



Master Thesis

Pharmakologie von Liganden für den neuronalen nicotinischen Acetylcholin-Rezeptor Reinigung, Methylierungen, Affinitätsbestimmungen

Author(s):

Wirz, Christa

Publication Date:

2001

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004261127> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Pharmakologie von Liganden für den neuronalen nicotinischen Acetylcholin- Rezeptor

Reinigung, Methylierungen, Affinitätsbestimmungen

Diplomarbeit

von

Christa Wirz
Bürgerin von Dürrenäsch AG

Leiter: Prof. Dr. P. A. Schubiger

Betreuer: Dr. G. Westera
Betreuer: W. Bisson

5. März bis 27. Juli 2001

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung	4
2. Einleitung	5
2.1. Das Alkaloid Epibatidin	5
2.2. Der nicotinsche Acetylcholinrezeptoren (nAChR)	7
2.3. In vitro Bindungsstudien	9
2.3.1. Allgemeine Betrachtungen	9
2.3.2. Puffer und deren pH-Werte	9
2.3.3. Inkubationstemperatur	9
2.3.4. Inkubationsdauer	10
2.3.5. Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden	10
2.4. Elektrophysiologie	11
2.5. Ziel der Arbeit	11
3. Materialien und Methoden	13
3.1. Reinigung mittels semipräparativer Dünnschichtchromatographie	13
3.2. Methylierungen	13
3.3. Konzentrationsbestimmung von Dechloroepibatidin	14
3.4. Membranpräparationen	15
3.5. Verdrängungsstudien	15
3.5.1. Waschvorgang und Proteinbestimmung	15
3.5.2. Cytisin als Radioligand	16
3.5.3. Bindungsstudien mit [³ H]-Cytisin	17

4. Resultate	19
4.1. Reinigung der vier Epibatidin-Derivate ((+)-DCIEPB, (-)-DCIEPB, (+)-2PABH, (-)-2PABH)	19
4.2. Methylierungen	20
4.2.1. Vorversuche	20
4.2.2. Methylierungsreaktionen mit (\pm)-Epibatidin	20
4.3. Konzentrationsbestimmung von Dechloroepibatidin	22
4.4. Verdrängungsversuche	22
5. Diskussion	24
6. Abkürzungen	28
7. Literatur	29
8. Anhang	33

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die nicotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) gehören zur Familie der membran-durchspannenden Ionenkanal-Rezeptoren. Im lebenden Organismus sind sie wichtig für viele Funktionen und scheinen in einigen pathologischen Zuständen involviert zu sein, wie z.B. bei den Krankheiten Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer. Eine in Rattenhirnen häufig vorkommende und sehr wichtige Bindungsstelle der nAChR ist der $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp. In vorangegangenen Arbeiten wurden von einigen Epibatidin-Derivaten elektrophysiologische Untersuchungen sowie in-vivo-Experimente mittels Kleintier-PET durchgeführt. In dieser Arbeit wollte man mit den einfachen und schneller zu handhabenden Bindungsstudien weitere Daten zur Charakterisierung des nAChR gewinnen. Ebenfalls können diese Werte mit den aus der Elektrophysiologie vorhandenen Daten verglichen werden. Es wurde mit dem selektiven $\alpha_4\beta_2$ -Liganden Epibatidin sowie mit zwei seiner Derivate, dem DCIEPB und dem 2-PABH gearbeitet. Die beiden Derivate wurden in früheren Arbeiten synthetisiert, in ihre Enantiomere aufgetrennt und mussten nun mittels semipräparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt werden. Bei den folgenden Methylierungsreaktionen konnte mit Methyl-Triflat eine Ausbeute von 80% im Gegensatz zu einem Ertrag von 50% bei den selben Bedingungen mit Methyljodid erreicht werden.

In Verdrängungsstudien an Rattenganzhirnhomogenaten wurde die Affinität von (\pm)- und (-)-Epibatidin sowie von (+)- und (-)-Dechloroepibatidin zum $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp bestimmt. Die erhaltenen K_i -Werte für (\pm)-Epibatidin ($K_i = 53 \pm 9$ pM) und (-)-Enantiomer (K_i -Wert = 73 ± 10 pM) sind mit den in der Literatur gefundenen Daten vergleichbar. Aus diesen Werten lässt sich ableiten, dass allgemein die (+)-Enantiomere affiner sind als die (-)-Enantiomere der jeweiligen Substanzen. Für die beiden Enantiomere des DCIEPB wurden die IC_{50} -Werte berechnet. Sie zeigten eine signifikant höhere Affinität (Faktor 10) als Epibatidin. Für das (-)-DCIEPB lag der IC_{50} -Wert bei 64 ± 4 pM, der des (+)-DCIEPB bei 15 ± 3 pM.

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten dienen zur Vertiefung der Kenntnisse über nAChR sowie zum Vergleich mit elektrophysiologischen Daten. Das Fernziel des Gesamtprojektes besteht darin, PET-Liganden zu entwickeln, die eine ähnlich hohe Affinität für den nAChR haben wie die Epibatidin-Derivate jedoch eine geringere Toxizität aufweisen.

2. EINLEITUNG

2.1. Das Alkaloid Epibatidin

Als der amerikanische Chemiker J. W. Daly Hautextrakte von Baumfröschen aus Süd- und Mittelamerika untersuchte, entdeckte er die starke analgetische Wirkung des Stoffes *Epibatidin*. 1976 isolierte er erstmals das Sekret aus den Hautdrüsen des südamerikanischen Baumsteigerfrosches *Epipedobates tricolor* (Abb. 1) [20].



Abb. 1: Südamerikanischer Baumsteigerfrosch *Epipedobates tricolor*

Der Drüsen-Extrakt bewirkte bei Mäusen das Straub'sche Schwanzphänomen, ein für Opiate typischer Effekt, ohne aber spezifisch für diese Wirkstoffklasse zu sein. Bei Gabe des Extraktes war das Phänomen auch nach Vorbehandlung mit dem Opiat-Antagonisten Naloxon noch zu beobachten; ein Opioid konnte also nicht die Ursache sein. Diese Erkenntnis animierte Daly dazu, diese Substanz genauer zu analysieren [19]. Studien zeigten, dass Epibatidin ein höchst wirksamer Nicotinrezeptor-Agonist ist und bevorzugt an dessen α -Untereinheit bindet.

Die Verbindung wirkt 200fach stärker analgetisch als Morphin, reagiert aber nicht über Opioid-Rezeptoren [19]. Diese Befunde erlaubten die Vorstellung, dass diese Substanz als mögliche Alternative in der Schmerztherapie einsetzbar wäre.

Die Anwendung markierter, nicht-toxischer Analoga des Epibatidins stellen einen hoffnungsvollen Ansatz für zukünftige Untersuchungen am Menschen zur Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen dar. Ein weiteres Einsatzgebiet der Epibatidin-Analoga wäre somit als mögliche PET-Liganden in modernen diagnostischen Verfahren wie z. B. der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Bestimmung der nicotinischen Acetylcholin-Rezeptoren-Dichte im Gehirn.

Für einen Naturstoff weist das Epibatidin eine ungewöhnliche Struktur auf (Abb. 2). Es hat ein 7-Azabicyclo[2.2.1]heptan-Grundgerüst, das bisher in der Natur noch nicht gefunden worden ist. Dieses relativ starre, käfigartige Grundgerüst ist mit einem in Position 6 chlorierten 3-Pyridylrest verknüpft [19].

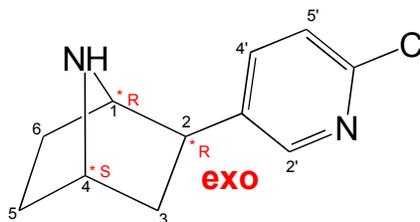


Abb. 2: Epibatidin Originalstruktur. Das (-)-Epibatidin (freie Base) ist das natürliche Enantiomer, das als Salz (HCl) rechtsdrehend ist [20]. Interessant ist die Umkehrung des Drehsinns durch Salzbildung. Wichtig für die Struktur sind die drei Stereozentren und die *exo*-Konfiguration. Ebenfalls von Bedeutung ist die Stellung des Pyridinringes in Position 2.

Epibatidin zeigt eine sehr hohe Affinität zum nicotinischen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR), aber nur eine geringe zum muskulären AChR [18]. Es bindet bevorzugt an die α -Untereinheiten des nAChR. Epibatidin besitzt an diesem Rezeptor die gleichen Bindungsstellen wie Nicotin, wirkt aber stärker. Aus elektrophysiologischen Untersuchungen ist bekannt, dass Epibatidin einen Na^+ -Strom induziert, der durch die nAChR-Antagonisten Hexamethonium und Mecamylamin unterdrückbar ist, nicht aber durch Naloxon.

Epibatidin selbst ist zu toxisch, um am Menschen angewandt zu werden. Es wurde deshalb versucht, die Struktur abzuwandeln. Zuerst wurde das Chlorid-Ion entfernt, was zum (\pm)-Dechloroepibatidin (DCIEPB, Abb. 4) führte. Später wurde mit der Position des Stickstoffes im Pyridin-Ring variiert. Einerseits führte das zum (\pm)-2PABH (Abb. 3) und andererseits zum (\pm)-4PABH (Abb. 5) [19]. Der Bicyclus wurde abgeändert, was dann zum (\pm)-Homo-Epibatidin (Abb. 6) führte [21].

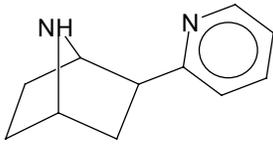


Abb. 3: (±)-2PABH, *exo*-2-(2-Pyridyl)-7-azabicyclo-[2.2.1]heptan, Variation der Stickstoffposition im Pyridinring. Hier in Position 2.

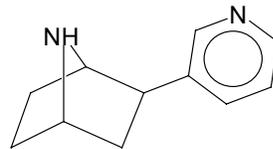


Abb. 4: (±)-DCIEPB, *exo*-2-(3-Pyridyl)-7-zabicyclo-[2.2.1]heptan nach Entfernung des Chlorid-Ions

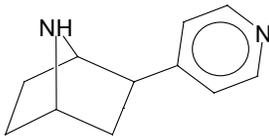


Abb. 5: (±)-4PABH, *exo*-2-(4-Pyridyl)-7-azabicyclo-[2.2.1]heptan, Variation der Stickstoffposition im Pyridinring

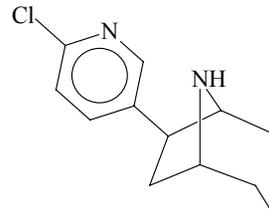


Abb. 6: (±)-Homo-Epipatidin

Infolge guter Resultate in Affinitätsstudien, elektrophysiologischen Untersuchungen und in Bezug auf die Spezifität zu dem speziellen Rezeptor-Subtyp von (±)-DCIEPB und (±)-2PABH ist es interessant, weitere Untersuchungen damit durchzuführen. Die Derivate des Epibatidins sind zu toxisch, um am Menschen in irgendeiner Form angewandt zu werden und dienen deshalb vor allem dem Studium der nAChR.

2.2. Der nicotinsche Acetylcholinrezeptor

Nicotinsche Acetylcholinrezeptoren (nAChR) gehören zur Klasse der ligand-gesteuerten Ionenkanal-Rezeptoren und werden in zwei Haupttypen unterteilt, den Muskeltyp - hier greifen bevorzugt Curare-Alkaloide an - und den neuronalen oder Ganglientyp.

Lokalisiert sind sie im zentralen und peripheren Nervensystem, an den neuromuskulären Endigungen und in den adrenergen Drüsen [24].

Die nAChR sind membrandurchspannende Glycoproteine, aufgebaut aus fünf Untereinheiten (Abb.7).

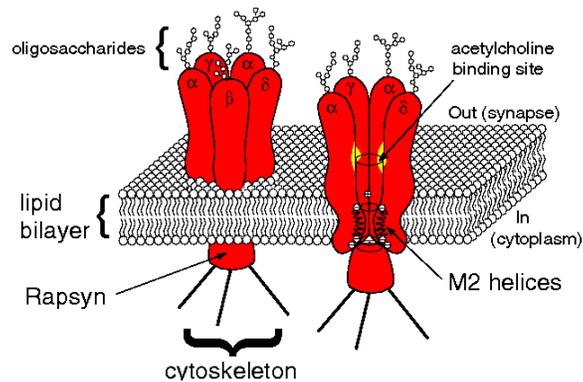


Abb. 7: Acetylcholinrezeptor, der Prototyp eines allosterischen Proteins. Der muskuläre Rezeptortyp besteht aus zwei α -, einer β -, einer γ - und einer δ -Untereinheit, während der neuronale Typ Heterooligomere aus α - und β -Untereinheiten bzw. Homooligomere aus α -Untereinheiten bildet. (Nach F. Hucho, V. Tsethin und J. Machold, Eur. J. Biochem. 239, 539-557 (1996))

In den Extrazellulärraum ragen die Aminoenden aller fünf Untereinheiten, wobei zwei dieser Untereinheiten eine Bindungsstelle enthalten, an die Acetylcholin (ACh) mit hoher Affinität bindet (Abb. 7). Die Bindung von Acetylcholin induziert eine Konformationsänderung des Komplexes. Dies führt zu einer Öffnung der Kanalpore und somit zur Erregung des postsynaptischen Neurons bzw. der Zielzelle.

Der Rezeptorkomplex ist in drei Bereiche unterteilt: einen grossen Eingangsbereich an der äusseren Membranoberfläche, eine enge transmembranäre Pore, die für die Kationenselektivität (Na^+ , K^+ und Ca^{2+}) verantwortlich ist, und einen grossen Ausgangsbereich an der inneren Membranoberfläche. Mittels Klonierungsexperimenten wurde der Aufbau des Rezeptors definiert [5]. Bis heute wurden neun α -, vier β -, eine γ -, eine δ - und eine ε -Untereinheit identifiziert und kloniert. Durch diese Vielfalt liessen sich eine Menge verschiedener Rezeptorsubtypen bilden. Bis heute wurden allerdings nur wenige Kombinationen dieser Untereinheiten identifiziert, welche funktionelle Rezeptoren formen. Der häufigste Subtyp des nAChR im zentralen Nervensystem von Ratten ist aus α_4 - und β_2 - Untereinheiten zusammengesetzt. Er ist über das ganze Gehirn verteilt, wobei die Dichte im Thalamus, Striatum und Cortex am höchsten ist [18].

Die im zentralen Nervensystem vorkommenden nAChR spielen eine wichtige Rolle in der Modulation der Neurotransmission. Zum Beispiel sind sie für das emotio-

nale Verhalten und die Wachsamkeit zuständig und haben auch kognitive Funktionen. Die nicotinischen Acetylcholinrezeptoren spielen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson eine wichtige Rolle [24]. Da bis heute nur sehr wenige Radioliganden für eine Visualisierung und Quantifizierung eben dieser Rezeptoren in vivo zur Verfügung stehen, wäre eine frühzeitige Diagnose dieser Erkrankungen von grossem Wert.

2.3. In vitro Bindungsstudien

2.3.1 Allgemeine Betrachtungen

Für die Analyse von Rezeptor-Ligand-Interaktionen sind die in vitro Bindungsstudien eine einfache und vielfältig einsetzbare Methode. Ein Nachteil ist, dass keine funktionelle Antwort messbar ist und die in vitro Bedingungen stark von der in vivo Situation abweichen können.

Bei Bindungsstudien werden Membranbestandteile aus homogenisiertem Hirngewebe mit radioaktiv markierten Liganden inkubiert. Durch Filtration des Inkubationsansatzes wird der Ligand-Rezeptor-Komplex vom freien Liganden getrennt. Durch Zugabe eines Überschusses eines kompetitiv bindenden Liganden (z.B. Nicotin) wird die nicht-spezifische Bindung ermittelt und dann von der totalen Radioligand-Bindung subtrahiert. Bei einer solchen Verdrängungsstudie kann als Mass für die Affinität des Liganden an seine Rezeptorbindungsstelle die Inhibitionskonstante K_i (Gleichung 1) ermittelt werden.

2.3.2. Puffer und deren pH-Werte

Der pH-Wert des Inkubationsgemisches sollte im physiologischen Bereich liegen, d.h. zwischen pH 7 und 8. Oft wird der Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan-Puffer verwendet. Es hat sich in verschiedenen Untersuchungen gezeigt [23], dass ein mit Salzen angereicherter Puffer die besten Ergebnisse liefert. In den beschriebenen Versuchen wird dieser BSS-Puffer eingesetzt.

2.3.3. Inkubationstemperatur

Die gebräuchlichsten Inkubationstemperaturen liegen bei 4°C, 22°C oder 37°C. Oft wird eine Inkubationstemperatur von 37°C gewählt, da sie der physiologischen

Körpertemperatur entspricht. Am einfachsten wäre es bei Raumtemperatur zu arbeiten, doch wegen verminderter Dissoziation des Radioliganden vom Rezeptor und auch wegen der geringeren nicht-spezifischen Bindung bei tieferen Temperaturen wird häufig bei 4°C gearbeitet. Ein Nachteil, wenn man bei 4°C arbeitet ist, dass einige Radioliganden bei tieferen Temperaturen eine veränderte Affinität zu ihrer Rezeptorbindungsstelle haben.

2.3.4. Inkubationsdauer

Für Verdrängungsstudien werden die Proben solange inkubiert, bis ein Gleichgewicht - der „Steady State“ - zwischen Assoziation und Dissoziation von Ligand und Rezeptor sicher gewährleistet ist.

2.3.5. Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden

Die am häufigsten angewendete Trennungsmethode ist die Vakuumfiltration durch spezielle Glasfaserfilter. Auf dem Filter bleibt der an die Rezeptoren gebundene Radioligand haften, der freie Radioligand befindet sich im Filtrat. Eine Alternative zur Vakuumfiltration wäre die Zentrifugation. Diese Methode wird vor allem bei Radioliganden mit geringer Affinität eingesetzt.

Die Bestimmung des gebundenen und des freien Anteils des Radioliganden ist ein heikler Punkt der Bindungsstudien. Eine signifikante Dissoziation des Rezeptor-Radioligand-Komplexes muss verhindert werden, da dies die zu messende Größe ist. Wird bei tiefer Temperatur gearbeitet und erfolgt die Trennung von freiem und gebundenem Radioliganden möglichst rasch, reduziert man die Dissoziationswahrscheinlichkeit. Um eine Minimierung der nicht-spezifischen Bindung zu erreichen, werden die Filter kurz vor der Filtration mit 4 ml einer speziellen Lösung (z.B. wässrige Ethylenimin-Polymer-Lösung (PEI-Lösung)) behandelt. Auch mehrmaliges Waschen der Membranen und der Filter mit Puffer reduziert die nicht-spezifische Bindung.

2.4. Elektrophysiologie

Die Elektrophysiologie ist eine weitere Methode, um die Möglichkeiten der ligandgesteuerten Rezeptoren zu untersuchen [4]. Die Verfahrensmethoden sind in [3, 4, 7] beschrieben worden.

2.5. Ziel der Arbeit

Epibatidin-Derivate sind ausserordentlich interessante Substanzen, da sie mit sehr hoher Spezifität und Affinität an die $\alpha_4\beta_2$ -Untereinheit des nAChR binden. Epibatidin dient als pharmakologisches Werkzeug für die Forschung am Acetylcholin-Rezeptor und dessen Subtypen.

Zwei potentielle Derivate des Epibatidins (\pm)-2PABH und des (\pm)-DCIEPB sind in vorangegangenen Arbeiten [25] synthetisiert und in ihre Enantiomere aufgetrennt worden. In Affinitätsstudien wurden nun die gereinigten und methylierten Substanzen auf ihre Affinität für den $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp des nAChR untersucht.

Die vorliegende Arbeit lässt sich in zwei Teile gliedern. Der erste Teil beschäftigte sich mehr mit chemischen Experimenten, während sich der zweite Teil mit biologischen bzw. pharmakologischen Untersuchungen befasste.

Der chemische Teil

Dieser Teil der Arbeit bestand darin, vier Epibatidin-Derivate ((+)-DCIEPB, (-)-DCIEPB, (+)-2PABH, (-)-2PABH), die in Lösung vorlagen, mittels semipräparativer Dünnschichtchromatographie von unerwünschten Substanzen zu reinigen und für die weitere Verwendung vorzubereiten.

Der nächste Schritt beschäftigte sich mit der Methylierung der gereinigten Produkte. Es sollte eine geeignete und einfache Methode entwickelt werden, um diese Methylierungsreaktionen mittels HPLC zu verfolgen.

Da die Dünnschichtchromatographie eine sehr einfach zu handhabende und schnelle Methode ist, um den Verlauf einer chemischen Reaktion zu verfolgen, wurde sie als zweite Methode bei diesen Experimenten eingesetzt. Von allen Substanzen stand nur eine sehr geringe Menge zur Verfügung, deshalb wurde die Methylier-

ung zuerst mit Substanzen versucht, die eine ähnliche Struktur aufweisen wie das Epibatidin. Als erster Versuch diente die Substanz *Pyrrolidin*. Später wurde das Racemat des Epibatidins eingesetzt und anhand dieser Versuche sollten die günstigsten HPLC-Bedingungen für die Verfolgung der Methylierungsreaktion ermittelt werden.

Der pharmakologische Teil

In diesem Bereich führte man bereits einige Experimente durch. So wurde z.B. mit den Epibatidin-Derivaten, die in dieser Arbeit beschrieben werden, elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Auch wurde bei diesen Substanzen durch selektive Methylierung mittels [¹¹C]-Methyliodid an der 7-aza- beziehungsweise 8-aza-Position das [¹¹C]-Nuklid eingeführt. Diese Verbindungen wurden dann anhand von in vivo Studien – speziell Experimente mit Hilfe von Positronen-Emissions-Tomographie (PET) – untersucht.

Die Aufgabe war nun, mit den kalten unmethylierten und methylierten Verbindungen in vitro Bindungsstudien zur Bestimmung der Affinität für den nAChR, speziell dem $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp, durchzuführen. Es ging darum, die Inhibitionskonstanten (K_i -Werte) oder die IC_{50} -Werte dieser Substanzen zu bestimmen, untereinander und auch mit bereits existierenden Daten aus der Elektrophysiologie zu vergleichen. Die erhaltenen Resultate dienen zur Vertiefung der Kenntnisse der nAChR und können eventuell bei der Forschung nach neuen selektiven Substanzen für diesen Rezeptor helfen.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Reinigung mittels semipräparativer Dünnschichtchromatographie (sDC)

Aus früheren Arbeiten [25] existierten vier Derivate des Epibatidins, die Enantiomere des (\pm)-2PABH und die beiden Enantiomere des (\pm)-DCIEPB (siehe Abb. 3 und 4). Diese Substanzen wurden in einer Lösung aus Triethylamin und Methanol gelagert. Die Substanzen mussten nun mittels semipräparativer Dünnschichtchromatographie von der Base gereinigt werden. Dazu wurden die Lösungen am Rotavap eingeeengt und anschliessend mit einer Mikropipette auf Silicagel-Dünnschicht-Platten (DC-Plastik-Folien 20/20 cm, Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck AG Schweiz, 105735) aufgetragen. Die entstandenen Spots wurden von der Dünnschicht-Platte abgekratzt, gesammelt und gemörsert. Dann wurde das Silicagel einige Male gewaschen, indem er durch eine Glasfilternutsche mit Dichlormethan (Merck, für Chromatographie, LiChro-solv[®], K23525344 649) abfiltriert wurde. Die Filtrate wurden gesammelt und kühl gelagert. Sie waren nun bereit für die weiteren Studien. Als Laufmittel wurde Chloroform/Ethanol (CHCl₃:EtOH, (95:5)) mit 5% Triethylamin (Fluka, Lot. 414174/1 13200, puriss.p.a., $\geq 99.5\%$ (GC)) gewählt. Eine andere eingesetzte Variante für das Laufmittel war, statt Chloroform (Fluka, Lot. 421656/1 30601, puriss.p.a.) Ethylacetat (Merck, A.C.S. Reagenz, Lot. 19528-079, 99,5%) zu verwenden, um eine Änderung des R_F-Wertes zu erreichen und dadurch mehr Vergleichsmöglichkeiten zu erhalten.

3.2. Methylierung

Da nur wenig Substanz zur Verfügung stand, wurde die Methylierung zuerst mit einer strukturähnlichen Substanz, dem Pyrrolidin, durchgeführt.

Für die Methylierungsreaktionen wurde eine definierte Menge der zu methylierenden Substanz in Acetonitril gelöst. Zu diesem Gemisch gab man eine vorher definierte Menge Methyljodid. Mit Base (Triethylamin) stabilisierte man den pH-Wert des

Ansatzes. Dieses Reaktionsgemisch wurde im Ölbad (80°C) aufgeheizt. Nach bestimmten Zeitpunkten wurde eine kleine Menge des Reaktionsgemisches herausgenommen und mittels HPLC (Säule: Nucleosil SP 250/10mm 50-7, 1041599, Macherey-Nagel, 7µm) und Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: Ethylacetat/EtOH 95:5, 5% Triethylamin) darauf untersucht, wieviel Substanz bereits methyliert ist. Die HPLC-Bedingungen wurden folgendermassen gewählt: Dichlormethan und Methanol (Rathburn, Scotland, HPLC grade, RH 1019) in einem Volumen-Verhältnis von 90 zu 10, der Flow war 8 ml/min [25].

In einem zweiten Versuch wurde statt Methyljodid Methyl-Triflat (Trifluormethansulfonsäuremethylester, $C_2H_3F_3O_3S$) verwendet [10], wobei die HPLC-Bedingungen identisch blieben. Diese Reaktionen wurden mit gekauftem (\pm)-Epibatidin und (+)-Epibatidin durchgeführt. Das (+)-Epibatidin lag allerdings als Salz vor und wurde so in Lösung zur freien Base. Da die freie Base aber linksdrehend ist, wurde das Enantiomer in dieser Arbeit als (-)-Epibatidin behandelt .

Sobald diese Bedingungen optimiert waren, konnte man dieses Verfahren mit den vier Substanzen ((+)-DCIEPB, (-)-DCIEPB, (+)-2PABH, (-)-2PABH) durchführen.

3.3. Konzentrationsbestimmung von DCIEPB mittels HPLC

Da das (+)-DCIEPB wie auch das (-)-DCIEPB nicht als Feststoff sondern in Lösung vorlagen, mussten vor Einsatz dieser Substanzen bei den Bindungsstudien die Konzentrationen bestimmt werden. Man spritzte dabei eine Vergleichssubstanz ((-)-Epibatidin) von bekannter Konzentration zusammen mit der Lösung des (+)- beziehungsweise des (-)-DCIEPB ins HPLC-Gerät ein. Die Substanzen wurden alle in Methanol gelöst. Das HPLC-Programm berechnet die Flächen unter den Peak-Kurven mittels interner Integration und setzt sie zueinander ins Verhältnis, so dass man mit diesen Angaben auf die unbekannte Konzentration schliessen kann. Damit eine gute Trennung erreicht werden konnte wurde das bereits erwähnte (s. 3.2.1) Laufmittel eingesetzt 90 Volumenteilen Dichlormethan und 10 Volumenteilen Methanol). Der Flow wurde ebenfalls wieder auf 8 ml/min eingestellt.

3.4. Membranpräparationen

Spragne-Donoley-Ratten (ca. 250g, männlich) wurden kurz mit Ether betäubt und geköpft. Anschliessend wurde das Gehirn entnommen und in ca. 10 Volumenteilen Sucrosepuffer (bezogen auf das Ausgangsgewicht des Gewebes) kalten Sucrose-Puffer (0.32 M Sucrose, 10 mM Tris/Ac pH 7.4, 0.02 % NaN₃) gegeben und sofort mit Hilfe eines Polytrons (Polytron[®] PT 1200 Kinematica AG) während 30 Sekunden auf der Stufe vier mit dem grössten Stab (Durchmesser 1cm) homogenisiert und zentrifugiert (4°C, 1000g, 15 min). Der Überstand wurde dekantiert und auf Eis gekühlt. Das zurückgebliebene Pellet wurde wiederum in fünf Volumenteilen Sucrose-Puffer-Lösung resuspendiert, mit dem Polytron homogenisiert und erneut zentrifugiert (4°C, 1000g, 15 min). Der entstandene zweite Überstand wurde mit dem ersten vereinigt und während 20 min bei 17000g zentrifugiert. Das nun erhaltene Pellet wurde in 5 mM Tris/Ac-Puffer (pH 7.0) aufgenommen, in Aliquots zu 1 ml aufgeteilt, so dass die Proteinkonzentration zwischen 2 und 10 mg/ml betrug, und anschliessend bei -80°C eingefroren.

3.5. Verdrängungsstudien

Die nAChR sind im Gehirn so verteilt, dass es keine Rolle spielt, ob nur der Cortex oder das Gesamthirn für die Versuche verwendet wird. Einfachheitshalber wurde für die folgenden Studien jeweils das Gesamthirn eingesetzt.

3.5.1. Waschvorgang und Proteinbestimmung

Für die Bindungsstudien wurden Aliquots des Ganzhirnhomogenats bei Raumtemperatur aufgetaut und zentrifugiert (11564g = 14000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 700 µl BSS-Puffer (50 mM Tris/Cl pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) resuspendiert. Diese Lösung wurde erneut zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 400 µl BSS-Puffer aufgenommen, homogenisiert und für die Proteinbestimmung eingesetzt. Die Proteinbestimmung wurde mit dem Bradford BioRad Microassay [24] durchge-

führt. Als Vergleichsstandard für die Eichgerade diente BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Rinderserumalbumin, Micro-Standard 1mg/ml in 0.15M NaCl, D-Steinheim).

Die Proteinkonzentrationen wurden so gewählt, dass nie mehr als 10% des total zugegebenen Radioliganden gebunden wurde. Die nicht-spezifische Bindung sollte mit Substanzen bestimmte werden, welche hochaffin und spezifisch an dieselbe Bindungsstelle binden und sich vom Radioliganden strukturell möglichst stark unterscheiden. In den folgenden Versuchen wurde immer mit Nicotin, das diese Bedingungen sehr gut erfüllt, gearbeitet.

3.5.2. Cytisin als Radioligand

Cytisin (Abb. 8), ein Chinolizidin-Alkaloid, ist ein giftiger Inhaltsstoff von Pflanzen wie zum Beispiel dem Besenginster (*Cytisus scoparius*) oder dem Goldregen (*Cytisus laburnum*). Er dient diesen als Selbstschutz. Es bindet an die nicotinsche Acetylcholinrezeptoren und zeigt ähnliche Wirkungen wie Nicotin bzw. Epibatidin. In geringen Konzentrationen führt es zur Erregung der vegetativen Ganglien, motorischen Endplatten und des Nebennierenmarks. Im Vergleich zu Nicotin wirkt Cytisin aber auf das zentrale Nervensystem stärker erregend. In hohen Konzentrationen hat es, wie Nicotin, eine hemmende Wirkung. So tritt z.B. bei einer Überdosis Cytisin eine zentrale Atemlähmung auf.

Cytisin besitzt eine hohe Affinität ($K_D = 1 \text{ nM}$) und Selektivität für den $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptorsubtyp [21] und wird daher in titrierter Form in Verdrängungsstudien als Radioligand benutzt, um die Affinität von Substanzen an eben diesen Rezeptorsubtyp zu untersuchen.

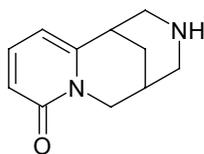


Abb. 8: Struktur des Cytisins (spezifische Aktivität: 1.2 GBq/ μmol)

3.5.3. Bindungsstudien mit [³H]-Cytisin

Die Bindungsstudien erfolgten mit (±)-Epibatidin (Dihydrochlorid, Sigma[®], Lot. 60K1456), (-)-Epibatidin (Hydrochlorid, Sigma[®], Lot. 60K1457, (freie Base)), (-)-DCIEPB und (+)-DCIEPB. Für die Bestimmung der Affinität dieser beiden Substanzen für $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptoren mittels Verdrängungsstudien wurde [³H]-Cytisin (spezifische Aktivität: 1.2 GBq/μmol; NEN[™] Boston, MA 02118 USA, LOT. 3347029) in einer Konzentration von 2 nM eingesetzt. Die Bindungsstudien wurden in Polystyrolröhrchen mit wässrigen Verdünnungen von (±)-Epibatidin, (-)-Epibatidin, (-)-DCIEPB und (+)-DCIEPB in steigenden Konzentrationen von 10^{-13} und 10^{-4} M durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mit 100 μg pro Ansatzröhrchen festgelegt.

Die Inkubationsansätze wurde mit BSS-Puffer auf ein Volumen von 200 μl ergänzt. Während 75 Minuten wurde auf Eis (4°C) inkubiert. Die Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung erfolgte durch Co-Inkubation mit einer wässrigen 10^{-4} M Nicotin-Lösung ((-)-Nicotin-Hydrogentartrat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim). Mittels Vakuumfiltration durch GF/C Whatman-Filter wurde der gebundene Radioligand vom freien getrennt. Die Filter wurden dreimal mit je 4 ml kaltem BSS-Puffer gewaschen, dann mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold[™], Packard Bioscience Company, NL-Groningen) versetzt und in einem β-Counter (Tri-Carb[™] Liquid Scintillation Analyzer, Canberra Packard, CH-Zürich) dreimal während 5 min gezählt.

Wird die spezifische Bindung in Abhängigkeit einer steigenden Kompetitor-Konzentration gemessen, konnte aus der resultierenden Inhibitionskurve der IC₅₀-Wert abgelesen werden. Der IC₅₀-Wert entspricht derjenigen Kompetitor-Konzentration, bei der die maximale spezifische Radioligand-Bindung auf die Hälfte reduziert ist.

Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mit dem PC-Programm KELL Radlig (Biosoft[®]). Diese Software benutzt für die Berechnung des K_i-Wertes die Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung 1). Im Gegensatz zum IC₅₀-Wert stellt der K_i-Wert ein Mass für die Affinität einer Substanz dar, welches unabhängig von der Affinität und Konzentrationen des verwendeten Radioliganden ist.

Alle Werte wurden in dreifachen Ansätzen in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt und als Mittelwert (±)-Standardabweichung angegeben.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{F}{K_D}}$$

[Gleichung 1]

F = freie Ligandkonzentration

K_D = Affinität des Radioliganden an den Rezeptor

IC₅₀ = Displacerkonzentration, bei welcher die spezifische Bindung des Radioliganden 50% beträgt.

4. RESULTATE

4.1. Reinigung der vier Epibatidin-Derivate

Mittels semipräparativer Dünnschichtchromatographie wurden die zwei Enantiomeren-Paare ((±)-2PABH und (±)-DCIEPB) vom Lösungsmittel gereinigt, die nach Filtration mit Chloroform erhaltene Lösung auf eine Silica-Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen und so auf ihre Reinheit überprüft. Nach einigen Waschschrritten, bei denen das zuvor abgekratzte Silicagel durch die Glasfilternutsche abfiltriert wurde, zeigte sich neben dem Substanz-Spot auch noch ein zweiter, sehr intensiver Punkt, was auf eine Unreinheit schliessen liess. Deshalb wurde mit der letzten Wasch-Fraktion ein NMR-Spektrum aufgenommen.

Weil der Verdacht von Beginn an auf eine Verunreinigung des Lösungsmittels fiel, wurden einige 100 ml „reines“ Chloroform eingedampft. Der verbleibende Stoff wurde mittels Dünnschichtchromatographie und NMR untersucht. Die entwickelte DC-Platte wies den selben Spot auf wie beim ersten Mal. Das zusätzlich aufgenommene NMR-Spektrum erhärtete das Ergebnis, dass das Chloroform verschmutzt gewesen sein musste. Die Unreinheit kam offenbar durch die Substanz *Dipropylphthalat* (Abb. 9, 10) zustande, die sich mittels Säulenchromatographie von der eigentlichen Substanz trennen liess.

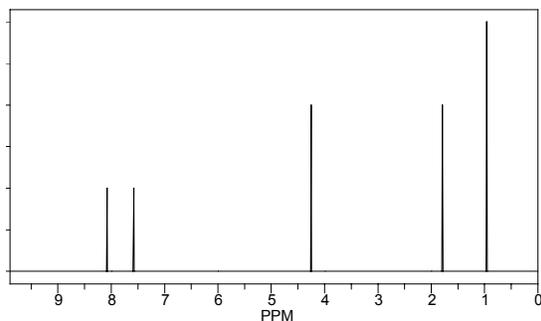
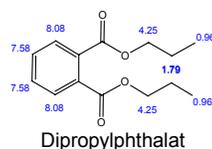


Abb. 9: NMR-Spektrum von Dipropylphthalat. Das Spektrum wurde mittels Computer-Programm (ChemDraw Ultra 6.0) gezeichnet, um den Vergleich darzustellen.

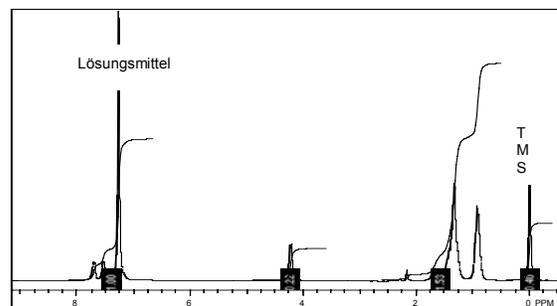


Abb. 10: NMR-Spektrum der Verunreinigung. Die Verunreinigung wurde in einer Fraktion aufgefangen und davon wurde ein NMR-Spektrum gemacht. Diese Aufnahme zeigt wahrscheinlich noch Rückstände des Produkts oder eventuell noch andere Verunreinigungen, was die Peaks um 1 ppm vermuten lassen.

4.2. Methylierungen

4.2.1. Vorversuche

Verschiedene HPLC-Säulen, das heisst sowohl RP-Phasen (reversed-Phase) als auch Normal-Phasen (Silica) wurden getestet. Erst wurden mit einer dem Epibatidin strukturähnlichen Substanz, dem Pyrrolidin, einige Reaktionen durchgeführt. Es zeigte sich, dass diese Substanz nicht geeignet scheint, um die Methylierungsreaktion zu simulieren. Auch verschiedene Laufmittel wurden eingesetzt; Es wurde versucht, mit ein wenig Base die Trennung des methylierten vom unmethylierten Stoff zu optimieren, doch am geeignetsten stellte sich dann die Laufmittelzusammensetzung von Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 90:10 heraus.

Der Versuch wurde mit einem der am wenigsten aktiven Epibatidin-Derivaten, dem 4-PABH, wiederholt. Die verschiedenen eingesetzten Säulen ergaben alle keine zufriedenstellenden Resultate. Es wurde deshalb auf eine neue Normalphasen-Säule (HPLC, Nucleosil SP 250/10mm 50-7; 1041599, Macherey-Nagel) gewechselt. Die folgenden Methylierungsversuche wurden mit der selben Laufmittelzusammensetzung durchgeführt wie weiter oben erwähnt (Dichlormethan/Methanol (90:10 Volumenteile)).

4.2.2. Methylierungsreaktion mit (\pm)-Epibatidin

Der erste eigentliche Versuch der Methylierung wurde mit (\pm)-Epibatidin durchgeführt. Als Methylierungssubstanz diente Methyljodid. Die Ausbeute betrug ca. 50% und die Trennung des unmethylierten Edukts vom methylierten Produkt erwies sich noch nicht als optimal (Abb.11).

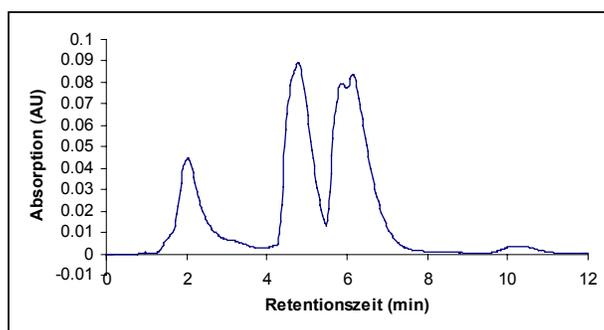


Abb. 11: Methyliertes Epibatidin erscheint bei einer Retentionszeit von 5 Minuten, das unmethylierte zeigt sich bei einer Retentionszeit von 6,5 Minuten.

Als zweiter Versuch diente als Methylierungssubstanz für das (\pm)-Epibatidin Methyl-Triflat. Der erste Ansatz wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, was aber zu einem Ertrag von weniger als 10% führte. Eine höhere Ausbeute (ca. 35%) erreichte man, indem die Reaktionstemperatur auf 80°C gesteigert wurde. Die höchste Ausbeute wurde erzielt, als man während der Reaktion ein wenig (0.5 Äquivalent) Methyl-Triflat und noch Base, zur pH-Stabilisierung des Reaktionsgemisches, hinzufügte. Wie die folgenden Abbildungen zeigen ist auch die Trennung von Edukt und Produkt sehr gut. Das unmethylierte Edukt hatte eine Retentionszeit von 13 Minuten, das methylierte Produkt hingegen eine von nur 6 Minuten.

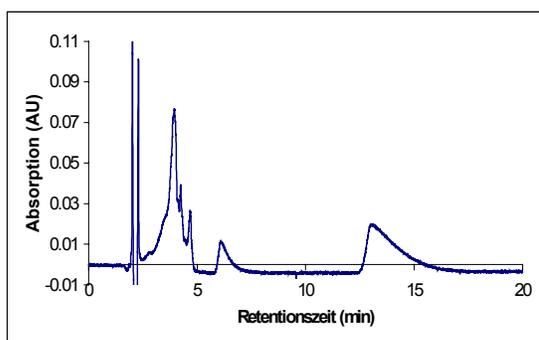


Abb. 12: Verfolgung der Methylierungsreaktion von (\pm)-Epibatidin nach 1 Minute Reaktionszeit. Das (\pm)-Epibatidin hat eine Retentionszeit von 13 Minuten, das methylierte Produkt hat eine Retentionszeit von 6 Minuten.

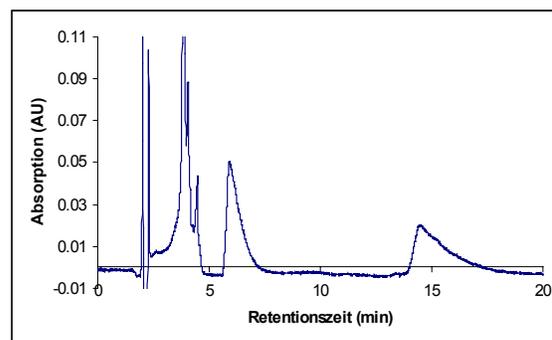


Abb. 13: Methylierungsreaktion von (\pm)-Epibatidin nach 5 Minuten Reaktionszeit. Der Anteil des methylierten Produktes ist schon sehr deutlich bei einer Retentionszeit von 6 Minuten sichtbar. Ebenfalls lässt sich eine deutliche Abnahme des unmethylierten Eduktes verfolgen.

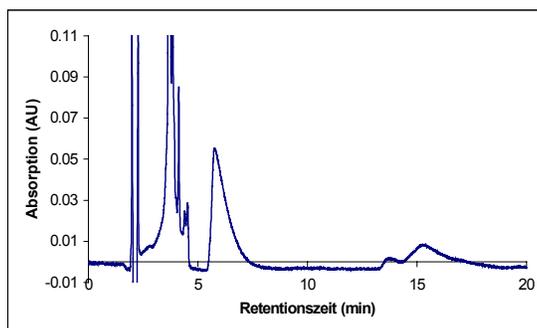


Abb. 14: Methylierungsreaktion von (\pm)-Epibatidin nach 10 Minuten Reaktionszeit. In dieser Grafik sieht man deutlich den Anstieg des methylierten Produktes bei einer Retentionszeit von 6 Minuten. Ebenso zeigt sich die Abnahme des unmethylierten Eduktes sehr gut.

4.3. Konzentrationsbestimmung des (+)- und (-)-DCIEPB mittels HPLC

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Lösung unbekannter Konzentration mit den beiden Enantiomeren des DCIEPB je dreimal zusammen mit der Lösung bekannter Konzentration (10^{-2} M) von (\pm)-Epibatidin ins HPLC-Gerät eingespritzt. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert ($c_{(-)\text{-DCIEPB}} = 2.13 \cdot 10^{-3}$ M; $c_{(+)\text{-DCIEPB}} = 4.5 \cdot 10^{-4}$ M) gebildet.

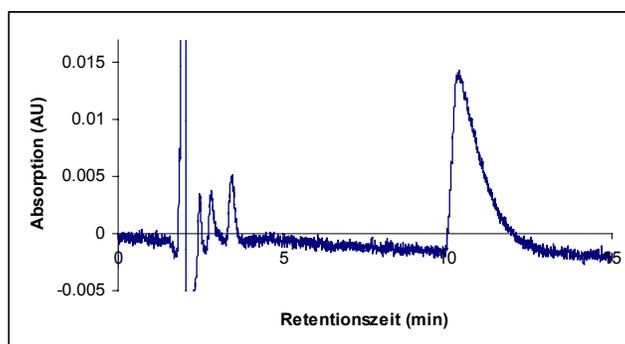


Abb. 15: Die Vergleichsubstanz (\pm)-Epibatidin hat eine Retentionszeit von 11 Minuten, das Dechloroepibatidin erscheint bei ca. 3,5 Minuten. Die Integration der Flächen erfolgte via Computerprogramm, so dass man die Flächen der Peaks direkt miteinander vergleichen konnte.

4.4. Verdrängungsstudien

Ziel der Verdrängungsstudie war es, die Affinität von (\pm)-Epibatidin sowie von vier Derivaten des Epibatidins, nämlich die Enantiomere des (\pm)-2PABH und des (\pm)-DCIEPB, an $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptoren zu bestimmen. Diese Werte wurden durch mehrmaliges Ansetzen der Bindungsstudien erhalten. Ebenfalls wurde von jeweils drei unabhängigen Werten der Mittelwert sowie die (\pm)-Standardabweichung bestimmt. Die K_i - und IC_{50} -Werte wurden mit dem „single-site competitive model“ des Kell Biosoft® Programms berechnet.

Aus den erhaltenen Inhibitionskurven (Abb. 16) wurde für (\pm)-Epibatidin eine K_i -Wert von 53 ± 9 pM und für (-)-Epibatidin einen K_i -Wert von 73 ± 10 pM berechnet. Diese Werte sind mit den aus der Literatur [1, 2] bekannten Werten vergleichbar.

Für (-)-DCIEPB erhielt man einen IC_{50} -Wert 64 ± 4 pM ($K_i = 5,6 \pm 1,2$ pM) und für (+)-DCIEPB einen IC_{50} -Wert von 15 ± 3 pM (der K_i -Wert konnte nicht berechnet werden).

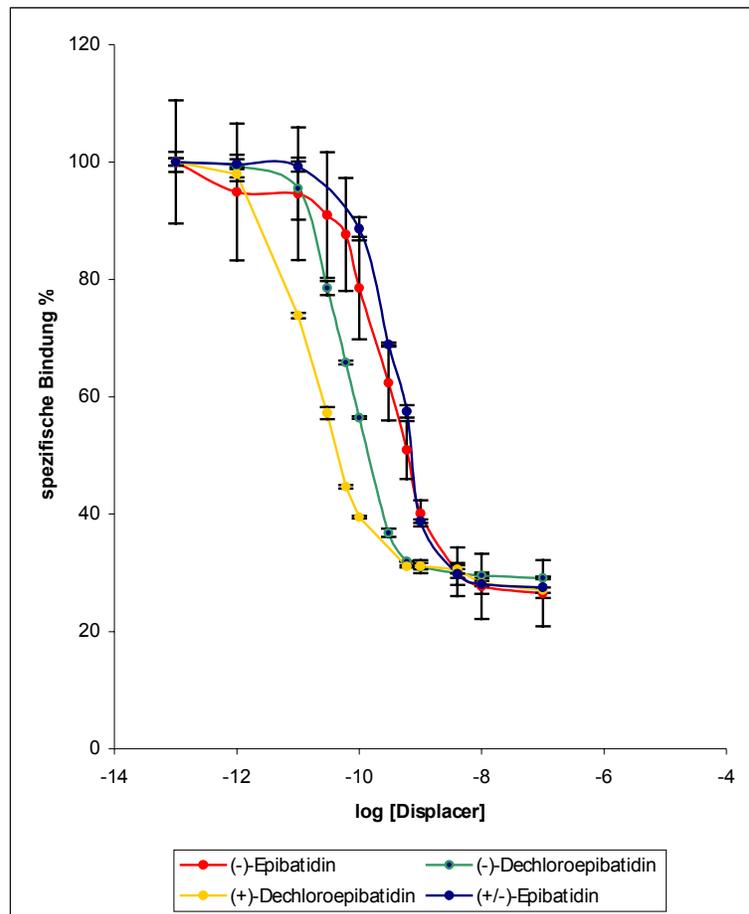


Abb.16: Inhibitionskurven von (\pm)-Epibatidin, (-)-Epibatidin, (+)-DCIEPB und (-)-DCIEPB aus den Konkurrenzexperimenten. Membranen aus Ganzhirnhomogenaten ($100\mu\text{g}/200\mu\text{l}$) wurden mit einer steigenden Konzentration von dem jeweiligen Displacer ((\pm) -Epibatidin, (-)-Epibatidin, (+)-DCIEPB, (-)-DCIEPB) und dem Radioliganden [^3H]-Cytisin (2 nM) inkubiert. Die Kurven stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen dar. Eingezeichnet sind dazu die jeweiligen Standardabweichungen.

Tabelle 1: K_i und IC_{50} -Werte von Epibatidin und einem seiner Derivate, dem DCIEPB

	K_i -Wert (gemessen) n = 3; (\pm)-Stabw	IC_{50} - Wert (gemessen)	K_i -Wert (Literatur [70])	IC_{50} - Wert (Literatur)
(\pm)-EPB	53 ± 9	---	49 ± 2	---
(-)-EPB	73 ± 10	---	70 ± 2	---
(-)-DCIEPB	$5,6 \pm 1,2$	64 ± 4	---	---
(+)-DCIEPB	---	15 ± 3	---	---

5. DISKUSSION

Epibatidin dient als pharmakologisches Werkzeug im Rahmen der Erforschung des Acetylcholinrezeptors mit all seinen verschiedenen bekannten und noch unbekanntem Subtypen.

Mit elektrophysiologischen Untersuchungen sowie mit Affinitätsstudien von verschiedenen Epibatidin-Derivaten möchte man anhand der ermittelten Inhibitions-konstanten (K_i) das Wissen über nAChR und ihre Subtypen erweitern. Mit der Methode der Elektrophysiologie untersuchte man in früheren Arbeiten bereits verschiedene Epibatidin-Derivate. In dieser Arbeit wurden nun nach einer Reinigung der Epibatidin-Analoga noch die *in vitro* Bindungseigenschaften dieser Substanzen in Verdrängungsstudien untersucht.

Reinigung

Nach der semipräparativen Dünnschichtchromatographie wurde auf der DC-Platte ein zweiter, zunächst unbekannter Spot identifiziert. Die Untersuchungen mittels NMR-Spektrometrie und Dünnschichtchromatographie zeigten, dass es sich bei diesem Punkt tatsächlich um eine Verunreinigung handelte. Die Peaks um 1 ppm lassen vermuten, dass einerseits vom tatsächlichen Produkt noch etwas in dieser Fraktion vorhanden gewesen sein könnte. Andererseits wäre auch eine Variation der Alkylkette im Dipropylphthalat denkbar, die zu diesen zusätzlichen Peaks führen könnte. Um diese Fehler zu vermeiden, sollte man alle benötigten Lösungsmittel vor Gebrauch destillieren.

Methylierung

Die Methylierung von Epibatidin mit Methyljodid ergab eine Ausbeute von ca. 50%. Es wurde aber ein deutlich höherer Ertrag angestrebt, deshalb versuchte man, diese Methylierungen mit einer anderen Substanz, dem Methyl-Triflat, die bessere Resultate ergeben sollte, durchzuführen. Diese Annahme wurde durch die erhaltenen Ergebnisse der Reaktion mit Methyl-Triflat bestätigt, da die Ausbeute um bis zu 30% gesteigert werden konnte. Das heisst, insgesamt darf man, wenn man Methyl-Triflat als Methylierungssubstanz einsetzt, eine Ausbeute von 80% erwarten. Allerdings erreicht man diese 80% erst nach einer Zugabe von 0.5 Äquivalent Überschuss Methyl-Triflat nach einigen Minuten Reaktionszeit. Ebenfalls als wichtig hat

sich erwiesen, dass man zum Reaktionsgemisch Base zugibt, um die pH-Stabilisierung zu gewährleisten, da die Substanz als Hydrochlorid-Salz vorliegt.

Konzentrationsbestimmung

Da weder das (+)- noch das (-)-DCIEPB als Feststoff vorlagen, sondern in Lösung, mussten für die Bindungsstudien vorerst die Konzentrationen der vorhandenen Lösungen bestimmt werden, so dass man die benötigten Verdünnungsreihen herstellen konnte. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels HPLC. Es wurde die unbekannte Lösung mit einer Lösung bekannter Konzentration zusammen eingespritzt, so dass man mit Hilfe des Integrationsprogramms die Flächen unter den Kurven direkt vergleichen und so auf die Konzentration schließen konnte. Die Konzentrationsbestimmungen des (+)- und (-)-DCIEPB sollten wiederholt werden, denn die Einspritzung im HPLC-Gerät wurde nur mit einem Ansatz, jedoch mit drei Messungen, durchgeführt, weil sehr wenig Substanz zur Verfügung stand.

Abweichungen bei Konzentrationsbestimmungen mittels HPLC rühren eventuell daher, dass die Methode sehr empfindlich reagiert. Eine Fehlerquelle könnte auch sein, dass im HPLC-Verfahren mit Normal-Phasen-Säulen mit organischen Lösungsmitteln (Methanol) gearbeitet wird, für die Bindungsstudien jedoch wässrige Lösungen benötigt werden. Um noch genauere Resultate zu bekommen gäbe es die Möglichkeit, anstatt dem DAD-Detektor am HPLC-Gerät einen UV-Spektrophotometer zu benutzen, der bis um eine Zehnerpotenz genauere Resultate liefern könnte.

Affinität

Der $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp des nAChR ist mit 90% der am häufigste vorkommende Subtyp im Rattengehirn. Aus den Resultaten der Bindungsstudien mit [^3H]-Cytisin ist ersichtlich, dass die untersuchten Substanzen eine hohe Affinität für diesen Subtyp besitzen. Die in den Bindungsstudien erhaltenen Werte für die Inhibitionskonstanten von (\pm)-Epibatidin ($K_i = 53 \pm 9 \text{ pM}$) und (-)-Epibatidin ($K_i = 73 \pm 10 \text{ pM}$) sind vergleichbar mit den in der Literatur aufgeführten Werten ($K_{i(\pm)\text{-EPB}} = 49 \pm 2 \text{ pM}$; $K_{i(-)\text{-EPB}} = 70 \pm 2 \text{ pM}$). Anhand dieser zwei Werte lässt sich nun auf den Wert des (+)-Epibatidins schließen. Dieses ist laut Literatur [27] affiner als das (-)-Epibatidin, was dieses Ergebnis bestätigt. Die Werte stimmen auch mit den Ergebnissen aus elektrophysiologischen Untersuchungen überein. Für die beiden Enantiomere des DCIEPB wurden jeweils die IC_{50} -Werte berechnet, da das Kell-Programm aus einem nicht geklärten Grund den K_i -Wert für das (+)-DCIEPB nicht berechnen konnte. Das Verhältnis (Fak-

tor 4) der beiden erhaltenen IC_{50} -Werte ist vergleichbar mit dem Verhältnis der K_i -Werte für die beiden Enantiomere des Epibatidins. Für das (-)-DCIEPB erhielt man eine IC_{50} -Wert von 64 ± 4 pM und für das (+)-DCIEPB einen Wert von 15 ± 3 pM. Für (-)-DCIEPB konnte das Programm einen K_i -Wert von $5,6 \pm 1,2$ pM berechnen. Das Resultat zeigte, dass die DCIEPB-Enantiomere beide affiner sind als Epibatidin. Es zeigt sich auch, dass das (+)-Enantiomer affiner ist als das (-)-Enantiomer. Ergebnisse aus elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigen diese Resultate, indem sie aussagen, dass das (+)-Enantiomer aktiver ist als das (-)-Enantiomer [25].

Die Anwesenheit des Chloratoms erniedrigt die Elektronendichte am Stickstoffatom des 6-Rings der DCIEPB-Struktur. Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen Elektronendichte am Stickstoff und der Affinität zum Rezeptor: Je geringer die Elektronendichte, desto weniger affin ist die Substanz.

Membranpräparationen

Da im Herstellungsverfahren der Hirnhomogenate Parameter (verschiedene Rattenarten, Pufferzusammensetzung, Temperatur, unterschiedliche Zentrifugeräte, verschiedene Homogenisierungs-Verfahren der Rattenhirne) zum Teil abweichen, sollte man verschiedene Membranpräparationen verwenden. So wird gewährleistet, dass sich eventuelle Variationen herausmitteln lassen und ein Datenvergleich dadurch zuverlässiger wird. Eine andere Möglichkeit den Assay zu validieren wäre, dass man eine Kontrollstandard, deren Werte bereits bekannt sind, zusammen mit den zu bestimmenden Substanzen verwendet.

Ausblick

In naher Zukunft ist die Durchführung der *in vitro* Bindungsstudien der anderen Epibatidin-Derivaten, d.h. (+)-2PABH und (-)-2PABH, wie auch von allen methylierten Substanzen vorgesehen.

Diese Arbeit diente dazu, die weitere Daten der Epibatidin-Derivate zu gewinnen und das Wissen über nAChR und seinen Subtypen zu erweitern. Mit diesen K_i -Werten könnte eventuell auch an eine Weiterführung der Untersuchungen in der Strukturfindung neuer Analoga mittels Molecular Modeling gedacht werden. Falls die kinetischen Bindungseigenschaften stimmen, kann man radioaktiv markierte Substanzen dieser Art als PET-Diagnostikum verwenden. Es wird auch spekuliert, dass der analgetische Effekt des Epibatidins und dessen Analoga über bestimmte, noch unbekannte Subtypen des Rezeptors vermittelt wird. In Zukunft wird versucht, auch

diese Rezeptortypen zu identifizieren dann mittels den Erkenntnissen weitere Forschungen, vielleicht bei der Suche nach neuen selektiven Agonisten für diese noch unbekannte Subtypen, zu betreiben. Eventuell ergibt sich die Möglichkeit, ein neues, rasch wirksames Analgetikum zu entwickeln.

6. ABKÜRZUNGEN

Ach	Acetylcholin
BSA	Rinderserumalbumin
Bq	Becquerel
BSS-Puffer	spezielle salzhaltige Pufferlösung mit pH 7.4 (50 mM Tris/Cl pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCIEPB	Dechloroepibatidin, <i>exo</i> -2-(3-Pyridyl)-7- azabicyclo[2.2.1]heptan
DAD	Diode Array Detector
dpm	Zerfälle pro Minute (disintegration per minute)
EPB	Epibatidin
F	freie Ligandkonzentration
HPLC	High performance liquid chromatography
IC ₅₀	Kompetitor-Konzentration, bei der die maximale spezifi- sche Bindung auf 50% reduziert ist
K _D	Dissoziationskonstante
K _i	Inhibitionskonstante
nAChR	nicotinischer Acetylcholinrezeptor
2PABH	<i>exo</i> -2-(2-Pyridyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptan
4PABH	<i>exo</i> -2-(4-Pyridyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptan
PEI	Polyethylenimin, 50% in Wasser
PET	Positron-Emissions-Tomographie
rpm	rounds per minute
RP-Säule	Reversed-Phase-Säule
Stabw	Standardabweichung
Triflat	Trifluormethansulfonsäuremethylester (C ₂ H ₃ F ₃ O ₃ S)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan

7. LITERATUR

- [1] **Badio B., Daly J.W.**, *Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist*, 1994, Mol. Pharmacology, 45, 563-569
- [2] **Badio B.**, Garaffo H.M., Spande T.F., Daly J.W., 1994, *Epibatidin: Discovery and definition as a potent analgesic and nicotinic agonist*, Medicinal chemistry research 4, 440-448, Birkhäuser Boston
- [3] **Bannon A. W.**, Decker M. W., Holladay M. W., Curzon P., Donnelly-Roberts D., Puttfarcken P. S., Bitner R. S., Diaz A., Dickenson A. H., Porsolt R. D., Williams M. Arneric S. P., 1998, *Broad - Spectrum, Non - opioid analgesic activity by selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholin receptors*, Science 279
- [4] **Bertrand D.**, Ballivet M., Rungger D., 1990, *Activation and blocking of neuronal nicotinic acetylcholine receptor reconstituted in Xenopus oocytes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1993-1997
- [5] **Bertrand D.**, Buisson B., Krause R. M. Hu H.Y., Bertrand S., 1997, *Electrophysiology: a method to investigate the functional properties of ligand – gated channels*, Journal of receptor and signal trans???
- [6] **Bertrand D. und Changeux J.-P.**, 1995, *Nicotinic receptor: an allosteric protein specialized for intercellular communication*, The Neurosciences, Vol 7, 75-90
- [7] **Bertrand S.**, Patt J. T., Spang J. E., Westera G., Schubiger P. A., Bertrand D., 1999, *Neuronal nAChR stereoselectivity to non-natural epibatidin derivatives*, FEBS 21938 Letters 450, 283-279
- [8] **Bonhaus D. W.**, Bley K. R., Broka C. A., Fontana D. J., Leung E., Lewis R., Shieh . Wong E. H. F., 1995, *Characterization of the electrophysiological, biochemical and behavioral actions of Epibatidine*, The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics 272, 1199-1203

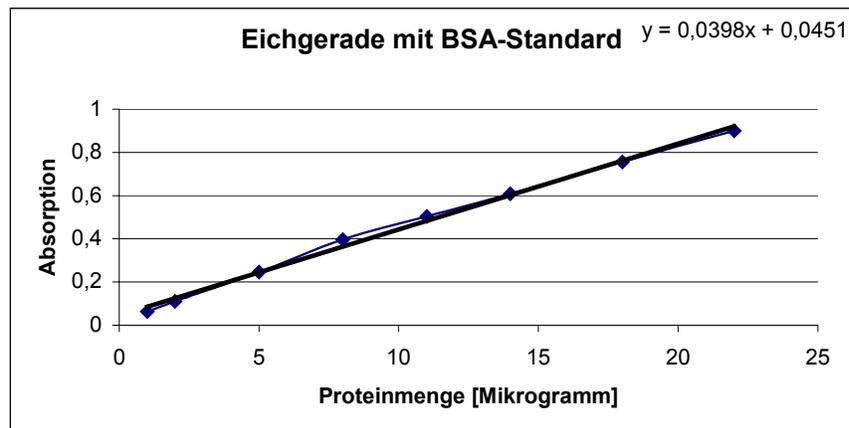
-
- [9] **Buisson B. und Bertrand D.**, 1998, *Allosteric modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors*, Journal of Physiology (Paris) 92, 89-100
- [10] **Bylund D. B.**, Yamamura H. I., 1990, *Methods for Receptor Binding*, Raven Press, Ltd., New York
- [11] **Changeux J-P.**, Bertrand D., Corringer P-J., Dehaene S. Edelstein S., Lena C., Le Novère N., Marubio L., Picciotto M., Zoli M., 1998, *Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement*, Brain Research Reviews 26, 198-216
- [12] **Curtis L.**, Chiodini F., Spng J.E., Bertrand S., Patt J.T., Westera G., Bertrand D., 2000, *A new look t the neuronal nicotinic acetylcholine receptor pharmacophore*, European Journal of Pharmacology 393, 155-163
- [13] **Dehmlow E. V.**, 1995, *Synthesewettlauf zum Epibatidin, einem neuartigen Naturstoff mit hoher analgetischer Wirkung*, Journal für praktische Chemie 337, 167-174
- [14] **Hecker T.**, Nieber K., 1999, *Epibatidin, ein altes Wirkprinzip wird neu entdeckt*, MMP 8, 226-231
- [15] **Horti A. G.**, Scheffel U., Kimes A. S., Musachio J. L., Ravert H. T., Mathews W. B., Zhan Y., Finley P. A., London E. D., Dannals R. F., 1998, *Synthesis and Evaluation of N-[¹⁴C]methylated analogues of Epibatidine as tracers for positron emission tomographic studies of nicotinic acetylcholine receptors*, Journal of Medical Chemistry 41, 4199-4206
- [16] **Houghtling R. A.**, Davila-Garcia M. I., Hurt S. D., Kellar K. J., 1994, *[³H]-Epibatidine binding to nicotinic cholinergic receptors in brain*, Medical Chemistry. Research, . 4, 538-546

- [17] **Kassiou M.**, Ravert H. T., Mathews W. B., Musachio J. I., London E. D., Danals R. F., 1997, *Synthesis of 3-[(1-[¹¹C]Methyl-2(S)-pyrrolidinyl) methoxy] pyridine and 3-[(1-[¹¹C]Methyl-2(R)-pyrrolidinyl) methoxy] pyridine: Radioligands for In Vivo studies of neuronal nicotinic avetylcholine receptors*, Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 29
- [18] **Lindström J.M.**, 1995, *Nicotinic acetylcholine receptors*, CRC Press, Inc.
- [19] **Marks R. J.**, Smith K. W., Collins A. C., 1997, *Differential Agonist Inhibition Identifies Multiple Epibatidine Binding Sites in Mouse Brain*, Journal of pharmacology and experimental therapeutics, Vol. 285, Nr. 1, 377-386
- [20] **Müller C. E.**, 1996, *Epibatidin, ein nicotinartiges, analgetisch wirksames Alkaloid aus Pfeilgiftfröschen*, Pharmazie in unserer Zeit Jg. 25 Nr. 2, 85-92
- [21] **Pabreza L. A.**, Dhawan S., Kellar K. J., 1990, *[³H]-Cytisine binding to nicotinic cholinergic receptors in brain*, Molecular Pharmacology 39, 9-12
- [22] **Perry D. C.**, Kellar K. J., 1995, *[³H]-Epibatidine labels nicotinic receptors in rat brain: an autoradiographic study*, The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics 275, 1030-1034
- [23] **Qian C.**, Li T., Shen T. Y., Libertine-Garahan L., Eckman J., Biftu T., Ip S., 1993, *Epibatidine is a nicotinic analgesic*, European Journal of Pharmacology, 250 R13-R14
- [24] **Spang J.E.**, 1999, *Structural Variations of Epibatidin led to new ligand for studying the neuronal nAChRs via PET and Electrophysiology*, Diss. ETH, No. 13286

-
- [25] **Spang J.E.**, Bertrand S., Westera G., Patt J.T., Schubiger P.A., Bertrand D., 2000, *Chemical modification of Epibatidine causes a switch from agonist to antagonist and modifies its selectivity for neuronal nicotinic acetylcholine receptors*, research paper, Elsevier Science Ltd.
- [26] **Sullivan J. P.**, Decker M. W., Brioni J. D., Donnelly-Roberts D., Anderson D. J., Bannon A. W., Kang C., Adams P., Piattoni-Kaplan M., Buckley M. J., Gopalkrishnan M., Williams M., Arneric S. P., 1994, (+/-) - *Epibatidine elicits a diversity of in vitro and in vivo effects mediated by nicotinic acetylcholine receptors*, J. Pharmacology and Experimental therapeutics, 271, 624-631
- [27] **Sullivan J.P.**, Donnelly-Roberts D., Briggs C.A., 1996, *A-8530[3-(2(S)-Azetidinylmethoxy)Pyridine]: In vitro pharmacological properties of novel, high affinity $\alpha_4\beta_2$ nicotinic receptor ligand*, Neuropharmacology Vol. 35., No. 6, 725-734
- [28] **Yamamura H. I. und Bylund D. B.**, 1990, *Methods for Receptor Binding*, Raven Press. Ltd., New York

8. ANHANG

Eichgerade zur Proteinbestimmung nach Bradford mit dem Biorad Microassay.
Die Eichgerade wurde mit einem BSA-Standard in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.



Proteinmenge [μg]	Absorption bei 595nm
1	0.0623
2	0.1105
5	0.246
8	0.397
11	0.504
14	0.609
18	0.756
22	0.901

Danke

HERZLICH BEDANKE ICH MICH BEI

Herrn Prof. P. August Schubiger für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit im interessanten Fachbereich der Radiopharmazie durchführen zu können

Dr. G. Westera für die Betreuung und die herzliche Aufnahme in seine Gruppe

William Bisson für die gute Betreuung im Labor und Hilfsbereitschaft in allen Bereichen

Dr. M. Honer für die Einführung in das Gebiet der Bindungsstudien, die Unterstützung und Korrekturen bei der Arbeit.

Dr. Linjing Mu für die Unterstützung bei der Auswertung von NMR-Spektren und Tipps im Labor

Eva Geissler für den Informationsaustausch während der ganzen Zeit.

Marko Kokic für die Hilfsbereitschaft und nützlichen Informationen

Der ganzen Gruppe am Unispital für die herzliche und kollegiale Aufnahme ins Team, die mir eine gute und kurzweilige Zeit ermöglichten.