



Master Thesis

Bindungsstudie am α_7 -Rezeptor des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors mittels kompetitiver Verdrängungsanalyse

Author(s):

Schibig, Anita

Publication Date:

2002

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004432478> →

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

Ecole polytechnique fédérale de Zurich
Politecnico federale di Zurigo
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Departement Angewandte Biowissenschaften

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften

Bindungsstudie am α_7 -Rezeptor des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors mittels kompetitiver Verdrängungsanalyse

Diplomarbeit

von

Anita Schibig

Bürgerin von Küsnacht ZH und Steinen SZ

Leiter: Prof. Dr. P.A. Schubiger

Betreuer: Dr. G. Westera

Betreuer: W. Bisson

04. März bis 26. Juli 2002

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	4
2. EINLEITUNG	5
2.1 Der nicotinsche Acetylcholin-Rezeptor	5
2.2 α-Bungarotoxin	6
2.3 In vitro Bindungsstudien	7
2.3.1 Allgemeines zu Bindungsstudien	7
2.3.2 Der Radioligand	8
2.3.3 Inkubationsdauer	8
2.3.4 Inkubationstemperatur	8
2.3.5 Puffer und deren pH-Werte	9
2.3.6 Trennung von freiem und gebundenem Radioliganden	9
2.4 Ziel der Arbeit	9
3. MATERIALIEN UND METHODEN.....	11
3.1 Rattenhirne	11
3.2 Membranpräparation	11
3.3 Verdrängungsstudien	11
3.3.1 Waschen der Membranen und Proteinbestimmung	11
3.3.2 Bestimmung der idealen Proteinkonzentration	12
3.3.3 [¹²⁵ I]- ⁵⁴ Tyr- α -Bungarotoxin als Radioligand	12
3.3.4 Bindungsstudien mit [¹²⁵ I]- ⁵⁴ Tyr- α -Bungarotoxin	13
3.3.5 Überprüfung der gewählten Bindungsparameter	14
4. RESULTATE	15
4.1 Vorversuche	15
4.1.1 Bestimmung der idealen Proteinkonzentration	15
4.1.2 Affinitätsbestimmung von α -Bungarotoxin	15
4.2 Verdrängungsanalyse mit [¹²⁵I]-⁵⁴Tyr-α-Bungarotoxin	16
4.2.1 Fluorphenylcytisin (FPC)	16
4.2.2 LJ20W	17
4.2.3 LJ71	18
4.2.4 LJ37	19
4.2.5 (+)-2PABH	20
4.2.6 LJ45c	21
4.2.7 LJ33b	22
4.2.8 (-)-2PABH	23
4.2.9 Bromcytisin (BC)	24
4.2.10 Übersicht der Daten aus der Affinitätsbestimmung	25

5. DISKUSSION.....	26
6. ABKÜRZUNGEN.....	29
7. LITERATUR.....	31
8. ANHANG	33

1. Zusammenfassung

Der zu den ligandgesteuerten Ionenkanälen gehörende nicotinsche Acetylcholinrezeptor (nAChR) wird sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem exprimiert. Im Gehirn ist der nAChR an einigen wichtigen Hirnfunktionen beteiligt und scheint auch mit dem Auftreten von pathologischen Krankheiten wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer in Zusammenhang zu stehen.

Der im Gehirn dominant und in grossen Mengen vorkommende $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp des nAChRs wurde bereits in früheren Arbeiten genauer untersucht. Es wurden die Affinitäten von verschiedenen Liganden an diesen Subtyp bestimmt und elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Um das Wissen über die Eigenschaften des nAChRs zu erweitern, bestand die Aufgabe dieser Diplomarbeit darin, die Affinitäten von neun verschiedenen Liganden an den α_7 -Subtyp zu bestimmen. Der α_7 -Subtyp ist ebenfalls ein wichtiger Subtyp der nAChR, wird jedoch verglichen mit dem $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp im Gehirn in viel kleineren Konzentrationen exprimiert und wurde daher in der Vergangenheit kaum untersucht.

Bei den neun potentiellen Liganden für den α_7 -nAChR handelte es sich um modifizierte Strukturen des Epibatidins, bzw. des Cytisins. Dies sind beides spezifische und hochaffine Liganden des $\alpha_4\beta_2$ -Subtyps.

Die Affinitäten der neun zu untersuchenden Liganden wurden mittels der kompetitiven Verdrängungsanalyse mit [125 I]- 54 Tyr- α -Bungarotoxin bestimmt. Es wurde eine Inhibitionskurve ermittelt und daraus der IC_{50} -Wert abgelesen und der K_i -Wert berechnet.

Die affinste Substanz für den α_7 -Rezeptor war Bromcytisin mit einem K_i von 7.47 nM. Gefolgt von (-)-2PABH (0.14 μ M), LJ33b (0.33 μ M), LJ45c (0.49 μ M), (+)-2PABH (0.77 μ M), LJ37 (1.29 μ M), LJ71 (2.46 μ M), LJ20W (17.8 μ M) und Fluorphenylcytisin (31.9 μ M).

Aufgrund der ermittelten Affinitätsdaten kommt höchstens Bromcytisin für eine Weiterentwicklung zu einem potentiellen PET-Liganden in Frage. Es können jedoch alle Daten für vertiefte Studien am nAChR weiterverwendet werden, z.B. für Molecular Modelling. So sollte es möglich werden, dem Ziel von der Entwicklung und der Synthese eines spezifischen und affinen Liganden für den nAChR für die PET-Forschung und -Diagnostik näher zu kommen.

2. Einleitung

2.1 Der nicotinsche Acetylcholin-Rezeptor

Die nicotinschen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) gehören zur Klasse der ligand-gesteuerten Ionenkanal-Rezeptoren. Sie befinden sich auf motorischen Endplatten von Skelettmuskelzellen, auf postganglionären sympathischen und parasympathischen Neuronen und auf hormon produzierenden Zellen der adrenergen Drüsen [1]. nAChR sind membrandurchspannende aus 5 Untereinheiten aufgebaute Glykoproteine. Bisher konnten neun α , drei β , eine γ , eine δ und eine ϵ Untereinheiten identifiziert werden [2].

Die nAChR werden in die Klassen der muskulären und neuronalen Typen aufgeteilt. Der muskuläre Typ bildet Heterooligomere aus α , β , γ und δ Untereinheiten. Der neuronale Typ hingegen bildet Heterooligomere nur aus α und β Untereinheiten oder zum Teil Homooligomere aus α Untereinheiten.

Jede Untereinheit wird in eine N-terminale Domäne bzw. ligandbindene Domäne, eine transmembranäre und eine intrazelluläre Region eingeteilt [3].

Der Rezeptorkomplex selber lässt sich wiederum in drei Bereiche unterteilen: einen grossen Eingangsbereich an der äusseren Membranoberfläche, eine enge transmembranäre Pore, die für die Kationenselektivität (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) verantwortlich ist und einen grossen Ausgangsbereich an der inneren Membranoberfläche.

Die ligandbindenden Domänen sind ca. 210 Aminosäure-Reste lang und enthalten Bindungsstellen für Agonisten und kompetitive Antagonisten. Das Binden eines Agonisten induziert ein rasches Öffnen des Ionenkanals, was zu einer Änderung des Membranpotentials führt. Der zugrunde liegende Mechanismus ist mit allosterischen Interaktionen zwischen den Untereinheiten zu erklären.

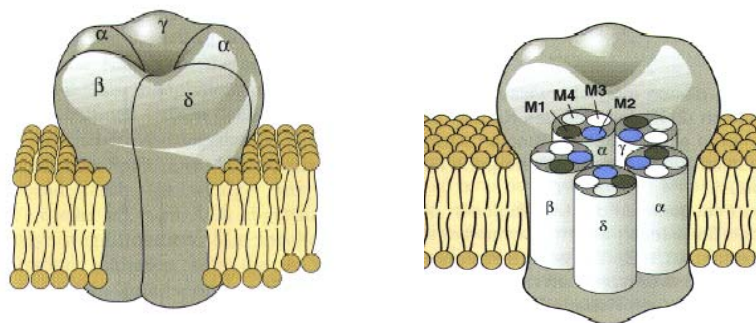


Abb. 1 links: Die fünf transmembranären Untereinheiten bilden den nAChR, welcher zur Familie der ligand-gesteuerten Ionenkanäle gehört. Man erkennt die grössere Eingangsdomäne, die Pore, welche für die Kationenselektivität verantwortlich ist und die kleinere innere cytosolische Domäne. **Rechts:** Jede Untereinheit ist aus vier transmembranären Domänen aufgebaut, M1 bis M4.

Der häufigste Subtyp von nAChR, der übers ganze zentrale Nervensystem (ZNS) verteilt vorkommt ist der $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp. Ein anderer wichtiger, jedoch weniger häufig vorkommender Subtyp ist der α_7 -Rezeptor, welcher sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem (PNS) exprimiert wird. Die nAChR des ZNS sind an verschiedenen wichtigen Hirnfunktionen wie Lernen, Emotionen und kognitiven Funktionen beteiligt. Zusätzlich kann man heute auch einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von nAChR und dem Auftreten von pathologischen Krankheitsbildern wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Schizophrenie herstellen [1,13].

Bisher existieren nur wenige Radioliganden, die für diese nAChR-Subtypen spezifisch sind. Solche Liganden zu finden, die *in vivo* appliziert werden können, würden einen grossen Fortschritt für die Forschung und die Frühdiagnostik der neurodegenerativen Krankheiten bedeuten.

2.2 α -Bungarotoxin

α -Bungarotoxin (α -BGT) ist ein α -Neurotoxin, welches aus der Schlange *Bungarus multicinctus* (Vielbindenbungar, Taiwan banded krait) isoliert werden konnte.



Abb. 2 *Bungarus multicinctus* gehört zur Familie der Giftnattern [Elapidae]. Zu dieser Familie gehören unter anderem auch die Mambas, Kobras und Ottern. Der LD_{50} von α -BGT beträgt für die Maus 0.15 mg/kg.

α -Neurotoxine sind Curare-Mimetika und binden mit sehr hoher Affinität an den postsynaptischen nAChR und blockieren dadurch die neuromuskuläre Transmission. Die α -Neurotoxine werden in 2 Klassen eingeteilt: kurze Neurotoxine mit 60 bis 62 Aminosäuren und 4 Disulfidbrücken und lange Neurotoxine mit 66 bis 74 Amino-

säuren und 5 Disulfidbrücken. Beide Klassen weisen eine signifikante Sequenz-Homologität auf und besitzen die gleiche dreidimensionale Struktur.

α -Bungarotoxin besteht aus 74 Aminosäuren und enthält 5 Disulfidbrücken und gehört demnach der Klasse der langen Neurotoxine an. Da α -Bungarotoxin mit hoher Affinität und Spezifität an den α_7 -Subtyp des nAChR bindet, diente es als wichtiges Werkzeug in diversen Studien, um die neuromuskuläre Transmission verstehen und Struktur-Funktions-Beziehungen am nAChR untersuchen zu können [7,8,9].

2.3 In vitro Bindungsstudien

2.3.1 Allgemeines zu Bindungsstudien

Diese einfache und vielfältige Methode der Bindungsstudien eignet sich besonders, um Rezeptor-Ligand-Interaktionen *in vitro* zu untersuchen. Es besteht jedoch der Nachteil, dass keine funktionelle Antwort messbar ist und dass sich die *in vitro* Bedingungen stark von den *in vivo* Bedingungen unterscheiden können.

Bei den Bindungsstudien werden Membranbestandteile aus bestimmten Geweben mit radioaktiv markierten Liganden inkubiert. Durch verschiedene Konzentrationen eines Verdrängers wird die Radioligandbindungsstelle am Rezeptor kompetitiert. Durch Vakuumfiltration des Inkubationsansatzes wird der freie Radioligand vom Radioligand-Rezeptor-Komplex abgetrennt.

Die nicht-spezifische Bindung wird durch die Zugabe eines Überschusses eines etablierten, kompetitiven Liganden ermittelt und anschliessend von der totalen Radioligandbindung subtrahiert. Als Mass für die Affinität des Liganden an die Rezeptorbindungsstelle wird in dieser Verdrängungsanalyse die Inhibitionskonstante K_i ermittelt.

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

- Gl. 1** Cheng Prusoff-Gleichung:
 IC_{50} Verdrängerkonzentration, bei der die Spezifische Bindung des Radioliganden 50 % beträgt
 F freie Radioligandkonzentration
 K_D Dissoziationskonstante

2.3.2 Der Radioligand

Im Allgemeinen wird ein Radioligand gewählt, welcher entweder mit ^3H (HWZ 12 Jahre, β -Strahler) oder mit ^{125}I (HWZ 60 Tage, γ -Strahler) markiert ist. Zusätzlich soll der Radioligand möglichst affin und spezifisch für den zu untersuchenden Rezeptor sein. Zu hohe Affinität an den Rezeptor sollte jedoch auch vermieden werden, da sich der Radioligand ansonsten nicht mehr gut durch den Verdränger von der Bindungsstelle kompetitieren lässt.

2.3.3 Inkubationsdauer

Bei Bindungsstudien werden die Proben so lange inkubiert, bis ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation am Rezeptor, d.h. bis ein steady state erreicht ist. Dies ist jedoch meistens nur im Idealfall erfüllt. Deshalb ist es wichtig bei den Versuchsbedingungen die Inkubationsdauer genau zu definieren.

2.3.4 Inkubationstemperatur

Die gebräuchlichsten Inkubationstemperaturen liegen bei 4°C , 22°C und 37°C , wobei Raumtemperatur, d.h. 22°C am einfachsten und am bequemsten zu handhaben ist. Jedoch muss beachtet werden, dass die Angabe Raumtemperatur nicht sehr präzise ist, da sich diese zwischen 20° und 25°C bewegen kann.

Oft wird eine Inkubationstemperatur von 37°C gewählt, da dies viel eher den physiologischen Verhältnissen entspricht.

Gründe, um den Bindungsversuch bei 4°C auszuführen sind, dass der Radioligand weniger vom Rezeptor abdissoziiert und dass oft eine tiefere nicht-spezifische Bindung erreicht wird. Allerdings tritt bei dieser tiefen Temperatur der Nachteil auf, dass ein Radioligand eine veränderte Affinität zu seinen Rezeptorbindungsstellen aufweisen kann.

2.3.5 Puffer und deren pH-Werte

Der pH der Inkubationsansätze sollte im physiologischen Bereich, d.h. zwischen pH 7 und 8 liegen. Oft wird in solchen Bindungsstudien der Tris(hydroxymethyl)amino-methan-Puffer verwendet. Oder es wird mit einem mit Salzen angereicherten Puffer (BSS-Puffer) gearbeitet.

2.3.6 Trennung von freiem und gebundenem Radioliganden

Da man die Quantität des Rezeptor-Ligand-Komplexes bestimmen will, ist es wichtig eine Dissoziation des Liganden vom Rezeptor zu verhindern, da sonst das Ergebnis verfälscht werden kann. Die Trennung des freien vom gebundenen Radioliganden ist demnach ein relativ heikler Punkt der Bindungsstudie. Um die Dissoziationswahrscheinlichkeit des Liganden vom Rezeptor möglichst zu reduzieren, sollte man bei tiefen Temperaturen und so rasch als möglich arbeiten.

Die am häufigsten verwendete Technik ist die Vakuumfiltration durch Glasfaserfilter. Der grosse Rezeptor-Ligand-Komplex bleibt dabei auf dem Filter liegen, während dem der freie Ligand den Filter passiert und anschliessend im Filtrat vorliegt.

Um die nicht-spezifische Bindung möglichst gering zu halten, werden die Filter mehrmals mit grösseren Mengen an eisgekühltem Puffer gewaschen. Zusätzlich können die Filter mit bestimmten Lösungen (z.B. Polyethylenimin 0.1%) vorgewaschen werden.

Eine Alternative zur Vakuumfiltration stellt die Zentrifugation dar. Diese Methode wird vor allem für Liganden mit kleineren Affinitäten eingesetzt.

2.4 Ziel der Arbeit

Epibatidin ist ein Ligand, welcher mit hoher Spezifität und Affinität (K_i 43 pM, [11]) an den $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp des nAChRs bindet, ist jedoch für einen therapeutischen Einsatz zu toxisch. Es wurden als Folge davon einige Epibatidin-Derivate auf deren Affinität zum $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp hin untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es nun, die Kenntnis über den nAChR zu erweitern. Es sollten die Affinitäten der neun Substanzen LJ20W, LJ33b, LJ37, LJ45c, LJ71, BC, FPC,

(+)-2PABH und (-)-2PABH an den α_7 -Subtyp des nAChRs bestimmt werden. Bei den neun Substanzen handelt es sich um modifizierte Moleküle des Epibatidins bzw. des Cytisins. Cytisin ist ebenfalls ein spezifischer und affiner Ligand für den $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptor (K_i 0.16 nM, [12]), ist jedoch für einen therapeutischen Einsatz auch zu toxisch.

Mittels der Methode der kompetitiven Verdrängungsanalyse und dem [125 I]- 54 Tyr- α -Bungarotoxin als Radioligand, sollte für jede Substanz eine Inhibitionskurve ermittelt werden. Anschliessend sollte daraus der IC_{50} -Wert bestimmt und der K_i -Wert für die jeweilige Substanz berechnet werden.

Aufgrund dieser neuen Affinitätsdaten am α_7 -Rezeptor soll dem Fernziel des Gesamtprojektes, unter welchem diese Diplomarbeit durchgeführt wurde, näher gekommen werden. Das Fernziel besteht darin, einen spezifischen und affinen Radioliganden für den nAChR zu finden, welcher in der PET-Forschung bzw. -Diagnostik von neurodegenerativen Krankheiten eingesetzt werden kann.

3. Materialien und Methoden

3.1 Rattenhirne

Bereits präparierte Rattengesamthirne von männlichen, ca. 200 g schweren Sprague-Dawley Ratten wurden von der Firma Charles River Wiga GmbH, D-Kisslegg bezogen und bei -80°C eingefroren.

3.2 Membranpräparation

Die eingefrorenen Rattengesamthirne wurden gewogen und in ca. 10 Volumenteilen (bezogen auf das Ausgangsgewicht) eiskaltem Sucrose-Puffer (0.32 M Sucrose, Tris/Ac pH 7.4, NaN_3 0.02%) auf Eis aufgetaut. Mit Hilfe eines Polytrons (Polytron[®] PT 1200 Kinematica AG) wurden die Hirne während ca. 20 Sekunden auf der Stufe 4 mit dem grössten Stab (Durchmesser 1 cm) homogenisiert und anschliessend zentrifugiert (1000 g, 4°C , 15 min). Der Überstand S1 (Membranen!) wurde vorsichtig abpipettiert und auf Eis gekühlt.

Das Pellet P1 wurde erneut mit 5 Volumenteilen Sucrose-Puffer versetzt, mit dem Polytron homogenisiert und zentrifugiert (1000 g, 4°C , 15 min). Der entstandene Überstand wurde abdekantiert und mit dem Überstand S1 vereinigt. Dieser gepoolte Überstand wurde anschliessend wieder zentrifugiert (17000 g, 4°C , 20 min).

Das Pellet P2 (Membranen!) wurde in 5 mM Tris/Ac pH 7.0 resuspendiert und erneut zentrifugiert (17000 g, 4°C , 20 min). Anschliessend wurde das Pellet P2 in 5 mM Tris/AC pH 7.4 resuspendiert und zentrifugiert (17000 g, 4°C , 20 min).

Zum Schluss wurde das Pellet P2 in 50 mM Tris/Ac pH 7.4 aufgenommen, so dass die Proteinkonzentration ca. 2 – 10 mg/ml betrug. Die Aliquots à 1 ml wurden bei -80°C eingefroren.

3.3 Verdrängungsstudien

3.3.1 Waschen der Membranen und Proteinbestimmung

Die während der Membranpräparation hergestellten Membranaliquots wurden auf Eis aufgetaut und während fünf Minuten mit 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Beckmann

CS-15R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 700 µl eiskaltem BSS-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) resuspendiert und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 4°C, 5 Minuten). Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 400 µl eiskaltem BSS-Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Membranen wurde mit dem Bradford Biorad Microassay bestimmt [4]. Die Eichgerade wurde mit einem BSA-Standard (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Rinderserumalbumin, Micro Standard 1 mg/ml in 0.15 M NaCl, D-Steinheim) hergestellt.

3.3.2 Bestimmung der idealen Proteinkonzentration

Um die ideale Proteinkonzentration für die Verdrängungsstudie zu bestimmen, wurde die Spezifische Bindung mit zwei aus der Literatur [6,10] beschriebenen Membrankonzentrationen (0.5 und 2 µg/µl) bestimmt.

Mit der kleinst möglichen Proteinkonzentration sollte ein Spezifische Bindung von mindestens 50 – 60% erreicht werden. Die Spezifische Bindung wird aus der nicht-spezifischen Bindung und der totalen Bindung berechnet (Gl. 2).

$$SP = 100 - \left(100 \times \frac{NSB}{TB} \right)$$

Gl. 2 Berechnung der Spezifischen Bindung (SB) aus der nicht-spezifischen Bindung (NSB) und der totalen Bindung (TB).

3.3.3 [¹²⁵I]-⁵⁴Tyr-α-Bungarotoxin als Radioligand

α-Bungarotoxin ist ein aus der Schlange *Bungarus multicinctus* isoliertes Schlangengift. Es handelt sich dabei um ein Peptid aus 74 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 8 kDa.

α-Bungarotoxin wirkt als irreversibler Antagonist am nAChR und blockiert dadurch die neuronale Transmission. Es bindet spezifisch und mit hoher Affinität (K_D 0.7 nM) an den α₇-Subtyp [5].

3.3.4 Bindungsstudien mit [¹²⁵I]-⁵⁴Tyr- α -Bungarotoxin

Die Bindungsaffinitäten der neun zu untersuchenden Substanzen an den α_7 -Subtyp wurden mittels Verdrängungsstudien mit 0.5 nM [¹²⁵I]-⁵⁴Tyr- α -Bungarotoxin (spezifische Aktivität = 5.42 TBq/mmol, Perlin Elmer Life Sciences, Inc., USA-Boston) ermittelt.

Die Bindungsstudien wurden in Polystyrolröhrchen mit einem Gesamtvolumen von 0.2 ml durchgeführt. Für die Verdränger wurden je nach Substanz wässrige Lösungen in Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-15} M (0.1 mM bis 1 fM) verwendet. Die Membranproteine wurden in einer Endkonzentration von 100 μ g/200 μ l zugesetzt. Das Volumen wurde mit BSS-Puffer ergänzt.

Die nicht-spezifische Bindung wurde mit α -Bungarotoxin (Sigma-Aldrich GmbH, Snake Toxin von Bungarus multicinctus, 1 mg lyophilisiert, D-Steinheim) in einer Endkonzentration von 10^{-5} M (10 μ M) ermittelt.

Die Inkubationsansätze wurden während 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde durch Vakuumfiltration durch GF/B Whatman®-Filter (1 Stunde in PEI 0.1% vorgewaschen) der freie Ligand vom Radioligand-Rezeptor-Komplex getrennt. Die Filter wurden dreimal mit 4 ml eiskaltem BSS-Puffer gewaschen und anschliessend im γ -Counter (Cobra™ II, Auto-Gamma®, Packard®, A Canberra Company) während 1 Minute gezählt.

Aus den erhaltenen Rohdaten konnte mit dem Computerprogramm KELL Biosoft® Radling („single site competitive modell“) die Inhibitionskurve, der IC₅₀ und der K_i-Wert ermittelt werden. Um aus der Inhibitionskurve und dem IC₅₀-Wert den K_i-Wert berechnen zu können, verwendet die Software die Cheng-Prusoff-Gleichung (Gl. 1). Der K_i-Wert hat gegenüber dem IC₅₀ den Vorteil, dass er unabhängig von der Affinität und der Konzentration des verwendeten Radioliganden ist, das heisst, die Daten lassen sich viel besser vergleichen.

Alle Substanzen wurden jeweils in Triplikaten gemessen und der Versuch wurde mindestens dreimal in unabhängigen Ansätzen wiederholt. Die Resultate werden als Mittelwert mit der (\pm) Standardabweichung (Stabw.) angegeben.

3.3.5 Überprüfung der gewählten Bindungsparameter

Um die Methode der Verdrängungsanalyse mit den gewählten Versuchsparametern validieren zu können, wurde ein Vorversuch mit α -BGT durchgeführt. Dabei wurden von α -BGT die Inhibitionskurve und der IC_{50} -Wert bestimmt und der K_i -Wert berechnet.

Diese im Experiment bestimmten Daten von α -BGT wurden mit den aus der Literatur bereits bekannten Daten [5,10] verglichen. Nur durch diesen Datenvergleich wurde es möglich, die in der Verdrängungsanalyse bestimmten Daten zu beurteilen und zu validieren.

4. Resultate

4.1 Vorversuche

4.1.1 Bestimmung der idealen Proteinkonzentration

Sowohl für die Proteinkonzentration von $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ als auch für die Konzentration von $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurde eine Spezifische Bindung von über 60% berechnet (Gl. 2). In der Folge wurden daher alle Bindungsexperimente mit der kleineren Proteinkonzentration von $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ durchgeführt.

4.1.2 Affinitätsbestimmung von α -Bungarotoxin

Mit der ermittelten Inhibitionskurve (Abb. 3) konnte ein K_i -Wert von 0.47 nM berechnet werden. Dieser Wert ist mit den in der Literatur beschriebenen Werten vergleichbar (Tab. 1).

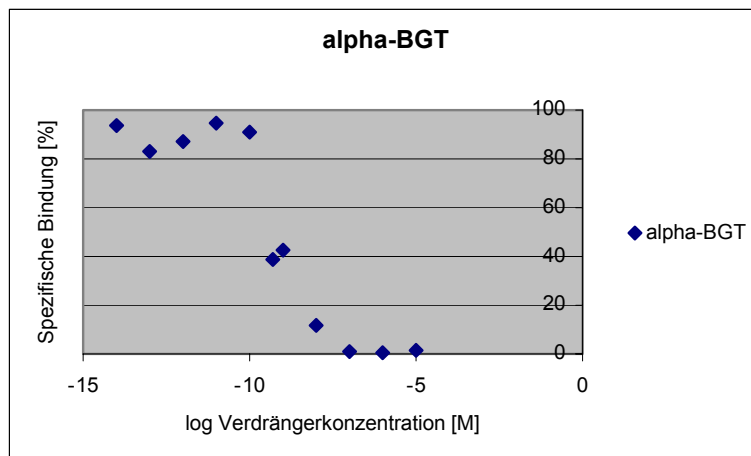


Abb. 3 Inhibitionskurve von α -BGT. Der ermittelte K_i -Wert aus vier unabhängigen Experimenten beträgt 0.47 nM .

Tab. 1 K_i -Werte von α -Bungarotoxin: durch Verdrängungsanalyse bestimmte Werte und Werte aus der Literatur.

	K_i -Wert		
	gemessen (n=4)	Literatur [5]	Literatur [10]
α -BGT	$0.47 \pm 0.16 \text{ nM}$	$0.48 \pm 0.07 \text{ nM}$	$0.7 \pm 0.01 \text{ nM}$

4.2 Verdrängungsanalyse mit [125 I]- 54 Tyr- α -Bungarotoxin

4.2.1 Fluorphenylcytisin (FPC)

Bei FPC handelt es sich um ein modifiziertes Cytisin-Analogon. Es wurde in ortho-Position zur Carbonylgruppe eine p-Fluorphenylgruppe eingeführt.

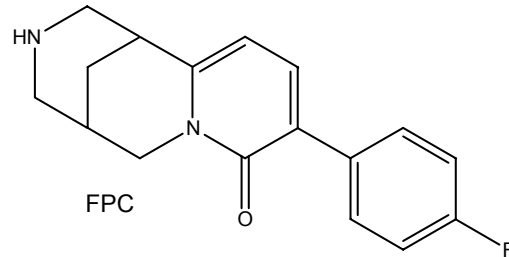


Fig. 1 Fluorphenylcytisin. Im Gegensatz zum Cytisin enthält FPC in ortho-Position zur Carbonylgruppe einen p-Fluorphenyl-Substituenten.

Für die Bestimmung des K_i -Wertes wurden Verdrängerkonzentrationen von $5 \cdot 10^{-5}$ bis $5 \cdot 10^{-14}$ M verwendet. Der ermittelte K_i -Wert beträgt $31.9 \mu\text{M} \pm 4.33 \mu\text{M}$ und wurde aus drei gemittelten Experimenten bestimmt.

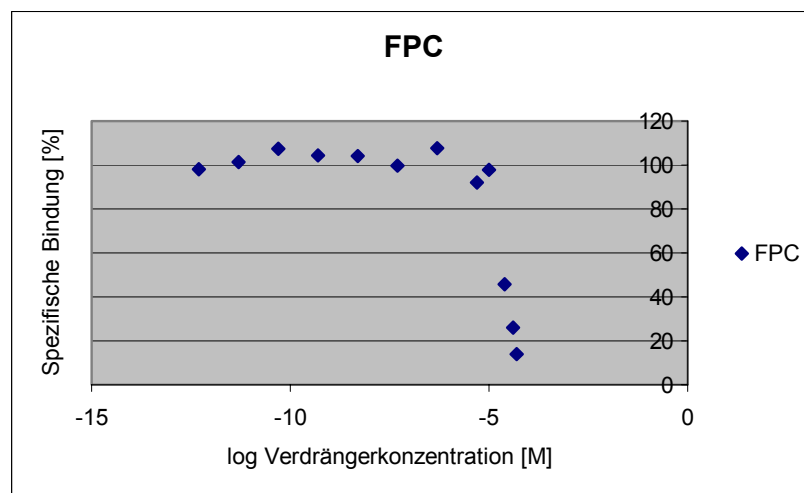


Abb. 4 Inhibitionskurve von FPC aus den drei gemittelten Verdrängungsanalysen mit [125 I]- 54 Tyr- α -Bungarotoxin. Der mittels der Inhibitionskurve ermittelte K_i -Wert beträgt $31.9 \mu\text{M} \pm 4.33 \mu\text{M}$.

4.2.2 LJ20W

LJ20W weist eine modifizierte Struktur vom Epibatidin auf. Dabei wurde der Bicyklus zu einem [3.2.1]oktan-Ring erweitert, der Stickstoff im Bicyklus methyliert, eine Etherbrücke zwischen dem Bicyklus und dem Pyridinring eingefügt und das Chlor am Pyridin entfernt.

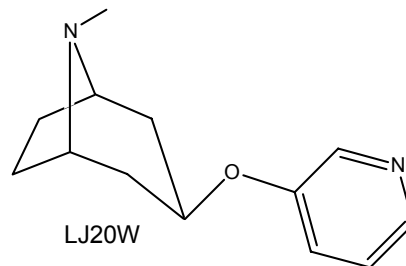


Fig. 2 Beim LJ20W handelt es sich um ein an vier Stellenmodifiziertes Epibatidin-Derivat. Der Bicyklus wurde zu einem [3.2.1]oktan-Ring erweitert, der Stickstoff im Bicyklus wurde methyliert, es wurde eine Etherbrücke zwischen die beiden Ringsysteme eingeführt und das Chlor am Pyridinring wurde entfernt.

Der gemittelte K_i -Wert aus drei Experimenten beträgt für LJ20W $17.8 \mu\text{M} \pm 2.9 \mu\text{M}$. Es wurden dafür Verdrängerkonzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-13} M verwendet.

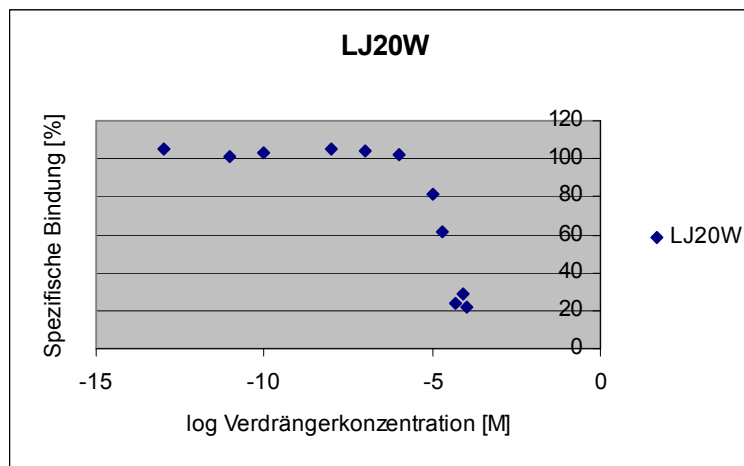
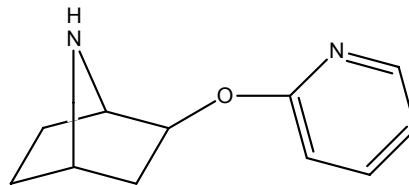


Abb. 5 Inhibitionskurve von LJ20W aus drei gemittelten Verdrängungsanalysen mit $[^{125}\text{I}]-^{54}\text{Tyr}-\alpha$ -Bungarotoxin. Der dadurch ermittelte K_i -Wert beträgt $17.8 \mu\text{M} \pm 2.9 \mu\text{M}$.

4.2.3 LJ71

Die Struktur von LJ71 ist eine modifizierte Epibatidin-Struktur, wobei das Epibatidin an drei Stellen abgeändert wurde. Es wurde eine Etherbrücke zwischen dem Bicyclus und dem Pyridinring eingeführt, der Stickstoff des Pyridinrings wurde von der meta- in die ortho-Position verschoben und das Chlor wurde vom Pyridinring entfernt.



LJ71

Fig. 3 Im Gegensatz zum Epibatidin, trägt der Pyridinring im LJ71 keine Chlorgruppe und der Stickstoff wurde in die ortho-Position verschoben. Zusätzlich dazu hat es beim LJ71 eine Etherbrücke zwischen den beiden Ringsystemen.

Der K_i -Wert von LJ71 beträgt $2.46 \mu\text{M} \pm 0.84 \mu\text{M}$ und wurde aus den gemittelten Daten von drei Verdrängungsanalysen bestimmt. Die Konzentrationen der Verdrängerlösungen von LJ71 lagen zwischen 10^{-3} und 10^{-12} M.

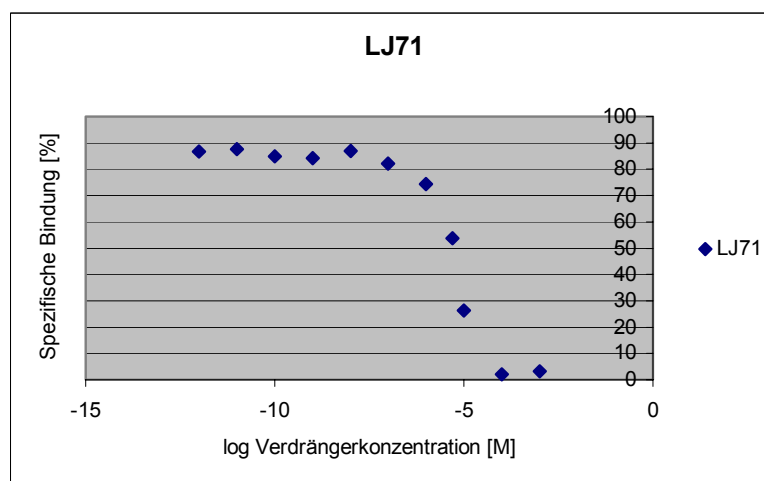


Abb. 6 Für LJ71 konnte aus der aus drei Verdrängungsanalysen mit $[^{125}\text{I}]\text{-}^{54}\text{Tyr-}\alpha\text{-Bungarotoxin}$ bestimmten Inhibitionskurve ein K_i -Wert von $2.46 \mu\text{M} \pm 0.84 \mu\text{M}$ berechnet werden.

4.2.4 LJ37

LJ37 ist ein modifiziertes Epibatidin-Derivat. Die Modifikationen erfolgten nur an zwei Stellen im Epibatidingerüst. Es wurde das Chlor aus dem Pyridinring eliminiert und zwischen dem Bicyklus und dem Pyridinring wurde eine Etherbrücke eingeführt.

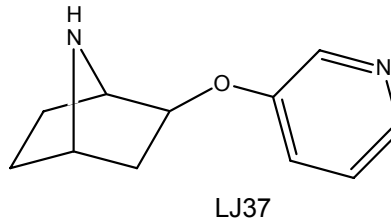


Fig. 4 Im Gegensatz zum Epibatidin wurde bei LJ37 das Chlor aus dem Pyridinring entfernt und eine Etherbrücke zwischen dem Bicyklus und dem Pyridinring eingeführt.

Aus drei gemittelten Verdrängungsanalysen wurde für LJ37 ein K_i -Wert von $1.29 \mu\text{M} \pm 0.05 \mu\text{M}$ bestimmt. Dazu wurden von LJ37 Verdrängerkonzentrationen zwischen 10^{-4} und 10^{-13} M verwendet.

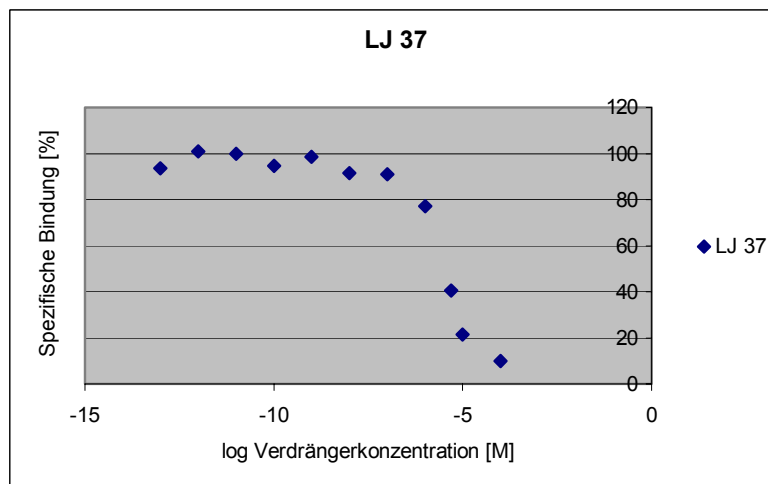


Abb. 7 Mit $[^{125}\text{I}]-^{54}\text{Tyr}-\alpha\text{-Bungarotoxin}$ konnte in der Verdrängungsanalyse von LJ37 ein aus drei Experimenten gemittelter K_i -Wert von $1.29 \mu\text{M} \pm 0.05 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

4.2.5 (+)-2PABH

Bei (+)-2-(2-pyridyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptan [(+)-2PABH] handelt es sich um eine modifizierte Struktur des Epibatidingerüsts. Dabei wurde das Chlor aus dem Pyridinring entfernt und der Stickstoff im Pyridinring wurde von der meta- in die ortho-Position verschoben.

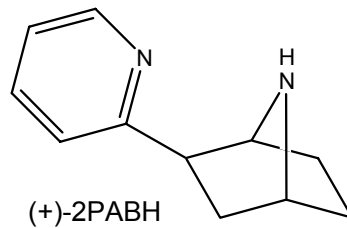


Fig. 5 Im Gegensatz zum Epibatidin hat (+)-2PABH keinen Chlorsubstituenten am Pyridin und der Stickstoff im Pyridinring befindet sich anstelle in meta- in ortho-Position.

In drei unabhängigen Versuchen wurde für (+)-2PABH ein K_i -Wert von $0.77 \mu\text{M} \pm 0.09 \mu\text{M}$ ermittelt. Die dazu eingesetzten Verdrängerlösungen wiesen Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-12} M auf.

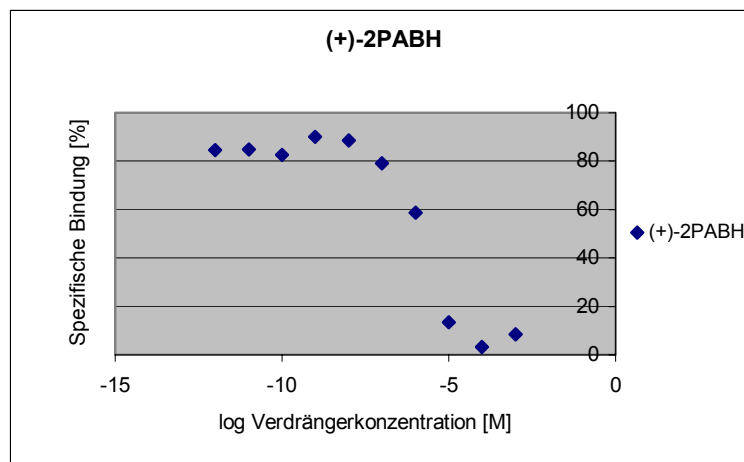


Abb. 8 Der mittels Verdrängungsstudie mit $[^{125}\text{I}]\text{-}^{54}\text{Tyr-}\alpha\text{-Bungarotoxin}$ ermittelte K_i -Wert beträgt für (+)-2PABH $0.77 \mu\text{M} \pm 0.09 \mu\text{M}$.

4.2.6 LJ45c

Bei LJ45c handelt es sich um eine an vier Stellen abgewandelte Epibatidinstruktur. Das Chlor im Pyridinring wurde entfernt und anstelle von diesem Halogen wurde ein Fluor im Bicyklus eingeführt. Der Bicyklus wurde um einen Kohlenstoff zum [3.2.1]oktan-Ring erweitert. Die vierte modifizierte Stelle betrifft den Stickstoff im Bicyklus, welcher methyliert wurde.

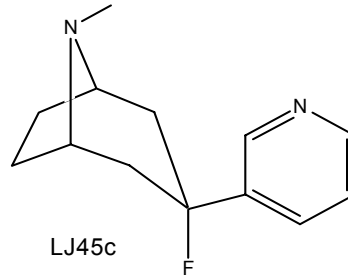


Fig. 6 LJ45c ist ein an vier Stellen abgewandeltes Epibatidinprodukt. Der Bicyklus wurde zum [3.2.1]oktan-Ring erweitert und dessen Stickstoff wurde methyliert. Das Chlor im Pyridinring wurde entfernt und dafür wurde ein Fluor im Bicyklus eingeführt.

In vier unabhängigen Versuchen wurde für das LJ45c ein K_i -Wert von $0.49 \mu\text{M} \pm 0.19 \mu\text{M}$ ermittelt. Die Konzentrationen der Verdrängerlösungen betragen 10^{-4} bis 10^{-13} M.

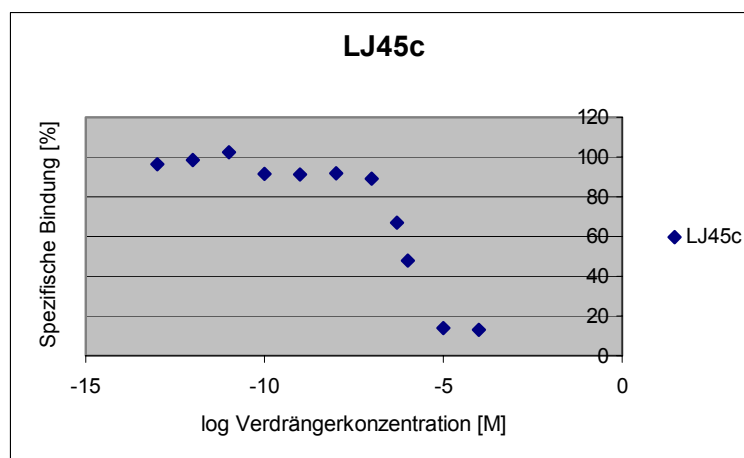


Abb. 9 Der mittels vier Verdrängungsanalysen mit $[^{125}\text{I}]-^{54}\text{Tyr}-\alpha$ -Bungarotoxin ermittelte K_i -Wert beträgt für LJ45c $0.49 \mu\text{M} \pm 0.19 \mu\text{M}$.

4.2.7 LJ33b

Bei LJ33b handelt es sich erneut um ein an mehreren Stellen abgewandeltes Epibatidinmolekül. Der [2.2.1]heptan-Ring wurde zu einem [3.2.1]okten-Ring erweitert und dehydriert. Der Stickstoff im Bicyklus wurde methyliert und das Chlor wurde aus dem Pyridinring eliminiert.

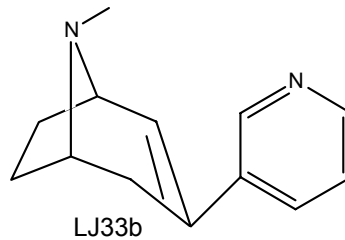


Fig. 7 LJ33b ist eine abgewandelte Epibatidinstruktur. Der Bicyklus wurde zum [3.2.1]okten-Ring erweitert, der Stickstoff im Bicyklus wurde methyliert und das Chlor wurde aus dem Pyridinring eliminiert.

Der aus drei Experimenten ermittelte K_i -Wert für LJ33b beträgt $0.33 \mu\text{M} \pm 0.15 \mu\text{M}$. Die dazu verwendeten Verdrängerlösungen wiesen Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-13} M auf.

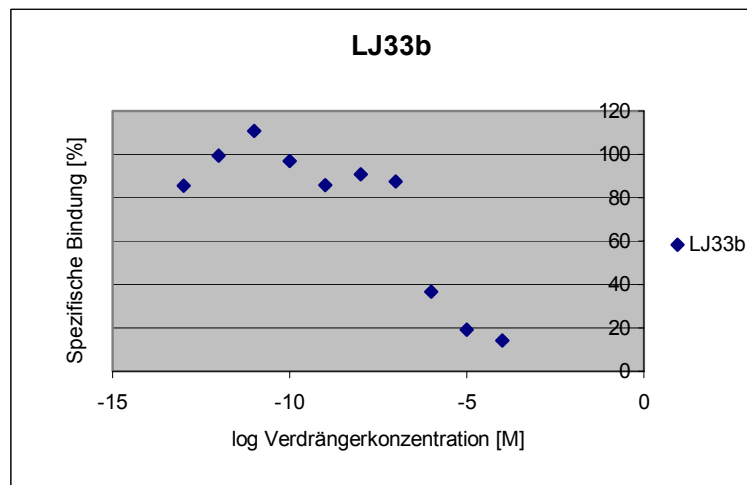


Abb.10 Der mit $[^{125}\text{I}]-^{54}\text{Tyr}-\alpha\text{-Bungarotoxin}$ in der Verdrängungsanalyse bestimmte K_i -Wert beträgt für LJ33b $0.33 \mu\text{M} \pm 0.15 \mu\text{M}$.

4.2.8 (-)-2PABH

(-)-2-(2-pyridyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptan [(-)-2PABH] weist dieselben Modifikationen am Epibatidingerüst auf wie das (+)-2PABH. Es handelt sich jedoch um dessen Enantiomer, d.h. die Konfiguration am chiralen Kohlenstoffatom ist dem (+)-2PABH entgegengesetzt.

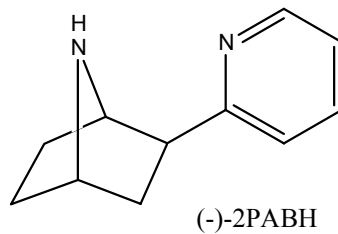


Fig. 8 Im Gegensatz zum Epibatidin enthält das (-)-2PABH kein Chloratom im Pyridinring und der Stickstoff im Pyridinring wurde von der meta- in die ortho-Position verschoben.

In vier Verdrängungsanalysen konnte für (-)-2PABH ein K_i -Wert von $0.14 \mu\text{M} \pm 0.07 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Die für die Experimente verwendeten Verdrängerlösungen wiesen Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-12} M auf.

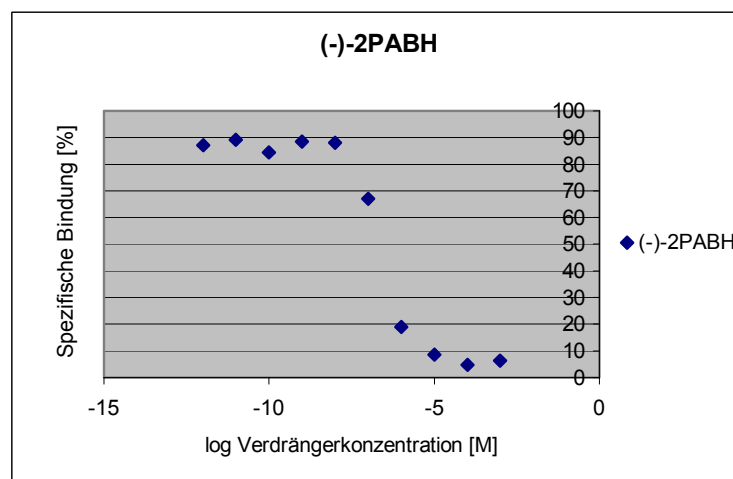


Abb. 11 Der mittels Verdrängungsanalyse mit $[^{125}\text{I}]-^{54}\text{Tyr-}\alpha\text{-Bungarotoxin}$ ermittelte K_i -Wert von (-)-2PABH beträgt $0.14 \mu\text{M} \pm 0.07 \mu\text{M}$.

4.2.9 Bromcytisin (BC)

Bei Bromcytisin handelt es sich um ein Derivat des Chinolizidinalkaloids Cytisin. Bromcytisin weist im Gegensatz zu Cytisin einen Bromsubstituenten in ortho-Stellung zur Carbonylgruppe auf.

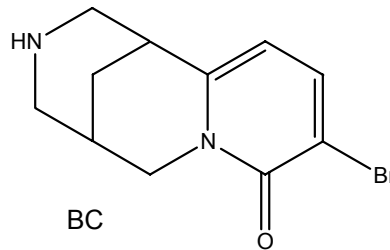


Fig. 9 Bromcytisin stellt ein Derivat des Cytisins dar, welches in ortho-Position zur Carbonylgruppe bromiert wurde.

Der K_i -Wert vom BC wurde aus fünf Experimenten ermittelt. Die in den Experimenten verwendeten Verdrängerlösungen wiesen Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-15} M auf. Der K_i -Wert für BC beträgt $7.47 \text{ nM} \pm 2.5 \text{ nM}$.

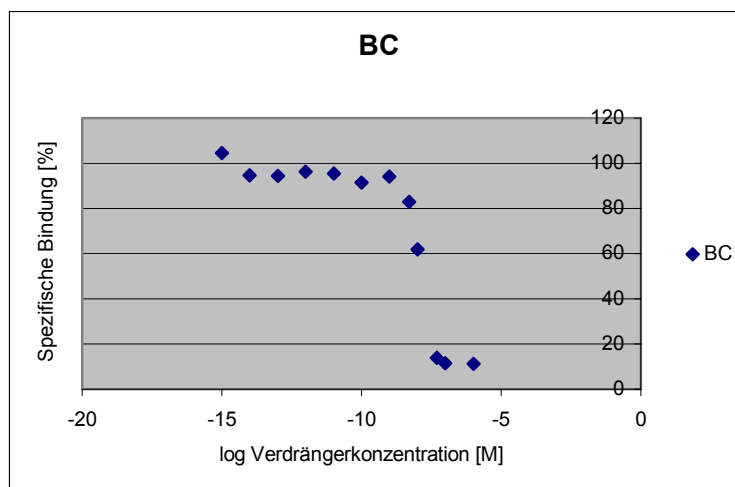


Abb. 12 Der mittels Verdrängungsanalyse mit $[^{125}\text{I}]\text{-}^{54}\text{Tyr-}\alpha\text{-Bungarotoxin}$ ermittelte K_i -Wert von BC beträgt $7.47 \text{ nM} \pm 2.5 \text{ nM}$.

4.2.10 Übersicht der Daten aus der Affinitätsbestimmung

Alle in der Verdrängungsanalyse ermittelten K_i -Werte der neun untersuchten, potentiellen Liganden werden hier in einer Übersicht dargestellt (Tab. 2).

Tab. 2 Alle in den Verdrängungsanalysen ermittelten K_i -Werte in der Übersicht.

	K _i -Wert
	Mittelwert ± Stabw.
FPC	31.9 μM ± 4.33 μM
LJ20W	17.8 μM ± 2.9 μM
LJ71	2.46 μM ± 0.84 μM
LJ37	1.29 μM ± 0.05 μM
(+)-2PABH	0.77 μM ± 0.09 μM
LJ45c	0.49 μM ± 0.19 μM
LJ33b	0.33 μM ± 0.15 μM
(-)-2PABH	0.14 μM ± 0.07 μM
BC	7.47 nM ± 2.5 nM

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Bindungsstudien von verschiedenen Liganden am α_7 -Subtyp des nicotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChRs) durchgeführt.

Damit eine Substanz als Ligand am nAChR agieren kann, müssen bestimmte Pharmakophore in der Molekülstruktur vorhanden sein [14,15]. Der Pharmakophor besteht aus einer dreidimensionalen Anordnung von essentiellen funktionellen Gruppen:

- A kationisches Zentrum, welches in eine Coulomb- oder Wasserstoffbrücken-Interaktion involviert ist
- B freies Elektronenpaar eines Pyridinstickstoffs oder eines Carbonylsauerstoffs als Wasserstoffbrücken-Akzeptor
- C Zentrum einer hydrophoben Region

Die Distanz zwischen Punkt A und B beträgt idealerweise 4.8 Å, diejenigen zwischen B und C 1.2 Å und zwischen A und C 4.0 Å.

Diese pharmakophoren Strukturforderungen wurden demnach von den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen von Bromcytisin (Fig. 9, K_i 7.47 nM) für den α_7 -Rezeptor am besten erfüllt. Der Punkt A entspricht dem Stickstoff im Bicyclus, die Forderungen von Punkt B werden durch die freien Elektronenpaare am Carbonylsauerstoff erfüllt und das lipophile Zentrum von Punkt C ist durch die Kohlenstoffe der Ringe dargestellt.

Trotzdem ist es äusserst schwierig bis fast unmöglich nur aufgrund der pharmakophoren Strukturforderungen eine Vorhersage der Affinität einer Substanz an den Rezeptor machen zu können. Denn nur schon kleine Änderungen in der Molekülstruktur wie z.B. die Änderung der Konfiguration haben Auswirkungen auf die Affinität. So betrug der in der Arbeit ermittelte K_i -Wert für (-)-2PABH (Fig. 8) 0.14 μ M, im Gegensatz zu 0.77 μ M von (+)-2PABH (Fig. 5), d.h. die beiden Werte unterscheiden sich um den Faktor 5.5.

Kürzlich gelang es einer Gruppe aus Amsterdam die Kristallstruktur eines acetylcholinbindenden Proteins (AChBP) zu identifizieren [16]. Die Struktur dieses AChBP ist nahe mit der α -Untereinheit der nAChR verwandt. Da der α_7 -Rezeptor ein Homomer aus α -Untereinheiten darstellt, kann die Kristallstruktur vom AChBP für weitere Studien an diesem Subtyp verwendet werden.

Mittels Molecular Modelling sollte es möglich werden, aus der Kristallstruktur des AChBP zusammen mit den in der Arbeit bestimmten Affinitätsdaten der neun Substanzen ein Modell für den nAChR herzustellen. Ziel dieses Modells ist es, die Affinitäten von potentiellen, neuen Liganden an den AChR schon vor den Bindungsstudien abschätzen zu können. Das Modell sollte es auch erlauben, die Auswirkungen von Konfigurationsunterschieden in Molekülen auf die Affinität an den Rezeptor bestimmen zu können.

Bromcytisin (Fig. 9) weist von den untersuchten Substanzen mit einem K_i von 7.47 nM eine um über 4000 mal stärkere Affinität an den α_7 -Subtyp des nAChRs auf, als die schwächst affine Substanz das Fluorphenylcytisin (Fig. 1, K_i 31.9 μ M). In der Literatur wurde BC bereits einmal untersucht und wies dort einen K_i -Wert von 2.0 nM auf [17]. In jener Studie wurden jedoch für die Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung Methylcaconitine und als Radioligand [3 H]Methylcaconitine verwendet. Auch wurden andere Inkubationszeiten und -temperaturen gewählt. Dies kann erklären, weshalb die Affinität von BC in jener Studie um den Faktor 3.7 besser war, als die im Rahmen dieser Diplomarbeit ermittelte Affinität.

In der gleichen Studie wurden neben BC auch mit anderen Halogenen substituierte Cytisinderivate, namentlich das Chlor- und Iodcytisin, untersucht. Trotz der unterschiedlichen Elektronegativitäten der Substituenten ist kein grosser Unterschied in den Affinitäten aufgetreten.

Demnach ist wahrscheinlich die stärkere Elektronegativität des Fluors gegenüber dem Brom nicht für den grossen Affinitätsabfall im FPC gegenüber dem BC verantwortlich.

Für den Affinitätsabfall gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Entweder ist der Einfluss vom π -System vom Aromaten zusammen mit dem Fluor im FPC zu stark, so dass sich die Affinität verringert. Oder es handelt sich um ein sterisches Problem. Der Fluorphenylsubstituent ist gegenüber dem Brom etwas grösser. Daher passt FPC schlechter in die Bindungsstelle des AChRs und die Affinität verringert sich.

Die beiden Enantiomere vom 2PABH wurden bereits früher in elektrophysiologischen Experimenten untersucht [18]. Die Studie zeigte, dass das 2PABH am α_7 -Rezeptor als partieller Agonist wirkt. Der EC_{50} von (-)-2PABH am α_7 -Rezeptor betrug 32.5 μ M, derjenige für (+)-2PABH 48 μ M. Diese Daten stimmen mit den in dieser Diplomarbeit bestimmten Affinitäten überein. Es zeigte sich auch hier, dass das (-)-2PABH mit

einem K_i von 0.14 μM mit höherer Affinität an den α_7 -Subtyp bindet, als das (+)-2PABH mit einem K_i von 0.77 μM .

Vergleicht man die Strukturen von LJ20W (Fig. 2, K_i 17.8 μM), LJ45c (Fig. 6, K_i 0.49 μM) und LJ33b (Fig. 7, K_i 0.33 μM) mit den Affinitätsdaten, so kann man annehmen, dass die Etherbrücke zwischen dem Bizeklus und dem Pyridinring im LJ20W für die 36- bzw. 54-fach schwächere Affinität verantwortlich ist. Die Distanz zwischen dem Pharmakophor A und B wird zu gross, weshalb die Affinität von LJ20W sinkt.

Dies wird zusätzlich noch verdeutlicht, wenn man die Distanzen zwischen den beiden Pharmakophoren mit dem ChemDraw[®] berechnet. Die Distanzen von LJ45c und LJ33b sind mit 5.9 Å bzw. 5.8 Å sehr ähnlich. Im Gegensatz dazu weist das LJ20W mit 7.2 Å eine deutlich grössere Distanz auf. Diese weicht noch stärker von der idealen Distanz von 4.8 Å ab, als diejenige der beiden anderen Liganden.

LJ71 (Fig. 3) und LJ37 (Fig. 4) unterscheiden sich nur durch die Position des Stickstoffs im Pyridinring. LJ37 trägt den Stickstoff in meta-Position und weist mit einem K_i von 1.3 μM beinahe zweifach stärkere Affinität an den α_7 -Rezeptor auf, als LJ71 (K_i 2.46 μM), welches den Stickstoff in ortho-Position trägt. Die Verschiebung des Pyridinstickstoffs (Pharmakophor B) wirkt sich auf die Distanz zum Stickstoff im Bizeklus (Pharmakophor A) aus. Demnach ist die Distanz in LJ37 für die Bindung an den α_7 -Subtyp des nAChRs idealer.

Die Distanzen zwischen den Pharmakophoren A und B wurden wiederum mit dem ChemDraw[®] berechnet. LJ37 weist mit 5.8 Å eine längere Distanz auf, als LJ 71 mit 5.3 Å. Obwohl LJ37 stärker von der idealen Distanz (4.8 Å) abweicht, weist es eine höhere Affinität an den Rezeptor auf. Dies verdeutlicht nochmals, dass nicht alleine aufgrund von pharmakophoren Strukturforderungen auf die Affinität an den Rezeptor geschlossen werden kann.

Die vorliegende Arbeit hat dazu beigetragen, die Kenntnisse über den nAChR erneut zu erweitern. Noch immer weiss man aber viel zu wenig über die Struktur und das Funktionieren des Rezeptors und dessen Liganden. Es wird die weitere Arbeit dieses Projektes sein, noch mehr über diesen Rezeptor in Erfahrung zu bringen, um in Zukunft einmal gezielt einen spezifischen und affinen Liganden für den nAChR zu entwickeln, welcher in der PET-Forschung und -Diagnostik eingesetzt werden kann.

6. Abkürzungen

α -BGT	α -Bungarotoxin
ACh	Acetylcholin
AChBP	acetylcholinbindendes Protein
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Bq	Becquerel
BSS	buffered salt solution (50 mM Tris/HCl pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂)
dpm	disintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
F	freie Ligandkonzentration
g	Erdbeschleunigung
HWZ	Halbwertszeit
IC ₅₀	Verdrängerkonzentration, bei der die Spezifische Bindung des Radioliganden 50 % beträgt
K _D	Dissoziationskonstante
K _i	Inhibitionskonstante
nAChR	nicotinischer Acetylcholinrezeptor
NSB	nicht-spezifische Bindung
PEI	Polyethylenimine
PET	Positron Emissions Tomographie
PNS	peripheres Nervensystem
rpm	rounds per minute
SP	Spezifische Bindung
Stabw.	Standardabweichung
TB	totale Bindung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZNS	zentrales Nervensystem

HERZLICHEN DANK!

Ich bedanke mich bei

Prof. Dr. P.A. Schubiger, für die Möglichkeit meine Diplomarbeit im Fach der Radiopharmazie durchführen zu können.

Dr. Gerrit Westera, für die gute Aufnahme in die Gruppe und die nette Betreuung während meiner ganzen Diplomarbeit.

William Bisson, für die sehr hilfsbereite Unterstützung im Labor und in allen anderen Bereichen.

Dr. Michael Honer, für die sehr kompetente Einführung in das Gebiet der Verdrängungsanalyse und die vielen hilfreichen Tipps während der Arbeit.

Dr. LinJing Mu, für die Unterstützung und Freundschaft im Labor während meiner Arbeit.

Der ganzen Gruppe am Universitätsspital, für die nette Aufnahme ins Team, wodurch mir eine sehr interessante Zeit ermöglicht wurde.

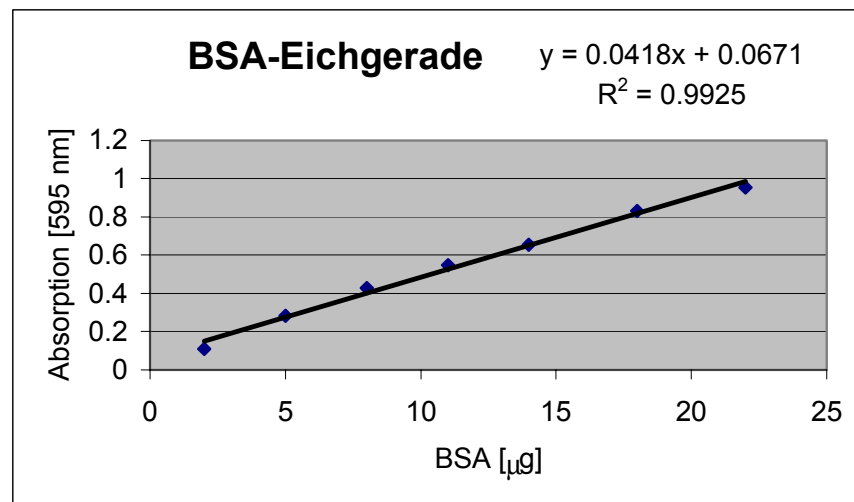
7. Literatur

- [1] Spang J. E. (1999) Structural Variations of Epibatidine Led to New Ligands for Studying the Neuronal nAChRs via Positron Emission Tomography and Electrophysiology, Diss ETH No.: 13286
- [2] Bertrand D., Changeux J-P. (1995) Nicotinic receptor: allosteric protein specialized for intercellular communication, *Neurosciences*, 7 : 75-90
- [3] Brejc K., van Dijk W., Klaadden R. V., Schuurmans M., van der Oost J., Smit A.B., Sixma T.K., (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand binding domain of nicotinic receptors, *Nature*, Vol 411
- [4] Bradford M.M., (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analyt. Biochem.* 72: 248-254
- [5] Gopalakrishnan M., Buisson B., Touma E., Giordane T. Campbell J.E., Hu I.C., Donnelly-Roberst D., Arneric S.P., Bertrand D., Sullivan J.P., (1995) Stable expression and pharmacological properties of the human α_7 nicotinic acetylcholine receptor, *European Journal of Pharmacology* 290, 237-246
- [6] Byland D.B., Yamamura H.I. (1990) *Methods for Receptor Binding*, Raven Press, Ltd., New York
- [7] Chang L-s., Lin S-k., Huang H-b., Hsiao M. (1999) Genetic organization of α -bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait): evidence showing that the production of α -bungarotoxin isotoxins is not derived from edited mRNAs, *Nucleic Acids Research* Vol. 27, No. 20, 3970-3975
- [8] Liu L-F., Chang C-C., Liao M-Y., Kuo K-W. (1998) Genetic characterization of the mRNAs encoding α -bungarotoxin: isoforms and RNA editing in *Bungarus multicinctus* gland cells, *Nucleic Acids Research* Vol. 26, No. 24, 5624-5629
- [9] Scarselli M. et al (2002) NMR Structure of α -Bungarotoxin Free and Bound to a Mimotope of the Nicotinic Acetylcholine Receptor, *Biochemistry*, 41, 1457-1463
- [10] Davies A.R.L., Hardick D.J., Blagbrough I.S., Potter B.V.L., Wolstenholme A.J., Wonnacott S. (1999) Characterisation of the binding of [3 H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling α_7 -type neuronal nicotinic acetylcholine receptors, *Neuropharmacology*, 38, 679-690
- [11] Sullivan J.P., Decker M.W., Brioni J.D., Donnelly-Roberts D., Anderson D.J., Bannon A.W., Kang Ch., Dams A., Piattoni-Kaplan M., Buckley M. J., Gopalakrishnan M., Williams M., Arneric S.P., (1994) (\pm)-Epibatidine Elicits a Diversity of In Vitro and In Vivo Effects Mediated by Nicotinic Acetylcholine Receptors, *JPET* 271: 624-631

-
- [12] Anderson D.J., Arneric S.P., (1994) Nicotinic receptor binding of [³H]cytosine, [³H]nicotine and [³H]methylcarbamylocholine in rat brain, *European Journal of Pharmacology* 253, 261-267
- [13] Perry E.K., Martin-Ruiz C.M., Court J.A., (2001) Nicotonic receptor subtypes in human brain related to aging and dementia, *Elsevier Alcohol*, 24, 63-68
- [14] Prince R.J., Sine S. M., (1998) The Ligand Binding Domains of the Nicotinic Acetylcholine Receptor, *The Nicotinic Acetylcholine Receptor: current Views and Future Trends*, edited by Francisco J. Barrantes, Springer Verlag and R.G. Landes Company
- [15] Nicolotti O., Pellegrini-Calace M., Carrieri A., Altomare C., Centino N.B., Sanz F., Carotti A., (2001) Neuronal nicotinic receptor agonists: a multi-approach development of the pharmacophore, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 15, 859-872
- [16] Brejc K., van Dijk W. J., Klaassen R. V., Schuurmans M., van der Oost J., Smit A. B., Sixma T. K., (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors, *Nature*, 411, 269-276
- [17] Imming P., Klaperski P., Stubbs M. T., Weitz G., Gündisch D., (2001) Synthesis and evaluation of halogenated cytosine derivatives and of bioisosteric thiocytosine as potent and selective nAChR ligands, *Eur. J. Med. Chem.* 36, 375-388
- [18] 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, *Chemistry & Biology*, 7, 545-555

8. Anhang

Mittels eines BSA-Standards wurde eine Eichgerade hergestellt, um im Bradford Biorad Microassay die genauen Konzentrationen der jeweiligen Membranen bestimmen zu können.



BSA [μg]	Absorption [595 nm]
2	0.111
5	0.282
8	0.428
11	0.549
14	0.655
18	0.833
22	0.955