



Master Thesis

## Plasmaproteinbindung der mGluR<sub>5</sub>-Liganden <sup>3</sup>H-M-MPEP und <sup>11</sup>C-M-FPEP

**Author(s):**

Santin, Mauro

**Publication Date:**

2002

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004428361> →

**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](#).



Eidgenössische Technische Hochschule Zürich  
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Departement  
Angewandte Biowissenschaften

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften

**Plasmaproteinbindung der  
mGluR<sub>5</sub>-Liganden  
[<sup>3</sup>H]-M-MPEP und [<sup>11</sup>C]-M-FPEP**

Diplomarbeit

von

**Mauro Santin**  
Bürger von Maserada sul Piave (TV), Italien

Leiter: Prof. Dr. P. August Schubiger

Betreuer: PD Dr. Simon M. Ametamey  
Betreuer: Dr. Michael Honer

4. März bis 26. Juli 2002

## **INHALTSVERZEICHNIS**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2. EINLEITUNG</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1 Glutamat-Rezeptoren   | 4         |
| 2.2 Der metabotrope Glutamat-Rezeptor 5 (mGluR <sub>5</sub> )                   | 5         |
| 2.3 <i>In vitro</i> , <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> Experimente mit M-MPEP  | 6         |
| 2.4 Plasmaproteinbindung von Pharmaka   | 7         |
| 2.5 Ziel der Arbeit   | 9         |
| <b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>   | <b>10</b> |
| 3.1 Methodvalidierung   | 10        |
| 3.1.1 Validierung mit [ <sup>3</sup> H]-M-MPEP                                  | 10        |
| 3.1.2 Filtervorsättigung  | 11        |
| 3.1.3 Validierung mit [ <sup>18</sup> F]-Fallypride und [ <sup>3</sup> H]-MK801 | 11        |
| 3.2 Plasmaproteinbindung von [ <sup>3</sup> H]-M-MPEP                           | 12        |
| 3.3 Plasmaproteinbindung von [ <sup>11</sup> C]-M-FPEP                          | 13        |
| <b>4. RESULTATE</b>   | <b>14</b> |
| 4.1 Methodvalidierung   | 14        |
| 4.1.1 Validierung mit [ <sup>3</sup> H]-M-MPEP                                  | 14        |
| 4.1.2 Filtervorsättigung  | 15        |
| 4.1.3 Validierung mit [ <sup>18</sup> F]-Fallypride und [ <sup>3</sup> H]-MK801 | 16        |
| 4.2 Plasmaproteinbindung von [ <sup>3</sup> H]-M-MPEP                           | 17        |
| 4.3 Plasmaproteinbindung von [ <sup>11</sup> C]-M-FPEP                          | 19        |
| <b>5. DISKUSSION</b>  | <b>21</b> |
| <b>6. ABKÜRZUNGEN</b>   | <b>24</b> |
| <b>7. LITERATUR</b>   | <b>25</b> |

## **1. Zusammenfassung**

M-MPEP ist ein hochaffiner und selektiver Antagonist für den Subtyp 5 des metabotropen Glutamat-Rezeptors (mGluR<sub>5</sub>). Biodistributions- und PET-Studien *in vivo* konnten jedoch die spezifische Bindung von [<sup>11</sup>C]-M-MPEP, die in *in vitro* und *ex vivo* Experimenten bestimmt worden war, nicht bestätigen. Unerwarteterweise wurde sogar eine deutliche Erhöhung der Aktivitätskonzentration im Hirn unter Blockadebedingungen gemessen. Die Verdrängung des Radioliganden aus der Plasmaproteinbindung durch den Blocker und eine daraus resultierende Erhöhung der Konzentration an freiem Radioliganden könnte eine Ursache für die widersprüchlichen Beobachtungen sein. Diese Hypothese wurde mit *in vitro* Plasmaproteinbindungsexperimenten von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP näher analysiert.

Zunächst wurde für die Untersuchung der Plasmaproteinbindung der radioaktiven MPEP-Derivate die Ultrafiltration gewählt, um gebundenen von freiem Radioliganden abzutrennen. In Vorexperimenten wurden Parameter wie Filtervorsättigung, Inkubationstemperatur, Inkubationszeit, Zentrifugationsdauer und Anzahl Waschzyklen bestimmt und optimiert. Die nicht-spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP an den Filter war mit 42% unerwartet hoch und konnte auch durch verschiedene Passivierungsprotokolle nicht signifikant reduziert werden. Da keine Alternativen für diese Methode und diese Filter zur Verfügung standen, wurde für die folgenden Plasmaproteinbindungsstudien ein Korrekturfaktor verwendet, welcher die nicht-spezifische Retention des ungebundenen Radioliganden berücksichtigte. Im Blutplasma wurde für [<sup>3</sup>H]-M-MPEP eine hohe Proteinbindung von 85.9% gemessen. Die Verdrängung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP aus dieser Bindung durch den kalten Liganden fiel jedoch relativ gering aus. Trotz einer sehr hohen Blockerkonzentration stieg der freie Anteil des Radioliganden von 14.1% ohne Blocker auf maximal 20.9%. Die nicht-spezifische Filter-Bindung eines weiteren MPEP-Derivats, [<sup>11</sup>C]-M-FPEP, war etwas weniger stark ausgeprägt (ca. 24%), die Plasmaproteinbindung lag aber in einem ähnlichen Bereich wie bei [<sup>3</sup>H]-M-MPEP (ca. 90%).

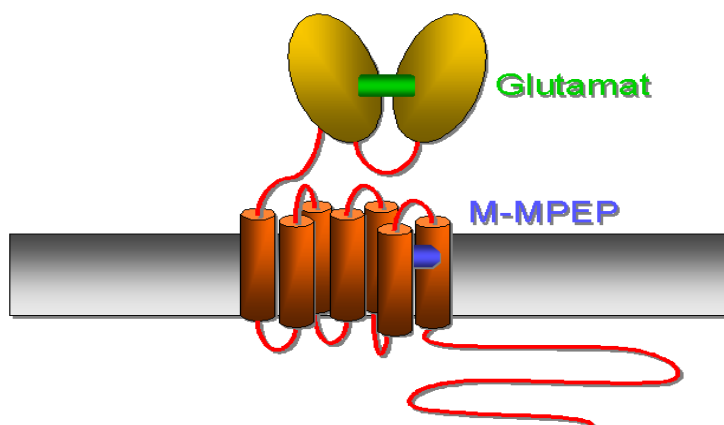
Somit zeigten beide mGluR<sub>5</sub>-Radioliganden eine starke Bindung einerseits ans Filtermaterial, andererseits an Plasmaproteine. Die unspezifische Bindung am Filtermaterial scheint aber nicht in Zusammenhang mit der Plasmaproteinbindung zu stehen. Die Hypothese, dass eine Verdrängung der Plasmaproteinbindung durch den Blocker der alleinige Grund für die paradoxen *in vivo* Werte wäre, konnte aufgrund der geringen Zunahme an freiem [<sup>3</sup>H]-M-MPEP unter Blockadebedingungen nicht bestätigt werden. Wahrscheinlich sind noch andere Mechanismen für dieses Phänomen verantwortlich.

## 2. Einleitung

### 2.1 Glutamat-Rezeptoren

Die Aminosäure L-Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem der Säuger, wo sie für den erregenden Input von rund 40 bis 50% aller Synapsen zuständig ist (Pin and Duvoisin, 1995). L-Glutamat spielt eine Rolle bei der Vermittlung von Sinneswahrnehmungen, bei der Regulation der Motorik sowie bei der Entstehung des Gedächtnisses und beim Lernprozess (Lu et al., 1997; Pellicciari and Costantino, 1999). Glutamaterg sind viele kortikale Projektionen zum Hippocampus, zum Thalamus und zu den Basalganglien. Fehlfunktionen des glutamatergen Systems scheinen an der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen wie Epilepsie und Psychosen (Depression, Schizophrenie und Angstzustände) beteiligt zu sein. Die übermässige neuronale Stimulation durch Glutamat kann auch für die Degeneration von Neuronen verantwortlich sein, die bei der Parkinson-, Alzheimer- und Huntington-Krankheit sowie nach Ischämie beobachtet wird (Pellicciari and Costantino, 1999; Pin and Duvoisin, 1995).

Bei den Glutamat-Rezeptoren unterscheidet man ionotrope und metabotrope Rezeptoren (Monaghan et al., 1989; Nakanishi, 1992; Pin and Duvoisin, 1995; Sommer and Seeburg, 1992). Die ionotropen Rezeptoren, die man nach ihren selektiv bindenden, synthetischen Agonisten in N-Methyl-Aspartat- (NMDA),  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat- (AMPA) und Kainat-Rezeptoren unterteilt, sind ligandgesteuerte Ionenkanäle (Bettler and Mülle, 1995; Hollmann and Heinemann, 1994; Mori and Mishina, 1995).



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung eines metabotropen Glutamat-Rezeptors. Die extrazelluläre Domäne beinhaltet die Glutamatbindungsstelle. Nicht-kompetitive mGluR<sub>5</sub>-Antagonisten wie M-MPEP binden in der transmembranären Domäne (7TM).

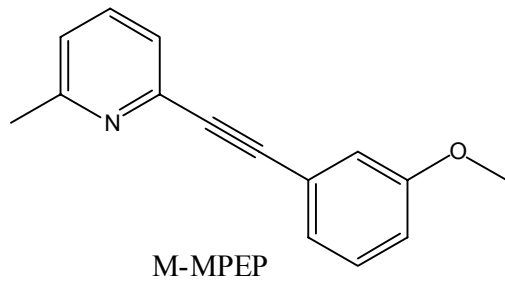
Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR) gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Wie alle GPCRs besitzen auch mGluRs sieben transmembranäre Domänen (7TM). Sie sind ausserdem durch eine grosse extrazelluläre, N-terminale Domäne charakterisiert, welche die Bindungsstelle für Glutamat bildet (Abb. 2.1) (Knopfel et al., 1995).

## 2.2 Der metabotrope Glutamat-Rezeptor 5 (mGluR<sub>5</sub>)

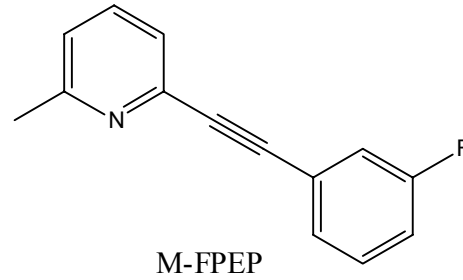
Bis heute sind acht Subtypen des metabotropen Glutamat-Rezeptors bekannt (mGluR<sub>1-8</sub>), die gemäss ihrer Sequenzhomologien, second-messenger-Kopplung und Pharmakologie in drei Gruppen unterteilt werden: Während die Gruppe I (mGluR<sub>1</sub> und mGluR<sub>5</sub>) an die Phospholipase C positiv gekoppelt ist und eine grosse Breite von Ionenkanälen moduliert, inhibieren die Gruppen II (mGluR<sub>2</sub> und mGluR<sub>3</sub>) und III (mGluR<sub>4</sub>, mGluR<sub>6-8</sub>) nach ihrer Aktivierung die Adenylatzyklase.

Die mGluRs werden überall im Zentralnervensystem exprimiert. Die beiden Subtypen der Gruppe I findet man jedoch in unterschiedlichen Hirnregionen angereichert. mGluR<sub>1</sub> ist vor allem im Kleinhirn, Bulbus olfactorius, Hippocampus, Thalamus, Globus pallidus und in der Substantia nigra exprimiert (Petralia et al., 1997; Shigemoto et al., 1992). mGluR<sub>5</sub> zeigt im Striatum sowie in der Hirnrinde eine erhöhte Expression und besitzt im Kleinhirn dagegen nur eine geringe Konzentration (Romano et al., 1995; Varney et al., 1999). Verschiedene nicht-kompetitive Antagonisten des mGluR<sub>1</sub> und mGluR<sub>5</sub> zeigten neuroprotektive und antikonvulsive Eigenschaften (Bruno et al., 2000; Knopfel et al., 1995; Nicoletti et al., 1999). Folglich scheint die Hyperaktivität der mGluR-Gruppe I mit Krankheiten wie zerebraler Ischämie und Epilepsie sowie mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen im Zusammenhang zu stehen. Zudem soll mGluR<sub>5</sub> an der Übertragung von Schmerzsignalen im Rückenmark beteiligt sein und stellt dadurch ein potentielles Target für die Behandlung von Schmerzen dar (Neugebauer et al., 1994; Walker et al., 2001; Young et al., 1994).

Bisher sind erst wenige Liganden charakterisiert, die selektiv an einen Subtyp der mGluRs binden. Aus dem ersten potenten und selektiven mGluR<sub>5</sub>-Antagonisten, dem MPEP [6-Methyl-2-(phenylethyl) pyridin], wurde das noch stärker bindende M-MPEP (Abb. 2.2) [2-Methyl-6-((3-methoxyphenyl) ethynyl) pyridin] und später das M-FPEP (Abb. 2.3) [2-Methyl-6-((3-fluorphenyl) ethynyl) pyridin] derivatisiert (Gasparini et al., 2002; Gasparini et al., 1999). Es handelt sich hierbei um nicht-kompetitive Inhibitoren, die nicht wie Glutamat an der extrazellulären Domäne binden, sondern eine Bindungsstelle in der transmembranären Domäne besitzen (Abb. 2.1) (Pagano et al., 2000). Beide Verbindungen sollten für eine Charakterisierung von mGluR<sub>5</sub> mit Kohlenstoff-11 markiert werden. Mit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bietet sich eine nicht-invasive Technologie an, um den Rezeptor unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen mit Hilfe von [<sup>11</sup>C]-M-MPEP und [<sup>11</sup>C]-M-FPEP *in vivo* zu visualisieren. Ein PET-Ligand für den mGluR<sub>5</sub> könnte zum Beispiel zur Bestimmung der Rezeptordichte und -funktion bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen eingesetzt werden.



**Abbildung 2.2:** Strukturformel von M-MPEP

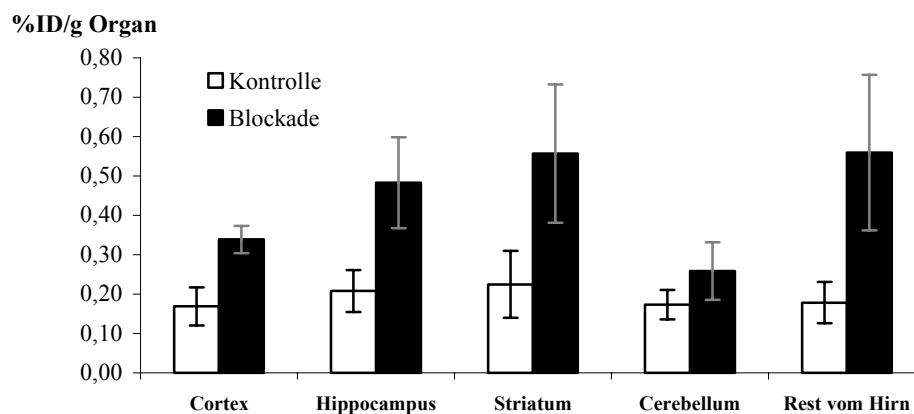


**Abbildung 2.3:** Strukturformel von M-FPEP

### 2.3 In vitro, ex vivo und in vivo Experimente mit M-MPEP

M-MPEP entstand in einem Optimierungsprogramm aus dem selektiven und hochaffinen mGluR<sub>5</sub>-Antagonisten MPEP, welcher eine antinozizeptive, neuroprotektive und anti-convulsive Wirkung besitzt (Bruno et al., 2000; Knopfel et al., 1995; Walker et al., 2001). *In vitro* Bindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]-M-MPEP an humanen, rekombinanten mGluR<sub>5</sub> ergaben eine Dissoziationskonstante K<sub>D</sub> von 2nM, was im Vergleich zu MPEP eine ca. fünffach höhere Affinität darstellt (Gasparini et al., 2002). Der Radioligand zeichnete sich in diesem Filtrationsassay zudem durch einen geringen Anteil an nicht-spezifischer Bindung (<10%) aus.

In *ex vivo* Tests mit [<sup>3</sup>H]-M-MPEP in Ratten wurde total gebundene Aktivität (unter Kontrollbedingungen) und nicht-spezifische Bindung (unter Blockadebedingungen) in einem Filtrationsassay mit Cortex- und Cerebellum-Homogenaten miteinander verglichen (Kokic et al., 2002). Dabei ergab sich ein Anteil von 50% an spezifischer Bindung in Cortex-Homogenaten. Einen weiteren Hinweis auf eine spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP *ex vivo* zeigte sich beim Vergleich von cerebellaren und corticalen Homogenaten. In Übereinstimmung mit einer sehr niedrigen mGluR<sub>5</sub>-Expression im Cerebellum konnte im *ex vivo* Filtrationsassay keine spezifische Bindung im Cerebellum-Homogenat nachgewiesen werden.



**Abbildung 2.4:** *In vivo* Biodistributionsstudien von [<sup>11</sup>C]-M-MPEP in Rattenhirn unter Kontroll- und Blockadebedingungen (n=3). In verschiedenen Hirnregionen wurde die Radioaktivität gemessen und als prozentualer Anteil der total injizierten Dosis pro g Gewebemasse angegeben.

In den darauffolgenden *in vivo* Biodistributions- und PET-Studien konnte jedoch diese spezifische Bindung von [ $^{11}\text{C}$ ]-M-MPEP nicht bestätigt werden (Abb. 2.4). Unter Blockadebedingungen konnte im Vergleich zu Kontrollbedingungen keine Erniedrigung der Aktivitätskonzentration im Hirn nachgewiesen werden. Unerwarteterweise wurde sogar eine deutliche Erhöhung der Aktivitätskonzentration unter Blockadebedingungen gemessen. Auch der Vergleich der Aktivitätskonzentrationen in verschiedenen Hirnregionen wie Cortex und Cerebellum gab keine Hinweise auf eine spezifische Bindung von [ $^{11}\text{C}$ ]-M-MPEP *in vivo*. Der Unterschied in der Quantifizierung zwischen *in vivo* und *ex vivo* Studien besteht darin, dass bei den *in vivo* Studien auch der freie, nicht-gebundene Anteil an Radioligand gemessen wird, während in Bindungsstudien nur total gebundener und nicht-spezifisch gebundener Radioligand bestimmt werden.

Durch Metabolitenanalysen von Rattenhirnextrakten konnte ausgeschlossen werden, dass bei den *in vivo* Experimenten mit [ $^{11}\text{C}$ ]-M-MPEP die Bestimmung der Radioaktivitätskonzentration im Hirn durch die Bildung von radioaktiven Metaboliten verfälscht worden war.

Eine weitere Hypothese, um die paradoxen Werte in den *in vivo* Experimenten zu erklären, wäre eine Sättigung der metabolisierenden Enzyme unter Blockadebedingungen. Falls die hohe Blockerkonzentration die abbauenden Enzyme absättigt, würde [ $^{11}\text{C}$ ]-M-MPEP nicht oder zumindest langsamer eliminiert werden. Die daraus entstehende höhere Konzentration an freiem [ $^{11}\text{C}$ ]-M-MPEP könnte dann ins Hirn übertreten.

Eine ausgeprägte Plasmaproteinbindung des Radioliganden könnte eine andere Ursache für diese widersprüchlichen Beobachtungen bei den *ex vivo* und *in vivo* Experimenten sein. Durch Verdrängung des Radioliganden aus der Plasmaproteinbindung unter Blockadebedingungen würde eine grössere Menge freier Radioligand im Blut vorliegen. Dadurch könnte mehr [ $^{11}\text{C}$ ]-M-MPEP die Blut-Hirn-Schranke passieren und zu erhöhten Werten unter Blockadebedingungen führen.

## 2.4 Plasmaproteinbindung von Pharmaka

Nach einer i.v. Applikation befindet sich ein Pharmakon im Blut und wird mit diesem im gesamten Körper verteilt. Entsprechend den physikochemischen Eigenschaften und Affinitäten des Pharmakons kann es bei der Verteilung zur Anreicherung in bestimmten Geweben kommen. Ein wesentlicher Faktor für die Verteilung einer Substanz im Körper ist die Bindung an Proteine. Damit eine Verteilung nicht eingeschränkt wird oder aber Barrieren wie zum Beispiel die Blut-Hirn-Schranke passiert werden können, muss das Pharmakon



ungebunden vorliegen. Demzufolge ist die Plasmaproteinbindung bei Substanzen, die zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden und (wie im Falle des [<sup>3</sup>H]-M-MPEPs und [<sup>11</sup>C]-M-FPEPs) die Blut-Hirn-Schranke passieren müssen, ein eindeutiger Nachteil. Das Ausmass der Plasmaproteinbindung kann zwischen 1% (z.B. Koffein) und 99% (z.B. Warfarin) variieren.

Serumalbumin stellt das wichtigste Bindungsprotein dar, besonders für neutrale und anionische (saure) Liganden. Das Gleichgewicht zwischen Albumin und Pharmakon kann sich innert wenigen Millisekunden einstellen. Im menschlichen Blut liegt das hochmolekulare Albumin (68'000 Da) in einer Konzentration zwischen 500 und 700µM vor; dies entspricht etwa 35 bis 50g Albumin in einem Liter Blut. Im Humanserumalbumin (HSA) konnten zwei verschiedene Bindungsklassen (die Warfarin-Bindungsstelle und die Diazepam-Bindungsstelle) nachgewiesen werden. Von jeder Bindungsklasse können dann je nach Affinität mehrere Bindungsstellen an Albumin vorhanden sein. Daneben werden kationische (basische) Arzneimittel an das saure  $\alpha_1$ -Glykoprotein gebunden und für einzelne Stoffe kommt den Lipoproteinen auch eine gewisse Rolle zu.

Eine Aufhebung der Albumin-Pharmakon-Bindung lässt sich durch die Zugabe eines stark an Albumin bindenden Stoffes erzielen. Dabei könnte die Konzentration des Verdrängers bis zur Sättigung der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen erhöht werden und somit der Anteil des freien, ungebundenen Pharmakons gesteigert werden. Haradahira et al. (2000) konnten die geringe Hirngängigkeit eines stark an Plasmaproteine bindenden Radioliganden für den NMDA-Rezeptor durch die gleichzeitige Gabe von Warfarin, das die Bindung des Radioliganden an Plasmaproteine inhibierte, erhöhen.

Für die Messung der Plasmaproteinbindung von Pharmaka stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die beiden meist angewandten Methoden sind die Gleichgewichtsdialyse und die Ultrafiltration. Der Vorteil der Ultrafiltration gegenüber der Gleichgewichtsdialyse ist ein geringerer Materialaufwand und eine kürzere Trennungszeit des freien vom gebundenen Pharmakon, die bei der Gleichgewichtsdialyse bis zur Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Kammern mehrere Stunden dauern kann. Zudem wäre die Gleichgewichtsdialyse bei einem Radioliganden, der mit Kohlenstoff-11 markiert wurde und somit über eine Halbwertszeit von nur 20min verfügt, absolut ungeeignet.

## 2.5 Ziel der Arbeit

In den früher bereits durchgeführten *in vivo* Biodistributions- und PET-Studien mit dem mGluR<sub>5</sub>-Liganden [<sup>11</sup>C]-M-MPEP war unter Blockadebedingungen eine Erhöhung der Aktivitätskonzentration im Hirn gemessen worden. Erwartet wurde dagegen eine Abnahme der Aktivitätskonzentration in Anwesenheit des Blockers. Es wurde vermutet, dass unter Blockadebedingungen der Radioligand möglicherweise aus der Plasmaproteinbindung verdrängt wird und somit mehr Radioligand für die Passage der Blut-Hirn-Schranke zur Verfügung steht. Diese Hypothese sollte anhand von *in vitro* Plasmaproteinbindungsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]-M-MPEP näher analysiert werden.

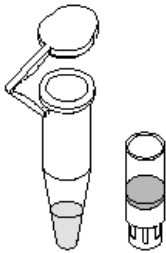
Zunächst musste eine Methode zur Messung der Plasmaproteinbindung der radioaktiven MPEP-Derivate etabliert und optimiert werden. Anschliessend sollte das Ausmass der Plasmaproteinbindung dieser Liganden unter Bedingungen ermittelt werden, die den Kontroll- und Blockadeverhältnissen bei den *in vivo* Experimenten entsprechen.

## **3. Material und Methoden**

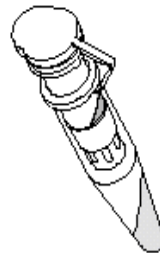
### **3.1 Methodenvalidierung**

#### **3.1.1 Validierung mit [<sup>3</sup>H]-M-MPEP**

Für die *in vitro* Analyse der Plasmaproteinbindung der mGluR<sub>5</sub>-Liganden [<sup>3</sup>H]-M-MPEP und [<sup>11</sup>C]-M-FPEP wurde die Ultrafiltrations-Methode gewählt, um gebundenen von freiem Radioliganden abzutrennen. Es wurde zunächst ein Vergleich von verschiedenen Ultrazentrifugen-Filtern vorgenommen, wobei von den zur Verfügung stehenden Filtern (Millipore Centrifree®-50, Millipore Ultrafree®-10 Millipore Microcon® YM-3, YM-10 und YM-50) die Wahl auf den Millipore Microcon® YM-10-Filter fiel (Abb. 3.1 und 3.2). Dieser besitzt einerseits einen geeigneten cut-off (10kDa), der für Plasmaproteine undurchlässig ist, andererseits hält er kein Restvolumen zurück. Bei diesen Millipore-Filtern konnte eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 14'000 x g eingesetzt werden.



**Abbildung 3.1:** Das Eppendorf-Gefäß (li.), welches die Filtrate auffängt, und eine Millipore-Filtereinheit (re.).



**Abbildung 3.2:** Anordnung des Filters und des Eppendorf-Gefäßes für die Filtration in der Zentrifuge.

Anschliessend musste die Methode der Ultrafiltration mit [<sup>3</sup>H]-M-MPEP optimiert werden. Es wurde zunächst die minimale Filtrationszeit und die nötige Anzahl an Waschschrritten bestimmt. Pro Filter setzte man 25µl (0.242pmol) einer 9.66nM [<sup>3</sup>H]-M-MPEP-Lösung in 225µl Inkubationslösung ein. Diese Menge entsprach im Vergleich zu den *ex vivo* und *in vivo* Studien etwa einer 20mal tieferen [<sup>3</sup>H]-M-MPEP-Konzentration im Blut. Als Inkubationslösungen wurden NaCl 0.9% (pH 7.4) oder menschliches Blutplasma verwendet. Dabei wiesen die Filter mit NaCl 0.9% nach 30min Zentrifugation kein Restvolumen mehr auf. Die Ultrafiltrationszeit mit Blutplasma betrug 50min, dabei blieb nach dieser Zeit noch ein geringes Restvolumen übrig. Für die anschliessenden Waschvorgänge wurden jeweils 200µl der physiologischen Kochsalzlösung während 30min durchfiltriert. Es bewährte sich ein zweimaliges Waschen der Filter, da ein beträchtlicher Teil an Radioligand vom Filter gelöst werden konnte. Die Filtrate und Filter wurden in einem Vial mit 4ml Scintillationslösung

(Packard, Ultima Gold™) versetzt. Die Zerfälle von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP wurden dann in einem β-Counter (Packard, Liquid Scintillation Analyzer, 1900 TR) gezählt.

Damit im Blutplasma die Trennung des freien vom gebundenen [<sup>3</sup>H]-M-MPEP nicht vor dem Einstellen des Gleichgewichtes der Plasmaproteinbindung ausgeführt wurde, musste die minimale Inkubationszeit von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP in Blutplasma bestimmt werden. Eine Inkubation von 10min bei 37°C reichte aus, um dieses Gleichgewicht zu erreichen.

### 3.1.2 Filtrervorsättigung

Um die unspezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP und [<sup>11</sup>C]-M-FPEP an den Filter zu reduzieren, wurden verschiedene Sättigungsprotokolle der Filter getestet. Gleichzeitig wurde die nicht-spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP am Filter mit dem aufgestellten Ultrafiltrationsprotokoll quantifiziert.

*Verfahren A:* Es wurden 250µl kaltes M-MPEP (892µM in NaCl 0.9%) während 30min bei 14'000 x g durch die Einheiten filtriert. Anschliessend wurden 500µl destilliertes Wasser ebenfalls bei 14'000 x g filtriert, um die Einheiten von überschüssigem M-MPEP zu waschen.

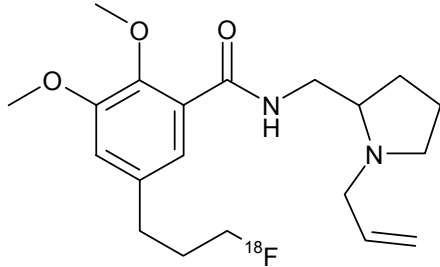
*Verfahren B:* Bei diesem Passivierungsprotokoll wurden die Filter über Nacht mit einer Lösung abgesättigt. Bei den eingesetzten Lösungen handelte es sich um wässrige Lösungen mit 5% Polyethylenglykol (PEG), 5% Tween-20 oder 1% Milchpulver. Die Filter wurden dann mit Leitungswasser gespült. Anschliessend wurden 500µl destilliertes Wasser zweimal bei 14'000 x g filtriert. Die Filter wurden dann umgekehrt auf das Eppendorf aufgesetzt, um das Restwasser während 3min bei 1000 x g zu entfernen.

### 3.1.3 Validierung mit [<sup>18</sup>F]-Fallypride und [<sup>3</sup>H]-MK801

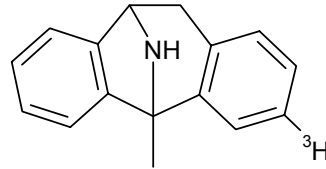
Für die Überprüfung, ob beim etablierten Ultrafiltrationsprotokoll die stark ausgeprägte nicht-spezifische Bindung der Radioliganden substanzspezifisch ist, wurde dasselbe Protokoll mit den beiden Radioliganden [<sup>18</sup>F]-Fallypride (Abb. 3.3) und [<sup>3</sup>H]-MK801 (Abb. 3.4) durchgeführt. [<sup>18</sup>F]-Fallypride ist ein Radioligand für striatale und extrastriatale Dopamin D-2 Rezeptoren (Mukherjee et al., 1999). [<sup>3</sup>H]-MK801 bindet als nicht-kompetitiver Antagonist am NMDA-Rezeptor (Wong et al., 1988). Beide Stoffe penetrieren die Blut-Hirn-Schranke in ähnlichem Ausmass wie M-MPEP und sind vermutlich ähnlich lipophil.

Für [<sup>3</sup>H]-MK801 wurden 11µl (0.507pmol) einer [<sup>3</sup>H]-MK801-Lösung pro 225µl physiologischer Kochsalzlösung eingesetzt. Die Filtrate, Eppendorf-Gefässe und die Filter der [<sup>3</sup>H]-MK801-Ansätze wurden in einem Vial mit 4ml Scintillationslösung (Packard, Ultima Gold™) versetzt. Die Zerfälle wurden in einem β-Counter (Packard, Liquid Scintillation

Analyzer, 1900 TR) gezählt. Die Menge [ $^{18}\text{F}$ ]-Fallypride in 250 $\mu\text{l}$  Inkubationslösung betrug 0.1pmol (6.25 $\mu\text{l}$  einer 16nM Lösung). Die Zerfälle in Filtraten und Filtern wurden in einem  $\gamma$ -Counter (Packard, Minaxi Gamma-Counter, Auto Gamma® 5000 Serie) gemessen.



**Abbildung 3.3:** Strukturformel von [ $^{18}\text{F}$ ]-Fallypride



**Abbildung 3.4:** Strukturformel von [ $^3\text{H}$ ]-MK801

### 3.2 Plasmaproteinbindung von [ $^3\text{H}$ ]-M-MPEP

Um die Plasmaproteinbindung von [ $^3\text{H}$ ]-M-MPEP unter Kontroll- und unter Blockadebedingungen zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Inkubationslösungen verwendet:

- a) Rinderserumalbumin (BSA) 4% in 0.9%-iger Kochsalzlösung (pH 7.4)
- b) Menschliches Blutplasma

Zu 225 $\mu\text{l}$  Inkubationslösung wurden jeweils 25 $\mu\text{l}$  verdünnte [ $^3\text{H}$ ]-M-MPEP-Lösung (9.66nM) pipettiert. Dies entsprach 0.242pmol [ $^3\text{H}$ ]-M-MPEP pro Probe. Der freie Radioligand wurde nach dem etablierten Ultrafiltrationsprotokoll vom gebundenen getrennt, die Aktivität der Filtrate, Eppendorf-Gefäße und Filter wurde mit 4ml Scintillationslösung versetzt und in einem  $\beta$ -Counter (Packard, Liquid Scintillation Analyzer, 1900 TR) gemessen.

Die Messung der Plasmaproteinbindung unter Blockadebedingungen erfolgte bei einem Überschuss an kaltem M-MPEP. Zu 209 $\mu\text{l}$  Blutplasma oder BSA-Lösung 4% wurden jeweils 16 $\mu\text{l}$  (142.7nmol) kalte M-MPEP-Lösung (8.92mM) und 25 $\mu\text{l}$  (0.242pmol) verdünnte [ $^3\text{H}$ ]-M-MPEP-Lösung (9.66nM) zugesetzt. Die Menge an kaltem M-MPEP entsprach etwa der Menge Serumalbumin in 209 $\mu\text{l}$  Blutplasma oder in einer 4%-igen BSA-Lösung und sollte somit das Serumalbumin einfach besetzen. Der Überschuss des kalten Liganden gegenüber dem tritierten M-MPEP war fast 590'000fach.

Zusätzlich wurde im Blutplasma eine im Vergleich zum Serumalbumin doppelte Menge von M-MPEP eingesetzt. Man pipettierte zu 195 $\mu\text{l}$  Blutplasma jeweils 30.6 $\mu\text{l}$  (273.0nmol) kalte M-MPEP-Lösung und 25 $\mu\text{l}$  (0.242pmol) verdünnte [ $^3\text{H}$ ]-M-MPEP-Lösung. Der Überschuss des kalten Liganden war hierbei über 1'100'000fach.

### 3.3 Plasmaproteinbindung von [<sup>11</sup>C]-M-FPEP

Vom neuen Radioliganden [<sup>11</sup>C]-M-FPEP sollte zu Vergleichszwecken die nicht-spezifische Bindung an Filter sowie die Plasmaproteinbindung mit demselben Ultrafiltrationsprotokoll wie für [<sup>3</sup>H]-M-MPEP bestimmt werden.

Pro Inkubationsansatz wurde eine Aktivität von jeweils etwa 260kBq eingesetzt, um bei der kurzen Halbwertszeit des Radioliganden ( $t_{1/2} = 20\text{min}$ ) eine Messung der Filter und Filtrate in einem akzeptablen Messbereich auch nach mehreren Filtrationsschritten zu gewährleisten. Weil die Aktivitätskonzentration des Radioliganden einerseits zu niedrig war und andererseits von Experiment zu Experiment variierte, musste man verschiedene Stoffmengen an [<sup>11</sup>C]-M-FPEP pro Inkubationsansatz verwenden. Dies hatte zur Folge, dass das Blutplasma durch die [<sup>11</sup>C]-M-FPEP-Stammlösung unterschiedlich stark verdünnt wurde.

Die Trennung des freien vom gebundenen [<sup>11</sup>C]-M-FPEP erfolgte gemäss dem Ultrafiltrationsprotokoll für [<sup>3</sup>H]-M-MPEP. Bei [<sup>11</sup>C]-M-FPEP wurden Filter und Filtrate in ein Reagenzglas überführt und in einem  $\gamma$ -Counter (Packard, Minaxi Gamma-Counter, Auto Gamma® 5000 Serie) gemessen.

## **4. Resultate**

Die Plasmaproteinbindung der beiden mGluR<sub>5</sub>-Antagonisten [<sup>3</sup>H]-M-MPEP und [<sup>11</sup>C]-M-FPEP wurde *in vitro* untersucht. Hierfür musste zunächst eine geeignete Methode etabliert und validiert werden. Zudem sollte analysiert werden, ob die beiden Radioliganden durch Co-Inkubation mit einem Überschuss an kaltem Liganden aus der Plasmaproteinbindung verdrängt werden können, um so paradoxe *in vivo* Resultate dieser Liganden möglicherweise erklären zu können.

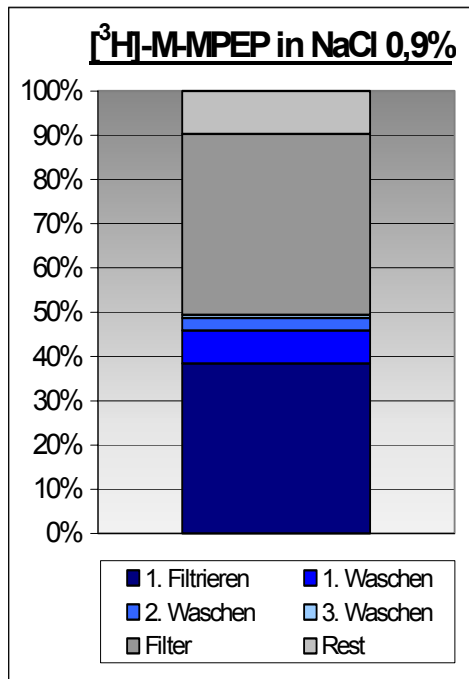
### **4.1 Methodvalidierung**

#### **4.1.1 Validierung mit [<sup>3</sup>H]-M-MPEP**

Für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP und [<sup>11</sup>C]-M-FPEP wurde zunächst die Ultrafiltration als Methode etabliert und validiert. Die Ultrafiltration eignet sich für eine Trennung des gebundenen vom ungebundenen Radioliganden und zeichnet sich durch einen geringen Materialaufwand und eine relativ kurze Trennzeit aus. In Vorexperimenten mit [<sup>3</sup>H]-M-MPEP wurden Parameter wie Inkubationstemperatur, Inkubationszeit, Zentrifugationsdauer und Anzahl Waschzyklen optimiert. Als Kontrollexperiment wurde jeweils eine Inkubation des Radioliganden in 0.9%iger Kochsalzlösung anstelle von Plasma oder BSA-Lösung durchgeführt und die Probe dann nach identischem Protokoll weiterverarbeitet und quantifiziert.

Eine Quantifizierung der Radioaktivität im Filtrat und Filter ergab überraschenderweise einen sehr hohen Anteil an [<sup>3</sup>H]-M-MPEP, der den Filter nicht passieren konnte. In einem anfänglichen Optimierungsversuch fand man im Filtrat der ersten Filtration nur 38.4% der eingesetzten Radioaktivität (Abb. 4.1). Durch mehrmaliges Waschen liessen sich noch 11% lösen. Allerdings genügte ein zweimaliges Waschen, da durch den dritten Waschgang nur noch eine sehr geringe Menge Radioligand freigesetzt wurde. Gesamthaft konnten also nur 49.4% des total eingesetzten [<sup>3</sup>H]-M-MPEPs im Filtrat wiedergefunden werden. Der Anteil [<sup>3</sup>H]-M-MPEP, der am Filter kleben blieb, war mit 40.9% der Gesamtaktivität sehr hoch. Vermutlich musste der nicht wiedergefundene Anteil (9.7%) dem Filter zugeschrieben werden, da die Bestimmung der Aktivität am Filtermaterial eine grössere Fehlerwahrscheinlichkeit besitzt als jene des Filtrats. Dies wurde in weiteren Messungen der Filteraktivität ersichtlich, die eine grosse Abweichung voneinander besaßen. Der Grund mag darin liegen,

dass der Radioligand unterschiedlich gut von der Scintillationslösung aus der Filtereinheit gelöst wird.



**Abbildung 4.1:** Ultrafiltration von 0.242pmol [<sup>3</sup>H]-M-MPEP (=100%) in NaCl 0.9%. Der prozentuale Anteil der ungebundenen Aktivität im Filtrat nach den verschiedenen Filtrationsschritten (1. Filtrieren 38.4%, 1. Waschen 7.5%, 2. Waschen 2.8% und 3. Waschen 0.7%) ist blau, das am Filtermaterial unspezifisch gebundene [<sup>3</sup>H]-M-MPEP grau gefärbt. Es wurden 90.3% der gesamthaft eingesetzten Aktivität wiedergefunden. Der Rest (hellgrau) wurde der unspezifischen Bindung am Filter zugerechnet.

Die hohe Retention von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP muss sehr wahrscheinlich durch eine ausgeprägte nicht-spezifische Bindung an Filter- und Plastikmaterial erklärt werden. Aus diesem Grund wurde in der Folge versucht, diese unspezifische Bindung mit einer Vorbehandlung der Filtereinheiten zu reduzieren.

#### 4.1.2 Filtrervorsättigung

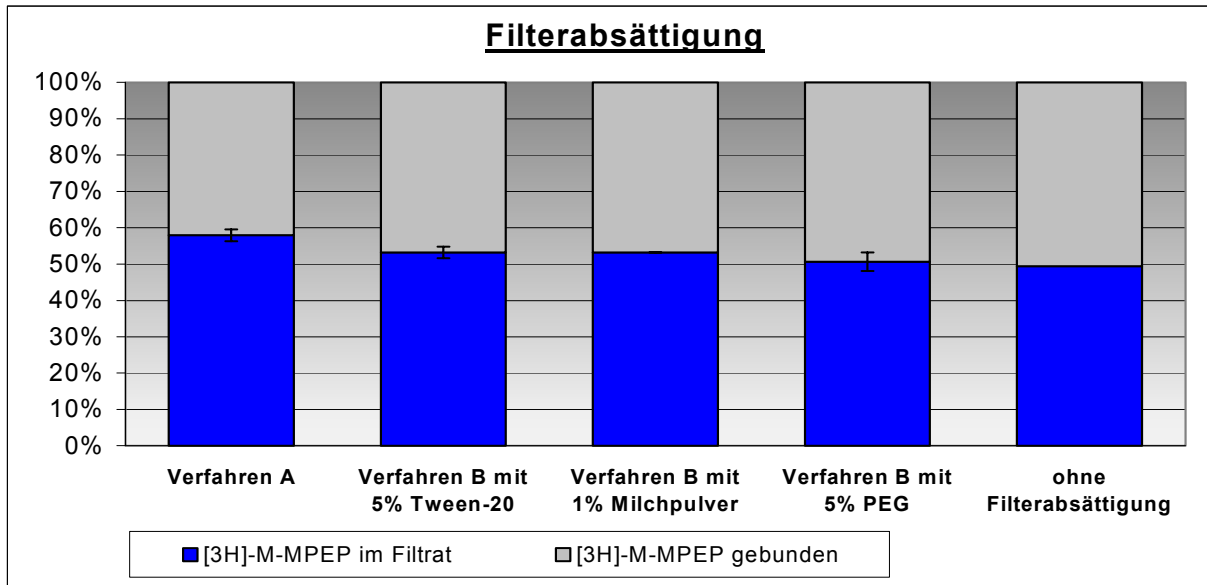
Im *Verfahren A* setzte man einen hohen Überschuss an kaltem Radioliganden vor Zugabe des Radioliganden ein, um die nicht-spezifische Bindungsstellen am Filter abzusättigen. Diese Vorgehensweise wurde zudem mit verschiedenen Passivierungsprotokollen des Filter-Herstellers verglichen, die ebenfalls zu einer Absättigung führen sollte (*Verfahren B*). Hierfür wurden wässrige Lösungen mit 5% Tween-20, 1% Milchpulver und 5% PEG verwendet.

Die nicht-spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP liess sich durch die Filterabsättigung geringfügig vermindern (Abb. 4.2). Sie betrug im *Verfahren A* 42.0±1.6%. Dieser Mittelwert ergab sich aus mehreren Versuchen, und die kleine Standardabweichung bewies eine hohe Reproduzierbarkeit der einzelnen Versuche nach diesem Verfahren.

Die vom Hersteller vorgeschlagenen Passivierungs-Verfahren mit 5% Tween-20, 1% Milchpulver oder 5% PEG konnten die Filtrationsrate von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP gegenüber dem *Verfahren A* nicht erhöhen. Der unspezifisch gebundene Anteil des Radioliganden lag nur leicht tiefer als bei einem Ansatz ohne Passivierung. Mit 5% PEG betrug die unspezifische Bindung



49.3±2.5%, mit 1% Milchpulver blieben 46.8% und mit 5% Tween-20 46.8±1.6% des Radioliganden nicht-spezifisch am Filter gebunden.

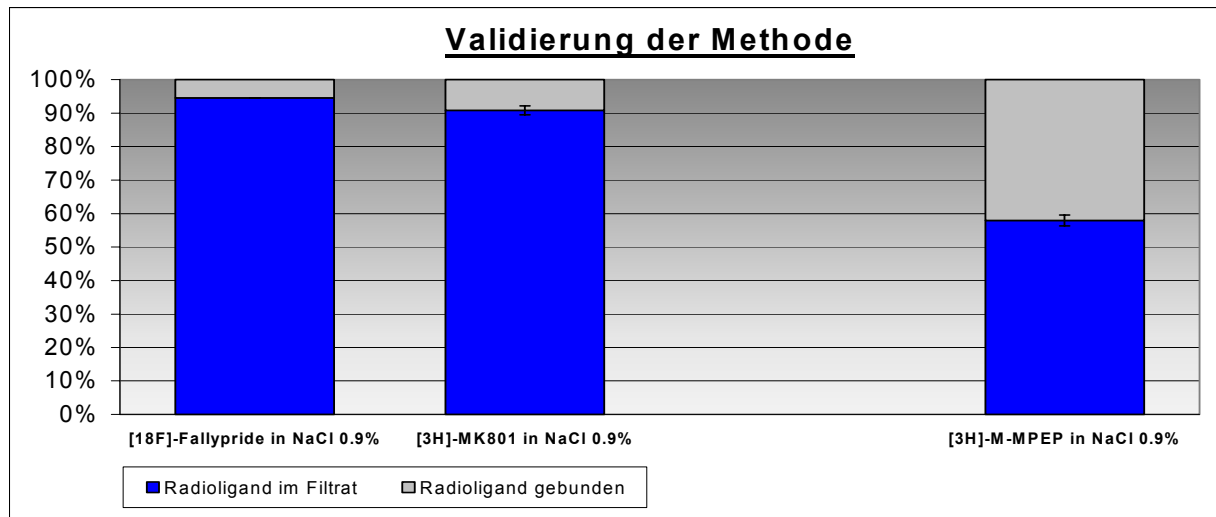


**Abbildung 4.2:** Ultrafiltration von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP in NaCl 0.9% nach verschiedenen Filterabsättigungsverfahren. Die Gesamtaktivität (=100%) ist unterteilt in freien (blau) und gebundenen (grau) Anteil. Die 1. Filtration und die Waschschritte sind zusammengefasst im Anteil des Filtrats. Zum Vergleich ist der Wert ohne Filterabsättigung angegeben.

Für alle folgenden Experimente wurde diese hohe unspezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP an die Filter in Kauf genommen, weil keine Alternativen für diese Methode und diese Filter zur Verfügung standen. Durch die Durchführung von Kontrollansätzen mit physiologischer Kochsalzlösung konnte für die folgenden Plasmaproteinbindungsstudien ein Korrekturfaktor bestimmt werden, welcher die nicht-spezifische Retention des ungebundenen Radioliganden berücksichtigt. Hierfür wurde jedoch vorausgesetzt, dass in einem Filtrationsansatz mit Blutplasma der selbe Anteil an Radioligand im Filter unspezifisch gebunden werden würde.

#### 4.1.3 Validierung mit [<sup>18</sup>F]-Fallypride und [<sup>3</sup>H]-MK801

Die Ultrafiltrationsmethode mit Millipore-Filtern hatte eine sehr hohe Retention des freien, ungebundenen Radioliganden [<sup>3</sup>H]-M-MPEP im Filter gezeigt, was aussagekräftige Plasmaproteinbindungsstudien erschwert. Um zu überprüfen, ob die stark ausgeprägte Retention von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP ein substanzspezifisches Phänomen darstellt, wurde mit den beiden Radioliganden [<sup>18</sup>F]-Fallypride und [<sup>3</sup>H]-MK801 dasselbe Ultrafiltrationsprotokoll angewandt und deren nicht-spezifische Retention im Filter analysiert (Abb. 4.3).



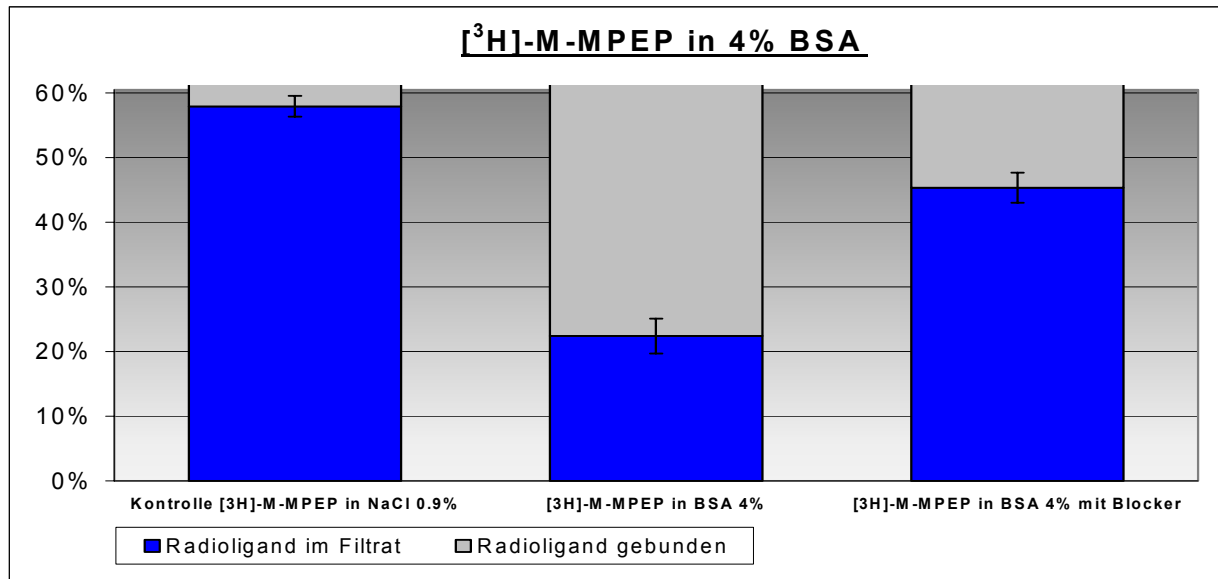
**Abbildung 4.3:** Freier (blau) und gebundener (grau) Anteil von 0.1pmol [<sup>18</sup>F]-Fallypride und 0.507pmol [<sup>3</sup>H]-MK801 in physiologischer Kochsalzlösung. Zum Vergleich ist der Wert von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP angegeben.

[<sup>18</sup>F]-Fallypride und [<sup>3</sup>H]-MK801 zeigten im Gegensatz zu [<sup>3</sup>H]-M-MPEP nur einen geringen Anteil von 5.0% beziehungsweise  $8.5 \pm 1.3\%$  an nicht-spezifischer Bindung am Filtermaterial. Daraus kann geschlossen werden, dass die hohe unspezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP nicht aufgrund eines ungeeigneten Ultrafiltrationsassays besteht, sondern eine ungünstige intrinsische Eigenschaft dieses Radioliganden darstellt.

## 4.2 Plasmaproteinbindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP

Vor der Messung im Blutplasma wurde die Bindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP an Rinderserumalbumin (BSA) getestet. Da Albumin das wichtigste Bindungsprotein im Blutplasma darstellt, gab diese Untersuchung Hinweise, ob und wie stark [<sup>3</sup>H]-M-MPEP an dieses Makromolekül bindet.

Der Filtrationsassay zeigte eine ausgeprägte Bindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP an BSA (Abb. 4.4). Nur  $22.4 \pm 2.7\%$  der gesamthaft eingesetzten Aktivität lagen in freier Form vor und wurden im Filtrat detektiert. Allerdings musste die hohe nicht-spezifische Bindung des Radioliganden an den Filter im Kontrollansatz berücksichtigt werden. Hierfür wurden 58% Aktivität im Filtrat einem Wert von 100% für den BSA-Ansatz gleichgesetzt. Aus dieser Korrektur für die hohe nicht-spezifische Bindung des Radioliganden ergab sich für [<sup>3</sup>H]-M-MPEP in 4%-iger BSA-Lösung eine Proteinbindung von  $61.4 \pm 4.7\%$ . Sie konnte grösstenteils durch Inkubation des Albumins mit einer hohen Konzentration an kaltem Liganden verhindert werden. Unter Blockadebedingungen wurden im Filtrat nämlich  $45.4 \pm 2.3\%$  der Gesamtaktivität gemessen. Mit dem Faktor aus dem Kontrollansatz korrigiert, betrug die Bindung des Radioliganden an BSA unter Blockadebedingungen noch  $21.7 \pm 4.0\%$ .

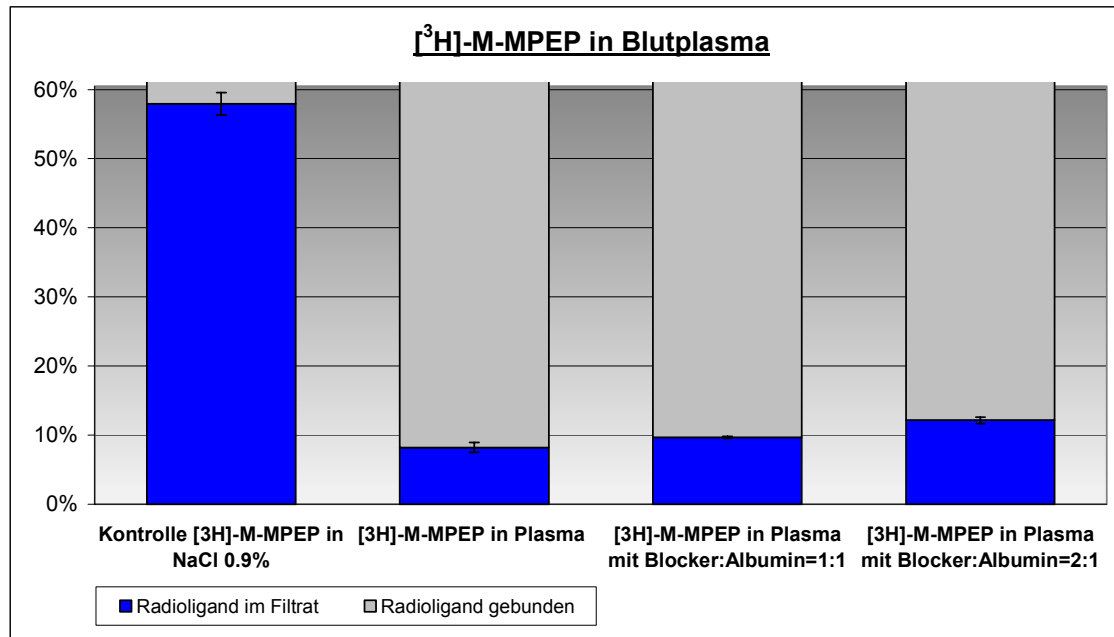


**Abbildung 4.4:** Freier (blau) und gebundener (grau) Anteil von  $[^3\text{H}]$ -M-MPEP im Kontrollansatz (0.9% NaCl), in 4%-iger BSA-Lösung und in 4%-iger BSA-Lösung zusammen mit 142.7nmol M-MPEP. Der Blockerüberschuss gegenüber dem Radioliganden beträgt 590'000.

Die Plasmaproteinbindung von  $[^3\text{H}]$ -M-MPEP wurde anschliessend im Blutplasma gemessen. Hier finden sich nebst dem Albumin auch andere mögliche Bindungspartner wie das saure Glykoprotein und Lipoproteine. Da  $[^3\text{H}]$ -M-MPEP schwach basisch ist, wurde erwartet, dass der gebundene Anteil wegen der grösseren Affinität zum sauren Glykoprotein gegenüber dem gebundenen Anteil in 4%-iger BSA-Lösung zunimmt.

Im Blockade-Experiment wurde zunächst eine dem Serumalbumin entsprechende Stoffmenge M-MPEP sowie die doppelte Menge von kaltem Ligand eingesetzt. Diese Mengen sollten wie bei der 4%-igen BSA-Lösung einen grossen Anteil  $[^3\text{H}]$ -M-MPEP aus der Bindung an Plasmaproteine verdrängen.

Tatsächlich war die Proteinbindung von  $[^3\text{H}]$ -M-MPEP im Blutplasma recht ausgeprägt (Abb. 4.5). Im Filtrat fand man durchschnittlich nur  $8.2 \pm 0.7\%$  des gesamten  $[^3\text{H}]$ -M-MPEP, was mit Korrekturfaktor aus dem Kontrollansatz einer Proteinbindung von  $85.9 \pm 1.2\%$  entspricht. Der Anstieg des freien Anteils unter Blockadebedingungen war im Gegensatz zum Experiment in 4%-iger BSA-Lösung, wo ein Grossteil des Radioliganden verdrängt wurde, überraschenderweise gering: Die Aktivität im Filtrat betrug  $9.7 \pm 0.2\%$  in der äquimolaren Blockade und  $12.2 \pm 0.5\%$  im Experiment, bei dem die doppelte Menge an kaltem Ligand eingesetzt wurde. Nach der Korrektur der Werte ergab sich ein gebundener Anteil von  $83.3 \pm 0.3\%$  in der tieferen Blockade und  $79.1 \pm 0.9\%$  in der höheren Blockade.



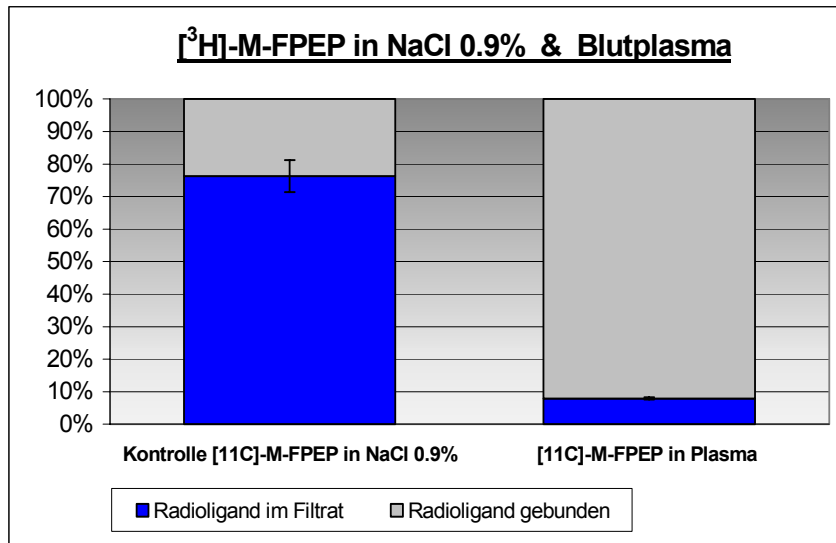
**Abbildung 4.5:** Freier (blau) und gebundener (grau) Anteil von  $[^3\text{H}]\text{-M-MPEP}$  im Kontrollansatz (0.9% NaCl) und im Blutplasma ohne Blocker sowie mit zwei verschiedenen Blockerkonzentrationen. Der Blockerüberschuss gegenüber dem Radioliganden beträgt 590'000 bzw. 1'100'000.

Die Verdrängung von  $[^3\text{H}]\text{-M-MPEP}$  aus der Plasmaproteinbindung durch M-MPEP war auffallend gering. Trotz der hohen Blockerkonzentrationen stieg der freie Anteil in der äquimolaren Blockade nur um 2.6 Prozentpunkte auf 16.7% und in der 2:1-Blockade nur um 6.8 Prozentpunkte auf 20.9%. Die Plasmaproteinbindung liess sich also mit diesen beiden Blockerkonzentrationen nicht sättigen. Dies legt die Vermutung nahe, dass Albumin entweder über mehrere Bindungsstellen für M-MPEP verfügt oder nur eine sekundäre Rolle bei der Plasmaproteinbindung von M-MPEP spielt. M-MPEP könnte, wie schon erwähnt, mit dem sauren Glykoprotein einen weiteren Bindungspartner besitzen.

Die gewählten Blockerkonzentrationen weisen bereits einen 1000mal beziehungsweise 2000mal höheren Wert auf als in den *in vivo* Studien. Daher macht es für diese Fragestellung keinen Sinn, eine noch höhere Blockerkonzentration zu verwenden.

#### 4.3 Plasmaproteinbindung von $[^{11}\text{C}]\text{-M-FPEP}$

$[^{11}\text{C}]\text{-M-FPEP}$  stellt einen neuen Radioliganden dar, der momentan auf seine Eignung als PET-Tracer für den  $\text{mGluR}_5$  untersucht wird. Zu Vergleichszwecken sollte die nicht-spezifische Bindung an Filter sowie die Plasmaproteinbindung von  $[^{11}\text{C}]\text{-M-FPEP}$  mit demselben Ultrafiltrationsprotokoll wie für  $[^3\text{H}]\text{-M-MPEP}$  bestimmt werden.



**Abbildung 4.6:** Freier (blau) und gebundener (grau) Anteil von [<sup>3</sup>H]-M-FPEP im Kontrollansatz (0.9% NaCl) und im Blutplasma.

Die unspezifische Bindung von [<sup>11</sup>C]-M-FPEP im Kontrollansatz mit physiologischer Kochsalzlösung war gegenüber derjenigen von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP etwas kleiner (Abb. 4.6). Der Anteil des Radioliganden, der die Filter passierte, betrug  $76.3 \pm 4.9\%$  der gesamthaft eingesetzten Radioaktivität im Gegensatz zu  $58.0 \pm 1.6\%$  bei [<sup>3</sup>H]-M-MPEP. Damit fiel der Korrekturfaktor der Werte im Blutplasma und ein dadurch verbundener Fehler kleiner aus als bei [<sup>3</sup>H]-M-MPEP, da hier ein höherer Anteil von 76.3% einem Wert von 100% gleichgesetzt wird.

Wie schon bei [<sup>3</sup>H]-M-MPEP war auch die Plasmaproteinbindung von [<sup>11</sup>C]-M-FPEP recht hoch. Nur  $8.0 \pm 0.3\%$  des gesamthaft eingesetzten [<sup>11</sup>C]-M-FPEP passierten den Filter, was mit Korrekturfaktor einer Plasmaproteinbindung von  $92.0 \pm 0.3\%$  entspricht.

Trotz der tieferen nicht-spezifischen Bindung von [<sup>11</sup>C]-M-FPEP ist die Plasmaproteinbindung von [<sup>11</sup>C]-M-FPEP im Vergleich zu [<sup>3</sup>H]-M-MPEP höher. Anscheinend gibt es keinen Zusammenhang zwischen der nicht-spezifischen Bindung am Filtermaterial und der Plasmaeiweißbindung.

## **5. Diskussion**

Bis zum heutigen Zeitpunkt existieren noch keine PET-Radioliganden für die Visualisierung des Subtyps 5 des metabotropen Glutamat-Rezeptors. MPEP war der erste selektive mGluR<sub>5</sub>-Antagonist und repräsentierte die Muttersubstanz für die Derivatisierung von Liganden, die für eine *in vivo* Charakterisierung von mGluR<sub>5</sub> unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen mit PET-Nukliden markiert wurden. Mit [<sup>11</sup>C]-M-MPEP konnte allerdings die in den *in vitro* und *ex vivo* Experimenten gemessene spezifische Bindung an mGluR<sub>5</sub> *in vivo* nicht bestätigt werden. Diese Substanz zeigte sogar eine paradoxe Zunahme der Aktivitätskonzentrationen in verschiedenen Hirnregionen unter Blockadebedingungen. In dieser Arbeit wurde die Plasmaproteinbindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP untersucht, da sie bei den negativen *in vivo* Resultaten möglicherweise eine Rolle gespielt haben könnte.

In Kontrollversuchen mit [<sup>3</sup>H]-M-MPEP in physiologischer Kochsalzlösung stellte man eine hohe nicht-spezifische Bindung am Filtermaterial fest. Verschiedene Versuche, die Filtrationsrate zu erhöhen, konnten die nicht-spezifische Bindung nur leicht vermindern. Behandlungen der Filter mit Lösungsmitteln wie Tween, Acetonitril oder Methanol konnten nicht angewendet werden, weil die Plasmaproteinbindung bei den Versuchen mit Blutplasma verfälscht worden wäre. In den Kontrollmessungen von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP in NaCl 0.9% wurde eine unspezifische Bindung von 42% des gesamthaft eingesetzten [<sup>3</sup>H]-M-MPEPs gemessen. Ein Wert in dieser Höhe erschwert natürlich eine verlässliche Messung der eigentlichen Radioligand-Bindung an Plasmaproteine. Die Proteinbindung, die mit Blutplasma gemessen wurde, musste somit mit einem Faktor korrigiert werden und kann daher mit einem Fehler behaftet sein.

Schon während der Entwicklung der Radiosynthese von [<sup>11</sup>C]-M-MPEP wurde die „klebrige“ Eigenschaft dieser Substanz bemerkt. Auch bei den PET-Studien blieb eine bedeutende Menge [<sup>11</sup>C]-M-MPEP am implantierten Schwanz-Katheter, durch den der Radioligand in das Tier injiziert wurde, kleben (Kokic et al., 2002). Die hohe nicht-spezifische Bindung des Radioliganden an den Katheter-Kunststoff könnte auch in Zusammenhang mit den paradoxen Werten der *in vivo* Biodistributionsstudien stehen. Möglicherweise hatte die Präinjektion der Blockersubstanz die nicht-spezifischen Bindungsstellen am Katheter-Plastik vorgesättigt, sodass bei der darauffolgenden Injektion des Radioliganden mehr Aktivität in den Kreislauf des Tieres gelangte.

[<sup>3</sup>H]-M-MPEP besass eine Plasmaproteinbindung von 85.9%. Für ein Pharmakon, das die Blut-Hirn-Schranke passieren muss, ist so ein hoher Wert sicher nicht vorteilhaft, aber auch nicht unüblich. Andere zentral wirkende Stoffe liegen im Blut sogar noch stärker gebunden vor. Fluoxetin, ein Antidepressivum, besitzt eine Plasmaproteinbindung von 94%; Diazepam, der Wirkstoff von Valium®, bindet sogar zu 97% an Proteine. Bei diesen Stoffen reicht also ein geringer Anteil an freier Substanz, um im ZNS die gewünschte Wirkung auszulösen. Allerdings sind die Anforderungen an einen Radioliganden für PET-Untersuchungen im Gehirn anders als jene an ein Pharmakon, von dem eine bestimmte Wirkung erwartet wird. Bisher existiert kein Richtwert für eine „optimale“ Plasmaproteinbindung von PET-Radioliganden. Ein Zusammenhang zwischen freiem Anteil im Blut und Penetration der Blut-Hirn-Schranke scheint jedoch offensichtlich. Beispielsweise konnte durch die Verdrängung des Radioliganden aus der Plasmaproteinbindung mittels Warfarin die Hirnaufnahme eines PET-Liganden deutlich gesteigert werden (Haradahira et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings eine Coinkubation mit kaltem Liganden die Proteinbindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP nicht entscheidend beeinflussen. Eine äquimolare Blockade des Albumins erhöhte den freien Anteil des Radioliganden nur um 2.6 Prozentpunkte. Die doppelte Blockerkonzentration bewirkte ebenfalls nur einen geringen Anstieg an verdrängter Substanz (6.8 Prozentpunkte). Die Verdrängung von [<sup>11</sup>C]-M-MPEP aus der Plasmaproteinbindung durch den kalten Liganden bei den *in vivo* Biodistributionsstudien spielt also wahrscheinlich nur eine nebengeordnete Rolle bei der Erklärung des widersprüchlichen Phänomens. Es scheinen wohl eher andere Mechanismen dafür verantwortlich zu sein. Beispielsweise könnte M-MPEP eine hohe unspezifische Bindung an Blutgefäße aufweisen. Die Absättigung dieser Bindungsstellen unter Blockadebedingungen würde zu einer höheren Konzentration an freiem [<sup>11</sup>C]-M-MPEP im Blut führen. Diese Hypothese müsste durch weitere *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden.

Wie erwartet war die Proteinbindung von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP in der Inkubationslösung mit 4% BSA mit 61.4% wegen des Fehlens weiterer Blutbestandteile niedriger als im Blutplasma. Sie konnte unter Blockadebedingungen auf 21.7% vermindert werden. Möglicherweise besitzt [<sup>3</sup>H]-M-MPEP mehrere Bindungsstellen an Rinderalbumin, da der Ausgangswert unter äquimolarer Blockade nicht erreicht werden konnte. Im Filtrationsansatz mit Blutplasma konnte mit einem Überschuss an kaltem Liganden aber nur ein sehr viel kleinerer Anteil [<sup>3</sup>H]-M-MPEP aus der Bindung verdrängt werden. Falls also [<sup>3</sup>H]-M-MPEP eine Bindungsstelle an Albumin besitzen sollte, spielt sie wohl nur eine nebensächliche Rolle. Möglicherweise stellt das saure  $\alpha_1$ -Glykoprotein den Hauptbindungspartner von

[<sup>3</sup>H]-M-MPEP im Plasma dar, da schwach basische Substanzen wie [<sup>3</sup>H]-M-MPEP eher an dieses Protein binden. Dies würde den Unterschied in den Resultaten mit den beiden verschiedenen Inkubationslösungen erklären. Die Verwendung einer BSA-Lösung ist für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung ein etabliertes Modell, doch spiegelt die Verwendung von Blutplasma eher die *in vivo* Situation wider. Blutplasma beinhaltet einen Grossteil der möglichen Bindungspartner für Pharmaka, im Vergleich zur *in vivo* Situation fehlen jedoch die weiteren Bestandteile des Blutes. Eine Bindung von Pharmaka an Erythrocyten wird nicht selten beobachtet (Riant et al., 1988). Eine Messung der Bindung von Radioliganden an alle Blutbestandteile ist jedoch unmöglich, da die Filter durch den hohen Anteil an Feststoffen verstopfen würden.

Der grosse Unterschied in der Radioligand-Verdrängung aus der Plasmaproteinbindung unter Blockadebedingungen zwischen der 4%-igen BSA-Lösung und dem humanen Blutplasma könnte auch auf Speciesunterschiede in der Plasmaproteinbindung deuten, wie es bereits für einen Radioliganden beschrieben worden ist (Hume et al., 1994). Man müsste mit menschlichem Serumalbumin feststellen, ob an diesem Protein im Gegensatz zum Rinderserumalbumin mehrere Bindungsstellen für [<sup>3</sup>H]-M-MPEP vorhanden sind. Falls diese Annahme bestätigt würde, müssten Studien mit Rattenplasma durchgeführt werden, um das Verhalten von [<sup>11</sup>C]-M-MPEP in den *in vivo* Studien doch durch eine Verdrängung in der Plasmaproteinbindung erklären zu können.

Die Plasmaproteinbindung von [<sup>11</sup>C]-M-FPEP, einem weiteren Radioliganden für mGluR<sub>5</sub>, betrug mit menschlichen Blutplasma 89,7% und war somit etwas höher als jene von [<sup>3</sup>H]-M-MPEP. Dagegen war die nicht-spezifische Bindung von [<sup>11</sup>C]-M-FPEP am Filter und Kunststoff weniger ausgeprägt. Die „klebrige“ Eigenschaft der Radioliganden scheint also keinen direkten Zusammenhang mit der Plasmaproteinbindung zu haben. Voraussagen über die *in vivo* Eigenschaften von [<sup>11</sup>C]-M-FPEP sind nur schwer möglich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide Radioliganden im Blutplasma eine ausgeprägte Proteinbindung zeigten. Aufgrund der geringen Zunahme an freiem [<sup>3</sup>H]-M-MPEP unter Blockadebedingungen konnte jedoch die Hypothese einer Verdrängung der Plasmaproteinbindung als Grund für die paradoxen *in vivo* Werte nicht bestätigt werden.



## **6. Abkürzungen**

|                    |   |
|--------------------|---|
| AMPA               | $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat |
| BSA                | Rinderserumalbumin                                      |
| GPCR               | G-Protein gekoppelter Rezeptor                          |
| HSA                | Humanserumalbumin                                       |
| ID                 | injizierte Dosis  |
| i.v.               | intravenös  |
| $K_D$              | Dissoziationskonstante                                  |
| M-FPEP             | 2-Methyl-6-((3-fluorphenyl) ethynyl) pyridin            |
| M-MPEP             | 2-Methyl-6-((3-methoxyphenyl) ethynyl) pyridin          |
| MPEP               | 6-Methyl-2-(phenylethyl) pyridin                        |
| mGluR              | metabotroper Glutamat-Rezeptor                          |
| mGluR <sub>5</sub> | metabotroper Glutamat-Rezeptor Subtyp 5                 |
| NaCl 0.9%          | physiologische Kochsalzlösung                           |
| NMDA               | N-Methyl-D-Aspartat                                     |
| PEG                | Polyethylenglykol                                       |
| PET                | Positronen-Emissions-Tomographie                        |
| ZNS                | Zentralnervensystem                                     |

## **7. Literatur**

Bettler, B., and Mülle, C. (1995). Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34, 123-139.

Bruno, V., Ksiazek, I., Battaglia, G., Lukic, S., Leonhardt, T., Sauer, D., Gasparini, F., Kuhn, R., Nicoletti, F., and Flor, P. J. (2000). Selective blockade of metabotropic glutamate receptor subtype 5 is neuroprotective. *Neuropharmacology* 39, 2223-2230.

Gasparini, F., Andres, H., Flor, P. J., Heinrich, M., Inderbitzin, W., Lingenhohl, K., Müller, H., Munk, V. C., Omilusik, K., Stierlin, C., *et al.* (2002). [(3)H]-M-MPEP, a potent, subtype-selective radioligand for the metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Bioorg Med Chem Lett* 12, 407-409.

Gasparini, F., Lingenhohl, K., Stoehr, N., Flor, P. J., Heinrich, M., Vranesic, I., Biollaz, M., Allgeier, H., Heckendorn, R., Urwyler, S., *et al.* (1999). 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology* 38, 1493-1503.

Haradahira, T., Zhang, M., Maeda, J., Okauchi, T., Kawabe, K., Kida, T., Suzuki, K., and Suhara, T. (2000). A strategy for increasing the brain uptake of a radioligand in animals: use of a drug that inhibits plasma protein binding. *Nucl Med Biol* 27, 357-360.

Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 108, 1731-1108.

Hume, S. P., Ashworth, S., Opacka Juffry, J., Ahier, R. G., Lammertsma, A. A., Pike, V. W., Cliffe, I. A., Fletcher, A., and White, A. C. (1994). Evaluation of [O-methyl-3H]WAY-100635 as an in vivo radioligand for 5-HT1A receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol* 271, 515-523.

Knopfel, T., Kuhn, R., and Allgeier, H. (1995). Metabotropic glutamate receptors: novel targets for drug development. *J Med Chem* 38, 1417-1426.

Kokic, M., Honer, M., Gasparini, F., Schubiger, P.A., Ametamey, S.(2002). Radiolabeling and in vivo evaluation of [11C]-M-MPEP and [18F]-FE-MPEP as imaging agents for the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5). *Nucl Med Biol*, submitted.

Lu, Y. M., Jia, Z., Janus, C., Henderson, J. T., Gerlai, R., Wojtowicz, J. M., and Roder, J. C. (1997). Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci* 17, 5196-5205.

Monaghan, D. T., Bridges, R. J., and Cotman, C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29, 365-402.

Mori, H., and Mishina, M. (1995). Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34, 1219-1237.

Mukherjee, J., Yang, Z. Y., Brown, T., Lew, R., Wernick, M., Ouyang, X., Yasillo, N., Chen, C. T., Mintzer, R., and Cooper, M. (1999). Preliminary assessment of extrastriatal dopamine D-2 receptor binding in the rodent and nonhuman primate brains using the high affinity radioligand, 18F-fallypride. *Nucl Med Biol* 26, 519-527.

Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603.

Neugebauer, V., Lucke, T., and Schaible, H. G. (1994). Requirement of metabotropic glutamate receptors for the generation of inflammation-evoked hyperexcitability in rat spinal cord neurons. *Eur J Neurosci* 6, 1179-1186.

Nicoletti, F., Bruno, V., Catania, M. V., Battaglia, G., Copani, A., Barbagallo, G., Cena, V., Sanchez Prieto, J., Spano, P. F., and Pizzi, M. (1999). Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacology* 38, 1477-1484.

Pagano, A., Ruegg, D., Litschig, S., Stoehr, N., Stierlin, C., Heinrich, M., Floersheim, P., Prezeau, L., Carroll, F., Pin, J. P., *et al.* (2000). The non-competitive antagonists 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine and 7-hydroxyiminocyclopropan[b]chromen-1a-carboxylic acid ethyl ester interact with overlapping binding pockets in the transmembrane region of group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 275, 33750-33758.

Pellicciari, R., and Costantino, G. (1999). Metabotropic G-protein-coupled glutamate receptors as therapeutic targets. *Curr Opin Chem Biol* 3, 433-440.

Petralia, R. S., Wang, Y. X., Singh, S., Wu, C., Shi, L., Wei, J., and Wenthold, R. J. (1997). A monoclonal antibody shows discrete cellular and subcellular localizations of mGluR1 alpha metabotropic glutamate receptors. *J Chem Neuroanat* 13, 77-93.

Pin, J. P., and Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34, 1-26.

Riant, P., Urien, S., Albengres, E., Renouard, A., and Tillement, J. P. (1988). Effects of the binding of imipramine to erythrocytes and plasma proteins on its transport through the rat blood-brain barrier. *J Neurochem* 51, 421-425.

Romano, C., Sesma, M. A., McDonald, C. T., O'Malley, K., Van den Pol, A. N., and Olney, J. W. (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 355, 455-469.

Shigemoto, R., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1992). Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. *J Comp Neurol* 322, 121-135.

Sommer, B., and Seeburg, P. H. (1992). Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol Sci* 13, 291-296.

Varney, M. A., Cosford, N. D., Jachec, C., Rao, S. P., Sacca, A., Lin, F. F., Bleicher, L., Santori, E. M., Flor, P. J., Allgeier, H., *et al.* (1999). SIB-1757 and SIB-1893: selective, noncompetitive antagonists of metabotropic glutamate receptor type 5. *J Pharmacol Exp Ther* 290, 170-181.

Walker, K., Bowes, M., Panesar, M., Davis, A., Gentry, C., Kesingland, A., Gasparini, F., Spooren, W., Stoehr, N., Pagano, A., *et al.* (2001). Metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGlu5) and nociceptive function. I. Selective blockade of mGlu5 receptors in models of acute, persistent and chronic pain. *Neuropharmacology* 40, 1-9.

Wong, E. H., Knight, A. R., and Woodruff, G. N. (1988). [3H]MK-801 labels a site on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex in rat brain membranes. *J Neurochem* 50, 274-281.

Young, M. R., Fleetwood Walker, S. M., Mitchell, R., and Munro, F. E. (1994). Evidence for a role of metabotropic glutamate receptors in sustained nociceptive inputs to rat dorsal horn neurons. *Neuropharmacology* 33, 141-144.

## **Herzlichen Dank an**

Prof. Dr. P. August Schubiger für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit auf dem interessanten Gebiet der Radiopharmazie durchführen zu können

PD Dr. Simon Ametamey für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die interessante Aufgabenstellung

Dr. Michael Honer für die Einführung in das Thema und in die *in vitro* Experimente, seine kompetenten Auskünfte sowie die Anregungen und Korrekturen beim Schreiben dieser Arbeit

Lea Kessler für die angenehme Zusammenarbeit bei den [<sup>11</sup>C]-Experimenten und die Erfahrungen und Tipps aus ihrer Diplomarbeit

Anass Johayem für seine Unterstützung und Motivierung während dieser Zeit

Claudia Keller für ihre Hilfe im Labor und die Entnahme des Blutes, das ich für die Experimente brauchte

der ganzen PET-Gruppe, am PSI und am USZ, für die herzliche und kollegiale Aufnahme