pm 2,41	15 \pm 1
CHO-hA ₁ + 10 mM M β CD	85	A ₁	DPCPX	6,54 \pm 1,14 ^{ns} (P = 0,9558)	30 \pm 4* (P = 0,0158)
Rattenstriatum (Kontrolle)	100	A _{2A}	CGS21680	64,0 \pm 5,0 (μ M)	173 \pm 5
RS + 10 mM M β CD	50	A _{2A}	CGS21680	91,8 \pm 11,5 ^{ns} (μ M) (P = 0,9051)	197 \pm 5* (P = 0,0200)

* (0,01 < P < 0,05), ns (P > 0,05) vs. EC₅₀-Wert bzw. max. Effekt (Kontrolle)

^aStatistische Untersuchungen aller Datenpunkte (10 μ M bis 10 nM) ergaben keine signifikanten Unterschiede (10 μ M: 212 \pm 5 % gegenüber 163 \pm 14 %, P = 0,0752; 1 μ M: 216 \pm 10 % gegenüber 172 \pm 15 %, P = 0,0781; 100 nM: 212 \pm 25 % gegenüber 195 \pm 13 %, P = 0,5787; 1 nM: 216 \pm 2 % gegenüber 199 \pm 7 %, P = 0,0746; alle Konzentration: 219 \pm 13 % gegenüber 183 \pm 2 5%, P = 0,0825)

2.7.4. [³⁵S]GTPγS-BINDUNGSSTUDIEN AN RATTENSTRIATUM-MEMBRAN-PRÄPARATIONEN NACH RÜCKFÜHRUNG VON CHOLESTEROL

Um nachzuweisen, dass nicht nur die spezifische Bindung von radioaktiv markierten A₁-Liganden nach Cholesterol-Rückführung wiederhergestellt werden konnte (siehe Kap. 2.3.2.2.), sondern sich auch die Rezeptorfunktion wieder herstellen lässt, wurden zusätzlich [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Adenosin-A₁-Rezeptoren durchgeführt.

Tab. 2-14. Abhängigkeit des durch den A₁-selektiven Agonisten CPA ausgelösten max. Effektes auf die spezifische [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abhängigkeit vom Cholesterol-Gehalt (n=3).

Membranpräparation	Chol.-Gehalt [%]	max. Effekt der spezifischen [³⁵ S]GTPγS-Bindung relativ zum Basalwert (= 100 %) ± SEM [%]
		Adenosin-A ₁ -Rezeptor (1 μM CPA)
Rattenstriatum (Kontrolle)	100	148 ± 5
RS + 40 mM MβCD	31	108 ± 4** (P = 0,0033)
RS + 40 mM MβCD + 40 mM Komplex	114	128 ± 4* (P = 0,0291)

* (0,01 < P < 0,05), ns (P > 0,05) vs. Kontrolle

Die [³⁵S]GTPγS-Bindungsassays an A₁-Rezeptoren wurden im nativen Gewebe (Rattenstriatum-Membranpräparationen) durchgeführt. Es wurde ausschließlich der max. Effekt des A₁-selektiven Agonisten CPA in Abhängigkeit vom Cholesterol-Gehalt einer Rattenstriatum-Membranpräparation untersucht. CPA wurde in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt.

Aus Tab. 2-14 und Abb. 2-24 ist ersichtlich, dass sich die Rezeptorfunktion des Adenosin-A₁-Rezeptors wiederherstellen lässt. Wird eine Rattenstriatum-Membranpräparation mit 40 mM MβCD behandelt, so sinkt der max. Effekt der spezifischen

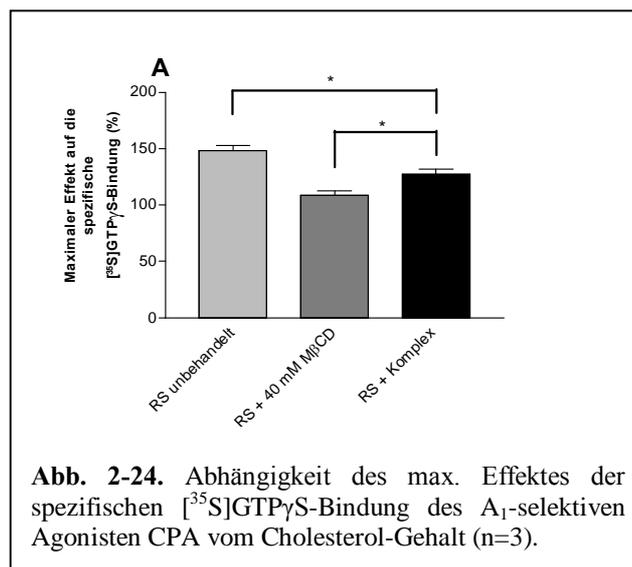


Abb. 2-24. Abhängigkeit des max. Effektes der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung des A₁-selektiven Agonisten CPA vom Cholesterol-Gehalt (n=3).

[³⁵S]GTPγS-Bindung des A₁-Agonisten CPA in statistisch signifikanter Weise. Die Werte weichen allerdings geringfügig von den in Tab. 2-13 dargestellten Werten ab, was daran liegen

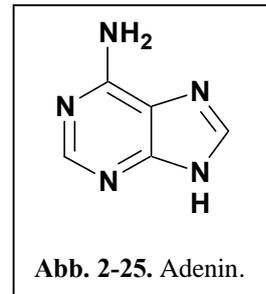
kann, dass an dieser Stelle eine andere Rattenstriatum-Charge verwendet worden ist.

In der Literatur wurde vielfach beschrieben, dass M β CD selektiv nur das Cholesterol aus der Plasma-Membran entfernt ^{66, 68, 69, 71, 72}. Pucadyil und Klein et al. konnten dies bestätigen, blieb doch der Gesamphospholipid-Gehalt nach Behandlung mit verschiedenen Konzentration an M β CD konstant.^{63, 88} Somit kann dies nicht als Grund dafür angeführt werden, dass sich die Rezeptorfunktion des A₁-Rezeptors nicht wieder vollständig herstellen lässt. Der Grund muss vielmehr in den Versuchsbedingungen gesucht werden, unterliegen die Rattenstriatum-Membranpräparationen doch vielen Zentrifugations-, Wasch- und Inkubationsschritten bei Raumtemperatur.

2.8. EXKURS: ENTWICKLUNG EINES [³⁵S]GTPγS-BINDUNGS-ASSAYS AN CORTICALEN RATTENHIRN-ADENIN-REZEPTOREN

Der Adenin-Rezeptor kann in die Gruppe der Purin-Rezeptoren eingeordnet werden, er gehört allerdings weder zu den P1-Rezeptoren noch zu den P2-Rezeptoren (siehe Kap. 1.5.). Aufgrund der Verwandtschaft des Adenins zu den Signalmolekülen der P1-Rezeptoren (Nukleoside) und der P2-Rezeptoren (Nukleotide), können die Adenin-Rezeptoren als eine neue Klasse von Purin-Rezeptoren (P0) bezeichnet werden.¹⁵²

Die Bindungsstudien, die zur Identifizierung und Charakterisierung des Adenin-Rezeptors auf Proteinebene führten, wurden an chinesischen Hamster-Ovarial-Zellen (CHO), die rekombinant mit dem Ratten-Rezeptor transfiziert worden waren, durchgeführt.¹⁵³ Einige



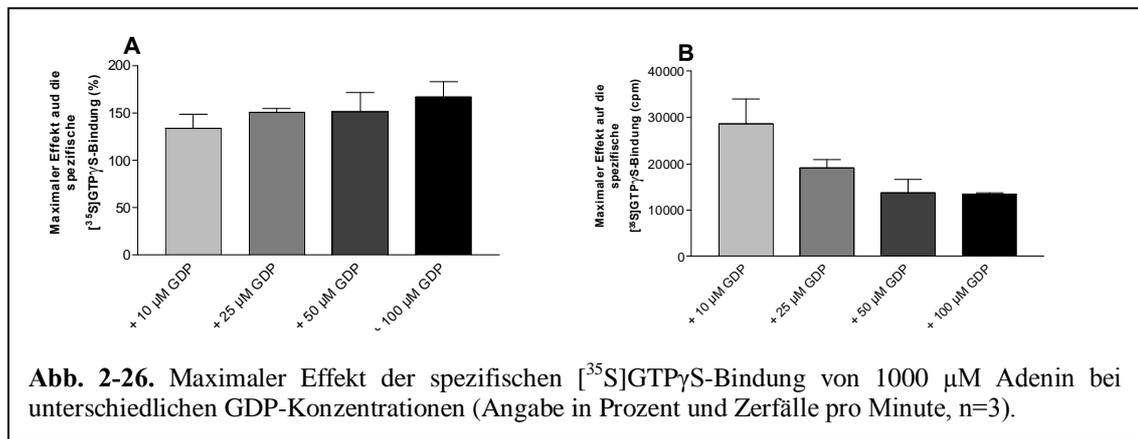
Zeit später konnte gezeigt werden, dass hochaffine Adenin-Bindungsstellen sowohl in nativen Geweben der Ratte (Cortex, Striatum) als auch des Menschen (Cortex) in hoher Dichte exprimiert werden.^{154, 297}

Zunächst wurde angenommen, dass der Adenin-Rezeptor, der zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, über ein inhibitorisches G-Protein (G_i) an das Enzym Adenylatcyclase (AC) gekoppelt ist.¹⁵³ Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass eine Stimulation des Rezeptors durch den physiologischen Agonisten Adenin nicht nur zu einer Inhibition der Adenylatcyclase und somit zu einer Verringerung der cAMP-Produktion führen kann, sondern in manchen System zu einer Stimulation dieses Enzyms führt, was mit einem Anstieg des cAMP-Spiegels einhergeht.²⁹⁷

Bender et al. beschrieben im Jahre 2002 eine Methode zur Durchführung von [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an diesem neu identifizierten Adenin-Rezeptor, exprimiert in CHO-Zellen. Im Folgenden wird die Übertragung des in Kap. 2.7.2. entwickelten Testsystems zur Durchführung von [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an striatalen Ratten-Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren auf den corticalen Ratten-Adenin-Rezeptor beschrieben.

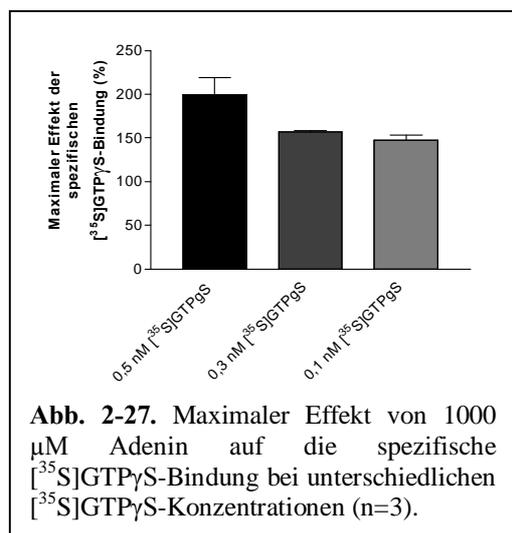
Tab. 2-15. Maximaler Effekt von Adenin auf die spezifische [³⁵S]GTPγS-Bindung bei unterschiedlichen GDP-Konzentrationen in Rattencortex-Membranpräparationen (Angabe in Prozent und Zerfälle pro Minute, n=3).

Agonist	GDP [μM]	max. Effekt der spezifischen [³⁵ S]GTPγS-Bindung relativ zum Basalwert (= 100 %)	
		% ± SEM	cpm ± SEM
Adenin [1000 μM]	100	167 ± 16	13500 ± 200
	50	152 ± 20	13700 ± 2900
	25	151 ± 14	19100 ± 1700
	10	134 ± 15	28600 ± 5300



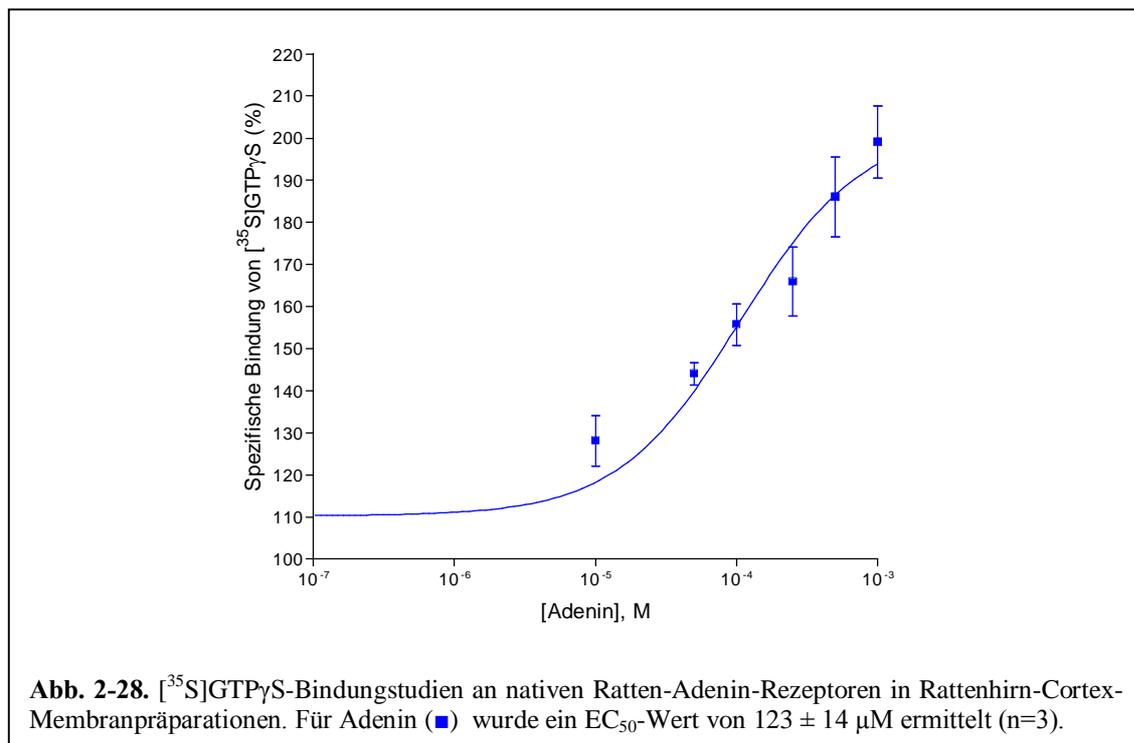
Für die Vorversuche wurde eine sehr hohe Adenin-Konzentration von 1000 μM eingesetzt, die einen maximal erreichbaren Effekt zeigen sollte.

Analog zu Kap. 2.7.2. wurde zunächst die GDP-Konzentration variiert. Auch hier zeigte sich, dass der Einsatz von 100 μM GDP den größten max. Effekt von 167 ± 16 % hervorruft (Basalwert: 100 %). Geringere Konzentrationen von 10, 25 oder 50 μM GDP lieferten einen geringeren max. Effekt von 134 ± 15 %, 151 ± 4 % oder 152 ± 20 % (siehe Abb. 2-26). Es ist ebenfalls deutlich zu erkennen, dass die Zerfälle pro Minute bei steigender GDP-Konzentration sinken, was



wiederum bestätigt, dass GDP die inaktive Form des G-Proteins fördert. Der max. Effekt nimmt allerdings relativ zum Basalwert zu. Durch eine Erhöhung der [³⁵S]GTPγS-Konzentration auf

0,5 nM konnte der max. Effekt weiter, auf 200 ± 20 %, gesteigert werden. Eingesetzte Konzentrationen von 0,1 und 0,3 nM lieferten nur einen max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTP γ S-Bindung von 147 ± 6 und 157 ± 2 % (siehe Abb. 2-27). Durch eine gezielte Veränderung der Versuchsbedingungen konnte somit der max. Effekt von ca. 150 %, publiziert von Bender et al. für Untersuchungen an rekombinanten, hochexprimierenden CHO-Zellen,¹⁵³ für den physiologischen Agonisten weiter gesteigert werden, und dies sogar im nativen Gewebe (Rattencortex). Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von Adenin konnte die Konzentration nicht weiter erhöht werden, was die unzureichende Plateau-Bildung erklärt (vgl. Abb. 2-28).



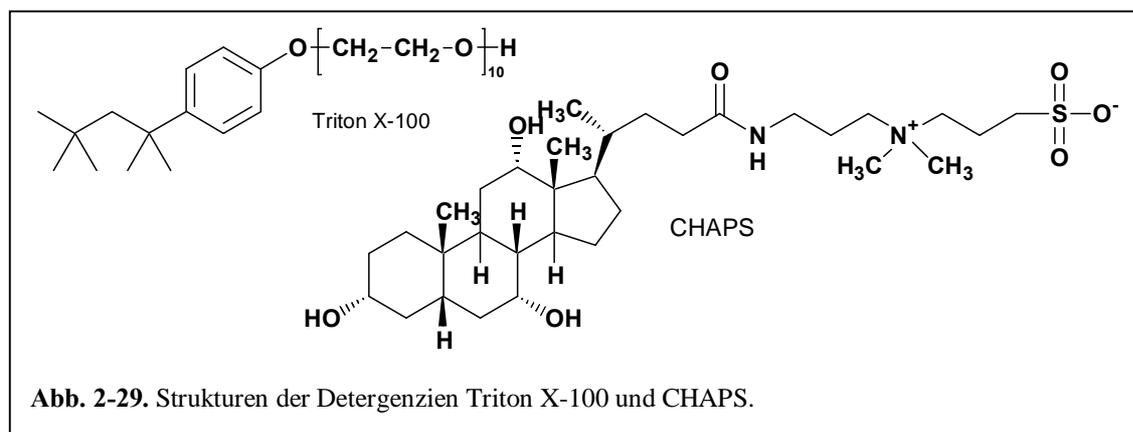
Wie in Abb. 2-28 deutlich zu erkennen ist, führt Adenin in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Erhöhung der [³⁵S]GTP γ S-Bindung mit einem EC₅₀-Wert von 123 ± 12 μ M. Bender et al. fanden einen wesentlich geringeren EC₅₀-Wert von 62 nM. Allerdings wurden die [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an CHO-Zellen durchgeführt, die mit dem Ratten-Adenin-Rezeptor stabil transfiziert worden waren, und nicht an nativem Gewebe (Ratten-Cortex). Bender et al. fanden heraus, dass Adenin die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion in den transfizierten CHO-Zellen inhibierte. Daraus wurde geschlossen, dass die Adenin-Rezeptoren über ein inhibitorisches G-Protein (G_i) an die Adenylatcyclase gekoppelt sind.¹⁵³ Wie bereits in Kap. 2.7.3. beschrieben, beschränken sich die konventionellen [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien weitestgehend auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über ein inhibitorisches G-Protein (G_i)

an die Adenylatcyclase gekoppelt sind. Gorzalka et al. zeigten hingegen, dass Adenin-Rezeptoren nicht nur einen inhibierenden Effekt auf die Adenylatcyclase ausüben können, sondern in manchen Zellen auch einen stimulierenden Effekt. Sie nahmen an, dass die Kopplung des Adenin-Rezeptors an ein inhibitorisches G_i- oder ein stimulatorisches G_s-Protein von der jeweiligen Spezies bzw. vom jeweiligen Organ abhängen könnte. Bisher ist allerdings noch nicht bekannt, ob Adenin-Rezeptoren im Rattenhirn-Cortex G_i- oder G_s-gekoppelt sind. Der gefundene hohe EC₅₀-Wert für Adenin in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien könnte ein Hinweis darauf sein, dass Adenin-Rezeptoren im Rattenhirn-Cortex nicht G_i- sondern G_s- oder G_q-gekoppelt sind. Dies könnte der Grund für die starken Abweichungen zu dem von Bender et al. publizierten EC₅₀-Wert von Adenin sein. Will man die Aktivierung der G_s und G_{q/11}-Proteine messen, so stören hohe Basallevel und die Stimulation dieser G-Proteine wird überdeckt (siehe Kap. 2.7.3.). Um diese Störungen zu umgehen empfahl Milligan die Verwendung von CHO-Zellen, da diese einen hohen Gehalt verschiedener G-Proteine aufweisen und das Problem durch den Einsatz dieser Zellen gelöst werden könnte.²⁶¹ Allerdings exprimieren CHO-Zellen selbst Adenin-Rezeptoren und eignen sich daher nur bedingt als Expressionssysteme für diese Rezeptorfamilie.²⁹⁷

2.9. ISOLIERUNG UND UNTERSUCHUNG VON „DETERGENT RESISTANT MEMBRANES“ DURCH EINE SUCROSE-GRADIENTEN-ZENTRIFUGATION

Bisher war man von der Annahme ausgegangen, dass „Membrane Rafts“ in Detergenzien unlöslich sind. Bis zum „Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function“ (2006) waren „Detergent Resistant Membranes“ (DRMs) noch als „Lipid Rafts“ bezeichnet worden.⁵⁷ Basierend auf zahlreichen Veröffentlichungen kam man auf diesem Symposium zu dem Ergebnis, dass die Eigenschaft „detergent resistant“ nicht mehr in Zusammenhang mit den „Membrane Rafts“ gebracht werden kann, da durch den Einsatz von Detergenzien diese erst gebildet und keineswegs nur isoliert werden (vgl. Kap. 1.3.1.-1.3.2.).^{57, 59} Im Folgenden wird deshalb der Begriff „Detergent Resistant Membranes“ verwendet. Diese wurden durch eine Sucrose-Gradienten-Zentrifugation unter Verwendung von Detergenzien isoliert. Die Arbeitsgruppe um Morris et al. waren die Ersten, die „Membrane Rafts“ durch den Einsatz eines Detergens-freien Sucrose-Gradienten isoliert haben.⁶⁴

Durch die folgenden Versuchsreihen sollte untersucht werden, ob Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren in DRMs angereichert werden und welche Eigenschaften sie in diesen cholesterolreichen Strukturen besitzen. Nach Solubilisierung von Membranen durch den Einsatz von Detergenzien reichern sich die DRMs in einer sich anschließenden Sucrose-Gradienten-Zentrifugation im Bereich geringer Dichte an.¹¹⁹ Zur Solubilisierung der Membranen können verschiedene Detergenzien verwendet werden, auf die bereits in Kap. 1.4.4. ausführlich eingegangen worden ist.

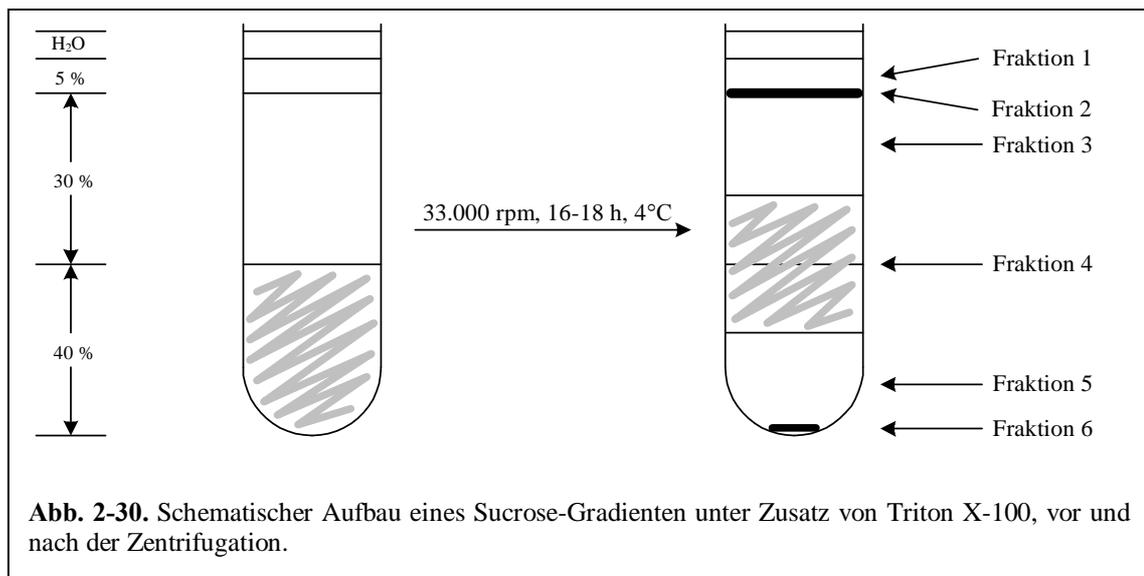


In diesem Falle wurden das nichtionische Detergens Triton X-100 (Octylphenolpoly(ethylenglycolether)) und das zwitterionische Detergens CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanosulfonat) eingesetzt (siehe Abb. 2-29).

2.9.1. SUCROSE-GRADIENTEN-ZENTRIFUGATION UNTER VERWENDUNG VON TRITON X-100 ALS DETERGENS

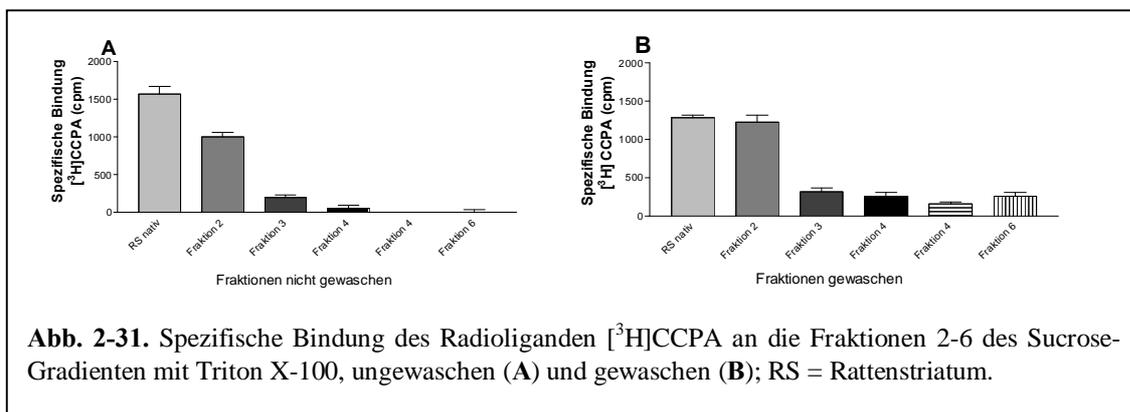
Bei dem Sucrose-Gradienten, der zur Isolierung der DRMs verwendet wurde, handelte es sich um einen diskontinuierlichen Gradienten. Zunächst wurde eine Rattenstriatum-Membranpräparation nach der Methode von Monastyrskaya et al. unter Zusatz von 0,4 % Triton X-100 und 0,2 mM Calciumchlorid für 0,5 h auf Eis inkubiert. Ein Zusatz von Calciumchlorid sollte die „Rafts“ stabilisieren.²⁹⁸

Um den Gradienten zu erstellen, wurde das Homogenat mit einer 80%-igen Sucrose-Lösung verdünnt, so dass sich eine Endkonzentration von 40 % ergab. In Ultra-Zentrifugenröhrchen wurde diese Suspension mit einer 30%-igen und einer 5%-igen Sucrose-Lösung überschichtet. Den Abschluss bildete eine Schicht aus Wasser.¹¹⁹ Der Gradient wurde 16-18 h bei 33.000 rpm und 4°C zentrifugiert (SW 55 Ti Rotor, Beckman Coulter). Wie in Abb. 2-30 dargestellt, reichert sich die DRMs im Bereich zwischen der 5- und der 30%-igen Sucrose-Lösung an, was in diesem Fall der Fraktion 2 entspricht. Der Gradient wurde in sechs Fraktionen aufgeteilt und der Protein- und Cholesterol-Gehalt der Fraktionen bestimmt.



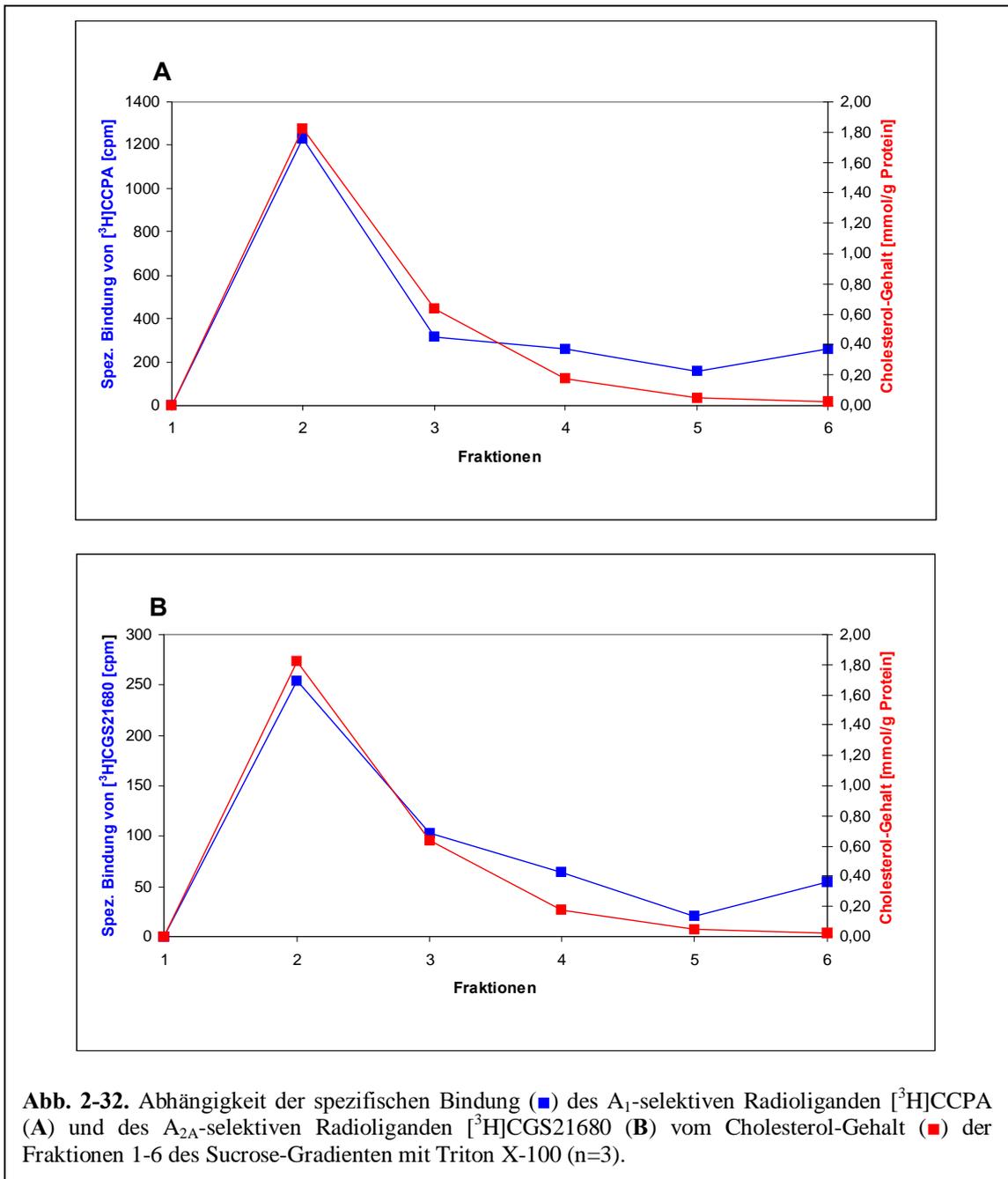
Wie bereits in Kap. 2.5. dargestellt, besitzt das nichtionische Detergens Triton X-100 einen großen Einfluss auf die spezifische Bindung von Radioliganden. Um sicherzugehen, dass durch die verwendeten Zusätze in späteren Bindungsstudien keine Probleme verursacht werden, wurden zusätzlich Calciumchlorid und Sucrose in Radioligand-Bindungsstudien auf einen möglichen Einfluss hin untersucht. Beide Verbindungen hatten aber keine Effekte.

Als Marion M. Bradford ihre Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes in nativem Gewebe veröffentlichte, stellte sie u.a. Untersuchungen zum Einfluss von Sucrose an.²⁹⁹ Auch hier zeigte sich, dass Sucrose den Assay nur geringfügig bzw. gar nicht störte. Anders sah es beim nichtionischen Detergens Triton X-100 aus. Am Beispiel des Radioliganden [³H]CCPA zeigt die Abb. 2-31 deutlich, warum es so wichtig ist, die Fraktionen des Sucrose-Gradienten vor Einsatz in den Bindungsstudien zu waschen. Im Vergleich zu den ungewaschenen Fraktionen ist die spezifische Bindung von [³H]CCPA in den drei Mal mit jeweils 50 mM Tris-Puffer gewaschenen Fraktionen deutlich höher. Dieser Unterschied war bei Verwendung der Radioliganden [³H]CGS21680 und [³H]ZM241385 sogar noch deutlicher.



In weiterführenden Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien wurden die gewaschenen Fraktionen 2-6 auf ihre spezifische Rezeptor-Bindung untersucht. Eingesetzt wurden der A₁-selektive Radioligand [³H]CCPA und der A_{2A}-selektive Radioligand [³H]CGS21680. Die Fraktion 1 konnte nicht weiter charakterisiert werden, da die Proteinbestimmung nach Bradford gezeigt hat, dass sich in dieser Fraktion kein Protein befindet. Zwar besitzt die Fraktion 6 (Pellet) die höchste Proteinkonzentration (17,17 mg/ml), aber bezogen auf den Cholesterol-Gehalt relativiert sich diese hohe Konzentration. Für die Fraktion 2 wurde ein Proteingehalt von 4,45 mg/ml ermittelt (Fraktion 3: 1,40 mg/ml; Fraktion 4: 2,76 mg/ml; Fraktion 5: 5,04 mg/ml). Trägt man nun den Cholesterol-Gehalt (in Bezug auf den Proteingehalt) der Fraktionen 1-6 gegenüber der spezifischen Bindung der Radioliganden [³H]CCPA und [³H]CGS21680 auf, so wird deutlich, dass die Fraktion 2 nicht nur den höchsten Cholesterol-Gehalt besitzt, sondern auch die höchste spezifische Bindung, sowohl des A₁-Radioliganden [³H]CCPA als auch des tritiierten A_{2A}-Liganden [³H]CGS21680 (siehe Abb. 2-31). Verglichen mit der unbehandelten Membranpräparation (Cholesterol-Gehalt: 1,25 mmol/g Protein) besitzt die Fraktion 2 einen wesentlich größeren Cholesterol-Gehalt (1,82 mmol/g Protein). Für die Fraktionen 3-6 wurde ein Cholesterol-Gehalt von 0,64 mmol/g Protein (3), 0,18 mmol/g Protein (4), 0,051 mmol/g

Protein (5) bzw. 0,022 mmol/g Protein (6) ermittelt. In der untenstehenden Abbildung wurde der Cholesterol-Gehalt der Fraktion 1 zur besseren Vergleichbarkeit auf 0 mmol/g Protein gesetzt. Die in dieser Versuchsreihe ermittelten und diskutierten Werte sind am Ende dieses Kapitels in Tab. 2-16 zusammenfassend dargestellt.



Gebreselassie et al. führten ähnliche Versuche durch, allerdings verwendeten sie Ratten-Leber-Membranen. In anschließenden Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Sigma-1-Rezeptor setzten sie den Radioliganden [³H](+)-Pentazocin und am Sigma-2-Rezeptor den Radioliganden

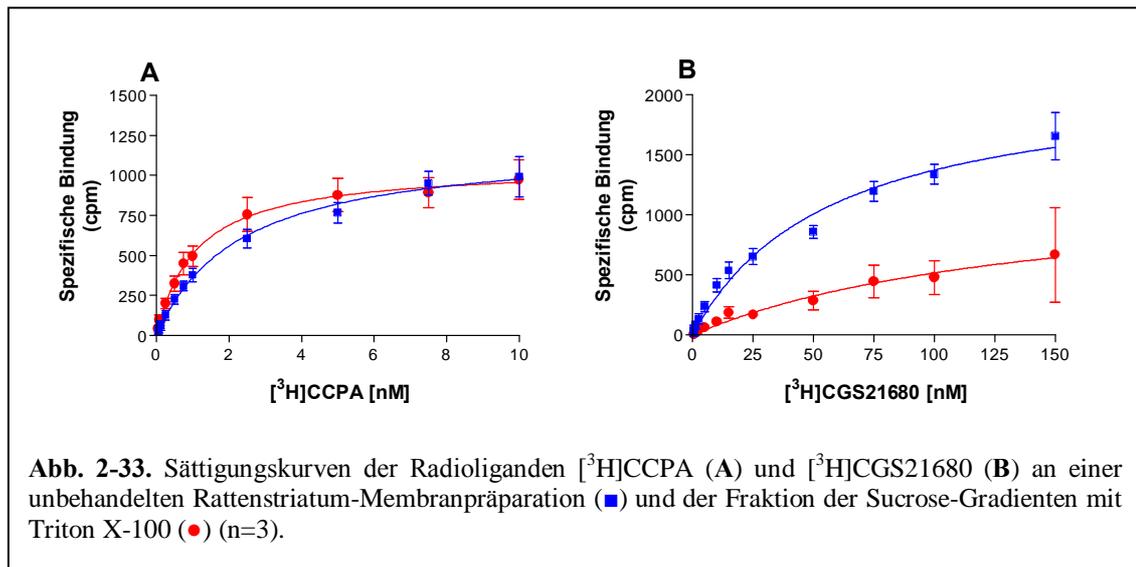
[³H]DTG ein. Der ebenfalls diskontinuierliche Sucrose-Gradient (+ Triton X-100) setzte sich aus 0,5 ml 40 % Sucrose (+ Ratten-Leber), 6 ml 38 % Sucrose und 4,5 ml 5 % Sucrose zusammen und wurde nach Zentrifugation in 11 Fraktionen (1 ml) aufgeteilt. Im Gegensatz zu Monastyrskaya et al. wurde kein CaCl₂ hinzugefügt. Der Protein-Gehalt war in den Fraktionen 6-8 am höchsten, was dem Bereich geringster Dichte entsprach (Fraktion 2 in der vorliegenden Arbeit). Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H](+)-Pentazocin und [³H]DTG haben gezeigt, dass zwar die spezifische Bindung des Radioliganden [³H]DTG (Sigma-2-Rezeptor) in den Fraktionen 6-8 am höchsten ist, aber nicht die des Radioliganden [³H](+)-Pentazocin (Sigma-1-Rezeptor).⁹⁰ Aus diesen Daten haben sie geschlossen, dass der Sigma-2-, allerdings nicht der Sigma-1-Rezeptor, in den cholesterolreichen Mikrodomänen (DRMs) lokalisiert ist.

Vergleicht man nun die vorliegenden Daten mit denen von Gebreselassie et al. lässt sich schlussfolgern, dass sowohl der A₁- als auch der A_{2A}-Rezeptor in den DRMs lokalisiert ist. Durch weiterführende Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass der Einsatz von Detergenzien Artefakte verursacht und es sich nicht um native Strukturen handelt (siehe Kap. 2.9.3.).

Gebreselassie et al. führten weiterhin Sättigungsexperimente mit der DRM-Fraktion durch. In diesen Experimenten verwendeten Gebreselassie et al. den Radioliganden [³H]DTG (Sigma-2-Rezeptor), da sich nur der Sigma-2-Rezeptor in den cholesterolreichen Mikrodomänen befand. Sie fanden in der Fraktion, die durch einen Sucrose-Gradienten unter Einsatz des Detergenzes CHAPS isoliert worden war, einen vergleichbaren K_D-Wert (23 nM gegenüber 19 nM). Wurde allerdings die Fraktion verwendet, die aus einer Sucrose-Gradienten-Zentrifugation mit Triton X-100 stammte, so wurde ein wesentlich höherer K_D-Wert gefunden (170 nM gegenüber 19 nM). Des Weiteren wurde hier eine geringe max. Anzahl von Bindungsstellen detektiert (1249 fmol/mg Protein gegenüber 2253 fmol/mg Protein). Im Gegensatz dazu nahm der B_{Max}-Wert für [³H]DTG in der mit CHAPS isolierten DRM-Fraktion zu. Eine Begründung für diesen Unterschied konnte die Arbeitsgruppe nicht liefern. Sie vermuteten, dass Triton X-100 einen direkten Effekt auf die Ligand-Bindung an Rezeptoren besitzt.⁹⁰ Dieser Einfluss konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, allerdings nicht nur für Triton X-100, sondern auch für CHAPS (siehe Kap. 2.5.).

Durch analoge Sättigungsexperimente der Radioliganden [³H]CCPA und [³H]CGS21680 sollte in eigenen Experimenten herausgefunden werden, ob sich zwischen der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D und dem B_{Max}-Wert der unbehandelten Membranpräparation und der Fraktion 2 Änderungen ergeben. Verglichen mit Kap. 2.2.3. konnten die B_{Max}-Werte der eingesetzten Radioliganden an der unbehandelten

Membranpräparation gut reproduziert werden. Für [³H]CCPA wurde ein B_{Max}-Wert von 638 ± 32 fmol/mg Protein und für [³H]CGS21680 ein Wert von 1110 ± 25 fmol/mg Protein ermittelt.



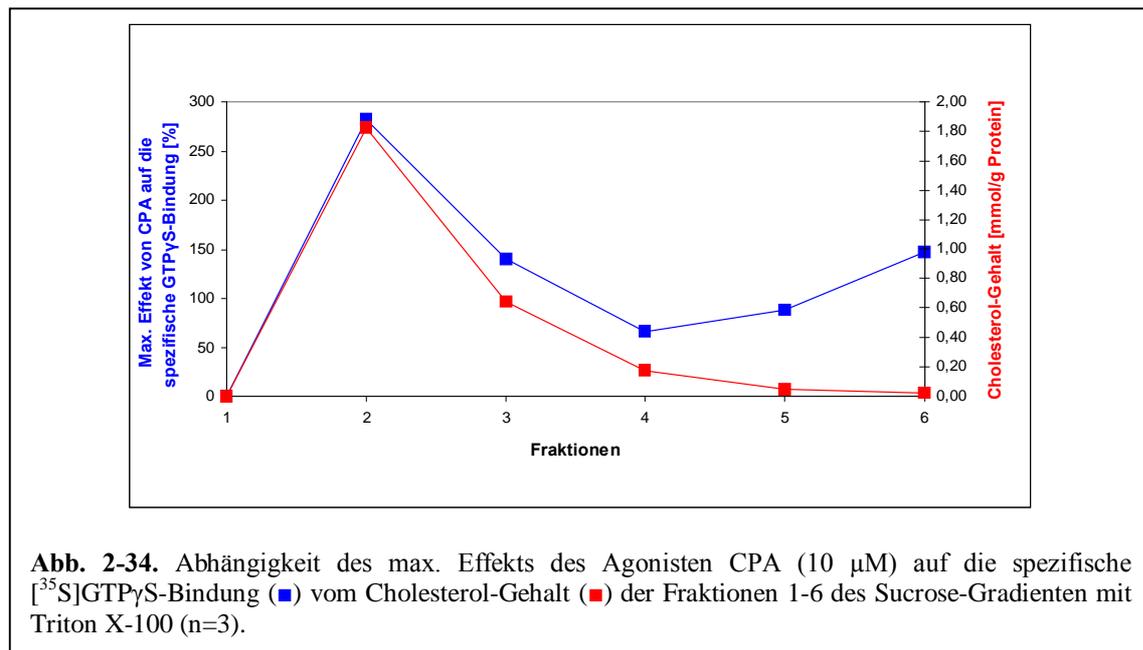
Somit liegen die Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren im Striatum im Verhältnis von 1:1,7 vor. Die B_{Max}-Werte, die in Fraktion 2 bestimmt wurden, fielen geringfügig bzw. deutlich geringer aus. Der B_{Max}-Wert des Radioliganden [³H]CCPA verminderte sich auf 552 ± 40 fmol/mg Protein und der des Radioliganden [³H]CGS21680 auf 324 ± 19 fmol/mg Protein. Allerdings unterschieden sich nur die B_{Max}-Werte des Radioliganden [³H]CGS21680 statistisch signifikant voneinander (***, P = < 0,0001). Nicht nur die B_{Max}-Werte nahmen ab, sondern auch die K_D-Werte der Radioliganden verringerten sich. Somit nahm die Affinität der Radioliganden zum Rezeptor zu. Der K_D-Wert des Radioliganden [³H]CCPA wurde statistisch signifikant von 2,4 ± 0,3 nM auf 1,1 ± 0,2 nM (*, P = 0,0253) und der K_D-Wert des Radioliganden [³H]CGS21680 ebenfalls signifikant von 56,2 ± 0,5 nM auf 45,3 ± 2,4 nM (*, P = 0,0116) verringert. Anhand der B_{Max}-Werte lässt sich erkennen, dass die Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren in den DRMs in einem Verhältnis von 1:0,6 vorliegen. Somit ist die Rezeptordichte der A₁-Rezeptoren in den DRMs unverändert, während sich die Dichte der A_{2A}-Rezeptoren vermindert. Bezieht man die Rezeptordichte auf den Cholesterin-Gehalt, so zeigt sich, dass in den DRMs die Menge an Rezeptoren in Bezug auf die Menge an Cholesterin abnimmt, sowohl für den A₁- als auch den A_{2A}-Rezeptor (siehe Tab. 2-16).

Die Arbeitsgruppe um Franco und Ferré et al. wiesen die Existenz von A₁-A_{2A}-Rezeptor-Heteromeren im Rattenstriatum nach. Sie zeigten eine intramembranäre Rezeptor-Rezeptor-Interaktion durch den Einsatz von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien. In HEK-Zellen, die nur mit dem A₁-Rezeptor stabil transfiziert worden waren, konnte der A_{2A}-Rezeptor-Agonist

CGS21680 in Konkurrenzexperimenten den tritiierten A₁-Agonisten [³H]R-PIA in sehr hohen Konzentrationen verdrängen. In diesem hohen Konzentrationsbereich verliert **CGS21680** seine Selektivität zum A_{2A}-Rezeptor. Waren allerdings die HEK-Zellen sowohl mit dem A₁- als auch mit A_{2A}-Rezeptor stabil kotransfiziert, reichten geringe Konzentrationen an **CGS21680** aus, um die [³H]R-PIA-Bindung zu beeinflussen. Dies deutete auf eine intramembranäre Interaktion in A₁-A_{2A}-Heteromeren hin. Eine Stimulation des A_{2A}-Rezeptors durch **CGS21680** verminderte demnach die Bindung des Agonisten [³H]R-PIA zum A₁-Rezeptor. Die gleichen Ergebnisse wurden bei Verwendung von Rattenstriatum-Membranpräparationen erzielt, die A₁- und A_{2A}-Rezeptoren nativ exprimieren.^{300, 301}

Die vorliegenden Daten könnten darauf hinweisen, dass die im nativen Striatum als Heteromere vorliegenden A₁- und A_{2A}-Rezeptoren in den DRMs nicht mehr existieren. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre, dass sich die Heterodimere in den DRMs anreichern. Allerdings sind an dieser Stelle noch mehrere Versuchsreihen notwendig, um diese Vermutungen bestätigen oder widerlegen zu können. Man könnte die von Ciruela et al. verwendeten kotransfizierten HEK-A₁-A_{2A}-Zellen in dem oben beschriebenen Sucrose-Gradienten einsetzen und die DRMs isolieren. Anschließend analog zu Ciruela et al. durchgeführte Experimente könnten klären, ob die intramembranäre Rezeptor-Rezeptor-Interaktion der A₁- und A_{2A}-Rezeptoren weiterhin besteht.

Durch weiterführende GTPγS-Bindungsstudien sollte gezeigt werden, ob sich die Fraktionen des Sucrose-Gradienten mit Triton X-100 im Hinblick auf die Rezeptorfunktion voneinander unterscheiden.



Die Fraktion 2 besitzt demnach nicht nur die höchste spezifische Radioligand-Bindung und den höchsten Cholesterol-Gehalt, sondern auch den höchsten max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung des A₁-selektiven Agonisten CPA (10 μM). Gegenüber der unbehandelten Rattenstriatum-Membranpräparation war eine Erhöhung des max. Effektes zu verzeichnen (280 ± 16 % gegenüber 200 ± 15 %), obwohl die Rezeptordichte in der DRM-Fraktion vermindert ist (siehe Tab. 2-16).

Die genaue Diskussion der vorliegenden Daten erweist sich aufgrund der derzeitigen kontroversen Diskussion über die Existenz der „Detergent Resistant Membranes“ als recht schwierig. Es wird davon ausgegangen, dass die Verwendung von Detergenzien die Bildung von cholesterolreichen Mikrodomänen erst induziert.⁵⁹ Diese Vermutung konnte in weiterführenden Untersuchungen teilweise bestätigt werden (siehe Kap. 2.9.3.). In Tab. 2-16 sind die Eigenschaften der DRMs denen der nativen Rattenstriatum-Membranpräparationen vergleichend gegenübergestellt.

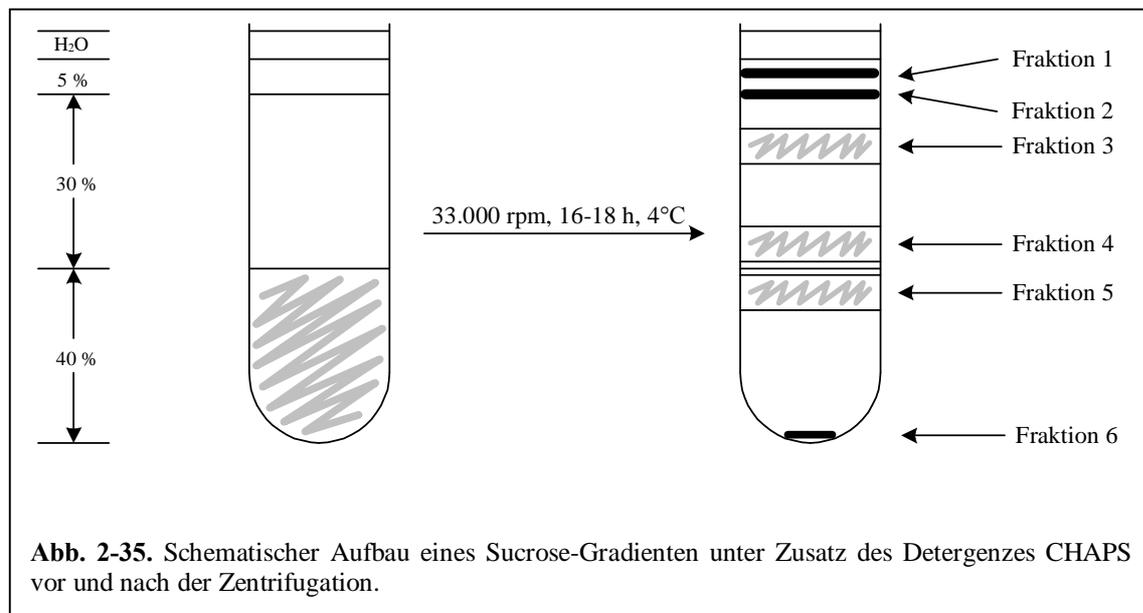
Tab. 2-16. Vergleich der Eigenschaften von DRMs und nativen Membranpräparationen.

Eigenschaft	nativ (Rattenstriatum)	DRMs
Cholesterol-Gehalt	1,25 mmol/g Protein	1,82 mmol/g Protein
Rezeptordichte	A ₁ : 638 ± 32 fmol/mg Protein A _{2A} : 1110 ± 25 fmol/mg Protein	A ₁ : 552 ± 40 fmol/mg Protein (ns, P = 0,2170) A _{2A} : 324 ± 19 fmol/mg Protein (*, P < 0,0001)
Rezeptoren/ Cholesterol	A ₁ : 510 pmol/mmol Cholesterol A _{2A} : 888 pmol/mmol Cholesterol	A ₁ : 303 pmol/mmol Cholesterol A _{2A} : 178 pmol/mmol Cholesterol
Max. Effekt von CPA auf die spezifische [³⁵S]GTPγS-Bindung	200 ± 15 %	280 ± 16 % (*, P = 0,0217)
Verhältnis A₁/A_{2A}	(A ₁ /A _{2A}) 1:1,7	(A ₁ /A _{2A}) 1:0,6

2.9.2. SUCROSE-GRADIENTEN-ZENTRIFUGATION UNTER VERWENDUNG VON CHAPS ALS DETERGENS

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt (siehe Kap. 1.3.4.), können verschiedene Detergenzien zur Isolierung von DRMs eingesetzt werden, allerdings erwiesen sich nicht alle als gleichermaßen geeignet.^{79, 93} Detergenzien, wie Tween 20, Brij 58, Lubrol WX, Brij 98, Brij 96, Triton X-100 und CHAPS solubilisierten alle einen Teil der verwendeten Membran, aber Detergenzien wie Tween 20, Brij 58 und Lubrol WX waren nicht selektiv. Eine Analyse des Cholesterol- und Sphingolipid-Gehaltes hatte ergeben, dass sich durch die Verwendung von Triton X-100 und CHAPS diese Lipide in der DRM-Fraktion anreicherten.^{48, 79, 94, 95} Zum Vergleich wurde daher neben dem Detergens Triton X-100 auch CHAPS verwendet.

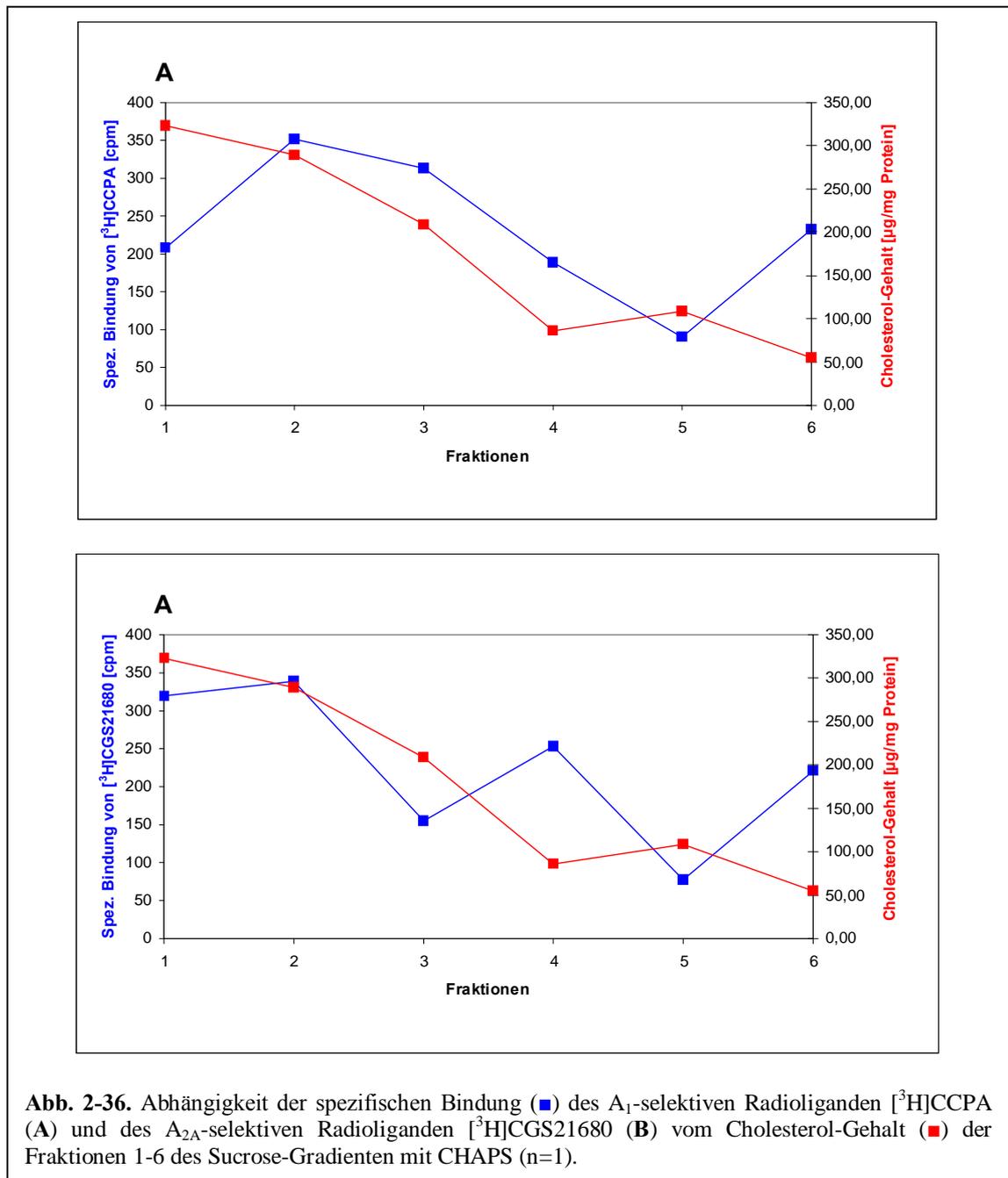
Um den Sucrose-Dichte-Gradienten herzustellen, wurde die Rattenstriatum-Membranpräparation zunächst nach Schuck et al. mit 4 % CHAPS (anstelle von Triton X-100 und Calciumchlorid) für 0,5 h inkubiert.⁷⁹ Der Sucrose-Gradient selbst setzte sich analog Kap. 2.9.1. zusammen.



Nach der Zentrifugation ließ sich erkennen, dass die erhaltenen Banden nicht so deutlich ausgeprägt waren, wie bei der Verwendung von Triton X-100. Es wurden sechs Fraktionen gesammelt und der Cholesterol- und Proteingehalt bestimmt.

Erste Bindungsstudien mit den Radioliganden [³H]CCPA und [³H]CGS21680 haben bereits gezeigt, dass die spezifische Bindung nicht so gut mit dem Cholesterol-Gehalt korreliert, wie es beim Sucrose-Gradienten mit Triton X-100 der Fall ist. Aus dem Grund wurde auf den Sucrose-

Gradienten mit Triton X-100 zurückgegriffen und es wurden keine weiteren Versuche mit diesem Gradienten durchgeführt.



2.9.3. SUCROSE-GRADIENTEN-ZENTRIFUGATION OHNE VERWENDUNG EINES DETERGENS

Aufgrund der kontroversen Diskussion über die Verwendung von Detergenzien bei der Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation, haben bereits diverse Arbeitsgruppen versucht, auf den Einsatz von Detergenzien zu verzichten bzw. andere Methoden zu verwenden.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Teilweise wurden Domänen isoliert, die ähnliche Eigenschaften wie die “Detergent Resistant Membranes” aufwiesen.

Macdonald et al. und Smart et al. publizierten eine Detergens-freie Methode zur Isolierung der DRMs, indem sie OptiPrepTM (Iodixanol) verwendeten.^{97, 98} Die OptiPrepTM-Methode wurde erst kürzlich von Morris et al. aufgegriffen, um „Membrane Rafts“ zu isolieren.⁶⁴ Bereits Luria et al. und Eckert et al. verglichen Sucrose-Dichte-Zentrifugationen, die mit und ohne den Zusatz von Triton X-100 durchgeführt wurden.^{99, 100}

Der von uns verwendete Detergens-freie Sucrose-Gradient setzte sich analog Kap. 2.9.1. zusammen, mit der Ausnahme, dass das Rattenstriatum nicht vorher mit Triton X-100 und Calciumchlorid inkubiert worden war, sondern die Membranpräparation ohne Vorbehandlung eingesetzt wurde. Nach der Zentrifugation konnten ebenfalls sechs Fraktionen isoliert und der Cholesterol- und Protein-Gehalt bestimmt werden.

Trägt man nun den ermittelten Cholesterol-Gehalt (in Bezug auf den Proteingehalt) der Fraktionen 1-6 gegenüber der spezifischen Bindung der Radioliganden [³H]CCPA und [³H]CGS21680 auf, so wird deutlich, dass die Fraktion 2 nicht nur den höchsten Cholesterol-Gehalt besitzt, sondern auch die höchste spezifische Bindung des Radioliganden [³H]CCPA. Allerdings war diese Erhöhung nicht sehr ausgeprägt, vergleicht man Abb. 2-37A mit Abb. 2-32A. Die spezifische Bindung des Radioliganden [³H]CGS21680 war in dieser Fraktion hingegen nicht erhöht. Die Protein-Bestimmung hat allerdings ergeben, dass durch diese Methode nur eine sehr geringe Menge an Protein in der Fraktion 2 im Gegensatz zum Sucrose-Gradienten mit Triton X-100 angereichert werden konnte. In weiterführenden Studien sollte aus dem Grund auf die neue OptiPrepTM-Methode zurückgegriffen werden.

Aus den bisherigen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Anreicherung des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors in den cholesterolreichen Fraktionen nur nach Behandlung mit Triton X-100 erfolgt. Dies bedeutet aber auch, dass nach Triton X-100-Behandlung isolierte DRMs Artefakte sind und sehr wahrscheinlich keine real existierenden Membrandomänen darstellen.

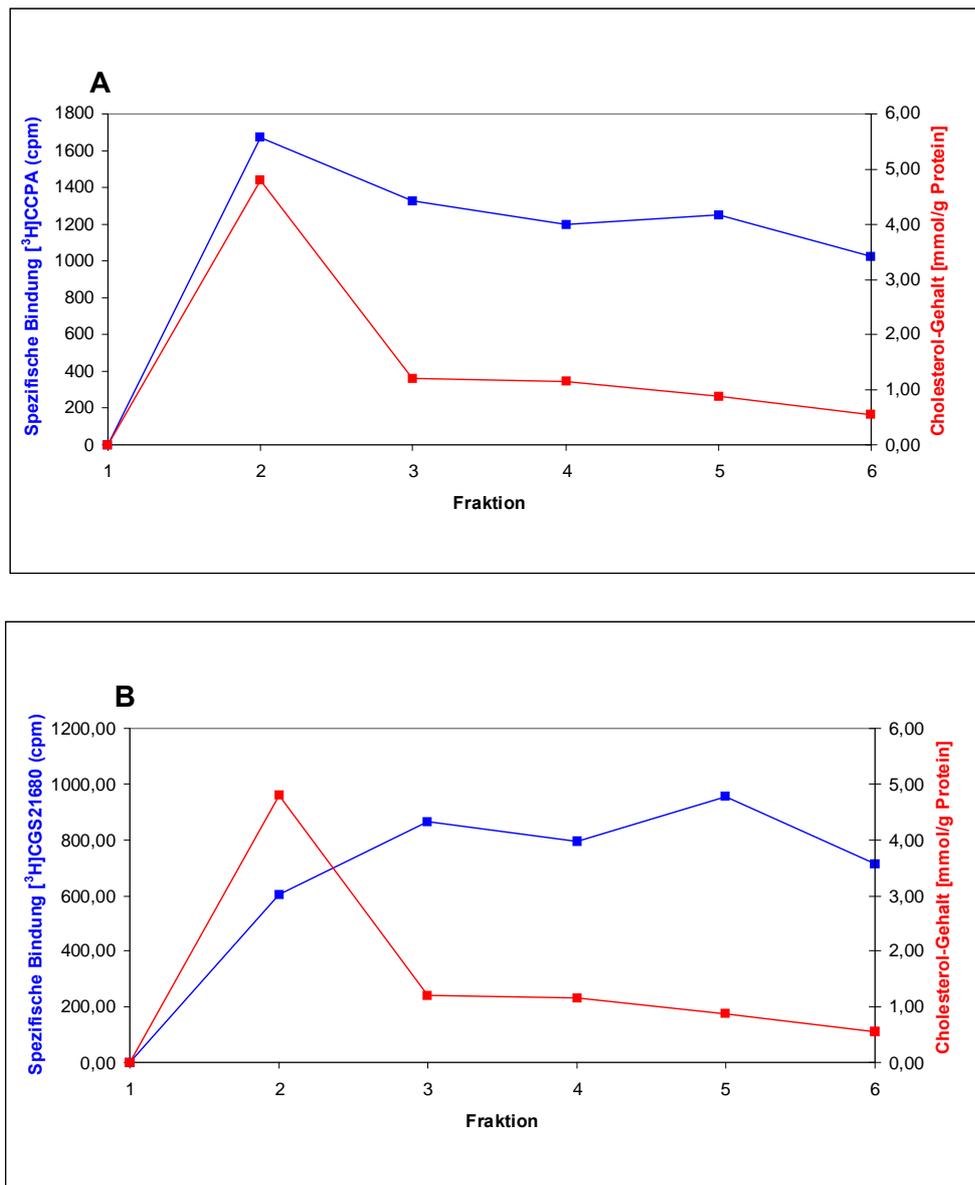


Abb. 2-37. Abhängigkeit der spezifischen Bindung (■) des A₁-selektiven Radioliganden [³H]CCPA (A) und des A_{2A}-selektiven Radioliganden [³H]CGS21680 (B) vom Cholesterol-Gehalt (■) der Fraktionen 1-6 des Sucrose-Gradienten ohne Verwendung eines Detergenzes (n=2).

2.10. ZUSAMMENFASSUNG

„Membrane Rafts“ sind kleine (10-200 nm große), heterogen aufgebaute und bewegliche Domänen innerhalb der Plasma-Membran, die reich an Sterolen (Cholesterol) und Sphingolipiden sind.⁵⁷ Der Einfluss von Cholesterol auf die Rezeptorfunktion wurde bereits für zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gezeigt und auf die Lokalisation dieser Rezeptoren in den „Membrane Rafts“, die früher als „Lipid Rafts“ bezeichnet wurden, zurückgeführt.¹⁰³⁻¹⁰⁹

In der vorliegenden Arbeit sollte durch den Einsatz von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien der Einfluss des Cholesterol-Gehaltes in der Plasma-Membran auf die Bindung und Funktion von Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren untersucht werden. Für neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Erkrankungen und dem Serum-Cholesterol-Gehalt gefunden.

Der Cholesterol-Gehalt kann durch den Einsatz von Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) vermindert werden.⁶³ M β CD kann allerdings nicht nur dazu verwendet werden, Cholesterol aus der Plasma-Membran zu entfernen, sondern es kann auch vorher komplexiertes Cholesterol wieder abgeben und es auf diese Weise der Plasma-Membran wieder zurückführen.^{63, 88, 89}

Das Striatum exprimiert sowohl Adenosin-A₁- als auch A_{2A}-Rezeptoren nativ.²⁷⁴ Die Versuche wurden mit striatalen Membranpräparationen von Rattenhirn durchgeführt. Es zeigte sich, dass bereits durch Inkubation mit einer geringen Konzentration an M β CD (10 mM) Cholesterol aus der Membranpräparation partiell entfernt werden konnte. Eine Erhöhung der M β CD-Konzentration (20 – 40 mM) führte zu einer weiteren Verminderung des Cholesterol-Gehaltes. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit dem A₁-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CCPA und dem antagonistischen Radioliganden [³H]DPCPX sowie dem A_{2A}-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CGS21680 und dem antagonistischen Radioliganden [³H]MSX-2 ergaben, dass ein verminderter Membran-Cholesterol-Gehalt mit einer geringeren spezifischen Bindung dieser Radioliganden einhergeht. Dabei wurde die spezifische Bindung der antagonistischen Adenosin-Liganden stärker reduziert als die der agonistischen Radioliganden. Auch war der Einfluss auf die A_{2A}-Rezeptoren größer als auf die A₁-Rezeptoren. Analog durchgeführte Experimente an humanen Striatum-Membranpräparation (Caudate und Putamen) zeigten, dass die an der Ratte gewonnen Daten auf den Menschen übertragen werden können.

Cholesterol ließ sich nicht nur durch den Einsatz von Cholesterol-M β CD-Komplexen quantitativ zurückführen, sondern auch durch cholesterolreiche Liposomen. Allerdings schien die erforderliche Inkubationszeit von 24 h einen negativen Einfluss auf die Rezeptoren in der Rattenstriatum-Membranpräparation zu haben. Der Einsatz eines Cholesterol-M β CD-

Komplexes erforderte nur eine Inkubationszeit von 0,5 h. Anschließende Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien zeigten, dass nicht nur der ursprüngliche Cholesterolgehalt wiederhergestellt werden konnte, sondern auch die spezifische Bindung der eingesetzten Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX, [³H]CGS21680 und [³H]MSX-2.

Durch Sättigungsexperimente konnten die in Vorversuchen mit einer einzelnen Radioligandkonzentration ermittelten Ergebnisse bestätigt werden. Dabei übte schon der Einsatz der geringsten verwendeten M β CD-Konzentration (10 mM) zur Verringerung des Cholesterolgehaltes einen Einfluss aus. Während die Affinität der A₁-selektiven Radioliganden zunahm, ausgedrückt in einer Erniedrigung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D, sank die max. Anzahl der Bindungsstellen (B_{Max}). Die Affinität der A_{2A}-selektiven Radioliganden nahm hingegen ab, der B_{Max}-Wert ebenfalls, aber weniger stark als bei den A₁-Rezeptoren. Die geringere Anzahl an Rezeptoren, die durch A₁-Liganden erkannt wurde, wurde somit zumindest teilweise durch eine erhöhte Rezeptoraffinität kompensiert. Bei den A_{2A}-Rezeptoren beobachtete man hingegen diese Kompensation nicht.

Kinetikexperimente an einer unbehandelten und einer mit 10 mM M β CD-behandelten Rattenstriatum-Membranpräparation ergaben, dass ein verminderter Cholesterolgehalt kaum einen Einfluss auf die Geschwindigkeit von Radioligand-Rezeptor-Interaktionen besitzt.

Beobachtungen während der Durchführung der Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien ließen einen Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf die spezifische Bindung von Radioliganden vermuten. Konkurrenzexperimente mit dieser Verbindung und auch mit dem Detergens Triton X-100, welches bisher zur Isolierung von DRMs eingesetzt worden war, zeigten, dass die verwendeten Radioliganden durch beide Verbindungen konzentrationsabhängig inhibiert wurden. Das Detergens CHAPS wies einen ähnlichen Effekt auf. Es wird vermutet, dass M β CD den jeweiligen Radioliganden in seinen hydrophoben Hohlraum aufnimmt und die radioaktiv markierten Liganden auf diese Weise nicht mehr an den Rezeptor binden können. Hinsichtlich des Triton X-100 wird angenommen, dass die Radioliganden in Mizellen eingeschlossen werden. Eine UV-photometrische Bestimmung der M β CD-Konzentration hat allerdings ergeben, dass M β CD nach der Inkubation wieder quantitativ aus den behandelten Rattenstriatum-Membranpräparationen entfernt worden ist, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Ergebnisse dadurch nicht beeinflusst wurden.

Durch [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien sollte weiterhin untersucht werden, ob ein verminderter Cholesterolgehalt einen Einfluss auf die Funktion der Rezeptoren ausübt. In neu etablierten [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren unter Verwendung einer Rattenstriatum-Membranpräparation mit vermindertem Cholesterolgehalt wurde gefunden,

dass der max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung des A₁-selektiven Voll-Agonisten CPA in Abhängigkeit vom sinkenden Cholesterol-Gehalt auf signifikante Weise abnahm, der max. Effekt des A_{2A}-selektiven Voll-Agonisten CGS21680 wurde hingegen gesteigert. Die EC₅₀-Werte verringerten sich unabhängig vom Adenosin-Rezeptor-Subtyp nach Cholesterol-Entzug. In [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an CHO-hA₁-Membranpräparationen mit vermindertem Cholesterol-Gehalt wurde der EC₅₀-Wert des A₁-selektiven inversen Agonisten DPCPX nicht signifikant vermindert im Gegensatz zum maximalen Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung. Dies wurde auf den wesentlich geringeren Anfangscholesterol-Gehalt der CHO-hA₁-Membranpräparation im Vergleich zur Rattenstriatum-Membranpräparation zurückgeführt. Weitere [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an A₁-Rezeptoren mit einer an Cholesterol verminderten Rattenstriatum-Membranpräparation, deren Cholesterol-Gehalt durch den Einsatz eines Methyl-β-Cyclodextrin-Komplexes wieder auf sein ursprüngliches Niveau gebracht worden ist, haben gezeigt, dass sich die Rezeptor-Funktion des Adenosin-A₁-Rezeptors wieder herstellen lässt.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Cholesterol unterschiedliche Auswirkungen auf Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren besitzt. Die Funktion des A_{2A}-Rezeptors wird dabei in größerem Maße beeinflusst. Das Cholesterol besitzt allosterisch-modulatorische Effekt auf die Rezeptoren. In Tab 2-17 sind die Ergebnisse aus den Versuchsreihen schematisch zusammengefasst.

Bevor nachgewiesen wurde, dass durch die Verwendung des Detergens Triton X-100 – und auch weiterer Detergenzien – in einer Sucrose-Gradienten-Zentrifugation die „Detergent Resistant Membranes“ (DRMs) erst gebildet, nicht aber isoliert werden, wurde dieses Detergens zur Isolierung der auch als DRMs bezeichneten „Lipid Rafts“ eingesetzt.^{25, 47} Analoge Experimente haben gezeigt, dass sowohl der Adenosin-A₁-Rezeptor als auch der A_{2A}-Rezeptor in diesen cholesterolreichen Mikrodomänen lokalisiert ist. Die DRMs reicherten sich im Bereich geringerer Dichte an. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien ergaben, dass diese Fraktion nicht nur den höchsten Protein- und Cholesterol-Gehalt, sondern auch die höchste spezifische Radioligand-Rezeptor-Bindung des A₁-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CCPA und des A_{2A}-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CGS21680 besaß. Auch der max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung war in dieser Fraktion erhöht. Sättigungsexperimente mit [³H]CCPA und [³H]CGS21680 zeigten, dass sich das Verhältnis der A₁- und A_{2A}-Rezeptoren in der DRM-Fraktion, im Vergleich zur ursprünglichen nativen Striatum-Präparation verändert hat. Weiterführende Experimente haben allerdings bestätigt, dass es sich bei den DRMs um Artefakte handelt.

Tab. 2-17. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Untersuchte Parameter		Cholesterol-Gehalt	Adenosin-A ₁ -Rezeptoren		Adenosin-A _{2A} -Rezeptoren	
			Agonist	Agonist	Agonist	Antagonist
Vorversuche	Spezifische Bindung (Ratte)	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	Spezifische Bindung (Mensch)		(↑)	↓	↓↓	(↓)
Sättigungen	K _D -Wert (Ratte)	↓	↓↓	(↓)	↑	(↑)
	B _{Max} -Wert (Ratte)		↓	↓↓↓	(↓)	↓
[³⁵ S]GTPγS-Bindungsstudien	EC ₅₀ -Wert (Ratte)	↓	(↑)	n.d.	(↑)	n.d.
	Max. Effekt der spez. [³⁵ S]GTPγS-Bindung (Ratte)		↓	n.d.	(↑)	n.d.
	EC ₅₀ -Wert (Mensch)		(↓)	(↑)	n.d.	n.d.
	Max. Effekt der spez. [³⁵ S]GTPγS-Bindung (Mensch)		(↓)	↓	n.d.	n.d.
DRMs (Ratte)	K _D -Wert	↑	↓	n.d.	↓	n.d.
	B _{Max} -Wert		(↓)	n.d.	↓	n.d.
	Max. Effekt der spez. [³⁵ S]GTPγS-Bindung		↑	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = nicht durchgeführt

3. FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG NEUER ADENOSIN-REZEPTOR-LIGANDEN

3.1. EINLEITUNG

Das endogene Nukleosid Adenosin, welches in allen Organen und Geweben produziert wird, ist über die Beeinflussung von Adenosin-Rezeptoren u.a. in der Lage, verschiedene physiologische Effekte auf das zentrale Nervensystem, das Herz und die Lunge, antidiuretische und antiinflammatorische Effekte sowie immunomodulatorische Wirkungen zu entfalten.^{149, 161, 254}

Selektive Agonisten und Antagonisten für verschiedene Adenosin-Rezeptor-Subtypen werden derzeit als potentielle neue Arzneistoffe entwickelt.^{148, 156, 162} Klassische, natürlich vorkommende Adenosin-A₁-Rezeptor-Antagonisten sind z.B. das Coffein oder das Theophyllin, deren Derivate therapeutisches Potential z.B. als Antiasthmatica, Therapeutika zur Behandlung der Herzinsuffizienz oder als nierenprotektive Diuretika besitzen.^{148, 158} Des Weiteren werden Antagonisten zur Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie z.B. Depression oder Demenz (z.B. Alzheimer'sche Krankheit) diskutiert.^{158, 159} Selektive A₁-Agonisten könnten zukünftig bei der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen (als Antiarrhythmika) und in der Schmerztherapie eine Rolle spielen.^{162, 254}

Während der Einsatz von Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Liganden im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen, Allergien und auch Morbus Alzheimer diskutiert wird,¹⁵⁹ scheint der Adenosin-A_{2A}-Rezeptor neben dem Entzündungsgeschehen bei der renalen Dysfunktion eine Rolle zu spielen.^{254, 302} Zudem haben selektive A_{2A}-Rezeptor-Antagonisten ein großes Potential zur Behandlung von Morbus Parkinson, aber auch von Morbus Huntington (siehe Kap. 1.7.4.),^{161, 236, 237, 246, 303} während A_{2A}-Agonisten bei der Behandlung von Herzerkrankungen (als Antihypertensiva), Entzündungen sowie bei der Wundheilung Anwendung finden könnten.^{162, 254}

Die selektive Blockade von Adenosin-A₃-Rezeptoren ist als Therapieoption bei der akuten Behandlung des Schlaganfalls und des Herzinfarktes, zur Behandlung des Glaukoms, von Krebserkrankungen sowie bei Entzündungen, Asthma und Allergien denkbar.^{304, 305}

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Adenosin-Rezeptor-Liganden entwickelt, die sich zunächst an den Xanthin-Derivaten Coffein und Theophyllin (Antagonisten) bzw. dem endogenen Liganden Adenosin (Agonisten) als Leitstrukturen orientierten.^{149, 158} Die Markteinführung eines selektiven Adenosin-Rezeptor-Antagonisten lässt trotz dieser Bemühungen jedoch nach wie vor auf sich warten. Ein Grund für den langsamen Fortschritt in der Entwicklung von Arzneistoffen, die selektiv Adenosin-Rezeptoren blockieren, stellen

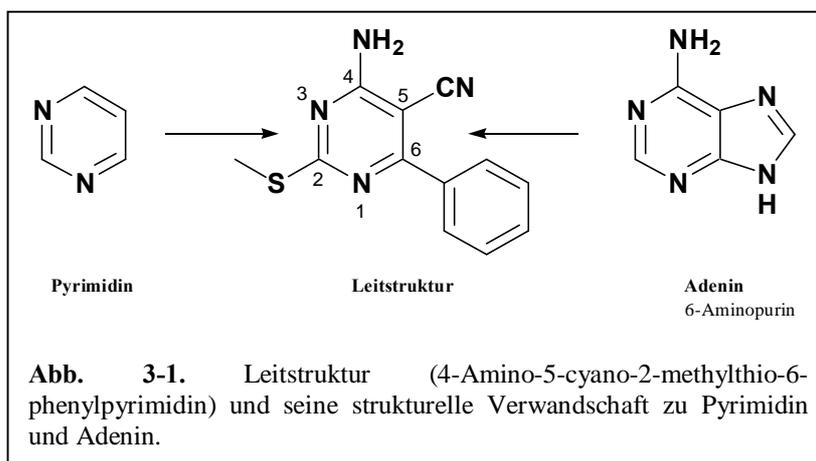
womöglich die ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften und die geringe Wasserlöslichkeit sowie die damit einhergehende schlechte Bioverfügbarkeit der meist lipophilen Verbindungen dar.^{148, 158} Hinzu kommt, dass die Entwicklung Subtyp-selektiver Antagonisten für die spezifische Wirkung von großer Bedeutung ist, um das Auftreten von Nebenwirkungen zu verringern.¹⁵⁸

3.2. CHARAKTERISIERUNG VON 4-AMINOPYRIMIDIN-DERIVATEN ALS NEUE NICHT-NUKLEOSIDISCHE ADENOSIN-REZEPTOR-LIGANDEN

Die im Rahmen dieses Projektes untersuchte Serie von Substanzen, die von Dr. H. Phuoc Le in unserem Arbeitskreis synthetisiert worden ist, bezieht sich auf die in Abb. 3-1 gezeigte Leitstruktur, das 4-Amino-5-cyano-2-methylthio-6-phenylpyrimidin.

Da Pyrimidin-Derivate eine neue Klasse von selektiven Adenosin-A₁-Rezeptor-Antagonisten darstellen,^{306, 307} wurden von dieser Leitstruktur ausgehend 125 Derivate synthetisiert,³⁰⁸ die sich vor allem durch unterschiedliche Substituenten am Pyrimidin-Ring in Position 2 und des sich in

Position 6 befindlichen Phenyl-Ringes unterscheiden. Ein besonderes Augenmerk wurde neben der Einführung von Halogen-Substituenten (Fluor, Chlor, Brom) sowie Methyl-, Methoxy- oder Phenyl-



Gruppen z.B. auf Carbonyl- oder Aminofunktionen sowie Carboxyl-Gruppen gelegt, mit dem Ziel, die Wasserlöslichkeit zu verbessern, jedoch gleichzeitig die ZNS-Gängigkeit nicht zu beeinträchtigen.

Die Bindungsneigung dieser Substanzen zu Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren sollte im nativen Rattenhirn (Cortex- bzw. Striatum-Membranpräparationen) bestimmt werden. Dies wurde unter Mitwirkung von Stefan Künne, Karen Schmeling, Nicole Florin, Dr. Anke Schiedel und Sonja Hinz durchgeführt. Die affinsten Verbindungen wurden anschließend an den humanen Subtypen untersucht, um somit sowohl eine Aussage über die Affinität zu menschlichen Adenosin-Rezeptoren als auch über spezies-abhängige Affinitätsunterschiede treffen zu können. Die A₁-Bindungsstudien wurden mit dem A₁-selektiven Radioliganden [³H]2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosin ([³H]CCPA)¹⁶⁴ und die A_{2A}-Bindungsstudien mit dem A_{2A}-selektiven Radioliganden [³H]3-(3-Hydroxypropyl)-7-methyl-8-(*m*-methoxystyryl)-1-propargylxanthin ([³H]MSX-2)¹⁶⁹ an Rattencortex- bzw. Rattenstriatum-Membranpräparationen durchgeführt, sowie an humanen rekombinanten Adenosin-A₁ bzw. A_{2A}-Rezeptoren, die in CHO-Zellen exprimiert waren.

Des Weiteren sollte die Selektivität aller Verbindungen gegenüber humanen Adenosin-

Rezeptoren des A_3 -Subtyps bestimmt werden. Diese Experimente wurden mit dem A_3 -selektiven Radioliganden [^3H]8-Ethyl-4-methyl-2-phenyl(*8R*)-4,5,7,8-tetrahydro-1*H*-imidazo[2,1-*i*]-purin-5-on ([^3H]PSB-11) an rekombinanten humanen A_3 -Rezeptoren, exprimiert in CHO-Zellen, durchgeführt.³⁰⁹

Die potentesten Derivate wurden darüber hinaus in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien an rekombinanten humanen Adenosin- A_1 - und nativen Ratten-Adenosin- A_{2A} -Rezeptoren funktionell charakterisiert.

3.2.1. KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN- A_1 -, A_{2A} - UND A_3 -REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN

Die Strukturen der untersuchten Verbindungen sowie die Ergebnisse der kompetitiven Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren sind in Tab. 3-1 dargestellt. Kompetitionskurven einiger potenter Verbindungen werden exemplarisch in Abb. 3-2 gezeigt.

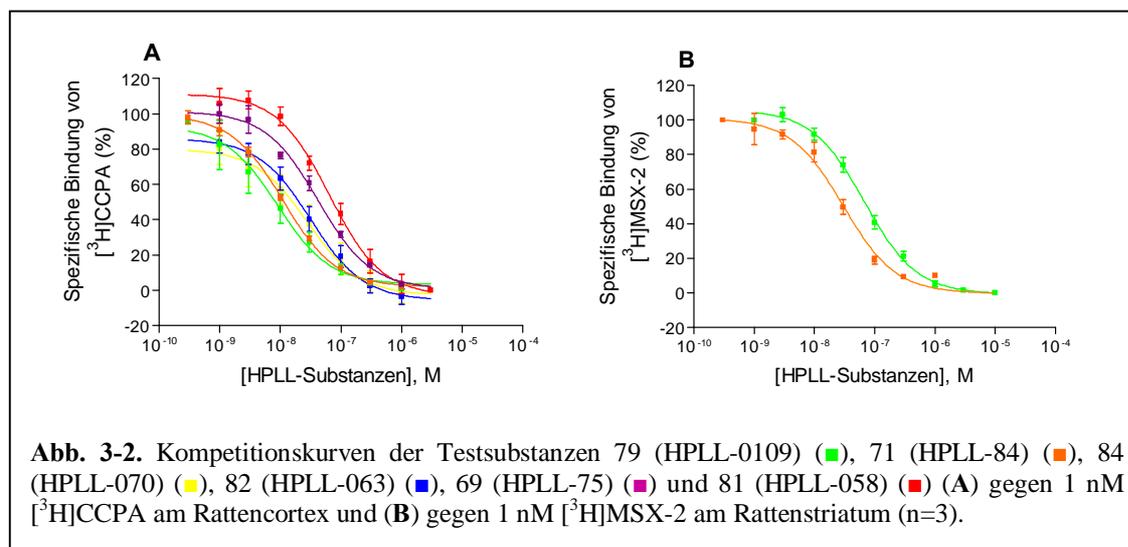


Abb. 3-2. Kompetitionskurven der Testspezialitäten 79 (HPLL-0109) (■), 71 (HPLL-84) (■), 84 (HPLL-070) (■), 82 (HPLL-063) (■), 69 (HPLL-75) (■) und 81 (HPLL-058) (■) (A) gegen 1 nM [^3H]CCPA am Rattencortex und (B) gegen 1 nM [^3H]MSX-2 am Rattenstriatum (n=3).

Die Untersuchung der Substanzklasse der 4-Aminopyrimidin-Derivate zeigt, dass Substanzen, die einen unsubstituierten Phenyl-Ring in Position 6 und einem Methylthioether-Rest in Position 2 besitzen (**4**, HPLL-18), eine relativ hohe Affinität zu Ratten-Adenosin- A_1 - und - A_{2A} -Rezeptoren aufweisen, allerdings nur eine geringe Affinität zum humanen A_3 -Subtyp. In Konkurrenzexperimenten mit CHO-Zellen, die den A_1 - bzw. A_{2A} -Rezeptor rekombinant exprimieren, konnte der K_i -Wert der Verbindung **4** (HPLL-18) am A_1 -Subtypen nur mäßig, der am A_{2A} -Rezeptor allerdings gut reproduziert werden. Diese Substanz besitzt sogar eine höhere Affinität zum humanen Adenosin- A_{2A} -Rezeptor als zum Ratten-Rezeptor.

Eine Verlängerung des Methylthioether-Restes um eine Methylen-Gruppe (**15**, HPLL-23) führt zu einer Wirkungssteigerung dieser Verbindung zu allen drei Rezeptorsubtypen, allerdings in unterschiedlichem Ausmaße. Durch die Einführung eines Propylthioether-Restes (**25**, HPLL-28) fällt die Affinität hingegen wieder ab, ein Hexylthioether-Rest (**34**, HPLL-33) führt weitestgehend und ein Octylthioether-Rest (**39**, HPLL-38) zum gänzlichen Affinitätsverlust. Im Allgemeinen bringt der voluminöse und lipophile Octylsulfanyl-Rest in dieser Position unabhängig vom Substitutionsmuster des Phenyl-Ringes in Position 6 einen kompletten Wirkungsverlust dieser Substanzklasse an allen drei Rezeptor-Subtypen mit sich (**40-43**, **45** (HPLL-39-42, 63)). Ein Hexylthioether-Rest besitzt ähnliche Eigenschaften (**22**, **32**, **35-36**, **38**, (HPLL-34-35, 37, 62, 72)). Allerdings zeigen Verbindungen mit diesem Rest und einer Acetamid-Gruppe in Position 4' des Phenyl-Ringes (**33**, HPLL-79) bzw. einem Fluor-Substituenten in Position 5' (**37**, HPLL-36) aber noch eine moderate Affinität zum Adenosin-A₁- und A_{2A}- bzw. nur zum A_{2A}-Rezeptor. Es können hingegen keine genauen Aussagen zur Einführung eines Butylthioether-Restes getroffen werden, da nur ein Derivat synthetisiert worden ist, welches allerdings keine Affinität zu Adenosin-Rezeptoren (**30**, HPLL-65) besitzt.

Das Substitutionsmuster des Phenyl-Ringes in Position 6 der 4-Aminopyrimidin-Derivate wiederholt sich bei den einzelnen Verbindungen dieser Substanzklasse. Im Allgemeinen wurden Substituenten wie eine Acetamid-, Carboxyl- oder Carbonsäure-Ester-Funktion, ein Chlor- bzw. Brom-Substituent, eine Methyl- bzw. Methoxy-Gruppe oder ein Benzyl-Rest in Position 4' des Phenyl-Ringes eingeführt. Die Position 5' wurde nur durch die Substitution mit Fluor variiert. In seltenen Fällen wurde ein Pyrimidin-Derivat an zwei Positionen des Phenyl-Ringes substituiert.

Diese Substituenten haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Affinität der 4-Aminopyrimidin-Derivate zu den drei Adenosin-Rezeptor-Subtypen. So führt eine Methyl- bzw. eine Methoxy-Gruppe oder ein Chlor-Substituent sowohl bei den Methylthioether- als auch bei den Ethyl-, Propyl- und 2-Fluorethylthioether-Derivaten zu einem teilweisen oder auch gänzlichen Affinitätsverlust dieser Substanzen zum Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptor, während die Affinität zum A₃-Rezeptor-Subtyp gesteigert wird (**5-6**, **8**, **16-17**, **19**, **26-27**, **29**, **47-48**, **51** (HPLL-14, 16, 19-20, 22, 24-25, 27, 29, 30, 32, 44)). Ein ähnliches Muster kann für Brom als Substituenten in dieser Position beobachtet werden (**2**, **12**, **23**, **46** (HPLL-69-71, 74)). Beim Methylthioether-Derivat führt dieser Substituent noch zu einer Wirkungssteigerung zum Adenosin-A₃-Rezeptor. Bei den längerkettigen Derivaten ist allerdings ein Wirkungsverlust gegenüber dem unsubstituiertem Derivat zu verzeichnen. Eine Carboxyl- ebenso wie eine Carbonsäureester-Funktion in Position 4' der Alkylthioether-Derivate geht immer mit einem gänzlichen Wirkungsverlust einher (**11**, **22**, **31**, **53** bzw. **10**, **30**, **44** (HPLL-60, 62, 62a, 64 bzw.

HPLL-032, 65, 036)), was auch auf einen Benzyl-Rest zutrifft (**20**, HPLL-019).

Die Acetamid-Funktion in Position 4' des Phenyl-Ringes hat je nach Substituent in Position 2 einen unterschiedlichen Einfluss auf die Affinität. Bei den Alkylthioether-Derivaten mit einem Methyl-, aber auch mit einem Propyl- und 2-Fluorethyl-Rest wird die Affinität zum Adenosin-A₁-Rezeptor gesteigert (**1**, **24**, **52** (HPLL-76, 78, 80)). Bei dem Ethylthioether-Derivat führt diese Struktur hingegen zu einem Wirkverlust (**21**, HPLL-77).

Fluor-Substituenten in 5'-Position bei der Substanz mit einem Methylthioether-Rest führen zu einem Wirkverlust zum Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptor und erhöhen die Wirkung zum A₃-Subtypen, die beim Ethylthioether-Derivat wieder verloren geht (**7**, **18** (HPLL-21, 26)). Ähnliches kann bei Verbindungen mit einem disubstituierten Phenyl-Ring beobachtet werden (**3**, **9**, **13-14** (HPLL-285-286, 020, 245)). Eine weitere Verlängerung der Kohlenstoffkette zum Propylthioether-Derivat mit einem Fluor-Substituenten in 5' Position führt zu einer Affinitätssteigerung zum A_{2A}-Subtypen, die wiederum beim Vorhandensein eines Hexyl- bzw. Octylthioether-Restes eingebüßt wird (**28**, **37**, **42** (HPLL-31, 36, 41)). Welche Rolle eine Hydroxy-Gruppe am Alkylthioether-Rest spielt, kann nur unzureichend diskutiert werden, da nur das Hydroxypropylthioether-Derivat hergestellt worden ist (**54**, HPLL-025).

Ein Methylsulfonsäure-Rest in Position 2 führt unabhängig vom Substitutionsmuster des Phenyl-Ringes zu einem kompletten Wirkungsverlust zu allen drei Adenosin-Rezeptor-Subtypen (**55-59**, **61** (HPLL-55-57, 59, 73, 82)). Nur das Derivat mit einem Fluor-Substituenten in Position 5' des Phenyl-Ringes zeigt eine moderate Affinität zum Adenosin-A_{2A}-Rezeptor (**60**, HPLL-58).

Wird der Säure-Rest verestert, ist eine Affinitätssteigerung zu den A_{2A}- und A₃-Subtypen, allerdings nicht zum A₁-Subtyp zu verzeichnen (**62-68**, HPLL-50-54, 67, 81). Das Methylsulfonsäureethylester-Derivat mit einem unsubstituiertem Phenyl-Ring besitzt hierbei die höchste Affinität zum Adenosin-A_{2A}-Rezeptor (**64**, HPLL-50), die auch durch die Einführung eines Fluor-Substituenten in Position 5' (**67**, HPLL-53) oder eines Carbonsäuremethylesters (**62**, HPLL-67), einer Acetamid-Funktion (**63**, HPLL-81) bzw. eines Methylrestes (**65**, HPLL-51) in Position 4' nicht weiter gesteigert werden kann. Ein Chlor-Substituent oder eine Methoxy-Gruppe in dieser Position führen gar zu einem vollständigen Wirkungsverlust (**66**, **68** (HPLL-52, 54)). Die Affinität dieser Substanzreihe zum A₃-Rezeptor kann durch die Einführung einer Methylgruppe (**65**, HPLL-51) und eines Chlor-Substituenten (**66**, HPLL-52) gesteigert werden, die anderen Substituenten verzeichnen keine Wirkungssteigerung bzw. führen zu einer Wirkungsverlust.

Während die bisher diskutierten Verbindungen nur eine moderate Affinität zu Adenosin-

Rezeptoren mit K_i -Werten der potentesten Verbindungen von ca. 100 nM an Adenosin- A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren bzw. von ca. 200 nM am A_3 -Subtyp zeigten, führt das folgende Substitutionsmuster zu Substanzen mit K_i -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich mit einer ausgeprägten Selektivität. Dies wird durch die Einführung von 2-(Pyridin-3-ylmethylthioether)- und 2-(Pyridin-2-ylmethylthioether)-Resten erreicht.

Die Verbindung **72** (HPLL-45) besitzt einen Pyridin-3-yl-methylthioether-Rest in Position 2 und einen unsubstituierten Phenyl-Rest in Position 6. Dieses Substitutionsmuster führt mit einem K_i -Wert von 0,448 nM zu einer äußerst hohen Affinität zu Ratten-Adenosin- A_1 -Rezeptoren. **72** (HPLL-45) zeigt außerdem eine hohe Selektivität gegenüber Ratten- A_{2A} -Rezeptoren (>360-fach) und humanen A_3 -Rezeptoren (>7700-fach). Der K_i -Wert von 0,448 nM kann in Konkurrenzexperimenten an CHO-Zellmembranen, die den humanen Adenosin- A_1 -Rezeptor exprimieren, nahezu bestätigt werden, allerdings mit einem 10-fachen Wirkungsverlust (K_i -Wert: 4,14 nM). Die Substitution des Phenyl-Ringes vermag diese Affinität nicht weiter zu steigern und auch die Selektivität gegenüber den anderen Subtypen kann nicht erhöht werden. Allerdings handelt es sich dennoch um hochaffine A_1 -Liganden. Ein Brom- (**69**, HPLL-75) und ein Chlor-Substituent (**74**, HPLL-47), eine Acetamid-Struktur (**71**, HPLL-84), ein Methyl-Rest (**73**, HPLL-46) und eine Methoxy- (**76**, HPLL-49) bzw. eine Hydroxy-Gruppe (**79**, HPLL-0109) in Position 4' und ein Fluor-Substituent in der 5'-Position (**75**, HPLL-48) bewirken K_i -Werte im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich am Ratten-Adenosin- A_1 -Rezeptor und auch am humanen Rezeptor. Nur die Carboxyl-Gruppe führt wiederum zu einem Aktivitätsverlust (**70**, HPLL-68). Die Verbindung **71** (HPLL-84) ist außerdem sehr interessant, da sie mit einem K_i -Wert von 28,1 nM eine recht hohe Affinität zum Adenosin- A_{2A} -Rezeptor besitzt, allerdings ist hier die Affinität zum A_1 -Rezeptor höher. Im Allgemeinen sind diese Verbindungen, vergleicht man ihre Affinität zu Ratten- bzw. menschlichen Adenosin-Rezeptoren, am humanen A_1 -Rezeptor weniger wirksam, während die Affinität zum humanen A_{2A} -Rezeptor zunimmt.

Der Pyridin-2-ylmethylsulfanyl-Rest in Position 2 führt zu Verbindungen mit einer ähnlichen Affinität zum A_1 -Rezeptor, diese Substitution geht allerdings mit einem geringen Wirkverlust einher (**80-86**, HPLL-051, 054, 058, 063/0108, 064, 066, 070). Ein 2-(Pyridin-4-ylmethylsulfanyl)-Rest besitzt jedoch nicht diesen positiven Einfluss auf die Affinität dieser Verbindungen (**87-95**, HPLL-012, 038, 061-062, 065, 071-073, 0110). Eine genauere Aussage kann leider noch nicht getroffen werden, da die Versuchsreihe an dieser Stelle noch nicht komplett abgeschlossen ist.

Wird der Pyridin-Ring durch einen Benzol-Ring ersetzt, so wird die Adenosin-Rezeptor-

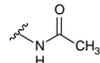
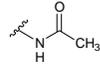
Affinität reduziert, was man deutlich an der Verbindung **98** (HPLL-055) erkennen kann. Verglichen mit **72** (HPLL-45) hat diese Verbindung einen ca. 20-fach niedrigeren K_i -Wert von 8,54 nM, der in Konkurrenzexperimenten an einer CHO-hA₁-Membranpräparation allerdings nicht erreicht wird. Weitere Derivate zeigen nur eine moderate Affinität (**96-97**, **99-100**, **102-103**, HPLL-052-053, 076, 059-060, 0107). Auch hier ist eine Diskussion nur bedingt möglich, da die Tabelle auch an dieser Stelle einige Lücken aufweist.

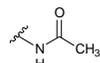
Dies trifft auch auf Verbindungen mit einem Cyclohexyl- (**103-104**, HPLL-66, 84a), einem 2-Chinolinyl- (**112-115**, HPLL077-079, 081), einem 2-Naphthyl- (**116**, HPLL-082), einem 1-Naphthyl- (**118-119**, HPLL039-040) und einem 8-Chinolinylmethylthioether-Rest (**117**, HPLL0111) in Position 2 zu. Wird der endständige Cyclohexyl-Rest in dieser Position durch einen Morpholinyl- bzw. *para*-Nitrophenyl-Rest ausgetauscht und zusätzlich eine Esterfunktion eingeführt (Struktur D, Tab. 3-1), so erhält man die Verbindungen **105-111** und **120-123** (HPLL01, 03-08 und 083-086). Erste Ergebnisse zeigen nur eine moderate bzw. gar keine Affinität. Besonders erwähnenswert ist noch die Substanz **117** (HPLL-0111), bei der der 1-Naphthyl- durch einen 8-Chinolinyl-Rest ausgetauscht wurde. Sie zeigt mit einem K_i -Wert von 23,9 nM eine hohe Affinität zum Adenosin-A₁-Rezeptor, einhergehend mit einer moderaten Selektivität. Die am Ratten-Adenosin-A₁- bzw. A_{2A}-Rezeptor ermittelten K_i -Werte konnten in Bindungsstudien an den humanen Rezeptoren bestätigt werden.

Tab. 3-1. Affinitäten verschiedener 4-Aminopyrimidin-Derivate an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren (n=3).

Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
1 (76)	A	Methyl	H	H		H	H	129 ± 15	4480 ± 343	5750 ± 457
2 (69)	A	Methyl	H	H	Br	H	H	456 ± 71	528 ± 16	1160 ± 49
3 (285)	A	Methyl	F	H	H	H	Cl	892 ± 125	> 10000 20 ± 5 (10 μM)	1450 ± 305
4 (18)	A	Methyl	H	H	H	H	H	190 ± 44 986 ± 62 ^d (n=2)	116 ± 13 ^a 62,4 ± 2,9 ^d	5690 ± 1230 ^a
5 (19)	A	Methyl	H	H	Methyl	H	H	421 ± 87 ^a	721 ± 137 ^a	693 ± 114
6 (20)	A	Methyl	H	H	Cl	H	H	> 10000 ^a 19 ± 4 (10 μM)	461 ± 78 ^a	775 ± 141 ^a

Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
7 (21)	A	Methyl	H	H	H	F	H	> 10000 nM ^a 29 ± 7 (10 μM)	206 ± 30 ^a	939 ± 48 ^a
8 (22)	A	Methyl	H	H	Methoxy	H	H	> 10000 nM ^a 25 ± 8 (10 μM)	638 ± 41 ^a	362 ± 20 ^a
9 (020)	A	Methyl	H	F	H	F	H	1280 ± 654 ^c	605 ± 120 ^c	n.d.
10 (032)	A	Methyl	H	H	COOCH ₃	H	H	n.d.	>> 10000 ^c -6 ± 5 (10 μM)	n.d.
11 (60)	A	Ethyl	H	H	COOH	H	H	> 10000 17 ± 2 (10 μM)	>> 10000 1 ± 2 (10 μM)	> 10000 26 ± 5 (10 μM)
12 (70)	A	Ethyl	H	H	Br	H	H	> 10000 39 ± 4 (10 μM)	741 ± 67	2670 ± 594
13 (286)	A	Ethyl	F	H	H	H	Cl	≥ 10000 40 ± 9 (10 μM)	> 10000 25 ± 3 (10 μM)	1680 ± 441
14 (245)	A	Ethyl	F	H	H	Methyl	H	289 ± 74	278 ± 58	1110 ± 245
15 (23)	A	Ethyl	H	H	H	H	H	102 ± 26 ^a 572 ± 187 ^d	91,9 ± 9,6 ^a 232 ± 27 ^d (n=2)	456 ± 35 ^a
16 (24)	A	Ethyl	H	H	Methyl	H	H	> 10000 ^a 17 ± 5 (10 μM)	960 ± 128	388 ± 76 ^a
17 (25)	A	Ethyl	H	H	Cl	H	H	> 10000 ^a 24 ± 5 (10 μM)	596 ± 58 ^a	269 ± 43 ^a

Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
18 (26)	A	Ethyl	H	H	H	F	H	286 ± 16 ^a	296 ± 57	537 ± 46
19 (27)	A	Ethyl	H	H	Methoxy	H	H	431 ± 54	918 ± 105 ^a	210 ± 63
20 (019)	A	Ethyl	H	H	Benzyl	H	H	> 10000 ^c 20 ± 12 (10 μM)	> 10000 ^c 10 ± 10 (10 μM)	n.d.
21 (77)	A	Ethyl	H	H		H	H	204 ± 21	1760 ± 390	≥ 10000 58 ± 8 (10 μM)
22 (62)	A	Propyl	H	H	COOH	H	H	> 10000 18 ± 2 (10 μM)	>> 10000 5 ± 3 (10 μM)	> 10000 19 ± 6 (10 μM)
23 (71)	A	Propyl	H	H	Br	H	H	2220 ± 493	1130 ± 118	1700 ± 350
24 (78)	A	Propyl	H	H		H	H	167 ± 27	1090 ± 244	2040 ± 794
25 (28)	A	Propyl	H	H	H	H	H	664 ± 17 ^a	277 ± 10	940 ± 77
26 (29)	A	Propyl	H	H	Methyl	H	H	> 10000 34 ± 8 (10 μM)	571 ± 93 ^a	458 ± 62 ^a
27 (30)	A	Propyl	H	H	Cl	H	H	> 10000 ^a 20 ± 7 (10 μM)	4430 ± 890	888 ± 132
28 (31)	A	Propyl	H	H	H	F	H	> 10000 ^a 23 ± 2 (10 μM)	166 ± 24 ^a	1120 ± 72

Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
29 (32)	A	Propyl	H	H	Methoxy	H	H	> 10000 ^a 23 ± 9 (10 μM)	437 ± 78 ^a	681 ± 162 ^a
30 (65)	A	Butyl	H	H	COOCH ₃	H	H	> 10000 20 ± 2 (10 μM)	> 10000 15 ± 11 (10 μM)	≥ 10000 49 ± 7 (10 μM)
31 (62a)	A	Hexyl	H	H	COOH	H	H	> 10000 26 ± 2 (10 μM)	> 10000 25 ± 5 (10 μM)	> 10000 22 ± 4 (10 μM)
32 (72)	A	Hexyl	H	H	Br	H	H	> 10000 21 ± 7 (10 μM)	> 10000 19 ± 13 (10 μM)	>> 10000 9 ± 7 (10 μM)
33 (79)	A	Hexyl	H	H		H	H	242 ± 42	433 ± 170	> 10000 35 ± 7 (10 μM)
34 (33)	A	Hexyl	H	H	H	H	H	> 10000 ^a 10 ± 6 (10 μM)	1420 ± 72 ^a	2530 ± 223
35 (34)	A	Hexyl	H	H	Methyl	H	H	> 10000 ^a 12 ± 3 (10 μM)	> 10000 25 ± 6 (10 μM)	> 10000 24 ± 6 (10 μM)
36 (35)	A	Hexyl	H	H	Cl	H	H	>> 10000 ^a 4 ± 1 (10 μM)	> 10000 25 ± 8 (10 μM)	> 10000 35 ± 9 (10 μM)
37 (36)	A	Hexyl	H	H	H	F	H	>> 10000 ^a 8 ± 2 (10 μM)	6850 ± 963	> 10000 29 ± 6 (10 μM)
38 (37)	A	Hexyl	H	H	Methoxy	H	H	>> 10000 ^a 8 ± 2 (10 μM)	> 10000 24 ± 6 (10 μM)	≥ 10000 43 ± 5 (10 μM)
39 (38)	A	Octyl	H	H	H	H	H	>> 10000 ^a 6 ± 3 (10 μM)	≥ 10000 44 ± 4 (10 μM)	> 10000 27 ± 1 (10 μM)

Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
40 (39)	A	Octyl	H	H	Methyl	H	H	>> 10000 ^a 8 ± 2 (10 μM)	> 10000 23 ± 2 (10 μM)	> 10000 11 ± 5 (10 μM)
41 (40)	A	Octyl	H	H	Cl	H	H	>> 10000 ^a 11 ± 2 (10 μM)	> 10000 26 ± 7 (10 μM)	> 10000 20 ± 4 (10 μM)
42 (41)	A	Octyl	H	H	H	F	H	>> 10000 ^a 8 ± 4 (10 μM)	≥ 10000 50 ± 7 (10 μM)	> 10000 11 ± 3 (10 μM)
43 (42)	A	Octyl	H	H	Methoxy	H	H	>> 10000 ^a 9 ± 1 (10 μM)	>> 10000 9 ± 2 (10 μM)	> 10000 16 ± 4 (10 μM)
44 (036)	A	Octyl	H	H	COOCH ₃	H	H	> 10000 ^c 14 ± 8 (10 μM)	> 10000 26 ± 6 (10 μM)	n.d.
45 (63)	A	Octyl	H	H	COOH	H	H	> 10000 25 ± 1 (10 μM)	> 10000 14 ± 13 (10 μM)	> 10000 32 ± 4 (10 μM)
46 (74)	B	F	H	H	Br	H	H	408 ± 36	1560 ± 162	2760 ± 694
47 (14)	B	F	H	H	Methoxy	H	H	> 10000 ^a 37 ± 3 (10 μM)	2450 ± 152	3660 ± 390 ^a
48 (16)	B	F	H	H	Cl	H	H	> 10000 ^a 24 ± 6 (10 μM)	774 ± 42 ^a	1600 ± 165 ^a
49 (17)	B	F	H	H	H	F	H	128 ± 22 ^a	408 ± 82 ^a	1040 ± 217 ^a
50 (43)	B	F	H	H	H	H	H	102 ± 12 ^a	264 ± 42 ^a	2540 ± 112

Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
51 (44)	B	F	H	H	Methyl	H	H	> 10000 ^a 17 ± 5 (10 μM)	812 ± 61	281 ± 56
52 (80)	B	F	H	H		H	H	88,6 ± 4,1	1130 ± 271	1780 ± 309
53 (64)	B	F	H	H	COOH	H	H	> 10000 14 ± 7 (10 μM)	>> 10000 -2 ± 5 (10 μM)	>> 10000 7 ± 6 (10 μM)
54 (025)	C	OH	H	H	Br	H	H	7850 ± 1730 ^c	>> 10000 5 ± 11 (10 μM)	n.d.
55 (73)	D	H	H	H	Br	H	H	> 10000 20 ± 1 (10 μM)	> 10000 33 ± 7 (10 μM)	> 10000 23 ± 5 (10 μM)
56 (82)	D	H	H	H		H	H	> 10000 21 ± 5 (10 μM)	>> 10000 9 ± 5 (10 μM)	> 10000 16 ± 5 (10 μM)
57 (55)	D	H	H	H	H	H	H	> 10000 17 ± 3 (10 μM)	10600 ± 1880	> 10000 16 ± 5 (10 μM)
58 (56)	D	H	H	H	Methyl	H	H	> 10000 ^a 11 ± 4 (10 μM)	> 10000 33 ± 5 (10 μM)	> 10000 19 ± 6 (10 μM)
59 (57)	D	H	H	H	Cl	H	H	> 10000 25 ± 2 (10 μM)	≥ 10000 45 ± 3 (10 μM)	> 10000 32 ± 5 (10 μM)
60 (58)	D	H	H	H	H	F	H	> 10000 40 ± 1 (10 μM)	8810 ± 697	> 10000 20 ± 7 (10 μM)
61 (59)	D	H	H	H	Methoxy	H	H	> 10000 31 ± 5 (10 μM)	≥ 10000 42 ± 3 (10 μM)	≥ 10000 38 ± 6 (10 μM)

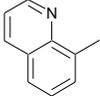
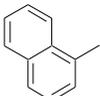
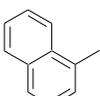
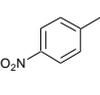
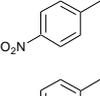
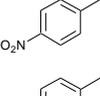
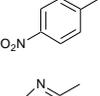
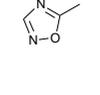
Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
62 (67)	D	Ethyl	H	H	COOCH ₃	H	H	> 10000 18 ± 2 (10 μM)	> 10000 24 ± 16 (10 μM)	> 10000 18 ± 5 (10 μM)
63 (81)	D	Ethyl	H	H		H	H	> 10000 43 ± 6 (10 μM)	1160 ± 608	> 10000 41 ± 9 (10 μM)
64 (50)	D	Ethyl	H	H	H	H	H	> 10000 ^a 22 ± 2 (10 μM)	516 ± 38	2270 ± 475
65 (51)	D	Ethyl	H	H	Methyl	H	H	> 10000 ^a 9 ± 3 (10 μM)	1400 ± 112	1250 ± 203
66 (52)	D	Ethyl	H	H	Cl	H	H	> 10000 ^a 16 ± 2 (10 μM)	≥ 10000 41 ± 7 (10 μM)	406 ± 94
67 (53)	D	Ethyl	H	H	H	F	H	> 10000 ^a 27 ± 9 (10 μM)	532 ± 68	743 ± 118 ^a
68 (54)	D	Ethyl	H	H	Methoxy	H	H	> 10000 ^a 15 ± 5 (10 μM)	> 10000 28 ± 6 (10 μM)	> 10000 32 ± 6 (10 μM)
69 (75)	A		H	H	Br	H	H	7,07 ± 0,51 9,10 ± 2,13 ^d	677 ± 95 300 ± 121 ^d (n=2)	3951 ± 686
70 (68)	A		H	H	COOH	H	H	675 ± 13	> 10000 13 ± 12 (10 μM)	> 10000 28 ± 4 (10 μM)
71 (84)	A		H	H		H	H	1,88 ± 0,15 13,8 ± 2,7 ^d	28,1 ± 6,0 14,7 ± 2,8 ^d (n=2)	1420 ± 166
72 (45)	A		H	H	H	H	H	0,448 ± 0,158 ^a 4,14 ± 0,45 ^d (n=2)	165 ± 29 ^a 163 ± 32 ^d (n=2)	3450 ± 667 ^a

Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
73 (46)	A		H	H	Methyl	H	H	4,58 ± 1,13 ^a 15,1 ± 4,71 ^d	311 ± 25 ^a 104 ± 3 ^d (n=2)	753 ± 42
74 (47)	A		H	H	Cl	H	H	10,1 ± 3,8 ^a 22,8 ± 8,12 ^d	494 ± 45 95,4 ± 13,8 ^d (n=2)	801 ± 105
75 (48)	A		H	H	H	F	H	1,76 ± 0,18 ^a 6,88 ± 1,38 ^d	121 ± 19 ^a 60,3 ± 1,3 ^d (n=2)	1030 ± 68
76 (49)	A		H	H	Methoxy	H	H	6,13 ± 1,22 ^a 19,6 ± 5,10 ^d	1070 ± 200 ^a 922 ± 148 ^d (n=2)	1030 ± 237
77 (034)	A		H	H	COOCH ₃	H	H	85,1 ± 34,8 ^c	> 10000 ^c 34 ± 12 (10 μM)	n.d.
78 (011)	A		H	H	Benzyl	H	H	2830 ± 506 ^c	> 10000 ^c 11 ± 10 (10 μM)	n.d.
79 (0109)	A		H	H	OH	H	H	2,03 ± 0,37 6,71 ± 3,39 ^d	60,9 ± 10,1 73,5 ± 8,3 ^d (n=2)	2790 ± 585
80 (054)	A		H	H	Cl	H	H	32,1 ± 5,3	2600 ± 507	1490 ± 248
81 (058)	A		H	H	Methoxy	H	H	11,7 ± 1,8 63,3 ± 25,4 ^d	2960 ± 310 1310 ± 335 ^d (n=2)	659 ± 57
82 (063/ 0108)	A		H	H	OH	H	H	2,20 ± 0,60 26,3 ± 8,40 ^d	207 ± 24 97,5 ± 7,6 ^d (n=2)	1010 ± 170
83 (064)	A		H	H	COOCH ₃	H	H	317 ± 28	4380 ± 1360	1430 ± 195

Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
84 (070)	A		H	H		H	H	4,94 ± 1,12 44,3 ± 1,0 ^d (n=2)	198 ± 15 18,6 ± 0,2 ^d (n=2)	1100 ± 117
85 (066)	A		H	H	H	H	H	6,57 ± 3,94 ^c	380 ± 9 ^c	n.d.
86 (051)	A		H	H	Methyl	H	H	32,0 ± 17,6 ^c	1450 ± 555 ^c	n.d.
87 (062)	A		H	H	Br	H	H	> 10000 29 ± 5 (10 μM)	> 10000 32 ± 6 (10 μM)	> 10000 31 ± 10 (10 μM)
88 (065)	A		H	H	COOCH ₃	H	H	> 10000 39 ± 6 (10 μM)	> 10000 37 ± 6 (10 μM)	> 10000 10 ± 0 (10 μM)
89 (0110)	A		H	H	OH	H	H	145 ± 15	449 ± 66	> 10000 43 ± 0 (10 μM)
90 (061)	A		H	H	H	H	H	166 ± 28 ^c	505 ± 52 ^c	n.d.
91 (012)	A		H	H	Benzyl	H	H	> 10000 ^c 22 ± 24 (10 μM)	> 10000 ^c 3 ± 7 (10 μM)	n.d.
92 (038)	A		H	H		H	H	n.d.	477 ± 127 ^c	n.d.
93 (071)	A		H	H	Methyl	H	H	668 ± 239 ^b	3290 ± 1100 ^b	n.d.
94 (072)	A		H	H	H	H	F	166 ± 21 ^b	2500 ± 264 ^b	n.d.

Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
95 (073)	A		H	H	Cl	H	H	> 10000 ^b 32 ± 4 (10 μM)	≥ 10000 ^b 49 ± 5 (10 μM)	n.d.
96 (052)	A	Phenyl	H	H	Methyl	H	H	152 ± 29	> 10000 31 ± 3 (10 μM)	> 10000 42 ± 11 (10 μM)
97 (053)	A	Phenyl	H	H	Cl	H	H	142 ± 26	> 10000 12 ± 7 (10 μM)	> 10000 40 ± 6 (10 μM)
98 (055)	A	Phenyl	H	H	H	H	H	8,54 ± 0,42 63,7 ± 32,5 ^d	1860 ± 224 2600 ± 158 ^d (n=2)	> 10000 18 ± 6 (10 μM)
99 (0107)	A	Phenyl	H	H	OH	H	H	> 10000 22 ± 6 (10 μM)	> 10000 24 ± 5 (10 μM)	> 10000 17 ± 1 (10 μM)
100 (076)	A	Phenyl	H	H	COOCH ₃	H	H	> 10000 ^b 19 ± 5 (10 μM)	> 10000 ^b 15 ± 1 (10 μM)	n.d.
101 (060)	A	Phenyl	H	H	Methoxy	H	H	599 ± 116 ^c	n.d.	n.d.
102 (059)	A	Phenyl	H	H	Cl	H	H	590 ± 142 ^c	> 10000 ^c 28 ± 2 (10 μM)	n.d.
103 (66)	A	Cyclohexyl	H	H	COOCH ₃	H	H	> 10000 13 ± 3 (10 μM)	> 10000 36 ± 4 (10 μM)	> 10000 27 ± 6 (10 μM)
104 (84a)	A	Cyclohexyl	H	H		H	H	≥ 10000 49 ± 19 (10 μM)	1030 ± 49	> 10000 19 ± 2 (10 μM)
105 (01)	D		H	H	H	H	H	393 ± 67 ^c	3670 ± 851 ^c	n.d.

Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
106 (04)	D		H	H	Methyl	H	H	n.d.	> 10000 ^c 42 ± 6 (10 μM)	n.d.
107 (06)	D		H	H	Methoxy	H	H	2210 ± 102 ^c	≥ 10000 ^c 45 ± 7 (10 μM)	n.d.
108 (05)	D		H	H	COOCH ₃	H	H	n.d.	n.d.	n.d.
109 (03)	D		H	H	Cl	H	H	n.d.	n.d.	n.d.
110 (07)	D		H	H		H	H	636 ± 79 ^c	> 10000 ^c 27 ± 11 (10 μM)	n.d.
111 (08)	D		H	H	OH	H	H	748 ± 121 ^b	6210 ± 990 ^b	n.d.
112 (077)	A		H	H	H	H	F	264 ± 18 ^b	n.d.	n.d.
113 (078)	A		H	H	Cl	H	H	> 10000 ^b 26 ± 2 (10 μM)	> 10000 ^c 32 ± 2 (10 μM)	n.d.
114 (079)	A		H	H	Br	H	H	> 10000 ^b 14 ± 5 (10 μM)	> 10000 ^c 26 ± 3 (10 μM)	n.d.
115 (081)	A		H	H	H	H	H	83,3 ± 0,10 ^b	> 10000 ^c 38 ± 4 (10 μM)	n.d.
116 (082)	A		H	H		H	H	n.d.	> 10000 ^c 37 ± 4 (10 μM)	n.d.

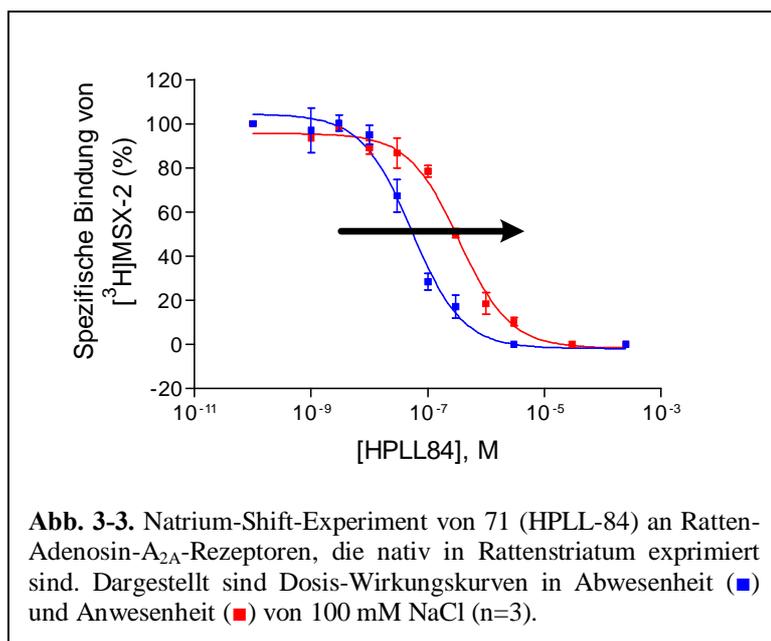
Verb. (HPLL)	Struktur	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
								A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
117 (0111)	A		H	H	OH	H	H	23,9 ± 5,1 83,8 ± 50,5^d	375 ± 93 252 ± 12^d (n=2)	> 10000 44 ± 3 (10 μM)
118 (040)	A		H	H	OH	H	H	> 10000^c 17 ± 7 (10 μM)	> 10000^c 16 ± 3 (10 μM)	n.d.
119 (039)	A		H	H		H	H	1960 ± 199^c	> 10000^c 32 ± 7 (10 μM)	n.d.
120 (083)	A		H	H	H	H	F	> 10000^b 30 ± 3 (10 μM)	> 10000^b 21 ± 2 (10 μM)	n.d.
121 (084)	D		H	H	-methyl	H	H	> 10000^b 12 ± 3 (10 μM)	> 10000^b 17 ± 2 (10 μM)	n.d.
122 (085)	D		-	-	-	-	-	> 10000^b 25 ± 2 (10 μM)	n.d.	n.d.
123 (086)	D		H	H	Br	H	H	> 10000^b 22 ± 3 (10 μM)	n.d.	n.d.
124 (027)	D		H	H	H	H	F	162 ± 37^c	824 ± 274^c	n.d.
125 (056)	D	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.

^aStefan Künne, ^bKaren Schmeling, ^cNicole Florin, ^dDr. Anke Schiedel und Sonja Hinz, n.d. = nicht durchgeführt

3.2.2. NATRIUM-SHIFT-EXPERIMENTE AN RATTEN-ADENOSIN-A_{2A}-REZEPTOREN

Für Adenosin-A₁-, A_{2A}, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren wurden allosterische Modulatoren beschrieben, wie z.B. Natrium-Ionen, die die Affinität von Agonisten und Antagonisten zu bestimmten Adenosin-Rezeptor-Subtypen (A_{2A}, A_{2B}) modulieren können. Im Allgemeinen bewirkt die Anwesenheit von Natrium-Ionen eine verminderte Affinität für Agonisten, während die Affinität von Antagonisten nicht verändert wird.²⁶⁹⁻²⁷¹ In sog. Natrium-Shift-Experimenten können Adenosin-Rezeptor-Liganden auf ihre intrinsische Aktivität untersucht werden. Dafür wird in kompetitiven Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien die Affinität eines Liganden in An- und Abwesenheit von Natrium-Ionen bestimmt. Da Natrium-Ionen das Gleichgewicht zugunsten der inaktiven Rezeptor-Konformation verschieben, erfolgt für Agonisten unter Zusatz von Natriumchlorid eine Rechtsverschiebung ihrer Dosis-Wirkungs-Kurve, während die Kompetitionskurven neutraler Antagonisten keine Änderung erfahren und sich bei inversen Agonisten eine Linksverschiebung zeigt.

Die Natrium-Shift-Experimente wurden mit der Verbindung **71** (HPLL-84) an einer Rattenstriatum-Membranpräparation durchgeführt. 70 µg der Membranpräparation wurden mit 1 nM [³H]MSX-2 und verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz – jeweils in An- und Abwesenheit von 100 mM NaCl – für 30 min unter den in Kapitel 9.7.2. beschriebenen



Bedingungen inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 50 µM NECA bestimmt. Die Kompetitionskurven für die Verbindung **71** (HPLL-84), jeweils mit und ohne Natrium-Zusatz, sind in Abb. 3-3 dargestellt. Die Kurve von **71** (HPLL-84) erfährt im Natrium-Shift-Experiment eine Verschiebung nach rechts, d.h.

zu einer niedrigeren Affinität. Der IC₅₀-Wert für **71** (HPLL-84) von 55,7 ± 7,4 nM erhöht sich unter dem Einfluss von 100 mM Natriumchlorid auf 331 ± 25 nM und unterliegt damit einer statistisch signifikanten Verschiebung (***, P = 0,0004). Der Na-Shift berechnet sich aus der Division des IC₅₀-wertes, der in Anwesenheit von 100 mM NaCl ermittelt wurde, und des IC₅₀-

Wertes in Abwesenheit von 100 mM NaCl; er beträgt $6,1 \pm 0,5$.

Tab. 3-2. IC_{50} -Werte und Natrium-Shifts der Verbindung 71 (HPLL-84) und der Referenzsubstanzen NECA, CGS21680 und DPCPX am Ratten-Adenosin- A_{2A} -Rezeptor in An- und Abwesenheit von 100 mM bzw. 1000 mM NaCl³¹⁰ (n=3).

Verb.	$IC_{50} \pm SEM$ [nM]		Natrium-Shift $\pm SEM$
	- NaCl	+ NaCl	
71 (HPLL-84)	55,7 \pm 7,4	331 \pm 25***	6,1 \pm 0,5
NECA	7,6 \pm 0,7³¹⁰	454 \pm 197³¹⁰	59,7³¹⁰
CGS21680	102 \pm 0,18³¹⁰	1399 \pm 0,19³¹⁰	13,7³¹⁰
DPCPX	210 \pm 96³¹⁰	120 \pm 3,0³¹⁰	0,29³¹⁰

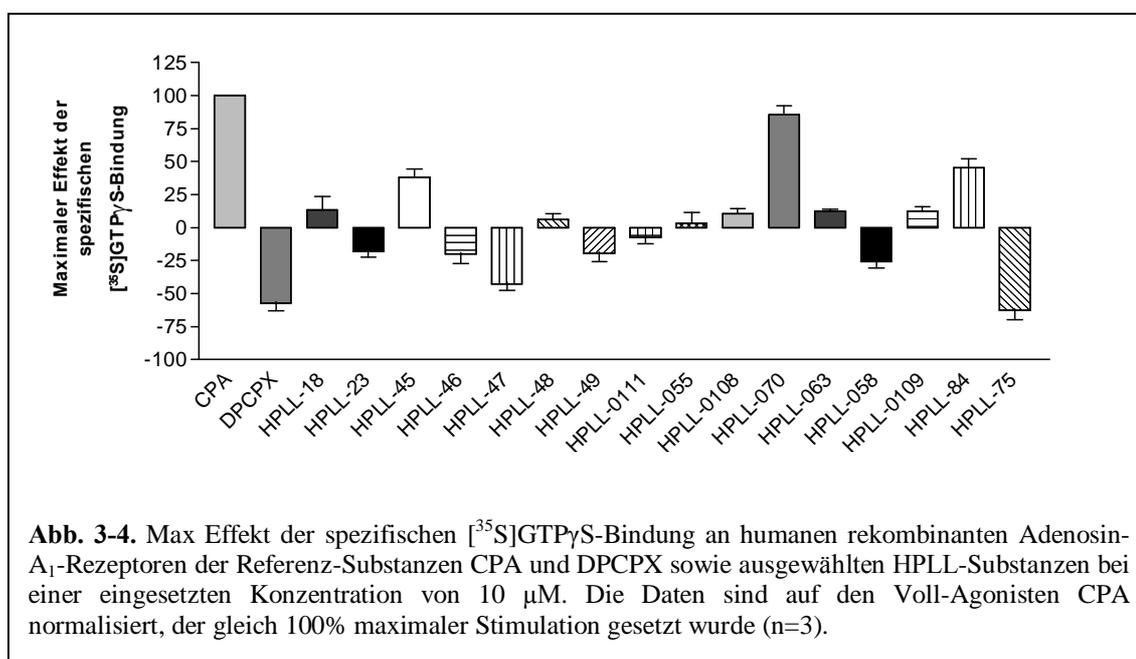
*** (P < 0,001) vs. IC_{50} -Wert – NaCl

Anhand der beobachteten Rechtsverschiebung und des berechneten Natrium-Shiftes von > 1 sowie von bereits in unserem Arbeitskreis von Frau Dr. Britta Schumacher durchgeführten Natrium-Shift-Experimenten,³¹⁰ kann geschlossen werden, dass es sich bei der Verbindung **71** (HPLL-84) um einen A_{2A} -Liganden mit (partiell) agonistischem Effekt handelt.

In funktionellen [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an Ratten-Adenosin- A_{2A} -Rezeptoren wird diese Verbindung noch weitergehend charakterisiert, um dieses Ergebnis zu untermauern (Kapitel 3.2.3.).

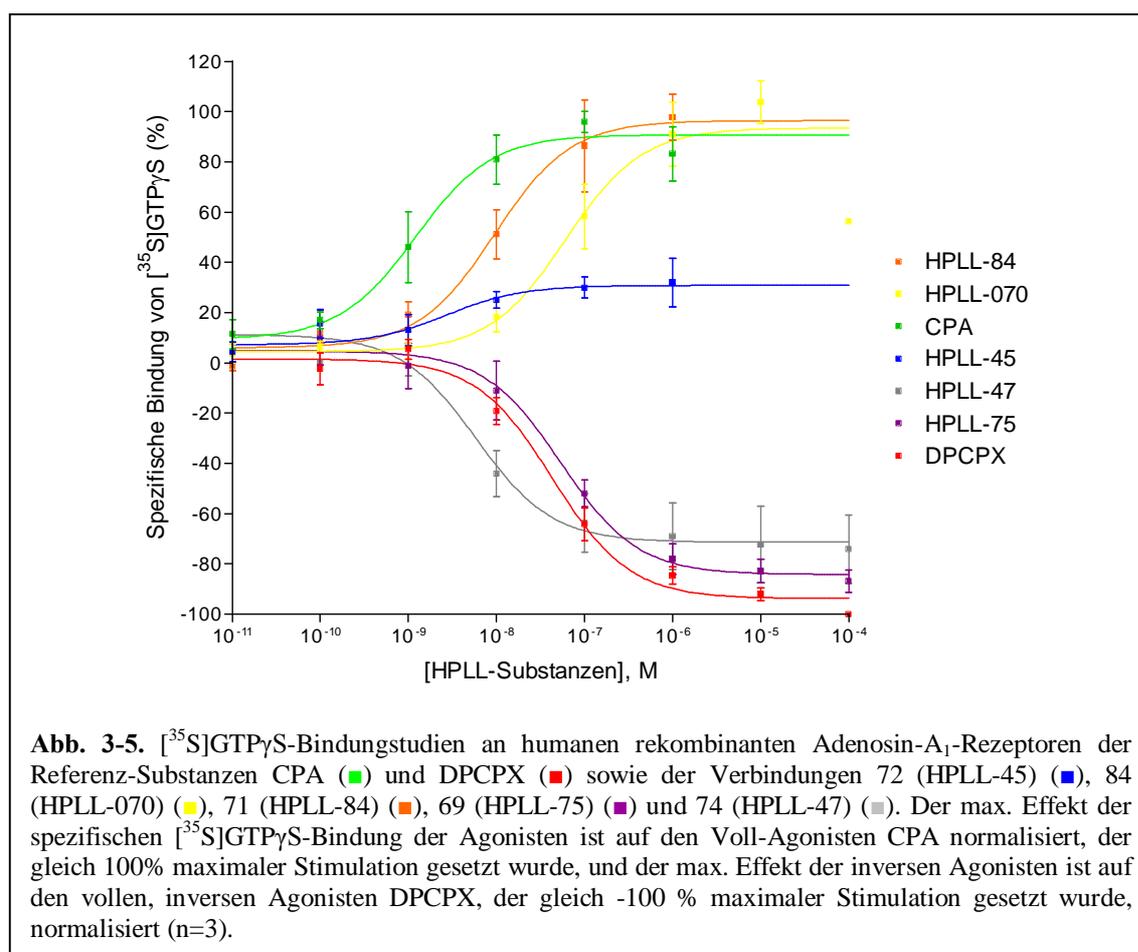
3.2.3. FUNKTIONELLE $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -BINDUNGSSTUDIEN AN HUMANEN ADENOSIN- A_1 - UND RATTEN-ADENOSIN- $\text{A}_{2\text{A}}$ -REZEPTOREN

Die Verbindungen mit der höchsten Affinität zu Adenosin- A_1 - und/oder $\text{A}_{2\text{A}}$ -Rezeptoren aus der Substanzklasse der untersuchten 4-Amino-5-cyano-2-methylthio-6-phenylpyrimidine (**4**, **15**, **69**, **71-76**, **79**, **81-82**, **84**, **98** und **117** (HPLL-18, 23, 45-49, 75, 84, 055, 058, 063, 070 und 0108-0109, 0111)) wurden in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien funktionell charakterisiert. Es wurden Membranpräparationen von CHO-Zellen, die mit dem humanen A_1 -Rezeptor rekombinant transfiziert worden waren und Rattenstriatum, das den Ratten-Adenosin- $\text{A}_{2\text{A}}$ -Rezeptor nativ exprimiert, verwendet. Dabei wurden analog zu den in Kap. 2.7. beschriebenen $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien der A_1 -selektive Adenosin-Rezeptor-Agonist **CPA**, der A_1 -selektive inverse Agonist **DPCPX**, der $\text{A}_{2\text{A}}$ -selektive Agonist **CGS21680** und der nicht selektive $\text{A}_{2\text{A}}$ -Agonist **NECA** sowie der $\text{A}_{2\text{A}}$ -selektive inverse Agonist **MSX-2** als Referenzsubstanzen verwendet. Zunächst wurden die Substanzen bei einer Konzentration von 10 μM (A_1 -Rezeptor) bzw. 100 μM ($\text{A}_{2\text{A}}$ -Rezeptor) hinsichtlich ihres max. Effektes (*Efficacy*) gescreent (siehe Abb. 3-4.).



Der Voll-Agonist **CPA** zeigte in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien am A_1 -Rezeptor bei einer Konzentration von 10 μM einen max. Effekt von $222 \pm 10\%$ (Basalwert: 100%). Der inverse Agonist **DPCPX** führte hingegen zu einer Hemmung der $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung von einem Basalwert von 100% auf $32 \pm 2\%$. Vergleicht man diesen max. Effekt mit dem der Testsubstanzen, so können die Verbindungen **71**, **72**, und **84** (HPLL-45, 070 und 84) als partielle bzw. volle

Agonisten und die Verbindungen **74** und **69** (HPLL-47 und 75) als partielle bzw. volle inverse Agonisten charakterisiert werden. Die Verbindungen **4**, **15**, **73**, **75-76**, **79**, **81-82**, **98**, und **117** (HPLL-18, 23, 46, 48, 49, 0111, 055, 0108, 063, 058 und 0109) besitzen nur einen geringen bzw. gar keinen Effekt und können aus diesem Grund in diesem Testsystem als neutrale Antagonisten eingestuft werden.



Der Einfluss des Substituenten in der Position 4' des Phenyl-Ringes auf die intrinsische Aktivität ist deutlich zu erkennen. Eine Acetamid-Funktion in dieser Position führt unabhängig vom Substituenten in Position 2 (2-(Pyridin-3-ylmethylthioether)- bzw. 2-(Pyridin-2-ylmethylthioether)-Rest) zu Verbindungen mit einem voll- bzw. partial-agonistischen Effekt (**71** und **84**, HPLL-070 und 84). Eine negative intrinsische Aktivität wird durch Halogen-Substituenten (Chlor und Brom) erreicht (**69** und **74**, HPLL-47 und 75). Einen ähnlichen, allerdings nur partialen invers-agonistischen Effekt, hat die Methoxy-Gruppe (**76** und **81**, HPLL-49 und 058).

Wie in Abb. 3-5 deutlich zu erkennen ist, führte der als Referenzsubstanz verwendete Adenosin-

A_1 -Rezeptor-Agonist **CPA** in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Erhöhung der [35 S]GTP γ S-Bindung mit einem EC_{50} -Wert von $1,22 \pm 0,48$ nM, der in guter Übereinstimmung mit dem früher in unserem Arbeitskreis bestimmten EC_{50} -Wert von 0,825 nM liegt.²⁹¹ Der inverse Agonist **DPCPX** zeigte eine Verringerung der [35 S]GTP γ S-Bindung mit einem EC_{50} -Wert von $27,9 \pm 11,4$ nM und weicht damit geringfügig von bereits publizierten Daten ab (2,11 nM).²⁹¹

Tab. 3-3. Strukturen der in [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien funktionell charakterisierten Verbindungen 69, 71, 72, 74, und 84 (HPLL-45, 070, 84, 75 und 47).

Verb.	R ₁	R ₄
72 (HPLL-45)		H
84 (HPLL-070)		
71 (HPLL-84)		
69 (HPLL-75)		Br
74 (HPLL-47)		Cl

Tab. 3-3. zeigt zur besseren Übersicht nochmals die Strukturen der in Kap. 3.2.1 untersuchten Verbindungen, deren weitere Charakterisierung sich nach vorausgegangen Screenings als interessant erwies.

Die Verbindungen **72**, **84** und **71** (HPLL-45, 070 und 84) zeigten einen max. Effekt der spezifischen [35 S]GTP γ S-Bindung von 34 ± 6 %, 104 ± 8 % bzw. 98 ± 9 % und **74** (HPLL-47) und **69** (HPLL-75) einen von -71 ± 12 bzw. -91 ± 4 % (Abb. 3-5). Die Daten der Agonisten sind dabei auf den Voll-Agonisten **CPA** (max. Effekt: 100 %) und die der inversen Agonisten auf den vollen inversen Agonisten **DPCPX** (max. Effekt: -100 %) normalisiert.

Wie aus Tab. 3-4 ersichtlich stimmen die in [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien ermittelten EC_{50} -Werte gut mit den K_i -Werten aus Konkurrenzexperimenten am humanen A_1 -Rezeptor-Subtyp gut überein. Auch hier können die speziesabhängigen Affinitätsunterschiede bestätigt werden. Die Verbindungen haben zum Ratten-Adenosin- A_1 -Rezeptor eine höhere Affinität als zum

humanen Rezeptor, wobei es sich trotz der etwas geringeren Affinität immer noch um hochaffine Verbindungen handelt.

Tab. 3-4. Vergleich der in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien am humanen Adenosin-A₁-Rezeptor ermittelten EC₅₀-Werte ausgewählter HPLL-Substanzen mit den in Konkurrenzexperimenten gegen [³H]CCPA am Ratten- und am humanem Adenosin-A₁-Rezeptor bestimmten K_i-Werten (n=3).

Verb.	K _i ± SEM [nM]		EC ₅₀ ± SEM [nM]	Max Effekt der spez. [³⁵ S]GTPγS-Bindung ± SEM [%]*
	A ₁ Ratte	A ₁ Mensch	A ₁ Mensch	
72 (HPLL-45)	0,448 ± 0,158	4,14 ± 0,45	2,03 ± 1,12	34 ± 6
84 (HPLL-070)	4,94 ± 1,12	44,3 ± 1,0	84,4 ± 12,7	104 ± 8
71 (HPLL-84)	1,88 ± 0,15	13,8 ± 2,7	14,4 ± 5,6	98 ± 9
69 (HPLL-75)	7,07 ± 0,51	9,10 ± 2,13	60,6 ± 14,7	-91 ± 4
74 (HPLL-47)	10,1 ± 3,8	22,8 ± 8,12	7,06 ± 1,66	-71 ± 12
CPA ^a	5,90 ³¹¹ (³ H]DPCPX)	0,8 ³¹³ (³ H]PIA)	1,22 ± 0,48	100
DPCPX ^b	5,07 ³¹² (³ H]DPCPX)	0,5 ³¹⁴ (³ H]CCPA)	27,9 ± 11,4	-100

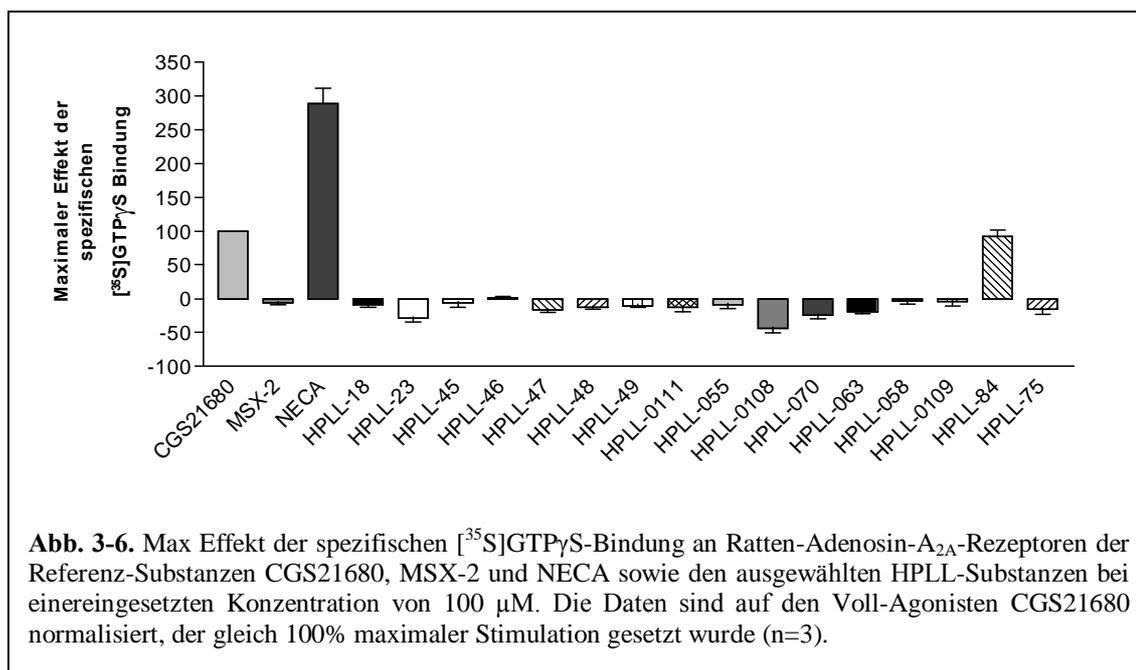
^aAgonist, ^binverser Agonist

*Der max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung der Agonisten ist auf den Voll-Agonisten CPA normalisiert, der gleich 100% maximaler Stimulation gesetzt wurde. Der max. Effekt der inversen Agonisten ist auf den vollen, inversen Agonisten DPCPX, der gleich -100 % maximaler Stimulation gesetzt wurde, normalisiert.

In [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien am Ratten-Adenosin-A_{2A}-Rezeptor hatten die Voll-Agonisten **CGS21680** und **NECA** bei einer Konzentration von 100 μM einen max. Effekt von 208 ± 7 bzw. 374 ± 22 % (Basalwert: 100 %). Der inverse Agonist **MSX-2** senkte allerdings die spezifische [³⁵S]GTPγS-Bindung nicht wesentlich unter den Basalwert von 100 % ab (max. Effekt: 94 ± 3 %). Untersuchungen von inversen Agonisten werden vorwiegend in Zell-Linien durchgeführt, die den Rezeptor in hoher Rezeptordichte rekombinant exprimieren.²⁶⁵ In diesen Systemen ist der negativ-intrinsische Effekt besser zu beobachten als in nativem Gewebe (Rattenstriatum).

Die Referenz-Substanz **NECA** zeigte eine höhere intrinsische Aktivität als der Voll-Agonist **CGS21680**. Da **NECA** allerdings nicht selektiv an den Adenosin-A_{2A}-Rezeptor bindet, sondern auch eine Affinität zum Adenosin-A₁-Rezeptor hat und im Rattenstriatum neben Adenosin-A₁- auch A_{2A}-Rezeptoren vorhanden sind,²⁷⁴ kann ein Teil dieses Effektes darauf zurückgeführt werden. Es muss untersucht werden, ob der Effekt der A₁-Rezeptoren sich z.B. mit einer hohen Konzentration (10 μM) des inversen A₁-Agonisten **DPCPX** inhibieren lässt.

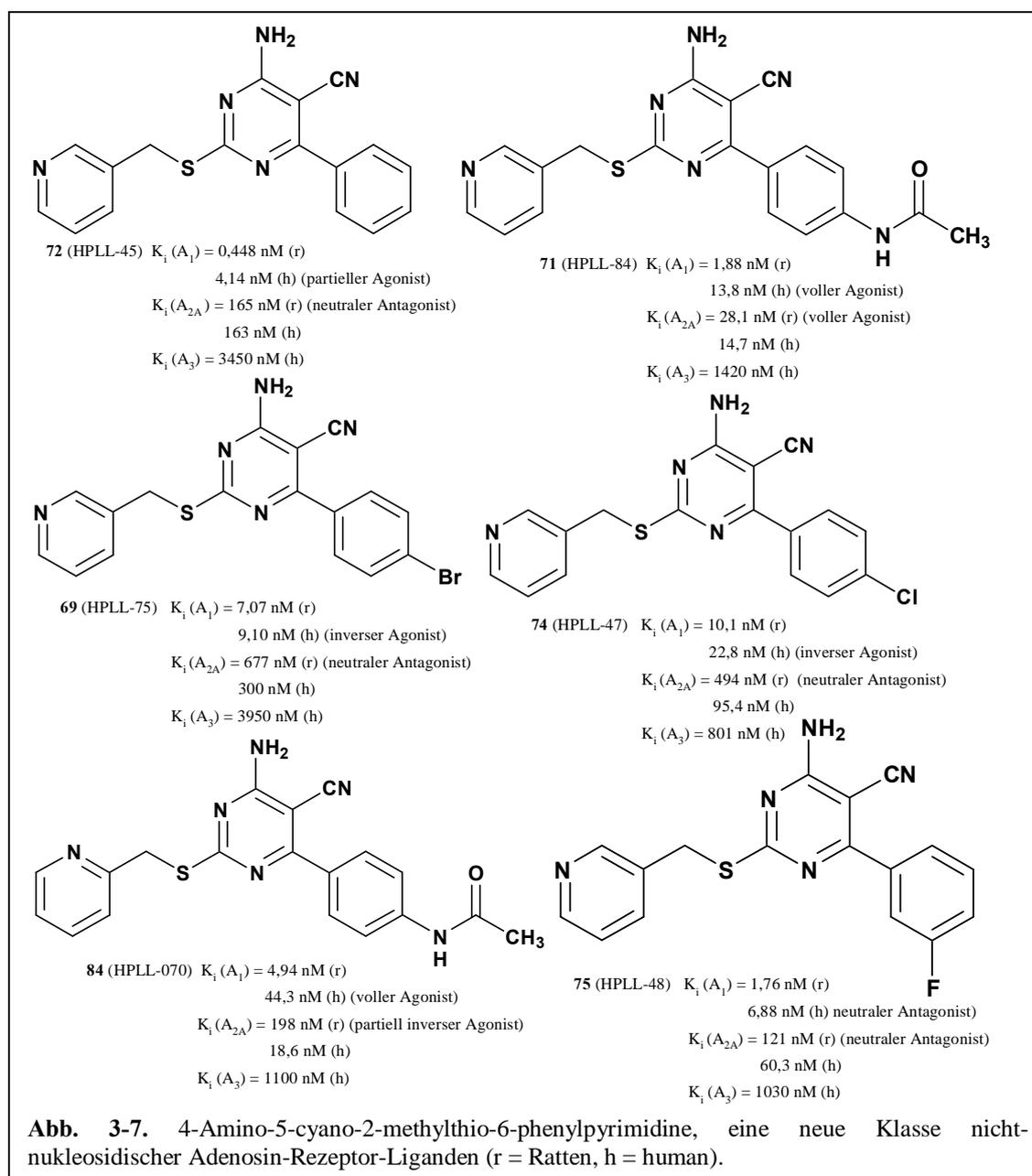
Obwohl in diesem Testsystem für die Referenz-Substanz **MSX-2** kein invers-agonistischer Effekt nachgewiesen werden konnte, zeigte die Verbindung **82** (HPLL-0108) mit einer *Efficacy* von 59 ± 6 % einen solchen Effekt. Eine negative intrinsische Aktivität kann auch für die Verbindungen **15** und **84** (HPLL-23 und 070) diskutiert werden.



Die Verbindung **71** (HPLL-84) kann mit einem max. Effekt von 200 ± 14 % eindeutig als voller Agonist eingeordnet werden, was bedeutet, dass Acetamid-Substituenten in Position 4' der 4-Aminopyridin-Derivate, sowohl bei A_1 - als auch bei $\text{A}_{2\text{A}}$ -Rezeptoren, zu Verbindungen mit einem agonistischen Effekt führen. Im Natrium-Shift-Experiment (siehe Kap. 3.2.2.) wurde für die Verbindung **71** (HPLL-84) ein (partiell) agonistischer Effekt ermittelt. Somit konnte das Ergebnis nahezu bestätigt werden.

3.2.4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Eine Serie von 4-Amino-5-cyano-2-methylthio-6-phenylpyrimidinen, die sich durch ihr Substitutionsmuster in den Position 2 bzw. 2', 3', 4', 5' und 6' des sich in Position 6 befindlichen Phenyl-Ringes unterscheiden, wurde *in-vitro*-pharmakologisch an Adenosin-A₁-, A_{2A}- und A₃-Rezeptoren untersucht.



Für die Testung an A₁- und A_{2A}-Rezeptoren wurden zunächst Rattenhirn-Membranpräparationen verwendet. Die affinsten Verbindungen wurden zusätzlich an CHO-

Membranpräparationen, die den humanen A₁- bzw. A_{2A}-Rezeptor rekombinant exprimieren, untersucht. Untersuchungen an humanen A₃-Rezeptoren wurden ebenfalls an rekombinanten CHO-Zell-Membranpräparationen durchgeführt. Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren, um die Selektivität dieser Verbindungen gegenüber diesem Rezeptor zu bestimmen, befinden sich zurzeit in Bearbeitung.

Es konnten zahlreiche Verbindungen mit K_i-Werten im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich am A₁-Rezeptor und im zweistelligen nanomolaren Bereich am A_{2A}-Rezeptor identifiziert werden. Die hinsichtlich ihrer Affinität und intrinsischen Aktivität interessantesten Verbindungen sind in Abb. 3-7 dargestellt.

Dabei handelte es sich vorwiegend um 4-Amino-5-cyano-6-phenylpyrimidine mit einem Pyridin-3-yl-methylthioether-Rest bzw. Pyridin-2-yl-methylthioether-Rest in Position 2, kombiniert mit einem unsubstituierten Phenyl-Ring in Position 6 bzw. mit einer Substitution in *para*- oder *meta*-Position dieses Phenyl-Ringes. Dabei hat die Verbindung mit einem Fluor-Substituenten in *meta*-Position einem K_i-Wert von 1,76 nM am Ratten-A₁-Rezeptor bzw. 6,88 nM am humanen A₁-Rezeptor (**75**, HPLL-48). Die Affinität der in *para*-Position substituierten Derivate nimmt abhängig vom Substituenten ab: Acetamid > OH > Methyl > Methoxy > Br > Cl (**71**, **79**, **73**, **76**, **69**, **74** (HPLL-84, 0109, 46, 49, 75, 47)).

Die Verbindungen **71**, **72** und **84** (HPLL-45, 84 und 070) stellen potente Adenosin-A₁-Liganden mit partial- bzw. voll-agonistischem Effekt dar. **72** (HPLL-45) weist an humanen bzw. Ratten-Adenosin-A₁-Rezeptoren einen K_i-Wert von 4,14 nM bzw. 0,448 nM auf und besitzt damit eine mehr als 360-fache A₁/A_{2A}-Selektivität und eine mehr als 7700-fache A₁/A₃-Selektivität. Für die Verbindungen **71** und **84** (HPLL-84 und 070) wurden K_i-Werte von 1,88 nM (rA₁) und 13,8 nM (hA₁) bzw. 4,94 nM (rA₁) und 44,3 nM (hA₁) ermittelt. Diese ebenfalls hochaffinen Verbindungen besitzen allerdings nicht die ausgeprägte Selektivität der Verbindung **72** (HPLL-45).

69 und **74** (HPLL-75 und 47) stellen nicht nur aufgrund ihrer hohen Affinität zum A₁-Rezeptor (7,07 nM (rA₁) und 9,10 nM (hA₁) bzw. 10,1 nM (rA₁) und 22,8 nM (hA₁)), sondern auch wegen ihrer intrinsischen Aktivität – es handelt sich bei diesen Substanzen um partielle inverse Agonisten – attraktive Verbindungen dar. Allgemein lässt sich schlussfolgern, dass eine Acetamid-Funktion in der Position 4' des Phenyl-Ringes unabhängig vom Substituenten in Position 2 (Pyridin-3-ylmethylthioether- bzw. Pyridin-2-ylmethylthioether-Rest) zu Verbindungen mit einem voll- bzw. partial-agonistischen Effekt (**84** und **71**, HPLL-070 und 84) führt. Eine negative intrinsische Aktivität wird durch Halogen-Substituenten (Chlor und Brom) erreicht (**69** und **74**, HPLL-47 und 75). Einen ähnlichen, allerdings nur partialen invers-

agonistischen Effekt, hat die Methoxy-Gruppe (**76** und **81**, HPLL-49 und 058).

Aufgrund ihrer hohen Bindungsneigung zum Adenosin-A_{2A}-Rezeptor sind die Verbindungen **71** (HPLL-84) und **84** (HPLL-070) besonders erwähnenswert. Im Gegensatz zum A₁-Rezeptor nimmt die Affinität dieser Verbindungen am humanen A_{2A}-Rezeptor im Vergleich zum Ratten-Rezeptor zu. **71** (HPLL-84) zeigt K_i-Werte von 28,1 nM (rA_{2A}) bzw. 14,7 nM (hA_{2A}) und **84** (HPLL-070) K_i-Werte von 198 nM (rA_{2A}) bzw. 18,6 nM (hA_{2A}). Wegen ihrer ebenfalls hohen Affinität zu Adenosin-A₁-Rezeptoren sind diese Verbindungen allerdings nicht sehr selektiv. In [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Ratten-Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren wurde für **71** (HPLL-84) ein voll-agonistischer Effekt und für **84** (HPLL-070) ein partieller invers-agonistischer Effekt ermittelt.

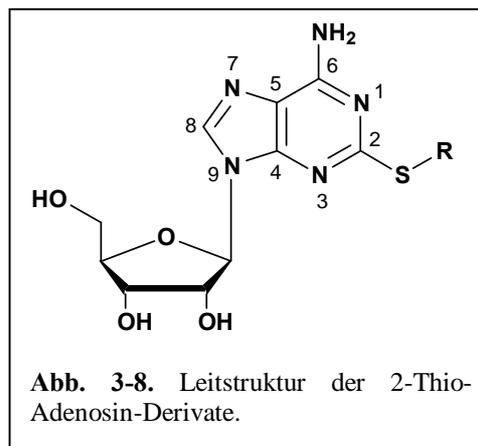
Somit handelt es sich bei den 4-Amino-5-cyano-2-methylthio-6-phenylpyrimidinen um eine neue Klasse nicht-nukleosidischer Adenosin-Rezeptor-Liganden, die einen Fortschritt in der Entwicklung von Wirkstoffen, die selektiv Adenosin-Rezeptoren blockieren oder aktivieren, darstellen. Das geringe Molekulargewicht und die hydrophilen Substituenten, die mit einer verbesserten Wasserlöslichkeit einhergehen, ohne jedoch gleichzeitig die ZNS-Gängigkeit zu beeinflussen, könnten zu einer besseren Bioverfügbarkeit im Vergleich zu bisher bekannten hochaffinen Liganden führen.

3.3. CHARAKTERISIERUNG VON 2-THIOADENOSIN-DERIVATEN ALS ADENOSIN-REZEPTOR-AGONISTEN

Eine kleine Bibliothek von 2-Thioadenosin-Derivaten mit der in Abb. 3-8 dargestellten allgemeinen Struktur wurden von Herrn Dr. Ali El-Tayeb in unserem Arbeitskreis synthetisiert. Ausgangspunkt für die Entwicklung dieser Verbindungen war die Beobachtung, dass Verbindungen dieser Substanzklasse als Inhibitoren der Blutplättchen-Aggregation fungieren.^{316, 317}

Dieser Effekt wird über Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren vermittelt, die auf Thrombozyten in hoher Dichte exprimiert und an die Aktivierung der Adenylatcyclase gekoppelt sind (Vergleich Kap.

1.6.). Basierend auf der Leitstruktur war das Ziel dieses Projektes die Entwicklung selektiver A_{2A}-Agonisten.



3.3.1. KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN-A₁-, A_{2A}- UND A₃-REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN

Die Affinität der Verbindungen zu Adenosin-A₁-, A_{2A}- und A₃-Rezeptoren wurde in kompetitiven Radioligand-Bindungsstudien an Rattenhirn (Cortex- bzw. Striatum-Membranpräparationen) und rekombinanten, humanen A₃-CHO-Membranpräparationen unter Mithilfe von Alexander Zielinski (Student der Biologie, im Rahmen eines Praktikums) bestimmt. Analog dem Kapitel 3.2. wurden die A₁-Bindungsstudien mit dem Radioliganden [³H]CCPA, die A_{2A}-Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 und die A₃-Bindungsstudien mit dem Radioliganden [³H]PSB-11 durchgeführt. Einige ausgewählte Derivate wurden darüber hinaus in Konkurrenzexperimenten mit dem A_{2A}-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CGS21680¹⁷³ weitergehend charakterisiert.

Die Strukturen der getesteten Verbindungen sowie die Ergebnisse der kompetitiven Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren sind in Tab. 3-5 dargestellt. Eine Konkurrenzkurve der Verbindung **Ali-325** am Adenosin-A_{2A}-Rezeptor wird exemplarisch in Abb. 3-9 gezeigt.

Die 2-Thioadenosin-Derivate unterscheiden sich durch einen Substituenten in Position 2 des Adenosin-Grundgerüsts voneinander. Die Untersuchung des Derivates mit einem

Cyclohexylthio-Rest in dieser Position (**Ali-303**) zeigte, dass diese Verbindung eine Affinität zum Adenosin-A₁-Rezeptor im niedrigen mikromolaren Bereich aufweist. Diese Verbindung besitzt eine mehr als 130-fache Selektivität gegenüber A_{2A}- und A₃-Rezeptoren. Verwendet man den Agonist-Radioliganden [³H]CGS21680, so wird ein fünffach geringerer K_i-Wert für den Adenosin-A_{2A}-Rezeptor erhalten. Im Allgemeinen liefern Konkurrenzexperimente ausgewählter 2-Thioadenosin-Derivate gegen diesen Radioliganden niedrigere K_i-Werte, als gegen den Antagonist-Radioliganden [³H]MSX-2 gemessen (**Ali-302-303**, **305-307**). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei den Verbindungen um Agonisten handelt. Sie erfahren einen sog. „Agonist-Shift“, welcher sich dabei als das Verhältnis der K_i-Werte aus Bindungsstudien mit dem antagonistischen und dem agonistischen Radioliganden definiert. In Tab. 3-6 sind die Agonist-Shifts der Verbindungen **Ali-302-303** und **305-307** dargestellt.

Wird zwischen dem Cyclohexyl-Rest und dem Schwefelatom eine Methyl- bzw. Ethylen-Gruppe eingefügt, so geht dies mit einer Reduzierung der Affinität zum A₁-Rezeptor einher, während die Wirkung an den A_{2A}- und A₃-Rezeptoren gesteigert wird (**Ali-306** und **302**). Der

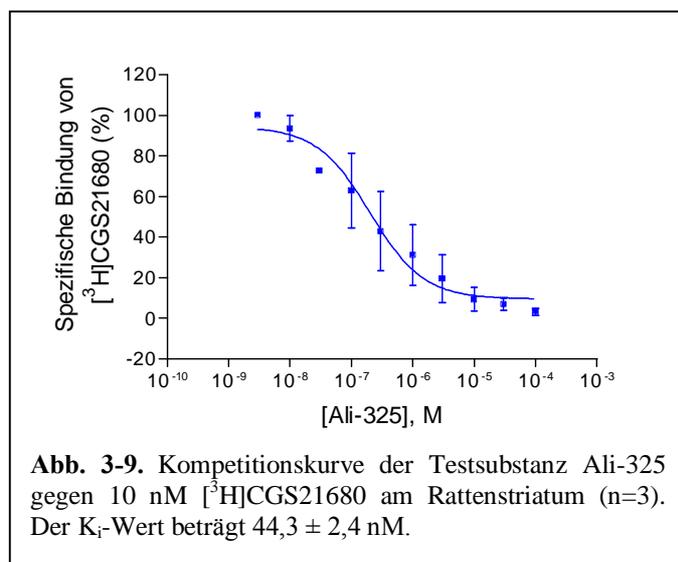


Abb. 3-9. Kompetitionskurve der Testsubstanz Ali-325 gegen 10 nM [³H]CGS21680 am Rattenstriatum (n=3). Der K_i-Wert beträgt 44,3 ± 2,4 nM.

Austausch des Cyclohexyl-Restes durch einen Cyclopentyl-Rest resultiert hingegen in einem weiteren Abfall der Affinität zu allen drei Rezeptorsubtypen (**Ali-305**). Die Verlängerung der Alkyl-Kette zu einem Cyclopentylpropylthio-Rest hat einen negativen Einfluss auf die Affinität dieser Verbindungen (**Ali-326**). Vergleicht man nun die Verbindungen **Ali-306** und **302** mit den Verbindungen **Ali-300** und **301**,

die sich dadurch unterscheiden, dass anstelle eines Cyclohexyl-Restes ein Phenyl-Rest eingeführt wurde, so lässt sich erkennen, dass die Einführung des Phenyl-Restes unterschiedliche Auswirkungen auf die Bindungsaffinität besitzt. Im Fall der Verbindung **Ali-300** geht ein Benzylthio-Rest mit einer Wirkverminderung am A₁- und A_{2A}-Rezeptor im Vergleich zu **Ali-301** einher, während eine recht hohe Affinität zum A₃-Rezeptor beobachtet wird. Ein Phenylethylthio-Rest (**Ali-301**) hingegen erhöht wiederum die Affinität dieser Verbindungen zum Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptor, während die Affinität zum A₃-Rezeptor verringert wird.

Die Einführung weiterer funktioneller Gruppen, wie einem Pentylthio-, einem

Carboxymethylthio-, einem Allylthio- oder einem Propargylthio-Rest vermag die Affinität dieser Verbindungen zu Adenosin-Rezeptoren nicht zu steigern (**Ali-306**, **311-313**).

Erst mit **Ali-325** wurde eine Verbindung mit hoher Affinität zum Adenosin-A_{2A}-Rezeptor und einer ausgeprägten Selektivität (>225-fach) gefunden. Der K_i-Wert der Verbindung **Ali-325** beträgt $44,3 \pm 2,4$ nM (siehe Abb. 3-9).

Tab. 3-5. Affinitäten verschiedener 2-Thio-Adenosin-Derivate an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren (n=3).

Verb. Ali	R	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
		A ₁ Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte [³ H]MSX-2 oder [³ H]CGS21680	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
300	Benzyl	927 ± 57^a	8560 ± 280^a	120 ± 15^a
301	Phenethyl	180 ± 14^a	249 ± 32^a	1810 ± 588^a
302	2-Cyclohexylethyl	400 ± 3^a	945 ± 84^a 372 ± 57	3640 ± 719^a
303	Cyclohexyl	139 ± 5^a	10600 ± 1630^a 2480 ± 655	$\geq 10000^a$ 48 ± 8 (10 μM)
305	Cyclopentyl	994 ± 112^a	7650 ± 142^a	10400 ± 924^a
306	Cyclohexylmethyl	498 ± 95^a	4130 ± 82^a 709 ± 123	1720 ± 167^a
307	n-Pentyl	256 ± 11^a	2940 ± 359^a 542 ± 120	2320 ± 134^a
311	Carboxymethyl	1930 ± 612^a	$> 10000^a$ 30 ± 9 (10 μM)	$> 10000^a$ 13 ± 3 (10 μM)
312	Allyl	532 ± 25^a	15200 ± 455^a	6640 ± 787^a
313	Propargyl	555 ± 73^a	14200 ± 2200^a	6990 ± 738^a
325	siehe unten ^b	≥ 10000 41 ± 5 (10 μM)	$44,4 \pm 2,4$	$\gg 10000$ 4 ± 5 (10 μM)
326	3-Cyclopentylpropyl	> 10000 24 ± 1 (10 μM)	1680 ± 381	1580 ± 304

^aAlexander Zielinski, ^bStruktur kann aus patentrechtlichen Gründen noch nicht veröffentlicht werden.

Tab. 3-6. Vergleich der K_i -Werte und Agonist-Shifts der Verbindungen Ali-302-303 und 306-307 aus Radioligand-Bindungsstudien mit dem A_{2A} -selektiven Agonisten [3 H]CGS21680 und dem A_{2A} -selektiven Antagonisten [3 H]MSX-2 an Ratten-Adenosin- A_{2A} -Rezeptoren (n=3).

Verb. Ali	$K_i \pm \text{SEM} [\text{nM}]$		Agonist-Shift
	[3 H]CGS21680	[3 H]MSX-2	
302	372 \pm 57	945 \pm 84**	2,5
303	2480 \pm 655	10600 \pm 1630**	4,3
306	709 \pm 123	4130 \pm 82***	5,8
307	542 \pm 120	2940 \pm 359**	5,4

*** ($P < 0,001$) bzw. ** ($0,001 < P < 0,01$) vs. K_i -Wert ([3 H]CGS21680)

3.3.2. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Eine Serie von 2-Thioadenosin-Derivaten, die sich durch ihr Substitutionsmuster in der Position 2 unterscheiden, wurde *in-vitro*-pharmakologisch an Adenosin- A_1 -, A_{2A} - und A_3 -Rezeptoren untersucht. Eine Reihe von Substituenten in dieser Position führten zu Verbindungen, die eine gewisse Affinität zu Adenosin-Rezeptoren aufwiesen, allerdings einhergehend mit einer geringen Selektivität. Erst mit **Ali-325** wurde eine Verbindung mit einer hohen Affinität und hohen Selektivität (>225-fach) zum Ratten- A_{2A} -Rezeptor erhalten, für die ein K_i -Wert von $44,3 \pm 2,4$ nM ermittelt wurde (**Ali-325**). Radioligand-Bindungsstudien am humanen A_{2A} -Rezeptor, um Aussagen über spezie-abhängige Unterschiede machen zu können, stehen noch aus. Aus der Diskussion der Struktur-Wirkungsbeziehungen geht hervor, dass eine kürzere Alkylkette zu Verbindungen führt, die eine höhere Bindungsneigung zum A_1 -Rezeptor zeigen, während eine Verlängerung zu einer Verschiebung dieser Affinität zu den Adenosin- A_{2A} -Rezeptoren nach sich zieht. Eine C_2 -Kette mit einem terminalen Phenyl- oder Cyclohexyl-Rest ist optimal, wie auch bereits im Rahmen anderer Studien an verwandten Adenosin-Derivaten gezeigt werden konnte.²⁵⁴ Die Verbindung **Ali-325** wurde synthetisiert mit dem Ziel, einen A_{2A} -selektiven Agonisten zu erhalten, der

- (a) zur lokalen Therapie entzündlicher Darmerkrankungen und
- (b) zur parenteralen Applikation geeignet wäre.

Frau Aliaa Abdelrahman aus unserem Arbeitskreis konnte inzwischen in cAMP-Studien an humanen A_{2A} -Rezeptoren, exprimiert in CHO-Zellen, zeigen, dass es sich um einen vollen Agonisten an A_{2A} -Rezeptoren handelt. Diese Verbindung wird zurzeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Karin Nieber, Leipzig, in *In-vivo*-Studien weiter untersucht.

3.4. CHARAKTERISIERUNG VON 2-PHENYLPURIN-6,8-DIONEN, 2,8-DIPHENYLPURIN-6-DIONEN, 1,2,3-TRIAZOLPYRIMIDINEN UND 7-AMINO-OXAZOLPYRIMIDINEN ALS NEUE ADENOSIN-REZEPTOR-LIGANDEN

Diese Serie von Heterozyklen wurde im Rahmen einer Dissertation von Herrn Dr. Alexander Bauer in unserem Arbeitskreis synthetisiert.³¹⁸ Man kann diese Verbindungen in folgende Substanzklassen einteilen: 2-Phenylpurin-6,8-dione, 1,2,3-Triazolpyrimidine, 2,8-Diphenylpurin-6-dione und 7-Amino-2,5-Diaryloxazolopyrimidine. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Adenosin-Rezeptor-Antagonisten, die dabei helfen sollten, den Aufbau und die Funktion der Adenosin-Rezeptoren besser zu verstehen.³¹⁸

3.4.1. KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN HUMANEN ADENOSIN-A₃-REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN

Nachdem zuvor in unserem Arbeitskreis die Affinitäten dieser Substanzen zu Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren im nativen Rattenhirn (Cortex- und Striatum-Membranpräparationen) sowie zu humanen A_{2B}-Rezeptoren bestimmt worden waren,³¹⁸ sollte nun zusätzlich deren Bindungsneigung zu humanen A₃-Rezeptoren ermittelt werden. Analog zu den Kapiteln 3.2. und 3.3. wurden die A₃-Bindungsstudien mit dem Radioliganden [³H]PSB-11³⁰⁹ durchgeführt. Des Weiteren sollte der K_i-Wert der am humanen A_{2B}-Rezeptor affinen Verbindung **AB-83** unter Verwendung des A_{2B}-selektiven Radioliganden [³H]PSB-603³¹⁹ bestimmt werden.

Die Ergebnisse aus kompetitiven Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen A₃-Rezeptoren sind zusammen mit den Ergebnissen aus vergangenen Testreihen in Tab. 3-7 aufgelistet. Diese wurden u.a. von Svenja Lacher durchgeführt.³¹⁸ Exemplarische Kompetitionskurven der Substanzen **AB-90** und **92** am Adenosin-A₃-Rezeptor sind in Abb. 3-10 dargestellt.

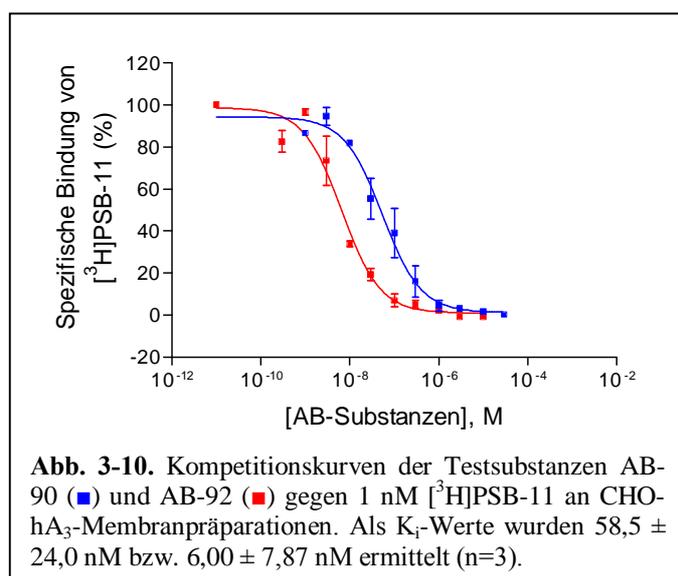
Kompetitionsexperimente der 2-Phenylpurin-6,8-dione haben ergeben, dass eine Verlängerung der Alkylkette in Position N7 die Affinität dieser Substanzen zu allen Adenosin-Rezeptor-Subtypen steigert (**AB-10** und **83**, **AB-112** und **114**)³¹⁸, wobei die Affinität zu Adenosin-A₁-Rezeptoren am Höchsten ist. Eine 6,7,9-Trisubstitution führt zu einem dramatischen Abfall der Bindungsneigung dieser Verbindungen zu Adenosin-Rezeptoren (**AB-50**). Dies könnte mit dem Verlust des H-Brücken-Donor- und Akzeptor-Musters erklärt werden.³¹⁸ Die Verbindung **AB-71** besitzt am A₃-Rezeptor einen K_i-Wert von 252 ± 63 nM und zeigt somit, dass die Wiederherstellung dieses Musters an N1 und C6/O⁶ die Affinität deutlich verbessert.³¹⁸

Die 1,2,3-Triazolpyrimidine **AB-T1** und **AB-T2** weisen nur eine geringe Affinität zu allen

Adenosin-Rezeptor-Subtypen auf.

Die Einführung eines Substituenten in Position 9 der 2,8-Diphenylpurin-6-dione ergibt Verbindungen, die eine Affinität sowohl zu Adenosin-A₁- als auch teilweise zu A₃-Rezeptoren aufweisen (**AB-79**, **108** und **116**). Die Affinität nimmt mit zunehmender Raumfüllung des Substituenten ab. In der Reihe Benzyl (**AB-79**) < Phenylethyl (**AB-108**) < 2-Methyl-Phenylpropyl (**AB-11**) fällt die Affinität von 210 auf 790 nM.

Die N⁷-Substitution der 7-Amino-2,5-Diaryloxazolopyrimidine führt zu einer erhöhten A₃-

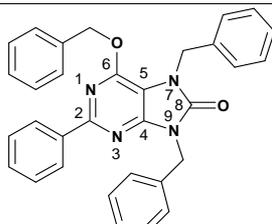
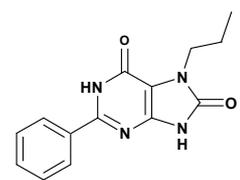
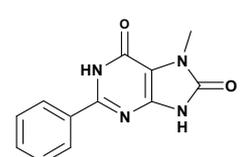
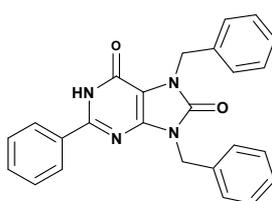
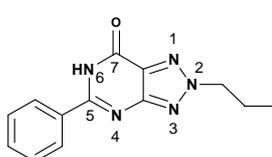
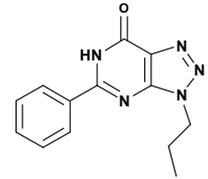


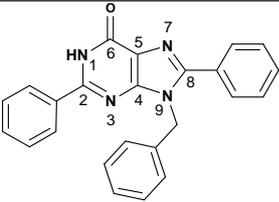
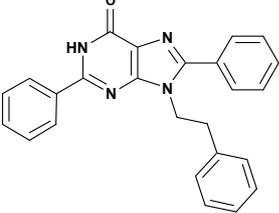
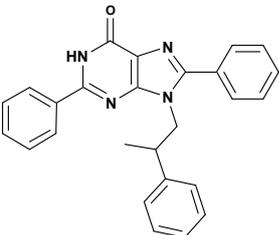
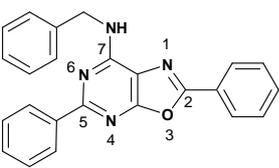
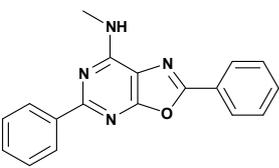
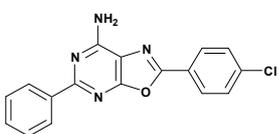
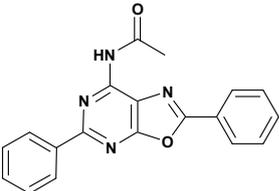
Affinität. Ein Methyl-Rest in Position N⁷ führt zu einem K_i-Wert im zweistelligen nanomolaren Bereich (**AB-90**, 58,5 nM), der durch einen Acetyl-Rest weiter verringert wird, was eine Erhöhung der Affinität nach sich zieht (**AB-92**, 6,00 nM).

Der K_i-Wert der Verbindung **AB-83** am humanen A_{2B}-Rezeptor konnte aufgrund der geringen Löslichkeit der Substanz bei Konzentrationen >

300 nM nicht ermittelt werden. Allerdings konnte die angegebene Inhibition von 74 ± 0 % bei einer eingesetzten Konzentration von 1 μM unter Verwendung des Radioliganden [³H]PSB-298³²⁰ bestätigt werden. Eine Konzentration von 100 nM der Verbindung **AB-83** inhibierten 43 ± 8 % des Radioliganden [³H]PSB-603.

Tab. 3-7. Übersicht über die Affinitäten von 2-Phenylpurin-6,8-dionen, 2,8-Diphenylpurin-6-dionen, 1,2,3-Triazolpyrimidinen und *N*⁷-substituierten Oxazolpyrimidinen und ausgewählter verwandter Verbindungen an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren (n=3).

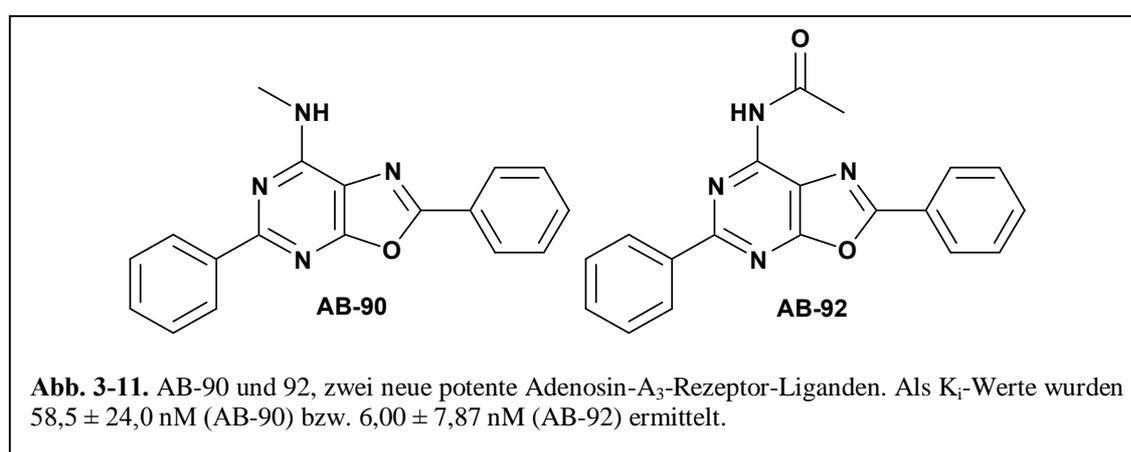
Verb. AB	Struktur	$K_i \pm \text{SEM} [\text{nM}]$ bzw. <i>Inhibition in % (Konzentration)</i>			
		A ₁ Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte [³ H]MSX-2	A _{2B} Mensch [³ H]PSB-298	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
2-Phenylpurin-6,8-dione und ausgewählte verwandte Verbindungen					
50 (104)		> 1000 4 ± 3 (1 μM)	> 10000 25 ± 3 (10 μM)	> 1000 11 ± 8 (10 μM)	> 10000 35 ± 8 (10 μM)
83 (113)		72,0 ± 5,0	9390 ± 1790	≥ 100 74 ± 0 (1 μM) [³ H]PSB-298 bzw. 43 ± 8 (100 nM) [³ H]PSB-603	536 ± 85
10 (111)		470 ± 90 (n=2)	> 10000 26 ± 5 (10 μM)	> 1000 26 ± 8 (1 μM)	≥ 10000 57 ± 13 (10 μM)
71 (123)		> 10000 27 ± 4 (10 μM)	> 10000 15 ± 16 (10 μM)	> 1000 27 ± 3 (1 μM)	252 ± 63
1,2,3-Triazolpyrimidine					
ABT1 (212)		730 ± 120	17300 ± 5200	> 1000 38 ± 9 (1 μM)	8410 ± 935
ABT1 (211)		7670 ± 1640	> 10000 40 ± 2 (10 μM)	> 1000 19 ± 3 (1 μM)	11900 ± 928

Verb. AB	Struktur	$K_i \pm \text{SEM [nM]}$ oder Inhibition in % (Konzentration)			
		A ₁ Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte [³ H]MSX-2	A _{2B} Mensch [³ H]PSB-298	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
2,8-Diphenylpurin-6-dione					
79 (180)		210 ± 40	> 10000 39 ± 5 (10 μM)	> 1000 14 ± 6 (10 μM)	≥ 10000 44 ± 8 (10 μM)
108 (215)		280 ± 20	> 10000 25 ± 4 (10 μM)	> 1000 17 ± 3 (10 μM)	838 ± 74
116 (162)		790 ± 70	> 10000 27 ± 2 (10 μM)	> 1000 27 ± 6 (1 μM)	21800 ± 4490
7-Amino-2,5-Diaryloxazolopyrimidine					
80 (219)		770 ± 190	> 10000 23 ± 9 (10 μM)	>> 1000 1 ± 5 (1 μM)	1610 ± 221
90 (217)		210 ± 20	42500 ± 13900	>> 1000 5 ± 1 (1 μM)	58,5 ± 24,0
91 (216)		>> 1000 5 ± 2 (1 μM)	> 10000 13 ± 4 (10 μM)	>> 1000 7 ± 7 (1 μM)	> 10000 43 ± 2 (10 μM)
92 (182)		130 ± 10	> 10000 38 ± 1 (10 μM)	> 1000 12 ± 9 (10 μM)	6,00 ± 7,87

Verb. AB	Struktur	$K_i \pm \text{SEM}$ [nM] oder Inhibition in % (Konzentration)			
		A ₁ Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte [³ H]MSX-2	A _{2B} Mensch [³ H]PSB-298	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
95 (220)		630 ± 130	> 10000 12 ± 4 (10 μM)	>> 1000 6 ± 2 (1 μM)	425 ± 7
102 (221)		1200 ± 170	> 10000 9 ± 4 (10 μM)	>> 1000 10 ± 1 (1 μM)	426 ± 127
114 (218)		100 ± 10	40700 ± 1160	> 1000 30 ± 4 (1 μM)	109 ± 20
117 (222)		480 ± 60	> 10000 11 ± 9 (10 μM)	>> 1000 5 ± 5 (1 μM)	137 ± 13
93 (183)		>> 1000 3 ± 5 (1 μM)	>> 10000 5 ± 9 (10 μM)	>> 1000 10 ± 5 (1 μM)	≥ 10000 46 ± 2 (10 μM)
104 (185)		> 10000 19 ± 3 (10 μM)	> 10000 17 ± 9 (10 μM)	> 1000 16 (n=1) (10 μM)	9200 ± 1150
118 (184)		> 10000 19 ± 3 (10 μM)	> 10000 14 ± 4 (10 μM)	>> 1000 5 ± 3 (1 μM)	6320 ± 1920

3.4.2. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Eine Reihe von Verbindungen, die in die folgenden Verbindungsklassen eingeteilt werden können – 2-Phenylpurin-6,8-dione, 1,2,3-Triazolpyrimidine, 2,8-Diphenylpurin-6-dione und 7-Amino-2,5-Diaryloxazolopyrimidine – wurden durch Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin-Rezeptoren untersucht. Dabei konnten zwei neue hochaffine Adenosin-A₃-Rezeptor-Liganden identifiziert werden: (2,5-Diphenyl-oxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-7-yl)methylamin (**AB-90**) und *N*-(2,5-Diphenyl-oxazolo[5,4-*d*]pyrimidin-7-yl)acetamid (**AB-92**), für die K_i-Werte von 58,5 ± 24,0 nM bzw. 6,00 ± 7,87 nM ermittelt wurden.



Gegenüber A₁-Rezeptoren besitzt **AB-90** eine 4-fache und gegenüber A_{2A}- bzw. A_{2B}-Rezeptoren eine 730-fache bzw. >17-fache Selektivität. **AB-92** weist eine 43-fache Selektivität gegenüber A₁-Rezeptoren, eine >1700-fache gegenüber A_{2A}- und eine >170-fache gegenüber A_{2B}-Rezeptoren auf.

Um die intrinsische Aktivität dieser Substanzen zu bestimmen, sollten diese Substanzen in funktionellen [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien mit CHO-Zellen, die den humanen Adenosin-A₃-Rezeptoren rekombinant exprimieren, weiter charakterisiert werden.

Ferner wurden die Verbindungen **AB-90** und **92** von Dr. Meryem Köse in einem Adenosinkinase-Assay untersucht. **AB-92** zeigte dabei einen inhibierenden Effekt auf die Adenosinkinase (IC₅₀ = 25,2 ± 6,6 μM), **AB-90** besaß hingegen keinen Einfluss auf dieses Enzym.

4. EVALUIERUNG VON ADENOSIN-A₁-REZEPTOR-AGONISTEN FÜR DEN EINSATZ IN DER POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE (PET)

4.1. EINLEITUNG

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und auch die Single-Photonen-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT) sind zwei computer-tomographische Verfahren, mit denen die dreidimensionale Darstellung der regionalen und zeitlichen Verteilung von Radiopharmaka im Körper möglich ist. Diese moderne molekulare Bildgebung bedient sich der Hilfe von radioaktiv markierten Tracern.^{321, 322}

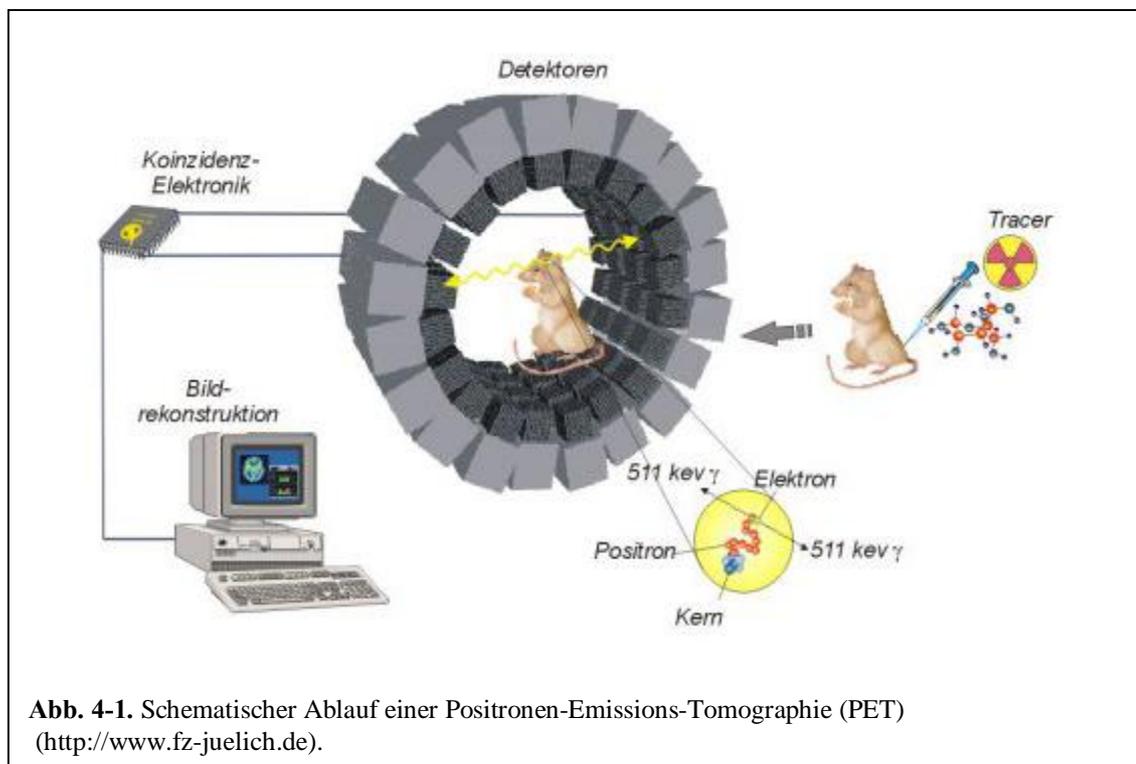


Abb. 4-1. Schematischer Ablauf einer Positronen-Emissions-Tomographie (PET) (<http://www.fz-juelich.de>).

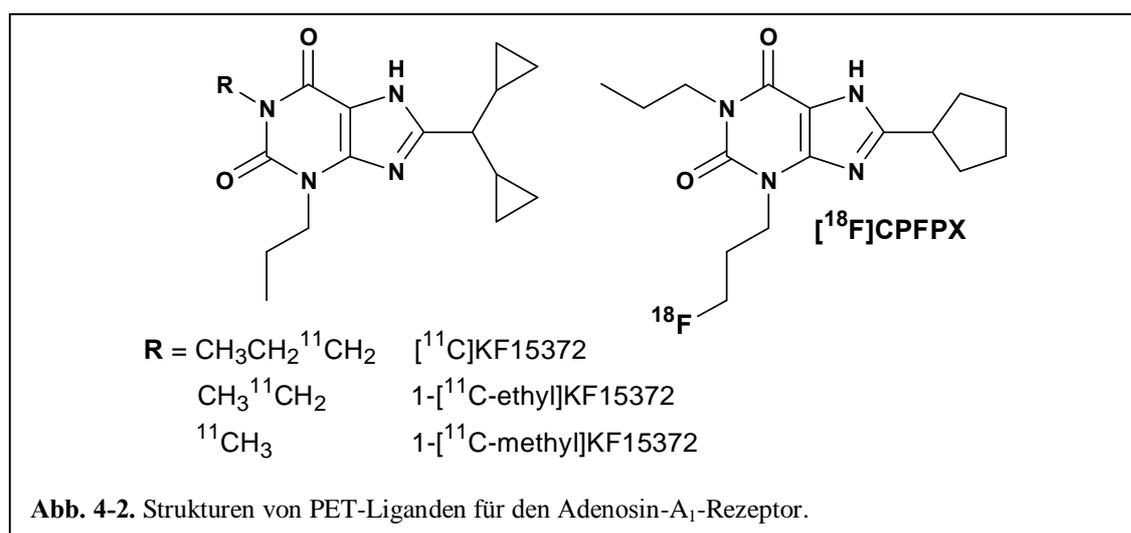
Während einer PET-Untersuchung wird dem Patienten zunächst das Radiopharmakon per Injektion oder Inhalation verabreicht. Anschließend muss er eine gewisse Zeit ruhen, damit der Tracer genügend Zeit hat, sich an den relevanten Stellen im Körper anzureichern. Dann wird der Patient in einem PET-Gerät mit einem beweglichen Tisch positioniert. Die Projektionsdaten erhält man mit Hilfe eines Ringes einzelner Detektoren oder mit um den Patienten rotierenden Gammakameras (schematische Darstellung, siehe Abb. 4-1).

Während die SPECT einfache Gamma-Strahler (*single photon emitter*) verwendet, eignen sich für die PET Radionuklide, die beim Zerfall Positronen emittieren (β^+ -Zerfall). Das meist

verwendete Nuklid in der Positronen-Emissions-Tomographie ist ein radioaktives Isotop des Fluors (¹⁸F), welches eine Halbwertszeit von ca. 110 Minuten aufweist. Neben dem ¹⁸F werden hauptsächlich ¹¹C, ¹³N und ¹⁵O als Radionuklide verwendet, die allerdings kürzere Halbwertszeiten besitzen.^{252, 322}

Aufgrund seines Zerfalls kann das Radionuklid im Körper detektiert werden. Trifft nun ein durch Zerfall des Radionuklides entstandenes Positron auf ein Elektron, so werden beide vernichtet, was als Annihilation bezeichnet wird. Es entstehen zwei hochenergetische Photonen (γ -Strahlung) mit einer Energie von exakt 511 keV, die sich in einem Winkel von knapp 180° voneinander entfernen. Diese Vernichtungsstrahlung trifft gleichzeitig (koinzident) auf zwei Detektoren, was Nachweis und Ortsbestimmung der Positronenemission ermöglicht. Werden zwei γ -Quanten einer Energie von 511 keV innerhalb eines bestimmten Zeitfensters (4,5 bis 15 ns) nachgewiesen, so wird dies als Positron-Elektron-Vernichtung zwischen den signalgebenden Detektoren interpretiert.³²¹

In Kapitel 3 wurde bereits die klinische Bedeutung von Adenosin-Rezeptoren ausführlich diskutiert. Dies macht sie, insbesondere die Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptorsubtypen, im Hinblick auf die Positronen-Emissions-Tomographie zu attraktiven *Targets*. Die selektiven Adenosin-Rezeptor-Liganden, die bisher als PET-Liganden untersucht wurden, sind ausschließlich Antagonisten und sie sind bis auf eine Ausnahme mit dem radioaktiven Isotop des Kohlenstoffs (¹¹C) markiert. Diese Ausnahme stellt das CFPFX dar, für dessen Markierung das Nuklid ¹⁸F verwendet wurde (siehe Abb. 4-2).²⁵²



Neben dem [¹⁸F]CFPFX (8-Cyclopentyl-3-(3-[¹⁸F]fluoropropyl)-1-propylxanthin) war das [¹¹C]KF15372 – 8-Dicyclopropylmethyl-1-(1-[¹¹C]-propyl)-3-propylxanthin – einer der ersten A₁-Antagonisten, der in der PET eingesetzt wurde.^{323, 324} Von dieser Substanz ausgehend

wurden weitere Derivate, wie das 1-[¹¹C-ethyl]KF15372 und das 1-[¹¹C-methyl]KF15372, entwickelt (siehe Abb. 4-2).³²³

Da bisher nur Adenosin-Rezeptor-Antagonisten in der PET eingesetzt werden, wurden im Rahmen dieses Projektes 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin-Derivate von Herrn Dr. H. Phuoc Le in unserem Arbeitskreis synthetisiert, die später – radioaktiv markiert mit ¹⁸F – als A₁-Agonisten in der PET-Diagnostik Verwendung finden sollen. Dabei war es von großer Bedeutung, dass die Fluorierung erst in den letzten beiden Synthese-Schritten erfolgte, da ¹⁸F nur eine Halbwertszeit von 110 Minuten aufweist. Zur Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen wurde eine Reihe von Adenosin-Derivaten hergestellt, die sich durch das Substitutionsmuster in der Position N⁶ oder am C5' unterscheiden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Modifikation (Einführung eines Fluoratoms bzw. einer Methoxy-Gruppe am C5' von Adenosin-Derivaten) toleriert wird, ohne die A₁-Rezeptor-Affinität und -Selektivität der Verbindungen zu beeinträchtigen. Darüber hinaus sollte der Agonismus erhalten bleiben, da ein agonistischer PET-Ligand eine selektive Markierung funktioneller Rezeptoren ermöglicht, im Gegensatz zu antagonistischen Liganden, welche alle Rezeptorkonformationen markieren. Nukleosid-Derivate dürften des Weiteren eine wesentlich geringere unspezifische Bindung besitzen, als die lipophilen Antagonisten. Da sie zudem wesentlich besser wasserlöslich sind, sollten sie leichter applizierbar sein. Die meisten PET-Liganden für Adenosin-Rezeptoren erwiesen sich bisher als ungeeignet für einen breiten Einsatz am Menschen aufgrund ihrer hohen unspezifischen Bindung.²⁵²

4.2. KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN-A₁-, A_{2A}- UND A₃-REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN

In Tab. 4-1a und b sind die Strukturen der getesteten Verbindungen sowie die Ergebnisse aus kompetitiven Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Ratten-Adenosin-A₁ und A_{2A}-Rezeptoren und humanen A₃-Rezeptoren dargestellt. Abb. 4-3 zeigt beispielhaft die Inhibitionskurven der potentesten Verbindungen. Analog zu Kapitel 3.2. und 3.3.1. wurden die A₁-Bindungsstudien mit dem Radioliganden [³H]CCPA, die A_{2A}-Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 und die A₃-Bindungsstudien mit dem Radioliganden [³H]PSB-11 durchgeführt.

Die Konkurrenzexperimente mit den N⁶-substituierten 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin-Derivaten haben ergeben, dass ein Cyclobutyl-Rest in Position N⁶ zu hochaffinen Adenosin-A₁-Rezeptor-

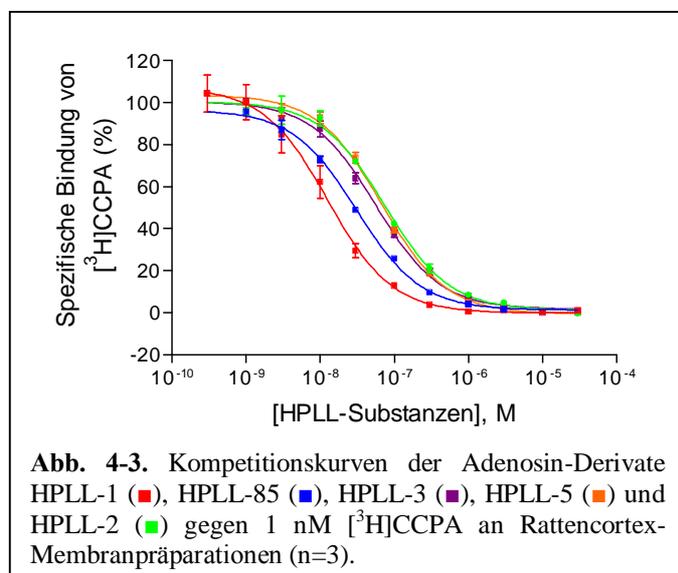


Abb. 4-3. Kompetitionskurven der Adenosin-Derivate HPLL-1 (■), HPLL-85 (■), HPLL-3 (■), HPLL-5 (■) und HPLL-2 (■) gegen 1 nM [³H]CCPA an Rattencortex-Membranpräparationen (n=3).

Liganden führt. Die Verbindung **HPLL-85** weist einen K_i-Wert im niedrigen nanomolaren Bereich (5,63 ± 0,66 nM) auf und besitzt eine mehr als 1700-fache Selektivität gegenüber A_{2A}-Rezeptoren und eine mehr als 280-fache gegenüber dem A₃-Subtyp. Die Affinität zum A₁-Rezeptor kann durch den Austausch des Cyclobutyl-Restes gegen den voluminöseren Cyclopentyl-Rest noch weiter gesteigert werden.

HPLL-1 zeichnet sich mit einem K_i-Wert von 1,55 ± 0,15 nM zum A₁-Rezeptor als die potenteste Verbindung der vorliegenden Verbindungsreihe aus. Neben der Affinität konnte auch die Selektivität zum A_{2A}-Rezeptor (>6400-fach) und zum A₃-Rezeptor (>1400-fach) verbessert werden. Vergleicht man diese Verbindung nun mit dem N⁶-Cyclopentyladenosin (**CPA**), das einen K_i-Wert von 5,07 nM³¹², 5,90 nM³¹¹ bzw. 2,3 nM¹⁴⁹ an humanen Adenosin-A₁-Rezeptoren besitzt, so wird deutlich, dass die Substitution der Hydroxy-Gruppe in Position 5' sehr gut toleriert wird und nur geringe Auswirkungen auf die Affinität besitzt.

Die Substitution des Cyclopentyl-Ringes durch einen größeren Cyclohexyl-Ring (**HPLL-2**) oder ein bicyclisches Ringsystem, wie dem Norbornyl-Rest (**HPLL-5**), resultiert in einer Verringerung der Aktivität zum A₁-Rezeptor, die auch teilweise mit einer Verringerung der Selektivität einhergeht. Im Falle von N⁶-Cyclohexyladenosin (**CHA**), das einen K_i-Wert von 0,85 nM¹⁴⁹ an Ratten-Adenosin-A₁-Rezeptoren aufweist, kommt es durch die Substitution der

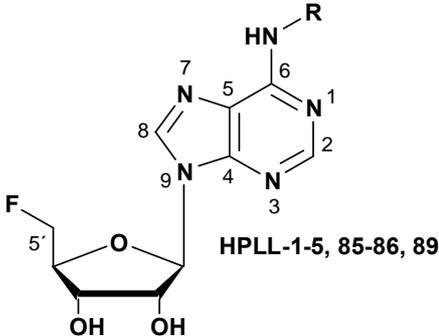
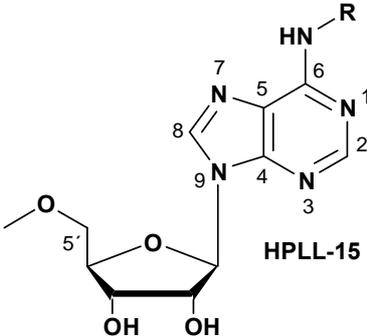
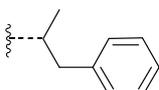
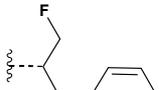
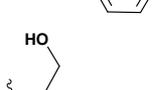
5'-Hydroxygruppe zu einem leichten Affinitätsabfall (K_i -Wert: $12,3 \pm 0,8$ nM). Konkurrenzexperimente der Verbindungen **HPLL-1**, **2** und **5** an humanen Adenosin-A₁-Rezeptoren lieferten K_i -Werte in der gleichen Größenordnung wie an Rattencortex, allerdings haben diese Verbindungen eine ca. 3-fach höhere Affinität zu Ratten- als zu humanen Adenosin-A₁-Rezeptoren.

Betrachtet man nun das 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin-Derivat mit einem 1-Methyl-2-phenylethyl-Rest in Position N^6 (**HPLL-3**), so lässt sich dessen Affinität mit einem K_i -Wert von $8,45 \pm 1,52$ nM zum Adenosin-A₁-Rezeptor zwischen der des N^6 -Cyclobutyl- und des N^6 -Cyclohexylsubstituierten Fluoradenosin-Derivat einordnen. Die Verlängerung der Alkylkette bei gleichzeitiger Einführung eines Fluor-Substituenten und einer Hydroxy-Gruppe zum 1-Fluormethyl-2-phenylethyl- bzw. 1-Hydroxymethyl-2-phenylethyl-Derivat (**HPLL-86** und **89**) führt zu einem Wirkungsabfall, wobei die Hydroxy-Gruppe im Vergleich zum Fluor schlechter toleriert wird. Das Schlusslicht dieser Substanzreihe bildet das Fluoradenosin-Derivat mit einer Adamantyl-Gruppe in Position N^6 , wobei es mit einem K_i -Wert von $53,4 \pm 4,9$ nM aber immer noch zu den hochaffinen Verbindungen gehört (**HPLL-4**).

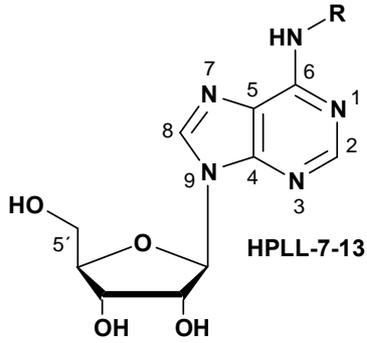
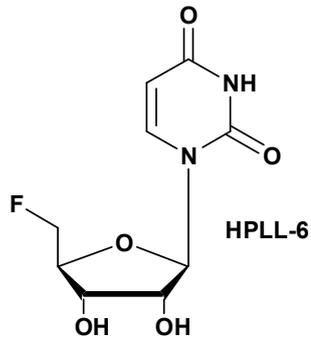
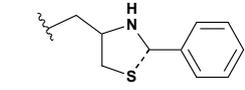
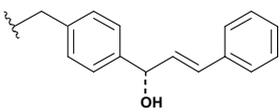
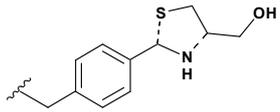
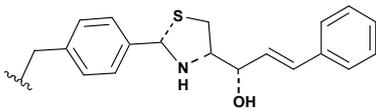
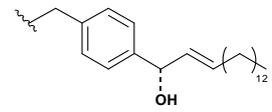
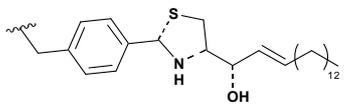
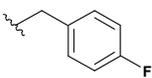
Der Austausch des Fluor-Substituenten in Position 5' durch eine Methoxy-Gruppe geht mit einem fast 100-fachen Aktivitätsverlust am A₁-Rezeptor einher (vgl. **HPLL-15** und **HPLL-5**).

Eine weitere Serie von Verbindungen setzt sich aus Adenosin-Derivaten zusammen, die sich durch das Substitutionsmuster in Position N^6 unterscheiden. Die potenteste Verbindung dieser Substanzreihe am Adenosin-A₁-Rezeptor stellt **HPLL-13** dar, das am N^6 einen 4-Fluorbenzyl-Rest trägt (K_i -Wert: $67,7 \pm 13,0$ nM). Eine Vergrößerung dieses Restes zum 4-(1-Hydroxy-3-phenylprop-2-enyl)benzyl-Rest führt zu einer Verbindung mit einem ähnlichen K_i -Wert (**HPLL-8**). Die Substitution des endständigen Phenyl-Restes dieser Verbindung durch einen Dodecyl-Rest führt hingegen zu einem vollständigen Wirkungsverlust an allen untersuchten Rezeptorsubtypen (**HPLL-11**). Führt man zwischen dem Phenyl-Rest, der über eine Ethylenbrücke mit der N^6 -Position des Adenosins verbunden ist, und dem Dodecyl-Rest einen Spacer in Form eines Thiazolidin-Ringes ein, so wird eine moderate Affinität dieser Substanz zum A₁-Rezeptor erreicht (**HPLL-12**). Eine sukzessive Verkleinerung dieses voluminösen Restes über einen 4-[4-(1-Hydroxy-3-phenylprop-2-enyl)thiazolidin-2-yl]benzyl-Rest (**HPLL-10**) zum 4-(4-Hydroxymethylthiazolidin-2-yl)benzyl-Rest (**HPLL-9**) führt zu einer Wirkungssteigerung dieser Verbindung zum Adenosin-A₁-Rezeptor. Werden die Positionen des Phenyl- und des Thiazolidin-Restes vertauscht, so kann die Bindungsneigung weiter gesteigert werden (**HPLL-7**).

Tab. 4-1a. Affinitäten verschiedener 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin-Derivate an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren (n=3).

Verb. HPLL	R	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
		A ₁ Ratte (Mensch) [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte (Mensch) [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
	 HPLL-1-5, 85-86, 89			
	 HPLL-15			
85		5,63 ± 0,66	> 10000 35 ± 7 (10 μM)	1580 ± 516
1		1,55 ± 0,15 5,59 ± 0,50	> 10000 24 ± 10 (10 μM) 32 ± 1 (10 μM)	2270 ± 485
2		12,3 ± 0,8 34,3 ± 2,9	≥ 10000 47 ± 2 (10 μM) 20 ± 10 (10 μM)	3880 ± 776
5		11,6 ± 0,5 38,9 ± 6,4	>> 10000 -7 ± 7 (10 μM) 6 ± 8 (10 μM)	> 10000 36 ± 4 (10 μM)
4		53,4 ± 4,9	>> 10000 -1 ± 5 (10 μM)	> 10000 22 ± 4 (10 μM)
3		8,45 ± 1,52	7300 (n=1)	204 ± 68
86		22,1 ± 1,8	> 10000 22 ± 2 (10 μM)	10400 ± 2020
89		53,0 ± 3,4	> 10000 15 ± 5 (10 μM)	≥ 10000 42 ± 3 (10 μM)
15		1140 ± 242	> 10000 13 ± 14 (10 μM)	11000 ± 3180
	CPA ¹⁴⁹	0,32 (2,3)	510 (790)	26
	CHA ¹⁴⁹	0,85	460	176

Tab. 4-1b. Affinitäten verschiedener, substituierter N⁶-Adenosin-Derivate an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren (n=3).

Verb. HPLL	R	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)		
		A ₁ Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte [³ H]MSX-2	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
	 HPLL-7-13			
	 HPLL-6			
7		117 ± 6	> 10000 39 ± 4 (10 μM)	> 10000 30 ± 4 (10 μM)
8		69,7 ± 11,6	1370 ± 73	1760 ± 423
9		169 ± 10	>> 10000 2 ± 10 (10 μM)	>> 10000 7 ± 9 (10 μM)
10		431 ± 24	>> 10000 -3 ± 9 (10 μM)	>> 10000 8 ± 5 (10 μM)
11		>> 10000 -1 ± 3 (1 μM)	>> 10000 -1 ± 4 (10 μM)	> 10000 12 ± 6 (10 μM)
12		643 ± 88	> 10000 30 ± 6 (10 μM)	> 10000 17 ± 12 (10 μM)
13		68 ± 13	4310 ± 382	7390 ± 1680
6	Struktur siehe oben	>> 10000 8 ± 6 (1 μM)	>> 10000 -5 ± 4 (10 μM)	>> 10000 9 ± 6 (10 μM)
	Adenosin ³²⁵	310 ^a	730 ^a	290 ^a

^aEC₅₀-Werte aus cAMP-Studien an CHO-Zellen, die mit Adenosin-Rezeptoren stabil transfiziert waren.

4.3. GTP-SHIFT- UND AGONIST-SHIFT-EXPERIMENTE AN RATTEN-ADENOSIN-A₁-REZEPTOREN

Neben dem Natrium-Shift-Experiment, auf welches im Kapitel 3.2.2. bereits eingegangen worden ist, ist der GTP-Shift ebenso eine Methode, die eine Unterscheidung zwischen agonistisch und antagonistisch wirkenden Liganden ermöglicht. Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit dem A₁-selektiven Antagonist-Radioliganden [³H]DPCPX zeigten, dass GTP-Shift Experimente an den G_i-gekoppelten Adenosin-A₁-Rezeptoren eine Aussage über die intrinsische Aktivität zulassen, während dieses Phänomen allerdings nicht an G_s-gekoppelten A_{2A}-Adenosin-Rezeptoren beobachtet werden konnte.^{169, 263, 264} In Analogie zum Natrium-Shift kann für Agonisten eine Rechtsverschiebung, für neutrale Antagonisten keine Veränderung und für inverse Agonisten eine Linksverschiebung beobachtet werden. Im Gegensatz zu neutralen Antagonisten können Agonisten zwischen mindestens zwei Rezeptorkonformationen – dem hochaffinen G-Protein-gekoppelten Zustand und einen niedrigaffinen ungekoppelten Zustand – unterscheiden.²⁶² GTP führt normalerweise zur Entkopplung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors von seinem G-Protein. Somit wird das Konformationsgleichgewicht vom hochaffinen zum niedrigaffinen Zustand verschoben. Der GTP-Shift definiert sich dabei als das Verhältnis der IC₅₀-Werte in Anwesenheit und in Abwesenheit von 100 μM GTP.

Die GTP-Shift-Experimente wurden mit den Verbindungen **HPLL-1, 2** und **5** und der Referenzsubstanz **CPA**, einem Voll-Agonisten am Adenosin-A₁-Rezeptor, an einer Rattencortex-Membranpräparation durchgeführt. 70 μg der Membranpräparation wurden mit 0,2 nM [³H]DPCPX und verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen – jeweils in An- und Abwesenheit von 100 μM GTP – für 90 min unter den in Kapitel 9.7.2. beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 μM DPCPX bestimmt.

Tab. 4-2. IC₅₀-Werte und GTP-Shifts der Verbindungen HPLL-1, 2 und 5 und der Referenzsubstanz CPA am Ratten-Adenosin-A₁-Rezeptor in An- und Abwesenheit von 100 μM GTP (n=3).

Verb. HPLL	IC₅₀ ± SEM [nM]		GTP-Shift ± SEM
	- 100 μM GTP	+ 100 μM GTP	
1	40,9 ± 8,0	881 ± 7***	23,3 ± 4,2^{ns}
2	196 ± 15	6120 ± 442***	31,5 ± 2,3^{ns}
5	191 ± 22	4120 ± 134***	22,2 ± 2,8^{ns}
CPA	3,78 ± 0,70	102 ± 6***	28,4 ± 4,5

*** (P < 0,001) vs. IC₅₀-Wert – 100 μM GTP; ns (P > 0,05) vs. GTP-Shift CPA

Die Konkurrenzkurven der Verbindungen **HPLL-1, 2** und **5** und der Referenzsubstanz **CPA** jeweils mit und ohne GTP-Zusatz sind in Abb. 4-4 dargestellt und die Ergebnisse in Tab. 4-2 zusammengefasst.

Die Kurven von **HPLL-1, 2** und **5** sowie die der Referenzsubstanz **CPA** erfahren im GTP-Shift-Experiment eine Verschiebung nach rechts, d.h. zu niedrigerer Affinität. Die IC₅₀-Werte der getesteten Verbindungen erhöhen sich unter dem Einfluss von 100 µM GTP und unterliegen einer statistisch signifikanten Veränderung (***, P < 0,001). Die Werte für die Referenzsubstanz **CPA** liegen in guter Übereinstimmung mit den früher in unserem Arbeitskreis durchgeführten GTP-Shift-Experimenten (IC₅₀ - 100 µM GTP: 5 nM, IC₅₀ + 100 µM GTP: 125 nM, GTP-Shift: 22,8).³²⁶

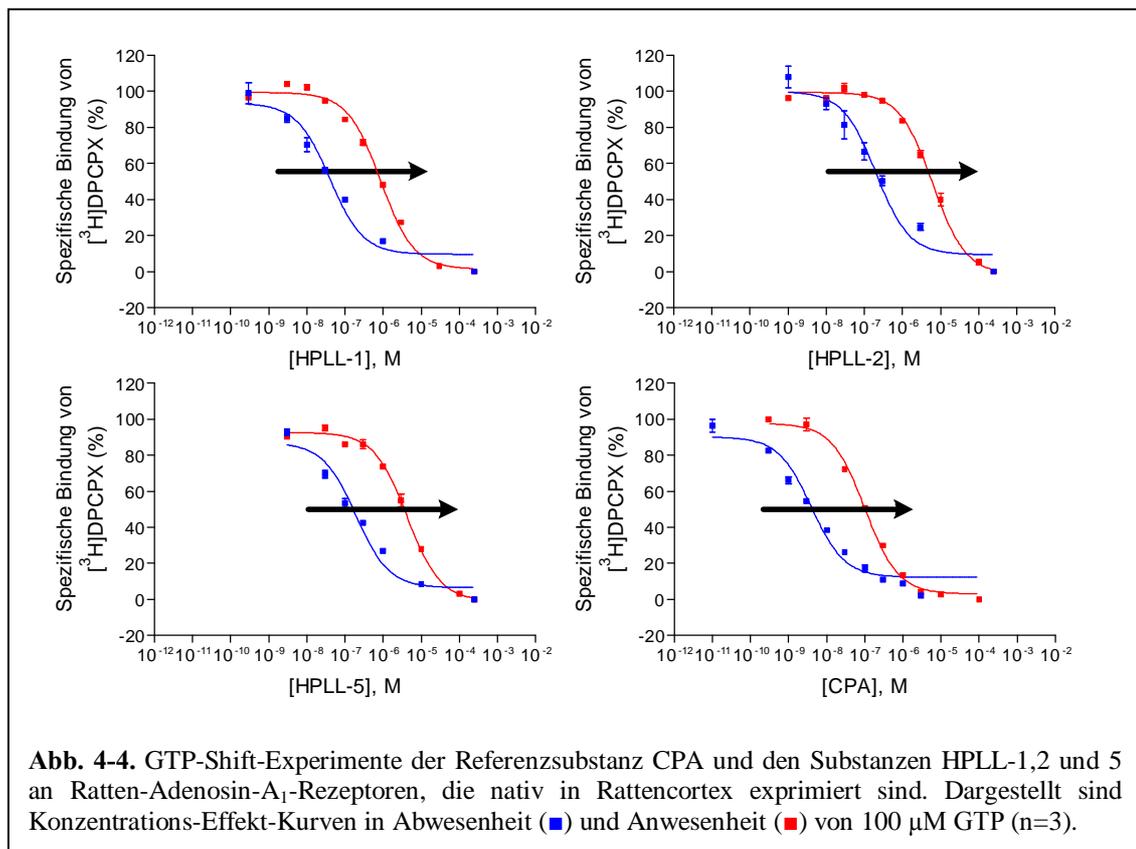


Abb. 4-4. GTP-Shift-Experimente der Referenzsubstanz CPA und den Substanzen HPLL-1,2 und 5 an Ratten-Adenosin-A₁-Rezeptoren, die nativ in Rattencortex exprimiert sind. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven in Abwesenheit (■) und Anwesenheit (■) von 100 µM GTP (n=3).

Die beobachtete Rechtsverschiebung und der berechnete GTP-Shift im Vergleich zu dem Voll-Agonisten **CPA** deuten darauf hin, dass es sich bei den Verbindungen **HPLL1, 2** und **5** ebenfalls um Voll-Agonisten handelt.

Im Vergleich zu Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit dem agonistischen Radioliganden [³H]CCPA nehmen in Bindungsstudien mit dem Antagonisten [³H]DPCPX die IC₅₀-Werte der untersuchten Substanzen zu. Wie bereits in Kap. 3.3. erwähnt, verändern sich die K_i-Werte von

Antagonisten in Bindungsstudien mit einem antagonistischen Radioliganden im Vergleich zu Bindungsstudien, in denen ein agonistischer Radioligand verwendet wurde, nicht. Agonisten hingegen erfahren einen „Agonist-Shift“,¹⁶⁹ welcher sich dabei als das Verhältnis der K_i-Werte aus Bindungsstudien mit dem antagonistischen und dem agonistischen Radioliganden definiert. In Tab. 4-3 sind die K_i-Werte der Verbindungen **HPLL-1, 2** und **5** aus Radioligand-Bindungsstudien mit dem tritiierten, A₁-selektiven Agonisten [³H]CCPA und dem Antagonisten [³H]DPCPX dargestellt.

Tab. 4-3. K_i-Werte und Agonist-Shifts der Verbindungen HPLL-1, 2 und 5 aus Radioligand-Bindungsstudien mit dem A₁-selektiven Agonisten [³H]CCPA und dem A₁-selektiven Antagonisten [³H]DPCPX an Ratten-Adenosin-A₁-Rezeptoren (n=3).

Verbdg. HPLL	K_i ± SEM [nM]		Agonist-Shift
	[³ H]CCPA	[³ H]DPCPX	
1	1,55 ± 0,15	16,8 ± 3,3**	10,8
2	12,3 ± 0,8	80,5 ± 6,3***	6,5
5	11,6 ± 0,5	78,6 ± 9,2**	6,8

*** (P < 0,001) bzw. ** (0,001 < P < 0,01) vs. K_i-Wert ([³H]CCPA)

Während in Bindungsstudien mit Adenosin-A_{2A}-Agonisten Agonist-Shifts von 3-7 ermittelt wurden,¹⁶⁹ zeigten die A₁-Agonisten **HPLL-1, 2** und **5** etwas höhere Shifte (7-11). Somit können diese Verbindungen nicht nur in GTP-Shift-Experimenten, sondern auch durch den „Agonist“-Shift als A₁-Liganden mit agonistischen Eigenschaften charakterisiert werden.

Die Kompetitionskurven der Verbindungen **HPLL-1, 2** und **5** sowie **CPA** zeigen beim Einsatz eines antagonistischen Radioliganden einen typischen biphasischen Kurvenverlauf,³²⁷ der nach GTP-Zusatz monophasisch wird. Eine genauere Auswertung hat ergeben, dass sich für diese Verbindungen zwei IC₅₀-Werte ermitteln lassen, die sich um den Faktor 40-80 voneinander unterscheiden (siehe Tab. 4-4).

Tab. 4-4. Hochaffine und niedrigaffine IC₅₀-Werte aus dem biphasischen Kurvenverlauf der Substanzen HPLL1, 2 und 5 und der Referenzsubstanz CPA an Ratten-Adenosin-A₁-Rezeptoren (n=3).

Verb. (HPLL)	IC₅₀ ± SEM [nM]	
	IC₅₀-Wert (hochaffin)	IC₅₀-Wert (niedrigaffin)
1	7,69 ± 1,47 (51,2 ± 5,6 %)	422 ± 170 (48,8 ± 5,6 %)
2	39,3 ± 12,0 (53,5 ± 2,0 %)	2830 ± 434 (46,5 ± 2,0 %)
5	29,1 ± 5,3 (55,2 ± 1,3 %)	1440 ± 83,3 (44,8 ± 1,3 %)
CPA	1,59 ± 0,67 (67,1 ± 6,2 %)	67,5 ± 24,8 (32,9 ± 6,2 %)

4.4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Eine Serie von Adenosin- und 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin-Derivaten, deren Substitutionsmuster in der Position N⁶ variiert worden ist, wurde in Konkurrenzexperimenten an Adenosin-Rezeptoren untersucht.

Die Verbindung N⁶-Cyclopentyl-5'-fluor-5'-desoxyadenosin (**HPLL-1**) wurde als neuer potenter und selektiver Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonist charakterisiert. Derivate, die in der Position N⁶ statt des Cyclopentyl-Restes einen Cyclobutyl-, Norbornyl- oder Cyclohexyl-Rest aufwiesen, zeigten ebenfalls hohe Affinitäten zum A₁-Rezeptor-Subtyp (**HPLL-2, 5** und **85**). In GTP-Shift-Experimenten zeigten die Inhibitionskurven der Verbindungen **HPLL-1, 2** und **5** analog zur Referenzsubstanz **CPA** eine signifikante

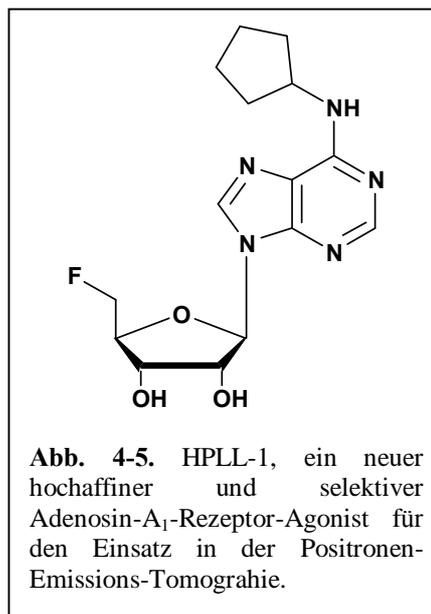


Abb. 4-5. HPLL-1, ein neuer hochaffiner und selektiver Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonist für den Einsatz in der Positronen-Emissions-Tomographie.

Rechtsverschiebung, so dass diese Verbindungen als Voll-Agonisten am A₁-Rezeptor charakterisiert werden konnten. Die Bestimmung des Agonist-Shifts bestätigte dieses Ergebnis.

HPLL-1 besitzt mit einem K_i-Wert von 1,55 ± 0,15 nM zum A₁-Rezeptor und einer ausgeprägten Selektivität zum A_{2A}-Rezeptor (>6400-fach) und zum A₃-Rezeptor (>1400-fach) gute Voraussetzungen für einen Einsatz in der Positronen-Emissions-Tomographie. Diese Verbindung wird zurzeit im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem Radionuklid ¹⁸F markiert.

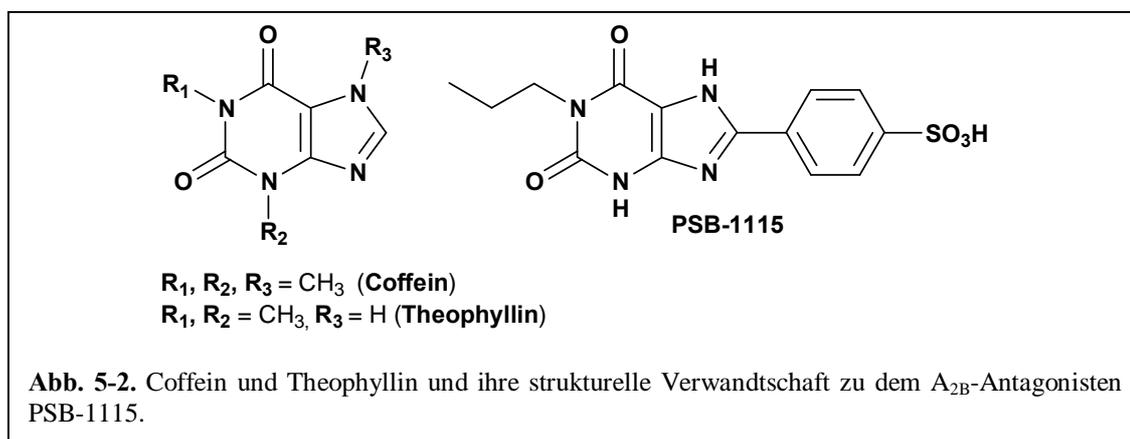
Da bisher nur Adenosin-Rezeptor-Antagonisten in der PET verwendet werden,²⁵² würde die Verbindung N⁶-Cyclopentyl-[¹⁸F]-5'-fluor-5'-desoxyadenosin den ersten selektiven A₁-Agonisten darstellen, der in der PET zum Einsatz kommen könnte. Dieser neue PET-Ligand könnte Verwendung in der medizinischen Diagnostik z.B. bei kardiologischen oder ZNS-Erkrankungen, bei denen Adenosin-A₁-Rezeptoren eine Rolle spielen,^{162, 254} finden, aber auch als pharmakologisches Werkzeug in der Forschung.³²⁸ Da sehr geringe subtherapeutische Dosen zum Einsatz kommen, ist nicht mit Komplikationen durch pharmakologische Effekte durch den A₁-Agonist-PET-Liganden zu rechnen.

beeinflussen.³³⁰

Da der BODIPY-Fluorophor viele der oben genannten erwünschten Eigenschaften, z.B. Photostabilität, Absorption bei hohen Wellenlängen (keine Störung durch Autofluoreszenz der Zellen) und kleine Molmasse (geringes Volumen) in sich vereinigt, wurde er im Rahmen dieses Projektes für die Fluoreszenzmarkierung von Adenosin-A₁- und A_{2B}-Rezeptor-Liganden ausgewählt.^{331, 332}

5.2. CHARAKTERISIERUNG VON FLUORESCENZMARKIERTEN XANTHIN-DERIVATEN ALS ADENOSIN-A_{2B}-REZEPTOR-LIGANDEN

Die natürlich vorkommenden Xanthin-Derivate Theophyllin und Coffein zeigen antagonistische Wirkung am Adenosin-A_{2B}-Rezeptor.^{159,333} Durch die sukzessive strukturelle Veränderung dieser Leitstrukturen, wurden hochaffine und hochselektive Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Liganden, wie z.B. PSB-1115, erhalten, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung von fluoreszenzmarkierten A_{2B}-Rezeptor-Liganden darstellen (siehe Abb. 5-2.).^{159, 331, 334, 335}

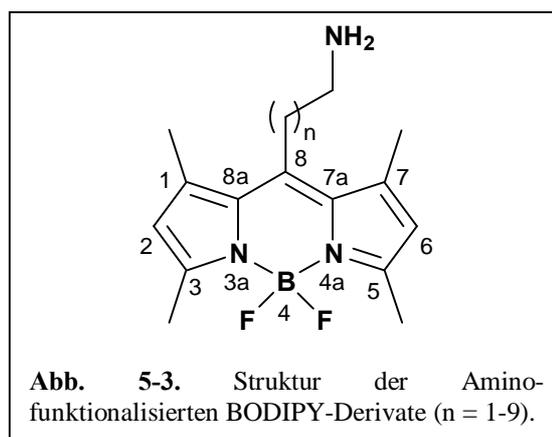


Die im Rahmen dieses Projektes untersuchte Reihe von fluoreszenzmarkierten potentiellen Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Liganden wurde von Herrn Dr. Fabian Heisig in unserem Arbeitskreis synthetisiert, dessen Arbeit auf der Dissertation von Herrn Dr. Sven-Jan Freudenthal aufbaut.³³⁶

Dieser veröffentlichte im Jahre 2002 die Synthese eines fluoreszenzmarkierten Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Liganden, der mit einem K_i-Wert von 20,5 nM zwar eine hohe Affinität, aber nur eine geringe Selektivität zum A_{2B}-Rezeptor aufwies.³³⁷

Ausgehend von PSB-1115 wurden weitere selektive A_{2B}-Rezeptor-Antagonisten synthetisiert,^{335, 338} die als Ausgangs-

substanzen dienen sollten. Die Modellsubstanzen wurden anschließend mit Aminofunktionalisierten BODIPY-Derivaten unterschiedlicher Kettenlänge gekoppelt (siehe Abb. 5-3), um davon ausgehend die optimale Kettenlänge im Hinblick auf Affinität und Selektivität zu ermitteln.³³¹



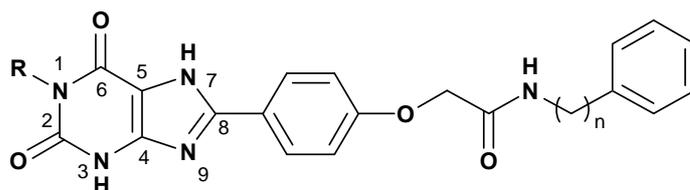
Analog zu den vorhergehenden Kapiteln wurden die Kompetitionsexperimente an humanen und

Ratten-Adenosin-Rezeptoren mit dem radioaktiv markiertem A₁-Liganden [³H]CCPA, die A_{2A}-Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 und die A₃-Bindungsstudien mit dem Radioliganden [³H]PSB-11 durchgeführt. Für die Konkurrenzexperimente am humanen A_{2B}-Rezeptor wurde der neuentwickelte A_{2B}-selektive Radioligand [³H]PSB-603 eingesetzt,³¹⁹ der mit einem K_D-Wert von 0,41 nM eine hohe Affinität zu humanen A_{2B}-Rezeptoren, die rekombinant in CHO-Zellen exprimiert wurden, aufweist.

5.2.1. KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN-A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- UND A₃-REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN

Die Strukturen der untersuchten Alkylxanthin-Derivate sowie die Ergebnisse aus kompetitiven Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien sind in Tab. 5-1 und 5-2 zusammenfassend dargestellt. Zunächst sollten nicht-fluoreszierende Modellsubstanzen untersucht werden (siehe Tab. 5-1). Diese Substanzen besitzen in der Position 1 einen Propyl- bzw. Butyl-Substituenten, welcher die Affinität zum A_{2B}-Subtypen Im Vergleich zu Theophyllin erhöhen soll.³³⁴ Die Einführung eines Phenyl-Restes in Position 8 führt zu einer weiteren Affinitätssteigerung.³³⁵ Ein polarer Substituent in *para*-Position des Phenyl-Ringes in Position 8 geht zwar mit einer geringfügigen Verringerung der Affinität einher, jedoch wird die Selektivität zum A_{2B}-Rezeptor erhöht.^{333, 335}

Tab. 5-1. Affinitäten verschiedener Modellsubstanzen für die Fluoreszenzmarkierung an Adenosin-Rezeptor-Subtypen (n=3).



Verb. FH	R	n	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)			
			A ₁ Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte [³ H]MSX-2	A _{2B} Mensch [³ H]PSB-603	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
104 (92)	Propyl	1	27,2 ± 4,1	≥ 10000 46 ± 4 (10 μM)	7,00 ± 1,39	266 ± 61
100 (93)	Propyl	2	7,85 ± 2,46	> 10000 33 ± 1 (10 μM)	7,45 ± 2,43	≥ 10000 46 ± 2 (10 μM)
99 (94)	Propyl	3	35,3 ± 5,7	> 10000 38 ± 3 (10 μM)	27,9 ± 9,1	2990 ± 438
98 (95)	Propyl	4	29,6 ± 4,0	498 ± 132	3,30 ± 1,24	1410 ± 234
130	Butyl	4	29,0 ± 4,7	515 ± 105	12,1 ± 3,0	> 10000 38 ± 3 (10 μM)

Die 1-Propylxanthin-Derivate (**FH-98-100**, **104**) und das 1-Butylxanthin-Derivat (**FH-130**) zeigen sowohl zum Adenosin-A₁-als auch zum A_{2B}-Rezeptor hohe Affinitäten mit K_i-Werten im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich, die nahezu unabhängig von der Kettenlänge des sich in *para*-Position des 8-Phenyl-Ringes befindlichen Substituenten ist. Dieser Substituent soll später als *Spacer* zwischen dem Liganden und dem zur Fluoreszenzmarkierung verwendeten BODIPY-Derivat dienen. Zu den A_{2A}- und A₃-Rezeptor-Subtypen zeigen die Verbindungen hingegen nur eine moderate Bindungsneigung.

Im Jahre 2004 wurde von Hill et al. die Synthese des fluoreszenzmarkierten Adenosin-A₁-Rezeptor-Antagonisten XAC-BY630 aus dem kommerziell erhältlichen A₁-Antagonisten XAC und dem bei der Firma *Molecular Probes* angebotenem BODIPY 630/650-X-succinimidylester publiziert, der einen K_D-Wert von 152 nM am A₁-Rezeptor aufwies.³³⁹ Die in Tab. 5-2 dargestellten Verbindungen zeigen eine deutlich höhere Affinität zu diesem Subtyp. Besonders erwähnenswert sind an dieser Stelle die Verbindungen **FH-141** und **150**, die einen K_i-Wert von $77,9 \pm 12,8$ bzw. $88,1 \pm 8,5$ nM besitzen. Vergleicht man die erhaltene Reihe fluoreszenzmarkierter Derivate allerdings mit den unmarkierten Substanzen (**FH-98-100**), so wird deutlich, dass die Markierung mit einem BODIPY-Derivat mit einem 5 bis 50-fachen Affinitätsverlust am Adenosin-A₁-Rezeptor einhergeht (**FH-102-103,121**). Die sukzessive Verlängerung der Kohlenstoffkette des Spacers von zwei auf bis zu fünf CH₂-Einheiten zwischen dem alkyliertem Xanthin-Derivat und dem Fluorophor führt hingegen zu einer Affinitätssteigerung am A₁-Rezeptor (**FH-121**, **102**, **103** und **141**). Das Derivat, welches eine Kohlenstoffkette mit 10 CH₂-Einheiten ausweist, verzeichnet allerdings wiederum einen Affinitätsverlust (**FH-111**). Stellt man nun diese Verbindungen, die in Position 1 einen Propyl-Rest besitzen (**FH-121**, **102**, **103**, **141** und **111**), den 1-Butylxanthin-Derivaten gegenüber, so lässt sich erkennen, dass eine Alkylkettenverlängerung in dieser Position zu einem leichten Wirkungsverlust der Verbindungen zum A₁-Rezeptor führt (**FH-126**, **109**, **108** und **124**). Auch hier zeigt sich, dass sich eine Kettenverlängerung des sich in *para*-Position des Phenyl-Ringes in Position 8 befindlichen Substituenten positiv auf die Affinität zum Adenosin-A₁-Rezeptor auswirkt. Dieses Wirkungsmuster wiederholt sich auch bei den 1,3-Dipropylxanthin-Derivaten (**FH-151** und **150**).

Das Ziel dieses Projektes war allerdings die Entwicklung von fluoreszenzmarkierten Adenosin-A_{2B}-Rezeptor-Liganden. Konkurrenzexperimente mit dem neu charakterisierten A_{2B}-Radioliganden [³H]PSB-603 haben ergeben, dass es sich bei den Verbindungen **FH-121**, **102**, **103**, **141**, **111** und **109** um hochaffine A_{2B}-Liganden handelt. Im Vergleich zu den unmarkierten

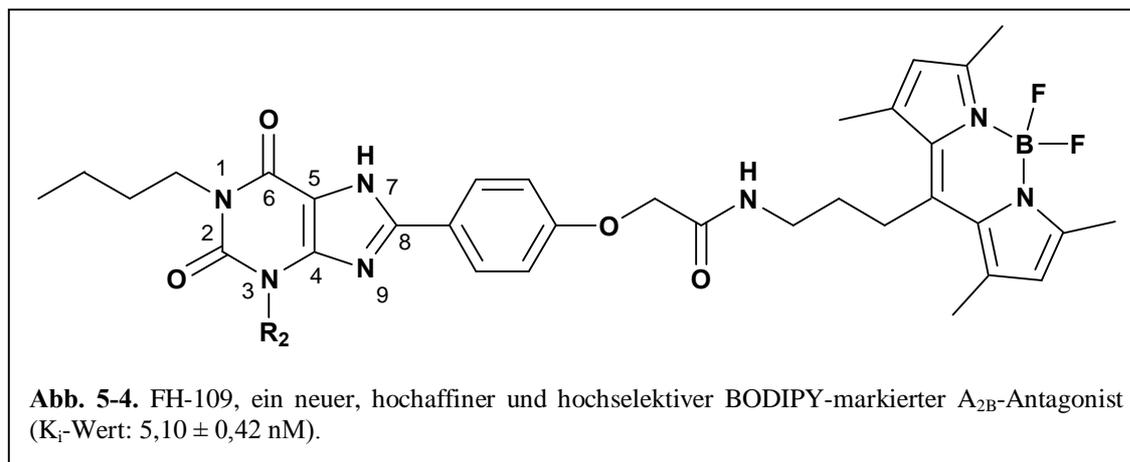
Xanthin-Derivaten scheint die Einführung des Fluorophors unterschiedliche Auswirkungen auf die Affinität zu besitzen. Vor der Kopplung mit dem BODIPY-Fluorophor wiesen die Verbindungen **FH-121**, **103** und **108** eine höhere Affinität zum A_{2B}-Rezeptor auf, während die Bindungsneigung von **FH-102** durch die Kopplung gesteigert werden konnte. Allerdings scheint die Affinität der markierten 1-Propylxanthin-, 1,3-Dipropylxanthin-Derivate und der 1-Butylxanthin-Derivate zum A_{2B}-Rezeptor unabhängig von der Kettenlänge des sich in *para*-Position des 8-Phenyl-Ringes befindlichen Substituenten zu sein. Da die Affinität zum A_{2A}- und A₃-Rezeptor-Subtyp eher gering ist, wurden somit hochselektive fluoreszenzmarkierte A_{2B}-Liganden dargestellt. **FH-109** weist z.B. einen K_i-Wert von 5,10 nM und eine mehr als 1960-fache Selektivität zu A_{2A}- und A₃-Rezeptoren und eine 74-fache Selektivität zum A₁-Subtypen auf.

Tab. 5-2. Affinitäten verschiedener fluoreszenzmarkierter Alkylxanthin-Derivate an Adenosin-Rezeptor-Subtypen (n=3).

Verb. FH	R ₁	R ₂	n	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)			
				A ₁ Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} Ratte [³ H]MSX-2	A _{2B} Mensch [³ H]PSB-603	A ₃ Mensch [³ H]PSB-11
121 (105)	-Propyl	H	2	422 ± 35	> 10000 27 ± 5 (10 μM)	15,0 ± 5,2	≥ 10000 49 ± 3 (10 μM)
102 (96)	-Propyl	H	3	168 ± 13	2150 ± 392	11,6 ± 3,4	904 ± 155
103 (97)	-Propyl	H	4	178 ± 23	1570 ± 277	24,4 ± 6,6	719 ± 116
141 (98)	-Propyl	H	5	77,9 ± 12,8	477 ± 68	5,90 ± 2,16	4550 ± 858
111 (99)	-Propyl	H	10	227 ± 21	> 10000 38 ± 3 (10 μM)	7,82 ± 1,94	> 10000 40 ± 4 (10 μM)
126 (106)	-Butyl	H	2	275 ± 51	> 10000 18 ± 1 (10 μM)	≥ 100 47 ± 10 (100 nM)	> 10000 42 ± 2 (10 μM)
109 (100)	-Butyl	H	3	382 ± 86	> 10000 21 ± 6 (10 μM)	5,10 ± 0,42	> 10000 25 ± 9 (10 μM)
108 (101)	-Butyl	H	4	431 ± 118	> 10000 14 ± 5 (10 μM)	≥ 100 45 ± 8 (100 nM)	> 10000 17 ± 1 (10 μM)
124 (102)	-Butyl	H	10	1340 ± 287	> 10000 28 ± 5 (10 μM)	≥ 100 41 ± 9 (100 nM)	> 10000 24 ± 2 (10 μM)
151 (107)	-Propyl	-Propyl	3	428 ± 30	> 10000 13 ± 4 (10 μM)	> 100 11 ± 7 (100 nM)	> 10000 17 ± 10 (10 μM)
150 (108)	-Propyl	-Propyl	5	88,1 ± 8,5	337 ± 8	≥ 100 58 ± 12 (100 nM)	7598 ± 1630

5.2.2. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Eine Serie von 1-Alkyl und 1,3-Dialkyl-8-phenylxanthin-Derivaten, die mit fluoreszenzmarkierten BODIPY-Derivaten in *para*-Stellung des Phenyl-Ringes in Position 8 über einen *Spacer* unterschiedlicher Kettenlänge verknüpft worden sind, wurden in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien in Hinblick auf ihre Affinität zu Adenosin-Rezeptoren untersucht. Das 1-Propyl- und das 1,3-Dipropylxanthin-Derivat, deren *Spacer* aus 5 CH₂-Einheiten bestehen, lieferten K_i-Werte von 77,9 ± 12,8 bzw. 88,1 ± 8,5 nM (**FH-141** und **150**) am Adenosin-A₁-Rezeptor. Im Allgemeinen hat sich gezeigt, dass die sukzessive Verlängerung der Kohlenstoffkette des *Spacers* zu einer Affinitätssteigerung am A₁-Rezeptor führt (Ausnahme: *Spacer* n=2), während hingegen eine längere Alkylkette (Butyl- statt Propyl-) in Position 1 mit einem Affinitätsabfall einhergeht. Die Kopplung mit dem BODIPY-Fluorophor wird mäßig toleriert und führte teilweise zu einem 5 bis 50-fachen Affinitätsverlust.



Durch Konkurrenzexperimente am A_{2B}-Rezeptor wurde gezeigt, dass es sich bei den fluoreszenzmarkierten 1-Alkyl und 1,3-Dialkyl-8-phenylxanthin-Derivaten um hochaffine und teilweise selektive A_{2B}-Liganden handelt. Im Vergleich zu den analogen nicht-fluoreszierenden Xanthin-Derivaten scheint die Einführung des Fluorophors unterschiedliche Auswirkungen auf die Affinität zu besitzen. Mit einem K_i-Wert von 5,10 ± 0,42 nM und einer mehr als 1960-fachen Selektivität zu A_{2A}- und A₃-Rezeptoren und einer 74-fachen Selektivität zum A₁-Subtypen wurde die Verbindung **FH-109** als neuer, hochaffiner und hochselektiver BODIPY-markierter A_{2B}-Ligand charakterisiert.

Da Konkurrenzexperimente ausgewählter Derivate an humanen A₁- und A_{2A}-Rezeptoren noch ausstehen, kann noch keine genaue Aussage über spezie-abhängige Affinitätsunterschiede gemacht werden. Eine weitere funktionelle Charakterisierung dieser Substanzen durch Natrium-Shift-Experimente, durch die Messung der cAMP-Akkumulation an CHO-

Membranpräparationen, die den humanen A_{2B} -Rezeptor rekombinant exprimieren, oder durch [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien, wäre im Hinblick auf ihre intrinsische Aktivität sinnvoll.^{294, 319, 320} Allerdings ist zu erwarten, dass es sich um Antagonisten handelt, da bisher keine Xanthin-Derivate mit agonistischer Wirkung bekannt sind. Zukünftig soll **FH-109** in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an CHO-Zellen, die den humanen A_{2B} -Rezeptor rekombinant exprimieren, weitergehend untersucht werden.

5.3. CHARAKTERISIERUNG VON FLUORESZENZMARKIERTEN N^6 -SUBSTITUIERTEN ADENOSIN-DERIVATEN ALS ADENOSIN- A_1 -REZEPTOR-AGONISTEN

Im Jahre 1998 wurde von Macchia et al. ein fluoreszenzmarkierter Adenosin- A_1 -Ligand beschrieben, der durch die Umsetzung von NECA mit einem Dansylfluorophor erhalten wurde.³⁴⁰ Der Ligand und der Fluorophor sind durch einen Spacer voneinander getrennt, der sich durch die Länge der Alkylkette unterscheidet. Die affinste Verbindung dieser Verbindungsreihe mit einer Alkylkette aus sechs CH_2 -Einheiten verzeichnete einen K_i -Wert von 27 nM und eine hohe Selektivität gegenüber dem A_{2A} - und A_3 -Rezeptor. Allerdings wurde nicht gezeigt, ob es sich bei diesen Substanzen um volle bzw. partielle Agonisten, neutrale Antagonisten oder aber inverse Agonisten handelt.

Der Dansylfluorophor ist aufgrund seiner ungünstigen Fluoreszenzeigenschaften und der damit einhergehenden geringen Empfindlichkeit in biologischen Systemen, in denen nur eine geringe Konzentration des fluoreszenzmarkierten Liganden eingesetzt wird, nur bedingt brauchbar.³⁴¹

Die Verknüpfung eines Adenosin-Derivates mit einem BODIPY-Fluorophor wurde im Jahre 2004 patentiert. Dabei wurde, wie drei Jahre später veröffentlicht, als Fluorophor das kommerziell erhältliche BODIPY-Derivat 630/650-X,SE eingesetzt. Als Liganden dienten das Adenosin selbst, wie auch das Derivat NECA, die über die Position N^6 durch einen Spacer verschiedener Kettenlänge mit dem Fluorophor verknüpft wurden.^{339, 342} Die erhaltenen Substanzen wurden durch Messung der cAMP-Akkumulation an CHO- hA_1 -Membranpräparationen funktionell charakterisiert. Ebenso wie die Referenzsubstanz NECA zeigten diese Verbindungen eine Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation, so dass sie hinsichtlich ihrer intrinsischen Aktivität als Agonisten eingestuft werden konnten. Die potenteste Verbindung dieser Reihe zeigte einen EC_{50} -Wert von 3 nM am Adenosin- A_1 -Rezeptor. Diese hohe Affinität ging allerdings mit einer geringen Selektivität einher, da die Affinität zum A_3 -Rezeptor ähnlich hoch war. In Radioligand-Bindungsstudien, die an ganzen Zellen durchgeführt wurden, konnten keine zufrieden stellende Ergebnisse erzielt werden.³⁴²

Da demnach noch keine hochaffinen, selektiven fluoreszenzmarkierten A_1 -Agonisten existieren, sollten solche Verbindungen zugänglich gemacht werden. Die im Rahmen dieses Projektes untersuchten Substanzen wurden von Herrn Dr. Fabian Heisig in unserem Arbeitskreis synthetisiert.³³¹ Als Ausgangssubstanz für die Synthese von Adenosin- A_1 -Rezeptor-Agonisten wurde Adenosin gewählt, welches in der Position N^6 derivatisiert wurde. Es hatte sich gezeigt, dass eine N^6 -Substitution zu hochpotenten und selektiven Agonisten am A_1 -Rezeptor führt.

Die Kompetitionsexperimente am Ratten-Adenosin- A_1 - und A_{2A} -Rezeptor und am humanen A_3 -Rezeptor wurden analog zu den vorhergehenden Kapiteln durchgeführt.

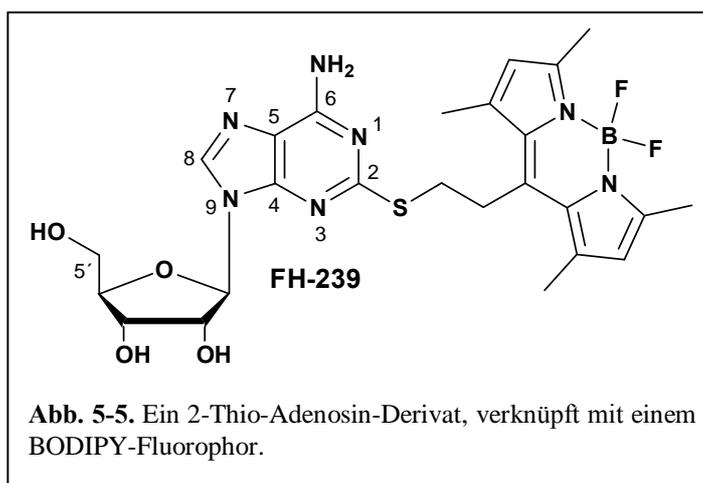
Alle untersuchten N^6 -substituierten Adenosin-Derivate wiesen eine moderate bis hohe Affinität zum Adenosin- A_1 -Rezeptor und teilweise auch eine moderate Affinität zu den A_{2A} - und A_3 -Rezeptor-Subtypen auf. Die Verbindungen, die am N^6 -Substituenten eine freie Carbonsäure besitzen, weisen nur eine moderate Haftungsneigung zum A_1 -Rezeptor auf (**FH-209**, **231** und **232**). Dabei wirkt sich eine Verlängerung der Kohlenstoffkette günstig aus (**FH-209** gegenüber **FH231**), die Einführung eines Phenyl-Restes hingegen als ungünstig (**FH-209** und **231** gegenüber **FH-232**). Über Amid-Funktionen verknüpfte aromatische Substituenten, die als Modellsubstanzen dienen sollten, führten zu einer leichten Affinitätserhöhung. (**FH-216** und **FH-233**). Die Einführung des BODIPY-Fluorophores wird nicht nur sehr gut toleriert, sie führt sogar zu einer Erhöhung der Wirkung dieser Substanzen auf den A_1 -Rezeptor. Die Verbindung **FH-234** besitzt einen K_i -Wert von $14,7 \pm 2,2$ nM am Adenosin- A_1 -Rezeptor und zeigt eine hohe Selektivität gegenüber dem Ratten- A_{2A} - (>48-fach), dem humanen A_{2B} - (>>7-fach) und dem humanen A_3 -Rezeptor (>290-fach). Für die Verbindung **FH-237/238** wurde in Konkurrenzexperimenten ein K_i -Wert von $28,3 \pm 5,9$ nM ermittelt. Sie zeigt somit zwar eine geringere Bindungsneigung zu diesem Rezeptor als die Verbindung **FH-234**, allerdings besitzt sie eine höhere Selektivität (>260-fach gegenüber dem A_{2A} -, >4-fach gegenüber dem A_{2B} - und >177-fach gegenüber dem A_3 -Rezeptor).

Zusätzlich zu dieser Verbindungsreihe wurde von Herrn Dr. Fabian Heisig in Kooperation mit Herrn Dr. Ali El Tayeb ein weiteres fluoreszenzmarkiertes Adenosin-Derivat als potentieller

A_{2A} -Agonist synthetisiert. Im Allgemeinen zeigen Adenosin-Derivate, die einen 2-Alkylamino-, einen 2-Alkoxy-, einen 2-Alkylthio oder einen 2-Alkynyl-Substituenten tragen, hohe Affinitäten und Selektivitäten zum Adenosin- A_{2A} -Rezeptor.³⁴³

Die Struktur-Wirkungsbeziehungen von 2-Thioadenosin-Derivaten wurden bereits in Kapitel 3.3. ausführlich diskutiert. Zeigten die unmarkierten Derivate noch eine moderate Affinität zum Adenosin- A_{2A} -Rezeptor, so führte die Verknüpfung mit dem BODIPY-Derivat zu einem kompletten Wirkungsverlust am

Adenosin- A_1 -, A_{2A} - und A_3 -Rezeptor. Bei einer eingesetzten Konzentration von 10 μ M



inhibierte **FH-239** die spezifische Bindung von [^3H]CCPA zum A_1 -Rezeptor um $19 \pm 7\%$, die von [^3H]MSX-2 zum $\text{A}_{2\text{A}}$ -Rezeptor um $22 \pm 3\%$ und die von [^3H]PSB-11 zum A_3 -Rezeptor um $37 \pm 4\%$.

5.3.2. FUNKTIONELLE [^{35}S]GTP γ S-BINDUNGSSTUDIEN AN HUMANEN ADENOSIN- A_1 -REZEPTOREN

Die N^6 -substituierten Adenosin-Derivate wurden in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien an CHO-h A_1 -Membranpräparationen durch den Praktikanten Alexander Zielinski funktionell charakterisiert. Analog zu den in Kap. 2.7. und 3.2.3. beschriebenen [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien wurden der A_1 -selektive Adenosin-Rezeptor-Agonist **CPA** und der A_1 -selektive inverse Agonist **DPCPX** als Referenzsubstanzen verwendet.

Im Vergleich zu den in Kap. 3.2.3. dargestellten [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien, in denen für den Voll-Agonisten **CPA** bei einer eingesetzten Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ ein max. Effekt von $222 \pm 10\%$ ermittelt worden war, hatte **CPA** in der vorliegenden Versuchsreihe einen max. Effekt

von $416 \pm 30\%$ (Basalwert: 100%). Der für den inversen Agonisten **DPCPX** bestimmte max. Effekt von $46 \pm 4\%$ relativ zum Basalwert von 100% deckt sich mit dem Ergebnis aus vergangenen Versuchsreihen ($32 \pm 2\%$). Vergleicht man diesen Effekt mit dem der Testsubstanzen, so können die Verbindungen

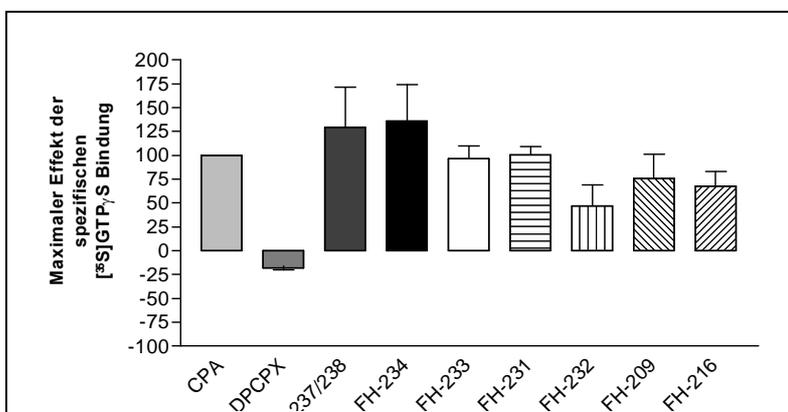


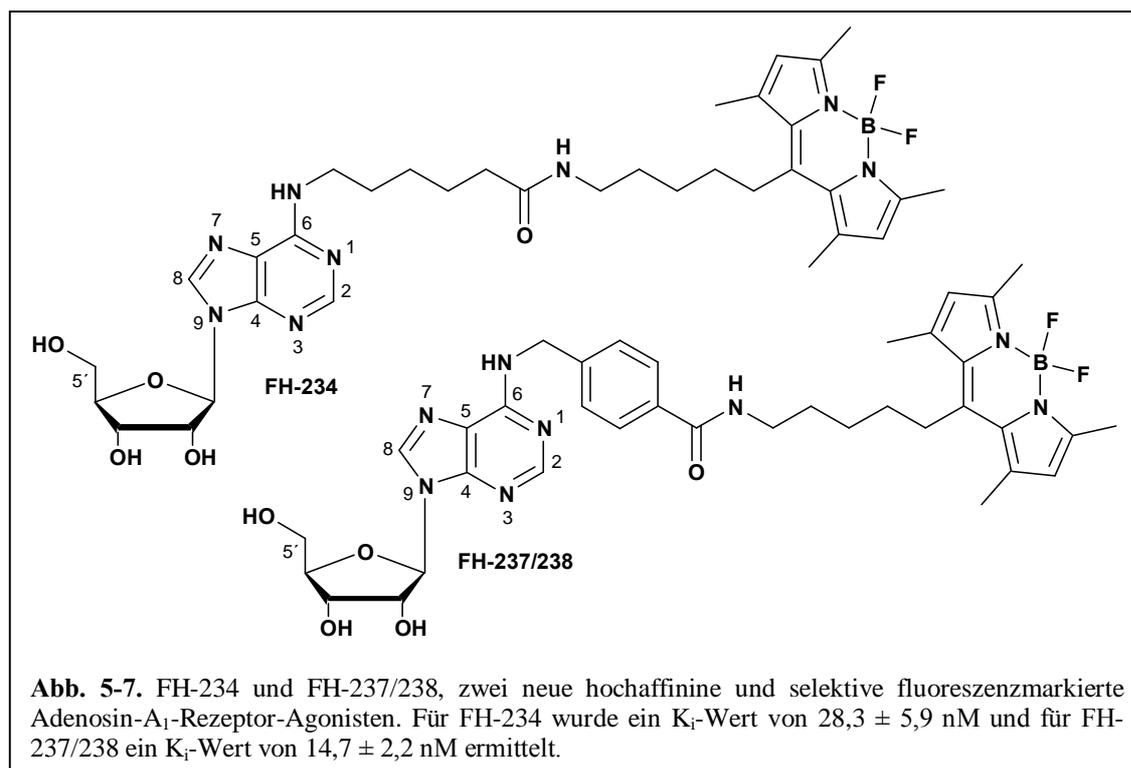
Abb. 5-6. Max Effekt der spezifischen [^{35}S]GTP γ S-Bindung an humanen rekombinanten Adenosin- A_1 -Rezeptoren der Referenz-Substanzen CPA und DPCPX sowie ausgewählten FH-Substanzen bei einer eingesetzten Konzentration von $10\ \mu\text{M}$. Die Daten sind auf den Voll-Agonisten CPA normalisiert, der gleich 100% maximaler Stimulation gesetzt wurde ($n=3$).

FH-237/238, **234**, **233** und **231** als volle Agonisten am Adenosin- A_1 -Rezeptor charakterisiert werden. Mit einem max. Effekt von $455 \pm 57\%$ bzw. $469 \pm 35\%$ für die fluoreszenzmarkierten Adenosin-Derivate **FH-237/238** bzw. **234**, wird der Wert der Referenzsubstanz **CPA** sogar noch überschritten ($416 \pm 30\%$). Die Modellverbindungen **FH-233** und **231** zeigten eine *Efficacy* von $398 \pm 21\%$ bzw. $415 \pm 36\%$. Allerdings ist der max. Effekt der Verbindungen **FH-237/238**, **234**, **233** und **231** nicht signifikant unterschiedlich vom max. Effekt der Referenzsubstanz **CPA**.

Die Verbindungen **FH-232**, **209** und **216** erreichten nur einen max. Effekt von 262 ± 80 , 354 ± 97 bzw. 319 ± 62 %. Dies könnte daran liegen, dass eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ nicht ausreichte, um eine max. Stimulation zu erreichen, da diese Verbindungen relativ geringe Affinitäten aufwiesen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass es sich um partielle Agonisten handelt. Vergleicht man die analogen Verbindungen **FH-233** und **234**, so wird deutlich, dass die Einführung eines BODIPY-Fluorophors keinen negativen Einfluss auf die intrinsische Aktivität besitzt (vgl. auch **FH-231**).

5.3.3. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Adenosin-Derivate, die am N^6 über einen Spacer unterschiedlicher Kettenlänge mit einem BODIPY-Fluorophor verknüpft sind, wurden in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien *in-vitro*-pharmakologisch an Adenosin-Rezeptoren untersucht. In funktionellen $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsstudien wurden sie im Hinblick auf ihre intrinsische Aktivität weiter charakterisiert. Für die Verbindungen **FH-234** und **FH-237/238** wurden K_i -Werte von $14,7 \pm 2,2$ nM bzw. $28,3 \pm 5,9$ nM zum Adenosin- A_1 -Rezeptor ermittelt.



Somit zeigen diese Verbindungen nicht nur hinsichtlich des verwendeten Fluorophors, sondern auch aufgrund der höheren Affinität zum A_1 -Rezeptor bessere Eigenschaften als der von

Macchia et al. publizierte Adenosin-A₁-Ligand (K_i-Wert: 27 nM).³⁴⁰ **FH-234** und **FH-237/238** wurden in funktionellen Bindungsstudien als Agonisten charakterisiert.

Ein direkter Vergleich mit den von Middleton et al. synthetisierten BOPIPY-markierten N⁶-substituierten Adenosin- bzw. NECA-Derivaten ist an dieser Stelle nicht möglich. Die Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien wurden von diesen Autoren mit dem A₁-selektiven Radioliganden [³H]DPCPX an ganzen Zellen durchgeführt, die allerdings nicht sehr zufrieden stellend verliefen. Es konnte keine vollständige Verdrängung des verwendeten Radioliganden nachgewiesen werden. Dies führte die Arbeitsgruppe darauf zurück, dass die Verbindungen im Gegensatz zum Radioliganden nicht in der Lage waren, die Zellmembran zu passieren. Es wurden aber keine Bindungsstudien an einer Membranpräparation durchgeführt, um diese Hypothese zu bestätigen. Durch Messung der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation wurde ein EC₋₅₀-Wert von 3 nM ermittelt.³⁴²

Zukünftig soll **FH-234** in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an CHO-Zellen, die den humanen A₁-Rezeptor rekombinant exprimieren, weitergehend untersucht werden.

6. CHARAKTERISIERUNG DES PFLANZENEXTRAKTS STW5 (IBEROGAST®) UND SEINER BESTANDTEILE DURCH [³⁵S]GTPγS-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN-REZEPTOREN

6.1. EINLEITUNG

Die funktionelle Dyspepsie (Verdauungsstörung) gehört zu den häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen, deren symptomatische Behandlung den Gebrauch von Pflanzenextrakten einschließt. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung und die Herkunft der Symptome sind nicht klar definiert, allerdings sollen eine Störung des Verdauungsapparates, insbesondere eine sensorische und motorische Erkrankung des Magens und des Zwölffingerdarms, eine größere Rolle spielen.³⁴⁴⁻³⁴⁶ Der Einsatz von Antazida, H₂-Rezeptor-Antagonisten und Protonenpumpenhemmern oder von die Magen- und Darmmotilität fördernden Stoffen (Prokinetika) scheinen einen positiven Effekt auszuüben,³⁴⁷⁻³⁴⁹ allerdings müssen diese Arzneistoffe über einen langen Zeitraum eingenommen werden, was die *Compliance* der Patienten verschlechtert.³⁵⁰ Häufig setzen Patienten auf die Einnahme von Pflanzenextrakten, wie Iberogast® (STW5), die sie selbst als sicher und wirkungsvoll einstufen, und die zudem noch kostengünstig erstanden werden können.²⁵³ Allerdings führen einige Ärzte deren Wirkung auf Placeboeffekte zurück, da bisher nur eingeschränkte Kenntnisse über die Wirkung des Pflanzenextraktes STW5 bei der Behandlung der funktionellen Dyspepsie vorliegen.^{349, 351-353}



Dieser Extrakt setzt sich aus vielen einzelnen Komponenten zusammen.³⁵⁴ Die **Bittere Schleifenblume** (*Iberis amara*) ist eine einheimische, krautige, weißblühende Pflanze, die zu den Kreuzblütlern (*Brassicaceae*) gehört. Frischpflanzenextrakte der Gesamtpflanze (*Iberis amara totalis*) fördern die Spannung erschlaffter bzw. gering kontrahierter Muskulatur des Magens. Die **Angelikawurzel** (*Angelica archangelica* L., *Angelicae radix*), auch als Echte Engelswurz bekannt, gehört zu den Doldengewächsen (*Apiaceae*). Als Heilpflanze wird sie bei Appetitlosigkeit und dyspeptischen Beschwerden wie leichten Magen-Darmkrämpfen, Völlegefühl oder Blähungen eingesetzt. Angelikawurzel-Extrakte fördern die Magensaftsekretion und haben eine krampflösende Wirkung. Die Echte **Kamille** (*Matricaria recutita* L.) ist eine einheimische Pflanze, die zu den Korbblütlern (*Asteraceae*) gehört. Kamillenblütenextrakte (*Matricariae flos*) wirken entzündungshemmend, antibakteriell, entkrampfend und wundheilungsfördernd und werden u.a. innerlich bei entzündlichen

Erkrankungen und bei Verkrampfungen des Magens verwendet. Der Echte **Kümmel** (*Carum carvi* L.) ist ebenfalls eine einheimische Pflanze, die zu den Doldenblütlern (*Apiaceae*) gehört. Der Kümmel ist nicht nur als Gewürz sehr wichtig, er verbessert außerdem bei blähungstreibenden Speisen (z.B. Kohl) die Verträglichkeit. Kümmelfruchtextrikte (*Carvi fructus*) wirken keimtötend und krampflösend am Magen. Sie werden bei leichten und krampfartigen Beschwerden im Magen-Bereich, Blähungen und Völlegefühl eingesetzt.

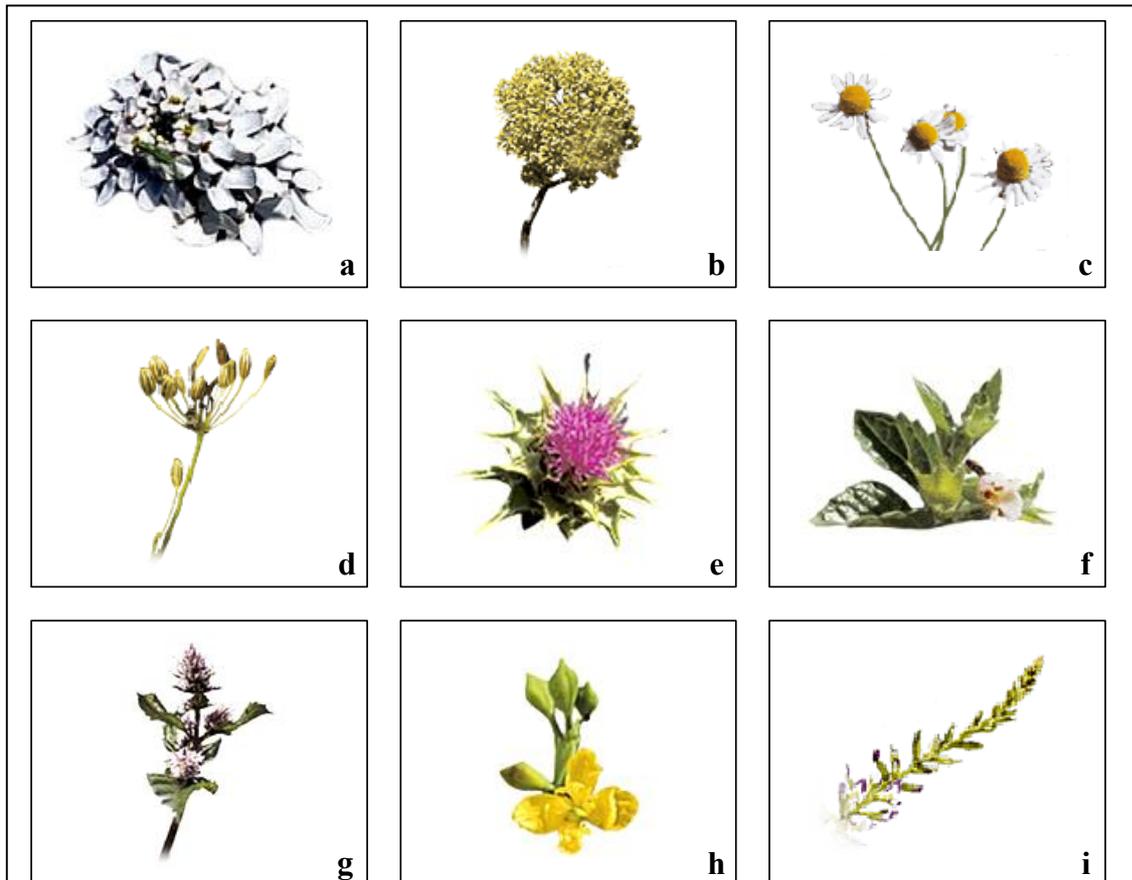


Abb. 6-2. In Iberogast enthaltene Pflanzen (in Klammern der verwendete Pflanzenteil). **a** *Iberis amara* (*Iberis amara* totalis), **b** *Angelica archangelica* L. (*Angelicae* radix), **c** *Matricaria recutita* L. (*Matricariae* flos), **d** *Carum carvi* L. (*Carvi* fructus), **e** *Silybum marianum* L. (*Cardui mariae* fructus), **f** *Melissa officinalis* L. (*Melissae* folium), **g** *Mentha piperita* L. (*Menthae piperitae* folium), **h** *Chelidonium majus* L. (*Chelidonii* herba), **i** *Glycyrrhiza glabra* L. (*Liquiritiae* radix).

Die **Mariendistel** (*Silybum marianum* L.) ist ein Korbblütler (*Asteraceae*) mit großen purpurroten Blütenköpfen. Der Wirkstoff der Mariendistelfrüchte (*Cardui mariae* fructus), Silymarin, kann die Leber vor schädigenden Einflüssen schützen und regt die Regeneration der Leberzellen an. Der Extrakt findet bei der Behandlung toxischer Leberschäden und zur unterstützenden Behandlung chronisch-entzündlicher Lebererkrankungen und der Leberzirrhose

Anwendung. Die **Melisse** (*Melissa officinalis* L.) gehört zu den Lippenblütlern (*Lamiaceae*). Melissenblätterextrakte (*Melissae folium*) wirken beruhigend gegen Blähungen und werden bei nervös bedingten Einschlafstörungen und bei funktionellen Magenbeschwerden eingesetzt. Ebenso wie die Melisse gehört die **Pfefferminze** (*Mentha piperita* L.) zu den Lippenblütlern (*Lamiaceae*). Blattextrakte (*Menthae piperitae folium*) regen die Gallenproduktion an, wirken krampflösend im Magen und gegen Blähungen. Pfefferminzblätter werden bei krampfartigen Beschwerden im Magenbereich sowie der Gallenblase und -wege angewendet. Das **Schöllkraut** (*Chelidonium majus* L., *Chelidonii herba*) gehört zu den Mohngewächsen (*Papaveraceae*). Es hat eine leicht entkrampfende Wirkung im oberen Verdauungstrakt und wird bei krampfartigen Beschwerden im Bereich der Gallenwege und des Magens eingesetzt. Die **Süßholzwurzel** (*Glycyrrhiza glabra* L., *Liquiritiae radix*), besser bekannt als Lakritze, ist eine Staude, die zu den Schmetterlingsblütengewächsen (*Fabaceae*) gehört. Extrakte der Süßholzwurzel werden bei Katarrhen der Luftwege verwendet, da sie das zähflüssige Sekret verflüssigen und so das Abhusten erleichtern können. Sie beschleunigen außerdem das Abheilen von Magengeschwüren. Schon in der Vergangenheit wurden **STW5** antibakterielle, antisekretorische, zytoprotektive, antiulzerogene sowie spasmolytische Effekte zugeschrieben.

354-356

Beim Pflanzenextrakt **STW5** (Iberogast®), der im Rahmen dieses Projektes verwendet worden ist, handelt es sich um eine fixe Arzneimittelkombination, die sich folgendermaßen zusammensetzt (siehe Tab. 6-1).

Tab. 6-1. Zusammensetzung von Iberogast®.

Arzneipflanze bzw. Droge ^a	DEV	Iberogast [ml]	
<i>Iberis amara</i> totalis (1 ml ≈ 0,60 g FP)	Bittere Schleifenblume	1:2	15
<i>Angelicae</i> radix (1 ml ≈ 0,35 g DR)	Angelikawurzel	1:3	10
<i>Matricariae</i> flos (1 ml ≈ 0,35 g DR)	Kamillenblüten	1:3	20
<i>Carvi</i> fructus (1 ml ≈ 0,35 g DR)	Kümmelfrüchte	1:3	10
<i>Cardui mariae</i> fructus (1 ml ≈ 0,35 g DR)	Mariendistelfrüchte	1:3	10
<i>Melissae</i> folium (1 ml ≈ 0,35 g DR)	Melissenblätter	1:3	10
<i>Menthae piperitae</i> folium (1 ml ≈ 0,35 g DR)	Pfefferminzblätter	1:3	5
<i>Chelidonii</i> herba (1 ml ≈ 0,35 g DR)	Schöllkraut	1:3	10
<i>Liquiritiae</i> radix (1 ml ≈ 0,35 g DR)	Süßholzwurzel	1:3	10

^aFP = Frischpflanze, DR = Droge, DEV = Drogen-Extrakt-Verhältnis

Die Bittere Schleifenblume (*Iberis amara*) ist in Iberogast als alkoholischer Frischpflanzenauszug (Auszugsmittel: Ethanol 50% (V/V)) enthalten, während die anderen Pflanzen als alkoholische Drogenauszüge vorliegen (Auszugsmittel: Ethanol 30% (V/V)).

Die Forschungspräparate **STW6** (bittere Schleifenblume), **STW 5-K IX** (Schöllkraut) und **STW5-K IXs/ss** (alkaloidarmer Schöllkrautextrakt) befinden sich nicht auf dem Markt.

Hohenester et al. veröffentlichten im Jahre 2004 eine Arbeit über den Einfluss des Extraktes **STW5** (Iberogast[®]) auf die Motilität des Gastrointestinaltraktes. Dafür wurden Muskelstreifen aus Teilbereichen des Magens, dem Fundus (Magenkuppel), dem Korpus (Magenkörper) und dem Antrum (Erweiterung vor dem Magenausgang) des Meerschweinchens herauspräpariert, wobei **STW5** Wirkungen auf die Motilität zeigte. Im Fundus und Korpus wurde eine Muskelrelaxation nachgewiesen, im Antrum allerdings eine Kontraktion.³⁵⁷

Basierend auf der Arbeit von Hohenester et al. untersuchte der Arbeitskreis Nieber die Extrakte **STW5** und **STW6** (bittere Schleifenblume) in einem *In-vitro*-Entzündungsmodell. In diesem Modell, bei dem die Entzündung durch Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) induziert wurde, zeigten beide Extrakte einen entzündungshemmenden Effekt.

Da das Nukleosid Adenosin, wie bereits in Kapitel 3 erwähnt, während des Entzündungsgeschehens freigesetzt wird,²⁵⁴ wurden diese Extrakte sowie **STW 5-K IX** (Schöllkraut) und **STW5-K IXs/ss** (alkaloidarmer Schöllkrautextrakt) in unserem Arbeitskreis durch Herrn Dr. Sebastian Michael, einem wissenschaftlichen Mitarbeiter aus dem Arbeitskreis Nieber, sowie der technischen Mitarbeiterin Nicole Florin auf ihre Affinität zu Adenosin-Rezeptoren untersucht. Die Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten an Ratten-Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren sowie aus GTP-Shift-Experimenten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Michael und Frau Florin zur Verfügung gestellt und sind in Tab. 6-2 und Tab. 6-3 zusammengefasst.

Tab. 6-2. Affinitäten des Pflanzenextraktes STW5 (Iberogast®) und der Forschungspräparate STW6, STW 5-K IX und STW 5-K IXa/s/s an Ratten-Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren (n=3).

Extrakt	K_i ± SEM [µg/ml] und Inhibition in % (Konzentration)	
	A₁ Ratte [³H]CCPA	A_{2A} Ratte [³H]CGS21680
STW5	83,7 ± 11,1 103 ± 7 (10 mg/ml)	140 ± 15 92 ± 3 (10 mg/ml)
STW6	133 ± 15 37 ± 3 (0,47 mg/ml)	1470 ± 255 27 ± 3 (0,47 mg/ml)
STW5 K IX	395 ± 32 34 ± 2 (1,3 mg/ml)	309 ± 48 47 ± 2 (1,3 mg/ml)
STW5 K IXa	634 ± 32 21 ± 1 (1,1 mg/ml)	866 ± 266 26 ± 1 (1,1 mg/ml)
STW5 K IXs	1000 ± 248 21 ± 3 (1,2 mg/ml)	800 ± 85 43 ± 1 (1,2 mg/ml)
STW5 K IXss	656 ± 327 33 ± 9 (1,2 mg/ml)	1870 ± 129 30 ± 4 (1,2 mg/ml)

Aus Tab. 6-2 wird ersichtlich, dass **STW5** und **STW5 K IX**, aber auch **STW6** eine hohe Bindungsneigung zum Adenosin-A₁-Rezeptor aufweisen. **STW5** und **STW5 K IX** zeigen zudem noch eine hohe Affinität zum A_{2A}-Rezeptor. Durch GTP-Shift-Experimente konnten diese Extrakte als neutrale Antagonisten (**STW5**) bzw. partielle Agonisten (**STW6** und **STW5 K IX**) funktionell charakterisiert werden.

Tab. 6-3. IC₅₀-Werte und GTP-Shifts des Pflanzenextraktes STW5 (Iberogast®) und der Forschungspräparate STW6 und STW 5-K IX an Ratten-Adenosin-A₁-Rezeptoren in An- und Abwesenheit von 100 µM GTP (n=3).

Extrakt	IC₅₀ ± SEM [µg/ml]		GTP-Shift ± SEM
	- 100 µM GTP	+ 100 µM GTP	
STW5	246 ± 27	326 ± 46^{ns}	1,3 ± 0,1
STW6	3890 ± 560	7600 ± 1210*	1,6 ± 0,5
STW5 K IX	5090 ± 87	11370 ± 620***	2,2 ± 0,1
CPA	0,0436 ± 0,0233 µM	0,261 ± 0,00817 µM***	7,3 ± 5,4

*** (P < 0,001), * (0,01 < P < 0,05) bzw. ns (P > 0,05) vs. IC₅₀-Wert – 100 µM GTP

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollten **STW5**, **STW5 K IX** und **STW6** in GTPγS-Bindungsstudien an Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren, **STW5** und **STW5 K IX** an Adenosin-A₁-Rezeptoren im Hinblick auf ihre intrinsische Aktivität weitergehend untersucht werden

6.2. [³⁵S]GTPγS-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN-A₁- UND A_{2A}-REZEPTOREN

Der Pflanzenextrakt **STW5** (Iberogast[®]) und die Bestandteile dieses Extraktes **STW 5 K IX** (Schöllkraut) und **STW6** (bittere Schleifenblume) wurden mit Hilfe von [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an humanen Adenosin-A₁- und Ratten-A_{2A}-Rezeptoren funktionell charakterisiert. Es handelte sich hierbei um Trockenextrakte, die nach quantitativer Entfernung des Auszugsmittels Ethanol, in Wasser gelöst wurden.

Ausgehend von bereitgestellten Stammlösungen aus dem Arbeitskreis Nieber wurden die Extrakte in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: **STW5** in einer Konzentration von 20 µg/µl, **STW5 K IX** mit 2,58 µg/µl und **STW 6** mit 0,235µg/µl. Da die Extrakte in Wasser gelöst waren, musste das [³⁵S]GTPγS-Standard-Protokoll geringfügig umgestellt werden: Die Gesamtbindung wurde in Anwesenheit von Wasser bestimmt. Unmarkiertes GTPγS, welches für die Bestimmung der unspezifischen Bindung eingesetzt wird, wurde ebenfalls in Wasser gelöst (Endkonzentration 10 µM).

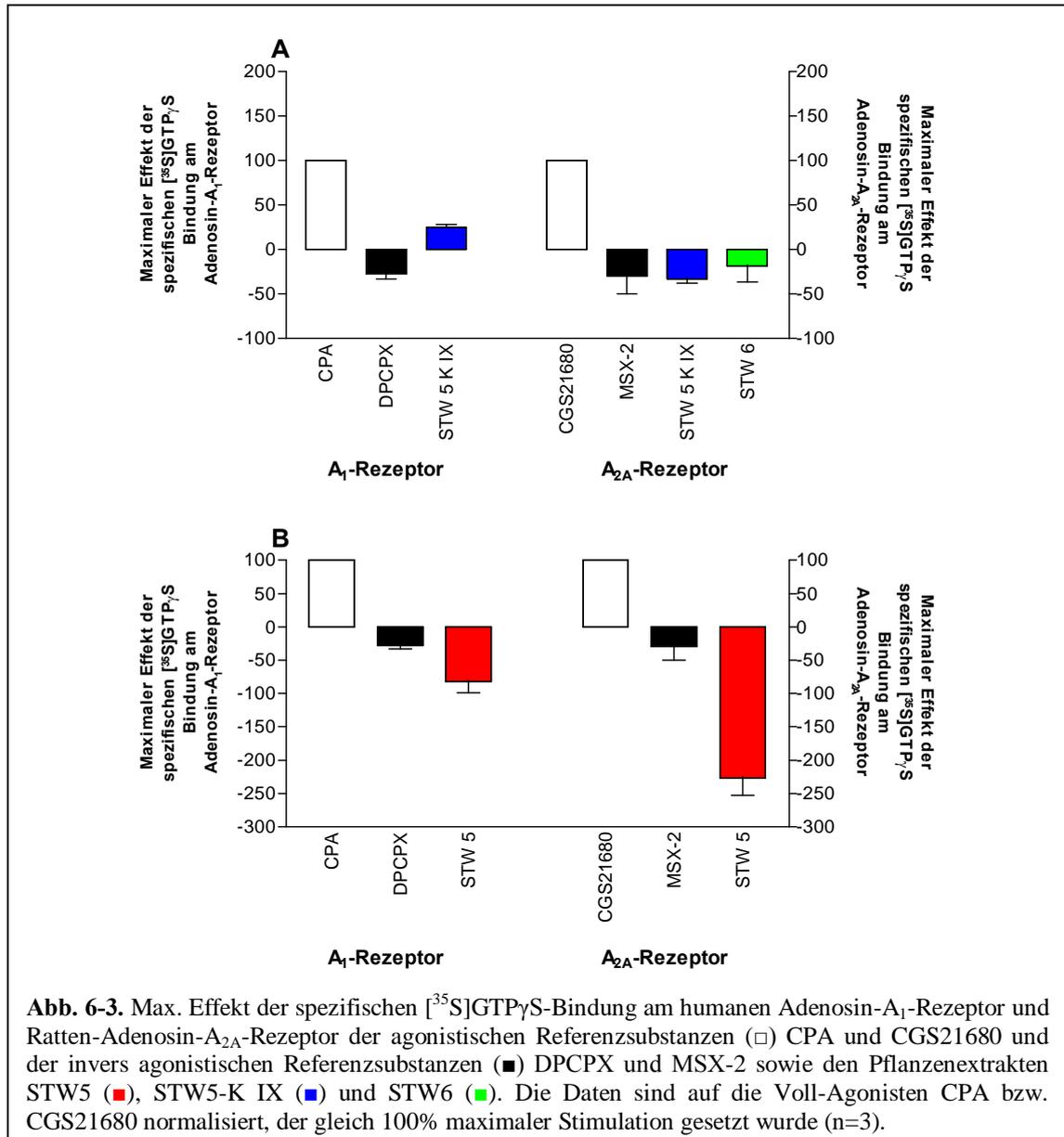
Als Referenzsubstanzen wurden, wie üblich, der A₁-selektive Adenosin-Rezeptor-Agonist **CPA**, der A₁-selektive inverse Agonist **DPCPX**, der A_{2A}-selektive Agonist **CGS21680** und der A_{2A}-selektive inverse Agonist **MSX-2** verwendet. **CPA** und **DPCPX** konnten analog dem Lösungsmittel der Extrakte in Wasser gelöst werden, die Stammlösung von **CGS21680** und **MSX-2** musste in DMSO hergestellt werden, da diese Substanzen in Wasser in der erforderlichen Konzentration unlöslich sind.

Tab. 6-4. Maximaler Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung relativ zum Basalwert (=100%) der Extrakte STW5, STW5-K IX und STW6 im Vergleich zu den Referenzsubstanzen CPA, DPCPX, CGS21680 und MSX-2 (n=3).

Extrakt bzw. Referenz	Konzentration	Max. Effekt der spezifischen Bindung von [³⁵ S]GTPγS [%] relativ zum Basalwert (=100%)	
		humaner Adenosin-A ₁ -Rezeptor	Ratten-Adenosin-A _{2A} -Rezeptor
STW5	20 µg/µl	2 ± 0***	2 ± 0***
STW5 K IX	2,58 µg/µl	149 ± 13*	86 ± 2**
STW6	0,235µg/µl	n.d.	95 ± 9 ^{ns}
CPA	10 µM	233 ± 31*	n.d.
DPCPX	10 µM	52 ± 3***	n.d.
CGS21680	200 µM	n.d.	144 ± 5***
MSX-2	100 µM	n.d.	89 ± 7 ^{ns}

*** (P < 0,001), ** (0,001 < P < 0,01), * (0,01 < P < 0,05) bzw. ns (P > 0,05) vs. Basalwert (=100 %), n.d. = nicht durchgeführt

Erwartungsgemäß (siehe Kap. 3.3.2. und 5.3.2.) führten die Voll-Agonisten **CPA** und **CGS21680** am A₁- bzw. am A_{2A}-Rezeptor zu einer Erhöhung der [³⁵S]GTPγS-Bindung. Die inversen Agonisten **DPCPX** und **MSX-2** zeigten hingegen eine Verminderung der [³⁵S]GTPγS-Bindung. Wie bereits in Kap. 3.2.3. diskutiert, senkt **MSX-2** die spezifische [³⁵S]GTPγS-Bindung nur in geringem Maße unter den Basalwert ab (siehe Abb. 6-3).



Diese Bindungsstudien wurden mit Rattenstriatum durchgeführt, die den A_{2A}-Rezeptor nativ exprimieren. Untersuchungen von inversen Agonisten werden allerdings vorwiegend in Zell-Linien durchgeführt, die mit dem Rezeptor stabil transfiziert worden sind und i.d.R. eine höhere Rezeptordichte aufweisen.²⁶⁵

Wie in Abb. 6-3B. gezeigt wird, führt der Gesamtextrakt **STW5** zu einer Inhibition der [³⁵S]GTP γ S-Bindung an beiden Adenosin-Rezeptor-Subtypen, sie liegt sogar weit unterhalb der Referenzsubstanzen **DPCPX** und **MSX-2**. Der Extrakt **STW5 K IX** (Schöllkraut) zeigt am A₁-Rezeptor einen partial-agonistischen Effekt, am A_{2A}-Rezeptor Antagonismus mit invers agonistischen Eigenschaften. Die bittere Schleifenblume (**STW6**) senkt die [³⁵S]GTP γ S-Bindung ebenfalls unter den Basalwert ab, und besitzt demnach ebenso wie das Schöllkraut (**STW 5 K IX**) invers agonistische Eigenschaften am A_{2A}-Rezeptor (siehe Abb. 6-3A).

6.3. ZUSAMMENFASSUNG, DISKUSSION UND AUSBLICK

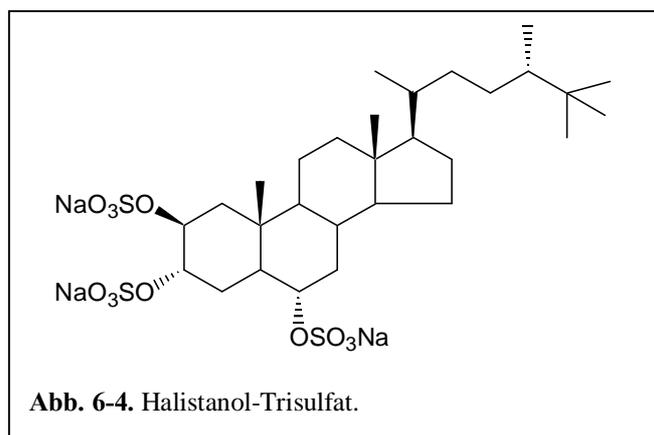
In funktionellen [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien wurde die bittere Schleifenblume (STW6) als inverser Agonist an Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren charakterisiert. Das Forschungspräparat **STW 5 K IX** (Schöllkraut) zeigte partiell-agonistische Eigenschaften am A₁- und ebenso wie **STW6** invers-agonistische Effekte am A_{2A}-Rezeptor. Somit stimmen die Ergebnisse mit den GTP-Shift-Experimenten überein, bei denen das Schöllkraut ebenfalls als A₁-Ligand mit invers-agonistischen Eigenschaften charakterisiert worden war.

Der Gesamt-Planzenextrakt **STW5** (Iberogast[®]) hingegen führt zu einer statistisch signifikanten Inhibition der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung unterhalb des Basalwertes (= 100%). Da die Absenkung größer ist als die der Referenz-Substanzen **DPCPX** und **MSX-2** muss an dieser Stelle die Möglichkeit einer Artefakt-Bildung diskutiert werden.

In Iberogast[®] (**STW5**) liegen die Extrakte in einer Gesamt-Konzentration von 3,4 µg/µl vor. Die bittere Schleifenblume (**STW6**) besitzt eine Konzentration von 0,6 µg/µl, das Schöllkraut (**STW5 K IX**) eine von 0,35 µg/µl. In [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien wurden aufgrund der bereitgestellten Stammlösungen, verglichen mit Iberogast[®], geringfügig abweichende Konzentrationen eingesetzt: **STW 5** (20 µg/µl), **STW 6** (0,235µg/µl) und **STW 5 K IX** (2,58 µg/µl).

Moni et al. veröffentlichten im Jahre 1992 eine Arbeit über den Einfluss von Halistanol-Trisulfat (siehe Abb. 6-4), isoliert aus dem marinen Schwamm *Tedania digitana*, auf Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin-A₁-Rezeptoren.³⁵⁸ Sie fanden heraus, dass Halistanol-Trisulfat konzentrationsabhängig die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor – ausgedrückt in der Dissoziationskonstante K_D – und die max. Anzahl an Bindungsstellen (B_{Max}) reduzierte. Sie vermuteten, dass dieser Extrakt einen direkten, aber nicht-kompetitiven Effekt auf den Adenosin-A₁-Rezeptor besitzt.

Saponine sind Glykoside von Steroiden oder polycyclischen Triterpenen, die aufgrund ihres amphiphilen Charakters Oberflächenaktivität aufweisen.^{359, 360} In Kap. 2.3.



wurden die Effekte von Methyl-β-Cyclodextrin und dem Detergens Triton X-100 auf die spezifische Bindung verschiedener Radioliganden beschrieben. Da dem Steroid Halistanol-Trisulfat ähnliche Detergens-Eigenschaften zugeschrieben werden,^{358, 361} könnte der Effekt auch

auf die Solubilisierung des Radioliganden durch Mizellbildung zurückgeführt werden.

Der Efeublätterextrakt (*Hedera helix*, *Hederæ heliçis folium*) Prospan[®] aus der Familie der Araliengewächse (*Araliaceae*) wird als Expektorans bei obstruktiven Atemwegerscheinungen mit produktivem Husten als Begleiterscheinung eingesetzt. Therapeutisch nutzt man sowohl seine sekretolytische als auch die bronchospasmolytische Wirkung.² Wichtige Bestandteile des Efeublätterextraktes sind Saponine vom Oleanyltyp, v.a. das Aglykon Hederagenin, das Monodesmosid α -Hederin und das Bisdesmosid Hederacosid C. α -Hederin und Hederacosid C (nach Umwandlung in α -Hederidin) sind pharmakologisch aktiv. Es konnte nachgewiesen werden, dass der sekretolytische und hustendämpfende Effekt auf einer indirekten sympathomimetischen Wirkung des α -Hederin beruht. *In-vitro* konnte eine Hemmung der Internalisierung von β_2 -Rezeptoren durch α -Hederidin gezeigt werden. Durch diesen indirekten Einfluss auf die Regulation der β_2 -Rezeptoren erhöht sich die α_2 -adrenerge Ansprechbarkeit der Zellen. Die Stimulierung der Rezeptoren regt Typ-2-Alveolarepithelzellen an, vermehrt Surfactant zu bilden, wodurch der zähe Bronchialschleim verflüssigt werden kann. Dieser sekretolytische Effekt führt letztendlich auch zur Hustendämpfung.³⁶²

Die Detergens-Effekte der Saponine bzw. des Halistanol-Trisulfat könnten ebenfalls dem Pflanzenextrakt **STW5** zugeschrieben werden. Da sich **STW5** (Iberogast[®]) aus vielen Einzelkomponenten zusammensetzt, kann an dieser Stelle nicht geschlussfolgert werden, welche Komponente hierfür verantwortlich ist. Konkurrenzexperimente an Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren und darauf aufbauende [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien aller einzelnen Bestandteile wären dafür notwendig.

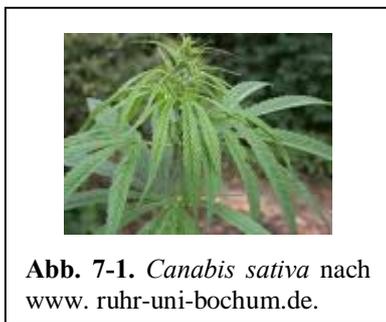
Die partiell agonistischen Eigenschaften am A₁-Rezeptor bzw. der inverse Agonismus am A_{2A}-Rezeptor des Schöllkrautes (**STW5 K IX**) sowie die invers agonistischen Eigenschaften (A_{2A}-Rezeptor) der Bitteren Schleifenblume (**STW6**) könnten zur pharmakologischen Wirkung von Iberogast[®] beitragen.

Weiterführende Untersuchungen einzelner Extrakt-Bestandteile, auch an A_{2B}-Rezeptoren, sind erforderlich.

7. FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG NEUER CANNABINOID-REZEPTOR-LIGANDEN

7.1. EINLEITUNG

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden zwei Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen, der Cannabinoid-CB₁- und der CB₂-Rezeptor, entdeckt und kloniert. Die Existenz eines dritten Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen wird diskutiert.³⁶³ Laut Definition handelt es sich um Rezeptoren, die auf cannabinoide Wirkstoffe reagieren, wie z.B. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), ein Naturstoff aus *Cannabis sativa*, sowie dessen biologisch aktive, synthetische Derivate.³⁶⁴ Der



CB₁-Rezeptor wurde im Jahre 1988 von Devane et al. durch Verwendung des tritiierten Cannabinoids **CP55,940** charakterisiert.³⁶⁵ Einige Jahre später (1993) folgte die Entdeckung und Klonierung des CB₂-Subtypen durch Munro et al.^{366, 367} Beide Subtypen weisen eine Sequenzhomologie von 48% auf.³⁶⁴ Der CB₁- und der CB₂-Rezeptor gehören, ebenso wie die Adenosin-Rezeptoren, zur Klasse der G-

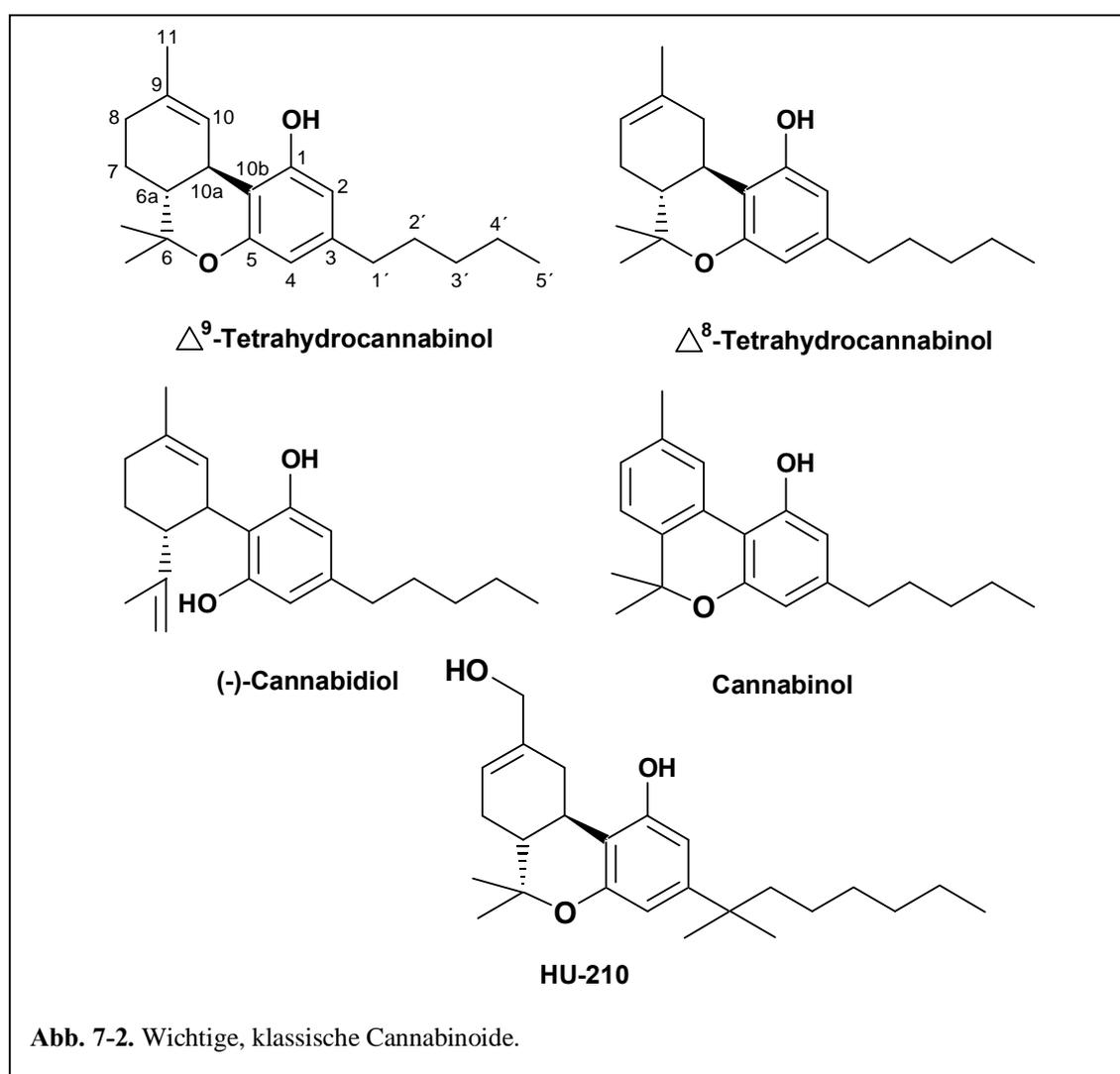
Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie sind G_{i/o}-gekoppelt und über das inhibitorische G-Protein bewirken sie durch Kopplung an die Adenylatcyclase eine Senkung der cAMP-Konzentration.³⁶⁶

Der Cannabinoid-CB₁ und der CB₂-Rezeptor unterscheiden sich in der Expression im Körper. Findet man den CB₁-Rezeptor vorwiegend im Gehirn, so wird der CB₂-Rezeptor eher im peripheren Gewebe des Immunsystems, wie den Mandeln, der Milz und im Knochenmark und in den Immunzellen, nachgewiesen. Im Gehirn weist der CB₁-Subtyp die höchste Dichte im Hippocampus und im cerebralen Cortex auf, in den Basalganglien und im Cerebellum zeigt sich hingegen eine geringe Expression. In der Peripherie ist dieser Subtyp z.B. in den ableitenden Harnwegen, den endokrinen Drüsen, im Ileum und im Vas deferens zu finden.^{364, 366}

Die Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten können in vier Gruppen eingeteilt werden: die klassischen und nicht klassischen Cannabinoide, die Aminoalkylindole und die Eicosanoide.³⁶⁶ Bei den klassischen Cannabinoiden handelt es sich um tricyclische Dibenzopyran-Derivate, die z.T. aus dem Hanf (*Cannabis sativa*) isoliert oder als Analoga synthetisch hergestellt worden sind.³⁶⁴ Zu den meist untersuchten klassischen Cannabinoiden gehören Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, (-)-Cannabidiol, Cannabinol und 11-Hydroxy-dimethylheptyl- Δ^8 -THC (**HU-210**).

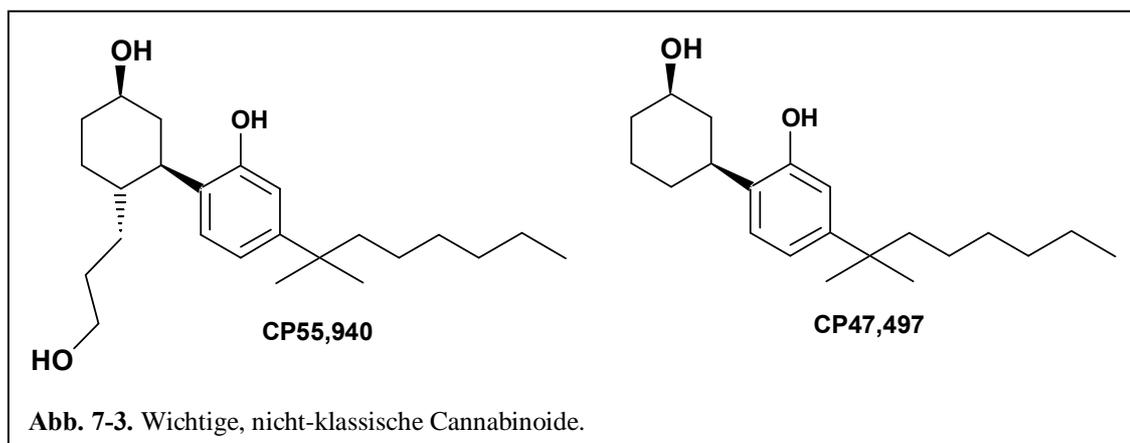
Δ^9 -THC und sein Isomer Δ^8 -THC sowie (-)-Cannabidiol, Cannabinol sind Inhaltsstoffe des Hanfs, während es sich beim **HU-210** um ein synthetisches Derivat des Δ^8 -THC handelt.

Der Pentyl-Rest wurde gegen einen Dimethylheptyl-Substituenten ausgetauscht, mit dem Ziel die Affinität und intrinsische Aktivität zu steigern. Im Allgemeinen können von den klassischen Cannabinoiden folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden. Zum Einen muss eine Dihydrobenzopyran-Struktur mit einer phenolischen OH-Gruppe in Position 1 (frei oder verestert) und eine Alkyl-Gruppe in Position 3 des Aromaten vorhanden sein und zum Anderen muss die Seitenkette in Position 3 eine bestimmte Kettenlänge (Propyl, Butyl oder Pentyl) aufweisen.³⁶⁴ Allerdings zeichnen sich die klassischen Cannabinoide durch eine geringe CB₁/CB₂-Selektivität aus. In Tab. 7-1. sind K_i-Werte einiger ausgewählter Cannabinoid-Rezeptor-Liganden zusammenfassend dargestellt.³⁶⁴



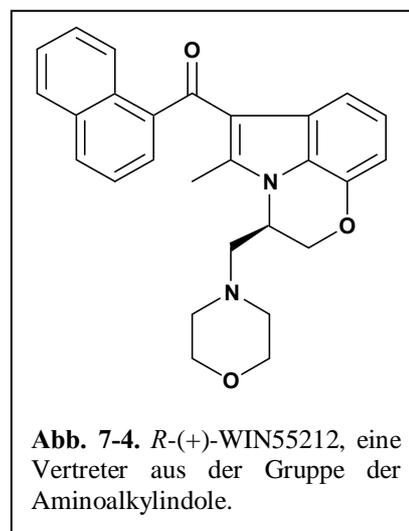
Ein wichtiges Mitglied der Gruppe der nichtklassischen Cannabinoide ist das **CP55,940**. Diesem Analogon des Δ⁹-THC fehlt der Dihydropyran-Ring. Generell stellen die nichtklassischen Cannabinoide bi- oder tricyclische Derivate des Δ⁹-THC dar. **CP47,497**,

synthetisiert von der Firma Pfizer, ist der Prototyp einer zweiten Gruppe von Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten.



Wie bereits erwähnt, ermöglichte **CP55,940** aufgrund seiner geringeren Lipophilie im Vergleich zum Δ^9 -THC damals die Entdeckung und Charakterisierung des CB₁-Rezeptors und stellt heute noch, markiert mit dem Nuklid Tritium, den am weitesten verbreiteten Radioliganden dar, der in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Cannabinoid-Rezeptoren eingesetzt wird.³⁶⁵ Es bindet allerdings mit gleicher Affinität an CB₁- und CB₂-Rezeptoren.³⁶⁴

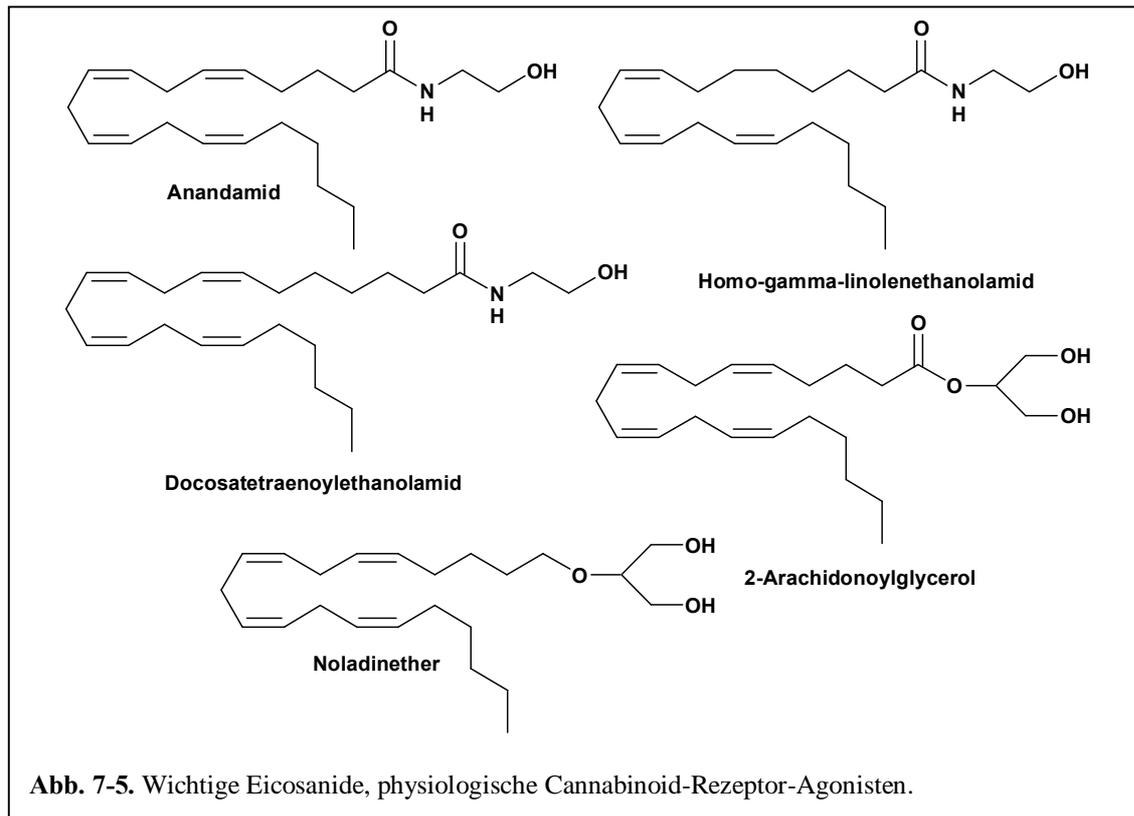
Bis in die frühen 1990er Jahre orientierte sich die Entwicklung von Cannabinoid-Rezeptor-Liganden strukturell am Δ^9 -THC, bis die Firma Sterling Winthrop eine neue Klasse von Aminoalkylindolen veröffentlichte, die cannabimimetische Eigenschaften aufwies. Der am meisten untersuchte und kommerziell erhältliche Vertreter



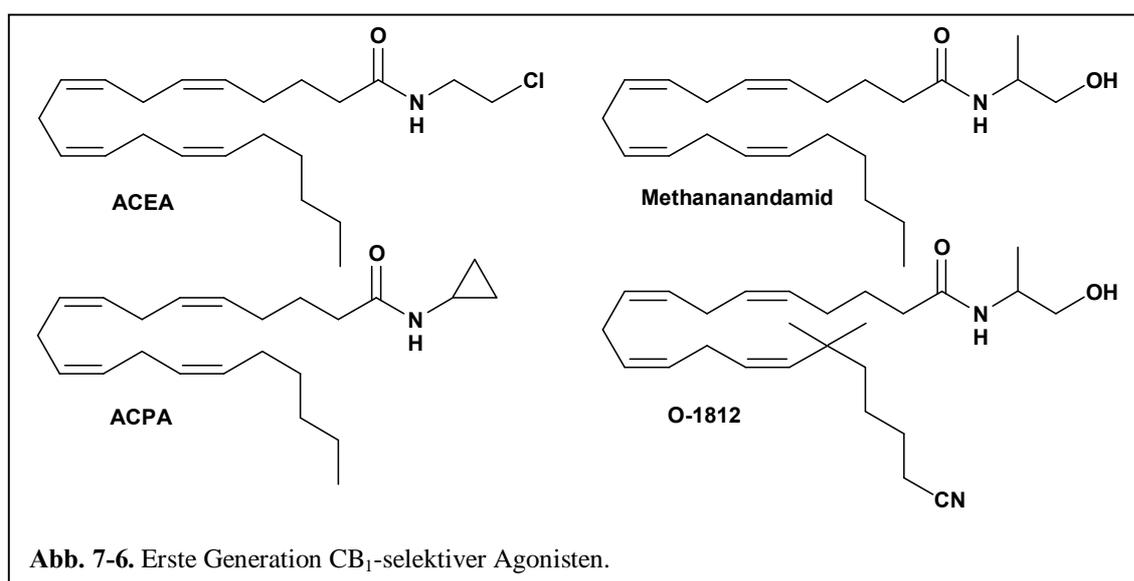
dieser dritten Gruppe von Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten ist das ***R*-(+)-WIN55212**. Diese Substanz besitzt eine hohe Affinität zu beiden Rezeptor-Subtypen mit einer moderaten Selektivität zum CB₂-Rezeptor.

Der prototypische Vertreter der vierten Klasse von Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten ist der endogene Ligand **Anandamid**, der zu der Gruppe der Eicosanoide zählt. Strukturell können die Endocannabinoide mit den Prostaglandinen und Leukotrienen aus der Arachidonsäure-Kaskade verglichen werden.¹⁶ Man entdeckte im Jahre 1992, dass bestimmte Gewebe von Säugetieren eigene, physiologische Liganden für die Cannabinoid-Rezeptoren synthetisieren. Die Gesamtheit der CB₁- und CB₂-Rezeptoren zusammen mit diesen entdeckten Endocannabinoiden

nennt man das „endogene Cannabinoid-System“.³⁶⁶



Neben **Anandamid** wurden noch weitere endogene Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten entdeckt, wie **Homo- γ -linolenylethanolamid**, **Docosa-tetraenoylethanolamid**, **2-Arachidonoylglycerol** und **Noladinether**.^{364, 366, 368}



Eine strukturelle Modifikation der Leitstruktur, die selbst eine höhere Affinität zum CB₁- als zum CB₂-Rezeptor aufweist, führte zur ersten Generation der CB₁-selektiven Agonisten, zu denen **R-(+)-Methanandamid**, Arachidonyl-2'-chloroethyl-amid (**ACEA**), Arachidonylcyclopropylamid (**ACPA**) und **O-1812** gehören.^{364, 368}

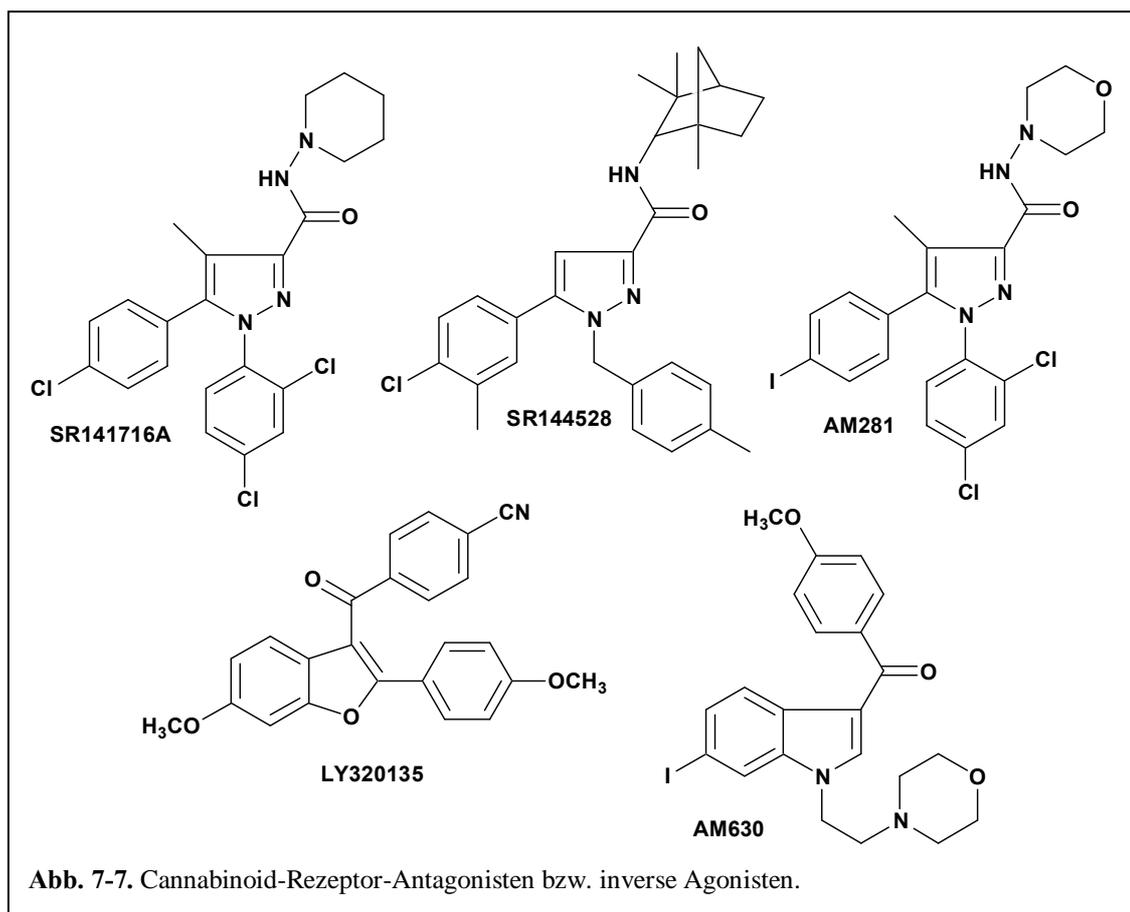


Abb. 7-7. Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten bzw. inverse Agonisten.

Liganden aus der Gruppe Diarylpyrazole fungieren als Antagonisten bzw. inverse Agonisten. Die Verbindungen **SR141716A** und **SR144528** von der Firma Sanofi stellen potente und selektive CB₁- bzw. CB₂-Liganden dar. Zu dieser Gruppe gehört auch das **AM281**, ein Analogon von **SR141716A** und CB₁-selektiver inverser Agonist. Weitere wichtige Liganden mit invers agonistischer Aktivität sind **LY320135**, ein substituiertes Benzofuran und **AM630** (6-Iodopravadolol).^{364, 368}

Tab. 7-1. K_i -Werte einiger wichtiger Cannabinoid- CB_1 und CB_2 -Rezeptor-Liganden.

Ligand	K_i -Wert am CB_1 -Rezeptor [nM]	K_i -Wert am CB_2 -Rezeptor [nM]	Literatur
Δ^9 -THC	40,7	36,4	Showalter et al. ³⁶⁹
HU-210	0,0608	0,524	Felder et al. ³⁷⁰
CP55,940	3,72	2,55	Felder et al. ³⁷⁰
	1,37	1,37	Rinaldi-Carmona et al. ³⁷¹
	0,58	0,69	Showalter et al. ³⁶⁹
<i>R</i> -(+)-WIN55212	1,89	0,28	Showalter et al. ³⁶⁹
	4,4	1,2	Hillard et al. ³⁷²
	9,94	16,2	Rinaldi-Carmona et al. ³⁷¹
Anandamide	89	371	Showalter et al. ³⁶⁹
SR141716A	12,3	702	Showalter et al. ³⁶⁹
AM281	12	4200	Lan et al. ³⁷³

Die Entdeckung des endogenen Cannabinoid-Systems hatte einen großen Einfluss auf die Cannabinoid-Forschung. Bisher hatte sie sich nur auf die Pharmakologie von pflanzlichen Cannabinoiden beschränkt, nun wurde das Gebiet auch auf die Physiologie und Pathophysiologie ausgeweitet. Es wurde gezeigt, dass die Konzentration von endogenen Cannabinoiden im Gewebe oder auch die Cannabinoid-Rezeptor-Dichte bei einigen Erkrankungen erhöht ist.³⁷⁴ Bei der Multiplen Sklerose, beim Schmerz, beim Krebs oder bei der Schizophrenie – um nur einige Beispiele zu nennen – geht man davon aus, dass eine Hochregulierung des endogenen Cannabinoid-Systems die Symptome vermindert und sich positiv auf das Fortschreiten der Krankheit auswirkt.³⁶⁶

Δ^9 -THC (Drabinol) und sein peroral verfügbares, stereoisomeres Derivat **Nabilon** werden als Therapeutika bei Chemotherapie-bedingtem Erbrechen und Übelkeit angewendet. Zudem werden sie zur Appetitanregung bei HIV-Patienten eingesetzt. Weitere potentielle Anwendungsgebiete von Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten sind Asthma, Glaukom und kardiovaskuläre Erkrankungen. Bei neuropathischen Schmerzen und Multipler Sklerose, aber auch bei Spastik oder Schmerzsymptomen wird der standardisierte Cannabis-Extrakt Sativex als sublinguales Spray eingesetzt. Er enthält zu gleichen Teilen Δ^9 -THC und **Cannabidiol** sowie geringfügige Mengen anderer Cannabinoide. Der breite Einsatz von Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten wird durch eine Vielzahl von zentralen Nebenwirkungen der Cannabinoide eingeschränkt.^{364, 375, 376} Aus diesem Grund liegt der Hauptfokus in der Forschung und

Entwicklung auf den Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten und inversen Agonisten, da deren Wirkung nicht von psychotropen Nebenwirkungen wie Sucht oder Abhängigkeit begleitet wird.^{371, 377, 378} Aufgrund der Appetit-stimulierenden Wirkung der CB₁-Rezeptor-Agonisten werden Antagonisten bei Übergewicht angewendet. Der erste publizierte inverse Agonist **SR141716A** (Rimonabant) wird erfolgreich in der Behandlung von Übergewicht bzw. Hyperlipidämie eingesetzt.^{371, 379-381} Ein weiteres Anwendungsgebiet stellt die Raucherentwöhnung dar und auch bei alkoholabhängigen Patienten zeigte Rimonabant einen positiven Effekt.^{376, 382}

Romero et al. veröffentlichten im Jahre 2002 eine Publikation über die Rolle von Endocannabinoiden auf wichtige neurobiologische Funktionen, insbesondere auf Bewegungsabläufe. Darauf basierend wird der Einsatz von CB₁-Antagonisten bei Morbus Parkinson bzw. Morbus Huntington diskutiert. Des Weiteren könnten Antagonisten bei Dyskinesien und Dystonien angewendet werden.²⁵⁵

Die physiologische Rolle der CB₂-Rezeptoren muss noch genau definiert werden. Es sind aber Studien über den Einsatz von CB₂-Agonisten bei chronischem Schmerz, insbesondere dem neuropathischem Schmerz, bei Entzündungen und allergischen Erkrankungen erschienen.³⁷⁶

7.2. ÜBERTRAGUNG DER KOMPETITIONSEXPERIMENTE AN CANNABINOID-CB₁- UND CB₂-REZEPTOREN VOM STANDARD- AUF DAS HIGH-THROUGHPUT-VERFAHREN

Im Rahmen ihrer Diplomarbeit entwickelte Frau Dr. Kerstin Atzler ein Standard-Verfahren zur Durchführung von Konkurrenzexperimenten am humanen und Ratten-Cannabinoid-CB₁-Rezeptor und am humanen CB₂-Rezeptor.³⁸³ Durch Variation einzelner Parameter, wie dem Lösungsmittel der Testsubstanzen und des eingesetzten Radioliganden, der verwendeten Filter und der Art der Filterimprägnierung, der Protein- und Radioligandkonzentration, der Zusammensetzung des Inkubations- und Waschpuffers, der Inkubationstemperatur, der Aufreinigungsschritte des verwendeten Proteins und der eingesetzten Gefäße, konnte folgendes optimiertes Pipettierschema erhalten werden (siehe Kap. 9.8.2., Experimenteller Teil).

Pipettierschema (24er- und 48er-Format):

25 µl	DMSO (Gesamtbindung) oder 10 µM CP55,940 in DMSO (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in DMSO
775 µl	50 mM Tris-Puffer, 3 mM MgCl ₂ , 0,1 % BSA, pH 7,4
100 µl	Radioligand [³ H]CP55,940 (Endkonzentration: 0,1 nM, K _D -Wert: 0,58 nM) in 50 mM Tris-Puffer, 0,1 % BSA, pH 7,4
100 µl	Proteinsuspension: Rattencortex- bzw. humane rekombinante CB ₁ oder CB ₂ - Membranpräparation (50 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
1000 µl	Endvolumen

Bei der Durchführung von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien muss darauf geachtet werden, die lipophilen Cannabinoide in Lösung zu bringen und zu halten. Aufgrund ihrer chemischen Struktur besitzen sie nur eine geringe Wasserlöslichkeit.³⁶⁸ Aus dem Grund ist der Einsatz von lösungsvermittelnden Vehikeln unumgänglich. Da DMSO in geringen Konzentrationen keinerlei eigene pharmakologische Wirkung besitzt, stellt es unter diesen Bedingungen mit einer max. Endkonzentration von 2,5% ein geeignetes Lösungsmittel für die Test- und Referenzsubstanzen dar.³⁶⁴ Bovines Serumalbumin (BSA) dient ebenfalls als lösungsvermittelndes Agens, welches darüber hinaus die Adsorption der Cannabinoide (Testsubstanzen und Radioliganden) an den Wandungen der eingesetzten Reaktionsgefäße verhindert. Analog zu einigen Publikationen wurde eine optimale Konzentration von 0,1% BSA eingesetzt, da in diesem Bereich das Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Bindung am günstigsten ist.^{364, 365} Die Zusammensetzung des Inkubations- und Waschpuffers kann in einem Konkurrenzexperiment sehr entscheidend sein. Einem 50 mM Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 wurden 3 mM Magnesiumchlorid zugesetzt. Wie bereits in Kap. 2.1. diskutiert, können Magnesium-Ionen bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren den hochaffinen Zustand des

Rezeptors fördern, was die Bindung von Agonisten erleichtert.^{365, 368} Auf einen Zusatz des Komplexbildners EDTA, der eine endogene proteolytische Reaktion an Zelloberflächen- und solubilisierten Rezeptoren vermindert, wurde verzichtet.³⁸³ BSA wurde nicht nur dem Inkubationspuffer, sondern auch dem Waschpuffer zugesetzt, was zu einer weiteren Erniedrigung der unspezifischen Bindung führte. GF/C-Filter weisen eine größere Poren-Größe als GF/B-Filter auf und unbehandelt führte deren Einsatz zu einer weiteren Verminderung der unspezifischen Bindung. Eine anschließende Trocknung des Filters im Trockenschrank verbesserte dieses Ergebnis noch, da sich die lipophilen Cannabinoide in einem getrockneten Filter im Szintillationscocktail besser lösen.

Die Optimierung der oben diskutierten Parameter führte schließlich zur Etablierung eines Pipettierschemas für Konkurrenzexperimente an CB₁- und CB₂-Rezeptoren, die eine durchschnittliche unspezifische Bindung von 20% aufwiesen und daher für reproduzierbare Bindungsstudien eingesetzt werden konnten.

Ausgehend von dem oben genannten Pipettierschema, sollte dieses Standardverfahren nun auf ein High-Throughput-Verfahren (HTS) umgestellt werden. In unserem Arbeitskreis wurden bereits einige Standardassays erfolgreich auf dieses kostengünstigere und effizientere HTS-Verfahren umgestellt.³¹⁴ Da für Versuchsreihen mit dem 96er-Harvester nur Mikrotiterplatten mit einem max. Volumen von 200 bzw. 600 µl zur Verfügung stehen, wurde das Endvolumen von 1000 µl auf 600 µl reduziert, so dass sich folgendes Pipettierschema ergab. Eine Umstellung dieses Schemas für den Einsatz einer Multipette, was eine Veränderung der Zusammensetzung des Pipettierschemas nach sich gezogen hatte, brachte kein positives Ergebnis. 50 µl Tris/DMSO (70:30) bzw. CP55,940 (10 µM) bzw. Testsubstanz in Tris/DMSO (70:30) wurden mit 450 µl Inkubationspuffer, 50 µl Proteinsuspension und 50 µl Radioligand-Lösung nach den untenstehenden Bedingungen inkubiert.

Pipettierschema (96er-Format):

15 µl	DMSO (Gesamtbindung) oder 10 µM CP55,940 in DMSO (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in DMSO
465 µl	50 mM Tris-Puffer, 3 mM MgCl ₂ , 0,1 % BSA, pH 7,4
60 µl	Radioligand [³ H]CP55,940 (Endkonzentration: 0,5 nM, K _D -Wert: 0,58 nM) in 50 mM Tris-Puffer, 0,1 % BSA, pH 7,4
60 µl	Proteinsuspension: Rattencortex- bzw. rekombinante humane CB ₁ oder CB ₂ - Membranpräparation (50 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
600 µl	Endvolumen

Für die Überprüfung des Standardverfahrens wurden die Referenzsubstanzen **CP55,940** und **WIN55212** ausgewählt, die sowohl eine Bindungsneigung zum CB₁- als auch zum CB₂-Rezeptor aufweisen. Für Konkurrenzexperimente am Ratten-Cannabinoid-CB₁-Rezeptor wurden beide Substanzen eingesetzt, für Experimente am CB₂-Subtypen nur die Verbindung **CP55,940**. Da in Versuchsreihen mit dem 96er-Harvester im Allgemeinen eine geringere Anzahl von Zerfällen pro Minute (cpm) registriert wird, wurde die Radioligand-Konzentration von 0,1 auf 0,5 nM erhöht. In Abb. 7-8 sind die Inhibitionskurven der verwendeten Referenzsubstanzen am CB₁- und CB₂-Rezeptor vergleichend dargestellt.

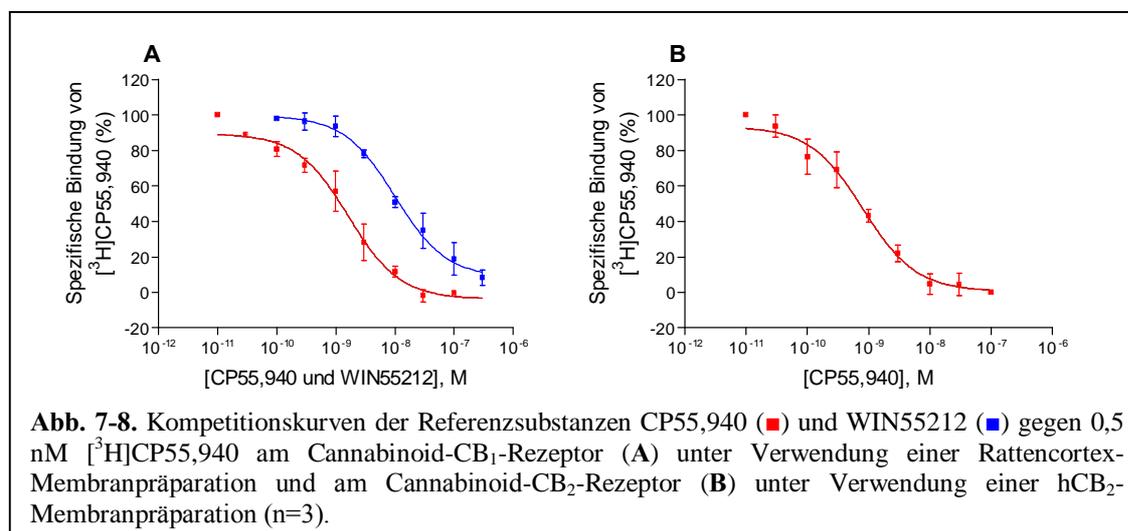


Abb. 7-8. Konkurrenzkurven der Referenzsubstanzen CP55,940 (■) und WIN55212 (■) gegen 0,5 nM [³H]CP55,940 am Cannabinoid-CB₁-Rezeptor (A) unter Verwendung einer Rattencortex-Membranpräparation und am Cannabinoid-CB₂-Rezeptor (B) unter Verwendung einer hCB₂-Membranpräparation (n=3).

Für die Verbindung **CP55,940** wurde am CB₁-Rezeptor ein K_i-Wert von $1,24 \pm 0,58$ nM und am CB₂-Rezeptor ein K_i-Wert von $0,404 \pm 0,012$ nM ermittelt. In der Literatur sind für **CP55,940** K_i-Werte von 1,37 bzw. 0,69 nM angegeben.^{369, 371} Ähnliches gilt für die Verbindung **WIN55212**. Mit einem K_i-Wert von $6,06 \pm 0,62$ nM, verglichen mit einem Literaturwert von 4,4-9,94 nM, zeigt sich auch hier eine gute Übereinstimmung.^{371, 372}

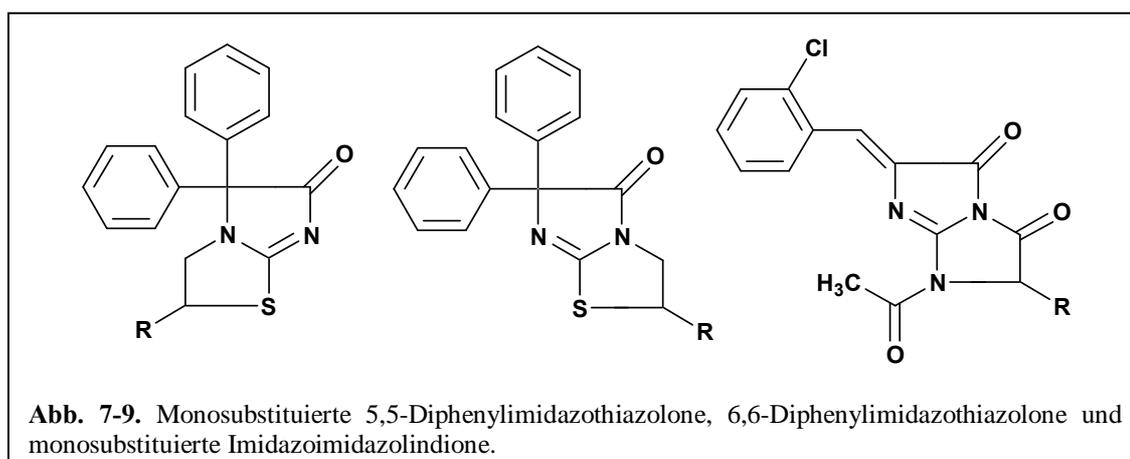
Demnach lässt sich der Standardassay für den CB₁- und den CB₂-Rezeptor problemlos auf das HTS-Format übertragen, welches zukünftig für die Untersuchung von Substanzbibliotheken eingesetzt werden kann.

Die in Kap. 7.3. und 7.4. genannten Verbindungen wurden teils im Standard- teils im HTS-Verfahren untersucht.

7.3. CHARAKTERISIERUNG VON IMIDAZOTHIAZEPINONEN ALS NEUE CANNABINOID-CB₁- UND CB₂-REZEPTOR-LIGANDEN

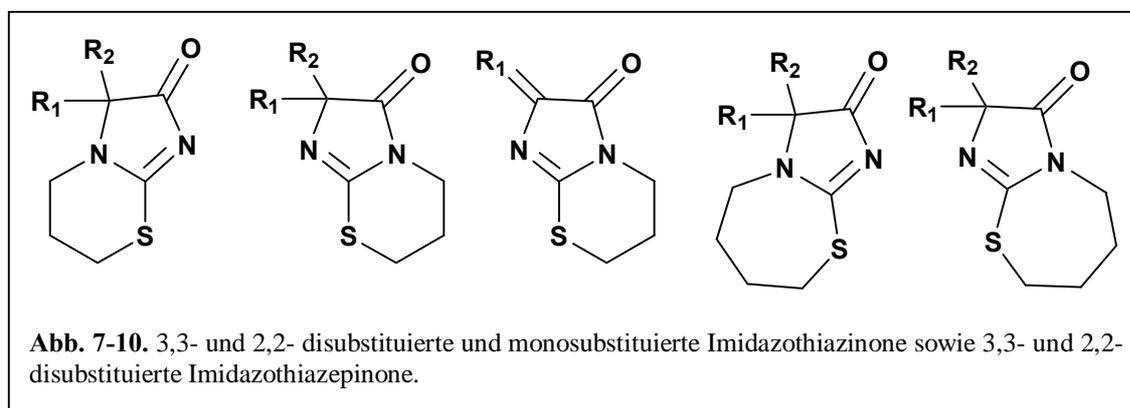
Die im Rahmen dieses Projektes untersuchten Substanzen wurden von Frau Prof. Dr. Kiec-Kononowicz aus Krakau, Polen zur Verfügung gestellt. Eine erste Serie von Verbindungen wurde von Frau Dr. Kerstin Atzler in Konkurrenzexperimenten an Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptoren charakterisiert.³⁸⁴ Das Ziel war die Entwicklung von inversen Agonisten für beide Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen. Wie bereits erwähnt, haben Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten bzw. inverse Agonisten ein hohes therapeutisches Potential.^{371, 377, 378} Das breite Anwendungspotential von Antagonisten und inversen Agonisten führte, in Anlehnung an die Biarylpyrazol-Struktur von **SR141716A**, zur Synthese und Charakterisierung zahlreicher neuer, heterozyklischer Verbindungen, wie Triazolen, Thiazolen, Pyrazolinen, Imidazolen und Pyridinen.³⁸⁵ Frau Dr. Atzler untersuchte verschiedene Heterozyklen, wie monosubstituierte Diphenylimidazothiazolone, monosubstituierte Imidazoimidazoldione, Imidazothiazinone und Imidazothiazepinone.³⁸⁴

Dabei zeigte sich, dass monosubstituierte 5,5-Diphenylimidazothiazolone und 6,6-Diphenylimidazothiazolone sowie monosubstituierte Imidazoimidazolindione keine Affinität zum Ratten-CB₁-Rezeptor aufweisen (siehe Abb. 7-9).



Im Vergleich zu einem 3,3-diphenyl-substituierten Imidazothiazinon-Derivat besaß das 2,2-diphenyl-substituierte Imidazothiazinon-Derivat eine größere Bindungsneigung zum CB₁-Rezeptor. Ein Phenoxyphenyl-Rest in Position 2 erhöhte die Affinität zu diesem Rezeptor-Subtyp. Eine geringfügige Steigerung wurde durch die Einführung eines Benzyloxyphenylmethyliden-Restes erzielt. Das *p,m*-Dichlorphenyl-Derivat dieser Struktur war allerdings noch deutlich aktiver (siehe Abb. 7-10).

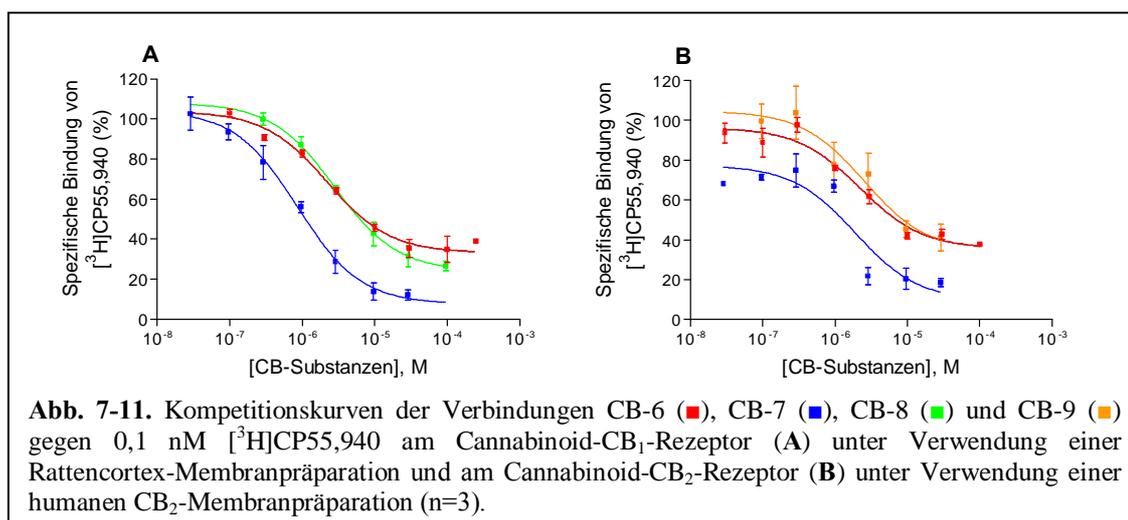
Eine Erweiterung des Schwefel-Heterozyklus zum Thiazepin-Ring führte ebenfalls zu Substanzen mit einer Haftungsneigung zum Ratten-CB₁-Rezeptor (siehe Abb. 7-10). Dabei band 3,3-Diphenylimidazo[1,2-*d*][1,4]thiazepin mit einer 6-fach geringeren Neigung an den Rezeptor als sein Imidazo[1,2-*d*][1,3]thiazepin-Analoges, was auch anhand von Bindungsstudien mit dem humanen CB₁-Rezeptor bestätigt werden konnte. Somit war die Annelierung des Schwefel-Heterozyklus über den Amid-Stickstoff günstiger als über den Nicht-Amidstickstoff. Unter den untersuchten Imidazo[1,2-*d*][1,4]thiazepinonen zeigte das 4-Chlorbenzyloxy-Derivat die höchste Affinität, was allerdings mit einem Verlust an Selektivität einherging, da diese Verbindung nicht nur an Ratten- und humanen CB₁-Rezeptoren aktiv war, sondern auch an humanen CB₂-Rezeptoren. Das 1,4-Dichlor-Derivat wies eine geringfügig verminderte Bindungsneigung mit einem K_i-Wert im niedrigen mikromolaren Bereich auf.³⁸⁴



Basierend auf diesen Ergebnissen wurden nun weitere Imidazothiazepinone vom Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Kiec-Kononowicz synthetisiert und sollten in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien auf ihre Affinität zu Ratten-CB₁ und humanen CB₂-Rezeptoren untersucht werden. Die Bindungsstudien wurden mit dem Radioliganden [³H]CP55,940 an einer Rattencortex-Membranpräparation, die den Ratten-CB₁-Rezeptor nativ exprimiert, und an einer von der Firma Perkin Elmer kommerziell erhältlichen humanen CB₂-Membranpräparation unter Verwendung des 24er bzw. 48er Harvesters durchgeführt.³⁶⁵ Die potentesten Verbindungen dieser Substanzklasse und einer weiteren sollten in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an den oben genannten Membranpräparationen sowie an einer humanen CB₁-Membranpräparation, die ebenfalls von der Firma Perkin Elmer erworben wurde, weiter charakterisiert werden.

7.3.1. KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN RATTEN-CANNABINOID-CB₁- UND HUMANEN CANNABINOID-CB₂-REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN

Die Strukturen der Imidazothiazepinon-Derivate aus dem Arbeitskreis Kiec-Kononowicz sowie die Ergebnisse aus kompetitiven Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien sind in Tab. 7-2 dargestellt. Abb. 7-11 zeigt Inhibitionskurven der Verbindungen **CB-6-9** an Ratten-CB₁ bzw. humanen CB₂-Rezeptoren.

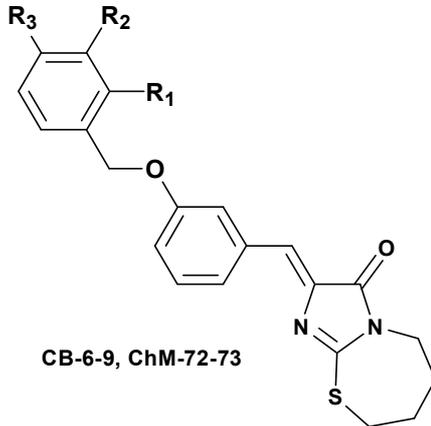


Die Verbindungen **ChM-72** und **ChM-73** wurden bereits von Frau Dr. Atzler in Kompetitionsexperimenten an beiden Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen untersucht.³⁸⁴ **ChM-72** war mit einem K_i-Wert von 0,82 ± 0,09 μM unter den bereits untersuchten Imidazo[1,2-d][1,4]thiazepinonen das Derivat mit der höchsten Affinität zum CB₁-Rezeptor. Nun zeigt sich, dass der Austausch des Chlor- durch einen kleineren Fluor-Substituenten zu einer Affinitätssteigerung führt (**CB7**). Für diese Verbindung wurde ein K_i-Wert von 0,73 ± 0,04 μM ermittelt. Allerdings wird nicht nur die Bindungsneigung zum CB₁-Rezeptor, sondern auch zum CB₂-Rezeptor-Subtypen erhöht. Verglichen mit der Verbindung **CB-6**, die einen unsubstituierten, endständigen Phenyl-Ring besitzt, wird deutlich, dass ein Halogen-Substituent in *para*-Position zu einer Affinitätssteigerung dieser Substanzen zum CB₁-Rezeptor führt (**CB-7** und **ChM-72**). Die Affinität zum CB₂-Rezeptor wird durch einen Fluor-Substituenten in dieser Position positiv (**CB-7**), durch einen Chlor-Substituenten allerdings negativ beeinflusst (**ChM-72**).

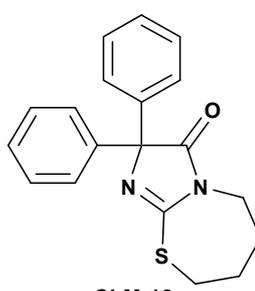
Ein Chlor-Substituent in *meta*-Stellung geht zwar mit einem Wirkungsverlust einher, allerdings wird die Selektivität dieser Verbindung gegenüber dem CB₂-Rezeptor erhöht (**CB-8**). Wird der

Phenyl-Ring in *ortho*-Stellung mit Chlor substituiert, so erhält man eine Verbindung, die neben einer Haftungsneigung zum CB₂-Rezeptor mit einem K_i-Wert von $0,98 \pm 0,23 \mu\text{M}$ eine Selektivität gegenüber dem CB₁-Rezeptor aufweist (**CB-9**). Eine Disubstitution in *ortho*- und *para*-Stellung (**ChM-73**) wird, im Vergleich zu den monosubstituierten Derivaten (**CB-9** und **ChM-72**) nicht sehr gut toleriert. Im Allgemeinen hat neben der Position des Thiazepin-Ringes (**ChM-18** und **48**) die Einführung eines voluminöseren Restes in Position 2 der Imidazo[1,2-*d*][1,4]thiazepinone einen positiven Einfluss auf die Wirkung dieser Substanzen an Cannabinoid-Rezeptoren (vgl. **ChM-18** gegenüber **CB-6-9** und **ChM-72-73**).

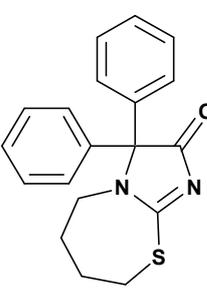
Tab. 7-2. Affinitäten substituierter Imidazothiazepinone an humanen und Ratten-Cannabinoid-Rezeptoren.



CB-6-9, ChM-72-73



ChM-18



ChM-48

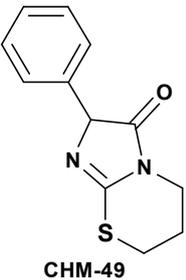
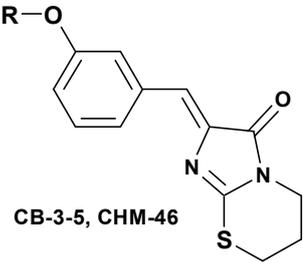
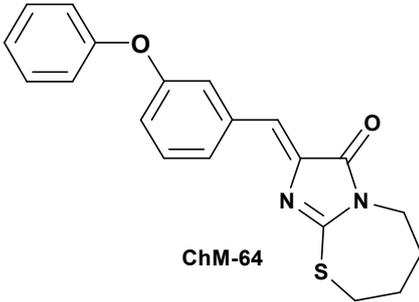
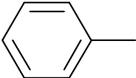
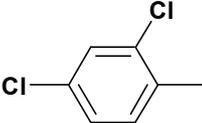
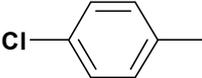
Verb.	R ₁	R ₂	R ₃	K _i ± SEM [μM]		
				bzw. Inhibition in % (Konzentration), n = 3		
				CB ₁ Ratte [³ H]CP55,940	CB ₁ Mensch [³ H]CP55,940	CB ₂ Mensch [³ H]CP55,940
CB-6	H	H	H	2,01 ± 2,25	n.d.	1,81 ± 0,34
CB-7	H	H	F	0,73 ± 0,04	n.d.	1,56 ± 0,34
CB-8	H	Cl	H	2,46 ± 0,21	n.d.	> 10 37 ± 8 (10 μM)
CB-9	Cl	H	H	> 10 35 ± 7 (10 μM)	n.d.	0,98 ± 0,23
ChM-72	H	H	Cl	0,82 ± 0,09^a	0,25 ± 0,06^a	4,15 ± 0,39^a
ChM-73	Cl	H	Cl	2,53 ± 0,89^a	n.d.	n.d.
ChM-18				3,94 ± 0,10^a	1,34 ± 0,37^a	n.d.
ChM-48				21,3 ± 2,2^a	n.d.	> 10^a 10 ± 2 (10 μM)

^aDr. Kerstin Atzler³⁸⁴, n.d. = nicht durchgeführt

7.3.2. [³⁵S]GTPγS-BINDUNGSSTUDIEN AN HUMANEN UND RATTEN-CANNABINOID-CB₁ UND HUMANEN CB₂-REZEPTOREN

Die Verbindungen aus der Substanzklasse der Imidazothiazepinone, die die höchste Affinität zu Cannabinoid-CB₁ und/oder CB₂-Rezeptoren aufwiesen, wurden in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an einer den Ratten-CB₁-Rezeptor nativ exprimierenden Rattencortex- und an kommerziell erhältlichen humanen CB₁- und CB₂-Membranpräparationen weiter charakterisiert, um Hinweise auf ihre Funktionalität (agonistisch, antagonistisch) zu erhalten (CB-6-9, ChM-18, 48, 72-73). Zusätzlich wurden mit substituierten Imidazothiazinonen (CB-3-5, ChM-46, 49) und einem weiteren Imidazothiazepinon-Derivat (ChM-64), welche von Frau Dr. Atzler in Konkurrenzexperimenten getestet worden waren, ebenfalls [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien durchgeführt.

Tab. 7-3. Affinitäten substituiertes Imidazothiazinone und Imidazothiazepinone an humanen und Ratten-Cannabinoid-Rezeptoren.

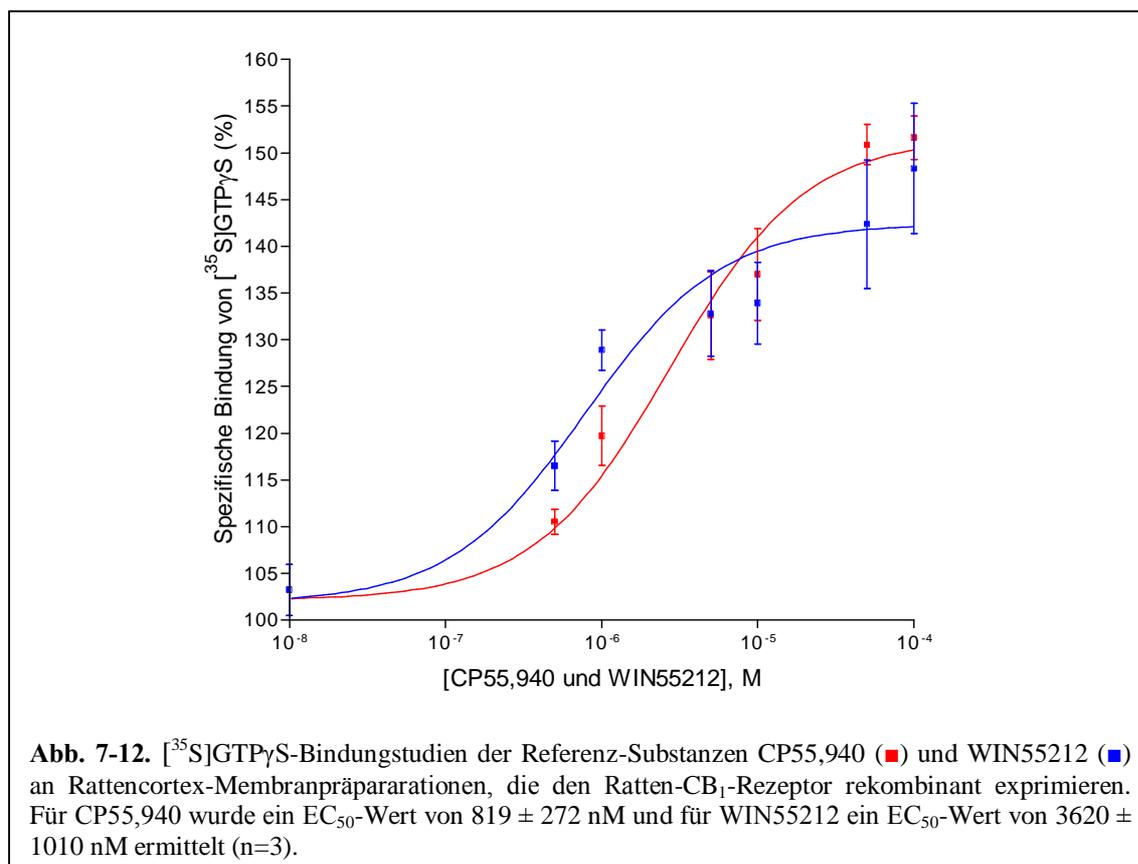
Verb.	R	K _i ± SEM [μM] bzw. Inhibition in % (Konzentration), n = 3	
		CB ₁ Ratte [³ H]CP55,940	CB ₂ Mensch [³ H]CP55,940
ChM-49		7,68 ± 1,68 ^a	> 10 ^a 5 ± 4 (10 μM)
CB-3-5, ChM-46			
ChM-64			
CB-3		4,22 ± 1,36 ^a	n.d.
CB-4		0,55 ± 0,22 ^a	n.d.
CB-5		8,24 ± 4,11 ^a	n.d.
ChM-46		6,58 ± 1,77 ^a	> 10 ^a 9 ± 6 (10 μM)
ChM-64		3,63 ± 0,21 ^a	n.d.

^aDr. Kerstin Atzler³⁸⁴, n.d. = nicht durchgeführt

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Strukturen und K_i -Werte dieser Verbindungen an Ratten-CB₁- und humanen CB₂-Rezeptoren in Tab. 7-3 aufgeführt.

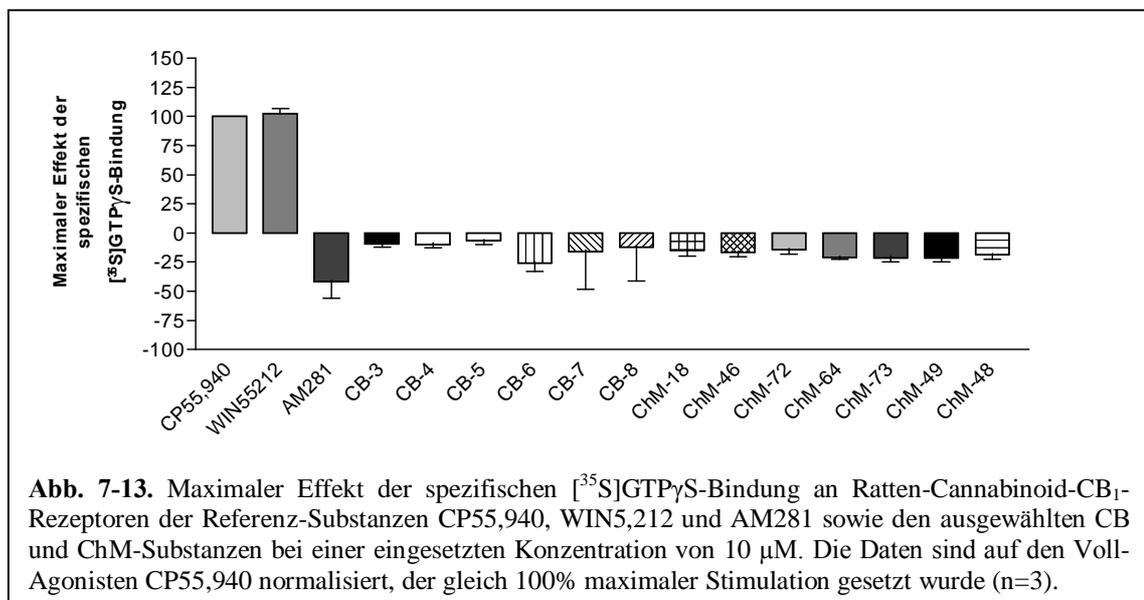
Die [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an CB₁- und CB₂-Rezeptoren werden abgesehen von einigen Modifikationen analog den Bindungsstudien an Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren durchgeführt.^{386, 387}

Als Referenzsubstanzen wurden die Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptor Agonisten **CP55,940** und **WIN55212** verwendet. Zusätzlich wurden für Bindungsstudien am CB₁-Rezeptor der inverse Agonist **AM281** eingesetzt. Aufgrund der hohen Lipophilie konnte sowohl für die Referenz- als auch die Testsubstanzen nur eine maximale Konzentration von 10 μM eingesetzt werden.



Wie in Abb. 7-12 deutlich zu erkennen ist, führen die eingesetzten Cannabinoid-CB₁-Rezeptor-Agonisten **CP55,940** und **WIN55212** in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Erhöhung der [³⁵S]GTPγS-Bindung mit EC₅₀-Werten von 819 ± 272 nM bzw. 3620 ± 1010 nM. Ein Vergleich mit Literaturdaten hat ergeben, dass die in unserem Arbeitskreis ermittelten EC₅₀-Werte stark von den Literaturwerten abweichen. Dyson et al. bestimmte in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien für **CP55,940** einen EC₅₀-Wert von 0,4 nM am humanen CB₁-Rezeptor,³⁸⁸ während Griffin et al.

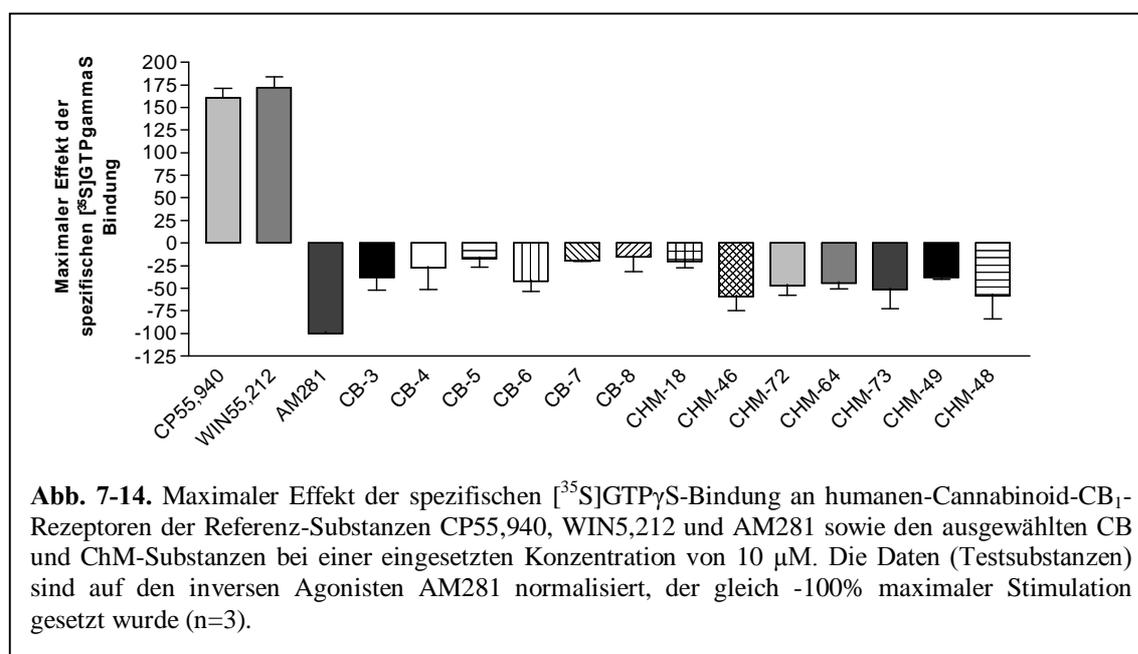
EC₅₀-Werte von 17,6 bzw. 151 nM für die **CP55,940** bzw. **WIN55212** am Rattenhirn-Cerebellum ermittelten.³⁸⁹ Diese Abweichung können damit begründet werden, dass unser Arbeitskreis einerseits Rattencortex-Membranpräparationen für [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien einsetzte. Zellen, die mit einem Rezeptor stabil transfiziert worden sind, weisen im Allgemeinen eine höhere Expression an Rezeptoren auf, als das native Gewebe. Daraus kann eine höhere *Efficacy* für Agonisten resultieren. Dyson et al. verwendeten in ihren [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien HEK293-Zellen, die den humanen CB₁-Rezeptor exprimierten. Andererseits führte die Arbeitsgruppe um Griffin et al. die Bindungsstudien am Ratten-Cerebellum bei einer GDP-Konzentration von 100 μM durch. Sie liegt damit um den Faktor 3,3 höher als die von uns eingesetzte Konzentration. Somit können die ermittelten EC₅₀-Wert von **CP55,940** und **WIN55212** nicht explizit verglichen werden.



Die Voll-Agonisten **CP55,940** und **WIN55212** zeigen bei einer eingesetzten Konzentration von 10 μM in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Ratten-CB₁-Rezeptoren einen max. Effekt von 132 ± 3 % bzw. 133 ± 2 % (Basalwert = 100 %). Wird die kommerziell erhältliche humane CB₁-Membranpräparation verwendet, so ist bei einem Basalwert von 100 % eine Steigerung des max. Effektes auf 161 ± 11 % bzw. 172 ± 12 % zu verzeichnen. Dies lässt sich auf die höhere Rezeptordichte in der humanen rekombinanten CB₁-Membranpräparation zurückführen. In Abb. 7-13 ist der maximale Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung der Referenz-Substanzen **CP55,940**, **WIN55212** und **AM281** sowie ausgewählten **CB** und **ChM**-Substanzen an Ratten-Cannabinoid-CB₁-Rezeptoren dargestellt. Der invers-agonistische Effekt von **AM281** ist in dem nativen Gewebe weniger gut sichtbar als in den rekombinanten Zellen (vgl. Abb. 7-14).

Rimonabant (**SR141716A**) zeigte in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien am Rattenhirn-Cerebellum einen neutral antagonistischen Effekt, während es sich bei dieser Verbindung in Bindungsstudien an CHO-Zellen, die mit dem CB₁-Rezeptor stabil transfiziert wurden, um einen inversen Agonisten handelte.³⁷⁵ Dieser Effekt lässt sich auch bei den untersuchten Verbindungen aus den Substanzklassen der Imidazothiazinone und Imidazothiazepinone sowie bei **AM281** erkennen.

Da der invers agonistische Effekt in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an einer humanen CB₁-Membranpräparation ausgeprägter war, wurden die erhaltenen Daten zur besseren Vergleichbarkeit hier auf den inversen Agonisten **AM281** normalisiert, der gleich -100 % maximaler Stimulation gesetzt wurde (siehe Abb. 7-14).

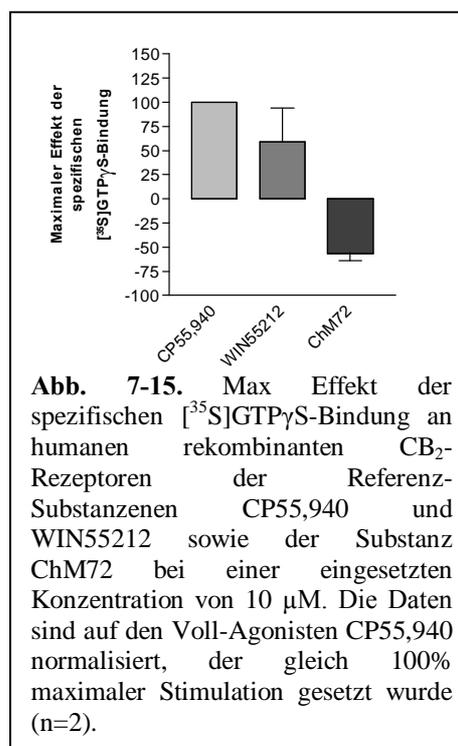


Zur Substanzklasse der Imidazothiazinone gehören die Verbindungen **CB-3-5**, **ChM-46** und **49**. Bei den Verbindungen **CB-6-9**, **ChM-72**, **73** und **64** handelt sich hingegen um Imidazothiazepinon-Derivate. Die Verbindungen **ChM-18** und **48** besitzen ebenfalls einen Thiazepin-Ring und können in diese Klasse eingeordnet werden. Der invers-agonistische Effekt tritt sowohl bei den Imidazothiazinon- als auch bei den Imidazothiazepinon-Derivate auf. Somit hängt die Größe des Effektes nur von dem jeweiligen Substitutionsmuster ab. Den höchsten invers-agonistischen Effekt besitzen die Verbindungen **CB-4**, **ChM-46**, **48**, **72**, **73** und **64** mit einem max. Effekt von 73-79 % (Basalwert: 100 %). Das unsubstituierte Derivat **ChM-46** hat unter diesen Verbindungen die ausgeprägteste inverse intrinsische Aktivität (73 ± 5 %). Während eine 2,4-Dichlorphenyl-Substitution zu einer Erhöhung der Affinität zum CB₁-

Rezeptor führte (**CB-4** gegenüber **ChM-46**), hat dieses Substitutionsmuster keinen Einfluss auf die intrinsische Aktivität ($74 \pm 9 \%$). Bei **ChM-73** handelt es sich um das Imidazothiazepinon-Analogon zu **CB-4**. Dieses Derivat besitzt einen geringfügig niedrigen max. Effekt ($77 \pm 9 \%$). Das 2-Chlorphenyl-Derivat zu **ChM-73** hat eine ähnliche Aktivität (**ChM-72**: $78 \pm 6 \%$). Bei **CB-5**, einem Imidazothiazinon-Analogon zu **ChM-72**, zeigt sich, dass die Imidazothiazepinon-Struktur zu Substanzen mit einer größeren negativen intrinsischen Aktivität führt ($92 \pm 5 \%$). Betrachtet man allerdings die unsubstituierten Derivate **CB-3** (Imidazothiazinon-Struktur) und sein Analoges **CB-6** (Imidazothiazepinon-Struktur), so geht dieser Effekt verloren. Dies setzt sich auch bei den Verbindungen **CB-7** und **CB-8** fort. Es wurde zwar gezeigt, dass das 3,3-Diphenylimidazo[1,2-*d*][1,4]thiazepin (**ChM-48**) mit einer 6-fach geringeren Neigung an den Rezeptor bindet als sein Imidazo[1,2-*d*][1,3]thiazepin-Analoges (**ChM-18**), allerdings besitzt **ChM-48** eine höhere negative intrinsische Aktivität ($75 \pm 8 \%$ gegenüber $92 \pm 2 \%$). In diesem Fall ist die Annelierung des Schwefel-Heterozyklus über den Nicht-Amid-Stickstoff günstiger als über den Amid-Stickstoff. Das Imidazothiazinon-Derivat **ChM-49** passt nicht in dieses Raster und weist einen max. Effekt von $82 \pm 2 \%$ auf.

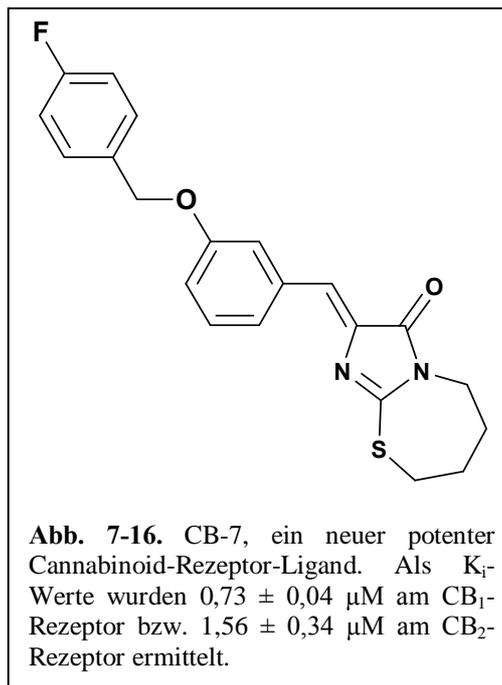
Mit der Verbindung **ChM-72** und den Referenzsubstanzen **CP55,940** und **WIN55212** wurden zusätzlich [^{35}S]GTP γ S-Bindungsstudien an humanen rekombinanten CB₂-Rezeptoren durchgeführt. **CP55,940** und **WIN55212** zeigten bei einer eingesetzten Konzentration von 10 μM einen max. Effekt von $156 \pm 14 \%$ bzw. $128 \pm 11 \%$ (Basalwert: 100 %). Savinainen et al. charakterisierte

CP55,940 als Voll-Agonisten und **WIN55212** als Partial-Agonisten am CB₂-Rezeptor.³⁸⁷ Mit einem max. Effekt von $68 \pm 12 \%$ zeigt die Verbindung **ChM-72** nicht nur am Cannabinoid-CB₁-Rezeptor einen invers-agonistischen Effekt, sondern auch am CB₂-Rezeptor.



7.3.3. ZUSAMMENFASSUNG

Aufbauend auf der Dissertation von Dr. Kerstin Atzler³⁸⁴ konnten weitere Imidazothiazepinone als Liganden für Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptoren identifiziert werden. Frau Dr. Atzler charakterisierte die Verbindung **ChM-72**, welche einen K_i-Wert von $0,82 \pm 0,09 \mu\text{M}$ aufwies, als die Verbindung mit der höchsten Affinität zum CB₁-Rezeptor unter den untersuchten Imidazo[1,2-*d*][1,4]thiazepinonen. Mit **CB-7**, das sich von **ChM-72** durch einen Fluor- anstelle eines Chlor-Substituenten in *para*-Position des endständigen Phenyl-Ringes unterscheidet, konnte eine noch potentere Verbindung gefunden werden. Allerdings ging die Erhöhung der Bindungsneigung zum CB₁-Rezeptor mit einer geringeren Selektivität zum CB₂-Rezeptor einher. In [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien, sowohl am humanen und Ratten-CB₁- als auch am humanen CB₂-Rezeptor, zeigte diese Verbindung sowie auch weitere Substanzen aus der Reihe der



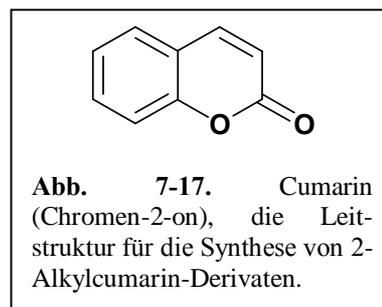
Imidazothiazinone- und Imidazothiazepinone einen partial invers agonistischen Effekt. Dabei besaß das unsubstituierte Imidazothiazinon-Derivat **ChM-46** mit einem max. Effekt von $73 \pm 5 \%$ (Basalwert: 100 %) den größten invers agonistischen Effekt.

Somit wurde eine Reihe neuer inverser Agonisten an Cannabinoid-Rezeptoren identifiziert und charakterisiert, die interessante Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneistoffe darstellen.

7.4. CHARAKTERISIERUNG VON 3-ALKYLCUMARINEN UND 2H-CHROMEN-DERIVATEN ALS NEUE CANNABINOID-CB₁- UND CB₂-REZEPTOR-LIGANDEN

Die im Rahmen dieses Projektes untersuchten Substanzen wurden hauptsächlich von Dr. Jakob Toräng aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Stefan Bräse synthetisiert.³⁹⁰ Bei der Synthese der 3-Alkylcumarine ging Herr Dr. Jakob Toräng von Salicylaldehyden aus und ließ sie mit α,β -ungesättigten Aldehyden in einer neuen Reaktion, der Umpolung-Domino-Reaktion, zu den gewünschten Cumarin-Derivaten reagieren.³⁹⁰

Ausgangspunkt für die Synthese dieser Verbindungen war die Tatsache, dass die als Benzopyran-Derivate natürlich vorkommenden Cumarine in den letzten Jahren an Attraktivität aufgrund ihrer verschiedenen pharmakologischen Eigenschaften gewonnen haben.^{391, 392}

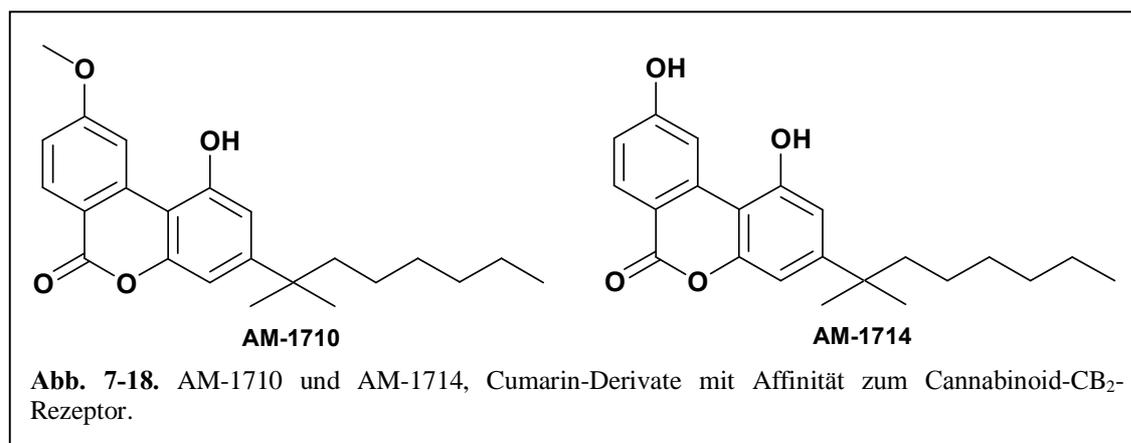


Cumarin ist das Lacton der 2-Hydroxyzimtsäure und stellt eine charakteristisch riechende, kristalline, farblose Substanz dar, die in Cumarin-Drogen, z.B. im Steinklee- oder Waldmeisterkraut, beim Trocknen aus der geruchlosen, glykosidischen Vorstufe Melilotosid gebildet wird. Es wirkt zentral sedativ, spasmolytisch, antiphlogistisch, ödemhemmend und lymphokinetisch.

Cumarin-Lieferanten sind im Pflanzenreich sporadisch verbreitet. Es kann z.B. aus fermentierten Tonkabohnen, den Samen des Tonkabaumes (*Dipteryx odorata* [Aubl.] Willd.), isoliert werden. Ferner befindet es sich im getrockneten Kraut vom Gemeinen Ruchgras (*Anthoxanthum odoratum* L.) und Duft-Mariengras (*Hierochloe odorata* (L.) P.B.) aus der Familie der Süßgräser (*Poaceae*), von Klee- und Steinklee-Arten aus der Familie der Schmetterlingsblütengewächse (*Fabaceae*) und vom Waldmeister (*Galium odoratum* (L.)) aus der Familie der Rötgräser (*Rubiaceae*).^{359, 360} Cumarine wurden nicht nur aus Grünpflanzen isoliert, sie wurden auch schon in Mikroorganismen oder im Tierreich gefunden.^{391, 392}

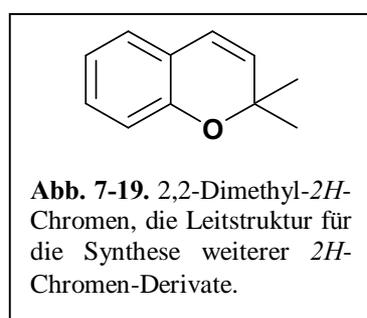
Das Cumarin, auch bekannt als Chromen-2-on, ist das Grundgerüst verschiedener Arzneistoffe, wie z.B. dem Phenprocoumon und dem Warfarin. Diese 4-Hydroxycumarin-Derivate sind Vitamin-K-Antagonisten und werden u.a. zur Verhütung von Thrombosen und Embolien nach Operationen eingesetzt.¹⁶ Inophyllum B, welches aus den Blättern des *Calophyllum inophyllum* L. isoliert worden ist, stellt einen Inhibitor der reversen Transkriptase von HIV dar.³⁹³ Das Mykotoxin Aflatoxin B1 wird von *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* und *Aspergillus nomius* produziert.³⁹⁴ Ein mutagener und karzinogener Effekt dieses Pilzgiftes auf den Menschen wurde bereits ausführlich untersucht. Scopoletin und Aesculetin wurden aus den Blüten der *Santolina oblongifolia* B. isoliert und zeigen antiinflammatorische Aktivität.³⁹⁵ Des

Weiteren sind Cumarin-Derivate veröffentlicht worden, die an Ratten bzw. humane CB₂-Rezeptoren binden (AM-1710 und AM-1714).³⁹⁶



Cumarin-Derivate gehören zur Gruppe der blauen Fluorophore. Die Grundstruktur selbst fluoresziert allerdings nicht. Erst durch die Einführung von Substituenten kann es zu einer Fluoreszenz kommen.³⁹⁷ Ihr Einsatzgebiet ist allerdings beschränkt, da sie Absorptionsmaxima besitzen, die im ultravioletten Bereich liegen. Zellen und Gewebe, die mit UV-Licht bestrahlt werden, neigen zur Autofluoreszenz. Diese Fluorophore finden bei der Immunfluoreszenz, bei Nukleinsäure- und Protein-Mikroarrays oder auch bei der In-situ Hybridisierung Anwendung (Beispiel: Alexa Fluor Farbstoffe), da sie leicht von grünem, gelbem oder rotem Licht unterschieden werden können.³⁹⁸

Ebenso wie die Cumarin-Derivate besitzen die 2H-Chromen-Derivate zahlreiche pharmakologische Eigenschaften. Ein Chromen-Derivat wurde aus dem Extrakt eines



brasilianischen Honigbienen-Stockes isoliert und zeigt Anti-Tumoreigenschaften,³⁹⁹ während Mallotochromen aus der Pflanze *Mallotus japonicus* ein weiteres Beispiel für einen Inhibitor der reversen Transkriptase von HIV ist.⁴⁰⁰ Massarigenin A wurde aus einem Frischwasser-Pilz gewonnen und zeigt antibakterielle Eigenschaften.⁴⁰¹ Die pharmakologischen Eigenschaften des (-)- Δ^9 -

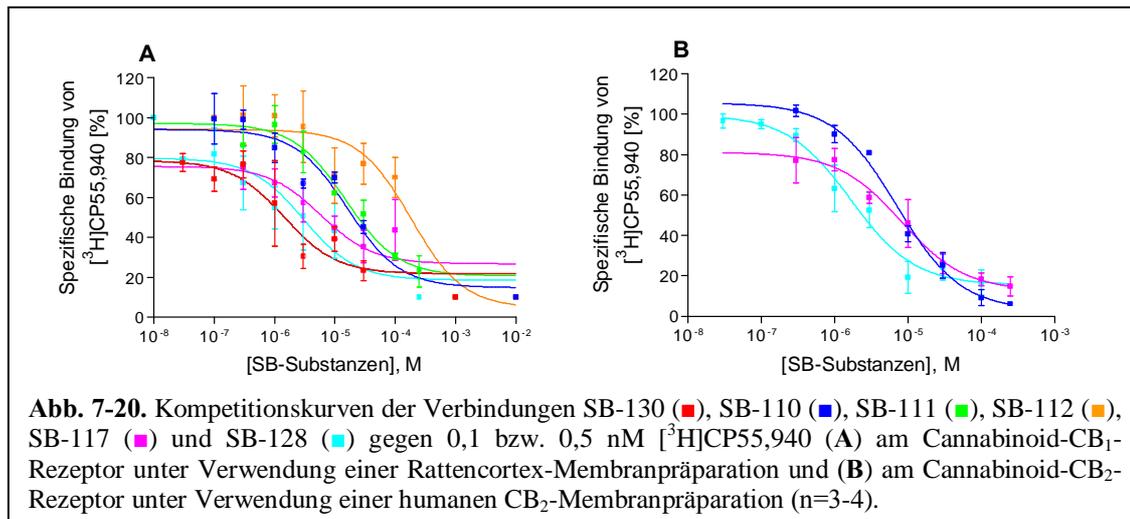
Tetrahydrocannabinols ((-)- Δ^9 -THC) wurden bereits in der Einleitung ausführlich dargestellt.

Die synthetisierten 3-Alkylcumarin- und 2H-Chromen-Derivate sollten in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien auf ihre Affinität zu Ratten-CB₁-Rezeptoren untersucht und des Weiteren die Selektivität aller Verbindungen gegenüber humanen Cannabinoid-CB₂-Rezeptoren bestimmt werden. Die Bindungsstudien wurden mit [³H]CP55,940 an einer Rattencortex-

Membranpräparation, die den Ratten-CB₁-Rezeptor nativ exprimiert und an einer von der Firma Perkin Elmer kommerziell erhältlichen humanen CB₂-Membranpräparation unter Verwendung des 24er, 48er bzw. 96er Harvesters durchgeführt. Ein Teil dieser Substanzen wurde im Rahmen eines Praktikums von Herrn Alexander Zielinski getestet. Die affinsten Verbindungen dieser Substanzklasse wurden in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an den oben genannten Membranpräparationen sowie an einer humanen CB₁-Membranpräparation, die ebenfalls von der Firma Perkin Elmer erworben wurde, auf ihre intrinsische Aktivität hin weitergehend charakterisiert.

7.4.1. KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN RATTEN-CANNABINOID-CB₁- UND HUMANEN CANNABINOID-CB₂-REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN

Die Strukturen der untersuchten 3-Alkylcumarin-Derivate sowie die Ergebnisse der kompetitiven Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Ratten-Cannabinoid-CB₁- und an humanen Cannabinoid-CB₂-Rezeptoren sind in Tab. 7-4 dargestellt. Kompetitionskurven der potenten Verbindungen sind exemplarisch in Abb. 7-20 dargestellt.



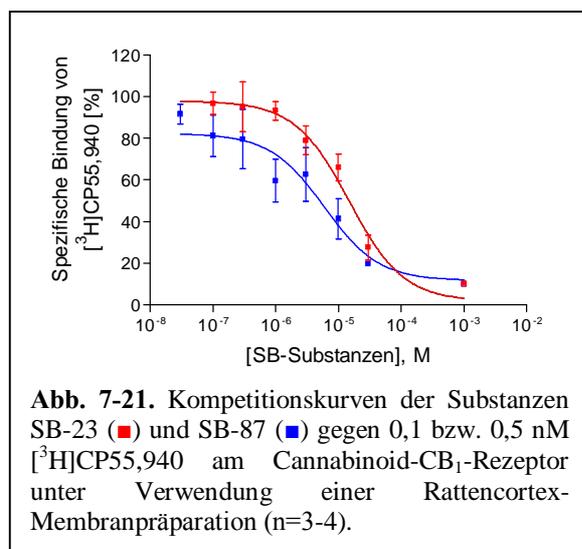
Wird ein Methyl-Rest in die Position 3 des Grundgerüsts Chromen-2-on eingeführt, so werden Substanzen erhalten, die keinerlei Affinität, weder zum Cannabinoid-CB₁- noch zum Cannabinoid-CB₂-Rezeptor, aufweisen. Auch das Einfügen weiterer Reste in Position 5, 6, 7 oder 8 des in Position 3 methylierten Chromen-2-on führen nur zu inaktiven Substanzen (SB-113, 115-116, 119, 121, 125-126, 129). Ein Benzyl-Rest in Position 3 hat zunächst keinen positiven Einfluss auf die Affinität dieser Substanzen zu Cannabinoid-Rezeptoren (SB-118).

Erst durch die Einführung eines weiteren Restes, einer Methoxy-Gruppe in Position 5, kann eine leichte Aktivitätssteigerung verzeichnet werden (**SB-111**). Eine Methoxy-Gruppe in Position 6, 7 oder 8 hat hingegen keinen Einfluss (**SB-127, 114, 122**).

Durch einen Methyl-Rest in Position 7 des 3-Benzyl-5-methoxy-chromen-2-ons kann die Wirkung zum Cannabinoid-CB₁-Rezeptor weiter erhöht werden (**SB-130**). Eine Substitution der Methoxy-Gruppe in Position 5 durch einen Isopropyl-Rest bei gleichzeitigem Einführen eines Methyl-Restes in Position 8 geht zwar mit einer Wirkungssteigerung einher, allerdings führt dieses Substitutionsmuster zu einem Verlust der Selektivität (**SB-110**).

Wird der Benzyl-Rest in Position 3 in *para*-Position mit einer Methoxy-Gruppe substituiert, so weist diese Substanz zwar eine geringere Bindungsneigung zu Cannabinoid-CB₁-Rezeptoren auf, allerdings wird die Wirkung zum CB₂-Subtypen erhöht (**SB-117**). Diese Verbindung ist allerdings nicht selektiv zu einem der beiden Rezeptor-Subtypen. Besitzt der Benzyl-Rest in Position 3 eine Methoxy-Gruppe in der *ortho*-Position anstelle der *para*-Position, so wird die Affinität zu beiden Rezeptor-Subtypen gesteigert (**SB-128**).

Die Kondensation eines Benzenringes an die Positionen 5-6 führt zu einer selektiven Wirkungssteigerung dieser Substanz zum Ratten-CB₁-Rezeptor (**SB-112**). Die Einführung



weiterer Substituenten, wie z.B. Iod (**SB-120**) oder einer Nitro-Gruppe (**SB-124**) in Position 6 oder Chlor in Position 8 (**SB-123**) wird nicht toleriert. Die resultierenden Verbindungen sind inaktiv.

In Tab. 7-5 sind die Strukturen der 3-Alkylcumarin-Derivate und der 2*H*-Chromen-Derivate und ihre K_i-Werte am Ratten-Cannabinoid-CB₁-Rezeptor und humanen Cannabinoid-CB₂-Rezeptor zusammengefasst. Die erhaltenen Kompetitionskurven der am CB₁-Rezeptor aktiven Substanzen sind exemplarisch in Abb. 7-21 dargestellt.

Aus der Reihe der 2*H*-Chromen-Derivate konnten zwei potente Verbindungen identifiziert werden. **SB-23** zeigte einen K_i-Wert von 4900 ± 1110 nM und **SB-87** einen K_i-Wert von 1370 ± 270 nM am Cannabinoid-CB₁-Rezeptor. Da bisher nur vier Derivate aus dieser Klasse synthetisiert worden sind, können an dieser Stelle keine weiterführenden Struktur-Wirkungsbeziehungen diskutiert werden.

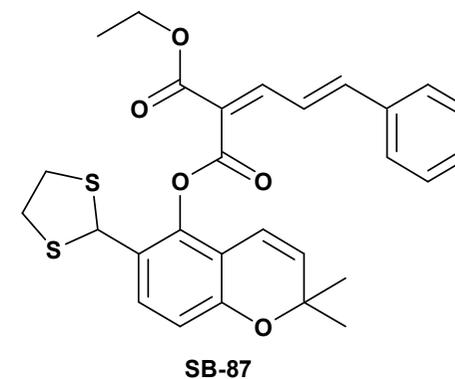
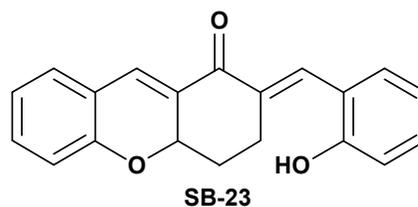
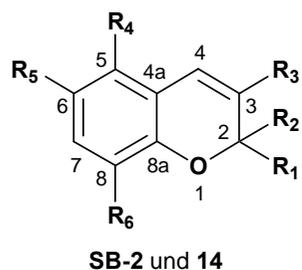
Tab. 7-4. Affinitäten verschiedener 3-Alkylcumarin-Derivate an Cannabinoid-CB₁ und CB₂-Rezeptoren.

The diagram shows the chemical structure of a 3-alkylcumarin derivative. The pyrone ring is numbered 1 to 8, and the benzene ring is numbered 4a to 8a. Substituents R₁ through R₅ are attached at positions 3, 5, 6, 7, and 8, respectively.

Verb. SB	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)	
						CB ₁ Ratte [³ H]CP55,940	CB ₂ Mensch [³ H]CP55,940
114	Benzyl	H	H	Methoxy	H	> 10000 ^{a,b} 31 ± 13 (10 μM) (n=7)	> 10000 ^b 33 ± 4 (10 μM) (n=3)
130	Benzyl	Methoxy	H	Methyl	H	3460 ± 1140 ^{a,b} (n=4)	≥ 10000 ^b 45 ± 3 (10 μM) (n=3)
110	Benzyl	Isopropyl	H	H	Methyl	2760 ± 664 ^{a,b} (n=3)	3930 ± 94 ^b (n=3)
111	Benzyl	Methoxy	H	H	H	19100 ± 4040 ^{a,b} (n=4)	> 10000 ^b 28 ± 7 (10 μM) (n=3)
112	Benzyl		H	H	H	4190 ± 2000 ^{a,b} (n=3)	≥ 10000 ^b 59 ± 9 (10 μM) (n=3)
113	Methyl	H	I	H	H	> 10000 ^b 12 ± 10 (10 μM) (n=6)	> 10000 ^b 10 ± 7 (10 μM) (n=3)
115	Methyl	Isopropyl	H	H	Methyl	> 10000 ^b 26 ± 11 (10 μM) (n=4)	>> 10000 ^b 0 ± 2 (10 μM) (n=3)

Verb. SB	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)	
						CB ₁ Ratte [³ H]CP55,940	CB ₂ Mensch [³ H]CP55,940
116	Methyl			H	H	> 10000 ^b 10 ± 4 (10 μM) (n=3)	>> 10000 ^b 2 ± 1 (10 μM) (n=3)
117	<i>para</i> -Methoxy- benzyl	Methoxy	H	Methyl	H	6140 ± 686 ^{a,b} (n=3)	5350 ± 2200 ^b (n=3)
118	Benzyl	H	H	H	H	> 10000 ^b 18 ± 7 (10 μM) (n=3)	> 10000 ^b 28 ± 3 (10 μM) (n=3)
119	Methyl	H	Methoxy	H	H	> 10000 ^b 15 ± 10 (10 μM) (n=5)	>> 10000 ^b 7 ± 8 (10 μM) (n=3)
120	Benzyl	H	I	H	H	> 10000 ^b 31 ± 7 (10 μM) (n=3)	≥ 10000 ^b 44 ± 2 (10 μM) (n=3)
121	Methyl	H	H	Methoxy	H	>> 10000 ^b 1 ± 6 (10 μM) (n=3)	>> 10000 ^b 2 ± 3 (10 μM) (n=2)
122	Benzyl	H	H	H	Methoxy	>> 10000 ^b 6 ± 9 (10 μM) (n=3)	> 10000 ^b 25 ± 3 (10 μM) (n=3)
123	Benzyl	Methoxy	H	H	Br	> 10000 ^{a,b} 39 ± 6 (10 μM) (n=4)	> 10000 ^b 29 ± 2 (10 μM) (n=3)
124	Benzyl	H	Nitro	H	H	> 10000 ^{a,b} 32 ± 15 (10 μM) (n=4)	> 10000 ^b 15 ± 5 (10 μM) (n=3)
125	Methyl	H	H	H	Methoxy	>> 10000 ^b 6 ± 3 (10 μM) (n=3)	>> 10000 ^b 4 ± 2 (10 μM) (n=3)

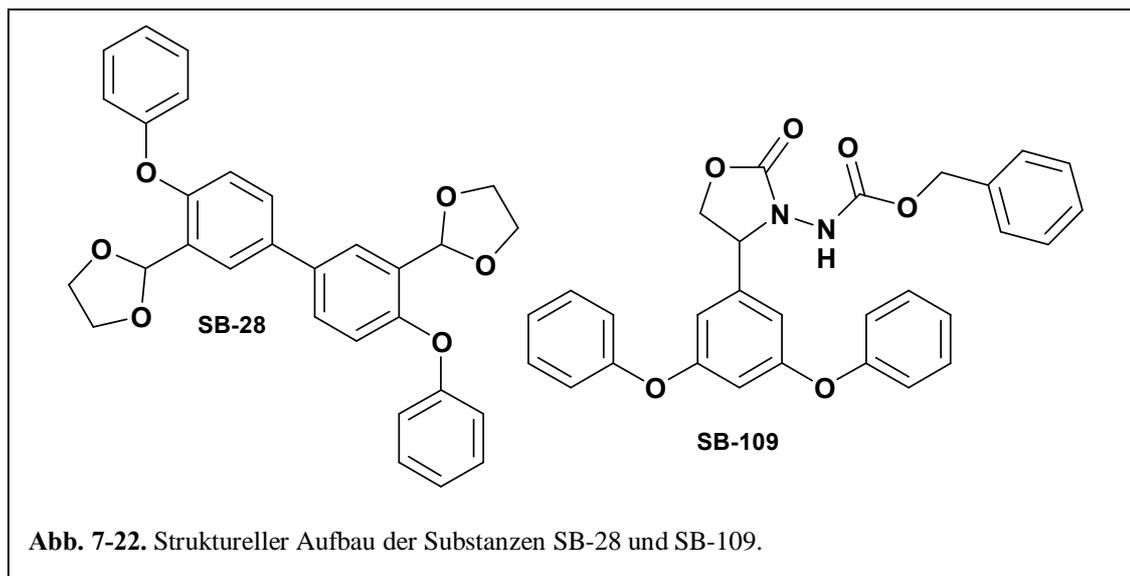
Verb. SB	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration)	
						CB ₁ Ratte [³ H]CP55,940	CB ₂ Mensch [³ H]CP55,940
126	Methyl	H	Cl	H	Br	>> 10000 ^b 8 ± 5 (10 μM) (n=3)	>> 10000 ^b 3 ± 10 (10 μM) (n=3)
127	Benzyl	H	Methoxy	H	H	>> 10000 ^b 8 ± 2 (10 μM) (n=3)	> 10000 ^b 37 ± 1 (10 μM) (n=3)
128	<i>ortho</i> -Methoxy- benzyl	Methoxy	H	Methyl	H	738 ± 414 ^{a,b} (n=3)	944 ± 203 ^b (n=3)
129	Methyl	H	Br	H	Methoxy	> 10000 ^{a,b} 17 ± 6 (10 μM) (n=3)	>> 10000 ^b 9 ± 7 (10 μM) (n=3)

Tab. 7-5. Affinitäten verschiedener 2H-Chromen-Derivate an Cannabinoid-CB₁ und CB₂-Rezeptoren.

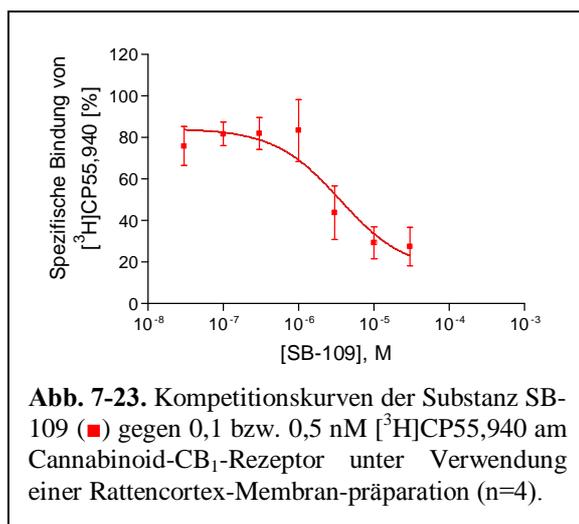
Verb. SB	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	K _i ± SEM [nM] oder Inhibition in % (Konzentration)	
							CB ₁ Ratte [³ H]CP55,940	CB ₂ Mensch [³ H]CP55,940
2	Methyl	Methyl	Formyl	H	H	Phenyl	≥ 10000 ^{a,b} 46 ± 7 (10 μM) (n=9)	>> 10000 ^b 3 ± 1 (10 μM) (n=3)
14	H	Methyl	Ethyl	Methoxy	H	Br	> 10000 ^{a,b} 34 ± 8 (10 μM) (n=3)	>> 10000 ^b 7 ± 7 (10 μM) (n=3)
23							4900 ± 1110 ^b (n=4)	> 10000 ^b 37 ± 5 (10 μM) (n=3)
87							1370 ± 270 ^b (n=3)	> 10000 ^b 22 ± 3 (10 μM) (n=3)

^aAlexander Zielinski, ^bAndrea Behrenswerth

Die Verbindungen **SB-28** und **SB-109** konnten nicht in die oben genannten Verbindungsklassen der 3-Alkylcumarin- und 2*H*-Chromen-Derivate eingeordnet werden. Die Strukturen dieser Verbindungen sind separat in Abb. 7-22 dargestellt.



Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien haben gezeigt, dass **SB-28** keine Affinität zu Cannabinoid-Rezeptoren aufweist. Bei einer Konzentration von 10 μ M inhibierte diese

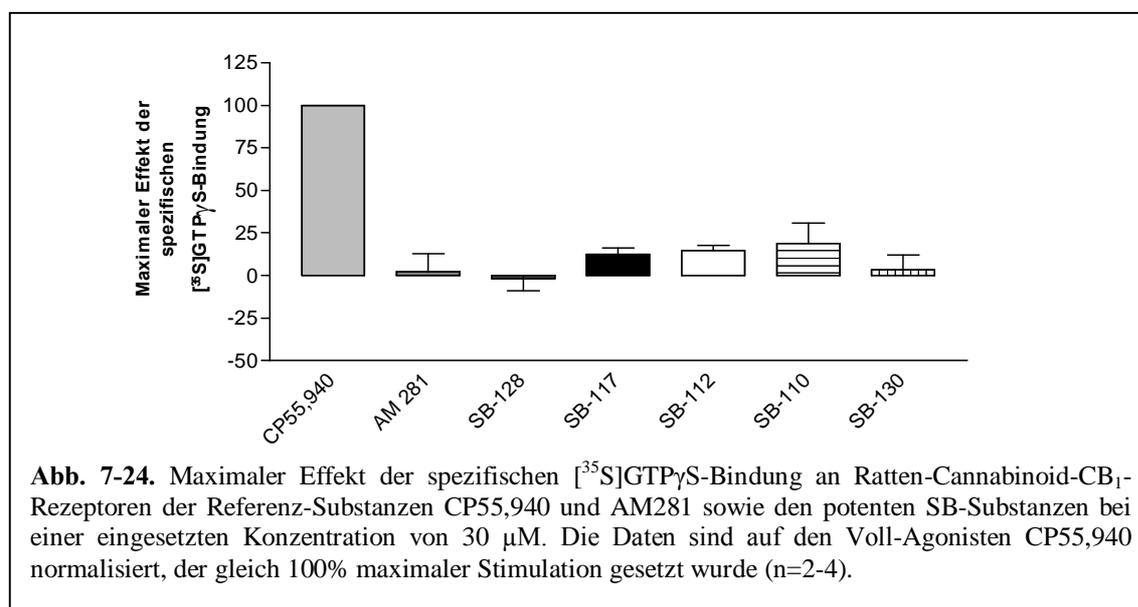


Verbindung den Radioliganden [³H]CP55,940 mit 23 \pm 8 % (CB₁) bzw. 14 \pm 4 % (CB₂). **SB-109** zeigt mit einem K_i-Wert von 2500 \pm 375 nM hingegen eine Bindungsneigung zum Cannabinoid-CB₁-Rezeptor, allerdings nicht zum CB₂-Rezeptor (38 \pm 8 % Inhibition bei einer Konzentration von 10 μ M). In Abb. 7-23 ist die Inhibitionskurve der Verbindung **SB-109** dargestellt. Da es sich bei diesen Substanzen um strukturell nicht verwandte Substanzen

handelt, konnten keine Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden.

7.4.2. [³⁵S]GTPγS-BINDUNGSSTUDIEN AN HUMANEN UND RATTEN-CANNABINOID-CB₁-REZEPTOREN

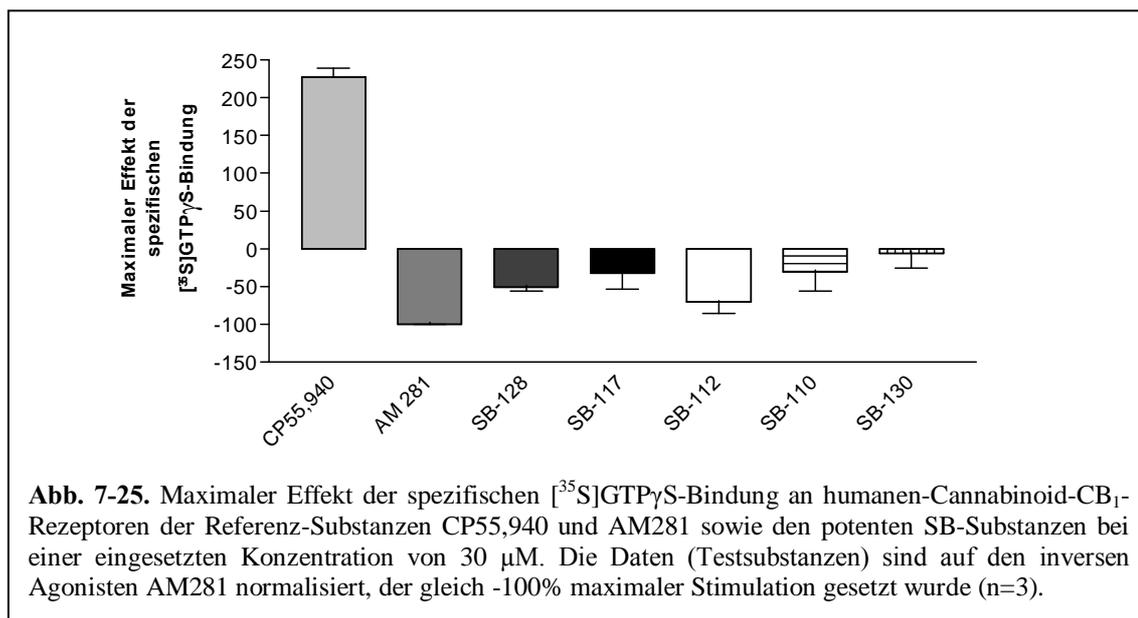
Die 3-Alkylcumarin-Derivate, die die höchste Affinität zum Cannabinoid-CB₁-Rezeptor aufwiesen, wurden in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an einer kommerziell erhältlichen hCB₁-Membranpräparation sowie einer Rattencortex-Membranpräparation, welches den Ratten-Cannabinoid-CB₁-Rezeptor nativ exprimiert, funktionell charakterisiert (**SB-128**, **117**, **112**, **110** und **130**). Analog zum Kap. 7.3.2. wurden der Cannabinoid-Rezeptor-Agonist **CP55,940** und der CB₁-selektive inverse Agonist **AM281** als Referenzsubstanzen eingesetzt.



Aufgrund der Affinität dieser Substanzen mit K_i-Werten im niedrigen mikromolaren Bereich wurde eine Konzentration von 30 μM eingesetzt. Wegen ihrer hohen Lipophilie konnte die Konzentration allerdings nicht weiter erhöht werden. Bei dieser eingesetzten Konzentration zeigte der Voll-Agonist **CP55,940** in [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Ratten-CB₁-Rezeptoren einen max. Effekt von 169 ± 6 % (Basalwert: 100 %). Analog Kap. 7.3.2. stieg der max. Effekt dieser Verbindung beim Einsatz einer humanen CB₁-Membranpräparation auf 228 ± 12 %, was sich wiederum auf die höhere Rezeptordichte der humanen rekombinanten hCB₁-Zellen zurückführen lässt. Auch der in Kap. 7.3.2. ermittelte Effekt des inversen Agonisten **AM281** ließ sich gut reproduzieren. In Bindungsstudien an einer nativen Rattencortex-Membranpräparation zeigte diese Verbindung einen neutral-antagonistischen Effekt (102 ± 7 %), während bei einem Einsatz der Membranpräparation, die den humanen CB₁-Rezeptor rekombinant exprimiert, eine negative intrinsische Aktivität gefunden wurde (73 ± 13 %, n=2). Analog zum Kap. 7.3.2. wurden die Daten aus [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien am Rattencortex

auf den Voll-Agonisten **CP55,940** normalisiert, der gleich 100% maximaler Stimulation gesetzt wurde (siehe Abb. 7-24).

Da analog zum Kap. 7.3.2. der invers agonistische Effekt in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an einer humanen CB₁-Membranpräparation ausgeprägter war, wurden die erhaltenen Daten der Testsubstanzen zur besseren Vergleichbarkeit auf den inversen Agonisten **AM281** normalisiert, der gleich -100 % maximaler Stimulation gesetzt wurde (siehe Abb. 7-25).



Während die untersuchten Verbindungen (**SB-128**, **117**, **112**, **110** und **130**) in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an Ratten-CB₁-Rezeptoren einen neutral-antagonistischen Effekt besaßen (max. Effekt: 99-114 %, siehe Abb. 7-23), zeigte sich analog zur Referenzsubstanz **AM281** bei der Verwendung einer rekombinanten humanen CB₂-Membranpräparation ein invers-agonistischer Effekt, d.h. der max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTP γ S-Bindung wurde unter den Basalwert von 100 % abgesenkt. **SB-112** besitzt mit einem max. Effekt von 72 ± 6 bei einem Basalwert von 100 % die größte negative intrinsische Aktivität. Somit führt die Kondensation des Benzenringes in Position 5-6 nicht nur zu einer Wirkungssteigerung am CB₁-Rezeptor, sondern auch zu Substanzen mit einem invers-agonistischen Effekt. Die potenteste Verbindung dieser Reihe **SB-128** besitzt eine *Efficacy* von 79 ± 2 %. Vergleicht man diesen Effekt nun mit dem von **SB-117**, die sich von **SB-128** darin unterscheidet, dass sie die Methoxy-Gruppe des sich in Position 3 befindlichen Benzyl-Restes in *para*- und nicht in *ortho*-Position trägt, so wird deutlich, dass sich die Stellung dieser Methoxy-Gruppe stark auf die intrinsische Aktivität auswirkt. **SB-117** zeigt einen geringeren invers-agonistischen Effekt (87 ± 8 %). Verbindungen, die nur einen Benzyl-Rest in Position 3 besitzen, haben unabhängig vom

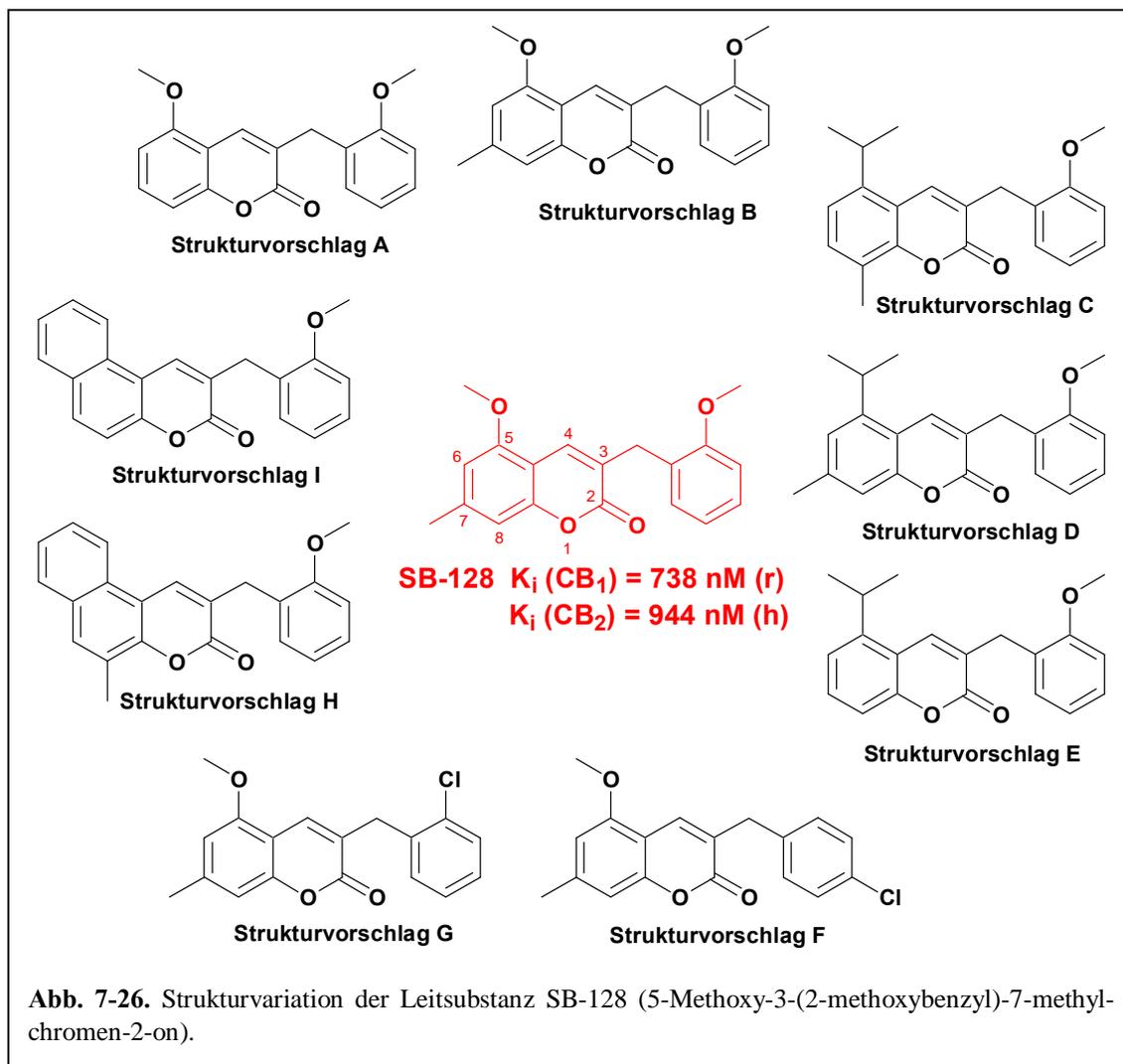
Substitutionsmuster mit max. Effekten von 88 ± 11 bzw. 90 ± 9 % relativ zum Basalwert von 100 eine sehr geringe negative intrinsische Aktivität (**SB-110** und **130**).

7.4.3. ZUSAMMENFASSUNG, DISKUSSION UND AUSBLICK

3-Alkylcumarin- und 2*H*-Chromen-Derivate aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Bräse aus Karlsruhe wurden in kompetitiven Radioligand-Bindungsstudien an Ratten-Cannabinoid-CB₁- und an humanen Cannabinoid-CB₂-Rezeptoren untersucht. Dabei konnte eine neue Leitstruktur, die Verbindung **SB-128** (5-Methoxy-3-(2-methoxybenzyl)-7-methyl-chromen-2-on) identifiziert werden, mit K_i-Werten von 738 ± 414 nM bzw. 944 ± 203 nM. Es hat sich gezeigt, dass die Einführung eines Benzyl-Restes in Position 3 von Chromen-2-on bei gleichzeitiger Einführung einer Methoxy-Gruppe in Position 5 zu Verbindungen führte, die eine Affinität zum CB₁-Rezeptor aufwiesen. Durch Variation der Substituenten in den Positionen 5-8 konnte die Wirkung der Verbindungen erhöht werden, was allerdings teilweise mit einem Verlust der Selektivität einherging. Durch eine Methoxy-Gruppe in *para*- bzw. *ortho*-Position des sich in Position 3 befindlichen Benzylrestes konnte die Bindungsneigung weiter gesteigert werden. Die Substitution des Benzyl-Restes in Position 3 führt demnach im Allgemeinen zu einer Wirkungssteigerung, allerdings zu Lasten der Selektivität. Eine Substitution in *ortho*-Position erwies sich jedoch als günstiger als eine *para*-Substitution. Die Kondensation eines Benzenringes an die Position 5-6 führte zu einer selektiven Wirkungssteigerung zum Ratten-CB₁-Rezeptor. [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien haben ergeben, dass sich bei den potentesten Substanzen um inverse Agonisten am CB₁-Rezeptor handelt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, liegt der Hauptfokus der Forschung und Entwicklung auf der Synthese von Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten und inversen Agonisten, da deren Wirkung nicht von psychotropen Nebenwirkungen wie Sucht oder Abhängigkeit begleitet wird.³⁷¹ Um die Selektivität der Leitsubstanz **SB-128** weiter zu erhöhen und die intrinsische Aktivität in Hinblick auf einen invers-agonistischen Effekt zu verbessern, wurden die in Abb. 7-25 dargestellten Strukturen vorgeschlagen, die zurzeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bräse synthetisiert werden.

Aus den Struktur-Wirkungsbeziehungen konnte abgeleitet werden, dass mit der Einführung eines Isopropyl-Restes bei gleichzeitigem Einführen eines Methyl-Restes in Position 8 eine Wirkungssteigerung zu verzeichnen ist (Vergleich **SB-110**). Dieses Substitutionsmuster wurde in die Struktur der Leitsubstanz **SB-128** eingearbeitet (Strukturvorschlag C). Ein Methyl-Rest in Position 7 führt bei der Substanz **SB-130** zu einer weiteren Erhöhung der Bindungsneigung zum CB₁-Rezeptor (Strukturvorschlag D). Allerdings ist noch unklar, ob diese Methyl-Gruppe

essentiell ist (Strukturvorschlag E). In den Strukturvorschlägen A und B wurde das Grundgerüst **SB-128** nur durch die Stellung des Methyl-Restes verändert, der, wie bereits erwähnt, in Position 7 eine positive Auswirkung auf die Affinität besitzt.



Die Kondensation eines Benzenringes in Position 5-6 führte nicht nur zu einer selektiven Wirkungssteigerung dieser Substanz zum CB₁-Rezeptor (Vergleich **SB-112**), sondern auch zu einem ausgeprägteren negativ invers-agonistischen Effekt. In den Strukturvorschlägen H und I liegt diese Modifikation vor. Ferner soll der Einfluss einer Methylgruppe in Position 8 untersucht werden (Strukturvorschlag H).

Des Weiteren könnten die Substituenten des Benzyl-Restes in Position 3 in *ortho*- und *para*-Position variiert werden (Strukturvorschläge F und G). Neben einer Monosubstitution mit einem Chlor-Substituenten, einer Hydroxy- oder einer Methyl-Gruppe, wäre auch eine Disubstitution mit diesen Substituenten bzw. mit Methoxy-Gruppen denkbar.

Murata et al. synthetisierten eine Reihe von in Position 3 substituierten 6-Methoxy-Cumarin-Derivaten, um die fluoreszierenden Eigenschaften der Cumarine zu charakterisieren.³⁹⁷ Derivate, die in Position 6 oder 7 einen elektronenschiebenden und in Position 3 einen elektronenziehenden Substituenten besaßen, entwickelten eine intensive Fluoreszenz. Die Verbindungen **SB-114** und **121** haben in Position 7 und **SB-119** in Position 6 eine Methoxy-Gruppe als Elektronendonator. Da diese Verbindungen allerdings in der Position 3 keinen Elektronenakzeptor, sondern einen Phenyl-Ring bzw. einen Methylrest besitzen, kommt es auch nicht zu der erforderlichen Generierung des von Murata et al. beschriebenen Push-Pull-Systems. Zudem sind diese Substanzen an beiden Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen inaktiv. Durch anellierte Benzenringe, z.B. in den Positionen 5 und 6, konnten ebenfalls Substanzen mit fluoreszierenden Eigenschaften gewonnen werden.³⁹⁷ Die Verbindungen **SB-112** und **116** besitzen einen solchen Ring. Zudem besitzt **SB-112** mit einem K_i -Wert von 4190 ± 2000 nM eine Affinität zum CB₁-Rezeptor. Der Austausch des Phenyl-Ringes in Position 3 durch einen Elektronenakzeptor, wie z.B. eine Carboxy- oder Aldehydgruppe, eine Ketofunktion, einen Carbonsäureester oder eine Nitrogruppe wäre im Hinblick auf die Anwendung dieser Verbindungsklasse als Fluoreszenz-Liganden interessant. Ob trotz dieses Substitutionsmusters eine Haftungsneigung zu Cannabinoid-Rezeptoren besteht, muss allerdings durch Radioligand-Bindungsstudien noch abgeklärt werden.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Die Adenosin-Rezeptoren, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören und anhand ihrer pharmakologischen Eigenschaften in vier Subtypen, die Adenosin-A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren, unterteilt werden, sind im Körper weit verbreitet und an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen beteiligt. Selektive Agonisten und Antagonisten für verschiedene Adenosin-Rezeptor-Subtypen werden derzeit als potentielle neue Arzneistoffe entwickelt. So wurde z.B. der Einsatz von Antagonisten am A₁- und A_{2A}-Rezeptor für die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer (A₁-Antagonist) und Morbus Parkinson (A_{2A}-Antagonist), vorgeschlagen. Morbus Alzheimer stellt in der Altersgruppe ab 85 Jahren die häufigste Demenzform dar. Für den dieser Erkrankung zugrunde liegenden Zelluntergang wird das β -Amyloid-Peptid mitverantwortlich gemacht. Das β -Amyloid-Peptid lagert sich extrazellulär in Form seniler Plaques in kortikalen und subkortikalen Strukturen des Gehirns ab. Es wurde gezeigt, dass ein erhöhter Cholesterolgehalt im Gehirn die Bildung von A β -Fibrillen fördert. Während bei Alzheimer-Patienten ein erhöhter Serum-Cholesterolspiegel diagnostiziert worden ist, ist die Cholesterolsynthese bei der Parkinson'schen Krankheit verringert, was mit einem geringeren Serum-Cholesterolgehalt einhergeht. Man geht davon aus, dass dieser geringe Cholesterolgehalt am Niedergang der dopaminergen Neuronen beteiligt ist.

„Membrane Rafts“ sind kleine (10-200 nm große), heterogen aufgebaute und bewegliche Domänen innerhalb der Plasma-Membran, die reich an Sterolen (Cholesterole) und Sphingolipiden sind. Sie nehmen an vielen zellulären Prozessen teil und können sich bei Bedarf zu größeren Domänen durch Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen zusammenlagern. Der Einfluss von Cholesterole auf die Rezeptorfunktion wurde bereits für zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nachgewiesen. Dieser Einfluss wurde auf die Lokalisation der Rezeptoren in den „Membrane Rafts“, die früher als „Lipid Rafts“ bezeichnet wurden, zurückgeführt. Da bei M. Alzheimer und M. Parkinson ein veränderter Cholesterolgehalt eine Rolle zu spielen scheint, bestand ein besonders großes Interesse, die Rolle von Cholesterole beim Aufbau und der Funktion von Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren zu untersuchen.

Ein durch den Einsatz von Methyl- β -Cyclodextrin (Cholesterole-Entzug) bzw. eines Methyl- β -Cyclodextrin-Cholesterole-Komplexes (Cholesterole-Rückführung bzw. Anreicherung) veränderter Cholesterolgehalt einer Rattens-triatum-Membranpräparation besaß einen Einfluss auf die spezifische Bindung des A₁-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CCPA und des antagonistischen Radioliganden [³H]DPCPX sowie des A_{2A}-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CGS21680 und des antagonistischen Radioliganden [³H]MSX-2. Bei einem

verminderten Cholesterolgehalt nahm die spezifische Radioligand-Rezeptor-Bindung in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt ab. Wurde Cholesterol wieder zugeführt, so war dies mit einem Anstieg der spezifischen Bindung verbunden. Dabei wurde die spezifische Bindung der antagonistischen tritium-markierten Adenosin-Liganden auf stärkere Weise beeinflusst als die der agonistischen Radioliganden. Auch war der Einfluss auf die A_{2A} -Rezeptoren größer als auf die A_1 -Rezeptoren. Analog durchgeführte Experimente an humanen Striatum-Membranpräparationen (Caudate und Putamen) haben ergeben, dass die an der Ratte gewonnenen Daten auf den Menschen übertragen werden können. Cholesterol ließ sich nicht nur durch den Einsatz von Cholesterol-M β CD-Komplexen quantitativ zurückführen (Inkubationszeit: 0,5 h), sondern auch durch cholesterolreiche Liposomen. Allerdings schien die erforderliche lange Inkubationszeit von 24 h einen negativen Einfluss auf die Rezeptoren in der Rattenstriatum-Membranpräparation zu haben.

In weiterführenden Sättigungsexperimenten übte schon der Einsatz der geringsten M β CD-Konzentration zur Verringerung des Cholesterolgehaltes einen Einfluss aus. Während die Affinität der A_1 -selektiven Radioliganden zunahm, ausgedrückt in der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D , sank die max. Anzahl der Bindungsstellen (B_{Max}). Die Affinität der A_{2A} -selektiven Radioliganden nahm hingegen ab, ebenso die B_{Max} -Werte. Die geringere Anzahl an Rezeptoren, die durch die A_1 -Radioliganden erkannt wurden, wurde somit zumindest teilweise durch eine erhöhte Rezeptoraffinität kompensiert. Bei den A_{2A} -Rezeptoren beobachtete man hingegen diese Kompensation nicht.

Zusätzliche Kinetikexperimente an einer unbehandelten und einer mit M β CD-behandelten Rattenstriatum-Membranpräparation ergaben, dass ein verminderter Cholesterolgehalt kaum einen Einfluss auf die Geschwindigkeit von Radioligand-Rezeptor-Interaktionen besitzt.

Durch [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien sollte weiterhin untersucht werden, ob ein verminderter Cholesterolgehalt lediglich die Affinität verschiedener Radioliganden in Kompetitions- und Sättigungsexperimenten beeinflusst, oder darüber hinaus auch einen Einfluss auf die Funktion der Rezeptoren ausübt. In [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien an Adenosin- A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren unter Verwendung einer Rattenstriatum-Membranpräparation mit vermindertem Cholesterolgehalt wurde gefunden, dass sich der max. Effekt der spezifischen [35 S]GTP γ S-Bindung des A_1 -selektiven Voll-Agonisten CPA mit abnehmendem Cholesterolgehalt auf signifikante Weise verminderte, der max. Effekt des A_{2A} -selektiven Voll-Agonisten CGS21680 wurde hingegen gesteigert. Die EC_{50} -Werte verringerten sich unabhängig vom Adenosin-Rezeptor-Subtyp nach Cholesterol-Entzug. Der EC_{50} -Wert des A_1 -selektiven inversen Agonisten DPCPX wurde in [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien an CHO-h A_1 -Membranpräparationen mit vermindertem

Cholesterol-Gehalt hingegen nicht signifikant verringert. Dies könnte u.a. auf den wesentlich geringeren Anfangscholesterol-Gehalt der CHO-hA₁-Membranpräparation im Vergleich zur Rattenstriatum-Membranpräparation zurückgeführt werden. Weitere [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an A₁- und A_{2A}-Rezeptoren mit einer an Cholesterol verminderten Rattenstriatum-Membranpräparation, deren Cholesterol-Gehalt durch den Einsatz eines Methyl-β-Cyclodextrin-Komplexes wieder auf sein ursprüngliches Niveau gebracht worden ist, haben gezeigt, dass sich die Rezeptor-Funktion des Adenosin-A₁-Rezeptors wieder herstellen ließ.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Cholesterol differenzierte Effekte auf die Funktion von Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren besitzt. Die Funktion des A_{2A}-Rezeptors wird dabei in größerem Maße beeinflusst. Das Cholesterol fungiert als allosterischer Modulator der Rezeptoren.

Bevor nachgewiesen worden ist, dass durch die Verwendung des Detergens Triton X-100 – und auch weiterer Detergenzien – in einer Sucrose-Gradienten-Zentrifugation die „Detergent Resistant Membranes“ (DRMs) erst gebildet, aber nicht isoliert werden, wurde dieses Detergens zur Isolierung der auch als DRMs bezeichneten „Lipid Rafts“ eingesetzt. Analoge Experimente haben gezeigt, dass sowohl der Adenosin-A₁-Rezeptor als auch der A_{2A}-Rezeptor in diesen cholesterolreichen Mikrodomänen lokalisiert ist. Die DRMs reichern sich im Bereich geringerer Dichte an. Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien ergaben, dass diese Fraktion nicht nur den höchsten Protein- und Cholesterol-Gehalt, sondern auch die höchste spezifische Radioligand-Rezeptor-Bindung des A₁-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CCPA und des A_{2A}-selektiven agonistischen Radioliganden [³H]CGS21680 besitzt. Auch der max. Effekt der spezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung war in dieser Fraktion erhöht. Sättigungsexperimente mit [³H]CCPA und [³H]CGS21680 zeigten, dass sich das Verhältnis der A₁- und A_{2A}-Rezeptoren in der DRM-Fraktion, im Vergleich zur nativen Membranpräparation, verändert. In weiterführenden Experimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass es sich bei den DRMs um Artefakte handelt.

Obwohl in den letzten Jahren eine Vielzahl von Adenosin-Rezeptor-Liganden entwickelt worden ist, lässt die Markteinführung eines selektiven Adenosin-Rezeptor-Antagonisten nach wie vor auf sich warten. Ein Grund für den langsamen Fortschritt bei der Entwicklung von Arzneistoffen, die selektiv Adenosin-Rezeptoren blockieren, stellen womöglich die ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften und die geringe Wasserlöslichkeit sowie die damit einhergehende schlechte Bioverfügbarkeit vieler sehr lipophiler Verbindungen dar.

Auf der Suche nach potenten und selektiven Adenosin-Rezeptor-Liganden mit neuartigen Strukturen wurden in unserem Arbeitskreis von Herrn Dr. H. Phuoc Le, Herrn Dr. Ali El- Tayeb und Herrn Dr. Alexander Bauer Serien neuer 4-Aminopyrimidin-Derivate, 2-Thioadenosin-Derivate, 2-Phenylpurin-6,8-dione, 2,8-Diphenylpurin-6-dione, 1,2,3-Triazolpyrimidine und 7-Amino-Oxazolpyrimidine synthetisiert. Diese wurden *in-vitro*-pharmakologisch in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien im Hinblick auf ihre Affinität zu Adenosin-Rezeptoren untersucht. Aus der Substanzklasse der 4-Amino-5-cyano-2-methylthio-6-phenylpyrimidine konnten zahlreiche Verbindungen mit K_i -Werten im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich am A_1 -Rezeptor und im zweistelligen nanomolaren Bereich am A_{2A} -Rezeptor identifiziert werden. Dabei handelte es sich vorwiegend um

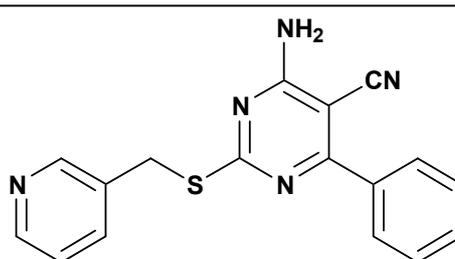
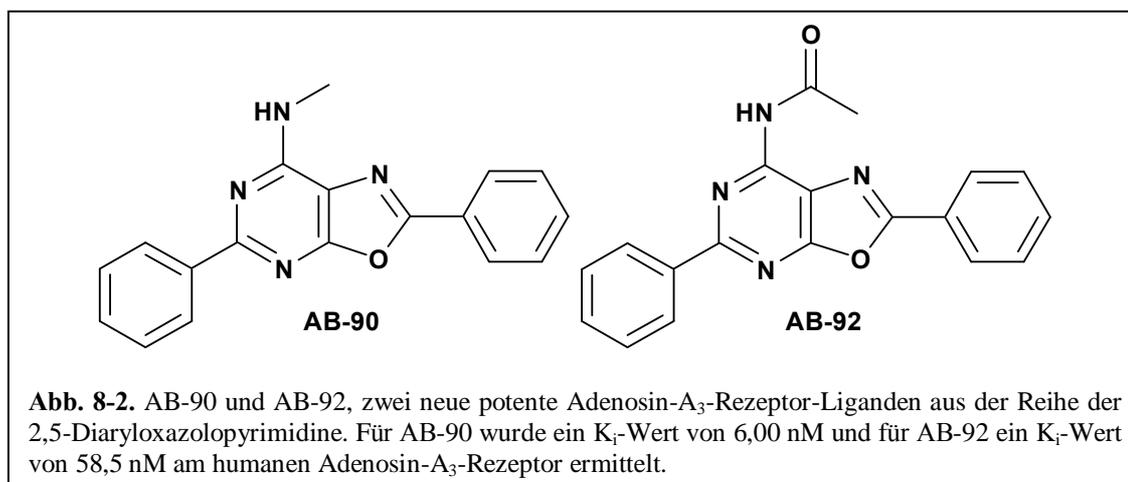


Abb. 8-1. 4-Amino-5-cyano-2-methylthio-6-phenylpyrimidine, eine neue Klasse nicht-nukleosidischer Adenosin-Rezeptor-Liganden.

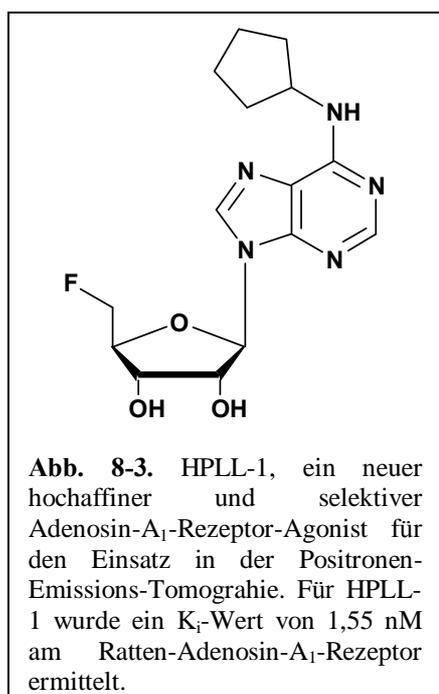
Pyrimidin-Derivate mit einem Pyridin-3-yl-methylthioether-Rest bzw. Pyridin-2-yl-methylthioether-Rest in Position 2 kombiniert mit einem unsubstituierten Phenyl-Ring in Position 6 bzw. mit einer Substitution in Position 4' bzw. 5' dieses Phenyl-Ringes. Zur Bestimmung der intrinsischen Aktivität konnte in funktionellen [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien an humanen Adenosin- A_1 - und Ratten-Adenosin- A_{2A} -Rezeptoren für zwei 4-Amino-5-cyano-2-methylthio-6-phenylpyrimidin-Derivate gezeigt werden, dass es sich um A_1 -Antagonisten mit invers agonistischer Aktivität handelt. Diese Substanzklasse stellt somit eine neue Leitstruktur für selektive A_1 -Antagonisten z.B. hinsichtlich der Entwicklung neuer Arzneistoffe zur Behandlung von Morbus Alzheimer dar.

Ein 2-Thioadenosin-Derivat wurde als neuer Agonist mit hoher Affinität und Selektivität (>225-fach) zum Ratten- A_{2A} -Rezeptor charakterisiert (**Ali-325**). Es handelt sich dabei um eine polare Verbindung, die mit dem Ziel synthetisiert wurde, einen A_{2A} -selektiven Agonisten zu erhalten, der zur lokalen Therapie entzündlicher Darmerkrankungen und zur parenteralen Applikation geeignet wäre.

Aus der Reihe der 2,5-Diaryloxazolopyrimidine konnten zwei neue hochaffine Adenosin- A_3 -Rezeptor-Liganden identifiziert werden (**AB-90** und **AB-92**).



Die große klinische Bedeutung der Adenosin-Rezeptoren, insbesondere die hochaffinen Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren, macht sie als Targets für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) interessant. Im Rahmen eines Projektes wurden 5'-Fluor-5'-

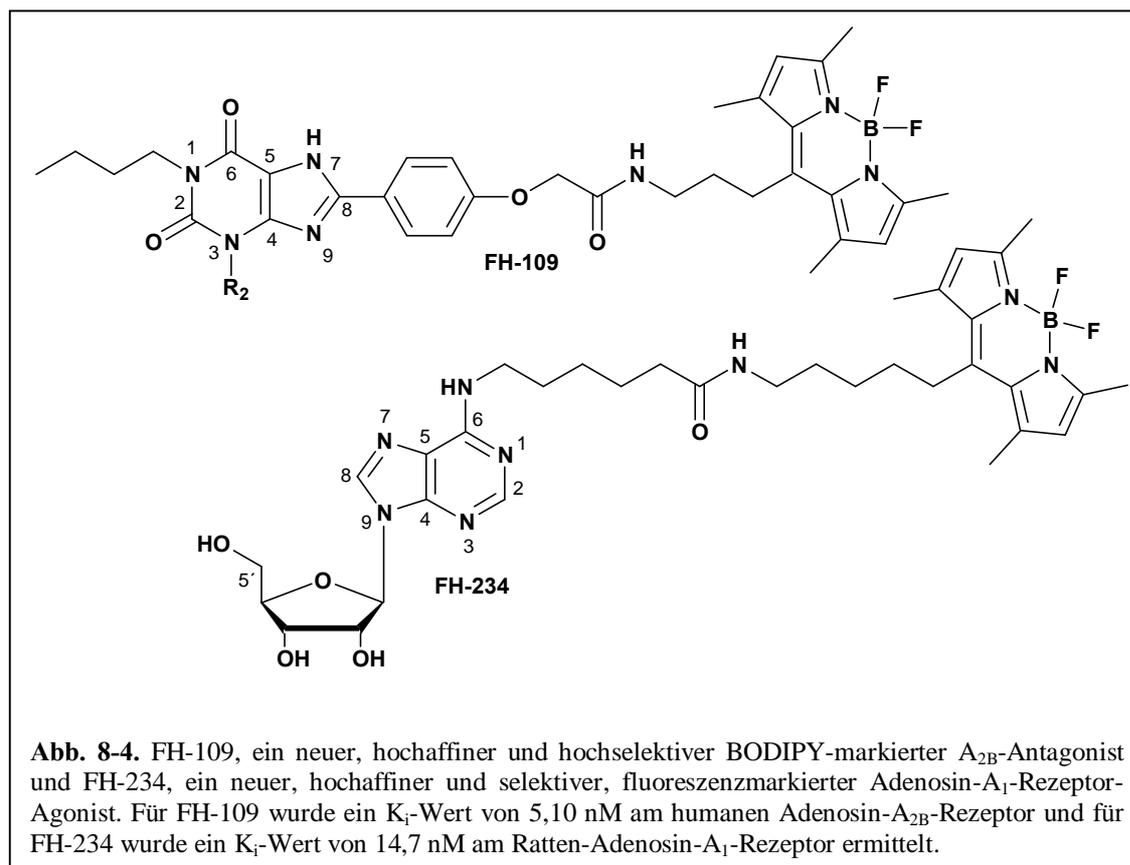


desoxyadenosin-Derivate von Herrn Dr. H. Phuoc Le in unserem Arbeitskreis synthetisiert, die später – radioaktiv markiert mit ¹⁸F – als A₁-Agonisten in der PET-Diagnostik Verwendung finden sollen. Dabei wurde die Verbindung N⁶-Cyclopentyl-5'-fluor-5'-desoxyadenosin (**HPLL-1**) als neuer potenter und selektiver Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonist charakterisiert. Derivate, die in der Position N⁶ statt des Cyclopentyl-Restes einen Cyclobutyl-, Norboryl- oder Cyclohexyl-Rest aufwiesen, zeigten ebenfalls hohe Affinitäten zum A₁-Rezeptor-Subtyp. In GTP-Shift- und Agonist-Shift-Experimenten konnten sie als Voll-Agonisten am A₁-Rezeptor charakterisiert werden. N⁶-Cyclopentyl-5'-[¹⁸F]Fluor-5'-desoxyadenosin wäre der erste selektive

A₁-Agonisten, der in der Positronen-Emissions-Tomographie, z.B. in der medizinischen Diagnostik von kardiologischen oder ZNS-Erkrankungen, zum Einsatz kommen könnte.

Fluoreszenzmarkierte Adenosin-Rezeptor-Liganden stellen ebenso wie Radioliganden pharmakologische Werkzeuge zur Charakterisierung von Rezeptoren dar. Auf der Suche nach potenten und selektiven, fluoreszenzmarkierten A_{2B}-Antagonisten und A₁-Agonisten synthetisierte Dr. Fabian Heisig eine Serie von Xanthin- und N⁶-substituierten Adenosin-

Derivaten, die mit funktionalisierten BODIPY-Derivaten unterschiedlicher Kettenlänge gekoppelt wurden. Die fluoreszenzmarkierten 1-Alkyl und 1,3-Dialkyl-8-Phenylxanthin-Derivate wurden als hochaffine und teilweise selektive A_{2B} -Liganden charakterisiert. **FH-109** wies dabei die höchste Affinität und Selektivität zum Adenosin- A_{2B} -Rezeptor auf.



Die Kopplung von Adenosin-Derivaten mit einem BODIPY-Fluorophor über einen Spacer unterschiedlicher Kettenlänge wurde ebenfalls sehr gut toleriert und führte zu Verbindungen mit hoher Affinität und Selektivität zum Adenosin- A_1 -Rezeptor. [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien ergaben, dass der BODIPY-Fluorophor keinen negativen Einfluss auf die intrinsische Aktivität dieser Verbindungen ausübt. **FH-234** wurde als neuer, hochaffiner und selektiver, fluoreszenzmarkierter A_1 -Agonist identifiziert.

Iberogast[®] (**STW5**) ist ein Pflanzenextrakt, der sich aus vielen Einzelkomponenten, wie z.B. der bitteren Schleifenblume (**STW6**) und dem Schöllkraut (**STW 5 K IX**), zusammensetzt und bei der funktionellen Dyspepsie (Verdauungsstörung), die zu den häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen gehört, angewendet wird. Der Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Karin Nieber aus

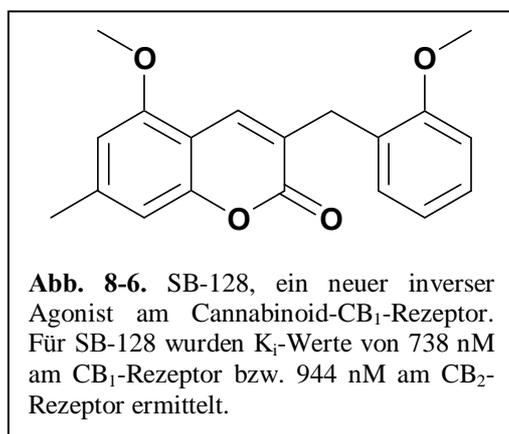
Leipzig zeigte für das **STW5** und das **STW6** einen entzündungshemmenden Effekt. Da das Nucleosid Adenosin beim Entzündungsgeschehen freigesetzt wird, untersuchte Herr Sebastian Michael diese und weitere Extrakte auf ihre Affinität zu Adenosin-Rezeptoren.

In funktionellen [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien wurde die bittere Schleifenblume (**STW6**) als inverser Agonist an Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren charakterisiert. Das Forschungspräparat **STW 5 K IX** (Schöllkraut) zeigte partielle agonistische Eigenschaften am A₁- und ebenso wie **STW6** invers-agonistische Effekte am A_{2A}-Rezeptor. Hinsichtlich des Pflanzenextraktes **STW5** wird ein Detergens-Effekt, der z.B. für Saponine bereits beschrieben worden ist, vermutet.

Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, wird neben einem Einsatz von Adenosin-Rezeptor-Antagonisten auch eine Therapie mit CB₁-Antagonisten bei Morbus Parkinson diskutiert. Auf der Suche nach neuen und selektiven Cannabinoid-Rezeptor-Liganden wurden Imidazothiazepinone (Frau Prof. Dr. Kiec-Kononowicz aus Krakau, Polen) sowie 3-Alkylcumarinen und 2H-Chromen-Derivate (Dr.

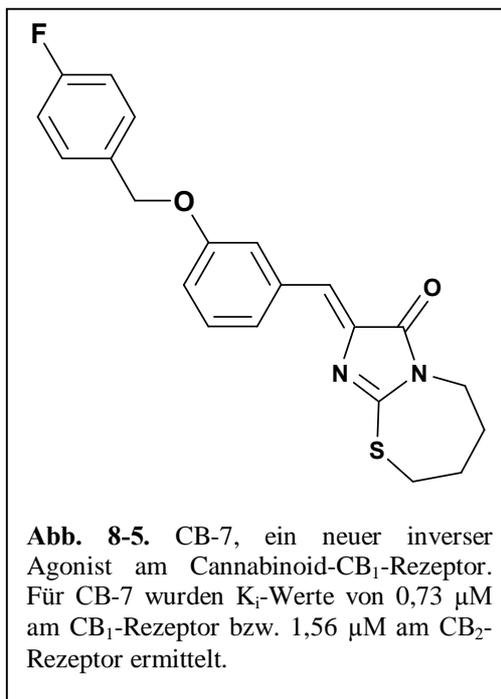
Jakob Törrang, Arbeitskreis von Prof. Dr. S. Bräse aus Karlsruhe) untersucht. Diese Verbindungen wurden in einem neu etablierten High-Throughput-Verfahren in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Cannabinoid-Rezeptoren *in-vitro*-pharmakologisch untersucht.

Aus der Reihe der Imidazo[1,2-d][1,4]thiazepinone konnte eine potente Verbindung



charakterisiert werden (**CB-7**). Allerdings ging die Bindungsneigung zum CB₁-Rezeptor mit einer geringen Selektivität gegenüber dem CB₂-Rezeptor einher. In [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien zeigten die Imidazothiazinone und Imidazothiazepinone einen partial invers agonistischen Effekt am Cannabinoid-CB₁-Rezeptor.

3-Alkylcumarine und 2H-Chromen-Derivate zeigten ebenfalls eine Bindungsneigung zu



128) aus der Reihe der *2H*-Chromen-Derivate konnte dabei als neue Leitstruktur identifiziert werden. Durch gezielte Strukturmodifikationen soll zukünftig die Affinität und Selektivität weiter gesteigert werden. [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien haben ergeben, dass es sich bei den Verbindungen aus dieser Reihe ebenfalls um inverse Agonisten am CB₁-Rezeptor handelt.

9. EXPERIMENTELLER TEIL

9.1. GERÄTE UND MATERIALIEN

Analysenwaage	Sartorius CP225D
Autoklaven	Varioklav [®] Dampfsterilisator, H + P
	Systec 3850 ELV
Brutschränke	Heraeus, HERAccl [®] 240
	Jouan IG 650
Digitalkamera	Power Shot A610
Glasfaserfilter (24er und 48er Harvester)	Whatman [®] , GF/B, Schleicher und Schüll GF52 (GF/C), Schleicher und Schüll
Glasfaserfilter (96er Harvester)	Uni-Filter [®] -96, GF/B und GF/C, Perkin Elmer
Harvester	Brandel M24, Gaithersburg, MD, USA Brandel M48, Gaithersburg, MD, USA Brandel 96, Gaithersburg, MD, USA
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf
Homogenisator	RW 16 basic, IKA Labortechnik
Laminar-Airflow-Werkbank	NUNC [®] Safe flow 1.2 NUNC [®] BIOFLOW
Liquid Scintillation Counter	TRICARB 2900TR, Canberra Packard Topcount [®] NXT, Packard Instrument Company
LSC-Cocktails	UltimaGold [®] , Canberra Packard Ready Safe [™] , Beckman Coulter Microscint-20, Perkin Elmer
Maxi vials	Roth
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss Wllovert30, Wetzlar Axiovert 100, Zeiss
Mikrotiterplatten	Microtest Plate 96, Sarstedt Assay Block 0,5 ml Costar [®] Corning Inc.
Mini vials C	Roth
Multipette	Eppendorf Multipette [®] Plus
pH-Meter	WTW pH Elektrode SenTix 41 WTW pH 197

PE-vials	Polyethylen-Vials, 4 ml und 5 ml, Roth
Pipetten	Eppendorf Research, 2-20 µl Eppendorf Research, 20-200 µl Mettler Toledo Volumate, 100-1000 µl
Pipettenspitzen	Sarstedt
Rührer mit Heizplatte	IKA Labortechnik RCT basic
Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schüttelwasserbad	GFL [®] 1083
Software	GraphPad Prism [®] , Version 3.0 CS Chemdraw Ultra, Ultra Version 6.0 Adobe [®] PhotoShop [®] 6.0 Microsoft Visio TILLvisION
Tischzentrifugen	Beckman Allegra [®] 2IR BIOFUGE pico, Heraeus
Trockenschrank	Heraeus T 6120
Ultraschallbad	Bandelin SONOREX RK 52H Bandelin SONOREX RK 110H
Ultraturrax	IKA Labortechnik T25 basic
Ultrazentrifuge (+ Zubehör)	Beckman Coulter SW 55 Ti (Rotor) Beckman Ultra-Clear [™] Centrifuge Tubes (13 x 51, 5 ml)
UV/Vis Spectrophotometer	Beckman [®] DU 530
Vortexer	IKA Labortechnik MS1, Minishaker
Waage	Scaltec SBC 42
Wipptisch	Shaker DRS-12, Sky Line, Elmi
Zentrifugen (+ Zubehör)	Beckman Avanti, J-20I Beckman, JA-20 (Rotor) Beckman Centrifuge Tubes (29 x 104 mm, 50 ml)

9.2. SUBSTANZEN UND REAGENZIEN

9.2.1. KOMMERZIELL ERHÄTLICHE CHEMIKALIEN

ADA	Calbiochem, 116880
2-Propanol p.a.	Merck, 1.00994.0500
2-Propanol tech.	ZVE
Adenin	Sigma, A-8626
AM281	Sigma, A-0980
BSA, Albumin Fraktion V	Roth, 8076.2
CaCl ₂	Sigma, C-3306
CADO	Fluka BioChemika, 22997; Sigma, C-5134
CGS21680	Sigma, C-141; Tocris, 1063
CHAPS	Roth, 1479.1
Cholesterol	Applichem, A-0807
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma, B-0770; Applichem, 3480,001
CP55,940	Tocris, 949
CPA	RBI, A-17
D (+) Saccharose	Roth, 4621.1
DMSO	Riedel-de Haën, 70040
DPCPX	Sigma, C-101
DTT	Applichem, A-2948
EDTA	Sigma, E-5134
Ethanol p.a.	Merck, 1.00983.1000
Ethanol techn.	ZVE
GDP	Sigma, G-7129
GTP γ S	Sigma, G-8634
H ₂ SO ₄	ZVE
H ₃ PO ₄ (85 %)	Applichem, A-0637
HCl 37%	Applichem, A-0659
KCl	Applichem, 2939,025
KH ₂ PO ₄	Sigma, P-9791
MgCl ₂	Fluka BioChemika, 63068
M β CD	Sigma, M-7439
Na ₂ HPO ₄	Applichem, 1938,05
NaCl	KMF Optichem, 123762

NaOH-Rotuli	Fluka BioChemika, 71689
NECA	Sigma, E-2387
Polyethylenimin-Lösung (50 %)	Sigma, P-3143
R-PIA	Sigma, P-4532
Tricin	Sigma, T-5816
Tris	Roth, AE15.3
Triton X-100	Applichem, 1388-05
WIN55,212-2-Mesylat	Tocris, 1038
ZM241385	Tocris, 1036

9.2.2. NICHT-KOMMERZIELL ERHÄLTliche CHEMIKALIEN

AB -Substanzen	Verbindungen von Dr. Alexander Bauer, Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn
Ali -Substanzen	Verbindungen von Dr. Ali El-Tayeb, Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn
CB/ChM -Substanzen	Verbindungen aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. K. Kiec-Kononowicz, Polen
Cheng -Substanzen	Verbindungen von Dr. Cheng, Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn
FH -Substanzen	Verbindungen von Dr. Fabian Heisig, Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn
HPLL -Substanzen	Verbindungen von Dr. H. Phuoc Le, Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn
jcb -Substanzen	Verbindungen von Dr. Joachim C. Burbiel, Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn
Nieber -Substanzen	Pflanzenextrakte von Sebastian Michael Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Karin Nieber, Leipzig
SB -Substanzen	Verbindungen von Dr. Jacob Törang, Arbeitskreis Herr Prof. Dr. Stefan Bräse, Karlsruhe
MSX-2, MSX-3	Synthese im Arbeitskreis von Prof. Dr. Christa E. Müller

9.2.3. RADIOLIGANDEN

Radioligand	Spezifische Aktivität	Hersteller
[³ H]CCPA	48,6 Ci/mmol (1,80 TBq/mmol) 42,6 Ci/mmol (1,58 TBq/mmol)	PerkinElmer Life Sciences, USA
[³ H]CGS21680	45 Ci/mmol (1,67 TBq/mmol) 47 Ci/mmol (1,74 TBq/mmol) 40,5 Ci/mmol (1,50 TBq/mmol)	PerkinElmer Life Sciences, USA
[³ H]CP55,940	158 Ci/mmol (5,85 TBq/mmol)	PerkinElmer Life Sciences, USA
[³ H]DPCPX	129 Ci/mmol (4,77 TBq/mmol)	Amersham Life Science, UK
[³⁵ S]GTPγS	1250 Ci/mmol (46,25 TBq/mmol)	PerkinElmer Life Sciences, USA
[³ H]MSX-2*	84 Ci/mmol (3,11 TBq/mmol)	Amersham Biosciences, UK
[³ H]PSB-11*	53 Ci/mmol (1,96 TBq/mmol)	Amersham Biosciences, UK
[³ H]PSB-603*	73 Ci/mmol (2,79 TBq/mmol)	GE Healthcare, UK
[³ H]ZM241385	17 Ci/mmol (0,63 TBq/mmol)	Tocris, UK

* Die nicht radioaktiven Vorstufen dieser Radioliganden wurden in unserem Arbeitskreis synthetisiert. Die Tritiumierung erfolgte extern durch Amersham Biosciences, UK.^{169, 309, 319}

9.2.4. ZELLKULTURBEDARF UND NÄHRMEDIEN

DMEM-F12 Medium 1:1, w Glucose w L-Glutamin	Invitrogen, 31330095
Deckgläschen, rund, 12 mm	Labomedic, LAME111520
Falcon Tubes	Sarstedt
Fötale Kalbsserum (FCS) G418	Sigma, F-0804 Merck, 345810
Gewebekulturflaschen, steril	Sarstedt
Glutaraldehyd-Lösung (50 %)	Roth, 4995.1
hA ₁ -/hA _{2A} -/hA ₃ -CHO-Zellen	AK Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz, Pharmazeutisches Institut, Würzburg
hA _{2B} -CHO-Zellen	AK Prof. Dr. Christa E. Müller
Immersion oil for fluorescence microscopy	Olympus
K1-CHO-Zellen	85051005 (ECACC)

Kryovials, steril	Sarstedt
Mounting-Solution, Immu-Mount	Thermo Electron Corporation, Pittsburg
Neubauer-Zählkammer	Roth
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel-Gläser
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml	Invitrogen, 15140130
Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	
Phenolrot 0,5 % in DPBS	Sigma, P-0290
Serologische Einmalpipetten, steril	Sarstedt
TC-Platte, 12-well	Cellstar, Greiner bio-one
Trypsin (2,5 %)	Lonza, 17-160
Ultraglutamin	Lonza, 7MB0044

9.2.5. KULTIVIERTE ZELLINIEN

Zelllinie	Vektor/Expressions-System	Rezeptordichte
hA ₁ -CHO-Zellen	pcDNA3-Vektor, stabil transfiziert, positive Klone selektiert mit Neomycin	1001 ± 418 bis 1069 ± 569 fmol/mg Protein ²⁹²
hA _{2A} -CHO-Zellen	pcDNA3-Vektor, stabil transfiziert, positive Klone selektiert mit Neomycin	247 ± 104 fmol/mg Protein ²⁹²
hA _{2B} -CHO-Zellen	pLXSN-Vektor, stabil transfiziert, positive Klone selektiert mit G418 (Gentamycin)	502 ± 57 fmol/ mg Protein ³¹⁹
hA ₃ -CHO-Zellen	pcDNA3-Vektor, stabil transfiziert, positive Klone selektiert mit Neomycin	807 ± 613 fmol/mg Protein ²⁹²
K1-CHO-Zellen		

9.3. PUFFERLÖSUNGEN

50 mM Tris-Puffer, pH 7,4

6,05 g Tris (50 mM) werden in 1,0 l deionisiertem Wasser gelöst. Mit konzentrierter Salzsäure (37%) wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

10 mM Tricin/5 mM DTT-Puffer, pH 7,0

89,6 mg Tricin (10 mM) und 38,6 mg DTT (5 mM) werden in 50 ml deionisiertem Wasser gelöst. Mit 0,1 M Natronlauge wird der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Dieser Puffer wird zur 1:1000-Verdünnung des Radioliganden [³⁵S]GTP γ S verwendet.

Inkubationspuffer für [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an Adenosin-A₁- und Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptoren

6,05 g Tris (50 mM), 5,84 g NaCl (100 mM), 0,37 g EDTA (1 mM), 1,02 g MgCl₂ x 6 H₂O (5 mM) und 0,15 g DTT (1 mM) werden in 1,0 l deionisiertem Wasser gelöst. Mit konzentrierter Salzsäure (37%) wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Vor der Verwendung wird dem Puffer GDP in Form einer 1 mM Stammlösung in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 (Endkonzentration bei [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an A₁ AR: 0,01 mM, an CB₁ und CB₂ R: 0,03 mM) und BSA (0,5 %) frisch zugesetzt.

Inkubationspuffer für [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an Adenosin-A_{2A}- und Adenin-Rezeptoren

Durch eine 1:10-Verdünnung des Inkubationspuffers für [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an Adenosin-A₁- und Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptoren mit einer 1 mM GDP-Stammlösung (in Tris-Puffer, pH 7,4) wird die folgende Zusammensetzung des Puffers erhalten: 45 mM Tris, 90 mM NaCl, 0,9 mM EDTA, 4,5 mM MgCl₂ und 0,9 mM DTT und 100 μ M GDP. GDP und BSA (0,5 %) werden dem Puffer vor Gebrauch frisch zugesetzt.

Waschpuffer für [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien

6,05 g Tris (50 mM) und 0,476 g MgCl₂ (5 mM) werden in 1,0 l deionisiertem Wasser gelöst. Mit konzentrierter Salzsäure (37%) wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

0,32 M Sucrose-Lösung

109,5 g Sucrose (0,32 M) wird bei 4°C in 1,0 l deionisiertem Wasser gelöst. Diese Lösung muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

Inkubationspuffer für [³H]CP,55940-Bindungsstudien

6,05 g Tris (50 mM) und 0,610 g MgCl₂ (3 mM) werden in 1,0 l deionisiertem Wasser gelöst. Mit konzentrierter Salzsäure (37%) wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Kurz vor der Verwendung wird dem Inkubationspuffer 0,1 % BSA zugesetzt.

Waschpuffer für [³H]CP,55940- und [³H]PSB603-Bindungsstudien

6,05 g Tris (50 mM) werden in 1,0 l deionisiertem Wasser gelöst. Mit konzentrierter Salzsäure (37%) wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Kurz vor der Verwendung wird dem Waschpuffer 0,1 % BSA zugesetzt.

PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline), pH 7,2

58,4 g NaCl (150 mM), 74,5 g KCl (2,5 mM), 178 g Na₂HPO₄ (7,5 mM) und 136,1 g KH₂PO₄ (1,5 mM) werden in 1,0 l deionisiertem Wasser gelöst. Mit konzentrierter Salzsäure (37%) wird der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Die Lösung wird ggf. autoklaviert.

Trypsin-EDTA-Lösung (steril)

500 ml PBS-Puffer, 0,6 ml EDTA-Lösung (20 min bei 120°C autoklavieren), 10 ml Trypsin (2,5 %), steril und Phenolrot (0,5 %), steril werden gemischt und bei 4°C gelagert.

9.4. ZELLKULTUR

9.4.1. AUFTAUEN VON ZELLEN

Ein in flüssigem Stickstoff eingelagertes Backup der entsprechenden Zelllinie wird möglichst schnell im Wasserbad (37°C) aufgetaut. Die Zellsuspension wird steril in eine Zellkulturflasche, die bereits zuvor mit vorgewärmtem Medium befüllt worden ist, überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgt im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit). Nach einigen Stunden im Brutschrank wird das Medium gewechselt und dann alle 2-4 Tage erneuert bzw. die Zellen werden bei Bedarf gesplittet.

9.4.2. SPLITTEN VON ZELLEN

Handelt es sich bei den Zellen um adhärent wachsende Zelllinien so wird bei 80-90 % Konfluenz das Medium entfernt und die am Boden der Zellkulturflasche anhaftende Zellschicht mit ca. 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch die Zugabe von ca. 2 ml vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung und einer Inkubation von mehreren Minuten im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) abgelöst, wozu unter Umständen zusätzlich ein vorsichtiges Klopfen gegen die Zellkulturflasche erforderlich ist. Die Reaktion mit Trypsin wird durch die Zugabe des jeweiligen Zellkulturmediums abgestoppt, wobei sich das Volumen des Mediums nach dem jeweiligen Splittverhältnis richtet. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das Volumen des Zellkulturmediums das Volumen der Trypsin-EDTA-Lösung übersteigt. Die Zellen in der Zellsuspension werden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzeln und je nach Vorhaben und Wachstumsgeschwindigkeit auf Zellkulturflaschen verteilt, in denen bereits auf 37°C vorgewärmtes Medium vorgelegt wurde. Anschließend werden die Zellen im Brutschrank inkubiert.

9.4.3. EINFRIEREN VON ZELLEN

Zum Erstellen von Backups wird die Zellsuspension der adhärent wachsenden Zellen nach dem Ablösen mit Trypsin in Falcon-Tubes überführt und bei 200 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet im jeweiligen Zellkulturmedium, das 10 % steriles DMSO enthält, resuspendiert. Die resultierende Zellsuspension wird in Kryovials zu 1-2 ml aliquotiert und sofort bei -20°C weggefroren. Nach 2 Tagen werden die Backups in den -80°C-Tiefkühlschrank und nach einigen Tagen zur längeren Aufbewahrung in den Stickstofftank überführt.

9.4.4. VERWENDETE NÄHRMEDIEN

K1-CHO-Zellen

DMEM F-12-Medium supplementiert mit

10 % fötalem Kälberserum

1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)

CHO-hA₁-, hA_{2A}- und hA₃-Zellen

DMEM F-12-Medium supplementiert mit

10 % fötalem Kälberserum

1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)

0,4 % G418 (50 mg/ml)

CHO-hA_{2B}-Zellen

DMEM F-12-Medium supplementiert mit

10 % fötalem Kälberserum

1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)

0,4 % G418 (50 mg/ml)

1 % Ultraglutamin

9.5. RATTENCORTEX- UND RATTENSTRIATUM-MEMBRANPRÄPARATION

Die Rattenhirne werden im tiefgefrorenen Zustand über die Firma Pel, Freez[®], Rogers, Arkansas, USA bezogen und bis zur Präparation bei -80°C gelagert. Die Hirne werden langsam auf Eis aufgetaut und mit einigen Tropfen Sucrose-Lösung beträufelt. Dann werden sie auf eine Glasplatte auf Eis gelegt und zur besseren Handhabung mit der Pinzette am Kleinhirn fixiert. Mit Hilfe eines Skalpells wird die Hirnrinde (Cortex) abgeschabt, bis die darunter liegende Hirnregion, deutlich erkennbar als hellere Region, sichtbar wird. Das auf diese Weise herauspräparierte Cortex-Gewebe wird in ein Becherglas auf Eis gegeben, das etwa 100 ml an eiskalter Sucrose-Lösung enthält. Das Striatum erhält man, wenn man mit Hilfe eines Skalpells, nachdem das Cortex entfernt wurde, die Großhirnhälfte von oben so weit abnimmt, bis das darunter liegende, ovale Striatum erkennbar wird. Die so erhaltenen Striata werden in einem Becherglas auf Eis vereinigt, das etwa 100 ml an eiskaltem Tris-Puffer enthält.

Membran-Präparation von Rattencortex (P2)

Das Cortex-Gewebe wird durch Verwendung des Ultraturax (Stufe 3, 60 s) zerkleinert, um die Membranen aufzuschließen. Die Suspension wird dann in Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1.000 g und 4 °C über 10 min zentrifugiert (Beckman Avanti J-20I, JA-20). Die Pellets werden verworfen und der Überstand auf saubere Zentrifugenröhrchen verteilt. Dieser wird bei 37.000 g und 4 °C über 60 min zentrifugiert. Die Pellets werden in eiskaltem, deionisiertem Wasser resuspendiert und mit dem Ultraturax (Stufe 3, 10 s) nochmals zerkleinert. Die Suspension wird dann erneut bei den zuletzt verwendeten Parametern zentrifugiert, der Überstand anschließend wieder verworfen und die Pellets werden nun in eiskaltem Tris-Puffer aufgenommen. Der vierte und letzte Zentrifugationsschritt wird wiederum mit den gleichen Einstellungen durchgeführt. Die Pellets werden in 4 ml Tris-Puffer/g Nassgewicht resuspendiert und mit dem Homogenisator (3-4x, Stufe 7-10) homogenisiert. Die erhaltene Proteinsuspension wird aliquotiert (1-2 ml) und bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgt eine Proteinbestimmung nach Lowry oder Bradford.

Membran-Präparation des Rattenstriatums (P1)

Analog zur Präparation des Rattencortex wird das Gewebe durch Verwendung des Ultraturax (Stufe 3, 60 s) zerkleinert. Die Suspension wird ebenfalls auf Zentrifugenröhrchen verteilt, allerdings bei 37.000 g und 4 °C über 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets werden in eiskaltem Tris-Puffer aufgenommen. Die Zerkleinerung erfolgt wiederum

durch den Ultraturrax (Stufe 3, 10 s). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit den oben genannten Einstellungen, wird der Überstand erneut verworfen, die Pellets werden in 3 ml Tris-Puffer/g Nassgewicht resuspendiert, mit dem Homogenisator homogenisiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgt eine Proteinbestimmung nach Lowry oder Bradford.

9.6. PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt nach der von Bradford beschriebenen Methode.²⁹⁹ Um die Bradford-Lösung herzustellen, werden 100 mg Coomassie Blue G 250 in einem 200 ml Becherglas eingewogen. Das Pulver wird zunächst in 50 ml Ethanol abs. gelöst und anschließend werden 100 ml H₃PO₄ (85 %) zugeben. In einem 1000 ml Messzylinder werden ca. 600 ml dem. Wasser vorgelegt, die Coomassie-Lösung wird vorsichtig hinzugeben, mit dem. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und daraufhin filtriert. Die fertige Bradford-Lösung muss in einer Braunglas-Flasche im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Vor der eigentlichen Proteinbestimmung muss die Proteinkonzentration einer BSA-Stammlösung bestimmt werden. Es wird eine 1 mg/ml BSA-Stammlösung in dem. Wasser hergestellt und die Absorption bei 280 nm in einer Quarzküvette gemessen. Der Sollwert der Optischen Dichte (OD) beträgt 0.66. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der OD bei 280 nm und der Menge an BSA in Lösung. Aus dem Grund kann mit Hilfe der gemessenen OD die tatsächliche BSA-Konzentration der Verdünnungsreihe für die Kalibriergerade berechnet werden. Aus einer 10 mg/ml BSA-Stammlösung in dem. Wasser werden folgende Verdünnungen hergestellt.

Pipettierschema

BSA (mg/ml)	BSA-Stammlösung (µl)	dem. Wasser (µl)
8	160	40
6	120	80
4	200	300
2	100	400
1	50	450
0,5	25	475
0,2	10	490

Die Rattenhirn- oder CHO-Membranpräparationen, deren Proteingehalt bestimmt werden soll, werden im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 mit dem. Wasser verdünnt. Für die Kalibriergerade werden Einzelbestimmungen und für die Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. Es werden 3 µl der Probe bzw. der Verdünnungsreihe in eine Küvette pipettiert und 600 µl Bradford-Lösung hinzugefügt. Die Proben müssen innerhalb von 30 min bei 590 nm gegen den Nullwert (dem. Wasser) vermessen werden.

9.7. RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN-REZEPTOREN

9.7.1. VERDÜNNUNGSSCHEMATA

Die Testsubstanzen, die in Radioligand-Bindungsstudien eingesetzt werden, sind in der Regel in DMSO gelöst. Die Konzentration der hergestellten Stammlösung beträgt standardmäßig 10 mM. In Konkurrenzexperimenten werden Inhibitionskurven durch den Einsatz von sechs bis sieben Konzentrationen generiert, die drei Zehnerpotenzen umfassen sollten. Die Verdünnungsreihen können mit Hilfe der nachfolgenden Verdünnungsschemata hergestellt werden. Bei Einsatz der Testsubstanzen in Bindungsstudien muss darauf geachtet werden, dass eine DMSO-Konzentration von 2,5 % nicht überstiegen wird, da dies einen Einfluss auf die spezifische Bindung haben könnte. Aus diesem Grund werden die Verdünnungsreihen für Konkurrenzexperimente an Adenosin-Rezeptoren mit einem Gemisch aus Tris-Puffer und DMSO in einem Verhältnis von 90 zu 10 und für GTP γ S-Bindungsstudien in einem Verhältnis von 80 zu 20 durchgeführt.

Verdünnungsreihen für Konkurrenzexperimente an Adenosin-A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren (1:4-Verdünnung),

10 mM Stammlösung in DMSO

	Verdünnungsreihe ab 250 μ M	Konz. im Assay	Verdünnungsreihe ab 100 μ M	Konz. im Assay	Verdünnungsreihe ab 30 μ M	Konz. im Assay
1	50 μ l + 450 μ l Tris	250 μ M	25 μ l + 600 μ l T/D	100 μ M	12 μ l + 988 μ l T/D	30 μ M
2	200 μ l + 300 μ l T/D	100 μ M	300 μ l + 700 μ l T/D	30 μ M	300 μ l + 600 μ l T/D	10 μ M
3	300 μ l + 700 μ l T/D	30 μ M	300 μ l + 600 μ l T/D	10 μ M	300 μ l + 700 μ l T/D	3 μ M
4	300 μ l + 600 μ l T/D	10 μ M	300 μ l + 700 μ l T/D	3 μ M	300 μ l + 600 μ l T/D	1 μ M
5	300 μ l + 700 μ l T/D	3 μ M	300 μ l + 600 μ l T/D	1 μ M	300 μ l + 700 μ l T/D	0,3 μ M
6	300 μ l + 600 μ l T/D	1 μ M	300 μ l + 700 μ l T/D	0,3 μ M	300 μ l + 600 μ l T/D	0,1 μ M
7	300 μ l + 700 μ l T/D	0,3 μ M	300 μ l + 600 μ l T/D	0,1 μ M	300 μ l + 700 μ l T/D	0,03 μ M

Zunächst werden die Substanzen bei einer Konzentration von 10 μ M getestet. Zeigen sie eine Inhibition von ≥ 50 %, so werden die K_i-Werte in Konkurrenzexperimenten bestimmt.

Screening bei 10 μ M

	Konz. im Assay
1	10 μ l + 240 μ l T/D 100 μ M
2	40 μ l + 360 μ l T/D 10 μ M

Verdünnungsreihen für GTP γ S-Bindungsstudien an Adenosin-A₁- und A_{2A}-Rezeptoren (1:20-Verdünnung)

2 mM Stammlösung in T/D

	Verdünnungsreihe ab 100 μ M	Screening bei 10 μ M
	Konz. im Assay	Konz. im Assay
1	Stammlösung	100 μ M
		5 μ l + 20 μ l Tris
		10 μ M
2	10 μ l + 90 μ l T/D	10 μ M
3	20 μ l + 180 μ l T/D	1 μ M
4	20 μ l + 180 μ l T/D	0,1 μ M
5	20 μ l + 180 μ l T/D	0,01 μ M
6	20 μ l + 180 μ l T/D	0,001 μ M
7	20 μ l + 180 μ l T/D	0,0001 μ M

Testsubstanzen, die auf ihre intrinsische Aktivität hin untersucht werden sollen, werden in GTP γ S-Bindungsstudien bei einer Konzentration von 10 μ M getestet.

9.7.2. KOMPETITIONSEXPERIMENTE

Die Substanzen zur Bestimmung der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung sowie die Testsubstanzen, die nach dem oben genannten Pipettierschema entsprechend verdünnt worden sind, werden in Triplets oder Duplets in PE-vials (24- bzw. 48-Reck) oder *wells* (96-well-plate) pipettiert. Anschließend wird die Radioligand-Lösung in Tris-Puffer und ggf. der Inkubationspuffer hinzugegeben. Das Protein wird ebenfalls mit Tris-Puffer auf die gewünschte Konzentration (30-50 μ g/vial) verdünnt. Um endogenes, d.h. in der Membranpräparation vorhandenes, Adenosin abzubauen, wird die Proteinsuspension mit ADA versetzt und 10 – 15 Minuten vorinkubiert. Das Kompetitionsexperiment wird durch die Zugabe der vorinkubierten Proteinsuspension zum Reaktionsansatz gestartet. Der Inkubationsansatz wird gut durchmischt (Vortexer) und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationszeit richtet sich nach dem jeweiligen Radioliganden. Die Reaktion wird durch die Zugabe von ca. 2 ml eiskaltem Tris-Puffer gestoppt und die gebundene von der freien Radioaktivität durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter mit Hilfe eines 24er, 48er oder 96er Zellharvesters getrennt. Um die unspezifische Bindung zu minimieren, wird der Filter zwei- bis dreimal mit ca. 2 ml eiskaltem Tris-Puffer nachgespült. Bei Verwendung eines 24er oder 48er Zellharvesters werden die Filter ausgestanzt, in Szintillationsvials überführt und mit je 2,5 ml Szintillationscocktail (Ready SafeTM, Beckman Coulter) versetzt. Nach 6 – 9 h Vorinkubation werden die Proben im LSC-

Counter (TRICARB 2900TR, Canberra Packard) vermessen. Bei Verwendung des 96-Harvesters werden die Filterplatten zunächst von unten mit Klebefolie versiegelt. Anschließend wird 40-50 μl Scintillationscocktail (Microscint-20, Perkin Elmer) in die *wells* pipettiert und die Platte von oben mit einer weiteren, durchsichtigen Klebefolie bedeckt. Nach einer Vorinkubationzeit von 10 h wird die Filterplatte im Topcount[®]NXT, Packard Instrument Company vermessen. Jedes Konkurrenzexperiment wird mindestens dreimal in voneinander unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplets, durchgeführt.

Zur Analyse der Konkurrenzexperimente werden jeweils die Werte der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert, um die spezifische Bindung des Radioliganden in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der Testsubstanzen zu ermitteln. Aus diesen Daten wird mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 3.0, eine sigmoidale Inhibitionskurve ermittelt, aus der der IC_{50} - bzw. K_i -Wert als Maß für die Affinität der getesteten Substanz am jeweiligen Rezeptor ermittelt wird.²⁵⁶

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin- A_1 -Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]CCPA an Rattencortex-, Rattenstriatum- und CHO-hA₁-Membranpräparationen

Pipettierschema:

50 μl	Tris/DMSO* (Gesamtbindung) oder 10 μM CADO in Tris/DMSO* (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in Tris/DMSO*
50 μl	50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 μl	Radioligand [³ H]CCPA (Endkonzentration: 1 bzw. 10 nM, K_D -Wert: 0,2 nM ¹⁶⁴ (Ratte) bzw. 0,61 nM ²⁹² (human))** in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 μl	Proteinsuspension: Rattencortex-, Rattenstriatum-Membranpräparation (30 $\mu\text{g}/\text{vial}$) bzw. CHO-hA ₁ -Membranpräparation (5 $\mu\text{g}/\text{vial}$) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, vorinkubiert mit 1,5 U/ml ADA***
200 μl	Endvolumen

Inkubationszeit: 90 min bei RT

* Das Verhältnis von 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und DMSO beträgt 90 zu 10.

** In Konkurrenzexperimenten beträgt die Radioligand-Konzentration 1 nM, in Radioligand-Bindungsstudien an Rattenstriatum-Membranpräparationen mit verändertem Cholesterol-Gehalt 10 nM.

*** 3 μl einer 2 mg/ml Stammlösung ADA (500 U/ml) pro ml Proteinsuspension.

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]DPCPX an Rattencortex- und Rattenstriatum-Membranpräparationen

Pipettierschema:

50 µl	Tris/DMSO* (Gesamtbindung) oder 10 µM DPCPX in Tris/DMSO* (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in Tris/DMSO*
50 µl	50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	Radioligand [³ H]DPCPX (Endkonzentration: 0,4 nM, K _D -Wert: 0,28 nM ¹⁶³) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	Proteinsuspension: Rattencortex bzw. Rattenstriatum-Membranpräparation (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, vorinkubiert mit 1,5 U/ml ADA**
200 µl	Endvolumen

Inkubationszeit: 90 min bei RT

* Das Verhältnis von 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und DMSO beträgt 90 zu 10.

** 3 µl einer 2 mg/ml Stammlösung ADA (500 U/ml) pro ml Proteinsuspension.

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]DPCPX an Rattencortex-Membranpräparationen unter Zusatz von GTP (GTP-Shift-Experiment)

Pipettierschema*:

25 µl	DMSO (Gesamtbindung) oder 10 µM DPCPX in DMSO (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in DMSO
725 µl	50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	100 µM GTP in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	Radioligand [³ H]DPCPX (Endkonzentration: 0,4 nM, K _D -Wert: 0,28 nM ¹⁶³) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	Proteinsuspension: Rattencortex-Membranpräparation (70 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, vorinkubiert mit 1,5 U/ml ADA**
1000 µl	Endvolumen

Inkubationszeit: 90 min bei RT

* Alternativ kann das obige Pipettierschema unter abgeänderten Bedingungen verwendet werden.

** 3 µl einer 2 mg/ml Stammlösung ADA (500 U/ml) pro ml Proteinsuspension.

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]CGS21680 an Rattenstriatum-Membranpräparationen

Pipettierschema:

50 µl	Tris/DMSO* (Gesamtbindung) oder 800 µM CADO in Tris/DMSO* (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in Tris/DMSO*
50 µl	10 mM MgCl ₂ in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	Radioligand [³ H]CGS21680 (Endkonzentration: 10 nM, K _D -Wert: 15,5 nM ¹⁷³) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	Proteinsuspension: Rattenstriatum-Membranpräparation (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, vorinkubiert mit 1,5 U/ml ADA**

200 µl Endvolumen

Inkubationszeit: 60 min bei RT

* Das Verhältnis von 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und DMSO beträgt 90 zu 10.

** 3 µl einer 2 mg/ml Stammlösung ADA (500 U/ml) pro ml Proteinsuspension.

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 an Rattenstriatum- und CHO-hA_{2A}-Membranpräparationen

Pipettierschema:

50 µl	Tris/DMSO* (Gesamtbindung) oder 50 µM NECA in Tris/DMSO* (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in Tris/DMSO*
50 µl	50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	Radioligand [³ H]MSX-2 (Endkonzentration: 1 nM, K _D -Wert: 8 nM ¹⁶⁹ (Ratte) bzw. 7,3 nM ²⁷⁵ (human)) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	Proteinsuspension: Rattenstriatum-Membranpräparation (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, vorinkubiert mit 1,5 U/ml ADA**

200 µl Endvolumen

Inkubationszeit: 30 min bei RT

* Das Verhältnis von 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und DMSO beträgt 90 zu 10.

** 3 µl einer 2 mg/ml Stammlösung ADA (500 U/ml) pro ml Proteinsuspension.

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]MSX-2 an Rattenstriatum-Membranpräparationen unter Zusatz von NaCl (Natrium-Shift-Experiment)

Pipettierschema*:

25 µl	DMSO (Gesamtbindung) oder 50 µM NECA in DMSO (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in DMSO
725 µl	50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	100 mM NaCl in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	Radioligand [³ H]MSX-2 (Endkonzentration: 1 nM, K _D -Wert: 8 nM ¹⁶⁹) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
50 µl	Proteinsuspension: Rattenstriatum-Membranpräparation (70 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, vorinkubiert mit 1,5 U/ml ADA**
1000 µl	Endvolumen

Inkubationszeit: 30 min bei RT

* Alternativ kann das obige Pipettierschema unter abgeänderten Bedingungen verwendet werden

** 3 µl einer 2 mg/ml Stammlösung ADA (500 U/ml) pro ml Proteinsuspension.

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Adenosin-A_{2B}-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]PSB-603 an CHO-hA_{2B}-Membranpräparationen

Pipettierschema:

50 µl	Tris/DMSO* (Gesamtbindung) oder 10 µM DPCPX in Tris/DMSO* (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in Tris/DMSO*
50 µl	Radioligand [³ H]PSB-603 (Endkonzentration: 0,3 nM, K _D -Wert: 0,4 nM ³¹⁹) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
100 µl	Proteinsuspension: CHO-hA _{2B} -Membranpräparation (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, vorinkubiert mit 2 U/ml ADA**
200 µl	Endvolumen

Inkubationszeit: 60 min bei RT

* Das Verhältnis von 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und DMSO beträgt 90 zu 10.

** 0,8 µl einer 10 mg/ml Stammlösung ADA (2520 U/ml) pro ml Proteinsuspension.

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen Adenosin-A₃-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]PSB-11 an CHO-hA₃-Membranpräparationen

Pipettierschema:

50 µl	Tris/DMSO* (Gesamtbindung) oder 100 µM R-PIA in Tris/DMSO* (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in Tris/DMSO*
50 µl	Radioligand [³ H]PSB-11 (Endkonzentration: 1 nM, K _D -Wert: 4,9 nM ³⁰⁹) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
100 µl	Proteinsuspension: CHO-hA ₃ -Membranpräparation (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, vorinkubiert mit 1,5 U/ml ADA**
200 µl	Endvolumen

Inkubationszeit: 60 min bei RT

* Das Verhältnis von 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und DMSO beträgt 90 zu 10.

** 3 µl einer 2 mg/ml Stammlösung ADA (500 U/ml) pro ml Proteinsuspension.

9.7.3. SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE

Die Sättigungsexperimente mit den Radioliganden [³H]CCPA, [³H]DPCPX und [³H]CGS21680 werden analog dem Pipettierschema für Kompetitionsexperimente durchgeführt. Für den Radioliganden [³H]ZM241385, einem Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Antagonisten, gilt folgendes Pipettierschema:

50 µl	Tris/DMSO* (Gesamtbindung) oder 800 µM NECA in Tris/DMSO* (unspezifische Bindung),
50 µl	Radioligand [³ H]ZM241385 (Endkonzentration: verschiedene Konzentrationen, K _D -Wert: 0,84 nM ¹⁷¹) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
100 µl	Proteinsuspension: Rattenstriatum-Membranpräparation (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, vorinkubiert mit mit 1,5 U/ml ADA**
200 µl	Endvolumen

Inkubationszeit: 30 min bei RT

* Das Verhältnis von 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und DMSO beträgt 90 zu 10.

** 3 µl einer 2 mg/ml Stammlösung ADA (500 U/ml) pro ml Proteinsuspension.

Die Radioliganden werden mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 verdünnt, so dass sich 12

verschiedene Konzentrationen im Intervall von 0,05 bis 10 nM für [³H]CCPA, 0,125 bis 50 nM für [³H]DPCPX, 0,5 bis 150 nM für [³H]CGS21680 und 0,25 bis 30 nM für [³H]ZM241385 ergeben. Jedes Sättigungsexperiment wird mindestens dreimal in voneinander unabhängigen Experimenten, jeweils in Dupletts, durchgeführt.

„Verschneiden“ von Radioliganden

Aufgrund eines hohen Verbrauchs an Radioligand kann bei Sättigungsexperimenten der Radioligand mit dem unmarkierten Liganden verschnitten werden. Im Folgenden ist das Verschneiden von Radioliganden am Beispiel von [³H]MSX-2 dargestellt. Theoretisch sollen 3 ml einer 750 nM Stammlösung an [³H]MSX-2 (Spezifische Aktivität: 84 Ci/mmol) hergestellt werden. Verschnitten wird mit „kaltem“ MSX-2.

Die theoretische Menge des Radioliganden berechnet sich auf folgende Weise, sofern dieser in einer Konzentration von 1 mCi/ml vorliegt:

$$\frac{\text{Spez. Aktivität (Ci/mmol)} \times \text{Konzentration des RL [nM]} \times \text{Volumen [ml]}}{\text{Konzentration (mCi/ml)}}$$

Beispiel:

$$\frac{84 \text{ Ci/mmol} \times 750 \text{ nM} \times 3 \text{ ml}}{1 \text{ mCi/ml}} = \frac{84 \text{ Ci} \times 750 \text{ nmol} \times 3 \text{ ml} \times \mu\text{l}}{\text{mmol} \times 1000 \text{ ml} \times 1 \mu\text{Ci}}$$

$$= 189 \mu\text{l } [^3\text{H}]\text{MSX-2}$$

Statt 189 μCi sollen allerdings nur 20 μCi (0,02 mCi) eingesetzt werden (ca. 10 %).

Mit Hilfe der folgenden Gleichung kann berechnet werden, mit wieviel an „kaltem“ Liganden der „heiße“ Ligand verschnitten werden muss.

$$W = M \cdot a \cdot (1/A' - 1/A) \quad W = \text{Kaltligand [mg]}$$

$$M = \text{Molekulargewicht des Kaltliganden [g/mol]}$$

$$a = \text{eingesetzte Aktivität [mCi]}$$

$$A' = \text{spez. Aktivität des Radioliganden (Soll) [mCi/mmol]}$$

$$A = \text{spez. Aktivität des Radioliganden (Ist) [mCi/mmol]}$$

Beispiel:

$$W_{[\text{MSX-2}]} = 394,4 \text{ g/mol} \cdot 0,02 \text{ mCi} \cdot (1/(8400 \text{ mCi/mmol}) - 1/(84000 \text{ mCi/mmol}))$$

$$W_{[\text{MSX-2}]} = 0,000845 \text{ g} \cdot \text{mCi} \cdot \text{mmol}/1000 \text{ mmol} \cdot \text{mCi}$$

$$W_{[\text{MSX-2}]} = 0,845 \mu\text{g}$$

Es wird eine Stammlösung (1 mg MSX-2/10 ml Tris-Puffer) hergestellt.

$$10000 \mu\text{l}/1000 \mu\text{g} = 8,45 \mu\text{l} (= 0,845 \mu\text{g})$$

(8,45 μl der Stammlösung müssen eingesetzt werden, um 0,845 μg Kaltligand zu erhalten.)

Daraus ergibt sich folgendes Gesamtvolumen

$$18,9 \mu\text{l } [^3\text{H}]\text{MSX-2} + 8,45 \mu\text{l MSX-2} = 27,35 \mu\text{l}$$

$$18,9 \mu\text{l Radioligand} = 18,9 \mu\text{Ci}/\mu\text{l (Konzentration 1 mCi/ml)}$$

$$27,35 \mu\text{l} = 18,9 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$$

→ das ergibt eine Konzentration von ca. 0,69 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

Um das Ergebnis dieser Rechnung zu überprüfen, muss nun diese Verdünnung in die obige Gleichung eingesetzt werden. Da nur 10% der Aktivität eingesetzt wurden, ergibt sich eine neue spezifische Aktivität von 8,4 Ci/mmol.

$$= \frac{8,4 \text{ Ci} \times 750 \text{ nmol} \times 3 \text{ ml} \times \mu\text{l}}{\text{mmol} \times 1 \times 0,69 \mu\text{Ci}}$$

$$= 27350 \frac{\text{Ci} \times \text{nmol} \times \text{ml} \times \mu\text{l}}{\text{mmol} \times 1000 \text{ ml} \times \mu\text{Ci}} = 27350 \frac{10^6 \mu\text{Ci} \times \text{nmol} \times \text{ml} \times \mu\text{l}}{10^6 \text{ nmol} \times 1000 \text{ ml} \times \mu\text{Ci}} \text{ (Kürzen)}$$

$$= 27350 \frac{10^6 \mu\text{Ci} \times \text{nmol} \times \text{ml} \times \mu\text{l}}{10^6 \text{ nmol} \times 1000 \text{ ml} \times \mu\text{Ci}}$$

→ 27,35 μl des Gesamtvolumens werden mit 2972,65 μl Tris-Puffer verdünnt, um 3 ml Stammlösung für das Sättigungsexperiment zu erhalten.

9.7.4. KINETIKEXPERIMENTE

Die Kinetikexperimente mit den Radioliganden [^3H]CCPA, [^3H]DPCPX, [^3H]CGS21680 und [^3H]ZM241385 werden analog dem Pipettierschema für Konkurrenzexperimente bzw. Sättigungsexperimente durchgeführt. Jedes Kinetikexperiment wird mindestens dreimal in voneinander unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplets, durchgeführt.

Assoziationsexperiment

In den *wells* werden die Proteinsuspension und das Tris/DMSO zur Bestimmung der Gesamtbindung sowie die Substanzen zur Bestimmung der unspezifischen Bindung vorgelegt. Das Assoziationsexperiment wird durch die Zugabe der Radioligand-Lösung gestartet (1. Messzeitpunkt). Die Radioligandlösung wird anschließend zeitversetzt im inversen Zeitgang in die *wells* pipettiert, in die Tris/DMSO und die Proteinsuspension vorgelegt wurde. [^3H]CCPA

und [^3H]DPCPX werden nach exakt 0,5/1/2,5/5/7,5/10/20/30/40/50/60/75/90/105 und 120 min im inversen Zeitgang (120 zuerst) einpipettiert, [^3H]CGS21680 hingegen nach 0,5/1/2,5/5/10/20/30/40/50/60/70 bzw. 75/80 und 90 min und [^3H]ZM241385 nach 0,5/1/2/4/6/8/10/15/20/25/30/35/40/45 und 60 min. Die *wells* mit der Substanz zur unspezifischen Bindung werden zu Beginn des Experiments mit Radioligandlösung versetzt. Beim Zeitpunkt ($t=0$) wird über einen GF/B-Glasfaserfilter filtriert.

Dissoziationsexperiment

In den *wells* werden die Proteinsuspension und die Radioligandlösung sowie Tris/DMSO (90:10) zur Bestimmung der Gesamtbindung vorgelegt. Das Dissoziationsexperiment wird durch die Zugabe des Kaltliganden bzw. des Liganden zur Bestimmung der unspezifischen Bindung gestartet (1. Messzeitpunkt). Dieser wird anschließend zeitversetzt im inversen Zeitgang in die *wells* pipettiert, in die die Proteinlösung und die Radioligand-Lösung vorgelegt wurden. 10 μM CADO werden bei dem Kinetikexperiment mit [^3H]CCPA nach exakt 0,5/1/2,5/5/10/20/30/45/60/75/90/105/120/150 und 180 min zugegeben, während 10 μM DPCPX bei dem Kinetikexperiment mit [^3H]DPCPX nach 0,5/1/2,5/5/7,5/10/20/30/40 bzw. 45/50/60/75/90/105 und 120 min, 800 μM CADO nach 0,5 bzw. 1/2,5/5/10/20/30/40 bzw. 45/50/60/70/80/90/120/150 und 180 min (Kinetikexperiment mit [^3H]CGS21680) und 800 μM NECA nach 0,5/1/2/4/6/8/10/15/20/25/30/35/40/45 und 60 min (Kinetikexperiment mit [^3H]ZM241385) zugegeben wurde. Die Bestimmung der Gesamtbindung mit Tris/DMSO und der unspezifischen Bindung erfolgen zu Beginn des Experiments. Beim Zeitpunkt ($t=0$) wird über einen GF/B-Glasfaserfilter filtriert.

Die Konstanten berechnen sich wie folgt:

k_{off} : siehe Prism-Datei [min^{-1}]

k_{on} : $(k_{\text{obs}} - k_{\text{off}})/[\text{Radioligand}]$ [$\text{min}^{-1} \cdot \text{nM}^{-1}$]

kinetischer k_{D} : $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ [nM].

9.7.5. [³⁵S]GTP γ S-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN- BZW. ADENIN REZEPTOREN

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³⁵S]GTP γ S an Adenosin-A₁-Rezeptoren in Rattencortex-, Rattensstriatum- und CHO-hA₁-Membranpräparationen

Pipettierschema:

10 μ l	Tris/DMSO* (Gesamtbindung) oder 10 μ M GTP γ S in Tris/DMSO* (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in Tris/DMSO*
150 μ l	Inkubationspuffer für [³⁵ S]GTP γ S-Bindungsstudien an Adenosin-A ₁ -Rezeptoren (mit 10 μ M GDP)
20 μ l	Radioligand [³⁵ S]GTP γ S (Endkonzentration: 0,2 nM) in Inkubationspuffer
20 μ l	Proteinsuspension: Rattencortex- oder CHO-hA ₁ -Membranpräparation (5 μ g/vial) in Inkubationspuffer, vorinkubiert mit 2,6 U/ml ADA**
200 μ l	Endvolumen

Inkubationszeit: 60 min bei RT

* Das Verhältnis von 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und DMSO beträgt 80 zu 20.

** 5,2 μ l einer 2 mg/ml Stammlösung ADA (500 U/ml) pro ml Proteinsuspension.

Zunächst wird eine 1:1000-Verdünnung des Radioliganden [³⁵S]GTP γ S in 10 mM Tricin/5 mM DTT-Puffer, pH 7,0 hergestellt (analog zum Lösungsmittel des unverdünnten Radioliganden), in Mengen zu 1,0 ml aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

DMSO, GTP γ S und die Testsubstanzen werden entsprechend des Pipettierschematas in Triplets in PE-Vials pipettiert. DMSO dient als Kontrolle zur Bestimmung der Gesamtbindung des Radioliganden. Mit dem nicht radioaktiv markierten GTP γ S wird die unspezifische Bindung ermittelt. Der Inkubationspuffer sowie der im Inkubationspuffer gelöste Radioligand werden hinzugegeben. Da das Radionuklid ³⁵S nur eine relativ kurze Halbwertszeit von 87,4 Tagen besitzt, muss vor jedem Versuch eine Halbwertszeitkorrektur durchgeführt und die aktuelle spezifische Aktivität des Radioliganden bestimmt werden (siehe unten).

Zuletzt wird die Membranpräparation, die zuvor für 15 min mit ADA (nur bei [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudien an Adenosin-Rezeptoren) vorinkubiert worden ist, zupipettiert und die Reaktion somit gestartet. Der Reaktionsansatz wird gut durchmischt (Vortexer) und 60 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wird durch Filtration über einen GF/B-Glasfaserfilter, der zuvor für einige Minuten in kaltem Waschpuffer eingelegt worden ist, mittels eines 24er oder 48er Zellharvesters terminiert. Es wird zweimal mit ca. 2 ml eiskaltem Waschpuffer nachgespült.

Anschließend werden die Filter analog den Konkurrenzexperimenten behandelt.

Die für die Testsubstanzen ermittelte intrinsische Aktivität wird in Bezug auf den Effekt eines Voll-Agonisten normalisiert, dessen maximaler Anstieg gleich 100 % gesetzt wird. Analog kann für Substanzen mit einer negativen intrinsischen Aktivität die Normalisierung auf einen vollen inversen Agonisten, der gleich -100 % gesetzt wird, erfolgen.

Berechnung der Aktivität des Radioliganden [³⁵S]GTP γ S

Zur Berechnung der aktuellen Aktivität des Radioliganden [³⁵S]GTP γ S ist das Kalibrierdatum sehr wichtig. Es handelt sich dabei um das Datum, an dem der Radioligand genau eine spez. Aktivität von 1250 Ci/mmol und eine Konzentration von 12,5 mCi/ml aufwies.

Der Zerfalls-Faktor (decay factor) berechnet sich auf folgende Weise: $D_F = 0,9924^d$, wobei es sich bei d um die Anzahl der Tage vor (negativer Wert) bzw. nach (positiver Wert) dem Kalibrierdatum handelt. Die Menge an Radioaktivität zum Zeitpunkt t (A_t) wird anhand der Menge an Radioaktivität zum Zeitpunkt der Kalibrierung (A_r) mit der folgenden Formel bestimmt: $A_t = A_r \times D_F$.

Die spezifische Aktivität zum Zeitpunkt t (SA_t) errechnet sich aus der spezifischen Aktivität zum Zeitpunkt der Kalibrierung (SA_r) und dem Zerfalls-Faktor:

$$SA_t = D_F / (1/SA_r - (1 - D_F)/1498).$$

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³⁵S]GTP γ S an Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren in Rattensstriatum- und an Adenin-Rezeptoren in Rattencortex-Membranpräparationen

Pipettierschema:

10 μ l	Tris/DMSO* (Gesamtbindung) oder 10 μ M GTP γ S in Tris/DMSO* (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in Tris/DMSO*
150 μ l	Inkubationspuffer für [³⁵ S]GTP γ S-Bindungsstudien an Adenosin-A _{2A} - und Adenin-Rezeptoren (mit 100 μ M GDP)
20 μ l	Radioligand [³⁵ S]GTP γ S (Endkonzentration: 0,5 nM) in Inkubationspuffer
50 μ l	Proteinsuspension: Rattencortex- oder Rattensstriatum-Membranpräparation (5 μ g/vial) in Inkubationspuffer, ggf. vorinkubiert mit 2,6 U/ml ADA**
200 μ l	Endvolumen

Inkubationszeit: 60 min bei RT

* Das Verhältnis von 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und DMSO beträgt 80 zu 20.

** 5,2 μ l einer 2 mg/ml Stammlösung ADA (500 U/ml) pro ml Proteinsuspension (A_{2A}-Rezeptor)

9.8. RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN CANNABINOID-REZEPTOREN

9.8.1. VERDÜNNUNGSSCHEMATA

Die Testsubstanzen, die in Radioligand-Bindungsstudien an Cannabinoid-Rezeptoren eingesetzt werden, sind wie bei den Bindungsstudien an Adenosin-Rezeptoren in DMSO gelöst und die Stammlösungen haben ebenfalls standardmäßig eine Konzentration von 10 mM. Die Konkurrenzexperimente werden analog durchgeführt. Allerdings werden die untenstehenden Verdünnungsreihen für Konkurrenzexperimente in reinem DMSO hergestellt, die für GTP γ S-Bindungsstudien mit einem Gemisch aus Tris-Puffer und DMSO in einem Verhältnis von 80 zu 20.

Verdünnungsreihen für Konkurrenzexperimente an Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptoren (1:40-Verdünnung)

10 mM Stammlösung in DMSO

	Verdünnungsreihe ab 250 μ M	Verdünnungsreihe ab 100 μ M	Verdünnungsreihe ab 30 μ M			
	Konz. im Assay	Konz. im Assay	Konz. im Assay			
1	direkt	250 μ M	80 μ l + 120 μ l D	100 μ M	24 μ l + 176 μ l D	30 μ M
2	80 μ l + 120 μ l D	100 μ M	60 μ l + 140 μ l D	30 μ M	60 μ l + 120 μ l D	10 μ M
3	60 μ l + 140 μ l D	30 μ M	60 μ l + 120 μ l D	10 μ M	60 μ l + 140 μ l D	3 μ M
4	60 μ l + 120 μ l D	10 μ M	60 μ l + 140 μ l D	3 μ M	60 μ l + 120 μ l D	1 μ M
5	60 μ l + 140 μ l D	3 μ M	60 μ l + 120 μ l D	1 μ M	60 μ l + 140 μ l D	0,3 μ M
6	60 μ l + 120 μ l D	1 μ M	60 μ l + 140 μ l D	0,3 μ M	60 μ l + 120 μ l D	0,1 μ M
7	60 μ l + 140 μ l D	0,3 μ M	60 μ l + 120 μ l D	0,1 μ M	60 μ l + 140 μ l D	0,03 μ M

Die Testsubstanzen werden zunächst bei einer Konzentration von 10 μ M getestet. Bei einer Inhibition des Radioliganden von ≥ 50 % werden Inhibitionskurven erstellt, um den K_i-Wert als Maß für die Affinität der getesteten Substanz zu ermitteln.

Screening bei 10 μ M

	Konz. im Assay
1	4 μ l + 96 μ l D

Verdünnungsreihen für GTP γ S-Bindungsstudien an Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptoren (1:20-Verdünnung)

10 mM Stammlösung in DMSO

	Verdünnungsreihe ab 100 μ M	Konz. im Assay	Screening bei 30 μ M	Konz. im Assay
1	24 μ l + 96 μ l Tris	100 μ M	3 μ l + 12 μ l Tris + 35 μ l T/D	30 μ M
2	50 μ l + 50 μ l T/D	50 μ M		
3	24 μ l + 96 μ l T/D	10 μ M		
4	50 μ l + 50 μ l T/D	5 μ M		
5	24 μ l + 96 μ l T/D	1 μ M		
6	50 μ l + 50 μ l T/D	0,5 μ M		

Testsubstanzen, die auf ihre intrinsische Aktivität hin untersucht werden sollen, werden in GTP γ S-Bindungsstudien an Cannabinoid-Rezeptoren bei einer Konzentration von 30 μ M gescreent.

9.8.2. KOMPETITIONSEXPERIMENTE

Die Konkurrenzexperimente an Cannabinoid-CB₁- und CB₂- Rezeptoren werden analog zu den Konkurrenzexperimenten an Adenosin-A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren durchgeführt. Allerdings wird die Proteinsuspension nicht mit dem Enzym Adenosindeaminase vorinkubiert. Die Terminierung der Reaktion erfolgt durch die Zugabe von ca. 2 ml eiskalten Waschpuffers, dem zuvor BSA frisch zugesetzt worden ist. Die gebundene Radioaktivität wird von der freien durch Filtration über GF/C-Glasfaserfilter mit Hilfe eines Zellharvesters getrennt. Diese werden anschließend für 90 min bei 50°C im Trockenschrank getrocknet.

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptoren

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]CP55,940 an Rattencortex- und humanen CB₁ und CB₂-Membranpräparationen

Pipettierschema (24er und 48er Harvester):

25 µl	DMSO (Gesamtbindung) oder 10 µM CP55,940 in DMSO (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in DMSO
775 µl	50 mM Tris-Puffer, 3 mM MgCl ₂ , 0,1 % BSA, pH 7,4
100 µl	Radioligand [³ H]CP55,940 (Endkonzentration: 0,1 nM, K _D -Wert: 0,58 nM ³⁸⁴) in 50 mM Tris-Puffer, 0,1 % BSA, pH 7,4
100 µl	Proteinsuspension: Rattencortex- bzw. humane rekombinate CB ₁ - oder CB ₂ - Membranpräparation* (50 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
1000 µl	Endvolumen

Inkubationszeit: 120 min bei RT

Pipettierschema (96er Harvester):

15 µl	DMSO (Gesamtbindung) oder 10 µM CP55,940 in DMSO (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in DMSO
465 µl	50 mM Tris-Puffer, 3 mM MgCl ₂ , 0,1 % BSA, pH 7,4
60 µl	Radioligand [³ H]CP55,940 (Endkonzentration: 0,5 nM, K _D -Wert: 0,58 nM ³⁸⁴) in 50 mM Tris-Puffer, 0,1 % BSA, pH 7,4
60 µl	Proteinsuspension: Rattencortex- bzw. rekombinate humane CB ₁ oder CB ₂ - Membranpräparation* (50 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4
600 µl	Endvolumen

Inkubationszeit: 120 min bei RT

* Die CB₁- und CB₂-Membranpräparationen mit rekombinant exprimierten humanem Rezeptor wurden käuflich bei Perkin Elmer erworben.

9.8.3. [³⁵S]GTPγS-BINDUNGSSTUDIEN AN CANNABINOID-REZEPTOREN

Die [³⁵S]GTPγS-Bindungsstudien an Cannabinoid-CB₁- und CB₂- Rezeptoren werden analog zu den Bindungsstudien an Adenosin- und Adenin-Rezeptoren durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die Proteinsuspension nicht mit ADA, wie bei den Adenosin-Rezeptoren, vorinkubiert werden muss.

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³⁵S]GTPγS an Cannabinoid-CB₁- und CB₂-Rezeptoren in Rattencortex- und humanen CB₁- und CB₂-Membranpräparationen

Pipettierschema:

10 µl	Tris/DMSO* (Gesamtbindung) oder 30 µM GTPγS in Tris/DMSO* (unspezifische Bindung) oder Testsubstanz in Tris/DMSO*
150 µl	Inkubationspuffer (mit 30 µM GDP)
20 µl	Radioligand [³⁵ S]GTPγS (Endkonzentration: 0,1 nM) in Inkubationspuffer
50 µl	Proteinsuspension: Rattencortex- bzw. humane CB ₁ oder CB ₂ - Membranpräparation** (5 µg/vial) in Inkubationspuffer
200 µl	Endvolumen

Inkubationszeit: 60 min bei RT

* Das Verhältnis von 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 und DMSO beträgt 80 zu 20.

** Die CB₁- und CB₂-Membranpräparationen mit rekombinant exprimierten humanem Rezeptor wurden käuflich bei Perkin Elmer erworben.

9.9. VERRINGERUNG DES CHOLESTEROL-GEHALTES VON MEMBRANPRÄPARATIONEN DURCH BEHANDLUNG MIT METHYL-β-CYCLODEXTRIN (MβCD)

Cholesterol wird aus Membranpräparationen (Rattenstriatum, humanes Striatum und CHO-hA₁-Zellen) entfernt, indem diese mit verschiedenen Konzentrationen an MβCD* versetzt werden (10, 20 und 40 mM in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4). Die Membranpräparationen werden 1 h bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert. Die Inkubation wird durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min, 20.000 g) beendet, der Überstand wird verworfen und die behandelte Membranpräparation wird 3 x mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 gewaschen (10 min, 20.000 g), um evtl. verbleibendes MβCD zu entfernen. Die Membranpräparation wird aliquotiert (Lagerung bei -80°C) und der Protein- und Cholesterol-Gehalt bestimmt.

* MβCD hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 1320 g/mol.

9.10. CHOLESTEROL-BESTIMMUNG

Die Cholesterol-Bestimmung erfolgt mit dem Kit Cholesterol FS von Rolf Greiner Biochemica, einem Reagenz für die quantitative *In-vitro*-Bestimmung von Cholesterol in Serum oder Plasma durch eine photometrische Methode. Die Bestimmung von Cholesterol erfolgt nach enzymatischer Hydrolyse und Oxidation. Der kolorimetrische Indikator ist das Chinonimin, welches durch die katalytische Wirkung von Peroxidase aus 4-Aminoantipyrin, Phenol und Wasserstoffperoxid entsteht (Trinder-Reaktion).⁴⁰²

6 µl Probe bzw. Standard (200 mg/dl bzw. 5,2 mM) werden mit 600 µl Reagenz versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die Extinktion sollte innerhalb von 60 min gegen den Reagenzienleerwert (6 µl dem. Wasser + 600 µl Reagenz) bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen werden.

Berechnung:
$$\text{Cholesterin [mg / dl]} = \frac{\Delta E \text{ Probe}}{\Delta E \text{ Std.}} \times \text{Konz. Std. [mg / dl]}$$

Umrechnungsfaktor:
$$\text{Cholesterol [mg/dl]} \times 0,02586 = \text{Cholesterol [mmol/l]}$$

9.11. RÜCKFÜHRUNG VON CHOLESTEROL IN EINE RATTENSTRIATUM-MEMBRAN-PRÄPARATION MIT EINEM VERMINDERTEN CHOLESTEROL-GEHALT

9.11.1. HERSTELLUNG EINES MβCD-CHOLESTEROL-KOMPLEXES

Methode A

Der Cholesterol-MβCD-Komplex wird vor jedem Versuch frisch hergestellt. Er wird gebildet, indem man die gewünschte Menge an Cholesterol und MβCD in einem Verhältnis von 1:10 in Tris-Puffer, 50 mM, pH 7,4 löst. Zunächst werden MβCD bzw. Cholesterol eingewogen, um 75 µl einer 400 mM (MβCD) bzw. einer 40 mM (Cholesterol) Stammlösung zu erhalten. Durch die Zusammenführung dieser beiden Substanzen und die Zugabe von 150 µl 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 erhält man eine Cholesterol-MβCD-Komplex-Stammlösung (20 mM/200 mM). Die Substanzen werden unter Verwendung eines Thermomixers (bei ca. 50°C, ca. 1000 rpm, ca. 0,5 h) gelöst. Anhand dieser Stammlösung werden folgende Konzentrationen durch Verdünnungsschritte erhalten:

- 1) 100 mM MβCD/10 mM Cholesterol → 50 µl Rattenstriatum + 50 µl Stammlösung
- 2) 50 mM MβCD /50 mM Cholesterol → 75 µl Rattenstriatum + 25 µl Stammlösung
- 3) 25 mM MβCD /2,5 mM Cholesterol → 49 µl Rattenstriatum + 7 µl Stammlösung
- 4) 15 mM MβCD /1,5 mM Cholesterol → 7 µl Rattenstriatum + 3 µl Stammlösung
- 5) 10 mM MβCD /1 mM Cholesterol → 7 µl Rattenstriatum + 3 µl Stammlösung

Methode B

Um diesen Cholesterol-M β CD-Komplex herzustellen wird zunächst 1 g M β CD in 2-Propanol gelöst, so dass eine 5 %ige Lösung entsteht. Diese Lösung wird in einem Becherglas im Wasserbad auf 80°C erhitzt. Währenddessen werden 30 bzw. 60 mg Cholesterol eingewogen, ebenfalls in 2-Propanol gelöst und langsam hinzu gegeben, so dass eine klare Lösung entsteht. Das 2-Propanol wird in einem 80°C heißen Wasserbad verdampft, bis sich der Komplex absetzt. Dieser wird in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 aufgenommen, so dass eine 100 mM Stammlösung entsteht.

Nebenrechnungen

1) Verhältnis M β CD/Cholesterol \rightarrow 30:1000

M (M β CD) \approx 1320 g/mol

M (Cholesterol) = 386,7 g/mol

\rightarrow 1320 g/mol (1000) + 11,601 g/mol (30) = 1331,60 g/mol

Für 1 ml einer 0,1 mM Stammlösung werden 0,133 mg eingesetzt.

2) Verhältnis M β CD/Cholesterol \rightarrow 60:1000

\rightarrow 1320 g/mol (1000) + 23,202 g/mol (60) = 1343,20 g/mol

Für 1 ml einer 0,1 mM Stammlösung werden 0,134 mg eingesetzt.

9.11.2. RÜCKFÜHRUNG VON CHOLESTEROL DURCH EINEN M β CD-CHOLESTEROL-KOMPLEX**Methode A**

Das mit 10 mM M β CD behandelte Rattenstriatum wird mit verschiedenen Konzentrationen des Cholesterol-M β CD-Komplexes, der nach Methode A hergestellt wurde, für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert. Die Inkubation wird durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min, 20.000 g) gestoppt, der Überstand wird verworfen und die behandelte Membranpräparation wird 3 x mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 gewaschen (10 min, 20.000 g).

Methode B

Rattenstriatum, dessen Cholesterol-Gehalt durch den Einsatz von 40 mM M β CD vermindert wurde, wird mit steigenden Konzentrationen (5, 10, 20, 30, 40 und 50 mM) des Cholesterol-M β CD-Komplexes (Verhältnis M β CD/Cholesterol 1000:30 und 1000:60), hergestellt nach Methode B, versetzt und 30 min bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert. Die Inkubation wird durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min, 20.000 g) gestoppt,

der Überstand wird verworfen und die behandelte Membranpräparation wird 3 x mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 gewaschen (10 min, 20.000 g). Anschließend erfolgt eine Cholesterol- und ggf. eine Protein-Bestimmung.

9.11.3. RÜCKFÜHRUNG VON CHOLESTEROL DURCH DEN EINSATZ VON CHOLESTEROL-REICHEN LIPOSOMEN

Die Liposomen wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Rolf Schubert, Universität Freiburg, durch Martin Holzer hergestellt. Sie setzen sich aus 55 % EPC und 45 % Cholesterol zusammen, was ungefähr einem Cholesterol-Gehalt von 22,5 mM entspricht.

Eingesetzt wird eine Rattenstriatum-Membranpräparation, welche zuvor mit 40 mM M β CD behandelt wurde. Bezogen auf den ermittelten Cholesterol-Gehalt dieser behandelten Membranpräparation werden Liposomen im 10fachen Überschuss zugesetzt. Um den Zeitpunkt zu ermitteln, wann die max. Menge an Cholesterol in das Striatum zurückgeführt worden ist, wird dieses zunächst zu verschiedenen Zeitpunkten mit den cholesterolreichen Liposomen inkubiert (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h und 48 h). Die Inkubation wird durch einen Zentrifugationsschritt (Biofuge, 13.000 rpm, 10 min) beendet. Der Überstand wird abgenommen und zur anschließenden Cholesterol-Bestimmung aufbewahrt. Um sicherzustellen, dass ein Rest an Liposomen das Messergebnis der Cholesterol-Bestimmung nicht verfälscht, wird das Rattenstriatum 3x mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 gewaschen und resuspendiert. Eine unbehandelte und mit 40 mM M β CD behandelte Rattenstriatum-Membranpräparation wird auf die gleiche Weise diesen Zentrifugationsschritten unterzogen (Kontrolle). Anschließend erfolgt eine Cholesterol- und ggf. eine Protein-Bestimmung.

9.12. FRAKTIONIERUNG DER ZELLMEMBRAN (RATTENSTRIATUM) DURCH DEN EINSATZ EINES SUCROSE-DICHTE-GRADIENTEN

Eine Rattenstriatum-Membranpräparation (980 μ l) wird mit 0,4 % Triton X-100 (10 μ l einer 40%-igen Stammlösung) und 0,2 mM CaCl₂ (10 μ l einer 20 mM Stammlösung) für 30 min in 5 ml PE-Röhrchen auf Eis inkubiert. Zu dem Homogenat wird 1 ml einer 80%-igen Sucrose-Lösung gegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 40 % ergibt und in Ultra-Zentrifugenröhrchen (Beckman Ultra-ClearTM Centrifuge Tubes) überführt. Über diese Schicht werden unter Verwendung einer Glaspipette vorsichtig 2 ml einer 30%-igen und 0,5 ml einer 5%-igen Sucrose-Lösung gelegt, um einen diskontinuierlichen Sucrose-Gradient zu erhalten. Der Abschluss dieses Sucrose-Gradienten wird von einer zusätzlichen Schicht aus Wasser

gebildet. Es ist wichtig, dass alle Schritte auf Eis durchgeführt werden. Der Gradient wird 16-18 h bei 33.000 rpm und 4°C zentrifugiert (SW 55 Ti Rotor, Beckman Coulter). Anschließend wird der Gradient fraktioniert und die einzelnen Fraktionen, falls ein Detergenz zur Isolierung eingesetzt worden ist, 3 x mit 5-10 ml 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 gewaschen. Abschließend wird der Protein- und Cholesterol-Gehalt der einzelnen Fraktionen bestimmt.

Für eine Sucrose-Dichte-Zentrifugation mit CHAPS wird anstelle des Triton X-100 und des CaCl₂ 4 % CHAPS (200 µl einer 20%-igen Stammlösung) verwendet und die Rattenstriatum-Membranpräparation wird ebenfalls für 30 min in 5 ml PE-Röhrchen auf Eis inkubiert.

Ein Sucrose-Gradient ohne Detergenz wird direkt aus 1000 µl einer Rattenstriatum-Membranpräparation hergestellt.

9.13. PHOTOMETRISCHER ASSAY ZUR BESTIMMUNG VON M β CD

Dieser Assay zur quantitativen Bestimmung von M β CD basiert auf der Spaltung der 1,4- α -glykosidischen Bindung von Glucose, aus der die Cyclodextrine aufgebaut sind. Durch die Zugabe heißer Säure, in diesem Falle konzentrierter Schwefelsäure, wird die Glucose in Furfural aufgespalten, das photometrisch detektiert werden kann.

Rattenstriatum wird mit einer Konzentration von 40 mM M β CD versetzt, was der höchsten eingesetzten Konzentration entspricht, um Cholesterol aus Membranpräparationen zu entfernen. Dies wird analog zur Versuchsvorschrift zur Verringerung des Cholesterol-Gehaltes in Membranpräparationen durchgeführt. Nach jedem Pelletier- bzw. Waschschrift des behandelten Rattenstriatums werden Proben (Pellet und Überstand) gezogen.

Aus einer 80 mM Methyl- β -Cyclodextrin-Stammlösung werden folgende Verdünnungen hergestellt, um eine Kalibriergerade zu ermitteln: 0,25 mM, 0,2 mM, 0,15 mM, 0,1 mM, 0,05 und 0,01 mM. In diesem Bereich liegt die Absorption zwischen 0 und 1. Die Proben (Pellet und Überstand) werden verdünnt, damit die Absorption innerhalb der Kalibriergerade liegt.

400 µl Probe werden mit 600 µl konz. Schwefelsäure in Glasröhrchen versetzt und für 1 h bei 100°C im Trockenschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Proben zunächst zur Abkühlung bei RT stehen gelassen und anschließend in Quarzküvetten überführt. Die Absorption wird bei 290 nm gemessen.

9.14. FLOURESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN (VORVERSUCHE)

CHO-Zellen, die mit dem A₁- und A_{2B}-Rezeptor stabil transfiziert worden sind, und untransfizierte CHO-Zellen (K1) werden am Vortag auf runden Deckgläschen (Durchmesser:

12 mm) in sterilen 12-*well*-Platten ausgesäht. Bei ca. 45-50 % Konfluenz werden die Deckgläschen entnommen, 1x mit PBS-Puffer gewaschen und in neue 12-*well*-Platten überführt. In diesen werden die CHO-hA_{2B}- und hA₁-Zellen mit dem BODIPY-markierten A_{2B}-Antagonisten FH109 (K_i-Wert \approx 5 nM) und dem BODIPY-markierten A₁-Agonisten FH234 (K_i-Wert \approx 15 nM) unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Die untransfizierten Zellen stellen die Kontrolle dar.

Vorläufige Inkubationszeit: 30 min (Antagonist) bzw. 90 min (Agonist)

Vorläufige Konzentration des Fluoreszenz-Liganden: \approx K_i-Wert

Vorläufige Anzahl der Waschschrte: 1 bzw. 3 Mal

Nach der Inkubationszeit werden die Deckgläschen mit PBS-Puffer gewaschen, wiederum in neue 12-*well*-Platten überführt und für ca. 30 min mit einer 1%igen Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Anschließend werden sie mit einer Immu-Mount-Lösung auf einem Objektträger (76 x 26 mm) aufgebracht, wobei 3 Deckgläschen auf einem Objektträger Platz finden können.

Die Objektträger werden mit den Deckgläschen nach unten in das Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss) eingespannt, dessen Objektiv zuvor mit Öl beträufelt worden ist.

Einstellungen Digitalkamera

(Power Shot A610):

- ISO-Empfindlichkeit 400
- Blende 2,8
- 0,25 s Belichtungszeit
- 4 fach Zoom
- Kunstlicht
- Auslöseverzögerung
- Fokussierung ∞
- kein Blitz

Einstellungen Mikroskop

(Axiovert 100, Zeiss):

- Exposure time: 20 s
- Objektiv: Fluar 100 x, Oil

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADA	Adenosindesaminase
A ₁	Adenosin-A ₁ -Rezeptor
A _{2A}	Adenosin-A _{2A} -Rezeptor
A _{2B}	Adenosin-A _{2B} -Rezeptor
A ₃	Adenosin-A ₃ -Rezeptor
AC	Adenylatcyclase
ACEA	Arachidonyl-2'-chloroethylamid
ACPA	Arachidonylcyclopropylamid
ADP	Adenosindiphosphat
ADS	Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom
A _F	Menge an Radioaktivität zum Zeitpunkt der Kalibrierung
AM1710	3-(1',1'-Dimethylheptyl)-1-hydroxy-9-methoxy-6 <i>H</i> -benzo[<i>c</i>]-chromen-6-on
AM1714	1,9-Dihydroxy-3-(1',1'-dimethylheptyl)-1-hydroxy-9-methoxy-6 <i>H</i> -benzo[<i>c</i>]-chromen-6-on
AM281	<i>N</i> -(Morpholin-4-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrazol-3-carboxamid
AM630	6-Iodopravadolin
Apo	Apolipoprotein
APP	Amyloid-Precursor-Protein (Amyloid-Vorläuferprotein)
AR	Adenosin-Rezeptor(en)
A _t	Menge an Radioaktivität zum Zeitpunkt t
ATP	Adenosintriphosphat
Aubl.	Jean Baptiste Christian Fusée Aublet
Aβ	β-Amyloid-Peptid
B.	Backer
BHS	Blut-Hirn-Schranke
B _{Max}	Maximale Anzahl an Bindungsstellen
BODIPY	Bordipyrrrol oder Borate-Dipyrrromethin
Bq	Becquerel (= Zerfälle pro Minute)
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CADO	2-Chloradenosin

cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CB ₁	Cannabinoid CB ₁ -Rezeptor
CB ₂	Cannabinoid CB ₂ -Rezeptor
CCKK	Cholecystokinin(-Rezeptor)
[³ H]CCPA	[³ H]2-Chlor- <i>N</i> ⁶ -cyclopentyladenosin
CGS21680	(2-(4-((2-Carboxymethyl)phenyl)ethylamino)5'- <i>N</i> -ethylcarboxamido)adenosin
CH	Cholesterol
CHA	<i>N</i> ⁶ -Cyclohexyladenosin
CHAPS	3-[3-(Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat
CHO	Chinesische Hamster Ovarien
Ci	Curie (1 Ci = 37 GBq)
CMC	critical micelle concentration (kritische Mizellbildungskonzentration)
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CP47497	5-(1,1-Dimethylheptyl)-2-(3-hydroxy-cyclohexyl)-phenol
CP55,940	(-)-cis-3-[2-Hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol
CPA	<i>N</i> ⁶ -Cyclopentyladenosin
CPFPX	8-Cyclopentyl-3-(3-fluoropropyl)-1-propylxanthin
cpm	counts per minute (Zahl der gezählten Zerfälle pro Minute)
[¹¹ C]CSC	(<i>E</i>)-8-(3-Chlorostyryl)-1,3-dimethyl-7-[¹¹ C]methylxanthin
D ₁	Dopamin-D ₁ -Rezeptor
D ₂	Dopamin-D ₂ -Rezeptor
DAG	Diacylglycerol
DEV	Drogen-Extrakt-Verhältnis
D _F	decay factor
DIG	detergent-insoluble glycosphingolipid membrane
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPCPX	1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthin
D-PDMP	D-threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol
dpm	decay per minute (Zahl der Zerfälle pro Minute)
DR	Droge

DRM	detergent resistant membrane
[³ H]DTG	[³ H]1,3-Di- <i>o</i> -tolylguanidin
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
ECACC	European Cell Culture Collection (UK)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	Ei-Phosphatidyl-Cholin
et al.	et alii
FP	Frischpflanze
g	guinea pig
G-418	Genticinsulfat
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
gew.	gewaschen
GF/B	Glasfaserfilter vom Typ C
GF/C	Glasfaserfilter vom Typ B
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanylnucleotid-bindendes Protein
GRAFS	Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, Frizzled/Taste2- und Secretin-Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
GTPγS	Guanosin-5'-(γ-thio)triphosphat
h	human bzw. Stunde
HDL	high-density lipoprotein
HEK	Human Embryonic Kidney (Humane Embryonische Nieren)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Humanes Immundefizienz-Virus)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HS	humanes Striatum
5-HT _{1A}	Serotonin _{1A} -Rezeptor
HTS	High-Throughput-Screening
HU-210	11-Hydroxy-dimethylheptyl-Δ ⁸ -THC
I.U.	International Units (Internationale Einheiten)
IC ₅₀	Halbmaximale Inhibitionskonzentration
IDL	intermediate-density lipoprotein
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat

ISP-1	Inhibitor der Sphingolipid-Synthese
KCl	Kaliumchlorid
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
keV	Kilo-Elektronen-Volt
1-[¹¹ C-ethyl]KF15372	8-Dicyclopropylmethyl-1-(1-[¹¹ C]-ethyl)-3-propylxanthin
1-[¹¹ C-methyl]KF15372	8-Dicyclopropylmethyl-1-(1-[¹¹ C]-methyl)-3-propylxanthin
[¹¹ C]KF15372	8-Dicyclopropylmethyl-1-(1-[¹¹ C]-propyl)-3-propylxanthin
[¹¹ C]KF17837	(<i>E</i>)-8-(3,4-Dimethoxystyryl)-1,3-dipropyl-7-[¹¹ C]methylxanthin
[¹¹ C]KF18446	(<i>E</i>)-8-(3,4,5-Trimethoxystyryl)-7-[¹¹ C]methylcoffein
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K _i	Gleichgewichtsinhibitionskonstante
k _{obs}	k _{observed}
K _{off}	Dissoziationskonstante
k _{on}	Assoziationskonstante
[¹¹ C]KW6002	(<i>E</i>)-1,3-diethyl-8-(3,4-dimethoxystyryl)-7-methylxanthin
L.	Linné (Linné'sches System)
LDL	low-density lipoprotein
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LLA	lipid lowering agents
LSC	Liquid Scintillation Counter
LY320135	6-Methoxy-2-(4-methoxyphenyl)benzo[<i>b</i>][thien-3-yl][4-cyanophenyl]methanon
m-/μ-/nM	milli-/mikro-/nanomolar
m-/μl	Milli-/Mikro-Liter
MAO	Monoaminoxidase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion
[³ H] <i>p</i> -MPPF	[³ H]4-(2'-Methoxy)-phenyl-1-[2'-(<i>N</i> -2''-pyridinyl)- <i>p</i> -fluorobenzamido]ethyl-piperazin
MPTP	Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MS	Multiple Sklerose
MSX-2	3-((3-Hydroxypropyl)-8- <i>m</i> -methoxystyryl)-7-methyl-1-propargylxanthin

MSX-3	3-(3-Hydroxypropyl)-8-(<i>m</i> -methoxystyryl)-7-methyl-1-propargylxanthin-phosphat-dinatrium-Salz
MWG	Massenwirkungsgesetz
M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
n	Zahl der durchgeführten Versuche
n.d.	nicht durchgeführt
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NECA	N-Ethylcarboxamidoadenosin
NgR	Nogo66-Rezeptor
NK1	Neurokinin-1(-Rezeptor)
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat(-Rezeptor)
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant (T-Test)
O-1812	[(<i>R</i>)-(20-Cyano-16,16-dimethyl-docosa- <i>cis</i> -5,8,11,14-tetraenoyl)-1'-hydroxy-2'-propylamin
OD	Optische Dichte
[³ H]8-OH-DPAT	[³ H](-Hydroxy-2(di- <i>N</i> -Propylamino)tetralin
P	Wahrscheinlichkeit (T-Test)
P.B.	Palison de Beauvois
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung)
PDE	Phosphodiesterase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PL	Phospholipid
PLC	Phospholipase C
[³ H]PSB-11	[³ H]8-Ethyl-4-methyl-2-phenyl-(8 <i>R</i>)-4,5,7,8-tetrahydro-1 <i>H</i> -imidazo-[1,2- <i>i</i>]purin-5-on
[³ H]PSB-298	[³ H]8-s-1-propylxanthin
[³ H]PSB-603	[³ H]8-(4-(4-(4-Chlorphenyl)-piperazin-1-sulfonyl)-phenyl)-1-propylxanthin

PSB-1115	1-Propyl-8-(4-sulfophenyl)xanthin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
r	Ratte(n)
R	aktive Rezeptorkonformation
R-(+)-WIN55212	(R)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphtalenylmethanon
R*	inaktive Rezeptorkonformation
RLS	Restless-Legs-Syndrom
R-PIA	(R)-N ⁶ -Phenylisopropyladenosin
RPM	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RS	Rattenstriatum
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA _r	Spezifische Aktivität zum Zeitpunkt der Kalibrierung
SA _t	Spezifische Aktivität zum Zeitpunkt t
[¹¹ C]SCH442416	5-Amino-7-[3-(4-[¹¹ C]methoxy)phenylpropyl]-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-c]-1,2,4-triazolo[1,5-e]pyrimidin
[³ H]SR-14033	[³ H](S)1-(2-[3-(3,4-Dichlorphenyl)-1-(3-isopropoxyphenylacetyl)piperidin-3-yl]ethyl)-4-phenyl-1-azoniabicyclo[2.2.2]octan-chlorid
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SPECT	Single-Photonen-Emissions-Computer-Tomographie
SR141617A	N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-chlorphenyl)-1-(2,4-dichlorphenyl)-4-methylpyrazol-3-carboxamid
SR144528	N-[(1S)-endo-1,3,3-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl]-5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-pyrazol-3-carboxamid (Rimonabant)
STW 5-K IX	Schöllkraut
STW5	Iberogast [®]
STW5-K IXs/ss	alkaloidarmer Schöllkrautextrakt
STW6	bittere Schleifenblume
TG	Triglycerid
Δ ⁸ /Δ ⁹ -THC	Δ ⁸ /Δ ⁹ -Tetrahydrocannabinol
7TM	Sieben-Transmembran-Rezeptoren
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
Tris	Tri(hydroxymethyl)aminomethan

Triton X-100	(Octylphenolpoly(ethyleneglycolether))
UDP	Uridindiphosphat
ung.	ungewaschen
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
VLDL	very-low-density lipoprotein
Verb.	Verbindung
vs.	versus (gegen)
Willd.	Willdenow, Karl Ludwig
XAC	xanthin amine congener
ZM241385	4-[2-[[7-Amino-2-(furyl)-1,2,4-triazolo[2,3-a]1,3,5triazin-5-yl]-amino]ethyl]phenol
ZNS	zentrales Nervensystem
ZVE	Zentrale Chemikalienversorgung Eendenich

11. LITERATURVERZEICHNIS

1. Yeagle, P. Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie* **1991**, *73*, 1303-1310.
2. Payne, A. H.; Hales, D. B. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 947-970.
3. Dietschy, J. M.; Turley, S. D. Thematic review series: brain lipids, cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 1375-1397.
4. Dietschy, J. M.; Turley, S. D. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* **2001**, *12*, 105-112.
5. Bloch, K. The Biological Synthesis of Cholesterol. *Science* **1965**, *150*, 19-28.
6. Vance, D. E.; Van den Bosch, H. Cholesterol in the year 2000. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1529*, 1-8.
7. Bloch, K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* **1992**, *57*, 378-383.
8. Goldstein, J.; Brown, M. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **1990**, *343*, 425-430.
9. Rilling, H. The mechanism of the condensation reactions of cholesterol biosynthesis. Fourth Morton lecture. *Biochem. Soc. Trans.* **1985**, *13*, 997-1003.
10. Blagg, B. S.; Jarstfer, M. B.; Rogers, D. H.; Poulter, C. D. Recombinant squalene synthase. A mechanism for rearrangement of presqualene diphosphate to squalene. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8846-8853.
11. Dean, P. D.; Ortiz de Montellano, P. R.; Bloch, K.; Corey, E. J. A soluble 2,3-oxidosqualene sterol cyclase. *J. Biol. Chem.* **1967**, *25*, 3014-3015.
12. Bae, S.-H.; Paik, Y.-K. Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol Δ 24-reductase. *Biochem. J.* **1997**, *326*, 609-616.
13. Stryer, L. *Biochemie*. 4th ed.; Spektrum, Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.
14. Bloch, K. Sterol Structure and Membrane Function. *Crit. Rev. Biochem.* **1983**, *14*, 47-92.
15. Schroepfer, G. J. Sterol Biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 555-585.
16. Lüllmann, H.; Mohr, K. *Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkungen verstehen-Medikamente gezielt einsetzen*. 14th ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 1999.
17. Oncley, J. L. Lipoproteins of human plasma. *Harvey Lect.* **1954-1955**, *50*, 71-91.
18. Fredrickson, D. S. Plasma lipoproteins and apolipoproteins. *Harvey Lect.* **1974**, 68185-68237.
19. Bjorkhem, I.; Lütjohann, D.; Diczfalusy, U.; Stahle, L.; Ahlborg, G.; Wahren, J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 1594-1600.
20. Dietschy, J. M. Overview of cholesterol and lipid metabolism in the brain, liver and extrahepatic organs. *Curr. Opin. Lipidol.* **2001**, *12*, 105-112.

21. Lütjohann, D.; Breuer, O.; Ahlborg, G.; Nennesmo, I.; Siden, A.; Diczfalusy, U.; Bjorkhem, I. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24-S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 9799-9804.
22. Bjorkhem, I.; Lütjohann, D.; Breuer, O.; Sakinis, A.; Wennmalm, A. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24-S-hydroxycholesterol in rat brain as measured with 1802 techniques in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30178-30184.
23. Lund, E. G.; Guileyardo, J. M.; Russel, D. W. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 7238-7243.
24. Lütjohann, D.; Papassotiropoulos, A.; Bjorkhem, I.; Locatelli, S.; Bagli, M.; Oehring, R. D.; Schlegel, U.; Jessen, F.; Rao, M. L.; von Bergmann, K.; Heun, R. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 195-198.
25. Simons, K.; Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387*, 569-572.
26. Simons, K.; Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews* **2000**, *1*, 31-39.
27. Brown, D. A.; London, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 111-136.
28. Burger, K.; Gimpl, G.; Fahrenholz, F. Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1577-1592.
29. Simons, K.; Ikonen, E. How cells handle cholesterol. *Science* **2000**, *290*, 1721-1726.
30. Tsui-Pierchala, B. A.; Encinas, M.; Milbrandt, J.; Johnson, E. M., Jr. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* **2002**, *25*, 412-417.
31. Grzybek, M.; Kozubek, A.; Dubielecka, P.; Sikorski, A. F. Rafts - the current picture. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2005**, *43*, 3-10.
32. Harder, T.; Simons, K. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 534-542.
33. Hooper, N. M. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol. Membr. Biol.* **1999**, *16*, 145-156.
34. Rajendran, L.; Simons, K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 1099-1102.
35. Ikonen, E. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 470-477.
36. Brown, D. A.; London, E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* **1998**, *164*, 103-114.
37. Pike, L. J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 655-667.
38. Maxfield, F. R. Plasma membrane microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 483-487.
39. Edidin, M. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 492-496.
40. Galbiati, F.; Razani, B.; Lisanti, M. P. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* **2001**, *106*, 403-411.
41. Zajchowski, L. D.; Robbins, S. M. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 737-752.

42. Brown, D. A.; London, E. Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17221-17224.
43. Fullekrug, J.; Simons, K. Lipid rafts and apical membrane traffic. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1014*, 164-169.
44. Gimpl, G.; Burger, K.; Fahrenholz, F. A closer look at the cholesterol sensor. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 596-599.
45. Lai, E. C. Lipid rafts make for slippery platforms. *J. Cell Biol.* **2003**, *162*, 365-370.
46. Pike, L. J. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* **2004**, *378*, 281-292.
47. Brown, D. A.; Rose, J. K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **1992**, *68*, 533-544.
48. Shogomori, H.; Brown, D. A. Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 1259-1263.
49. Ahmed, S. N.; Brown, D. A.; London, E. On the origin of sphingolipid-cholesterol rich detergent-insoluble domains in cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* **1997**, *36*, 10944-10953.
50. Schroeder, R. J.; Ahmed, S. N.; Zhu, Y.; London, E.; Brown, D. A. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 1150-1157.
51. Skwarek, M. Recent controversy surrounding lipid rafts. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2004**, *52*, 427-431.
52. Shaw, A. S. Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 1139-1142.
53. Hancock, J. F. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nature* **2006**, *7*, 456-462.
54. Lichtenberg, D.; Goni, F. M.; Heerklotz, H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 430-436.
55. London, E.; Brown, D. A. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1508*, 182-195.
56. Kurzchalia, T. V.; Hartmann, E.; Dupree, P. Guilty by insolubility - does a protein's detergent insolubility reflect a caveolar location? *Trends Cell Biol.* **1995**, *5*, 187-189.
57. Pike, L. J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 1597-1598.
58. Hao, M.; Mukherjee, S.; Maxfield, F. R. Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 13072-13077.
59. Anderson, R. G. W.; Jacobson, K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **2002**, *296*, 1821-1825.
60. Anderson, R. G. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 199-225.
61. Kurzchalia, T. V.; Parton, R. G. Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 424-431.

62. Schnitzer, J. E.; McIntosh, D. P.; Dvorak, A. M.; Liu, J.; Oh, P. Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science* **1995**, *269*, 1435-1439.
63. Klein, U.; Gimpl, G.; Fahrenholz, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13784-13793.
64. Morris, D. P.; Lei, B.; Wu, Y.-X.; Michelotti, G. A.; Schwinn, D. A. The alpha_{1A}-adrenergic receptor occupies membrane rafts with its G protein effectors but internalizes via clathrin coated pits. *J. Biol. Chem.* **2007**, in press.
65. Bauer, K. H.; Frömming, K.-H.; Führer, C. *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. 6. Auflage ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1999.
66. Pitha, J.; Irie, T.; Sklar, P. B.; Nye, J. S. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.* **1988**, *43*, 493-502.
67. Christian, A. E.; Haynes, M. P.; Phillips, M. C.; Rothblat, G. H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* **1997**, *38*, 2264-2272.
68. Irie, T.; Fukunaga, K.; Pitha, J. Hydroxypropylcyclodextrin in parenteral use. I: Lipid dissolution and effects on lipid transfers in vitro. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 521-523.
69. Riottot, M.; Olivier, P.; Huet, A.; Caboche, J. J.; Parquet, M.; Khallou, J.; Lutton, C. Hypolipidemic effects of beta-cyclodextrin in the hamster and in the genetically hypercholesterolemic Rico rat. *Lipids* **1993**, *28*, 181-188.
70. Ohtani, Y.; Irie, T.; Uekama, K.; Fukunaga, K.; Pitha, J. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrin on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 17-22.
71. Kilsdonk, E. P.; Yancey, P. G.; Stoudt, G. W.; Bangerter, F. W.; Johnson, W. J.; Phillips, M. C.; Rothblat, G. H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17250-17256.
72. Yancey, P. G.; Rodriguez, W. V.; Kilsdonk, E. P.; Stoudt, G. W.; Johnson, W. J.; Phillips, M. C.; Rothblat, G. H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 16026-16034.
73. Neufeld, E. B.; Cooney, A. M.; Pitha, J.; Dawidowicz, E. A.; Dwyer, N. K.; Pentchev, P. G.; Blanchette-Mackie, E. J. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21604-21613.
74. Scanlon, S. M.; Williams, D. C.; Schloss, P. Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10507-10513.
75. Harikumar, K. G.; Puri, V.; Singh, R. D.; Hanada, K.; Pagano, R. E.; Miller, L. J. Differential effects of modification of membrane cholesterol and sphingolipids on the conformation, function, and trafficking of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2176-2185.
76. Awasthi-Kalia, M.; Schnetkamp, P. P.; Deans, J. P. Differential effects of filipin and methyl-beta-cyclodextrin on B cell receptor signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *287*, 77-82.
77. Pucadyil, T. J.; Shrivastava, S.; Chattopadhyay, A. The sterol-binding antibiotic nystatin differentially modulates ligand binding of the bovine hippocampal serotonin_{1A} receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 557-562.

78. Bender, F. C.; Whitbeck, J. C.; Ponce de Leon, M.; Lou, H.; Eisenberg, R. J.; Cohen, G. H. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J. Virol.* **2003**, *77*, 9542-9552.
79. Schuck, S.; Honsho, M.; Ekroos, K.; Shevchenko, A.; Simons, K. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 5795-5800.
80. Paila, Y. D.; Pucadyil, T. J.; Chattopadhyay, A. The cholesterol-complexing agent digitonin modulates ligand binding of the bovine hippocampal serotonin_{1A} receptor. *Mol. Membr. Biol.* **2005**, *22*, 241-249.
81. Ilangumaran, S.; Hoessli, D. C. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* **1998**, *335*, 433-440.
82. Vecka, M.; Tvrzicka, E.; Stankova, B.; Novak, F.; Novakova, O.; Zak, A. Hypolipidemic drugs can change the composition of rat brain lipids. *Tohoku J. Exp. Med.* **2004**, *204*, 299-308.
83. Kobayashi, T.; Takahashi, M.; Nagatsuka, Y.; Hirabayashi, Y. Lipid rafts: new tools and a new component. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1526-1531.
84. Kasahara, K.; Watanabe, K.; Kozutsumi, Y.; Oohira, A.; Yamamoto, T.; Sanai, Y. Association of GPI-anchored protein TAG-1 with src-family kinase Lyn in lipid rafts of cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.* **2002**, *27*, 823-829.
85. Nagafuku, M.; Kabayama, K.; Oka, D.; Kato, A.; Tani-ichi, S.; Shimada, Y.; Ohno-Iwashita, Y.; Yamasaki, S.; Saito, T.; Iwabuchi, K.; Hamaoka, T.; Inokuchi, J.; Kosugi, A. Reduction of glycosphingolipid levels in lipid rafts affects the expression state and function of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins but does not impair signal transduction via T cell receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 51920-51927.
86. Yamaji, A.; Sekizawa, Y.; Emoto, K.; Sakuraba, H.; Inoue, K.; Kobayashi, T.; Umeda, M. Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5300-5306.
87. Kiyokawa, E.; Makino, A.; Ishii, K.; Otsuka, N.; Yamaji-Hasegawa, A.; Kobayashi, T. Recognition of sphingomyelin by lysenin and lysenin-related proteins. *Biochemistry* **2004**, *43*, 9766-9773.
88. Pucadyil, T. J.; Chattopadhyay, A. Cholesterol modulates ligand binding and G-protein coupling to serotonin(1A) receptors from bovine hippocampus. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1663*, 188-200.
89. Papanikolaou, A.; Papafotika, A.; Murphy, C.; Papamarcaki, T.; Tsolas, O.; Drab, M.; Kurzchalia, T. V.; Kasper, M.; Christoforidis, S. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26406-26414.
90. Gebreselassie, D.; Bowen, W. D. Sigma-2 receptors are specifically localized to lipid rafts in rat liver membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *493*, 19-28.
91. Salzer, U.; Prohaska, R. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* **2001**, *97*, 1141-1143.
92. Burgueno, J.; Enrich, C.; Canela, E. I.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R.; Ciruela, F. Metabotropic glutamate type 1alpha receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 785-791.
93. Banerjee, P.; Joo, J. B.; Buse, J. T.; Dawson, G. Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *77*, 65-78.

94. Chamberlain, L. H. Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett.* **2004**, *559*, 1-5.
95. Chattopadhyay, A.; Harikumar, K. G.; Kalipatnapu, S. Solubilization of high affinity G-protein-coupled serotonin_{1A} receptors from bovine hippocampus using pre-micellar CHAPS at low concentration. *Mol. Membr. Biol.* **2002**, *19*, 211-220.
96. Gehrig-Burger, K.; Kohout, L.; Gimpl, G. CHAPSTEROL. A novel cholesterol-based detergent. *FEBS J.* **2005**, *272*, 800-812.
97. Macdonald, J. L.; Pike, L. J. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 1061-1067.
98. Smart, E. J.; Ying, Y. S.; Mineo, C.; Anderson, R. G. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 10104-10108.
99. Luria, A.; Vegelyte-Avery, V.; Stith, B.; Tsvetkova, N. M.; Wolkers, W. F.; Crowe, J. H.; Tablin, F.; Nuccitelli, R. Detergent-free domain isolated from *Xenopus* egg plasma membrane with properties similar to those of detergent-resistant membranes. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13189-13197.
100. Eckert, G. P.; Igbavboa, U.; Muller, W. E.; Wood, W. G. Lipid rafts of purified mouse brain synaptosomes prepared with or without detergent reveal different lipid and protein domains. *Brain Res.* **2003**, *962*, 144-150.
101. Ford, T.; Graham, J.; Rickwood, D. Iodixanol: A nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 360-366.
102. Graham, J.; Ford, T.; Rickwood, D. The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol. *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 367-373.
103. Chini, B.; Parenti, M. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J. Mol. Endocrinol.* **2004**, *32*, 325-338.
104. Pucadyil, T. J.; Chattopadhyay, A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 295-333.
105. Ostrom, R. S.; Insel, P. A. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *143*, 235-245.
106. Insel, P. A.; Head, B. P.; Patel, H. H.; Roth, D. M.; Bunday, R. A.; Swaney, J. S. Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 1131-1134.
107. Ostrom, R. S. New determinants of receptor-effector coupling: trafficking and compartmentation in membrane microdomains. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 473-476.
108. Insel, P. A.; Head, B. P.; Ostrom, R. S.; Patel, H. H.; Swaney, J. S.; Tang, C. M.; Roth, D. M. Caveolae and lipid rafts: G protein-coupled receptor signaling microdomains in cardiac myocytes. *Ann. N Y Acad. Sci.* **2005**, *1047*, 166-172.
109. Becher, A.; McIlhinney, R. A. Consequences of lipid raft association on G-protein-coupled receptor function. *Biochem. Soc. Symp.* **2005**, *72*, 151-164.
110. Neubig, R. R. Membrane organization in G-Protein mechanisms. *FASEB J.* **1994**, *8*, 939-946.
111. Oh, P.; Schnitzer, J. E. Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 685-698.

112. Miura, Y.; Hanada, K.; Jones, T. L. G(s) signaling is intact after disruption of lipid rafts. *Biochemistry* **2001**, *40*, 15418-15423.
113. Navarro, J.; Landau, E. M.; Fahmy, K. Receptor-dependent G-protein activation in lipidic cubic phase. *Biopolymers* **2002**, *67*, 167-177.
114. Krauss, G. *Biochemistry of signal transduction and regulation*. 2th ed.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 2001.
115. Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Förstermann, U.; Starke, K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8th ed.; Urban & Fischer Verlag: München, 2001.
116. Barnett-Norris, J.; Lynch, D.; Reggio, P. H. Lipids, lipid rafts and caveolae: their importance for GPCR signaling and their centrality to the endocannabinoid system. *Life Sci.* **2005**, *77*, 1625-1639.
117. Bari, M.; Battista, N.; Fezza, F.; Finazzi-Agro, A.; Maccarrone, M. Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 12212-12220.
118. Nguyen, D. H.; Giri, B.; Collins, G.; Taub, D. D. Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement. *Exp. Cell Res.* **2005**, *304*, 559-569.
119. Monastyrskaya, K.; Hostettler, A.; Buergi, S.; Draeger, A. The NK1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is dependent on lipid raft integrity. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7135-7146.
120. Yu, W.; Guo, W.; Feng, L. Segregation of Nogo66 receptors into lipid rafts in rat brain and inhibition of Nogo66 signaling by cholesterol depletion. *FEBS Lett.* **2004**, *577*, 87-92.
121. Reversi, A.; Rimoldi, V.; Brambillasca, S.; Chini, B. Effects of cholesterol manipulation on the signaling of the human oxytocin receptor. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2006**, *291*, R861-R869.
122. Quinton, T. M.; Kim, S.; Jin, J.; Kunapuli, S. P. Lipid rafts are required in Galpha(i) signaling downstream of the P2Y₁₂ receptor during ADP-mediated platelet activation. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*, 1036-1041.
123. Savi, P.; Zachayus, J. L.; Delesque-Touchard, N.; Labouret, C.; Herve, C.; Uzabiaga, M. F.; Pereillo, J. M.; Culouscou, J. M.; Bono, F.; Ferrara, P.; Herbert, J. M. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y₁₂ receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 11069-11074.
124. Vial, C.; Fung, C. Y.; Goodall, A. H.; Mahaut-Smith, M. P.; Evans, R. J. Differential sensitivity of human platelet P2X₁ and P2Y₁ receptors to disruption of lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *343*, 415-419.
125. Chattopadhyay, A.; Jafurulla, M.; Kalipatnapu, S.; Pucadyil, T. J.; Harikumar, K. G. Role of cholesterol in ligand binding and G-protein coupling of serotonin_{1A} receptors solubilized from bovine hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *327*, 1036-1041.
126. Pucadyil, T. J.; Chattopadhyay, A. Cholesterol modulates the antagonist-binding function of hippocampal serotonin_{1A} receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1714*, 35-42.
127. Pucadyil, T. J.; Shrivastava, S.; Chattopadhyay, A. Membrane cholesterol oxidation inhibits ligand binding function of hippocampal serotonin(1A) receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 422-427.

128. Allen, J. A.; Yu, J. Z.; Donati, R. J.; Rasenick, M. M. Beta-adrenergic receptor stimulation promotes G α s internalization through lipid rafts: a study in living cells. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1493-1504.
129. Chun, M.; Liyanage, U. K.; Lisanti, M. P.; Lodish, H. F. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalisation of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 11728-11732.
130. Lasley, R. D.; Narayan, P.; Uittenbogaard, A.; Smart, E. J. Activated cardiac adenosine A(1) receptors translocate out of caveolae. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4417-4421.
131. Escriche, M.; Burgueno, J.; Ciruela, F.; Canela, E. I.; Mallol, J.; Enrich, C.; Lluís, C.; Franco, R. Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A₁ adenosine receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling. *Exp. Cell Res.* **2003**, *285*, 72-90.
132. Gines, S.; Ciruela, F.; Burgueno, J.; Casado, V.; Canela, E. I.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R. Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A₁ adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1314-1323.
133. Vial, C.; Evans, R. J. Disruption of lipid rafts inhibits P2X₁ receptor mediated currents and arterial vasoconstriction. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 30705-30711.
134. Kaiser, R. A.; Oxhorn, B. C.; Andrews, G.; Buxton, I. L. Functional compartmentation of endothelial P2Y receptor signaling. *Circ. Res.* **2002**, *91*, 292-299.
135. Vacca, F.; Amadio, S.; Sancesario, G.; Bernardi, G.; Volonte, C. P2X₃ receptor localizes into lipid rafts in neuronal cells. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *76*, 653-661.
136. Lander, E. S. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
137. Venter, J. C. The sequence of the human genome. *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
138. Attwood, T. K.; Findlay, J. B. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* **1994**, *7*, 195-203.
139. Kolakowski, L. F. J. GCRDb: a G-Protein-coupled receptor database. *Recept. Channels* **1994**, *2*, 1-7.
140. Vassilatis, D. K.; Hohmann, J. G.; Zeng, H.; Li, F.; Ranchalis, J. E.; Mortrud, M. T.; Brown, A.; Rodriguez, S. S.; Weller, J. R.; Wright, A. C.; Bergmann, J. E.; Gaitanaris, G. A. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 4903-4908.
141. Bockaert, J.; Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1723-1729.
142. Baldwin, J. M. Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6*, 180-190.
143. Fredriksson, R.; Lagerstrom, M. C.; Lundin, L. G.; Schiöth, H. B. The G protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256-1272.
144. Ji, T. H.; Grossmann, M.; Ji, I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17299-17302.
145. Fredholm, B. B.; AP, I. J.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527-552.
146. Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413-492.

147. Palmer, T. M.; Stiles, G. L. Neurotransmitter Receptors VII: Adenosine Receptors. *Neuropharmacology* **1995**, *34*, 683-694.
148. Müller, C. E.; Scior, T. Adenosine receptors and their modulators. *Pharm. Acta Helv.* **1993**, *68*, 77-111.
149. Müller, C. E. Adenosine receptor ligands - recent developments part I. Agonists. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1269-1288.
150. Jacobson, K. A. Purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors. *Ann. Rep. Med. Chem.* **2002**, *8*, 75-83.
151. Traversa, U.; Bombi, G.; Camaioni, E.; Macchiarulo, A.; Constantino, G.; Palmieri, C.; Caciagli, F.; Pellicciari, R. Rat brain guanosine binding site: biological studies and pseudo-receptor construction. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5417-5425.
152. Brunschweiler, A.; Müller, C. E. P2 receptors activated by uracil nucleotides - an update. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 289-312.
153. Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H. Q.; Wintolders, C.; Van den Wyngaert, I.; Van Oers, I.; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 8573-8578.
154. Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von Kugelgen, I.; Müller, C. E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 955-964.
155. von Kugelgen, I.; Schiedel, A. C.; Hoffmann, K.; Alsdorf, B. B.; Abdelrahman, A.; Müller, C. E. Cloning and functional expression of a novel G_i protein-coupled receptor for adenine from mouse brain. *Mol. Pharmacol.* **2007**, in press.
156. Jacobson, K. A.; Gao, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 247-264.
157. Müller, C. E. A₁ adenosine receptors and their ligands: overview and recent developments. *Il Farmaco* **2001**, *56*, 77-80.
158. Müller, C. E. A₁-Adenosine receptor antagonists. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1997**, *7*, 419-440.
159. Müller, C. E.; Stein, B. Adenosine Receptor Antagonists: Structural and Potential Therapeutic Applications. *Curr. Pharm. Des.* **1996**, *2*, 501-530.
160. Klotz, K. N. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 382-391.
161. Kiec-Konowicz, K.; Drabczynska, A.; Pekela, E.; Michalak, B.; Müller, C. E.; Schumacher, B.; Karolak-Wojciechowska, J.; Duddeck, H.; Rockitt, S.; Wartchow, R. New developments in A₁ and A₂ adenosine receptor antagonists. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1411-1420.
162. Yan, L.; Burbiel, J. C.; Maass, A.; Müller, C. E. Adenosine receptor agonists: from basic medicinal chemistry to clinical development. *Expert. Opin. Emerg. Drugs* **2003**, *8*, 537-576.
163. Lohse, M. J.; Klotz, K. N.; Lindenborn-Fotinos, J.; Reddington, M.; Schwabe, U.; Olsson, R. A. 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) - a selective high affinity antagonist radioligand for A₁ adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1987**, *336*, 204-210.

164. Klotz, K. N.; Lohse, M. J.; Schwabe, U.; Cristalli, G.; Vittori, S.; Grifantini, M. 2-Chloro-N⁶-[³H]cyclopentyladenosine ([³H]CCPA) - a high affinity agonist radioligand for A₁ adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1989**, *340*, 679-683.
165. Bruns, R. F.; Fergus, J. H.; Badger, E. W.; Bristol, J. A.; Santay, L. A.; Hartman, J. D.; Hays, S. J.; Huang, C. C. Binding of the A₁-selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to rat brain membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1987**, *335*, 59-63.
166. Fuxe, K.; Ferre, S.; Canals, M.; Torvinen, M.; Terasmaa, A.; Marcellino, D.; Goldberg, S. R.; Staines, W.; Jacobson, K. X.; Lluís, C.; Woods, A. S.; Agnati, L.; Franco, R. Adenosine A_{2A} and dopamine D₂ heterotrimeric receptor complexes and their function. *J. Mol. Neurosci.* **2005**, *26*, 209-220.
167. Ongini, E.; Fredholm, B. B. Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1996**, *17*, 364-372.
168. Müller, C. E.; Sauer, R.; Maurinsh, Y.; Huertas, R.; Fülle, F.; Klotz, K. N.; Nagel, J.; Hauber, W. A_{2A}-selective adenosine receptor antagonists: development of water-soluble prodrugs and a new tritiated radioligand. *Drug Dev. Res.* **1998**, *45*, 190-197.
169. Müller, C. E.; Maurinsh, J.; Sauer, R. Binding of [³H]MSX-2 (3-(3-hydroxypropyl)-7-methyl-8-(m-methoxystyryl)-1-propargylxanthine) to rat striatal membranes - a new, selective antagonist radioligand for A_{2A} adenosine receptors. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *10*, 259-265.
170. Kelly, M.; Bailey, A.; Ledent, C.; Kitchen, I.; Hourani, S. Characterization of [³H]ZM 241385 binding in wild-type and adenosine A_{2A} receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *504*, 55-59.
171. Alexander, S. P.; Millns, P. J. [³H]ZM241385 - an antagonist radioligand for adenosine A_{2A} receptors in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *411*, 205-210.
172. Lopes, L. V.; Halldner, L.; Rebola, N.; Johansson, B.; Ledent, C.; Chen, J. F.; Fredholm, B. B.; Cunha, R. A. Binding of the prototypical adenosine A_{2A} receptor agonist CGS21680 to the cerebral cortex of adenosine A₁ and A_{2A} receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 1006-1014.
173. Jarvis, M. F.; Schulz, R.; Hutchison, A. J.; Do, U. H.; Sills, M. A.; Williams, M. [³H]CGS 21680, a selective A₂ adenosine receptor agonist directly labels A₂ receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *251*, 888-893.
174. Bruns, R. F.; Lu, G. H.; Pugsley, T. A. Characterization of the A₂ adenosine receptor labeled by [³H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 331-346.
175. Brown, M. S.; Goldstein, J. L. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Am.* **1984**, *251*, 58-66.
176. Goldstein, J. L.; Brown, M. S. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 897-930.
177. Roth, H. J.; Fenner, H. *Pharmazeutische Chemie Band 3: Arzneistoffe (Wissen und Praxis)*. 3th ed.; Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart, 2000.
178. Müller, W. E.; Eckert, G. P.; Franke, C. Schützen Statine vor Schlaganfall und Alzheimer: Neue Therapiemöglichkeiten in Zentralnervensystem. *Forschung Frankfurt* **2005**, *3*, 18-21.
179. Menge, T.; Hartung, H.-P.; Stüve, O. Statins - a cure-all for the brain. *Neuroscience* **2005**, *6*, 325-331.
180. Stepien, K.; Tomaszewski, M.; Czuczwar, S. J. Neuroprotective properties of statins. *Pharmacol. Rep.* **2005**, *57*, 561-569.

181. Werning, C. *Medizin für Apotheker: Ein Handbuch mit Grundwissen für die Praxis*. 2th ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 1997.
182. Kang, J.; Lemaire, H. G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K. H.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Müller-Hill, B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles as cell-surface receptor. *Nature* **1987**, *325*, 733-736.
183. Sambamurti, K.; Greig, N. H.; Lahiri, D. K. Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* **2002**, *1*, 1-31.
184. Eckert, A.; Eckert, G. P.; Kastl, A.; Leutner, S.; Leutz, S.; Schindowski, K.; Steiner, B.; Müller, W. E. Vom unaufhaltsamen Niedergang der Hirnzellen. *Forschung Frankfurt* **1999**, *4*, 60-67.
185. Selkoe, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **1991**, *6*, 487-498.
186. Octave, J. N. The amyloid peptide and its precursor in Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* **1995**, *6*, 287-316.
187. Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C.; Small, G. W.; Roses, A. D.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **1993**, *261*, 921-923.
188. Jarvik, G. P.; Wijsman, E. M.; Kukull, W. A.; Schellenberg, G. D.; Yu, C.; Larson, E. B. Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case control study. *Neurology* **1995**, *45*, 1092-1096.
189. Moir, R. D.; Atwood, C. S.; Romano, D. M.; Laurans, M. H.; Huang, X.; Bush, A. I.; Smith, J. D.; Tanzi, R. E. Differential effects of apolipoprotein E isoforms on metal-induced aggregation of A beta using physiological concentrations. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4595-4603.
190. Wolozin, B.; Brown, J.; Theisler, C.; Silberman, S. The cellular biochemistry of cholesterol and statins: insights into the pathophysiology and therapy of Alzheimer's disease. *CNC Drug Rev.* **2004**, *10*, 127-146.
191. Kuo, Y. M.; Emmerling, M. R.; Bisgaier, C. L.; Essenburg, A. D.; Lampert, H. C.; Drumm, D.; Roher, A. E. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *252*, 711-715.
192. Igbavboa, U.; Avdulov, N. A.; Schroeder, F.; Wood, W. G. Increasing age alters transbilayer fluidity and cholesterol asymmetry in synaptic plasma membrane of mice. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 1717-1725.
193. Mori, T.; Paris, D.; Town, T.; Rojiani, A. M.; Sparks, D. L.; Delledonne, A.; Crawford, F.; Abdullah, L. I.; Humphrey, J. A.; Dickson, D. W.; Mullan, M. J. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2001**, *60*, 778-785.
194. Wolozin, B. Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron* **2004**, *41*, 7-10.
195. Wolozin, B. Cholesterol, statins and dementia. *Curr. Opin. Lipidol.* **2004**, *15*, 667-672.
196. Eckert, G. P.; Wood, W. G.; Müller, W. E. Statins: drugs for Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **2005**, *112*, 1057-1071.
197. Kirsch, C.; Eckert, G. P.; Koudinov, A. R.; Müller, W. E. Brain Cholesterol, Statins and Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* **2003**, *36*, S113-S119.

198. Whitfield, J. F. Can statins put the brakes on Alzheimer's disease? *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2006**, *15*, 1479-1485.
199. Ehehalt, R.; Keller, P.; Haas, R.; Thiele, C.; Simons, K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 113-123.
200. Simons, K.; Ehehalt, R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 597-603.
201. Cordy, J. M.; Hooper, N. M.; Turner, A. J. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol. Membr. Biol.* **2006**, *23*, 111-122.
202. Michel, V.; Bakovic, M. Lipid rafts in health and disease. *Biol. Cell* **2007**, *99*, 129-140.
203. Wolozin, B.; Kellman, W.; Rousseau, P.; Celesia, G. G.; Siegel, G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* **2000**, *57*, 1439-1443.
204. Rockwood, K.; Kirkland, S.; Hogan, D. B.; MacKnight, C.; Merry, H.; Verreault, R.; Wolfson, C.; McDowell, I. Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch. Neurol.* **2002**, *59*, 223-227.
205. Fassbender, K.; Simons, M.; Bergmann, C.; Stroick, M.; Lütjohann, D.; Keller, P.; Runz, H.; Kühl, S.; Bertsch, T.; von Bergmann, K.; Hennerici, M.; Beyreuther, K.; Hartmann, T. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 5856-5861.
206. Locatelli, S.; Lütjohann, D.; Schmidt, H. H.; Otto, C.; Beisiegel, U.; von Bergmann, K. Reduction of plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) levels using high-dosage simvastatin in patients with hypercholesterolemia: evidence that simvastatin affects cholesterol metabolism in the human brain. *Arch. Neurol.* **2002**, *59*, 213-216.
207. Corsini, A.; Bellosta, S.; Baetta, R.; Fumagalli, R.; Paoletti, R.; Bernini, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *84*, 413-428.
208. Saheki, A.; Terasaki, T.; Tamai, I.; Tsuji, A. In vivo and in vitro blood-brain barrier transport of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 305-311.
209. Wolozin, B.; Manger, J.; Bryant, R.; Cordy, J.; Green, R. C.; McKee, A. Re-assessing the relationship between cholesterol, statins and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* **2006**, *185*, 63-70.
210. Ledesma, M. D.; Dotti, C. G. The conflicting role of brain cholesterol in Alzheimer's disease: lessons from the brain plasminogen system. *Biochem. Soc. Symp.* **2005**, *72*, 129-138.
211. Hoyer, S.; Riederer, P. Alzheimer disease - no target for statin treatment. A mini review. *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 695-706.
212. Dall'Igna, O. P.; Porciúncala, L. O.; Souza, D. O.; Cunha, R. A.; Lara, D. R. Neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *138*, 1207-1209.
213. Mutschler, E.; Schäfer-Korting, M. *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 7th ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 1997.
214. Von Bohlen und Halbach, O. Animal Models in Parkinson's Disease. *Neurodegener. Dis.* **2005**, *2*, 313-320.
215. Smeyne, R. J. S.; Jackson-Lewis, V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Mol. Brain Res.* **2005**, *134*, 57-66.

216. Schober, S. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* **2004**, *318*, 215-224.
217. Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 5th ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 1999.
218. Gerfen, C. R.; Engber, T. M.; Mahan, L. C.; Susel, Z.; Chase, T. N.; Monsma, F. J. j.; Sibley, D. R. D₁ and D₂ dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* **1990**, *250*, 1429-1432.
219. Samii, A.; Nutt, J. G.; Ranson, B. R. Parkinson's disease. *Lancet* **2004**, *363*, 1783-1793.
220. Lang, A. E.; Lozano, A. M. Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 1044-1053 und 1130-1143.
221. Ma, D. W. Lipid mediators in membrane rafts are important determinants of human health and disease. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2007**, *32*, 341-350.
222. Musanti, R.; Parati, E.; Lamperti, E.; Ghiselli, G. Decreased cholesterol biosynthesis in fibroblasts from patients with Parkinson disease. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **1993**, *49*, 133-142.
223. Huang, X.; Chen, H.; Miller, W. C.; Mailman, R. B.; Woodard, J. L.; Chen, P. C.; Xiang, D.; Murrow, R. W.; Wang, Y. Z.; Poole, C. Lower low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2007**, *22*, 377-381.
224. de Lau, L. M.; Koudstaal, P. J.; Hofman, A.; Breteler, M. M. Serum cholesterol levels and the risk of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* **2006**, *164*, 998-1002.
225. de Lau, L. M.; Stricker, B. H.; Breteler, M. M. Serum cholesterol, use of lipid-lowering drugs, and risk of Parkinson disease. *Mov. Disord.* **2007**.
226. Lieberman, A.; Lyons, K.; Levine, J.; Myerburg, R. Statins, cholesterol, Co-enzyme Q10, and Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord.* **2005**, *11*, 81-84.
227. Huang, X.; Chen, P. C.; Poole, C. APOE-ε2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology* **2004**, *62*, 2198-2202.
228. Dexter, D. T.; Carter, C. J.; Wells, F. R.; Agid, F. J.; Agid, D.; Lees, A.; Jenner, P.; Marsden, C. D. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **1989**, *52*, 381-389.
229. Schapira, A. H. V.; Cooper, J. M.; Dexter, D. T.; Clark, J. B.; Jenner, P.; Marsden, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's patients. *J. Neurochem.* **1990**, *54*, 823-827.
230. Shults, C. W.; Haas, R. H.; Passov, D.; Beal, M. F. Coenzyme Q₁₀ levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and non-parkinsonian subjects. *Ann. Neurol.* **1997**, *42*, 261-264.
231. Shults, C. W.; Oakes, D.; Kieburtz, K.; Beal, M. F.; Haas, R.; Plumb, S.; Juncos, J. L.; Nutt, J.; Shoulson, I.; Carter, J.; Kompoliti, K.; Perlmutter, J. S.; Reich, S.; Stern, M.; Watts, R. L.; Kurlan, R.; Molho, E.; Harrison, M.; Lew, M. Effects of Coenzyme Q₁₀ in Early Parkinson Disease. *Arch. Neurol.* **2002**, *59*, 1541-1550.
232. Beal, M. F.; Matthews, R. T.; Tieleman, A.; Shults, C. W. Coenzyme Q₁₀ attenuates the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice. *Brain Res.* **1998**, *783*, 109-114.
233. Bleske, B. E.; Willis, R. A.; Anthony, M.; Casselberry, N.; Datwani, M.; Uhley, V. E.; Secontine, S. G.; Shea, M. J. The effect of pravastatin and atorvastatin on coenzyme Q10. *Am. Heart J.* **2001**, *142*, e2.
234. Ben-Shachar, D.; Zuk, R.; Glinka, Y. Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *J. Neurochem.* **1995**, *64*, 718-723.

235. Walkinshaw, G.; Waters, C. M. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 2458-2464.
236. Müller, C. E. A_{2A} adenosine receptor antagonists - future drugs for Parkinson's disease. *Drugs Future* **2000**, *25*, 1042-1052.
237. Kase, H. New aspects of physiological and pathophysiological functions of adenosine A_{2A} receptor in basal ganglia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 1447-1457.
238. Kirk, I. P.; Richardson, P. J. Adenosine A_{2A} receptor-mediated modulation of striatal [³H]GABA and [³H]acetylcholine release. *J. Neurochem.* **1994**, *62*, 960-966.
239. Kurokawa, M.; Kirk, I. P.; Kirkpatrick, K. A.; Kase, H.; Richardson, P. J. Inhibition by KF17837 of adenosine A_{2A} receptor-mediated modulation of striatal GABA and ACh release. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *113*, 43-48.
240. Kurokawa, M.; Koga, K.; Kase, H.; Nakamura, J.; Kuwana, Y. Adenosine A_{2A} receptor-mediated modulation of striatal acetylcholine release in vivo. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 1882-1888.
241. Ferre, S.; von Euler, G.; Johansson, B.; Fredholm, B. B.; Fuxe, K. Stimulation of high-affinity adenosine A₂ receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1991**, *88*, 7238-7241.
242. Schwarzschild, M. A.; Agnati, L.; Fuxe, K.; Chen, J. F.; Morelli, M. Targeting adenosine A_{2A} receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **2006**, *29*, 647-654.
243. Canals, M.; Marcellino, D.; Fanelli, F.; Ciruela, F.; de Benedetti, P.; Goldberg, S. R.; Neve, K.; Fuxe, K.; Agnati, L. F.; Woods, A. S.; Ferre, S.; Lluís, C.; Bouvier, M.; Franco, R. Adenosine A_{2A}-Dopamine D₂ Receptor-Receptor Heteromerization. *J. Biol. Chem.* **2003**.
244. Torvinen, M.; Marcellino, D.; Canals, M.; Agnati, L. F.; Lluís, C.; Franco, R.; Fuxe, K. Adenosine A_{2A} receptor and dopamine D₃ receptor interactions: evidence of functional A_{2A}/D₃ heteromeric complexes. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 400-407.
245. Nakata, H.; Yoshioka, K.; Kamiya, T. Purinergic-receptor oligomerization: implications for neural functions in the central nervous system. *Neurotox. Res.* **2004**, *6*, 291-297.
246. Richardson, P. J.; Kase, H.; Jenner, P. G. Adenosine A_{2A} receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 338-344.
247. Yang, M.; Soohoo, D.; Soelaiman, S.; Kalla, R.; Zablocki, J.; Chu, N.; Leung, K.; Yao, L.; Diamond, I.; Belardinelli, L.; Shryock, J. C. Characterization of the potency, selectivity, and pharmacokinetic profile for six adenosine A_{2A} receptor antagonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2007**, *375*, 133-144.
248. Jenner, P. A_{2A} antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. *Neurology* **2003**, *61*, S32-38.
249. Jenner, P. Istradefylline, a novel adenosine A_{2A} receptor antagonist, for the treatment of Parkinson's disease *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2005**, *14*, 729-739.
250. Müller, C. E.; Ferre, S. Blocking striatal adenosine A_{2A} receptors: a new strategy for basal ganglia disorders. *Recent Patents CNS Drug Discov.* **2007**, *2*, 1-21.
251. El Yacoubi, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Bertorelli, R.; Ongini, E.; Costentin, J.; Vaugeois, J. M. Adenosine A_{2A} receptor antagonist are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A_{2A} receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 68-77.
252. Holschbach, M. H.; Olsson, R. A. Applications of adenosine receptor ligands in medical imaging by positron emission tomography. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 2345-2352.

253. Stickel, F.; Poschl, G.; Seitz, H. K.; Waldherr, R.; Hahn, E. G.; Schuppan, D. Acute hepatitis induced by Greater Celandine (*Chelidonium majus*). *Scand. J. Gastroenterol.* **2003**, *38*, 565-568.
254. Akkari, R.; Burbiel, J. C.; Hockemeyer, J.; Müller, C. E. Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1375-1399.
255. Romero, J.; Lastres-Becker, I.; de Miguel, R.; Berrendero, F.; Ramos, J. A.; Fernandez-Ruiz, J. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *95*, 137-152.
256. Cheng, Y.; Prusoff, W. H. 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.
257. Bylund, D. B.; Toews, M. L. Radioligand binding methods: practical guide and tips. *Am. J. Physiol.* **1993**, *265*, L421-429.
258. Attie, A. D.; Raines, R. T. Analysis of receptor-ligand interactions. *J. Chem. Edu.* **1995**, *72*, 119-124.
259. Hulme, E. C. *Receptor-ligand interactions. A practical approach*. Oxford University Press: 1992.
260. Motulsky, H. *Analyzing data with GraphPad Prism*. GraphPad Software Inc., San Diego CA: 1999.
261. Milligan, G. Principles: extending the utility of [35 S]GTPgammaS binding assays. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 87-90.
262. Lorenzen, A.; Guerra, L.; Vogt, H.; Schwabe, U. Interaction of full and partial agonists of the A_1 adenosine receptor with receptor/G protein complexes in rat brain membranes. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *49*, 915-926.
263. Nanoff, C.; Mitterauer, T.; Roka, F.; Hohenegger, M.; Freissmuth, M. Species differences in A_1 adenosine receptor/G protein coupling: identification of a membrane protein that stabilizes the association of the receptor/G protein complex. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 806-817.
264. Kull, B.; Svenningsson, P.; Hall, H.; Fredholm, B. B. GTP differentially affects antagonist radioligand binding to adenosine A_1 and A_{2A} receptors in human brain. *Neuropharmacology* **2000**, *39*, 2374-2380.
265. Strange, P. G. Mechanism of inverse agonism at G-Protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 89-95.
266. Olah, M.; Stiles, G. L. Agonists and antagonists recognize different but overlapping populations of A_1 adenosine receptors: modulation of receptor number by $MgCl_2$, solubilization, and guanine nucleotides. *J. Neurochem.* **1990**, *55*, 1432-1438.
267. Musser, B.; Mudumbi, R. V.; Liu, J.; Olson, R. D.; Vestal, R. E. Adenosine A_1 receptor-dependent and -independent effects of the allosteric enhancer PD 81,723. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1999**, *288*, 446-454.
268. Higashijima, T.; Ferguson, K. M.; Sternweis, P. C.; Smigel, M. D.; Gilman, A. G. Effects of Mg^{2+} and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 762-766.
269. Gao, Z. G.; Kim, S. K.; Ijzerman, A. P.; Jacobson, K. A. Allosteric modulation of the adenosine family of receptors. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 545-553.
270. Gao, Z. G.; Kim, S. K.; Gross, A. S.; Chen, A.; Blaustein, J. B.; Jacobson, K. A. Identification of essential residues involved in the allosteric modulation of the human A_3 adenosine receptor. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1021-1031.

271. Gao, Z. G.; Ijzerman, A. P. Allosteric modulation of A_{2A} adenosine receptors by amiloride analogues and sodium ions. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 669-676.
272. Chidiac, P. Considerations in the evaluation of inverse agonism and protean agonism at G protein coupled receptors. *Methods Enzymol.* **2002**, *343*, 3-16.
273. Lasley, R. D.; Smart, E. J. Cardiac myocyte adenosine receptors and caveolae. *Trends Cardiovasc. Med.* **2001**, *11*, 259-263.
274. Svenningsson, P.; Hall, H.; Sedvall, G.; Fredholm, B. B. Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse* **1997**, *27*, 322-335.
275. Reith, U. Native und rekombinante humane Adenosinrezeptoren: Charakterisierung, Interaktion mit pflanzlichen Inhaltsstoffen und Suche nach neuen Leitstrukturen. Dissertation, Universität Bonn, **2001**.
276. Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 90-113.
277. Hahn, C.; Reichel, C.; von Bergmann, K. Serum concentration of 7 alpha-hydroxycholesterol as an indicator of bile acid synthesis in humans. *J. Lipid Res.* **1995**, *36*, 2059-2066.
278. Berthold, H. K.; Sudhop, T.; von Bergmann, K. Effect of a garlic oil preparation on serum lipoproteins and cholesterol metabolism: a randomized controlled trial. *JAMA* **1998**, *279*, 1900-1902.
279. Sudhop, T.; Lütjohann, D.; Ratman, C.; von Bergmann, J.; von Bergmann, K. Differences in the response of serum lipoproteins to fenofibrate between women and men with primary hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *50*, 365-369.
280. Lütjohann, D.; Bjorkhem, I.; Beil, U. F.; von Bergmann, K. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J. Lipid Res.* **1995**, *36*, 1763-1773.
281. Papassotiropoulos, A.; Lütjohann, D.; Bagli, M.; Locatelli, S.; Jessen, F.; Rao, M. L.; Maier, W.; Bjorkhem, I.; von Bergmann, K.; Heun, R. Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* **2000**, *11*, 1959-1962.
282. Simons, M.; Schwarzler, F.; Lütjohann, D.; von Bergmann, K.; Beyreuther, K.; Dichgans, J.; Wormstall, H.; Hartmann, T.; Schulz, J. B. Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann. Neurol.* **2002**, *52*, 346-350.
283. Kirsch, C. Einfluß einer *in vitro* und *in vivo* Cholesterol-Modulation in Hirnmembranen auf die zellulären Effekte von Amyloid beta-Peptid. Dissertation, Universität Frankfurt, **2003**.
284. Joseph, J. A.; Villalobos-Molinas, R.; Denisova, N. A.; Erat, S.; Strain, J. Cholesterol: a two-edged sword in brain aging. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22*, 455-462.
285. Voigt, R. *Pharmazeutische Technologie - Für Studium und Beruf*. 9. Auflage ed.; Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart: 2000.
286. Minetti, P.; Tinti, M. O.; Carminati, P.; Castorina, M.; Di Cesare, M. A.; Di Serio, S.; Gallo, G.; Ghirardi, O.; Giorgi, F.; Giorgi, L.; Piersanti, G.; Bartoccini, F.; Tarzia, G. 2-*n*-Butyl-9-methyl-8-[1,2,3]triazol-2-yl-9H-purin-6-ylamine and Analogues as A_{2A} Adenosine Receptor Antagonists. Design, Synthesis, and Pharmacological Characterization. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6887-6896.
287. Lehninger, A. L. *Grundkurs Biochemie*. 1th ed.; Walter de Gruyter: Berlin, New York, 1984.

288. Herve, D.; Levi-Strauss, M.; Marey-Semper, I.; Verney, C.; Tassin, J. P.; Glowinski, J.; Girault, J. A. G_{olf} and G_s in rat basal ganglia: possible involvement of G_{olf} in the coupling of dopamine D_1 receptor with adenylyl cyclase. *J. Neurosci.* **1993**, *13*, 2237-2248.
289. Herve, D.; Rogard, M.; Levi-Strauss, M. Molecular analysis of the multiple G_{olf} alpha subunit mRNAs in the rat brain. *Mol. Brain Res.* **1995**, *32*, 125-134.
290. Schumacher, B.; Scholle, S.; Holzl, J.; Khudeir, N.; Hess, S.; Müller, C. E. Lignans isolated from valerian: identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at A_1 adenosine receptors. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1479-1485.
291. Lacher, S. K.; Mayer, R.; Sichardt, K.; Nieber, K.; Müller, C. E. Interaction of valerian extracts of different polarity with adenosine receptors: Identification of isovaltrate as an inverse agonist at A_1 receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 248-258.
292. Klotz, K. N.; Hessling, J.; Hegler, J.; Owman, C.; Kull, B.; Fredholm, B. B.; Lohse, M. J. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1998**, *357*, 1-9.
293. Martini, C.; Tuscano, D.; Trincavelli, M. L.; Cerrai, E.; Bianchi, M.; Ciapparelli, A.; Alessio, L.; Novelli, L.; Catena, M.; Lucacchini, A.; Cassano, G. B.; Dell'Osso, L. Upregulation of A_{2A} adenosine receptors in platelets from patients affected by bipolar disorders under treatment with typical antipsychotics. *J. Psychiatr. Res.* **2006**, *40*, 81-88.
294. Trincavelli, M. L.; Marroni, M.; Tuscano, D.; Ceruti, S.; Mazzola, A.; Mitro, N.; Abbracchio, M. P.; Martini, C. Regulation of A_{2B} adenosine receptor functioning by tumour necrosis factor α in human astroglial cells. *J. Neurochem.* **2004**, *91*, 1180-1190.
295. Lorenzen, A.; Lang, H.; Schwabe, U. Activation of various subtypes of G-protein alpha subunits by partial agonists of the adenosine A_1 receptor. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1287-1293.
296. Kudlacek, O.; Waldhoer, M.; Kassack, M. U.; Nickel, P.; Salmi, J. A. I.; Freissmuth, M.; Nanoff, C. Biased inhibition by suramin analogue of A_1 -adenosine receptor/ G protein coupling in fused receptor/ G protein tandems: the A_1 -adenosine receptor is predominantly coupled to $G_{0/\alpha}$ in human brains. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2002**, *365*, 8-16.
297. Gorzalka, S. Neuartige G-Protein-gekoppelte Purinrezeptoren: Funktionelle Charakterisierung nativer Adeninrezeptoren und Evaluation neuer Purinrezeptor-Liganden. Dissertation, Universität Bonn, **2006**.
298. Kunzelmann-Marche, C.; Freyssinet, J.-M.; Martinez, M. C. Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19876-19881.
299. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
300. Ferre, S.; Ciruela, F.; Quiroz, C.; Lujan, R.; Popoli, P.; Cunha, R. A.; Agnati, L. F.; Fuxe, K.; Woods, A. S.; Lluís, C.; Franco, R. Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *Scientific WorldJournal* **2007**, *7* (S2), 74-85.
301. Ciruela, F.; Casado, V.; Rodrigues, R. J.; Lujan, R.; Burgueno, J.; Canals, M.; Borycz, J.; Rebola, N.; Goldberg, S. R.; Mallol, J.; Cortes, A.; Canela, E. I.; Lopez-Gimenez, J. F.; Milligan, G.; Lluís, C.; Cunha, R. A.; Ferre, S.; Franco, R. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A_1 - A_{2A} receptor heteromers. *J. Neuroscience* **2006**, *26*, 2080-2087.

302. Okusa, M. D. A_{2A} adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2002**, *282*, F10-18.
303. Popoli, P.; Blum, D.; Martire, A.; Ledent, C.; Ceruti, S.; Abbracchio, M. P. Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine A_{2A} receptors in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* **2007**, *81*, 331-348.
304. Müller, C. E. Medicinal chemistry of adenosine A₃ receptor ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 445-462.
305. Müller, C. E. A₃ adenosine receptor antagonists. *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 417-427.
306. Chang, L. C.; Spanjersberg, R. F.; von Frijtag Drabbe Kunzel, J. K.; Mulder-Krieger, T.; van den Hout, G.; Beukers, M. W.; Brussee, J.; Ijzerman, A. P. 2,4,6-trisubstituted pyrimidines as a new class of selective adenosine A₁ receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6529-6540.
307. Nie, A.; Wang, J.; Huang, Z. Microwave-assisted solution-phase parallel synthesis of 2,4,6-trisubstituted pyrimidines. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 646-648.
308. Daboun, H. A.; El-Reedy, A. M. A one step synthesis of new 4-aminopyrimidine derivatives: preparation of tetrazolo- and s-triazolopyrimidines. *Z. Naturforsch.* **1983**, *38B*, 1686-1689.
309. Müller, C. E.; Diekmann, M.; Thorand, M.; Ozola, V. [³H]8-Ethyl-4-methyl-2-phenyl-(8R)-4,5,7,8-tetrahydro-1H-imidazo[2,1-i]- purin-5-one ([³H]PSB-11), a novel high-affinity antagonist radioligand for human A₃ adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 501-503.
310. Schumacher, B. Identifizierung, Struktur-Wirkungsbeziehungen und Aktivitätsprofile neuer Adenosinrezeptor-Liganden. Dissertation, Universität Bonn, **2003**.
311. van der Wenden, E. M.; Carnielli, M.; Roelen, H. C.; Lorenzen, A.; von Frijtag Drabbe Kunzel, J. K.; AP, I. J. 5'-substituted adenosine analogs as new high-affinity partial agonists for the adenosine A₁ receptor. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 102-108.
312. Vittori, S.; Lorenzen, A.; Stannek, C.; Costanzi, S.; Volpini, R.; AP, I. J.; Kunzel, J. K.; Cristalli, G. N-cycloalkyl derivatives of adenosine and 1-deazaadenosine as agonists and partial agonists of the A₁ adenosine receptor. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 250-260.
313. Lohse, M. J.; Klotz, K. N.; Schwabe, U.; Cristalli, G.; Vittori, S.; Grifantini, M. 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A₁ adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1988**, *337*, 687-689.
314. Lacher, S. K. Radioligand-Bindungsstudien an Adenosinrezeptoren: Vergleich von Standard-Assays mit High-Throughput-Verfahren. Diplom, Universität Bonn, **2004**.
315. Novellino, E.; Cosimelli, B.; Ehlaro, M.; Greco, G.; Iadanza, M.; Lavecchia, A.; Rimoli, M. G.; Sala, A.; Da Settimo, A.; Primofiore, G.; Da Settimo, F.; Taliani, S.; La Motta, C.; Klotz, K. N.; Tuscano, D.; Trincavelli, M. L.; Martini, C. 2-(Benzimidazol-2-yl)quinoxalines: a novel class of selective antagonists at human A₁ and A₃ adenosine receptors designed by 3D database searching. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8253-8260.
316. Kikugawa, K.; Suehiro, H.; Ichino, M. Platelet aggregation inhibitors. 6. 2-Thioadenosine derivatives. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 1381-1388.
317. Ryan, K. J.; Acton, E. M.; Goodman, L. Synthesis of 2-Thio-D-ribose and 2'-Thioadenosine Derivatives. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 2646-2657.
318. Bauer, A. A. Synthese und Struktur-Wirkungsbeziehungen neuer 2-Phenylpurine und strukturanaloger Verbindungen als Adenosin-Rezeptor-Antagonisten. Dissertation, Universität Bonn, **2004**.

319. Hinz, S. Bedeutung ausgewählter Aminosäuren für die Ligand-Bindung und Aktivierung des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors. Diplom, Universität Bonn, **2007**.
320. Bertarelli, D. C. G.; Diekmann, M.; Hayallah, A. M.; Rüsing, D.; Iqbal, J.; Preiss, B.; Verspohl, E. J.; Müller, C. E. Characterization of human and rodent native and recombinant adenosine A_{2B} receptors by radioligand binding studies. *Purinergic Signal*. **2006**, *2*, 559-571.
321. Herzog, H.; Rösch, F. PET- und SPECT-Technik. *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *6*, 468-473.
322. Phelps, M. E. Inaugural article: positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9226-9233.
323. Holschbach, M. H.; Fein, T.; Krummeich, C.; Lewis, R. G.; Wutz, W.; Schwabe, U.; Unterlugauer, D.; Olsson, R. A. A₁ adenosine receptor antagonists as ligands for positron emission tomography (PET) and single-photon emission tomography (SPET). *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 555-563.
324. Ishiwata, K.; Furuta, R.; Shimada, J.; Ishii, S.; Endo, K.; Suzuki, F.; Senda, M. Synthesis and preliminary evaluation of [¹¹C]KF15372, a selective adenosine A₁ antagonist. *Appl. Radiat. Isot.* **1995**, *46*, 1009-1013.
325. Fredholm, B. B.; Irenius, E.; Kull, B.; Schulte, G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 443-448.
326. Kehraus, S.; Gorzalka, S.; Hallmen, C.; Iqbal, J.; Müller, C. E.; Wright, A. D.; Wiese, M.; König, G. M. Novel amino acid derived natural products from the ascidian *Atrium robustum*: identification and pharmacological characterization of a unique adenosine derivative. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2243-2255.
327. Yeung, S. M.; Green, R. D. Agonist and antagonist affinities for inhibitory adenosine receptors are reciprocally affected by 5'-guanylylimidodiphosphate or N-ethylmaleimide. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2234-2293.
328. Themann, A.; Le, H. P.; Müller, C. E. New A₁ adenosine receptor agonists as potential ligands for positron emission tomography, *First Joint Italian-German Purine Club Meeting*, Chieti (Italy), **2005**.
329. Treibs, A.; Kreuzer, F. H. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethen. *Liebigs Ann. Chem* **1968**, 208-223.
330. Daly, C. J.; McGrath, J. C. Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Pharmacol. Ther.* **2003**, *100*, 101-118.
331. Heisig, F. Synthese neuer, funktionalisierter BODIPY-Fluorophore zur Fluoreszenzmarkierung von Membranrezeptor-Liganden. Dissertation, Universität Bonn, **2007**.
332. Heisig, F.; Freudenthal, S. J.; Themann, A.; Müller, C. E. Synthesis and structure-activity relationships of novel fluorescent-labeled adenosine derivatives, *First Joint Italian-German Purine Club Meeting*, Chieti (Italy), **2005**.
333. Volpini, R.; Costanzi, S.; Vittori, S.; Cristalli, G.; Klotz, K. N. Medicinal chemistry and pharmacology of A_{2B} adenosine receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 427-443.
334. Kim, S. A.; Marshall, M. A.; Melman, N.; Kim, H. S.; Müller, C. E.; Linden, J.; Jacobson, K. A. Structure-activity relationships at human and rat A_{2B} adenosine receptors of xanthine derivatives substituted at the 1-, 3-, 7-, and 8-positions. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2131-2138.

335. Hayallah, A. M.; Sandoval-Ramirez, J.; Reith, U.; Schobert, U.; Preiss, B.; Schumacher, B.; Daly, J. W.; Müller, C. E. 1,8-disubstituted xanthine derivatives: synthesis of potent A_{2B}-selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1500-1510.
336. Freudenthal, S. J. Fluorophordesign und Fluoreszenzmarkierung: Synthese funktionalisierter BODIPY-Derivate und Markierung von Purinrezeptor-Liganden. Dissertation, Universität Bonn, **2002**.
337. Diekmann, M. Charakterisierung neuer Radioliganden als pharmakologische Werkzeuge für A_{2B}- und A₃-Adenosinrezeptoren, Identifizierung neuer Leitstrukturen & Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien. Dissertation, Universität Bonn, **2003**.
338. Hayallah, A. A. K. M. Design, Synthesis, Biological Investigation and Structure Activity Relationships of New, Potent A_{2B}-Selective Adenosine Receptor Antagonists as Potential Immunomodulators. Dissertation, Universität Bonn, **2003**.
339. George, M.; Hill, S. J.; Kellam, B.; Middleton, R. J. Preparation of fluorescently tagged nucleoside ligands as adenosine A₁ receptors. WO 2004088312, A2 20041014, 2004.
340. Macchia, M.; Salvetti, F.; Barontini, S.; Calvani, F.; Gesi, M.; Hamdan, M.; Lucacchini, A.; Pellegrini, A.; Soldani, P.; Martini, C. Fluorescent probes for adenosine receptors: synthesis and biology of N6-dansylaminoalkyl-substituted NECA derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3223-3228.
341. Chen, R. F. Fluorescence of dansyl amino acids in organic solvents and protein solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *120*, 609-620.
342. Middleton, R. J.; Briddon, S. J.; Cordeaux, Y.; Yates, A. S.; Dale, C. L.; George, M. W.; Baker, J. G.; Hill, S. J.; Kellam, B. New fluorescent adenosine A₁-receptor agonists that allow quantification of ligand-receptor interactions in microdomains of single living cells. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 782-793.
343. Cristalli, G.; Lambertucci, C.; Taffi, S.; Vittori, S.; Volpini, R. Medicinal Chemistry of adenosine A_{2A} receptor agonists. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 387-401.
344. Feinle-Bisset, C.; Vozzo, R.; Horowitz, M.; Talley, N. J. Diet, food intake, and disturbed physiology in the pathogenesis of symptoms in functional dyspepsia. *Am. J. Gastroenterol.* **2004**, *99*, 170-181.
345. Koloski, N. A.; Talley, N. J.; Boyce, P. M. Epidemiology and health care seeking in the functional GI disorders: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* **2002**, *97*, 2290-2299.
346. Talley, N. J. Review article: dyspepsia: how to manage and how to treat? *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2002**, *16 Suppl 4*, 95-104.
347. Talley, N. J.; Silverstein, M. D.; Agreus, L.; Nyren, O.; Sonnenberg, A.; Holtmann, G. AGA technical review: evaluation of dyspepsia. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology* **1998**, *114*, 582-595.
348. Fisher, R. S.; Parkman, H. P. Management of nonulcer dyspepsia. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 1376-1381.
349. Allescher, H. D.; Bockenhoff, A.; Knapp, G.; Wienbeck, M.; Hartung, J. Treatment of non-ulcer dyspepsia: a meta-analysis of placebo-controlled prospective studies. *Scand. J. Gastroenterol.* **2001**, *36*, 934-941.
350. Moayyedi, P.; Soo, S.; Deeks, J.; Delaney, B.; Innes, M.; Forman, D. Pharmacological interventions for non-ulcer dyspepsia. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2003**, CD001960.
351. Rosch, W.; Vinson, B.; Sassin, I. A randomised clinical trial comparing the efficacy of a herbal preparation STW 5 with the prokinetic drug cisapride in patients with dysmotility type of functional dyspepsia. *Z. Gastroenterol.* **2002**, *40*, 401-408.

352. Armin, U. v.; Peitz, U.; Vinson, B.; Gundermann, K.-J.; Malferteiner, P. STW 5, a Phytopharmakon for Patiens With Functional Dyspepsia: Results of a Multicenter, Placebo-Controlled Double-Blind Study. *Am. J. Gastroenterol.* **2007**, *102*, 1268-1275.
353. Melzer, J.; Iten, F.; Reichling, J.; Saller, R. Iberis amara L. and Iberogast-results of a systematic review concerning functional dyspepsia. *J. Herb. Pharmacother.* **2004**, *4*, 51-59.
354. Saller, R.; Pfister-Hotz, G.; Iten, F.; Melzer, J.; Reichling, J. [Iberogast: a modern phytotherapeutic combined herbal drug for the treatment of functional disorders of the gastrointestinal tract (dyspepsia, irritable bowel syndrome) - from phytomedicine to "evidence based phytotherapy." A systematic review]. *Forsch. Komplementarmed. Klass. Naturheilkd.* **2002**, *9 Suppl 1*, 1-20.
355. Khayyal, M. T.; el-Ghazaly, M. A.; Kenawy, S. A.; Seif-el-Nasr, M.; Mahran, L. G.; Kafafi, Y. A.; Okpanyi, S. N. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. *Arzneimittelforschung.* **2001**, *51*, 545-553.
356. Reichling, J.; Saller, R. [Iberis amara L. (bitter candytuft) - profile of a medicinal plant. *Forsch. Komplementarmed. Klass. Naturheilkd.* **2002**, *9 Suppl 1*, 21-33.
357. Hohenester, B.; Ruhl, A.; Kelber, O.; Schemann, M. The herbal preparation STW5 (Iberogast) has potent and region-specific effects on gastric motility. *Neurogastroenterol. Motil.* **2004**, *16*, 765-773.
358. Moni, R. W.; Willis, R. J.; Quinn, R. J. A note of caution in the use of receptor binding assay to screen marine organism: the action of halistanol trisulphate on adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 1631-1634.
359. Rimpler, H. *Biogene Arzneistoffe*. 2th ed.; Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart, 1999.
360. Teuscher, E.; Melzig, M. F.; Lindequist, U. *Biogene Arzneimitte*. 6th ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 2004.
361. Moni, R. W.; Parsons, P. G.; Quinn, R. J.; Willis, R. J. Critical micelle concentration and hemolytic activity - a correlation suggested by the marine sterol, halistanol trisulfate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *182*, 115-120.
362. Runkel, F.; Prenner, L.; Häberlein, H. Ein Beitrag zum Wirkmechanismus von Efeu. *Pharmazeutische Zeitung* **2005**.
363. Breivogel, C. S.; Griffin, G.; Di Marzo, V.; Martin, B. R. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 155-163.
364. Howlett, A. C.; Barth, F.; Bonner, T. I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W. A.; Felder, C. C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B. R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R. G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 161-202.
365. Devane, W. A.; Dysarz, F. A., 3rd; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; Howlett, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 605-613.
366. Pertwee, R. G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147 Suppl 1*, S163-171.
367. Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **1993**, *365*, 61-65.
368. Pertwee, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *74*, 129-180.

369. Showalter, V. M.; Compton, D. R.; Martin, B. R.; Abood, M. E. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB₂): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *278*, 989-999.
370. Felder, C. C.; Joyce, K. E.; Briley, E. M.; Mansouri, J.; Mackie, K.; Blond, O.; Lai, Y.; Ma, A. L.; Mitchell, R. L. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 443-450.
371. Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Congy, C.; Martinez, S.; Oustric, D.; Perio, A.; Poncelet, M.; Maruani, J.; Arnone, M.; Finance, O.; Soubrie, P.; Le Fur, G. SR147778 [5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyr azole-3-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB₁ cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 905-914.
372. Hillard, C. J.; Manna, S.; Greenberg, M. J.; DiCamelli, R.; Ross, R. A.; Stevenson, L. A.; Murphy, V.; Pertwee, R. G.; Campbell, W. B. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB₁). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1427-1433.
373. Lan, R.; Gatley, J.; Lu, Q.; Fan, P.; Fernando, S. R.; Volkow, N. D.; Pertwee, R.; Makriyannis, A. Design and synthesis of the CB₁ selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. *AAPS Pharm. Sci.* **1999**, *1*, E4.
374. Pertwee, R. G. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J.* **2005**, *7*, E625-654.
375. Howlett, A. C.; Breivogel, C. S.; Childers, S. R.; Deadwyler, S. A.; Hampson, R. E.; Porrino, L. J. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* **2004**, *47 Suppl 1*, 345-358.
376. Mackie, K. Cannabinoid Receptors as Therapeutic Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 101-122.
377. Lange, J. H.; Kruse, C. G. Recent advances in CB₁ cannabinoid receptor antagonists. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2004**, *7*, 498-506.
378. Smith, R. A.; Fathi, Z. Recent advances in the research and development of CB₁ antagonists. *Drugs* **2005**, *8*, 53-66.
379. MacLennan, S. J.; Reynen, P. H.; Kwan, J.; Bonhaus, D. W. Evidence for inverse agonism of SR141716A at human recombinant cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Br J. Pharmacol.* **1998**, *124*, 619-622.
380. Van Gaal, L. F.; Rissanen, A. M.; Scheen, A. J.; Ziegler, O.; Rossner, S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* **2005**, *365*, 1389-1397.
381. Jbilo, O.; Ravinet-Trillou, C.; Arnone, M.; Buisson, I.; Bribes, E.; Peleraux, A.; Penarier, G.; Soubrie, P.; Le Fur, G.; Galiegue, S.; Casellas, P. The CB₁ receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *Faseb J.* **2005**, *19*, 1567-1569.
382. Le Foll, B.; Goldberg, S. R. Cannabinoid CB₁ receptor antagonists as promising new medications for drug dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 875-883.
383. Griessmeier, K. J. Interaktion neuer potentieller Anxiolytika mit Benzodiazepin- und Cannabinoid-Rezeptoren. Diplom, Universität Bonn, **2003**.

384. Atzler, K. J. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Arzneistoff-Targets: In-Vitro-Charakterisierung neuer Liganden und Untersuchung der Wirkstoff-Rezeptor-Interaktion. Dissertation, Universität Bonn, **2006**.
385. Muccioli, G. G.; Wouters, J.; Charlier, C.; Scriba, G. K.; Pizza, T.; Di Pace, P.; De Martino, P.; Poppitz, W.; Poupaert, J. H.; Lambert, D. M. Synthesis and activity of 1,3,5-triphenylimidazolidine-2,4-diones and 1,3,5-triphenyl-2-thioxoimidazolidin-4-ones: characterization of new CB₁ cannabinoid receptor inverse agonists/antagonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 872-882.
386. Thomas, A.; Stevenson, L. A.; Wease, K. N.; Price, M. R.; Baillie, G.; Ross, R. A.; Pertwee, R. G. Evidence that the plant cannabinoid Delta9-tetrahydrocannabivarin is a cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146*, 917-926.
387. Savinainen, J. R.; Kokkola, T.; Salo, O. M.; Poso, A.; Jarvinen, T.; Laitinen, J. T. Identification of WIN55212-3 as a competitive neutral antagonist of the human cannabinoid CB₂ receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 636-645.
388. Dyson, A.; Peacock, M.; Chen, A.; Courade, J. P.; Yaqoob, M.; Groarke, A.; Brain, C.; Loong, Y.; Fox, A. Antihyperalgesic properties of the cannabinoid CT-3 in chronic neuropathic and inflammatory pain states in the rat. *Pain* **2005**, *116*, 129-137.
389. Griffin, G.; Atkinson, P. J.; Showalter, V. M.; Martin, B. R.; Abood, M. E. Evaluation of cannabinoid receptor agonists and antagonists using the guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)-triphosphate binding assay in rat cerebellar membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *285*, 553-560.
390. Törang, J. Novel Solid- and Solution-Phase Syntheses of Oxygen-Heterocycles based on Salicylaldehydes. Dissertation, Universität Bonn, **2006**.
391. Kostova, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *5*, 29-46.
392. Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 887-916.
393. Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Eggleston, D. S.; Haltiwanger, R. C.; Bean, M. F.; Taylor, P. B.; Caranfa, M. J.; Breen, A. L.; Bartus, H. R.; Johnson, R. K.; et al. The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4131-4138.
394. Minto, R. E.; Townsend, C. A. Enzymology and Molecular Biology of Aflatoxin Biosynthesis. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2537-2556.
395. Silvan, A. M.; Abad, M. J.; Bermejo, P.; Sollhuber, M.; Villar, A. Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1183-1185.
396. Mukherjee, S.; Adams, M.; Whiteaker, K.; Daza, A.; Kage, K.; Cassar, S.; Meyer, M.; Yao, B. B. Species comparison and pharmacological characterization of rat and human CB₂ cannabinoid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *505*, 1-9.
397. Murata, C.; Masuda, T.; Kamochi, Y.; Todoroki, K.; Yoshida, H.; Nohta, H.; Yamaguchi, M.; Takadate, A. Improvement of fluorescence characteristics of coumarins: syntheses and fluorescence properties of 6-methoxycoumarin and benzocoumarin derivatives as novel fluorophores emitting in the longer wavelength region and their application to analytical reagents. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 750-758.
398. Haugland, R. P. The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Section 1.7 - Coumarines, Pyrenes and other ultraviolet light-excitable fluorophores.

399. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 896-900.
400. Nakane, H.; Arisawa, M.; Fujita, A.; Koshimura, S.; Ono, K. Inhibition of HIV-reverse transcriptase activity by some phloroglucinol derivatives. *FEBS Lett.* **1991**, *286*, 83-85.
401. Oh, H.; Swenson, D. C.; Gloer, J. B.; Shearer, C. A. New bioactive rosigenin analogues and aromatic polyketide metabolites from the freshwater aquatic fungus *Massarina tunicata*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 73-79.
402. Deeg, R.; Ziegenhorn, J. Kinetic enzymatic method for automated determination of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* **1983**, *29*, 1798-1802.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg begleitet haben und ohne deren Unterstützung, diese Arbeit bestimmt nicht möglich gewesen wäre.

Als erstes möchte ich mich bei meinen lieben Laborkolleginnen und Freundinnen Dr. Petra Hillmann, Dr. Simone Eck, Dr. Daniela Bertarelli und Anja Scheiff für die schöne gemeinsame Zeit im Labor und in der Freizeit bedanken. Nicht nur die vielen, schönen Stunden im Isotopenlabor und die Kongressreisen, sondern auch die Kneipenbesuche, Grill- und Spieleabende, bei denen Dr. Uli Wüllner, Steffen Eck, sowie Dr. Kerstin und Bernard Atzler natürlich auch nicht fehlen durften, werden mir immer in guter Erinnerung bleiben und mir bestimmt fehlen. Auch für die moralische Unterstützung und den regen fachlichen Austausch bin ich sehr dankbar. Sie sind der Grund, warum ich Bonn nicht nur mit einem „lachenden Auge“, sondern auch mit einem „weinenden Auge“ verlasse.

Besonders fehlen wird mir auch das „A-Team“, bestehend aus Anja Scheiff, Andreas Spinrath, Aliaa Abdelrahman (und Dr. Ali El-Tayeb während der Mittagspause) und mir. Man kann wirklich sehr froh sein, solche liebe BürokollegInnen bekommen zu haben. Aliaa Abdelrahman und Dr. Ali El-Tayeb mit Aya und Rhalid möchte ich zudem noch für die Einladung zu einem „ägyptischen Mittagessen“ danken und dafür, dass sie mir und meinem Mann Martin soviel über die Kultur und Lebensweise in Ägypten erzählt haben.

Auch bei Kirsten Loos und Melanie Knospe möchte ich mich für die Freundschaft und für den Einsatz beim Bau diverser Doktorwagen bedanken. Sie hatten immer ein offenes Ohr und ich danke Ihnen für Ihre Unterstützung. Leider war die gemeinsame Zeit viel zu kurz, aber ich hoffe, dass man über die Uni hinaus noch in Kontakt bleibt.

Bernt Alsdorf sowie allen anderen KollegInnen im Isotopenlabor möchte ich für die gute Zusammenarbeit, den regen Austausch und die vielen lustigen gemeinsamen Stunden im Labor danken. Unseren technischen Mitarbeiterinnen Nicole Florin, Manuela Dotten, Karen Schmeling und Julia Thomas danke ich für die perfekte Organisation des Laboralltages und ihre große Hilfsbereitschaft. Die oft lustige gemeinsame Zeit mit unseren rheinischen „Froh-Naturen“ in 408/409 wird mir bestimmt fehlen. An dieser Stelle möchte ich Sonja Hinz und Melanie Knospe sowie auch Sabrina Gollos alles Gute für ihre Doktorarbeit wünschen. Natürlich darf auch Dominik Thimm nicht vergessen werden, dem ich viel Erfolg für seine Diplom-Arbeit wünsche. Svenja Lacher danke ich für die schöne gemeinsame Zeit während unseres Qualifizierungsjahres.

In besonders schöner Erinnerung wird mir auch die gemeinsame Zeit mit den beiden italienischen Diplomandinnen Silvia Scolari und Silvia Casagrande bleiben. Gern denke ich an die gemeinsamen Kochabende und die italienischen Feiern im Studentenwohnheim zurück.

Auch bei Dr. Anke Schiedel möchte ich mich herzlich bedanken. Sie stand einem jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und man konnte sich immer zu 100 % auf sie verlassen. Speziell wegen ihrer ruhigen und stets freundlichen Art machte die Zusammenarbeit mit ihr viel Spaß. Dies gilt natürlich auch für PD Dr. Daniela Gündisch. Ich danke ihr sehr für ihre Hilfsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gütschow bedanken, besonders bei Dr. Markus Pietsch, Dr. Reik Löser, Hans-Georg Häcker sowie Dr. Paul Elsinghorst, die auch über das Qualifizierungsjahr hinaus stets hilfsbereit waren. Neben den vielen netten und oft lustigen Stunden in der Uni, werde ich mich noch gerne an die gemeinsamen Grill- und Kneipenabende erinnern.

Den Mitgliedern des Graduiertenkolleg 804, allen voran Dr. Sven Freudenthal, danke ich für die gut organisierten Workshops und Symposien sowie für die zahlreichen Stammtisch-Treffen und den gegenseitigen Austausch über den Tellerrand der eigenen Arbeit hinaus. Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Hans-Georg Häcker, Martin Müller, Anna Jacobs, Matthias Christlieb, Dr. Katharina Fucik, Dr. Jakob Törang und Dr. Lucia Gullotti. In einem Atemzug mit dem GRK804 muss natürlich auch Martina Krumbiegel genannt werden, die mir während meiner Zeit in Bonn als liebe Kollegin und auch Freundin sehr ans Herz gewachsen ist. Besonders vermissen werde ich ihre ruhige, stets freundliche und aufmunternde Art.

Herrn Dr. Markus Hubert und allen AssistentInnen des 3. Semesters, insbesondere Dr. Andreas Brunschweiger, Dr. Fabian Heisig, Heiko Ullmann, Christoph Eibl, Dirk Simonis, Jens Meyer, Lars Möllmann, Dr. Daniel Geich-Gimbl, unserem „Gentleman“ Nikolay Tzvetkov und Sabrina Gollos danke ich für die Unterstützung und die gute und auch oft spaßige Zusammenarbeit bei der Studentenbetreuung.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. H. Phuoc Le, Dr. Ali El-Tayeb, Dr. Alexander Bauer, Dr. Fabian Heisig, Sebastian Michael, Dr. Jacob Törang und Nicole Volz für die Synthese bzw. Isolierung von Testsubstanzen. Bei Dr. Meryem Köse bedanke ich mich für das Screening einiger Verbindungen in einem Adenosinkinase-Assay und für ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Alexander Zielinski danke ich für die Testung von Verbindungen an Adenosin- und Cannabinoid-Rezeptoren. Ein großer Dank gilt auch Martin Holzer für die Herstellung der cholesterolreichen Liposomen und für die rege fachliche Diskussion und die guten Ratschläge.

Stefan Rathmann, Beate Ponatowski und Wolfgang Bosse danke ich für die netten Gespräche und die lustige Zeit am pharmazeutischen Institut. Besonders bei Wolfgang möchte ich mich für seine technische Hilfsbereitschaft danken.

Prof. Dr. Ivar von Kügelgen und Irina Algaier danke für die Einarbeitung in die Bedienung des Fluoreszenz-Mikroskopes.

Prof. Dr. Stefan Bräse, Prof. Dr. Reinhard Büttner, PD Dr. Sabine Merkelbach-Bruse und Prof. Dr. Michael Gütschow möchte ich dafür danken, dass sie mich im Rahmen des Qualifizierungsjahres sehr freundlich in ihre Arbeitsgruppen aufgenommen haben und für die interessanten Themen, die ich während dieser Zeit bearbeiten durfte. Bei Dr. Kerstin Knepper, Dr. Lucia Gullotti und Dr. Markus Pietsch möchte ich mich für die gute Einarbeitung und die freundliche Betreuung bedanken.

Herrn Dr. Rodrigo A. Cunha danke ich sehr für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis an der Universität Coimbra (Portugal) und dass ich zwei Monate an einem sehr interessanten Projekt mit Parkinson-Tiermodellen arbeiten durfte. Besonders Paula Canas danke ich sehr, dass sie mich in dieses interessante Projekt eingearbeitet hat und für ihre aufopfernde Hilfsbereitschaft, sogar nachts und an den Wochenenden. Auch Patricia Simões und den Brasilianerinnen Nadia Velloso und Manuella Kaster möchte ich für die lustige Zeit im Labor und die zahlreichen portugiesischen „Dinner“ bedanken. Dem ungarischen Post-Doc Dr. Attila Kövalfi danke ich für die netten Gespräche im Labor und in der Freizeit, die Zubereitung „seines“ ungarischen Gulasches zeugte von seiner Herkunft. Nicht vergessen werden dürfen natürlich Carla Silva und Juaõ Darte. Meinen beiden Mitbewohnern André Alves und Herculano David danke ich für die wunderschöne Zeit in Portugal und ihre stete Hilfsbereitschaft, die oft lustigen Gespräche sowie die bemühten Versuche, mit mir portugiesisch zu sprechen.

Wirklich vermissen werde ich den Posaunenchor der Lutherkirche Bonn unter der Leitung von Uli Scharf. Es ist wirklich ein großes Glück so freundlich in eine Gemeinschaft aufgenommen zu werden. Die Übungsabende, die zahlreichen Auftritte, Konzerte und Ausflüge sowie der Stammtisch im „Hoppegarten“ und der „Seligen Witwe“ werden mir in guter Erinnerung bleiben. Besonders danken möchte ich Uli Scharf und Burkhard Schley, ohne deren Hilfe und guten Ratschläge ich jetzt bestimmt noch nicht so gut Trompete spielen könnte. Sehr fehlen wird mir meine Sitznachbarin Ute, die mir durch ihre freundliche Art besonders ans Herz gewachsen ist. Dies gilt natürlich auch für meine niedersächsischen Mitstreiter Dr. Andreas Heider und Sebastian Link, meinem ostfriesischen Kollegen Detlef Wagner und natürlich auch für Dunja Schley und Claudia Wester, aber auch Katharina Weinhold, Katharina Petri und

Katharina Schulze.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen lieben FreundInnen vom Studium und aus unseren Cliques aus Langförden und Hilter a.T.W. Trotz der Entfernung kam es einem immer vor, als würden sie nur „um die Ecke“ wohnen. Man freut sich immer wieder nach Hause zu kommen und zu wissen, dass man dort freudig erwartet wird, auch wenn dies viel zu selten der Fall ist.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Patentante Elisabeth und meinem Patenonkel Hubert, meinen Schwiegereltern Hanni und Friedhelm Behrenswerth, bei Oma und Opa Kemper und Oma Gerta sowie Maja und Thomas Behrenswerth mit Janine und Marina und Frank und Simone Sandfort mit Sarah-Marie und Luisa. Das Pflastern, Dachdecken, Mauern und Holzhacken an den Wochenenden auf dem Hofe Behrenswerth sorgte immer für einen angenehmen Ausgleich vom Laboralltag.

Mein allergrößter Dank gilt jedoch meinen Eltern, meinem Bruder Christian und meinem Mann Martin. Ihnen habe ich alles zu verdanken, was ich bis heute erreicht habe.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

PUBLIKATIONEN

Gütschow, M.; Pietsch, M.; Themann, A.; Fahrig, J.; Schulze, B. 2,4,5-Triphenylisothiazol-3-(2H)-one 1,1-dioxides as inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2005**, *20*, 341-347.

Knepper, K.; Themann, A.; Bräse, S. Syntheses of 5-Oxa-10,11-diazadibenzo[a,d]cycloheptenes on solid supports. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 799-801

Carriba, P.; Ortiz, O.; Patkar, K.; Justinova, Z.; Stroik, J.; Themann, A.; Müller, C.; Woods, A.S.; Hope, B.T.; Ciruela, F.; Casado, V.; Canela, E.I.; Lluís, C.; Goldberg, S.R.; Moratalla, R.; Franco, R.; Ferre, S. Striatal adenosine A_{2A} and cannabinoid CB₁ receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *32*, 2249-2259

POSTER

Themann, A.; Le, H.P.; Müller, C.E. New A₁ adenosine receptor agonists as potential ligands for positron emission tomography, *First Joint Italian-German Purine Club Meeting, Chieti (Italien)*, 18. – 20. September 2005

Heisig, F.; Freudenthal, S.J.; Themann, A.; Müller, C.E. Synthesis and structure-activity relationships of novel fluorescent-labeled adenosine derivatives, *First Joint Italian-German Purine Club Meeting, Chieti (Italien)*, 18. – 20. September 2005

Themann, A.; Le, H.P.; Müller, C.E. New A₁ adenosine receptor agonists as potential ligands for positron emission tomography, *DPhG-Jahrestagung, Mainz (Deutschland)*, 05. – 08. Oktober 2005

Heisig, F.; Freudenthal, S.J.; Themann, A.; Müller, C.E. Synthesis and structure-activity relationships of novel fluorescent-labeled adenosine derivatives, *DPhG-Jahrestagung, Mainz (Deutschland)*, 05. – 08. Oktober 2005

Themann, A.; Schiedel, A.; Müller, C.E. Effects of the membrane lipid environment on adenosine A₁ and A_{2A} receptors in rat brain striatum, *8th International Symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides, Ferrara (Italien)*, 24. – 28. Mai 2006

Themann, A.; Schiedel, A.; Müller, C.E. Effects of the membrane lipid environment on adenosine A₁ and A_{2A} receptors in rat brain striatum, *3rd Summer School Medicinal Chemistry (Graduiertenkolleg 760), Regensburg (Deutschland)*, 25. – 27. September 2006

Themann, A.; Schiedel, A.; Müller, C.E. Effects of the membrane lipid environment on adenosine A₁ and A_{2A} receptors in rat brain striatum, *DFG-Berichtskolloquium (Graduiertenkolleg 804), Bonn (Deutschland)*, 20. Oktober 2006

Knepper, K.; Ridder, M.E.P.; Themann, A.; Ziegert, R.E.; Bräse, S. Combinatorial synthesis of novel nitrogen and oxygen heterocycles aiming GPCR, *DFG-Berichtskolloquium (Graduiertenkolleg 804), Bonn (Deutschland)*, 20. Oktober 2006

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Andrea Behrenswerth (geb. Themann)
Geburtsstag: 21. Februar 1980
Geburtsort: Vechta (Niedersachsen)
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Studium

seit 09/2004 Promotionsstudium am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. C.E. Müller
09/2003 – 08/2004 Qualifizierungsstudium an der Universität Bonn für Fachhochschulabsolventen für eine Heranführung an die Doktorarbeit
09/1999 – 08/2003 Studium der Lebensmitteltechnologie mit Studienschwerpunkt Pharmatechnik an der Fachhochschule Lippe und Höxter in Lemgo
07/2003 Abschluss
Diplom: Retrospektive Qualifizierung einer Prozessanlage zur Herstellung von festen Formen mit anschließender prozessbegleitender Validierung
03/2001 Vordiplom

Stipendium

09/2004 – 08/2007 Promotionsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Graduiertenkolleg 804)
09/2003 – 08/2004 Qualifizierungsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Graduiertenkolleg 804) für Fachhochschulabsolventen
10/2001 – 08/2003 Stipendiatin einer Studienstiftung

Praktische Tätigkeiten

seit 09/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin mit Lehrverpflichtung am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn
02/2007 – 03/2007 Forschungsaufenthalt im Arbeitskreis Herr Dr. R.A. Cunha, Universidade de Coimbra, Coimbra (Portugal)
06/2004 – 08/2004 Forschungspraktikum im Arbeitskreis Frau Prof. Dr. C.E. Müller, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn
03/2004 – 05/2004 Forschungspraktikum im Arbeitskreis Herr Prof. Dr. M. Gütschow, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn

01/2004 – 02/2004	Forschungspraktikum im Arbeitskreis Herr Prof. Dr. R. Büttner, Institut für Pathologie, Universitätsklinik Bonn
09/2003 – 12/2003	Forschungspraktikum im Arbeitskreis Herr Prof. Dr. S. Bräse, Kekulé Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Bonn
10/2002 – 07/2003	Praktikum und Diplomarbeit bei Mepha AG, Pharmazeutische Forschung, Entwicklung und Produktion, Aesch BL (Schweiz)
07/2001 – 09/2001	Praktikum bei Bayer AG, Department Pharmaceutical Technology, Leverkusen
02/2001 – 03/2001	Praktikum bei BelaPharm, Arzneimittelfabrik, Vechta
07/2000 – 09/2000	Praktikum bei sportfit, Fruchtsaft GmbH & Co. KG, Vechta-Spreeda
02/2000 – 03/2000	Praktikum bei BelaPharm, Arzneimittelfabrik, Vechta
05/1999 – 09/1999	Praktikum bei BelaPharm, Arzneimittelfabrik, Vechta
10/1998	Praktikum bei Remmers, Bauchemie GmbH, Lönigen
10/1997	Praktikum bei BelaPharm, Arzneimittelfabrik, Vechta

Schulbildung

1992 – 1999	Gymnasium Antonianum in Vechta Abschluss: Abitur
1990 – 1992	Orientierungsstufe an der Ludgerusschule Vechta
1986 – 1990	Grundschule in Vechta-Langförden

Akademische Weiterbildung

09/2003	Grundkurs zum Erwerb der Fachkunde im Strahlenschutz für Strahlenschutzbeauftragte nach § 30 StrlSchV
09/2004	Gentechnik-Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit nach § 15(2) und (4) GenTSV
09/2007	Aktualisierung der Fachkunde im Strahlenschutz