

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Biopharmazeutische Aspekte bei der Evaluierung von
FE@SUPPY: Bindungsstudien, Ermittlung der Lipophilie und
der Stabilität gegen Carboxylesterase

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	El-Samahi Hoda
Matrikel-Nummer:	0300015
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Pharmazie (A 449)
Betreuerin / Betreuer:	O.Univ.-Prof. Mag.pharm. Dr. Helmut Viernstein

Wien, im Jänner 2009

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist in der Zeit von Mai 2008 bis Dezember 2008 am Department der Pharmazeutischen Technologie Uni Wien und Nuklearmedizin im AKH entstanden.

Mein besonderer Dank gilt an Herrn O.Univ.-Prof. Mag.pharm. Dr. Helmut Viernstein für die Bereitstellung dieses Arbeitsplatzes.

Bei Mag. Dr. Markus Mitterhauser bedanke ich mich für die Zurverfügungstellung des äußerst interessanten Themas, die kompetente Anleitung während der praktischen Arbeiten und die Unterstützung während des Verfassens der Diplomarbeit.

Mag. Lukas Nics, Mag. Daniela Häusler und Frau Karoline-Maria Sindelar möchte ich für die Betreuung und für das Korrekturlesen bedanken.

Mein Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe, die mich herzlich aufgenommen und mich unterstützt haben (Mag. Johanna Ungersböck, Mag. Dr. Leonhard-Key Mien, Biomed. Analytiker Girschele Friedrich, Mag. Dr. Wolfgang Wadsak).

Besonderer Dank gilt auch Frau Katharina Klein, die für eine kurze Zeit dort ein Praktikum gemacht hat, und mich während dieser Zeit sehr unterstützte und mich immer motiviert hat.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern möchte ich ganz besonders herzlich danken, denn sie haben mich während meines ganzen Studiums hindurch immer unterstützt. Meinen Freunden, Heba El-Bana, Sarah Ismail und Tamima Al-Zaher danke ich für ihre Unterstützung und für ihren jeglichen Beistand.

Abstract

Purpose: In the early 90's the fourth Adenosine Receptor, which is the Adenosine A₃-Receptor, was discovered. Changes of the adenosine A₃ receptor expression have been shown in a variety of pathologies, especially neurological, cardiac and oncological diseases as well as in inflammation processes. The aim of this diploma thesis was to (1) evaluate the metabolic stability of FE@SUPPY against carboxyl esterase, (2) to show the Ligand-Receptor-Interaction using the Ligand Tracer[®] and (3) to determine the lipophilicity of FE@SUPPY and FE@SUPPY:2.

Methods: In vitro enzymatic hydrolysis assays were performed using different concentrations of FE@SUPPY with constant concentrations of carboxyl esterase. Ligand Tracer experiments were performed using FE@SUPPY and CHO-cells, which express the human A₃-Receptor. The logP was determined with an HPLC-method using a short octadecyl-poly(vinyl alcohol) HPLC column (Supelco ODP-50) and an HPLC-System with a gradient.

Results: In vitro assays showed Michaelis -Menten constants of 33 μmol/L⁻¹ and a velocity of 0.04 μmol/min⁻¹/L⁻¹. Compared to other PET-Tracers we found out, that FE@SUPPY had a low stability against the carboxyl esterase. The Ligand Tracer data did not allow sufficient qualification, but the Uptake/Retention and the Selectivity were represented. FE@SUPPY had a logP of 4.04 and FE@SUPPY:2 a logP of 4.07 at the physiological range. The logP value showed that an unspecific binding can happen while permeation through the blood-brain-barrier.

Conclusion: (1) Metabolic stability experiments evinced a low stability of FE@SUPPY against the carboxyl esterase. These Results are a guideline for FE@SUPPY:2, for which the experiments are currently in process. (2) Ligand Tracer[®] experiments showed binding of FE@SUPPY to the CHO-cells, expressing the human A₃-Receptor, however, further experiments are demanded to obtain a higher degree of validity. (3) In vivo measurements in rats will deliver further information regarding blood-brain-barrier penetration.

Zusammenfassung

Ziel: Der vierte Adenosin Rezeptor, der A₃-Rezeptor, wurde Anfang der 90-Jahre entdeckt. Es wurde festgestellt, dass Veränderungen der Expression dieses Rezeptor-Subtyps bei vielen Erkrankungen vorkommen. Diese Veränderungen treten vor allem bei neurologischen, kardiologischen sowie onkologischen Erkrankungen, aber auch bei Entzündungsprozessen auf. Ziel dieser Arbeit war (1) die Evaluierung der metabolischen Stabilität von FE@SUPPY gegenüber der Carboxylesterase, (2) die Darstellung der Ligand-Rezeptor-Interaktion mit dem Ligand Tracer® und (3) die Charakterisierung der Lipophilie von FE@SUPPY und FE@SUPPY:2.

Methoden: In vitro Enzymreaktionen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von FE@SUPPY und einer konstanten Konzentration der Carboxylesterase durchgeführt. Die Ligand Tracer Versuche wurden mit FE@SUPPY und CHO-Zellen, welche den humanen A₃-Rezeptor exprimieren, durchgeführt. Für die LogP-Bestimmung wurde eine HPLC-Methode angewendet. Die Methode wurde mit einer octadecyl-poly(vinyl alcohol) HPLC-Säule (Supelco ODP-50) und einer HPLC-Anlage, welche einen Gradienten besitzt, durchgeführt.

Ergebnisse: In vitro Untersuchungen zeigten eine Michaelis Menten Konstante von 33µmol/L⁻¹ und eine Vmax von 0.04µmol/min⁻¹/L⁻¹. Durch den Vergleich mit 2 anderen PET-Tracern wurde festgestellt, dass die Stabilität von FE@SUPPY gegenüber der Carboxylesterase gering war. Die Ligand Tracer Daten erlaubten keine ausreichende Qualifizierung, aber der Uptake/Retention und die Selektivität konnten dargestellt werden. FE@SUPPY hatte einen logP von 4.04 und FE@SUPPY:2 einen logP von 4.07 im physiologischen Bereich. Mittels logP wurde gezeigt, dass unspezifische Bindungen beim Passieren der Blut-Hirn-Schranke auftreten können.

Ausblick: (1) Die Michaelis Menten Kinetik von FE@SUPPY zeigte eine geringe Stabilität gegenüber der Carboxylesterase. Diese Ergebnisse dienen als Vorlage für FE@SUPPY:2, deren Versuche zur Ermittlung der Michaelis Menten Kinetik derzeit laufen. (2) Mittels Ligand Tracer® Experimenten konnte die Bindung von FE@SUPPY an den CHO-Zellen, welche den humanen A₃-Rezeptor exprimieren, dargestellt werden. Allerdings sind weitere Versuche gefragt um eine genauere Aussagekraft zu erzielen. (3) In vivo Experimente in Ratten werden zusätzliche Aussagen über die Hirngängigkeit der beiden A₃-Antagonisten ermitteln.

Inhaltsverzeichnis

1. Problemstellung	10
2. Einleitung	11
2.1. Nuklearmedizin	11
2.1.1. PET	11
2.1.1.1. Radiopharmaka	11
2.1.1.2. Radionuklidherstellung	13
2.1.1.3. Dosierung	13
2.1.1.4. Ablauf einer PET-Untersuchung	14
2.1.1.5. Anwendungsgebiete	15
2.2. Adenosin	16
2.2.1. Adenosin-Rezeptoren	16
2.2.2. Wirkung	19
2.2.3. A ₃ -Rezeptor-Antagonisten	21
2.3. Metabolismus	22
2.3.1. Biotransformation	22
2.3.2. Enzymkinetik	23
2.3.3. Chromatographie	25
2.3.3.1. HPLC	25
2.4. Bindungsstudien	26
2.4.1. CHO-Zellen	26
2.4.1.1. Zellkulturmedien	27
2.4.1.2. Zusätze von Medien	27
2.4.1.3. Passagieren der Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung	28
2.4.2. Ligand-Rezeptor-Kinetik	29
2.4.3. Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen mittels Ligand Tracer [®]	32
2.4.3.1. Ligand Tracer Grey	32
2.4.3.2. Ligand Tracer Yellow	32

2.5. Lipophilie	33
2.5.1. Durchtritt von Pharmaka durch biologische Membranen	33
2.5.2. Lipophiliebestimmung	34
3. Material und Methoden	36
3.1. Metabolitenversuche	36
3.1.1. Material	36
3.1.1.1. Chemikalien, Lösungen, Puffer	36
3.1.1.2. Geräte und Instrumente	38
3.1.2. Methode	40
3.1.2.1. Methodenoptimierung für FE@SUPPLY	40
3.1.2.2. Carboxylesteraseversuch	42
3.1.2.2.1. <i>Vorbereitung für den Versuch</i>	42
3.1.2.2.2. <i>Durchführung des Esteraseversuchs</i>	43
3.2. Bindungsstudie	45
3.2.1. Material	45
3.2.1.1. Medien, Lösungen und Puffer	45
3.2.1.2. Geräte und Instrumente	46
3.2.2. Methoden	47
3.2.2.1. Steriltechnik	47
3.2.2.2. Routinemethoden zum Umgang mit CHO- und CHO- humane-A3-Zellen	48
3.2.2.3. Vorbereitung für die Bindungsversuche	50
3.2.2.4. Bindungsversuch mit dem Ligand Tracer [®]	52
3.3. Lipophiliebestimmung	55
3.3.1. Material	55
3.3.1.1. Chemikalien, Puffer, Lösungen	55
3.3.1.2. Geräte und Instrumente	56
3.3.2. Methode	57
3.3.2.1. LogP	57

4. Ergebnisse und Diskussion	58
4.1. Metabolitenversuche.....	58
4.1.1. Methodenoptimierung für FE@SUPPY	58
4.1.2. Carboxylesteraseversuch.....	63
4.2. Bindungsstudien.....	72
4.2.1. Bindungsversuch mit dem Ligand Tracer	72
4.3. Lipophiliebestimmung	75
4.3.1. LogP.....	75
5. Zusammenfassung und Ausblick	78
Anhang.....	79
A1-Abbildungsverzeichnis	79
A2-Tabellenverzeichnis	81
A3-Abkürzungsverzeichnis.....	82
A4-Literaturverzeichnis	84
Lebenslauf.....	87

1. Problemstellung

Der A₃ Rezeptor wurde im Rahmen molekularbiologischer Studien, die 1992 durch Zhou et al durchgeführt wurden, entdeckt. Tatsächlich fanden sie heraus, dass dieser Rezeptor eine hohe identische Sequenz zu den vorher entdeckten A₁ und A_{2A} Rezeptoren hatte, aber auch viele Unterschiede in den pharmakologischen Eigenschaften aufwies. [1] Wie die anderen bekannten Rezeptoren dieses Typs, ist der A₃ ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. Durch die Aktivierung dieses Rezeptors erfolgten eine Stimulierung der Phospholipase C und D, sowie eine Inhibierung der Adenylatcyclase. [2]

Die vermutlich auffälligste Erscheinung in der Pharmakologie des A₃-Rezeptors ist seine sehr niedrige Affinität für Adenosin. Diese Tatsache bereitet viele Schwierigkeiten in der Charakterisierung und Erkennung der biologischen Funktionen dieses Rezeptors. [2]

Kürzlich wurde der A₃-Rezeptor-Subtyp aus verschiedenen Spezies geklont (z.B.: Ratte, Mensch, Hund und Schaf). Im menschlichen Organismus wurde der A₃-Rezeptor in etlichen Organen gefunden, wie z.B.: Lunge, Herz, Leber, Niere und mit einer geringen Dichte auch im Gehirn. [3]

Der A₃-Rezeptor besitzt eine Schlüsselfunktion sowohl in der Stimulation der Zellproliferation als auch in der Inhibition. In mikromolaren Konzentrationen stimuliert es normale und Tumorzellen und induziert Apoptose in höheren Konzentrationen. Niedrige Konzentrationen dagegen scheinen eine antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen zu haben. Der A₃-Rezeptor soll eine wichtige Rolle bei der Immunsuppression, bei Gehirn-Ischämie und Bronchospasmen spielen. [2]

Basierend auf diesen Daten scheinen hoch selektive Antagonisten für A₃-Rezeptoren für die Behandlung von Entzündungen oder Glaukomen nützlich zu sein. [3] Selektive A₃-Agonisten liefern einen potentiellen Nutzen für die Vorbeugung von myokardialen ischämischen Verletzungen. [4]

Die 3,5-Diacyl-2,4-dialkyl-6-phenylpyridine Derivate wurde als selektive Antagonisten für den A₃-Rezeptor ermittelt. [5] Li et al. entdeckten, dass β -fluoroethyl- oder γ -fluoropropylester an der 5.Position der Derivate einen positiven Effekt auf die Affinität der humanen A₃-Rezeptoren hatten. [6] Aufgrund der bereits vorhandenen Literatur ist es denkbar, dass der A₃ Rezeptor als Ziel für die bildliche Darstellung von diversen Erkrankungen mittels PET genutzt werden kann.

Für die erfolgreiche Darstellung des A₃-Rezeptors sind einige Voraussetzungen nötig: eine nanomolare Affinität des Radioliganden zu dem Zielrezeptor und eine ausreichende Dichte von mindestens einigen fmol/g. Die Affinität von FE@SUPPY, ein Ligand für den A₃-Rezeptor, wurde von Li et al evaluiert und zeigte eine K_i von 4.22 nM. [6]

Ziel dieser Arbeit war es, die metabolische Stabilität von FE@SUPPY gegenüber der Carboxylesterase zu evaluieren, die Lipophilie von FE@SUPPY zu bestimmen und die Ligand-Rezeptor-Kinetik darzustellen.

2. Einleitung

Die Einleitung soll dazu dienen, die theoretischen Grundlagen, auf welchen die Methoden basieren, zu erläutern und den umgebenden Bereich näher darzustellen.

2.1. Nuklearmedizin

Die Nuklearmedizin ist ein eigenständiges Fachgebiet der Medizin, in welchem radioaktive Stoffe (Radiopharmaka) zur Diagnose und Therapie bestimmter Erkrankungen eingesetzt werden.

Mithilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) kann die Verteilung der so genannten Tracer (Radiopharmaka), die vorher in winzigen Mengen in den Stoffwechsel eingeschleust werden, im menschlichen Körper aufgezeichnet werden. Auf diese Weise können die natürlichen Zellfunktionen, beispielsweise der Stoffwechsel oder die Proteinbiosynthese, dargestellt werden.

Die Strahlenbelastung für den Patienten durch nuklearmedizinische Untersuchungen ist in den vergangenen Jahren immer weiter zurückgegangen. Dies liegt sowohl an der Produktion neuer spezifischer Radiopharmaka als auch an der Optimierung der Kameratechnik. Im Schnitt entspricht die Strahlenexposition bei einer solchen Untersuchung der Strahlendosis, welcher ein Mensch im Verlauf eines Jahres ausgesetzt ist. [7]

2.1.1. PET

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) gehört zu dem so genannten nicht-invasiven, bildgebenden Untersuchungsmethoden. Sie wird seit mehr als 15 Jahren in der Medizin, vor allem im Rahmen der Tumordiagnostik, genutzt.

Damit eine PET-Untersuchung stattfindet, muss ein geeignetes Radiopharmakon verfügbar sein.

2.1.1.1. Radiopharmaka

Ein Radiopharmakon besteht aus einem Radionuklid mit geeigneten physikalischen Eigenschaften und einem Molekül mit geeigneter Pharmakokinetik.

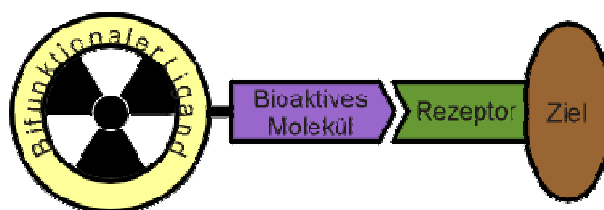


Abbildung 2.1.1.1-1: Radiopharmakon

Radiopharmaka werden durch ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften und durch die Strahlungseigenschaften des Radionuklids charakterisiert. Das Radiopharmakon besteht daher aus zwei funktionellen Komponenten, nämlich dem Radionuklid und dem biologischen Tracer. [8]

Die Strahlung des Radionuklids ermöglicht es, den Radioaktivitätsverlauf des Radiotracers im biologischen System extern zu verfolgen. Der biologische Tracer bestimmt die Organspezifität und den Metabolismus des Radiopharmakons und bedingt die Aufnahme der Radioaktivität im Zielorgan. [8]

Bei der Prüfung des Radiopharmakons auf dessen biologische Verteilung sind vor allem die Anreicherung im Zielorgan und die Elimination von Interesse. Für die Anreicherung sind bestimmte physiologische Faktoren verantwortlich, aber auch molekülspezifische Eigenschaften des Radiopharmakons. [8]

Weitere Parameter dienen vor allem zur Berechnung der Strahlenbelastung des Patienten. Da die Abnahme der Radioaktivität im biologischen System durch biologische Ausscheidung und durch den Zerfall des Radionuklids erfolgt, wird die Elimination eines Radiopharmakons von zwei Halbwertszeiten bestimmt, ausgedrückt durch die effektive Halbwertszeit. [8]

Für Berechnungen der Strahlenexposition verwendet man daher die effektive Halbwertszeit, die gemäß der nachstehenden Formel ermittelt wird:

$$T_{1/2} \text{ eff} = \frac{T_{1/2} \text{ biol.} \times T_{1/2} \text{ phys.}}{T_{1/2} \text{ biol.} + T_{1/2} \text{ phys.}}$$

Wobei die physikalische Halbwertszeit - $T_{1/2} \text{ phys.}$ - dem radioaktiven Zerfall des Radionuklids entspricht und für jedes radioaktive Element einen charakteristischen Wert besitzt. [8]

Die biologische Halbwertszeit - $T_{1/2} \text{ biol.}$ - entspricht der Elimination eines Radiopharmakons und besitzt für jede chemische Verbindung und natürlich auch für jedes Organ einen typischen Wert. Daher muss man zwischen der Gesamt-Elimination aus dem Körper und der aus bestimmten Organen unterscheiden. Die biologische HWZ wird im Tierexperiment ermittelt. [8]

Die effektive Halbwertszeit - $T_{1/2} \text{ eff.}$ - wird unter Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls und der biologischen Ausscheidung mathematisch berechnet. [8]

2.1.1.2. Radionuklidherstellung

Künstliche Radionuklide werden durch Beschuss von Atomkernen mit Neutronen im Kernreaktor oder im Zyklotron (kreisförmiger Teilchenbeschleuniger) durch Beschuss mit Protonen, Deuteronen oder Alphateilchen erzeugt. Dabei verschmelzen Teilchen mit den getroffenen Kernen, die dadurch instabil werden und beim Zerfall Teilchen- oder Gammastrahlung abgeben. Einige Radionuklide erreichen nicht direkt, sondern nur über Zwischenstufen (metastabile Zustände) die Stabilität. Dabei entsteht jeweils ein anderes Radionuklid mit typischen Eigenschaften wie bestimmter Strahlung und HWZ. [9]

Zum Beispiel: Molybdän (^{99}Mo) zerfällt erst zum metastabilen Technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), was dann unter Abgabe von Gammaquanten weiter zu ^{99}Tc zerfällt. Diese Eigenschaft kann zur Herstellung eines Radionuklidgenerators genutzt werden. Verwendet wird ein im Kernreaktor erzeugtes Mutterradionuklid mit einer HWZ von einigen Tagen, das zu einem kurzlebigen Tochternuklid zerfällt. [9]

Am häufigsten wird der Molybdän/Technetium-Generator benutzt. Er besteht aus einer Anionenaustauschersäule, an die das Mutternuklid ^{99}Mo (HWZ 66h) gebunden ist. Es zerfällt zu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (HWZ 6h), das als Technetiumpertechnetat ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) keine Affinität mehr zur Säule hat und mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen wird. [9]

Die Aktivität A einer bestimmten Menge eines Radionuklids wird in Bequerel (Bq) angegeben: 1 Bq = 1 Zerfall/Sekunde (früher Curie Ci: 1 mCi = 37 MBq)

2.1.1.3. Dosierung

Radionuklide werden im Gegensatz zu anderen diagnostisch eingesetzten Mitteln in äußerst geringen, nahezu homöopathischen Dosen verabreicht. Arzneimittelnebenwirkungen und Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten können fast immer ausgeschlossen werden. [10]

2.1.1.4. Ablauf einer PET-Untersuchung

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wird häufig im nüchternen Zustand durchgeführt. Der Patient bekommt zunächst den entsprechenden Tracer injiziert, der sich während einer Wartezeit von ca. einer Stunde im Körper verteilt und das Zielgewebe erreicht. Für die Untersuchung wird der Patient auf die Kameraliege gelegt, auf der er sich möglichst nicht mehr bewegen sollte. [11]

Die bei einer Positronen-Emissions-Tomographie verwendeten Tracer werden als Positronenstrahler (Beta-Plus Teilchen) bezeichnet. Trifft ein durch Zerfall des Radionuklids entstandenes Positron auf ein Elektron im Körper, so werden beide vernichtet (sog. Annihilation). Es entstehen zwei hochenergetische Photonen (Gammastrahlung) einer Energie von exakt 511 keV. Diese entfernen sich voneinander in einem Winkel von knapp 180°. Diese Vernichtungsstrahlung trifft gleichzeitig (koinzident) zwei Detektoren, was Ortsbestimmung der Positronenemission ermöglicht. Werden zwei γ -Quanten einer Energie von 511 keV zeitgleich nachgewiesen, wird dies als *Positron-Elektron-Vernichtung* auf der gedachten Linie interpretiert. Diese Linie wird als Line of Response (LOR) bzw. Koinzidenzlinie bezeichnet. [12]

Während der Untersuchung wird der Patient schrittweise durch den Scannerring gefahren und der gesamte Körper aufgenommen. Anhand aller Zerfallsereignisse kann ein an die Kamera angeschlossener Computer schließlich ein komplexes Bild der Tracer-Verteilung im Körper berechnen (Abb.2.1.1.4-1). [11]

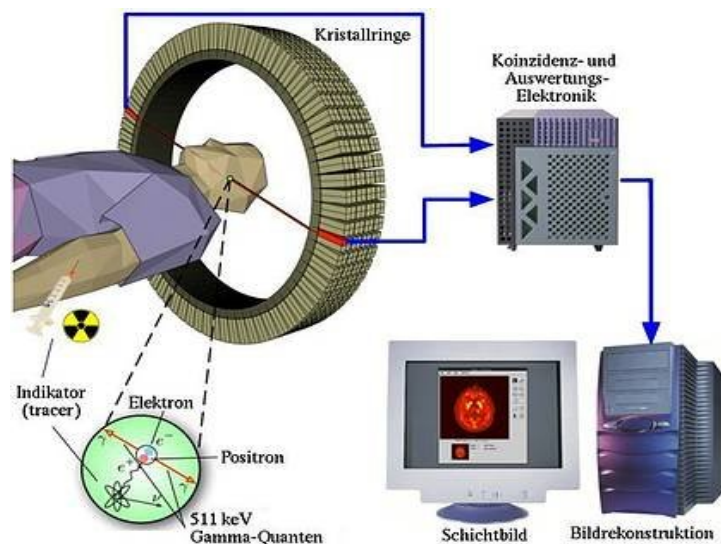


Abbildung 2.1.1.4-1: Ablauf einer PET-Untersuchung

2.1.1.5. Anwendungsgebiete

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wird vor allem in der Krebsdiagnostik eingesetzt. Mit ihrer Hilfe kann ein möglicher Krebsherd gesucht und dargestellt werden. Sie dient dazu, eine Bösartigkeit der Gewebeneubildung festzustellen und das Stadium der Erkrankung zu bestimmen. Dieses ist wichtig, um eine optimale Therapie einzuleiten bzw. unnötig belastende Maßnahmen zu vermeiden. Besonders erfolgreich wird eine PET bei der Diagnose von Lungen-, Schilddrüsen-, Speiseröhrenkrebs, malignen Lymphomen und Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt. [11]

Neben der Krebsdiagnostik wird die Positronen-Emissions-Tomographie auch in der Kardiologie und Neurologie eingesetzt. Anwendungsgebiete sind hier der Nachweis von Durchblutungsstörungen bei einer Koronaren Herzkrankheit, Nachweis von Herzmuskelschädigungen, Diagnose eines Herzinfarkts, Voruntersuchungen vor Herztransplantationen und die Diagnose von Parkinson, Chorea Huntington und Demenz. [11]

2.2. Adenosin

Adenosin gehört zu der Stoffgruppe der Nukleoside; es besteht aus der Purinbase Adenin, die mit einer Ribose verknüpft ist (Abb.2.2-1).

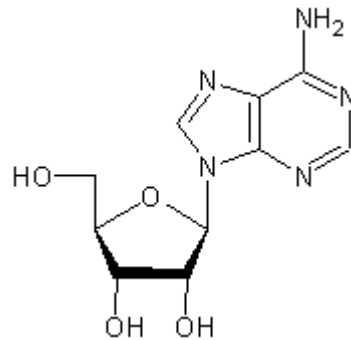


Abbildung 2.2-1: Strukturformel von Adenosin

Purine wie Adenosintriphosphat (ATP) und Adenin sind essentielle Bestandteile aller lebenden Zellen mit wichtigen Aufgaben im Energiestoffwechsel und bei der Speicherung genetischer Information: ATP ist bekanntlich der wichtigste Energielieferant für nahezu alle intrazellulären Vorgänge, Adenin ein Bestandteil von Ribonukleinsäuren und Co-Enzymen. [13]

Purine spielen vermutlich wegen ihrer ubiquitären Verbreitung auch eine große Rolle bei der Übertragung intra- und extrazellulärer Signale. Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) übermittelt als sekundäres Botenmolekül intrazelluläre Signale. Demgegenüber fungiert ATP als Neurotransmitter sowie Co-Transmitter (z.B. in cholinergen Neuronen) und bindet an ionotrope P_2X -Rezeptoren und metabotrope P_2Y -Rezeptoren. [13]

Adenosin ist ein weiteres, zu den Purinen gehörendes Signalmolekül. Es moduliert zahlreiche physiologische Prozesse vor allem des Zentralnervensystems (ZNS) und wirkt dort u.a. bei der Steuerung von Schlaf und motorischer Aktivität mit. [13]

2.2.1. Adenosin-Rezeptoren

Die Adenosin-Rezeptoren werden in 2 große Gruppen eingeteilt, die P_1 - Rezeptoren und die P_2 - Rezeptoren.

Die vier verschiedene Adenosin-Rezeptor-Subtypen, die A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 Rezeptoren, bezeichnet man gemeinsam als P_1 -Purinozeptoren und grenzt sie von der Klasse der P_2 -Purinozeptoren ab, die Nukleotide wie ATP oder ADP binden. [13]

Ursprünglich wurden die Adenosin-Rezeptoren Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts nach ihrer inhibitorischen bzw. stimulierenden Wirkung auf die Adenylatcyclase in Adenosin- A_1 - und A_2 -Rezeptoren eingeteilt. Basierend auf der Entdeckung von hochaffinen A_2 - Rezeptoren im Rattenstriatum und niedrigaffinen, im Gehirn weit verbreiteten A_2 -Rezeptoren, die beide in der Lage waren, die Adenylatcyclase zu stimulieren, wurden die A_2 -Rezeptoren 1983 in zwei Subtypen klassifiziert. Dabei wurde der hochaffine A_2 -Rezeptor als A_{2A} und der niedrigaffine als A_{2B} -Rezeptor bezeichnet. [14]

In den frühen 90er Jahren wurde schließlich der vierte Adenosin-Rezeptor-Subtyp, der Adenosin- A_3 -Rezeptor, identifiziert und kloniert, der ebenso wie der A_1 -Subtyp eine Inhibition der Adenylatcyclase vermittelt (Abb.2.2.1-1). [14]

Der endogene Ligand Adenosin bindet mit hoher Affinität an Adenosin- A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren, wohingegen die Aktivierung von Adenosin- A_{2B} - und A_3 -Rezeptoren in der Regel erst in Gegenwart höherer Adenosin-Konzentrationen im mikromolaren Bereich erfolgt. [14]

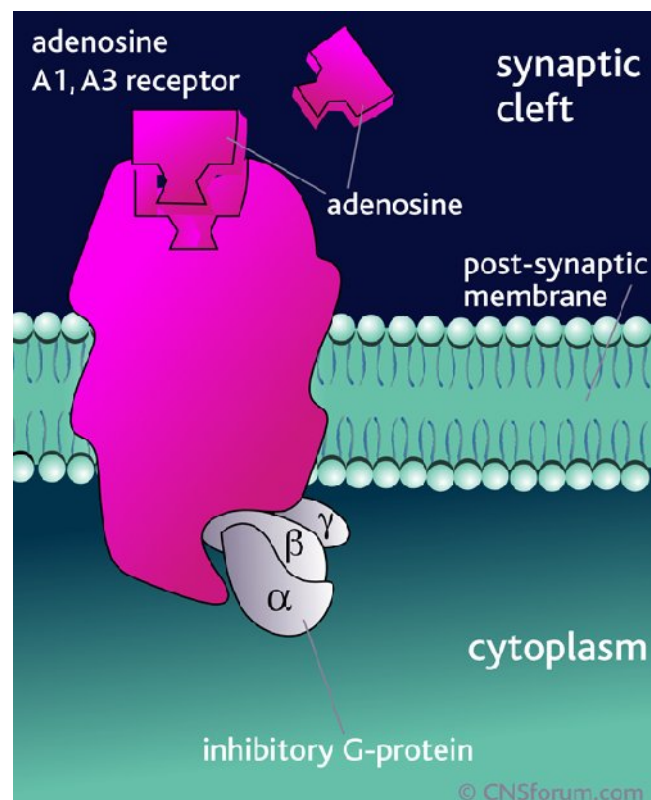


Abbildung 2.2.1-1: A_3 -Rezeptor-Subtyp

Alle Adenosin-Rezeptor-Subtypen können über ein G-Protein an die Adenylatcyclase als Effektorprotein gekoppelt sein, aber sie besitzen z.T. gegensätzliche Wirkungen (Abb. 2.2.1-2). [14]

A₁- und A₃-Rezeptoren sind über ein inhibitorisches G-Protein (G_i) an die Adenylatcyclase gekoppelt, wobei es zu einer Inhibition dieses Enzyms, verbunden mit einer Senkung des cAMP Spiegels, kommt. Ein G_o-Protein oder auch „anderes“ („other“) Protein genannt führt hingegen über die Freisetzung der βγ-Untereinheit unter anderem zur Hemmung bzw. Aktivierung von Ionenkanälen (Abb.2.2.1-2). [14]

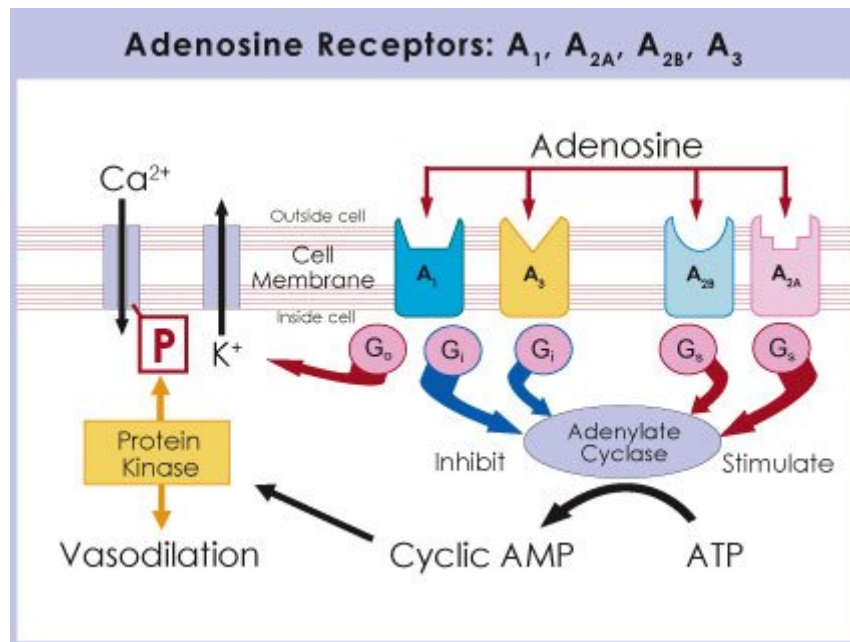


Abbildung 2.2.1-2: Signalweg der Adenosinrezeptoren

Die Aktivierung der Phospholipase C durch Stimulation eines Gq/11-gekoppelten Rezeptors resultiert in der Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu den Botenstoffen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ stimuliert anschließend die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern, aktiviert zusammen mit DAG das Enzym Proteinkinase C (PKC) und bewirkt die Phosphorylierung weiterer Proteine. Die beiden verschiedenen α-Untereinheiten der G-Proteine Gq und G₁₁ aktivieren jeweils unterschiedliche Isoenzyme der Phospholipase C (Abb.2.2.1-3). [14]

A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren bewirken über die Stimulation der Adenylatcyclase (G_s- oder G_{olf}-gekoppelt) einen Anstieg des cAMP-Spiegels (Abb.2.2.1-2). [14]

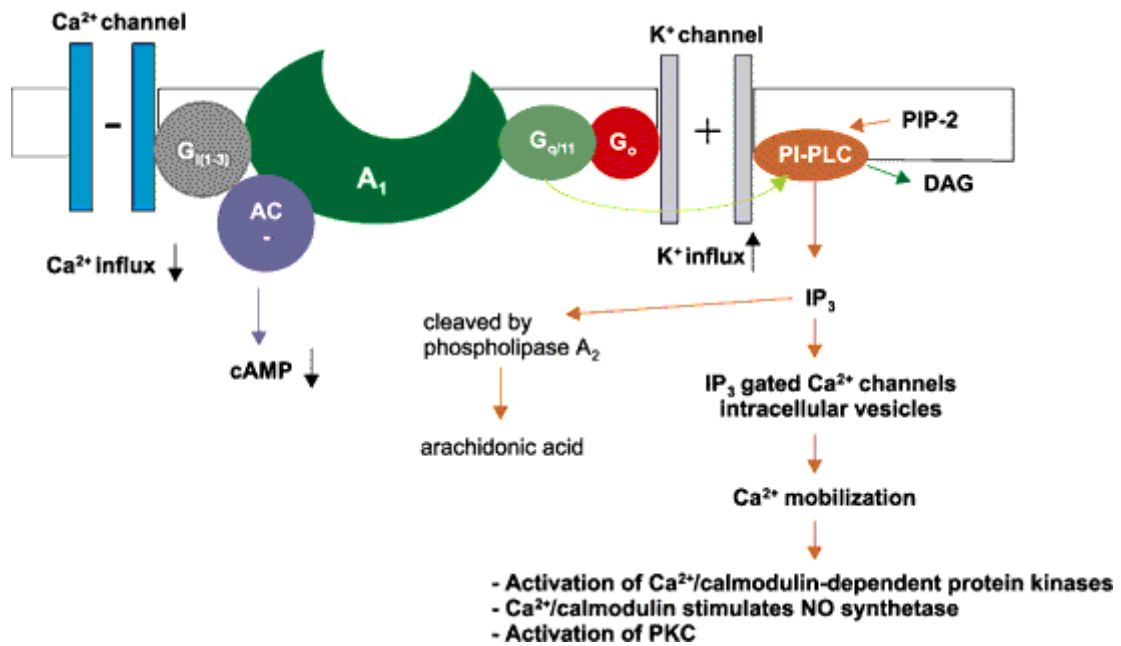


Abbildung 2.2.1-3: Gq/11-gekoppelten Rezeptor

2.2.2. Wirkung

Adenosin ist vielen als Baustein von Nukleotiden bekannt, die als Energiequelle und zur Synthese von Nukleinsäuren genutzt werden. Das Nukleosid Adenosin ist allerdings auch ein aktives Autakoid, das modulatorische Wirkung auf eine Reihe von Geweben und Zelltypen zeigt. Adenosin ist in allen Zellen und Körperflüssigkeiten vorhanden und spielt eine zentrale Rolle im Energiehaushalt aller Zellen. Unter physiologisch normalen Bedingungen liegt die extrazelluläre Adenosinkonzentration zwischen 30 und 300 nM und ist direkt mit der lokalen Energiebilanz verknüpft. Sobald das Gleichgewicht zwischen Energieproduktion (d.h. ATP Produktion) und dessen Verbrauch verschoben ist, sorgen bidirektionale Adenosintransporter dafür, überschüssiges Adenosin aus der Zelle zu pumpen. D.h., dass zum Beispiel Nerven- oder Muskelzellaktivität oder Sauerstoffmangel und Ischämie zu erhöhten extrazellulären Adenosinkonzentrationen bis zu 10 µM oder höher führen können. [15]

Der Ursprung extrazellulären Adenosins liegt jedoch nicht nur in intrazellulär, sondern auch in extrazellulär abgebautem ATP. ATP wird als Botenstoff von vielen Synapsen – gleichzeitig mit anderen Transmittersubstanzen – freigesetzt und schnell von Ectonukleotidasen zu ADP, AMP, und Adenosin abgebaut. Eine andere Quelle intrazellulären Adenosins ist die Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein (Abb.2.2.2-1). Die Art und Weise der Adenosinfreisetzung, die nicht gequantelt ist, zeigt deutlich, dass Adenosin nicht als klassischer Neurotransmitter, sondern eher als Modulator betrachtet werden sollte. Adenosin ist einer effektiven und schnellen Neutralisierung durch Phosphorylierung (Adenosinkinase) oder Desaminierung (Adenosindeaminase) unterworfen. Dies bedeutet, dass verschiedene Systeme – sowohl innerhalb, als auch außerhalb der Zelle – entwickelt wurden, um die Adenosinkonzentration im Gleichgewicht zu halten. Unter Normalbedingungen, aber besonders in Stresssituationen spielt Adenosin eine wichtige modulatorische Rolle unter anderem im kardiovaskulären System, dem zentralen Nervensystem, im Magen-Darm Trakt, im Immunsystem, und generell bei der Regulierung des Zellzyklus und Überlebens. [15]

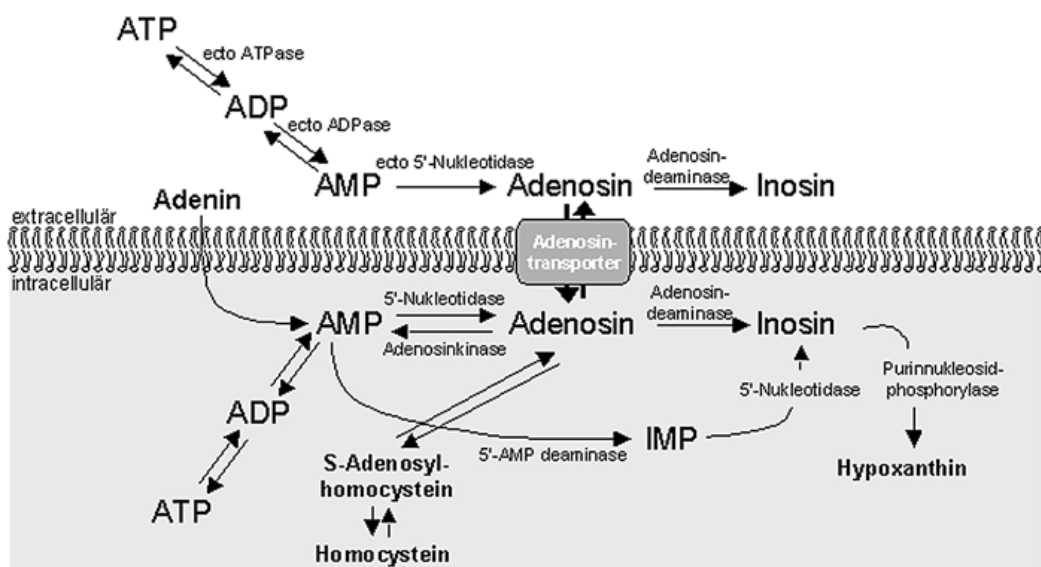


Abbildung 2.2.2-1: Regulation der intra- und extrazellulären Adenosinkonzentration

2.2.3. A₃-Rezeptor-Antagonisten

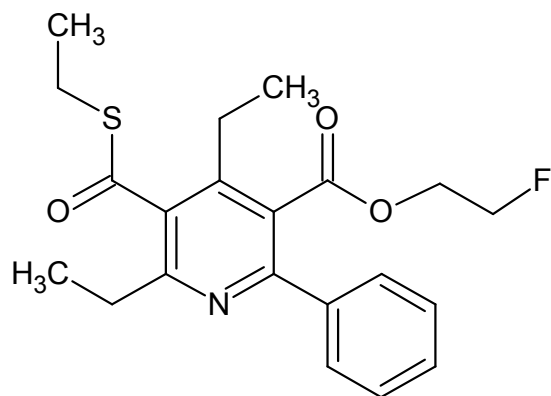


Abbildung 2.2.3-1: FE@SUPPLY

(5-(2-fluoroethyl)-2,4-diethyl-3-(ethylsulfanylcarbonyl)-6-phenylpyridine-5-carboxylate)

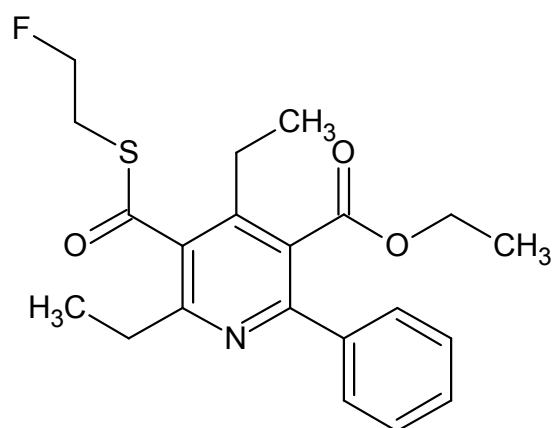


Abbildung 2.2.3-2: FE@SUPPLY:2

Ethyl-4,6-diethyl-5-[(2-fluorethyl)sulfanyl]carbonyl]-2-phenylnicotinat

2.3. Metabolismus

Als Metabolismus bezeichnet man den Prozess, bei dem Arzneistoffe biochemisch so modifiziert werden, dass sie vom Körper ausgeschieden werden. Der Arzneistoffmetabolismus findet größtenteils in der Leber statt.

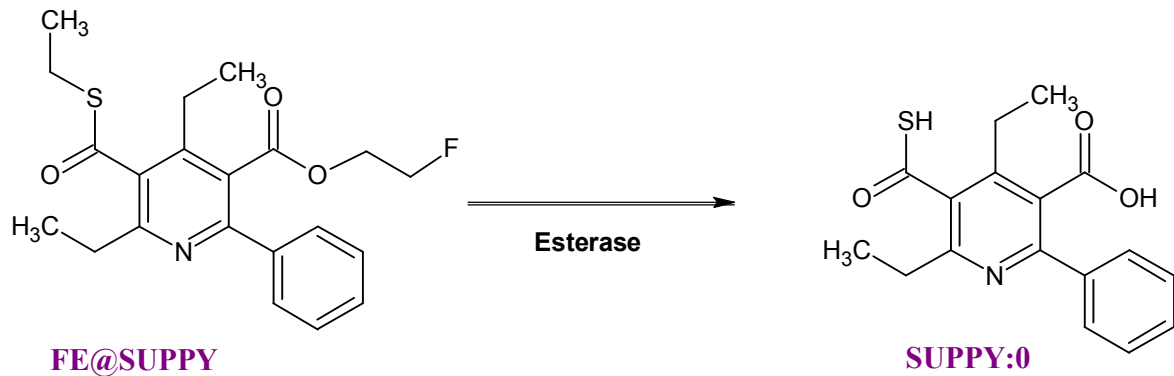


Abbildung 2.3-1: Metabolismus von FE@SUPPLY

2.3.1. Biotransformation

Durch die Biotransformation werden die meisten Arzneimittel in eine besser wasserlösliche Form überführt, was für die Ausscheidung durch die Niere von essentieller Bedeutung ist. Lipophile Substanzen werden in der Niere rückresorbiert, so dass ein lipophiles Arzneimittel den Organismus nur sehr langsam und unvollständig verlassen kann. Die Biotransformations-Reaktionen können grundsätzlich in zwei Typen unterteilt werden. Und zwar solche, die am Arzneimolekül eine strukturverändernde Reaktion bewirken (Phase-I-Reaktion) und solche, die als aufbauende Reaktion (Konjugation) bezeichnet werden (Phase-II-Reaktion). [16]

- Phase-I-Reaktionen sind Funktionalisierungsreaktionen, denn sie führen funktionelle Gruppen in das unpolare Molekül ein oder legen entsprechende funktionelle Gruppen frei. Diese Reaktionen sind u.a. Oxidation, Reduktion, Hydrolyse und Hydratisierung. [17]

Ester werden im Organismus enzymatisch hydrolysiert. Die bei der Hydrolyse von Estern beteiligten Enzyme besitzen Esterase- als auch Amidaseaktivität. Sie sind hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum der Leber lokalisiert. [17]

Die Acetylcholinesterase, das klassische synaptische Enzym, weist dagegen eine hohe Substratspezifität auf. Die Pseudocholinesterase (=Butylcholinesterase) kommt außer in der Leber auch im Blutplasma vor. [17]

- Phase-II-Reaktionen sind Konjugationsreaktionen, die durch Transferasen katalysiert werden. Im Rahmen der Phase-II-Reaktionen werden funktionelle Gruppen z.B. mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen gekoppelt. Wichtige Phase-II-Reaktionen sind Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung sowie Konjugation mit Aminosäuren und Glutathion. [17]

Die in Phase-I-Reaktionen katalysierte Einführung funktioneller Gruppen ist häufig Voraussetzung dafür, dass Arzneistoffe Substrate für Phase-II-Reaktionen sind. Besitzt allerdings ein Arzneistoff bereits für die Konjugation geeignete funktionelle Gruppen, kann auch ohne vorgeschaltete Phase-I-Reaktionen eine direkte Konjugation erfolgen. Die entstehende Konjugate sind sehr polar, damit gut wasserlöslich und können somit schneller renal und biliär ausgeschieden werden. [17]

2.3.2. Enzymkinetik

Die Enzymkinetik, ein Teilgebiet der biophysikalischen Chemie, beschreibt, wie schnell enzymkatalysierte chemische Reaktionen verlaufen. Die Enzymkinetik findet breite Anwendung in Biologie und Medizin, da auch biologische Substrate – unter anderem solche, die im Menschen auftreten – untersucht werden. Ein Hauptziel der Enzymkinetik ist die Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit mit geeigneten Formeln, aber auch die Bestimmung der dazugehörigen Parameter für ein bestimmtes Protein. [18]

Die Michaelis-Menten-Theorie, deren Gründer Leonor Michaelis und Maud Menten sind, legt den Grundstein für die Enzymkinetik. Diese besagt: Enzyme nicht nur hinsichtlich ihrer Aktivität zu charakterisieren, sondern auch die Konzentration zu finden, welche eine den Gegebenheiten angepasste Umwandlung ermöglicht. [18]

Im Gegensatz zur Kinetik chemischer Reaktionen gibt es in der Enzymkinetik das Phänomen der Sättigung: bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann die Umsatzgeschwindigkeit v nicht weiter gesteigert werden d. h. V_{max} (maximale Geschwindigkeit) wird erreicht. [18]

Die Sättigungsfunktion eines “Michaelis-Menten Enzyms” lässt sich unter Verwendung der Parameter K_m und V_{max} wie folgt formulieren:

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Bei immer gleicher Enzymkonzentration kann jeweils die Anfangsgeschwindigkeit v der Umsetzung für eine bestimmte, eingesetzte Substratkonzentration $[S]$ gemessen werden. Die graphische Auftragung ergibt für die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Substratkonzentration eine hyperbolische Kurve (Abb.2.3.2-1). [18]

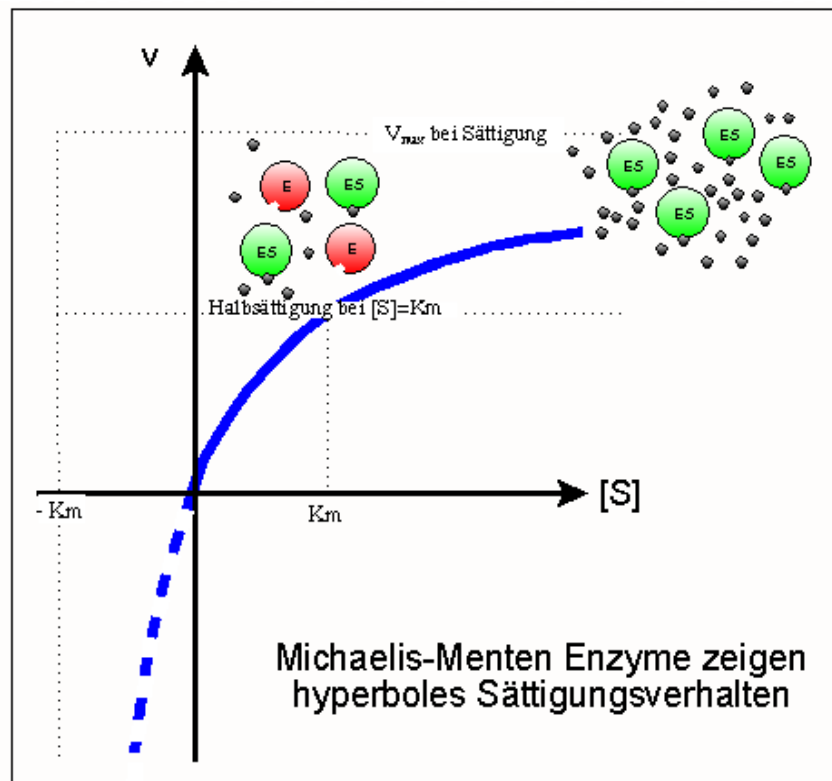


Abbildung 2.3.2-1: Hyperbel der Michaelis Menten Kinetik.

Aus dieser Kurve entnimmt man folgendes:

- Bei hoher Substratkonzentration wird die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) erreicht. [18]
- Bei niedriger Substratkonzentration steigt die Umsatzgeschwindigkeit fast linear mit zunehmender Substratkonzentration an. [18]
- An der Stelle, wo die Substratkonzentration gleich K_m wird, ist die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht. [18]

2.3.3. Chromatographie

Die Chromatographie ist eigentlich kein Unterkapitel des Metabolismus, es wird aber hier beschreiben, da chromatographische Methoden zur Darstellung des Metabolismus von FE@SUPPY angewendet wurden.

Zur Trennung von Substanzgemischen ist in den letzten 50 Jahren die Chromatographie die wichtigste Methode geworden. Sie beruht darauf, dass sich Substanzen in Bezug auf die Adsorption, den Ionenaustausch, die Verteilung zwischen verschiedenen Lösungsmitteln und einfache Filtriereffekte verschieden verhalten. [16]

2.3.3.1. HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography) ist eine analytische Methode in der Chemie. Die HPLC ist ein Flüssigchromatographie-Verfahren, mit dem man nicht nur Substanzen trennt, sondern diese auch über Standards identifizieren und quantifizieren (die genaue Konzentration bestimmen) kann.

Die HPLC ist eine schnelle Trenntechnik, dabei wird das zu trennende Gemisch mit Hilfe eines Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches (Eluent/Mobile Phase) zur Säule gebracht. Das ist ein Rohr, meist aus rostfreiem Stahl, das mit der so genannten stationären Phase gefüllt ist. Die stationäre Phase besteht meist aus Kieselgel an dessen Oberfläche bestimmte Gruppen gebunden sein können. Diese Gruppen fungieren als „Austauschplätze“ für die zu trennenden Substanzen. Je nach Art der Substanz wird sie unterschiedlich lang festgehalten. [19]

Durch verschiedene Trennmechanismen, bedingt durch die auf dem Kieselgel gebundenen Gruppen, findet so die Trennung der Substanzen des untersuchenden Gemisches statt. Die Probensubstanzen werden unterschiedlich lang am Säulenmaterial festgehalten und verlassen die Säule nach unterschiedlichen Zeiten. Die einzelnen Probenkomponenten werden anschließend vom Detektor registriert, er gibt diese Information an die Auswerteinhalte weiter, das Ergebnis ist ein Chromatogramm. Die Anzahl der Peaks entspricht der Anzahl der aufgetrennten Probenkomponenten, die Fläche ist deren Menge proportional. [19]

2.4. Bindungsstudien

Bindungsstudien dienen zur in vitro Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen. Diese Studien wurden mit Hilfe von Radioliganden und CHO-Zellen, welche mit dem humanen A₃-Rezeptor transfiziert sind, durchgeführt.

2.4.1. CHO-Zellen

CHO-Zellen sind Zellen aus den Ovarien des chinesischen Hamsters. Die erste CHO-Zelllinie wurde bereits 1957 etabliert. Hieraus wurden verschiedene CHO-Zelllinien mit speziellen Eigenschaften abgeleitet. Die CHO-Zellen werden meist als adhärente Monolayer gezogen. Die Zelldichte kann bis zu 400.000 Zellen/cm² betragen und die Verdoppelungszeit liegt bei 20-24 Stunden. [20]

CHO-Zelllinien werden sowohl zu Forschungszwecken als auch zur „industriellen“ Herstellung von rekombinanten Proteinen häufig benutzt. Gründe hierfür sind neben der raschen Verdoppelungszeit auch die genaue Charakterisierung der Zelllinien, die eine größtmögliche Sicherheit auch bei der Herstellung von Arzneimitteln gewährleistet. [20]

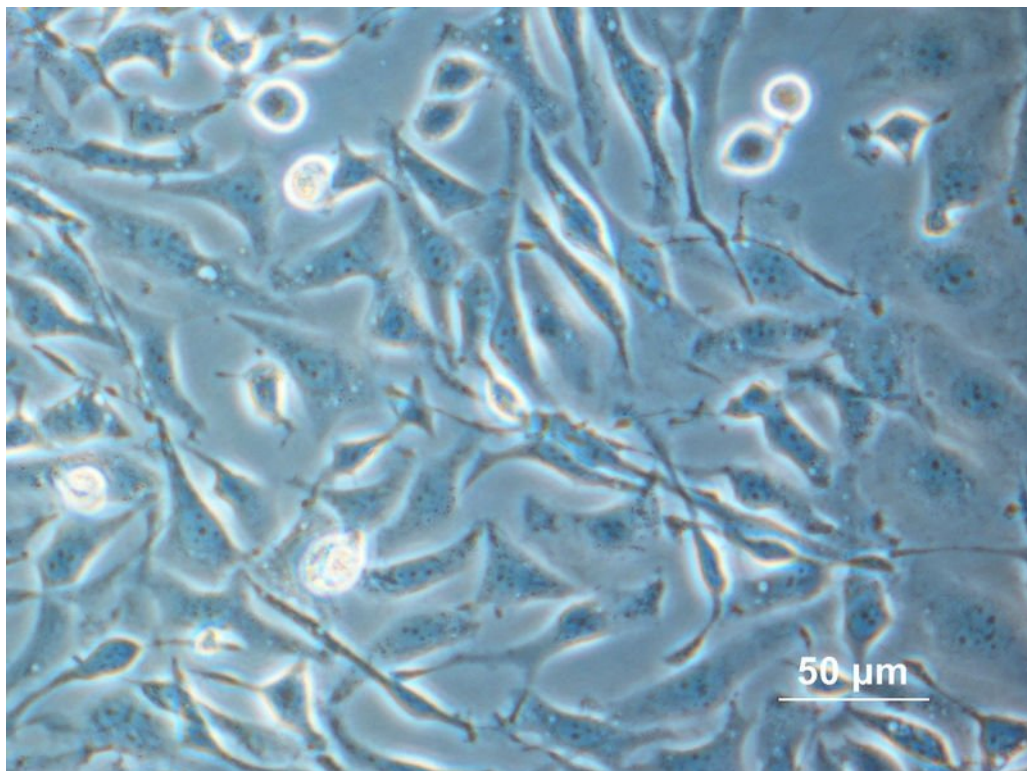


Abbildung 2.4.1-1: CHO-Zellen

2.4.1.1. Zellkulturmedien

Für die aus Organismen isolierten Zellen muss unter in-vitro-Bedingungen eine Umgebung geschaffen werden, welche Proliferation, Wachstum und, wenn nötig, Differenzierung und Ausübung von typischen Zellfunktionen erlaubt. Hierzu müssen den Zellen alle nicht selbst synthetisierbaren Substanzen zugeführt werden (essentielle Substanzen). „Abfallprodukte“ müssen so lange wie möglich neutralisiert werden (durch Zugabe von Puffer). Dieser Puffer ist in der Regel NaHCO_3 , wobei hierzu noch CO_2 von außen zugeführt werden muss. [21]

Als Ersatz für das Immunsystem des Organismus können Antibiotika zugegeben werden. Für ein optimales Wachstum über längere Zeit ist jedoch bis zum heutigen Tag ein Zusatz von tierischem oder menschlichem Serum nötig. [21]

Die Zellkulturmedien setzen sich in der Regel aus Aminosäuren, Salzen, Vitaminen, sonstigen Substanzen und einer anorganischen Puffersubstanz (NaHCO_3) zusammen. Diesen Medien muss Serum zugegeben werden, außerdem je nach Formulierung Glutamin und Natriumhydrogencarbonat. [21]

- Medium F12

Es ist eine Weiterentwicklung von F10 (Medium für die Züchtung von CHO-Zellen), der Gehalt einiger Aminosäuren und des Zinksulfats ist erhöht, außerdem wurden Putrescin und Linolsäure hinzugefügt. In dieser Form können CHO-Zellen ohne Serum vermehrt werden. [21]

2.4.1.2. Zusätze von Medien

- Serum

Neben dem bekannten und weit verbreiteten fetalen Kälberserum (FKS) kann Serum von neugeborenen Kälbern, von älteren Kälbern, vom Pferd, vom Schwein und anderen Spezies sowie vom Menschen verwendet werden. Die Seren liefern Hormone, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren, zahlreiche zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer- (NaHCO_3) und Neutralisationssysteme, z.B. Albumin. [21]

- Fetales Kälberserum (FKS):

Es wird aus Blut von Rinderfeten zwischen dem 3. und ca. 7. Trächtigkeitsmonat nach der Schlachtung meist keimarm gewonnen. Das Blut wird nach der Gerinnung zentrifugiert; das überstehende Serum soll möglichst wenig Hämoglobin und Endotoxin enthalten. Wichtig scheint zu sein, dass das Blut auf natürliche Weise gerinnt, weil dabei offenbar ein Wachstumsfaktor aus den Thrombozyten in das Serum abgegeben wird. [21]

Der Grund für die besondere Rolle des FKS ist bis heute unbekannt geblieben, auffällig ist jedoch insbesondere, dass der fetale Kreislauf des Rindes zu einem hohen Prozentsatz mit der vom Organismus kaum zu verwendenden Fructose betrieben wird, weshalb fetale Seren stets einen signifikanten hohen Anteil an Fructose aufweisen sollten. Serum von geborenen Kälbern hat diesen hohen Fructoseanteil nicht. [21]

- Glutamin

Es wird in der Regel bei -20°C aufbewahrt, was auch für Glutamin-haltige Medien gilt. Der Abbau des Glutamins findet jedoch hauptsächlich bei 37°C statt. Dies ist der Grund, weshalb regelmäßiger Medienwechsel nötig ist. [21]

- NaHCO₃

Natriumhydrogencarbonat ist sowohl Puffersubstanz als auch essenzieller Nahrungsbestandteil. Erhöhte CO₂- Gehalte, die z.B.: bei starkem Wachstum auftreten können, erniedrigen den pH-Wert, was durch erhöhten NaHCO₃ neutralisiert werden kann. Für jedes Medium ist eine bestimmte Menge an NaHCO₃ vorgegeben, die höheren Konzentrationen erfordern höhere CO₂- Spannungen. [21]

2.4.1.3. Passagieren der Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung

Die am weitesten verbreitete Methode, adhärente Zelllinien zu subkultivieren, ist der Gebrauch von Trypsin, mit EDTA. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellen nicht zu lange mit dem Trypsin-EDTA-Lösung in Kontakt bleiben, weil längere Einwirkzeiten die Lebensfähigkeit der Zellen irreversibel schädigen können. [21]

Bevor man die Trypsin-EDTA-Lösung einwirken lässt, sollten die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), möglichst ohne Calcium und Magnesium, gewaschen werden. Geringe Spuren von Serum-haltigem Medium können die Wirkung von Trypsin beeinträchtigen und die Zeit der Einwirkung auf die Zellen erheblich verlängern. Beim Trypsinierungsprozess sollten die verwendeten Lösungen auf 37°C vorgewärmt werden, denn diese ist die optimale Temperatur für die Trypsinwirkung (Einwirkzeit zwischen 3 und 10 Minuten). [21]

2.4.2. Ligand-Rezeptor-Kinetik

- Grundlagen

Unter einem Radioliganden sei hier eine radioaktiv markierte Substanz verstanden, die an Rezeptoren, Transportern oder Hormonen selektiv binden kann. Über Bindungsstudien können wichtige Informationen zur Affinität und Selektivität der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung erhalten werden. [22]

Die spezifische Bindung des Pharmakons (Ligand) an seinen Rezeptor ist die Voraussetzung der meisten Pharmakonwirkungen.

Der frei ungebundene Rezeptor liegt in der Regel in zwei Konformationen R und R* vor, die R-Konformation des Rezeptors ist inaktiv, die R*-Konformation ist aktiv. Die Bindung des Pharmakons an den Rezeptor kann zwei verschiedene Reaktionen auslösen: [17]

- Bindung des Pharmakons an seinen Rezeptor aktiviert eine dem Rezeptor zugeordnete Funktion. Substanzen, die die Rezeptorfunktion aktivieren, werden als Agonisten bezeichnet. [17]
- Bindung des Pharmakons an seinen Rezeptor aktiviert eine dem Rezeptor zugeordnete Funktion nicht, blockiert aber die Bindung des Agonisten und damit die agonist-induzierte Wirkung. Substanzen mit diesen Eigenschaften werden als kompetitive Antagonisten bezeichnet. [17]

Eine wesentliche Kennzahl eines Pharmakons ist demnach seine Affinität zum Rezeptor, die durch die dissoziationskonstante K_D bestimmt wird. [17]

$$K_D = \frac{[R]f^* [P]f}{[RP]}$$

f -freie Konzentration R-Rezeptor P-Pharmakon RP-Rezeptor-Pharmakon-Komplex

Der K_D -Wert wird in mol/L oder M angegeben. Für viele Arzneistoffe liegt er zwischen 0,1 und 1000nM. Je kleiner der K_D -Wert ist, desto höher ist die Affinität des Pharmakons zum Rezeptor. [17]

Aus der Gleichung kann abgelesen werden, dass wenn die freie Konzentration des Pharmakons gleich K_D ist, d.h. $K_D = [P]f$, die Hälfte aller Rezeptoren mit Pharmakon besetzt, also $[R]f=[RP]$, ist. [17]

- Sättigungsexperimente

Mit Sättigungsstudien wird die spezifische Bindung eines Radioliganden im Gleichgewicht in Abhängigkeit von seiner Konzentration bestimmt. Dadurch lassen sich drei Parameter ermitteln, die Aussagen über das Bindungsverhalten des Liganden erlauben (Abb.2.4.2-1): [22]

- die Affinität des Liganden (K_D)
- die Rezeptoranzahl (B_{max}) und
- das Ausmaß der unspezifischen Bindung

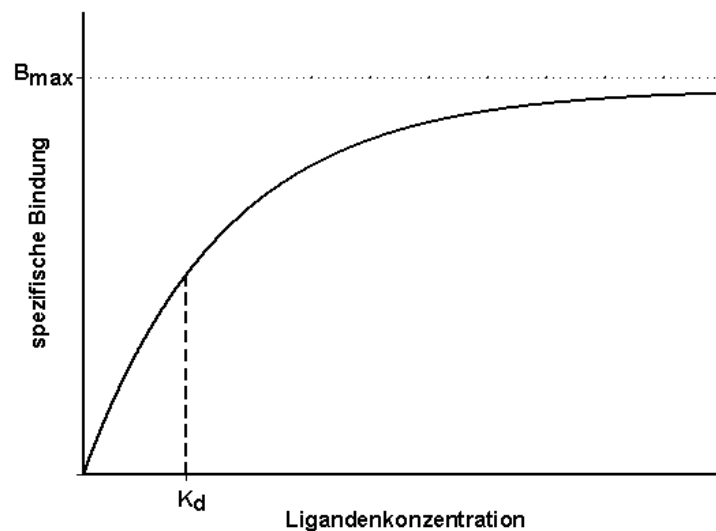


Abbildung 2.4.2-1 : Schematische Darstellung einer typischen Sättigungskurve

- Verdrängungsexperimente

Mit Sättigungsstudien können zwar Bindungsparameter bestimmt werden, sie haben jedoch den Nachteil, dass der zu überprüfende Ligand in radioaktiv markierter Form vorliegen muss. Um zu entscheiden, ob ein Ligand überhaupt Affinität zum Rezeptor besitzt, oder um die Bindungseigenschaften verschiedener Liganden zu vergleichen ohne jeden markieren zu müssen, sind Verdrängungsstudien die Methode der Wahl. [22]

In Verdrängungsstudien wird die Bindung eines mit konstanter Konzentration eingesetzten Radioliganden, dessen K_D bekannt ist, in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Liganden untersucht, dessen Bindungsparameter bestimmt werden sollen. Ein typischer Kurvenverlauf der Bindung in Verdrängungsstudien ist in Abb.2.4.2-2 schematisch dargestellt. [22]

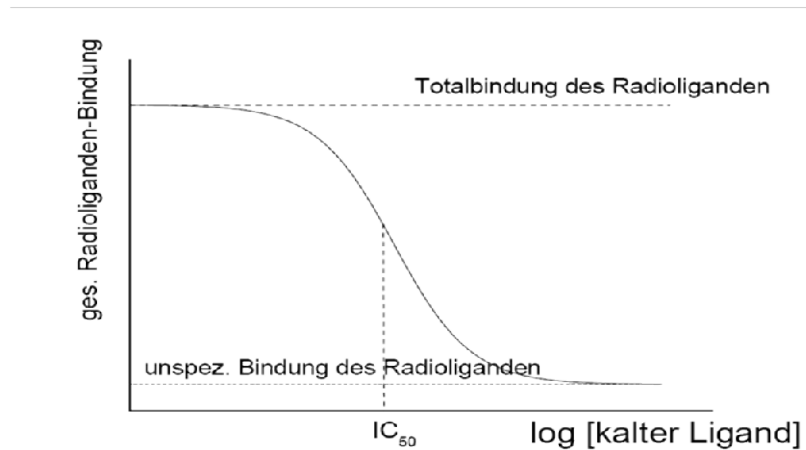


Abbildung 2.4.2-2: Schematische Darstellung einer Verdrängungskurve

Die Konzentration an nicht markiertem Ligand, die genau dem Wendepunkt der Verlaufskurve entspricht, wird als IC_{50} (inhibitory concentration 50 %) bezeichnet und gibt an, bei welcher Konzentration der nicht markierte Ligand die Hälfte der spezifischen Bindung des Radioliganden verdrängt hat. [22]

Der IC_{50} -Wert aus dem Hemmungs-Experiment und der K_D -Wert aus dem Sättigungsexperiment gehen in die Gleichung von Cheng- Prusoff ein, mit der auch der K_i -Wert berechnet wird. Der K_i -Wert ist die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Inhibitors. [23]

2.4.3. Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen mittels Ligand Tracer®

© Ridgeview Instruments AB erzeugt ein halb-automatisches Instrument zur Analyse von Ligand-Rezeptor-Interaktionen. Dieses Instrument wird als Ligand Tracer® bezeichnet und es ist seit etwa einem Jahr kommerziell erhältlich. Der Ligand Tracer® erlaubt eine einfache und korrekte Messung. [24]

2.4.3.1. Ligand Tracer Grey

Der Ligand Tracer Grey erfasst Ligand-Rezeptor-Interaktionen sowie sie auftreten. Dieses Gerät ist für die Detektion von ^{125}I markierte Liganden entworfen worden. [24]

Ligand Tracer Grey kann in 2 gemeinsamen Experimenten verwendet werden:

- Uptake/Retention-Messung

Bei dieser Messung wird die Bindung des Liganden an den Rezeptor in Echtzeit verfolgt. Der Uptake erfolgt während der Inkubation (=Zellen, welche den Rezeptor exprimieren, werden mit dem Radioliganden inkubiert. Dadurch sollte der Radioligand an den Rezeptoren binden, welche sich auf der Zelloberfläche befinden). [24]

Die Retention erfolgt nach dem „Waschen“ der Zellen (=Radioligand wird den Zellen entnommen und die Zellen werden mit frischem Medium versorgt; d.h. die Aktivität wird von den Zellen runter gewaschen). [24]

- Affinitäts-Messung

Die Affinität wird ermittelt, indem die Stärke der Bindung des Liganden zu dem Rezeptor gemessen wird. Dadurch ist es möglich den IC_{50} -Wert und K_i -Wert zu berechnen. [24]

2.4.3.2. Ligand Tracer Yellow

Ligand Tracer Yellow stellt bildlich dar, wie PET/SPECT-Liganden an den Rezeptoren binden. Es wird vor allem für Uptake/Retention Messungen verwendet, welche die PET/SPECT-Ligand-Rezeptor-Kinetik erkennen lässt. Dieses Gerät ist für eine Reihe von Nukliden geeignet, inklusive ^{111}In , ^{99}Tc , ^{18}F , ^{11}C und viele andere. [24]

2.5. Lipophilie

Die Lipophilie eines Wirkstoffes ist ein wichtiger pharmakokinetischer Faktor, der einen entscheidenden Einfluss auf die Permeabilität von Zellmembranen und die Verteilung im Zytoplasma hat. Auch die Fähigkeit eines Pharmakons, mit seinem Zielort zu interagieren, steht damit in Zusammenhang. Somit stellt die Lipophilie ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung von pharmakologischen Eigenschaften einer Verbindung dar.

2.5.1. Durchtritt von Pharmaka durch biologische Membranen

Biologische Membranen wie Endothelien und Epithelien sind ein-oder mehrschichtige Zellverbände. Die Zellmembran besteht aus einem bimolekularen Lipidfilm mit eingelagerten Proteinen. Während lipophile Substanzen durch die Lipiddoppelschicht diffundieren können, ist diese für polare Verbindungen weitgehend impermeabel. [17]

Nur kleine polare Moleküle können die Zellmembran durchdringen, worauf man auf die Existenz von hydrophilen „Poren“ in der Membran geschlossen hat. In den Kapillaren der Leber sind „Poren“ so weit, dass sogar Albumin und andere in der Leber synthetisierte Makromoleküle durchtreten können. [17]

Dagegen sind die Kapillaren des Gehirns für hydrophile Moleküle, die größer als Harnstoff sind (MM 60; Molekülradius 0,2µm), praktisch impermeabel. Das morphologische Substrat dieser so genannten Blut-Hirn-Schranke ist vor allem darin zu sehen, dass die Endothelzellen der Kapillaren im Gehirn dichter als in anderen Geweben aneinander schließen. Hinzu kommt, dass die Hirnkapillaren von einer dicht anliegenden Schicht von Gliazellen eingehüllt sind. [17]

Das Gehirn wird daher vom Blut aus in der Regel nur von lipophilen Pharmaka erreicht. Eine Verringerung der lipophilen Eigenschaften eines Pharmakons vermindert daher auch seine zentralen Wirkungen.

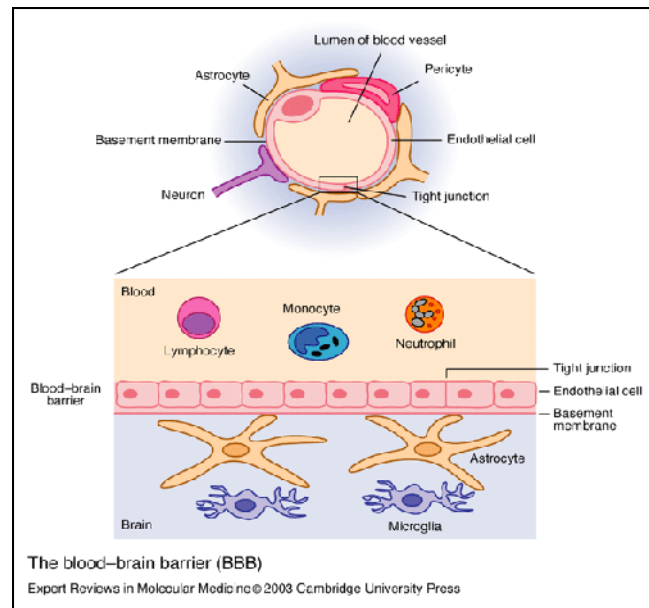


Abbildung 2.5.1-1: Blut-Hirn-Schranke

2.5.2. Lipophiliebestimmung

- Definition: $P = \frac{[S] \text{ Oktanol}}{[S] \text{ Wasser}}$

Zwischen organischer Phase (1-Octanol) und einer Pufferlösung von pH 7.4 verteilt sich ein Wirkstoff in einem bestimmten Verhältnis P. Dessen Logarithmus ergibt den log P.

- Methoden zur Bestimmung der Lipophilie:

- Klassische Verteilungsmethode (shake flask)

Substanz wird in wässriger Phase gelöst und einige Zeit mit 1-Octanol geschüttelt; anschließend bestimmt man die Konzentration in der wässrigen Phase und vergleicht sie mit der Ausgangskonzentration. [25]

- Berechnungen:

sehr viele Methoden und Algorithmen publiziert: Inkrementmethoden, Atom-basierte Methoden, Regressionsmodelle; absolute Werte weichen oft stark von gemessenen Werten ab. [25]

- HPLC [25]
 - vor allem reversed-phase HPLC-Säulen
 - eigentlich Bestimmung des $\log k_w$ (ist proportional zu $\log P$)
 - direkte Bestimmung meist nicht möglich, da man Wasser als Eluent verwenden müsste
 - bei sehr lipophilen Substanzen sehr lange Retentionszeiten
- HPLC-Anlage mit einer Gradienten-Pumpe:

Ein säulenchromatographisches System besteht aus einer Vorrichtung zur Förderung der mobilen Phase (Pumpe), einem Injektor zur Applikation der Probe, einer Trennsäule und einem Detektor, der an einen Schreiber oder Integrator angeschlossen ist. HPLC-Pumpen sorgen für einen konstanten Fluss der mobilen Phase. [26]

Isokratische Elution – Gradienten Elution:

Wird die Fließmittelzusammensetzung während eines chromatographischen Laufs konstant gehalten, so spricht man von einer isokratischen Elution. Bei dieser Elutionsform wird nur für die Förderung des Fließmittels nur eine Pumpe benötigt. Die isokratische Elution ist ausreichend, wenn die zu bestimmenden Substanzen keine zu großen Unterschiede aufweisen, so dass alle zu bestimmenden Komponenten innerhalb einer akzeptablen Zeit getrennt werden. [26]

Sollen jedoch mit einem chromatographischen Lauf Substanzen bestimmt werden, die sich in ihren chromatographischen Eigenschaften stark unterscheiden und daher stark unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen, muss die Fließmittelzusammensetzung während eines chromatographischen Laufs verändert werden. Auf diese Weise gelingt es, große Retentionsunterscheide zu verringern. [26]

Zur Bestimmung von hydrophilen und lipophilen Substanzen in einem chromatographischen Lauf gelingt meistens durch die Veränderung der Fließmittelzusammensetzung während der Trennung. Diese Elutionsform wird als Gradienten-Elution bezeichnet. [26]

Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten eine Gradienten-Elution zu erzeugen. die reproduzierbarsten Gradienten erhält man bei der Verwendung von HPLC-Anlagen, bei denen die Mischung von Fließmitteln programmiert werden kann. Man unterscheidet zwei Bauweisen: Hochdruck- und Niederdruck-Gradientensystem. [26]

Beim Hochdruck-Gradientensystem werden einzelne Fließmittel von separaten Pumpen gefördert und die Fließmittelanteile nach den Pumpen, folglich auf der Hochdruckseite, gemischt. Beim Niederdruck-Gradienten werden die einzelnen Fließmittel vor der Pumpe, somit auf der Niederdruckseite, durch Schaltventile gemischt. [26]

3. Material und Methoden

3.1. Metabolitenversuche

3.1.1. Material

3.1.1.1. Chemikalien, Lösungen, Puffer

Im Einzelnen wurden folgende Chemikalien von den angegebenen Quellen bezogen:

Acetonitril (AcN)	LiChrosolv [®] , Merck (Darmstadt, Deutschland; Lot.# I428229819)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland; Lot.# A684016536)
Aqua purificata	Anstaltsapotheke, AKH-Wien (Österreich)
DMSO (=Dimethylsulfoxid)	Sigma-ALDRICH [®] (Steinheim, Deutschland; Lot.# 00756MH-068)
Di-Na-Hydrogenphosphat x 2H ₂ O	Fluka Chemie AG (Basel, Schweiz; Lot.# 2314487)
Essigsäure 100%	Merck (Darmstadt, Deutschland; Lot.# K29822263 141)
Esterase [EC 3.1.1.1] (from porcine liver, crude)	Sigma-ALDRICH [®] (Steinheim, Deutschland; Lot.# 123K7033)
Kalium-dihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland; Lot.# 9023716)
Natrium-Chlorid	Sigma-ALDRICH [®] (Steinheim, Deutschland; Lot.# 68H1134)
Methanol	Sigma-ALDRICH [®] (Steinheim, Deutschland; Lot.# 80 39A)

PBS (=phosphate buffered saline)	Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung (Frankfurt am Main, Deutschland)
Salzsäure rauchend 37%	Merck (Darmstadt, Deutschland; Lot.# K22842217 612)
Trinatriumcitratdihydrat	Sigma-ALDRICH® (Steinheim, Deutschland; Lot.# 106K0064)
TWEEN 20® (=Polysorbate 20)	Sigma-ALDRICH® (Steinheim, Deutschland; Lot.# I428229819)

3.1.1.2. Geräte und Instrumente

HPLC-Anlage
3.1.1.2-1

Agilent Technologies 1100 Series (Santa Clara,

- Pumpe (Isopump) G13101
- Autosampler (WPALS) G1367A
- UV-Detektor (MWD) G1365B

Folgende Parameter waren eingestellt:

- Wellenläng: 254 nm
- Flow: 3ml/min
- Injektionsvolumen: 20µl



Abbildung 3.1.1.2-1: HPLC-Anlage

Säule: RP-18e 100-4.6mm
(Abb.3.1.1.2-2)

Chromolith® Performance, Merck
(Darmstadt, Deutschland)



Abbildung 3.1.1.2-2: RP-Säule

Vorsäule: 3-4.6mm	Chromolith® Reversed-Phase, Merck (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter	pH 537 WTW (Weilheim, Deutschland)
Eppendorf- Thermomixer	Thermomixer Compact, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge	Universal 30 RF, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Standard-Reaktionsgefäß 3810X	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Ultraschalbad	Ultrasonic Cleaner, VWR-GmbH (Darmstadt, Deutschland)

3.1.2. Methode

3.1.2.1. Methodenoptimierung für FE@SUPPY

- **Eluentoptimierung:**

Für die Eluentoptimierung wurden 2 Eluenten getestet.

- Eluent A ist ein Acetatpuffer/AcN Gemisch.

Acetatpuffer:

- 2,5 g Ammoniumacetat in 500ml Aqua purificata lösen
- 25ml Eisessig
- ad 1000ml Aqua purificata
- pH -Wert 3,5

Dazu wurden 1000ml AcN gemischt und 1 Stunde am Ultraschallbad entgast. Nach dem Abkühlen war der Eluent gebrauchsfertig.

- Eluent B ist ein Citratpuffer/AcN Gemisch.

Citratpuffer:

- 10g Trinatriumcitratdihydrat in 500ml Aqua purificata lösen
- 29,5ml 10% HCL
- ad 1000ml Aqua purificata
- pH-Wert 2,9-3

Dazu wurden 1000ml AcN gemischt und 1 Stunde am Ultraschallbad entgast. Nach dem Abkühlen war der Eluent gebrauchsfertig.

Der Eluent wurde immer einen Tag vor der Analyse hergestellt, um ihn über Nacht auf Raumtemperatur abkühlen zu lassen.

- **Optimierung der Löslichkeit**

Es wurden 3 verschiedene Lösungen (A,B,C) ausgetestet, um die Kompatibilität zwischen Eluent und Substrat zu optimieren:

- Lösung A:

PBS-Konzentrat mit folgender Zusammensetzung:

- 81,84g NaCl
- 18,0g Na₂HPO₄ · 2H₂O
- 3,0g KH₂PO₄
- ad 1000ml Aqua purificata

Lösung B:

PBS-TWEEN 20[®]

PBS wurde frisch hergestellt und mit einer 4N NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt
Dieser PBS hatte folgende Zusammensetzung:

- 8,184 g NaCl
- 1,8g Na₂H₂PO₄
- 0,3g KH₂PO₄
- ad 100ml Aqua purificata

Danach wurde TWEEN 20[®] dazu gemischt.

- Lösung C:

ACN

- **Optimierung von Lösungen zum Stoppen der Enzymreaktion:**

Es wurden 4 Lösungen ausgetestet, um die Optimalste für das Stoppen der Substratumsetzung zu verwenden → Stopplösung

Stopplösung 1: AcN/MeOH (9+1)

Stopplösung 2: MeOH/H₂O (9+1)

Stopplösung 3: AcN/H₂O (9+1)

Stopplösung 4: 1M HCL

3.1.2.2. Carboxylesteraseversuch

3.1.2.2.1. *Vorbereitung für den Versuch*

➤ Herstellung der verwendeten Lösungen

- PBS

PBS- Konzentrat wurde 1:10 verdünnt und bei Raumtemperatur gelagert.

- Stopplösung:

Als Stopplösung wurde das Gemisch AcN/MeOH (9+1) verwendet.

- Esterase

Es wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 100 I.U./ml hergestellt. Die Festsubstanz wurde mittels einer Analysenwaage eingewogen und auf das definierte Volumen mit PBS aufgefüllt.

- Eluent (mobile Phase)

Der Eluent, welcher für die Analysen verwendet wurde, war Eluent B. Der pH-Wert war zwischen 2.38-2.5.

3.1.2.2.2. Durchführung des Esteraseversuchs

Die Versuchsdauer betrug 6 Stunden, es wurden 5 verschiedene Konzentrationen ausgetestet (20µg/ml - 50µg/ml - 100µg/ml - 200µg/ml - 350µg/ml), welche im Triplikat bestimmt wurden.

➤ Herstellung des Versuchansatzes

	20µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	350µg/ml
FE@SUPPY [µl]	4,5	11,25	22,5	45	78,75
Esterase 80I.U. [µl]	360	360	360	360	360
PBS [µl]	85,5	78,75	67,5	45	11,25
Gesamtvolumen des 1.Reaktionsgefäßes [µl]	450	450	450	450	450

Nachdem SUPPY1, Esterase und PBS im ersten Reaktionsgefäß gut durchgemischt wurden, wurde 50µl gezogen und in ein zweites Reaktionsgefäß übergeführt. Das erste Reaktionsgefäß wurde im Thermomixer Compact bei 37°C und 900rpm inkubiert.



Abbildung 3.1.2.2.2-1: Thermomixer Compact

Mit der Stopplösung wurde die Enzymreaktion beendet, indem 50 μ l aus diesem AcN/MeOH Gemisch ebenfalls in dem zweiten Reaktionsgefäß überführt wurden. Das Stoppen der Reaktionsumsetzung erfolgte zu der 0., 1., 2., 3., 4. und 6. Stunde.

Das 2.Reaktionsgefäß wurde bei 10000rpm und einer Temperatur von 10°C für 5min zentrifugiert.



Abbildung 3.1.2.2.2-2: Zentrifuge

➤ Analyse

Die klare Lösung des Überstandes wurde in Vials, welche sich in Autosamplerfläschen befinden, überführt und zur Analyse in die HPLC eingebracht.

➤ Auswertung

Die erhaltenen Chromatogramme wurden über das Programm Gina Star 4 ausgewertet. Anhand der Peakflächen wurde die Konzentration von SUPPY:0 über die Kalibrationsgerade ermittelt.

Danach wurde mithilfe dieser Werte über Microsoft Excel eine Gerade errechnet, deren Steigung k jeweils einen Einzelwert der Michaelis Menten Kinetik darstellt.

Um die Michaelis Menten Kinetik zu ermitteln wurde das Programm Graph Pad Prism Version 3 verwendet.

3.2. Bindungsstudie

3.2.1. Material

3.2.1.1. Medien, Lösungen und Puffer

Im Einzelnen wurden folgende Chemikalien von den angegebenen Quellen bezogen:

Ethanol 96%	Merck (Darmstadt, Deutschland; Lot.# K37570271 728)
F12-Medium (Nutrient Mixture (Ham) + L-Glutamine)	GIBCO® Invitrogen GmbH (Lofer, Österreich; Lot.# 350419)
FCS (Fetales Kälber Serum)	GIBCO® Invitrogen GmbH (Lofer, Österreich; Lot.# 41F1775F)
Geneticin® (G418)	GIBCO® Invitrogen GmbH (Lofer, Österreich; Lot.# 348031)
[¹²⁵ I]-AB-MECA ([¹²⁵ I]-4-Aminobenzyl-5'-N-Methylcarboxamideoadenosine)	PerkinElmer® (Boston, USA; Lot.# GU51680)
Isopropanol	Anstaltsapotheke, AKH-Wien (Österreich)
Trypsin-EDTA-Lösung	GIBCO® Invitrogen GmbH (Lofer, Österreich; Lot.# 25200-072)
Trypanblau	Merck (Darmstadt, Deutschland; Lot.#111732)
PSG (Penicillin-Streptomycin-Glutamin)	GIBCO® Invitrogen GmbH (Lofer, Österreich; Lot.#10378-016)
PBS (=phosphate buffered saline)	Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung Frankfurt am Main, Deutschland)

3.2.1.2. Geräte und Instrumente

Autoklav	Certoclav Typ CVII, Kelomat (Traun, Österreich)
Brutschrank	Hera Cell 150, Heraeus (Hanau, Deutschland)
Einkanal-Pipette	Reference®, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
elektrische Pipettierhilfe	accu-jet® pro, BRAND GmbH (Wertheim, Deutschland)
Ligand Tracer Yellow/Grey	Ridgeview Instruments AB (Uppsala, Schweden)
Mehrzweckröhrchen (50ml) (Polypropylen, konischer Boden)	Cellstar™ Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Mikroskop (Objektive 10x,20x,40x)	BH-2, Olympus (Hamburg, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	©LaborOptik (Friedrichsdorf, Deutschland)
Petrischalen (100x20mm)	Cellstar™ Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Pipetten (2ml)	Falcon (New Jersey, USA)
Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sterilin® Limited (Angel Lane, USA)
Reine Werkbank	Reinraumtechnik Typ Et 190V EHRET (Tulln, Österreich)
Zellkulturflaschen	Cellstar™ Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zentrifuge	Rotanta/TRC, Hettich (Tuttligen, Deutschland)

3.2.2. Methoden

3.2.2.1. Steriltechnik

Die Steriltechnik ist keine Methode, aber eine Voraussetzung für das erfolgreiche Durchführen der Methoden. Diese Technik umfasst aseptische Arbeitsverfahren, die darauf abzielen, mikrobiologische Kontaminationen in Zellkulturen zu verhindern.

Für das Gewährleisten der Sterilität wurde Folgendes durchgeführt:

- Das Tragen von Schutzmantel
- Hände wurden mit 70% EtOH desinfiziert
- Das Benutzen einer Reinen-Werkbank (Abb. 3.2.2.1-1)



Abbildung 3.2.2.1-1: Reine Werkbank

- Die Arbeitsfläche wurde vor dem Einschalten des Laminar Air Flow mit Isopropanol desinfiziert und die Arbeitsmaterialien mit 70% EtOH besprüht, bevor sie in die Reine Werkbank eingebracht wurden.
- Pipetten (steril verpackt)
 - Für jeden Arbeitsschritt wurde eine neue sterile Pipette verwendet; das Aufziehen von Lösungen erfolgte mittels einer elektrischen Pipettierhilfe.
- Autoklavieren
 - Pipettenspitzen wurden vor dem Gebrauch autoklaviert und steril gelagert.

3.2.2.2. Routinemethoden zum Umgang mit CHO- und CHO- humane- A3-Zellen

Zellen wurden 2-mal pro Woche subkultiviert (montags und freitags) und es erfolgte einmal wöchentlich ein Medium-Wechsel (mittwochs).

Das verwendete Medium war F12, zudem wurde zusätzlich 10% FKS und 1% PSG dazu gemischt.

- Medium-Wechsel:

1. Es erfolgte zuerst eine mikroskopische Beurteilung der Zellkulturen
2. Danach wurde das alte Medium ausgeleert
3. Die Zellen wurden dann mit 20ml frischem Medium versorgt

- Subkultivierung:

1. Es erfolgte zuerst eine mikroskopische Beurteilung der Zellkulturen
2. Danach wurde das alte Medium ausgeleert
3. Mittels einer sterilen Pipette wurden 2-3ml PBS in die Zellkulturflasche pipettiert und auf der ganzen Oberfläche verteilt. Nach kurzer Einwirkzeit wurde das PBS ausgeleert.
4. 2-4ml Trypsin/EDTA-Lösung wurden in die Zellkulturflasche pipettiert. Nachdem diese Lösung gut an der ganzen Fläche verteilt wurde, erfolgte eine Einwirkzeit von 1-2 Minuten.
Durch festes Klopfen auf den Seiten der Zellkulturflasche wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst, was zu einer trüben Lösung geführt hatte. Dazu wurden 10-15ml Medium pipettiert und gut durchgemischt.
5. Dieses Gemisch aus Trypsin/EDTA, Medium und Zellen wurde in einem Mehrzweck-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur 5min zentrifugiert (1000rpm).

6. In einer neuen und sterilen Zellkulturflasche wurden 20ml Medium vorgelegt, welche auf die ganze Oberfläche der Zellkulturflasche homogen verteilt wurden. Zusätzlich wurden 600µl G-418 in die Zellkulturflasche pipettiert, in welche die CHO-humane-A3-Zellen kultiviert wurden. Dieses Antibiotikum sorgte dafür, dass die CHO-Zellen, welche den humanen A₃-Rezeptor exprimieren, weiterhin auch nur diesen Rezeptor-Subtyp exprimieren.
7. Das Pellet, das sich durch das Zentrifugieren gebildet hat, wurde in 1000µl Medium resuspendiert.
8. Danach erfolgte die Subkultivierung, indem das gewünschte Verhältnis (1:2, 1:4, 1:6) aus dem resuspendierten Pellet entnommen und in die Zellkulturflasche überführt wurde.
9. Die Zellkulturflasche wurde in den Brutschrank (Abb.3.2.2.2-1) bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.



Abbildung 3.2.2.2-1: Brutschrank

3.2.2.3. Vorbereitung für die Bindungsversuche

Die Bindungsversuche erfolgten mit den CHO-Zellen, welche den humanen A₃-Rezeptor exprimieren. Die Messung erfolgte mit dem Ligand Tracer[®]. Zuerst erfolgte eine Zellzahlbestimmung, danach wurde die Petrischale für den Versuch vorbereitet.

- Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer
 - Die Oberfläche der Zählkammer und das dazugehörige Deckglas wurden mit 70% EtOH gründlich gereinigt und danach wurde das Deckglas auf die Zählkammer angelegt (Abb. 3.2.2.3-2). Durch das Erscheinen von sog. „Newtonringen“, wurde gezeigt, dass die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt wurde (0,1mm). [21]
 - 20µl der Zellsuspension wurden vor dem Zentrifugieren (siehe Subkultivierung- Schritt 5) entnommen und mit Trypanblau (20µl) angefärbt. Das Anfärben mit Trypanblau diente der Unterscheidung vitaler von nicht vitalen Zellen, wobei sich vitale Zellen als ungefärbt darstellen.
 - Die Zellsuspension wurde in die Zählkammer gefüllt, welches durch Ansetzen der Einkanal-Pipette an die Kante der Zählkammer erfolgte. Die Kapillarkräfte saugten die Suspension selbst in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer. [21]

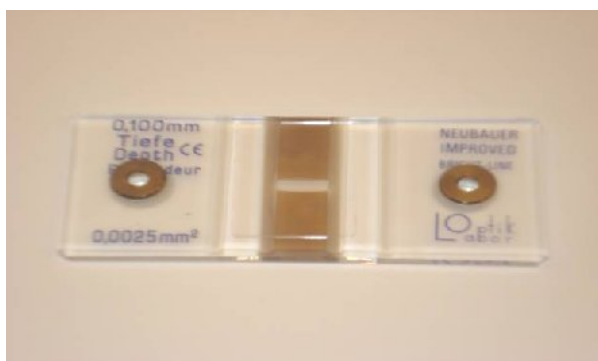


Abbildung 3.2.2.3-1: Neubauer-Zählkammer

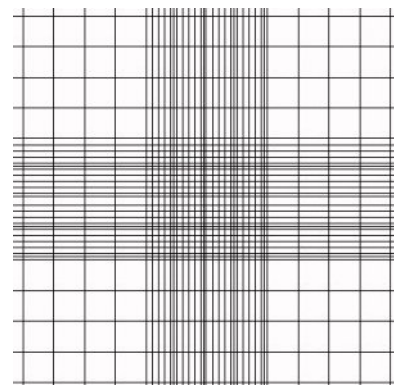


Abbildung 3.2.2.3-2: Netzeinteilung einer Neubauer-Zählkammer

Die Neubauerkammer besteht aus neun großen Quadraten (Abb.3.2.2.3-3). Jedes große Quadrat hat eine Fläche von 1mm^2 ; dies ergibt bei einer Tiefe von $0,1\text{mm}$ ein Volumen von $0,1\mu\text{l}$. [21]

Es wurden 4 große Quadrate ausgezählt und dann der Mittelwert errechnet. Zur Berechnung der Zellzahl wurde der Mittelwert mit 10^4 multipliziert. Dies ergibt die Zellkonzentration pro Millimeter; die Gesamtzahl ergibt sich aus dem Volumen der Zellsuspension mal der Zellzahl pro ml. [21]

- Vorbereitung der Petrischale für den Versuch

2ml der resuspendierten Pellets (siehe Subkultivierung- Schritt 7) wurden mittels einer sterilen Pipette auf eine sterile Petrischale gebracht, welche schräg liegt. Durch diese Schrägstellung wurden die Zellen nur auf einen bestimmten Bereich der Petrischale aufgebracht, welcher markiert wurde.

Die Petrischale wurde einen Tag lang in den Brutschrank ebenfalls schräg inkubiert, damit die Zellen nur in diesem Bereich anwachsen.

Am nächsten Tag erfolgte zuerst die mikroskopische Beurteilung und dann wurden die Zellen mit 10ml frischem Medium versorgt. Danach wurde die Petrischale für eine weitere Stunde in den Brutschrank horizontal gestellt, somit wurde die ganze Petrischale durch das Medium benetzt.

Vor Versuchsbeginn wurde das Medium von der Petrischale entfernt.

3.2.2.4. Bindungsversuch mit dem Ligand Tracer®

Mittels der Ligand Tracer® Technologie wurden kinetische Daten ermittelt, basierend auf wiederholte Konzentrationsmessungen von dem Radioliganden, welcher am Rezeptor gebunden ist. [24]

Die Technologie die dahinter steckt ist in Abb.3.2.2.4-1 schematisch dargestellt.

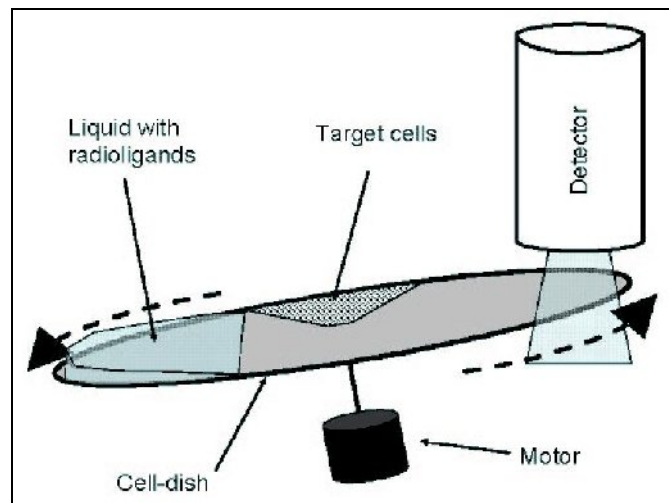


Abbildung 3.2.2.4-1: Ligand-Tracer® Technologie

Die Zielzellen wurden fest auf einem bestimmten Teil auf der Oberfläche der Petrischale platziert (inkubiert). Die Petrischale wurde auf eine, langsam sich drehende, Halterung aufgebracht und der flüssig markierte Ligand wurde dazugegeben. Der Detektor wurde über den höher liegenden Teil der Petrischale montiert. Er wurde dazu eingerichtet um hauptsächlich den flüssigkeitsfreien Bereich der Petrischale abzulesen. [24]

Beim Rotieren der Petrischale, passierten die Zielzellen durch den Detektor. Während der Ligand am Rezeptor gebunden hat, erfolgte eine erhöhte Intensität welche auch registriert wurde. Durch die Bindung des Liganden an dem Rezeptor wurde mit der Zeit eine sich erhöhende oder erniedrigte Reaktion ermittelt, die das kinetische Verhalten dieser Reaktion repräsentiert hat. [24]

- **Ligand Tracer Yellow** (Abb.3.2.2.4-2):

- Messung: Uptake / Retention
- Versuchsablauf:
 - Petrischale wurde in den Ligand Tracer eingebracht
 - Medium (F12 ohne FCS und PSG) wurde dazu pipettiert
 - Danach wurde die entsprechende Menge an Radioligand dazugegeben ($[^{18}\text{F}]\text{FE@ SUPPY:2}$)
 - Nachdem sich ein Equilibrium gebildet hat, wurde die ganze Lösung (Medium + Radioligand) von der Petrischale abgesaugt
 - 4ml frisches Medium (F12 ohne FCS und PSG) wurden auf der Petrischale gebracht



Abbildung 3.2.2.4-2: Ligand Tracer Yellow

- **Ligand Tracer Grey** (Abb.3.2.2.4-3):

- Messung: Affinität
- Versuchsablauf:
 - Petrischale wurde in den Ligand Tracer eingebracht
 - Medium (F12 ohne FCS und PSG) wurde dazu pipettiert
 - Danach wurde die entsprechende Menge an Radioligand dazugegeben (^{125}I -AB-MECA)
 - Nach dem sich ein Equilibrium gebildet hat, wurde ein kaltes FE@SUPPY dazu pipettiert (beginnend mit einer niedrigen Konzentration und diese dann stufenweise erhöhen)



Abbildung 3.2.2.4-3: Ligand Tracer Grey

Die Ergebnisse der Ligand Tracer Grey und Yellow wurden mit der Software Ligand Tracer 0.91 ausgewertet und mit Hilfe von Microsoft Excel graphisch dargestellt.

3.3. Lipophiliebestimmung

3.3.1. Material

3.3.1.1. Chemikalien, Puffer, Lösungen

Im Einzelnen wurden folgende Chemikalien von den angegebenen Quellen bezogen:

Aqua purificata	Anstaltsapotheke, AKH-Wien (Österreich)
DMSO (=Dimethylsulfoxid)	Sigma-ALDRICH® (Steinheim, Deutschland; Lot.# 00756MH-068)
Methanol	Sigma-ALDRICH®(Steinheim, Deutschland; Lot.# 80 39A)
PBS (=phosphate buffered saline)	Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung (Frankfurt am Main, Deutschland)
TFA (=Triflouressigsäure)	Fluka Chemie AG (Basel, Schweiz; Lot.# 3977541)
Triphenylene, 98%	Sigma-ALDRICH® (Steinheim, Deutschland; Lot.# 08513-CH)
Toluol, 99,9%	Sigma-ALDRICH® (Steinheim, Deutschland; Lot.# 34866)
TRIS (=Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck (Darmstadt, Deutschland; Lot.# K23044182 631)

3.3.1.2. Geräte und Instrumente

HPLC-Anlage	Merck HITACHI, Hitachi High Technologies (New York, Amerika)
-------------	---

Pumpe (Gradient): LaChrom L-7100

UV-Detektor: LaChrom L-7400

Folgende Parameter waren eingestellt:

Flussrate: 2ml/min

Wellenlänge: 270nm

Injektionsvolumen: 20µl

Säule: 2cm x 4mm (Abb.3.3.1.2-1)	Supelco®, Sigma-ALDRICH® (Steinheim, Deutschland)
-------------------------------------	--



Abbildung 3.3.1.2-1: Supelco® -Säule

Hamilton-Spritze (50µl)	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)
Loop (20µl)	Rheodyne®, IDEX Health & Science groups (Wertheim-Mondfeld, Deutschland)
pH-Meter	pH 537 WTW (Weilheim, Deutschland)

3.3.2. Methode

3.3.2.1. LogP

- Vorbereitung:

- Herstellung der Pufferlösungen:

- **pH 7,4:** 100ml PBS-Konzentrat + 900ml Aqua purificata
 - **pH 2:** 1,989ml TFA auf 1000ml Aqua purificata
 - **pH 10:** 6,06g TRIS auf 1000ml Aqua purificata
 - **pH 3,5:** Acetatpuffer:

- 2,5 g Ammoniumacetat in 500ml Aqua purificata lösen

- 25ml Eisessig

- ad 1000ml Aqua purificata

- Herstellung des internen Standards:

- 20mg Triphenylen + 2ml Toluol + 200ml MeOH

- Durchführung:

Ein aliquoter Teil der zu analysierenden Substanz wurde in DMSO gelöst. Anschließend wurde die Substanz 1:1 mit dem internen Standard gemischt. Aus diesem Gemisch wurden 20µl entnommen und mittels einer HPLC-Anlage analysiert, welche von einem Gradientensystem betrieben wurde. [27]

Eluent A: Pufferlösung (je nachdem bei welchem pH-Wert der logP bestimmt wurde)

Eluent B: Methanol

Zu Beginn der Analyse bestand die Eluentenmischung aus 90% Pufferlösung und 10% MeOH. Das Verhältnis der Eluentenmischung wurde kontinuierlich in die lipophilere Richtung geändert, sodass es nach 7 Minuten 0% Pufferlösung und 100% MeOH betrug. Die letzten 3 Minuten wurden vom System benötigt um sich wieder auf den Ursprungswert (90% Pufferlösung und 10% MeOH) einzustellen.

Durch diese kontinuierliche Änderung des Eluenten war es möglich, sowohl hydrophile als auch lipophile Substanzen innerhalb eines Zeitraums von nur 10 Minuten bei einer Flussrate von 2ml/min zu detektieren. Die erhaltenen Chromatogramme wurden über das Programm Winflow B, Version 1.21.60, ausgewertet und mit einem Plot-Programm überarbeitet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Metabolitenversuche

4.1.1. Methodenoptimierung für FE@SUPPY

Grundvoraussetzung für erfolgreiche Experimente mit Carboxylesterase ist ein funktionierendes Analysensystem. Sowohl Substrat, als auch sämtliche potentielle Produkte sollten mit hoher Empfindlichkeit quantifiziert werden. Daher wurde in einem ersten Schritt Eluent, Lösungsmittel und Stopplösung optimiert.

- Eluentoptimierung

Ziel der Optimierung der mobilen Phase war es die zu analysierenden Substanzen qualitativ voneinander zu trennen, eine Analysendauer von max. 10 Minuten und eine gute Auflösung zu erreichen.

In der Tabelle 3.1-1 sind die Ergebnisse nach Optimierung der mobilen Phase für FE@SUPPY zusammengefasst.

Eluent	Acetatpuffer- AcN	Citratpuffer- AcN
t_m	0,7	0,7
t_{R1}	1,53	2,09
t_{R2}	7,71	7,89
k_1	1,186	1,986
k_2	10,014	10,27
α	8,44	5,17
R	7,78	6,46

Tabelle 4.1.1-1: Vergleich zweier Eluenten bei einer Flussrate von 3ml/min

t_m =Totzeit (Zeit, die eine Substanz benötigt, um das HPLC-System ohne jegliche Wechselwirkung zu passieren; Injektionspeak)

t_R =Retentionszeit (=Zeit, die eine Substanz bis sie zum Detektor benötigt)

t_{R1} -SUPPY:0 t_{R2} -FE@SUPPY

k =Retentionsfaktor (Verhältnis der Aufenthaltszeit einer Komponente in der stationären und in der mobilen Phase) [19]

α =Trennfaktor (Verhältnis der Aufenthaltszeit 2-er Substanzen in der stationären Phase) [19]

R =Auflösung (ist ein Maß für den Abstand zwischen den Peaks_ an der Peakbasis) [19]

Bei beiden Eluenten konnten eine qualitative Trennung von SUPPY:0 und FE@SUPPY erzielt, wie in der Tab.4.1.1-1 an den Retentionszeiten zu sehen ist, sowie eine Analysendauer von max. 10 Minuten erreicht werden.

Das Citratpuffer-AcN Gemisch hat sich für die Carboxylesteraseversuche als optimal erwiesen, denn es erfüllt folgende Voraussetzungen:

- gute qualitative Trennung von SUPPY:0 und FE@SUPPY (siehe Tab. 4.1.1-1: t_{R1} und t_{R2})
- gute qualitative Trennung vom Injektionspeak und SUPPY:0 mit einer schönen Basislinientrennung (siehe Tab. 4.1.1-1: t_m und t_{R1})
- hohe Auflösung

- **Optimierung des Lösungsmittels und der Stopplösung:**

Die Optimierung des Lösungsmittels und der Stopplösung wurden hier in einem gemeinsamen Punkt zusammengefasst, da beide voneinander abhängig sind.

Da bei der Quantifizierung die Löslichkeit von Substanzen für deren Wiederfindung von entscheidender Bedeutung ist, ist es notwendig optimale analytische Bedingungen zu schaffen. Dadurch kann eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht werden.

Für SUPPY:0 und FE@SUPPY wurden verschiedene Lösungsmittel getestet, und über die erhaltenen Peakflächen miteinander verglichen.

Jede gelösten Substanzen wurden einer Kalibrationsgerade unterzogen. Parallel dazu wurde auch immer ein Carboxylesteraseversuch durchgeführt. Die 0-Stunden Werte, bei denen FE@SUPPY noch komplett vorliegt, wurden den äquivalenten Konzentrationen des Standards gegenübergestellt und die Wiederfindungsrate errechnet. Dadurch konnte ein optimales Lösungsmittel erarbeitet werden.

Zu Beginn wurde das PBS-Konzentrat für SUPPY:0 und FE@SUPPY eingesetzt. Es wurde aber festgestellt, dass die Peak-Areas von FE@SUPPY beim Carboxylesteraseversuch sehr stark von jenen der Kalibrationsgerade abgewichen haben.

Es wurde eine nicht ausreichende Löslichkeit von FE@SUPPY und SUPPY:0 in PBS erkannt darum wurde TWEEN20[®] als Lösungsvermittler, einem frisch hergestellten PBS beigemischt. AcN wurde als Lösungsmittel ebenfalls getestet.

Da die Peak-Areas in mehreren Versuchen unterschiedliche Werte zeigten, wurde versucht die Stopplösung mit einzubeziehen, um dadurch die Löslichkeit zu verbessern. Es wurde somit sowohl bei der Kalibrationsgerade als auch beim Carboxylesteraseversuch eingesetzt. Die Stopplösung wurde für das PBS-Konzentrat und für PBS-TWEEN20 ebenfalls optimiert (Tab.4.1.1-2 und Tab.4.1.1-3).

Durch die Optimierung des Lösungsmittels und der Stopplösung für SUPPY:0 und FE@SUPPY, welche eine 1:1 Mischung aus PBS-Konzentrat + AcN/MeOH ist (Abb.4.1.1-1 und Abb.4.1.1-2), haben sich beim Carboxylesteraseversuch Peak-Area Anfangswerte ergeben, die mit denen der Kalibrationsgerade vergleichbar waren. Dies war eine wichtige Voraussetzung für erfolgreiche Analysen.

In der Abb. 4.1.1-1 und 4.1.1-2 sind die Wiederfindungsraten für die 3 unterschiedlichen Lösungsmittel anhand der Peak-Areas dargestellt.

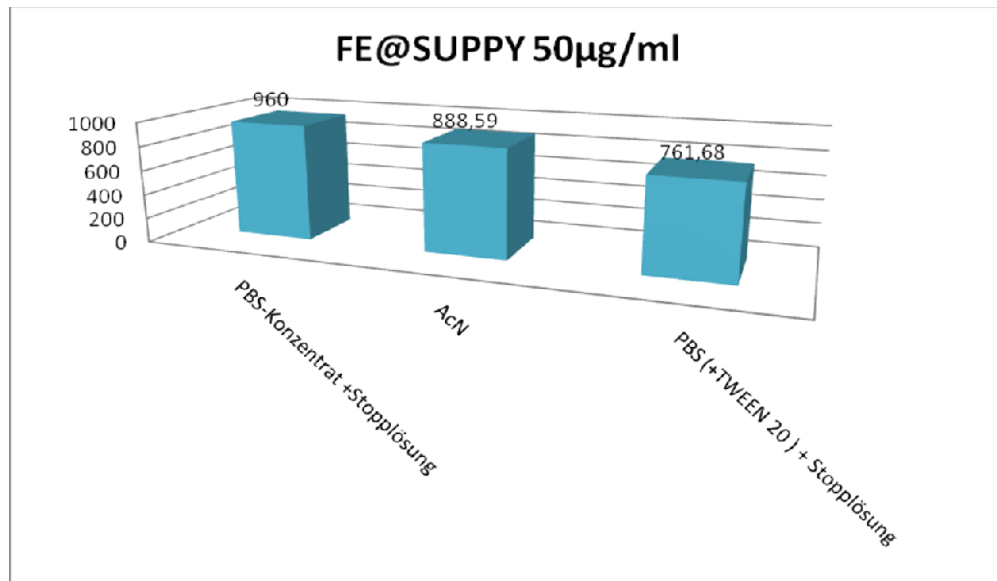


Abbildung 4.1.1-1: Vergleich der unterschiedlichen Lösungsmitteln anhand der Peak_Areas

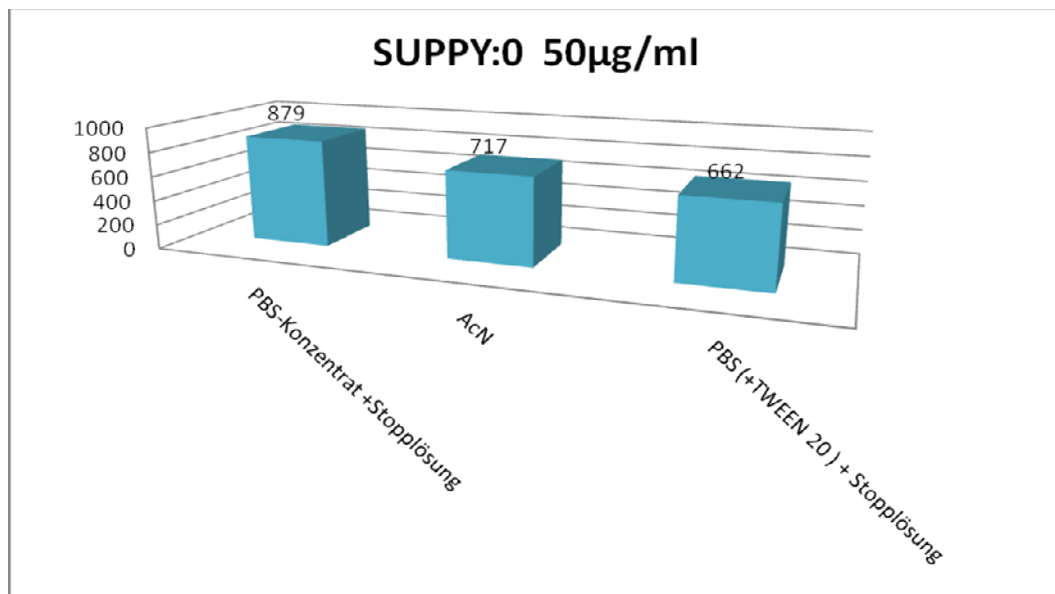


Abbildung 4.1.1-2: Vergleich der unterschiedlichen Lösungsmitteln anhand der Peak_Areas

Die Ergebnisse für die Optimierung der Stopplösung sind in der Tab.4.1.1-2 und Tab.4.1.1-3 angeführt.

Stopplösung	SUPPY:0	FE@SUPPY	Ergebnis
ACN/MeOH (9+1)	×		Niederschlag
MeOH/H ₂ O (9+1)		×	Niederschlag
AcN/H ₂ O (9+1)	×	×	2-Phasentrennung
1M HCL	×	×	Klare Lösung

Tabelle 4.1.1-2: Optimierung der Stopplösung für PBS+TWEEN20®

Stopplösung	SUPPY:0	FE@SUPPY	Ergebnis
ACN/MeOH (9+1)	×	×	Klare Lösung
MeOH/H ₂ O (9+1)	×	×	Klare Lösung

Tabelle 4.1.1-3: Optimierung der Stopplösung für das PBS-Konzentrat

Für die Lösungsmittel-Variante mit PBS und TWEEN20® stellte sich die 1M HCL als die optimale Stopplösung heraus, weil es weder zu einer Phasentrennung noch zu einem Niederschlag geführt hat (siehe Tab.3.1-2).

Für das PBS-Konzentrat waren beide Stopplösungen optimal, doch das AcN/MeOH Gemisch kam zum Einsatz, denn es wurde der folgenden Referenz [28] entnommen.

4.1.2. Carboxylesteraseversuch

Das Ziel der Carboxylesteraseversuche war es die Stabilität von FE@SUPPLY gegenüber Carboxylesterase zu ermitteln.

Um die Ergebnisse der Carboxylesteraseversuche quantifizieren zu können wurden Kalibrationsgeraden mit SUPPLY:0 und FE@SUPPLY durchgeführt.

Es wurden folgende Konzentrationen im Triplikat hergestellt: 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml.

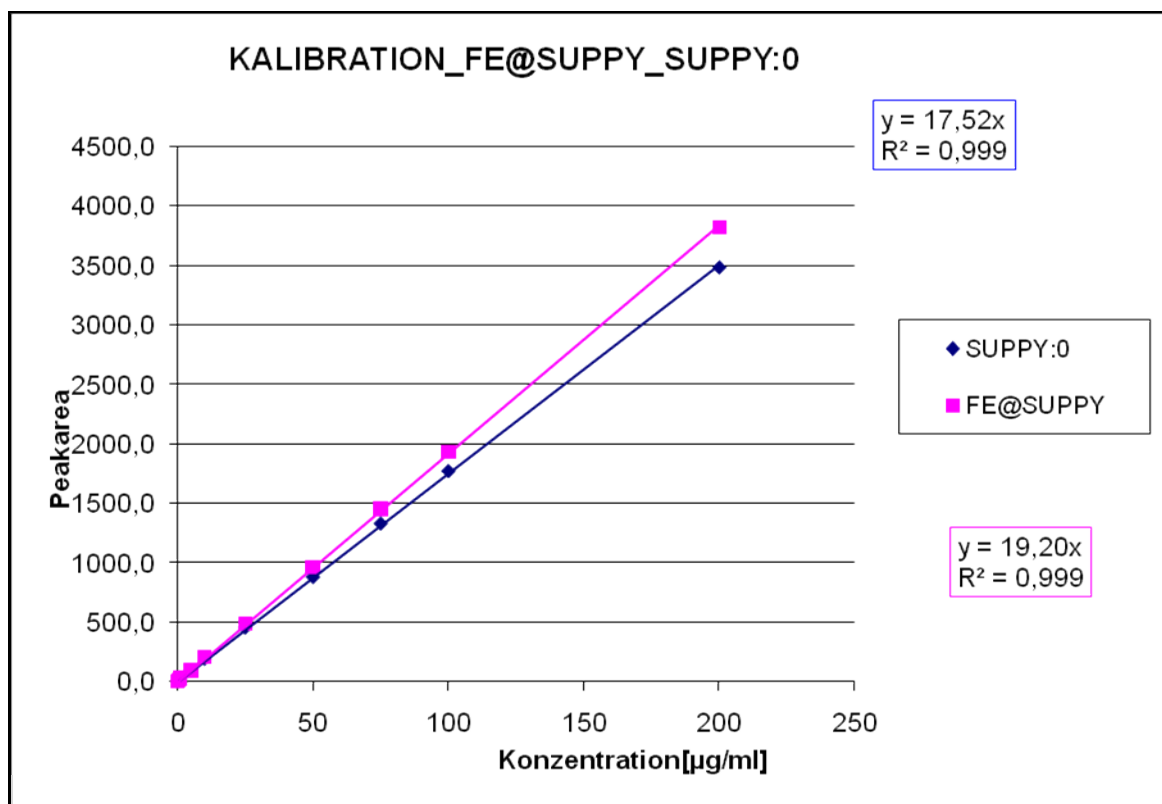


Abbildung 4.1.2-1: Kalibrationsgerade von SUPPLY:0 und FE@SUPPLY

Die Linearität, die durch das hohe Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,999$ ausgedrückt wird, zeigt, dass einerseits die Löslichkeit von SUPPLY:0 und FE@SUPPLY, aber auch der HPLC-Trennassay optimal gewählt wurden.

Die, durch die Zugabe der Stopplösung und dadurch beendeten enzymatischen Umsetzung von FE@SUPPY zu SUPPY:0, erhaltene Probe wurde über die HPLC analysiert.

Folgende Chromatogramme (Abb.4.1.2-2-Abb.4.1.2-7) zeigen die enzymatische Abnahme von FE@SUPPY und die Zunahme von SUPPY:0 über 6 Stunden.

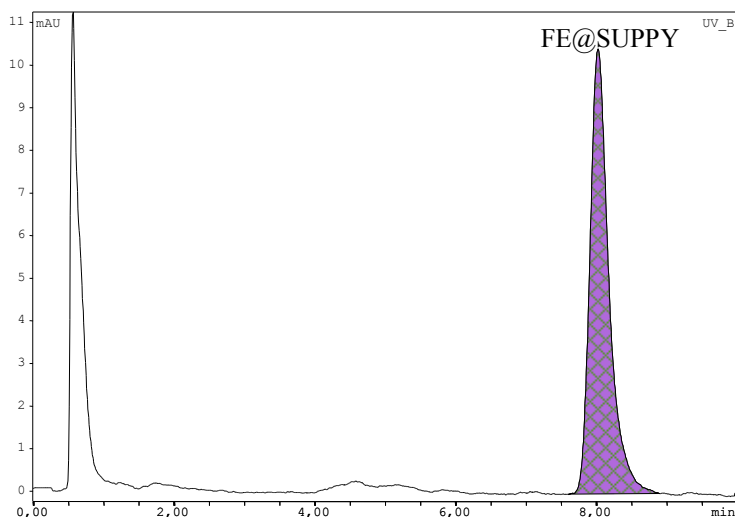


Abbildung 4.1.2-2: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 0.Stunde

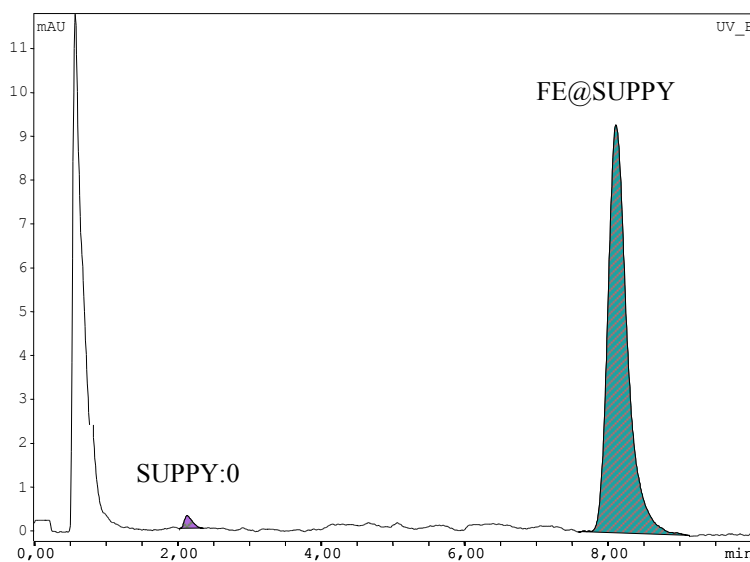


Abbildung 4.1.2-3: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 1.Stunde

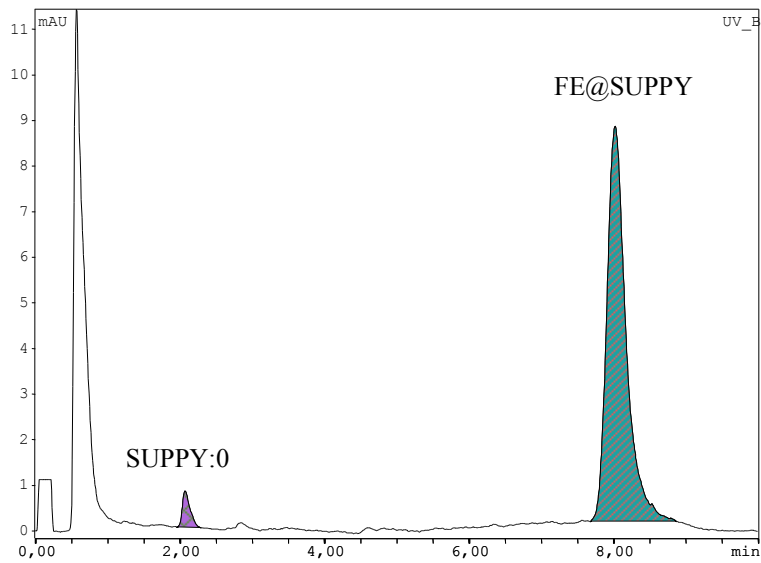


Abbildung 4.1.2-4: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 2.Stunde

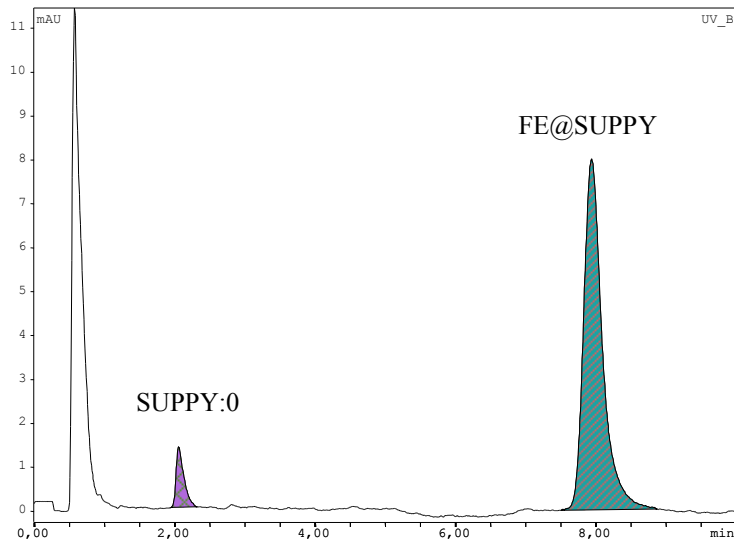


Abbildung 4.1.2-5: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 3.Stunde

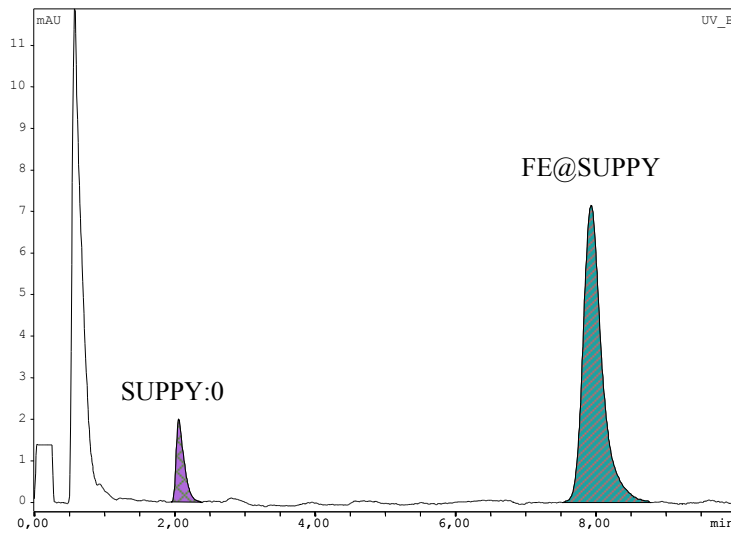


Abbildung 4.1.2-6: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 4.Stunde

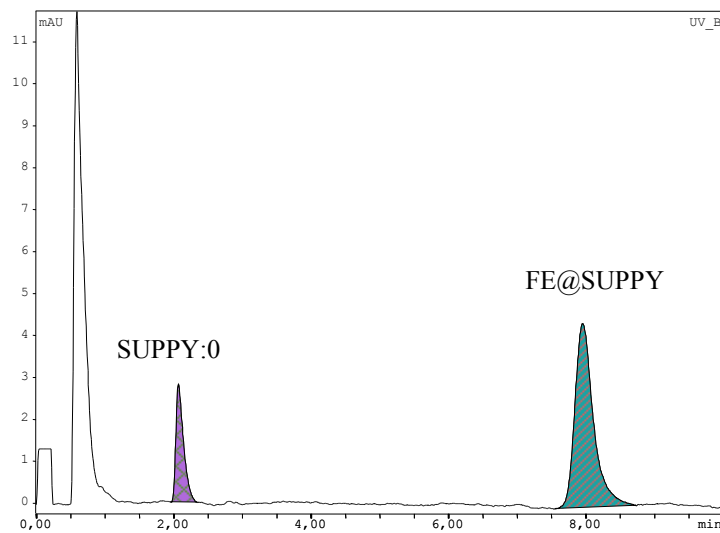


Abbildung 4.1.2-7: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 6.Stunde

Die aus den Chromatogrammen erhaltenen Peak-Areas wurden integriert und im Verhältnis zu der Zeit mit Hilfe von Microsoft Excel graphisch dargestellt (Abb.4.1.2-8 bis Abb.4.1.2-12). Diese Diagramme zeigen den Verlauf der Triplikate von FE@SUPPY und SUPPY:0 über 6 Stunden.

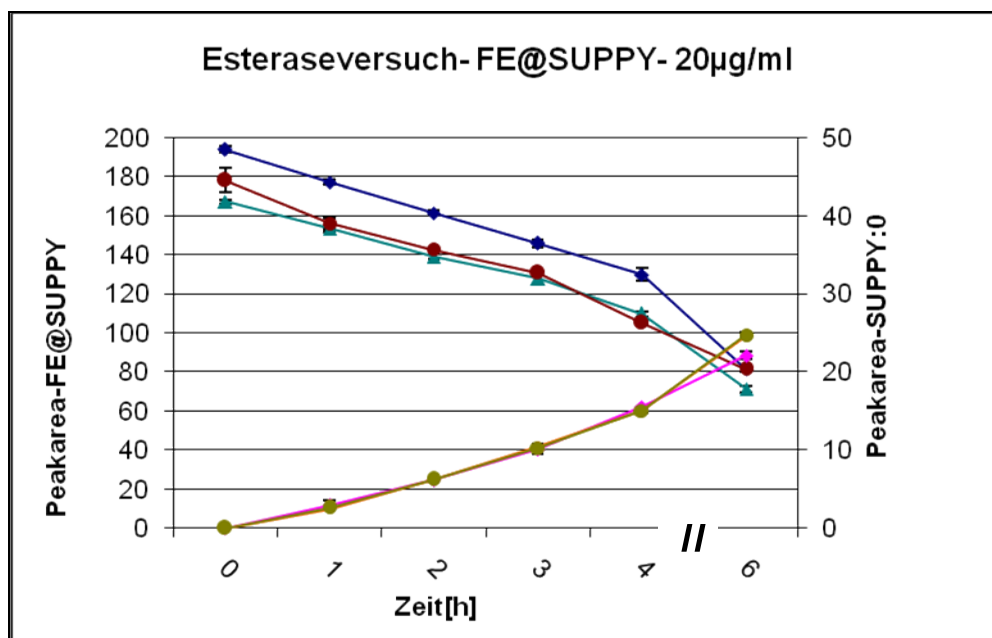


Abbildung 4.1.2-8: Abnahme von FE@SUPPY und Zunahme von SUPPY:0 bei 20µg/ml

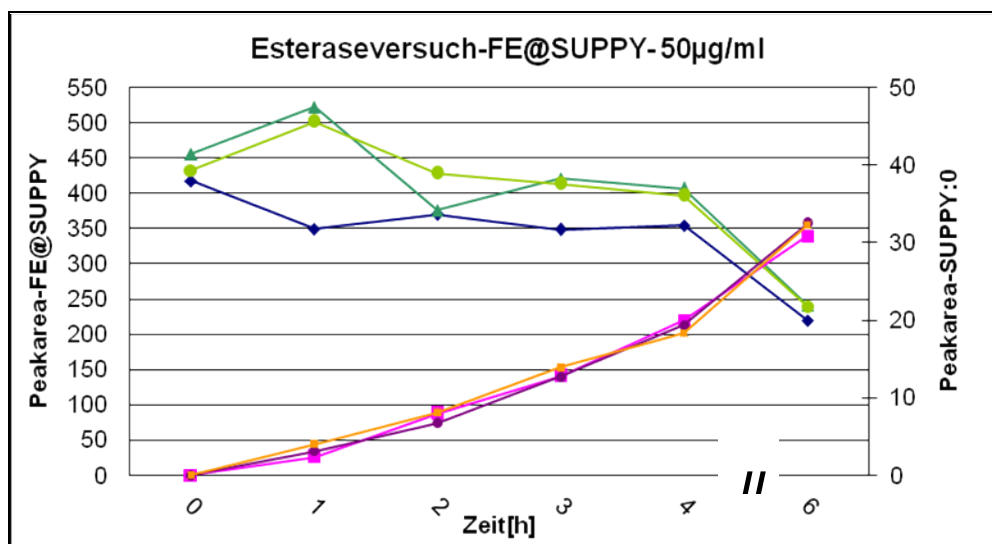


Abbildung 4.1.2-9: Abnahme von FE@SUPPY und Zunahme von SUPPY:0 bei 50µg/ml

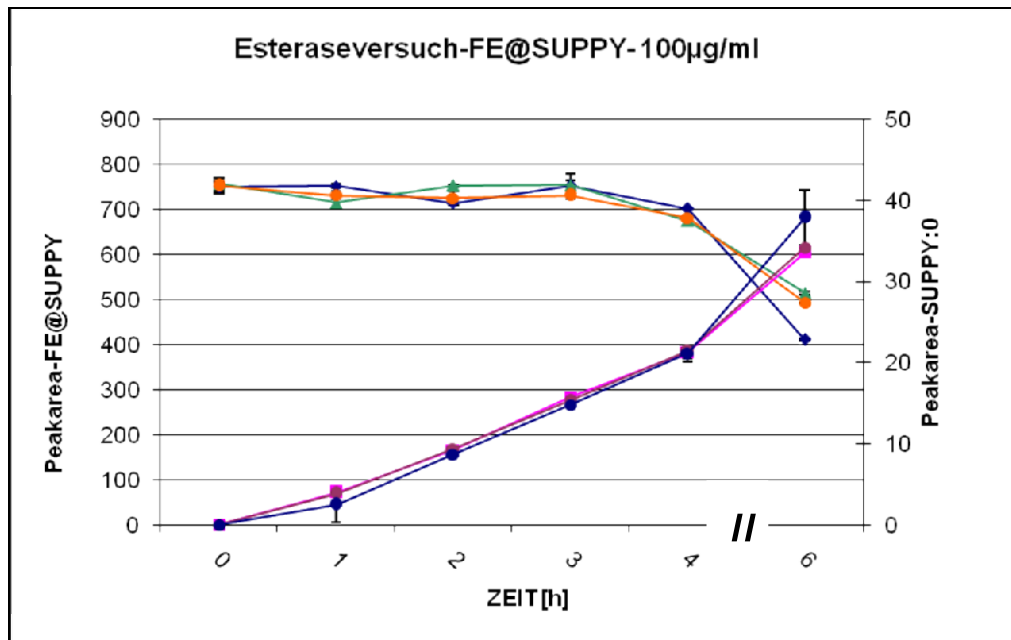


Abbildung 4.1.2-10: Abnahme von FE@SUPPY und Zunahme von SUPPY:0 bei 100µg/ml

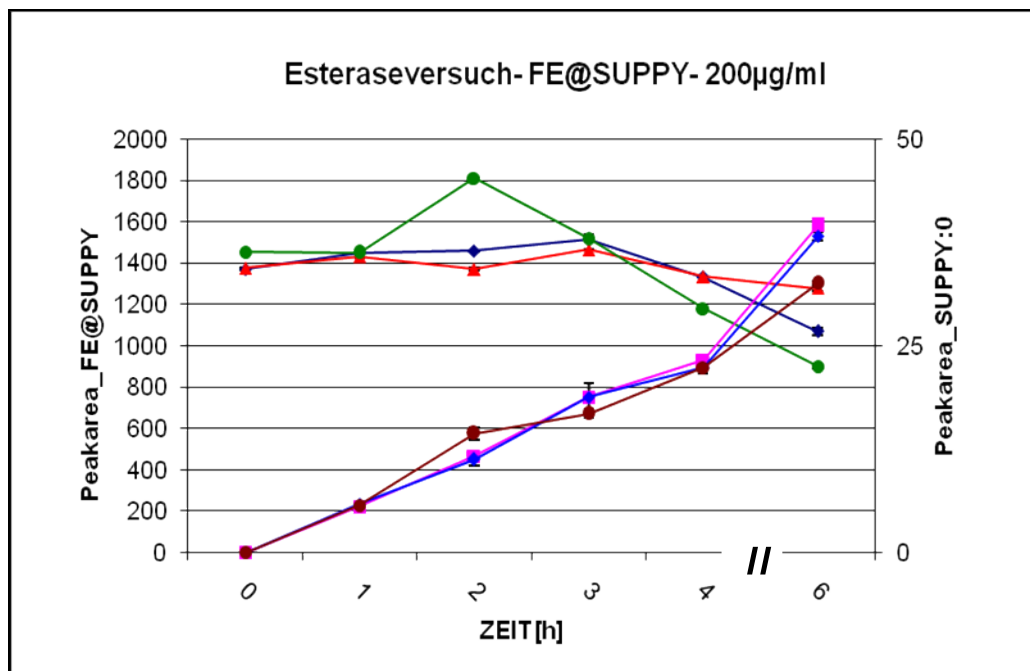


Abbildung 4.1.2-11 Abnahme von FE@SUPPY und Zunahme von SUPPY:0 bei 200µg/ml

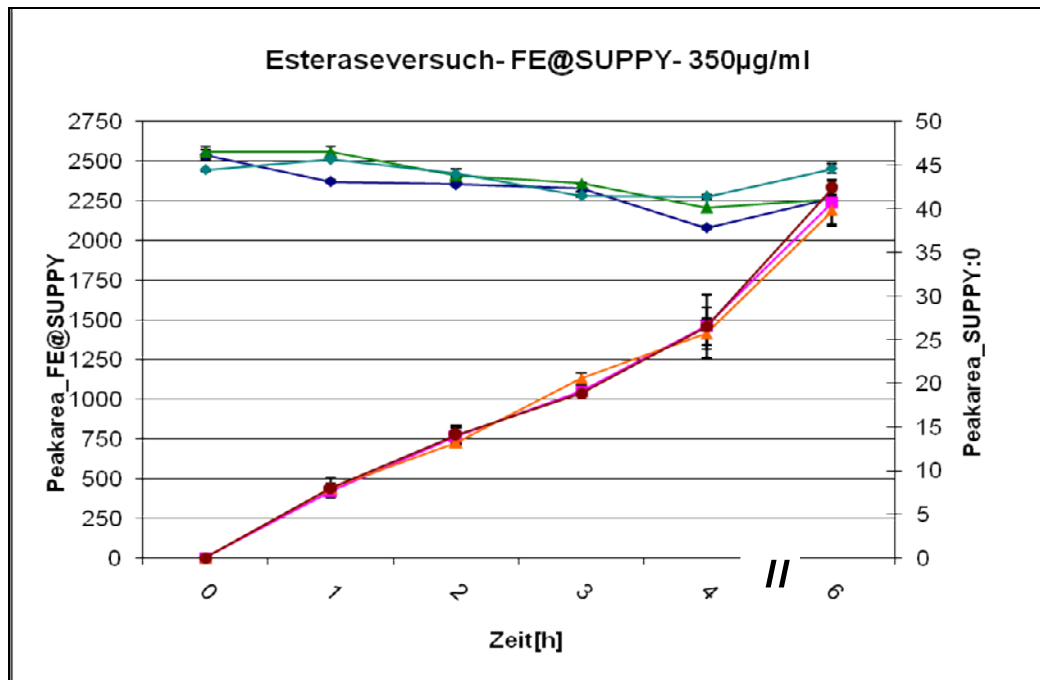


Abbildung 4.1.2-12: Abnahme von FE@SUPPY und Zunahme von SUPPY:0 bei 350µg/ml

Mittels Michaelis Menten Kinetik wurde der Zusammenhang zwischen der Substratkonzentration ($[S]$, x-Achse) und der Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms (v , y-Achse) dargestellt. Die Kinetik liefert 2 Parameter:

$V_{\max}$ = maximale Umsatzgeschwindigkeit, welche bei Enzymsättigung erreicht wird

K_m = Michaelis Menten Konstante, ist die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit ($\frac{1}{2} V_{\max}$) erreicht wird. K_m beschreibt somit die Affinität zwischen Substrat und Enzym.

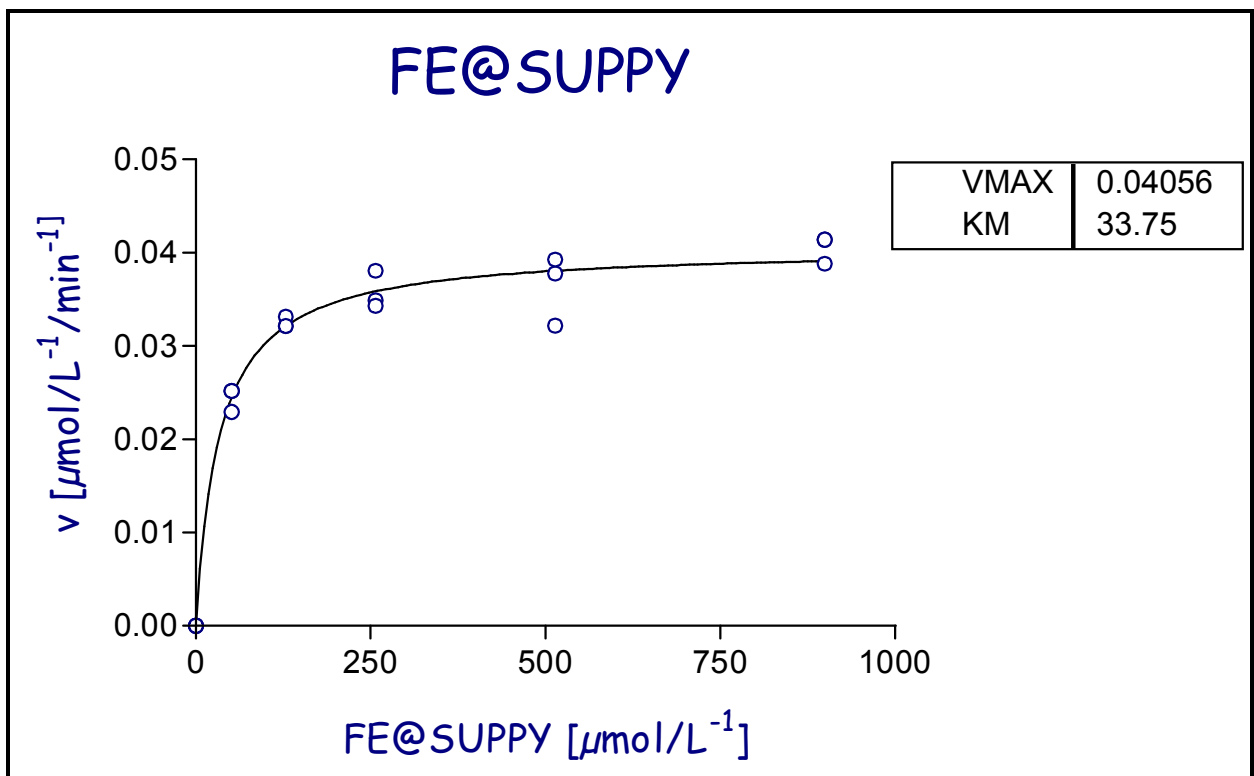


Abbildung 4.1.2-13: Michaelis Menten Kinetik von FE@SUPPY

Aus der Abb.4.1.2-12 kann abgelesen werden, dass FE@SUPPY einen $V_{\max}$ von $0.04056 \mu\text{mol/L}^{-1}/\text{min}^{-1}$ und einen K_m von $33.75 \mu\text{mol/L}^{-1}$ hat.

Die Ergebnisse von FE@SUPPY dienen eigentlich als Vorlage für FE@SUPPY:2, doch zur Abschätzung der Stabilität von FE@SUPPY wurden die Werte mit 2 anderen PET-Tracern verglichen.

FETO: $V_{\max}$ $1.543 \mu\text{mol/L}^{-1}/\text{min}^{-1}$, K_m $115.1 \mu\text{mol/L}^{-1}$ [28]

FE@CIT: $V_{\max}$ $0.1418 \mu\text{mol/L}^{-1}/\text{min}^{-1}$, K_m $182.6 \mu\text{mol/L}^{-1}$ [29]

Durch den Vergleich mit den anderen PET-Tracern wurde festgestellt dass die Stabilität von FE@SUPPY gegenüber der Carboxylesterase sehr gering ist, was auf einen schnellen Metabolismus hindeutet.

Betrachtet man den K_m -Wert der drei Tracer, so sieht man dass die Michaelis Konstante von FE@SUPPY viel kleiner als den 2 anderen Tracern ist. Ein kleiner K_m -Wert bedeutet, dass das Enzym bereits bei niedrigen Substratkonzentrationen halb gesättigt ist und das, das Substrat eine höhere Affinität zum Enzym hat. [30]

Zurzeit finden die Versuche für FE@SUPPY:2 statt. Ziel dieses Vergleichs zwischen FE@SUPPY und FE@SUPPY:2 ist es, die Stabilität der beiden PET-Tracer gegenüber Carboxylesterasen aufzuzeigen, um dadurch Informationen über die weitere Verwendung des Tracers herauszufinden.

4.2. Bindungsstudien

Bindungsstudien dienen zur in vitro Untersuchung der Ligand-Rezeptor-Interaktion. Dadurch können die Affinität und die Selektivität des Liganden zum Rezeptor ermittelt werden.

In dieser Arbeit wurden die ersten Bindungsstudien für FE@SUPPY ermittelt. Diese wurden mit dem Ligand Tracer Grey und dem Ligand Tracer Yellow durchgeführt, welche von der Firma[®] Ridgeview Instruments AB zur Testung für einen gewissen Zeitraum zur Verfügung gestellt wurden.

4.2.1. Bindungsversuch mit dem Ligand Tracer

- Ligand Tracer Grey

Ziel der Messung mit dem Ligand Tracer Grey war die Ermittlung der IC_{50} und der inhibitorischen Konstante von FE@SUPPY (K_i) gegenüber $[^{125}I]$ -AB-MECA.

Dafür wurden die CHO-Zellen, welche den humanen A_3 -Rezeptor exprimieren, mit der gleichbleibende Konzentration des Radioliganden ($[^{125}I]$ -AB-MECA) und unterschiedlichen Konzentrationen von FE@SUPPY inkubiert (siehe Abb.4.2.1-1).

$[^{125}I]$ -AB-MECA ist ein Agonist am humanen A_3 -Rezeptor mit einer K_D von 0.59. [31]

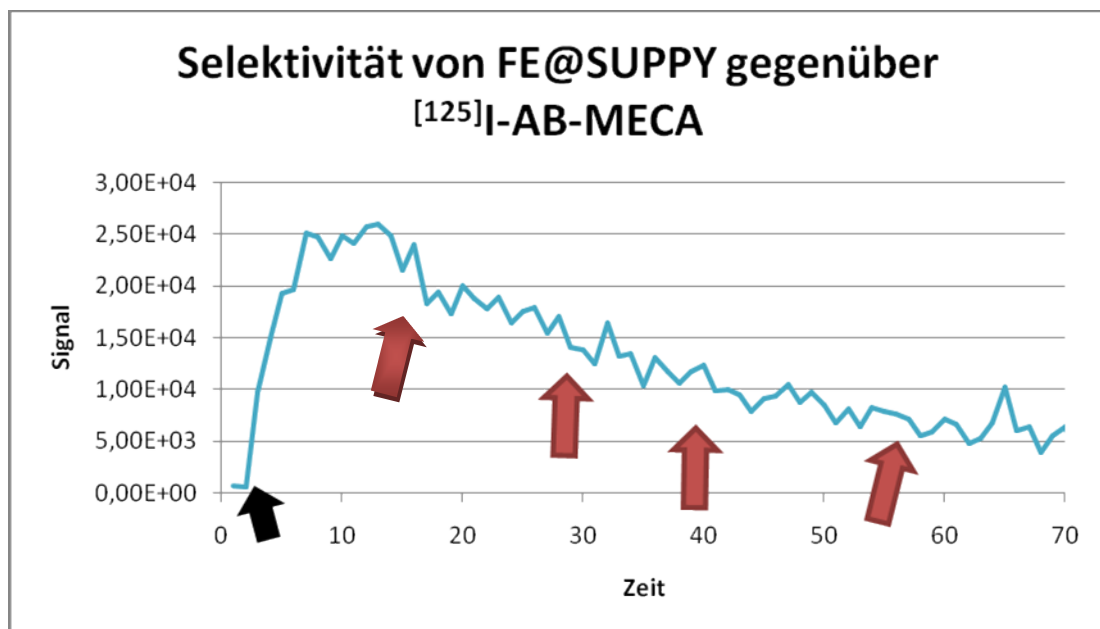


Abbildung 4.2.1-1: Selektivität von FE@SUPPY gegenüber $[^{125}I]$ -AB-MECA

 Zugabe von $[^{125}I]$ -AB-MECA 3nM
 Zugabe von FE@SUPPY beginnend mit 0.5nM, 1nM, 2nM und 5nM

Zuerst wurden die Zellen mit ^{125}I -AB-MECA inkubiert, was zu einem „Uptake“ geführt hat (^{125}I -AB-MECA bindet an den Rezeptor). Durch die Zugabe von FE@SUPPY erfolgte eine Verdrängung des Agonisten von seinem Bindungsplatz, was zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität geführt hat (Abb.4.2.1-1). Obwohl die Abnahme nicht gleichförmig erfolgte, konnte trotzdem gezeigt werden, dass FE@SUPPY mit hoher Selektivität am A_3 -Rezeptor gebunden hat.

Die Ermittlung der IC_{50} und K_i konnte nicht erzielt werden, da der Ligand Tracer Grey für eine limitierte Zeit zur Verfügung gestellt wurde und in dieser Zeit wurden die Vorversuche durchgeführt. Aus diesem Grund haben die erhaltenen Daten begrenzte Aussagekraft.

- **Ligand Tracer Yellow**

Ein Ligand Tracer Yellow Versuch diente der Darstellung von Uptake und Retention. Für die Ligand Tracer Yellow Messungen wurde aus logistischen Gründen FE@SUPPY:2 eingesetzt.

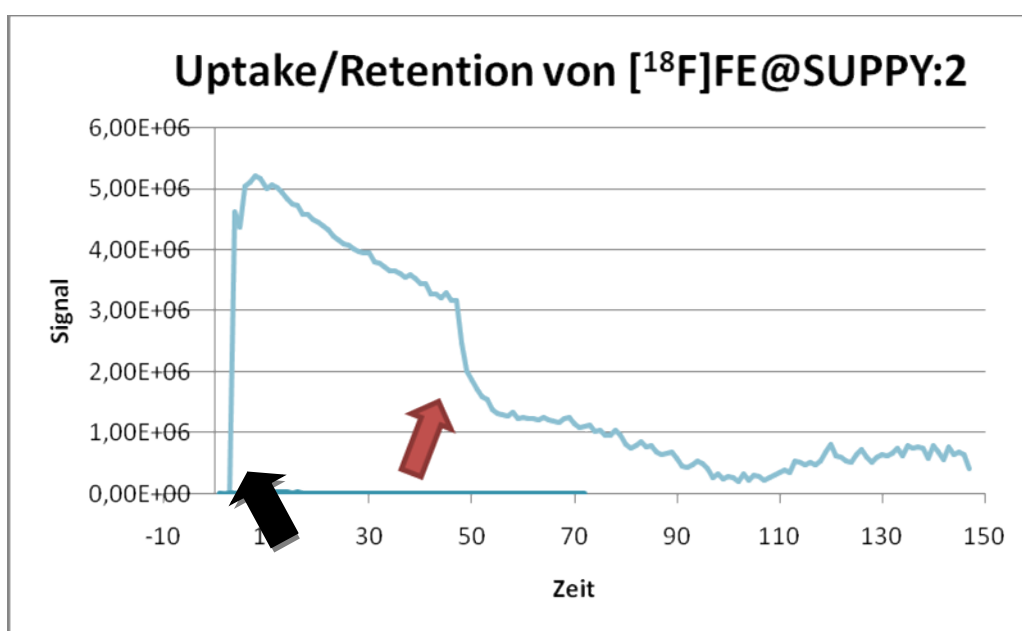


Abbildung 4.2.1-2: Uptake/Retention von ^{18}F FE@SUPPY:2



Zugabe von ^{18}F FE@SUPPY:2

Abheben des Mediums mit dem freien Radioliganden und Zugabe frisches Medium

Durch die Zugabe von [^{18}F]FE@SUPPY:2 erfolgte ein Uptake, d.h. FE@SUPPY:2 hat an den A₃-Rezeptor gebunden (Abb.4.2.1-2). Durch das Abheben des Medium mit dem freien Radioliganden wurde gleichzeitig auch die freie Aktivität dem Gleichgewicht entzogen, was die Messung der Retention ermöglichte.

Aus der Abbildung 4.2.1-2 kann man erkennen, dass die Aktivität ganz absank, was niedrige unspezifische Bindung bedeutet.

Da mit beiden gleichzeitig gearbeitet wurde, erfolgte ein Vergleich der beiden Ligand Tracer[®] (Tab.4.2.1-1).

Ligand Tracer Grey	Ligand Tracer Yellow
- keine Synthese zum Durchführen des Experimentes notwendig - 2 gemeinsame Messungen (Uptake/Retention und Affinität) - liefert mehr Informationen und Daten die für das pharmakologische Verhalten der Substanz sehr nützlich sind	- chemische Synthese ist Voraussetzung zum Durchführen des Experimentes (FE@SUPPY mit ^{18}F markieren) - 1 Messung (Uptake /Retention)

Tabelle 4.2.1-1: Vergleich der beiden Ligand Tracer[®]

In der Tabelle (4.2.1-1) wurden die wichtigsten Vergleichspunkte zusammengefasst. Durch diesen Vergleich wurde festgestellt, dass der Ligand Tracer Grey für unsere Experimente am günstigsten war. Aufgrund dieser Erfahrungen wurde die Entscheidung zugunsten der Ligand Tracer Grey getroffen.

4.3. Lipophiliebestimmung

4.3.1. LogP

Die Lipophilie einer Substanz ist mitentscheidend für ihre Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Als wichtige Größe zur Abschätzung der Hirngängigkeit wird deshalb der log P verwendet. [32]

In dieser Arbeit wurde die logP-Bestimmung für die A₃-Antagonisten mittels einer HPLC-Methode ermittelt. Diese Methode beruht darauf, dass die zu analysierende Substanz chromatographisch zu zwei Substanzen mit bekanntem logP in Relation gesetzt wurden (Abb.4.3.1-1). [27]

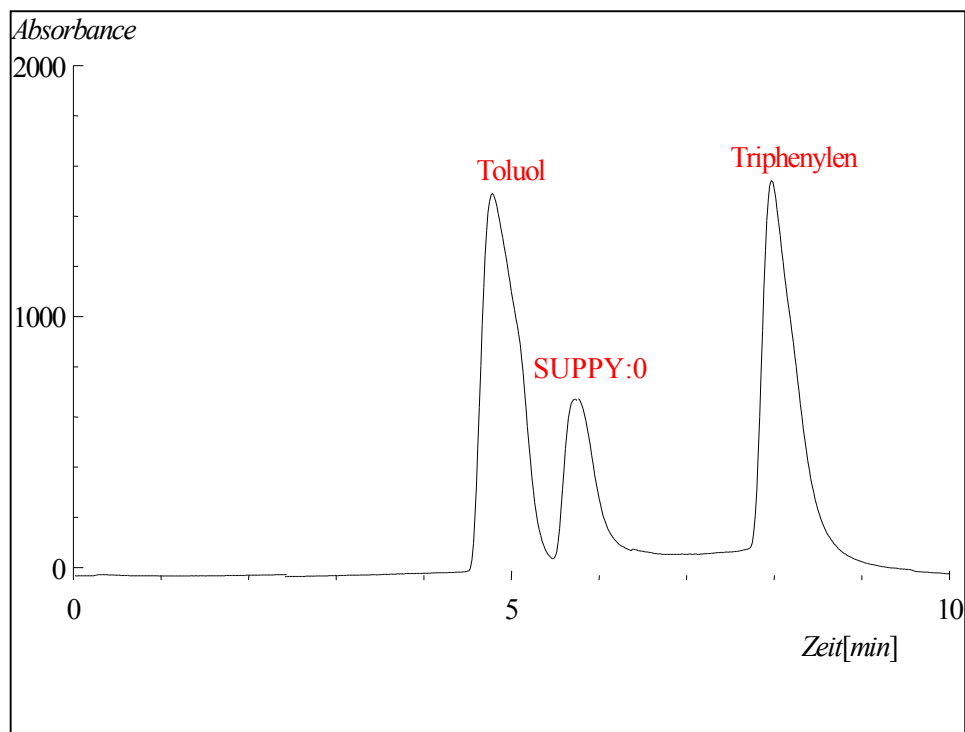


Abbildung 4.3.1-1: Chromatogramm der logP-Bestimmung; dieses wurde mit einem Plot-Programm überarbeitet. Aus diesem Chromatogramm kann abgelesen werden, dass Toluol die hydrophilere Substanz (logP-Wert: 2.61) und Triphenylen die lipophilere Substanz (logP-Wert: 6.27) ist. [27] Mit Hilfe einer Gradientenpumpe wurden sowohl lipophile als auch hydrophile Substanzen innerhalb von 10 Minuten detektiert.

Die Berechnung des logP-Wertes der unbekannten Substanz erfolgte folgendermaßen [27]:

$$\log P_{\text{unknown}} = \frac{(\log P_{\text{tol}} - \log P_{\text{triph}}) * t_{\text{unknown}} + t_{\text{tol}} \log P_{\text{triph}} - t_{\text{triph}} \log P_{\text{tol}}}{t_{\text{tol}} - t_{\text{triph}}}$$

t_{unknown} Retentionszeit der zu untersuchenden Substanz

t_{tol} Retentionszeit von Toluol

t_{triph} Retentionszeit von Triphenylen

$\log P_{\text{tol}}$ logP von Toluol

$\log P_{\text{triph}}$ logP von Triphenylen

In der Tabelle 3.3-1 sind die erhaltenen logP-Werte für die A₃-Antagonisten zusammengefasst.

pH-Wert	SUPPY:0	FE@SUPPY	FE@SUPPY:2
pH 2	4,43	3,99	4,12
pH 3,5	3,54	4,02	4,16
pH 7,4	2,22	4,04	4,05
pH 10	0,42	4,06	4,10

Tabelle 4.3.1-1: logP-Werte der A₃-Antagonisten bei unterschiedlichen pH-Werten

Als optimaler Wert für einen hirngängigen Neuroliganden gilt ein logP von 2,5-3,0. Neuroliganden mit einem niedrigeren logP besitzen zumeist eine zu geringe Hirngängigkeit und Liganden mit einem höheren logP neigen zur Ausbildung starker unspezifischer Bindungen, welche unerwünscht sind. [33]

Allerdings sind etliche PET-Neuroliganden, wie z.B.: DASB, sind bekannt, die weitaus einen höheren logP aufweisen (logP 3,81) und sich trotzdem durch eine gute Hirngängigkeit aufzeichnen. [34]

Der logP für die A₃-Antagonisten wurde bei unterschiedlichen pH-Werten ausgetestet. Bei dem pH-Wert von 7,4, welcher den physiologischen Bereich darstellt, hat FE@SUPPY einen logP von 4,04 und FE@SUPPY:2 einen logP von 4,05.

Daraus lässt sich schließen, dass, aufgrund einer hohen Lipophilie (logP>3) von FE@SUPPY und FE@SUPPY:2, beim Passieren der Blut-Hirn-Schranke unspezifische Bindungen auftreten können.

Unspezifische Bindung bedeutet, dass die Verbindung nicht nur am A₃-Rezeptor binden wird, sondern dass es aufgrund seiner hohen Fettlöslichkeit z.B.: im Fettgewebe hängen bleiben kann. Die Mengen, die dann den A₃-Rezeptor spezifisch erreichen, können gering sein und somit zu einer schlechten Darstellung des A₃-Rezeptors führen. Parallel dazu bindet der Ligand am Zielort unspezifisch auch an Regionen, welche keinen Rezeptor exprimieren, was zu einem deutlich verschlechtertem Signal-Rausch Verhältnis führt.

SUPPY:0 hat im physiologischen Bereich einen logP von 2,22. FE@SUPPY und FE@SUPPY:2 werden von den Esterasen, welche im Gehirn vorkommen [35], abgespalten und es entsteht SUPPY:0. Dieses sollte aufgrund des niedrigen lipophilen Charakters die Blut-Hirn-Schranke passieren können, um ausgeschieden zu werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In Rahmen dieser Diplomarbeit sollte das pharmakokinetische und das pharmakodynamische Verhalten von FE@SUPPY dargestellt werden.

Die Pharmakokinetik umfasst unter anderem den Metabolismus von Pharmaka und deren Durchtritt durch biologische Membranen, während sich die Pharmakodynamik mit der Art und der Stärke der Bindung des Liganden an den Zielort beschäftigt.

Um biologische Membranen passieren zu können muss die Substanz einen lipophilen Charakter besitzen. Aufgrund dessen wurde der logP für FE@SUPPY und FE@SUPPY:2 bestimmt, um auf die Hirngängigkeit der beiden Substanzen zu prüfen. Die Ergebnisse deuten auf das Auftreten von unspezifischer Bindung beim Durchqueren der Blut-Hirn-Schranke. Diese unspezifischen Bindungen sind Folge einer hohen Lipidlöslichkeit.

Der Metabolismus von FE@SUPPY wurde mittels HPLC-Analysen quantifiziert. Dabei wurde auf die Stabilität von FE@SUPPY gegenüber der Carboxylesterase getestet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels Michaelis Menten Kinetik dargestellt. Über dieser Kinetik wurde, durch einen Vergleich mit 2 anderen PET-Tracern, festgestellt, dass die Stabilität von FE@SUPPY gegenüber der Carboxylesterase gering ist.

Das pharmakodynamische Verhalten von FE@SUPPY sollte anhand von Bindungsstudien dargestellt werden. Für die Durchführung wurden Ligand Tracer Grey und Ligand Tracer Yellow herangezogen. Die erhaltenen Daten waren nicht ausreichend um quantifiziert zu werden, da beide Geräte nur für eine limitierte Zeit zur Verfügung gestellt wurden. Während dieser Zeit wurde festgestellt, dass der Ligand Tracer Grey am günstigsten für diese Experimente ist, welcher derzeit auch angeschafft ist.

Zurzeit erfolgt die Ermittlung der 1) Michaelis Menten Kinetik für FE@SUPPY:2, welche dann mit FE@SUPPY verglichen wird, und des 2) K_i von FE@SUPPY und FE@SUPPY:2 mit dem Ligand Tracer Grey. Anhand von in vivo Experimenten in Ratten werden zusätzliche Aussagen über die Hirngängigkeit der beiden A_3 -Antagonisten sowie über das Ausmaß des Entstehen der unspezifischen Bindungen ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Versuche werden einige wichtige Fragen beantworten, welche unter anderem für das Abschließen der präklinischen Phase Voraussetzung sind.

Anhang

A1-Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1.1.1-1: Radiopharmakon	11
http://www.staff.uni-marburg.de/~kernchem/grundp/markierung/Image1.gif (30.07.08)	
Abbildung 2.1.1.4-1: Ablauf einer PET-Untersuchung	14
http://www.jens-langner.de/ftp/MScThesis.pdf (01.12.2008)	
Abbildung 2.2-1: Strukturformel von Adenosin	16
http://tu-dresden.de/die_tu_dresden/fakultaeten/medizinische_fakultaet/inst/phy/forschung/deussen/scienceinfo/Adenosin.png (30.07.2008)	
Abbildung 2.2.1-1: A3-Rezeptor-Subtyp	17
http://www.cnsforum.com/imagebank/item/Adeno_A1_A3/default.aspx (30.07.08)	
Abbildung 2.2.1-2: Signalweg der Adenosinrezeptoren	18
www.adenrx.com/images/aboutgraphic.jpg (30.07.2008)	
Abbildung 2.2.1-3: Gq/11-gekoppelten Rezeptor	19
http://journals.prous.com/journals/dnp/20011402/html/dn140089/images/Marx_f2.gif	
Abbildung 2.2.2-1: Regulation der intra- und extrazellulärer Adenosinkonzentration [15].	20
Abbildung 2.2.3.1-1: FE@SUPPY	21
Abbildung 2.2.3.1-2: FE@SUPPY:2	21
Abbildung 2.3-1: Metabolismus von FE@SUPPY	22
Abbildung 2.3.2-1: Hyperbel der Michaelis Menten Kinetik [30].	24
Abbildung 2.4.1-1: CHO-Zellen	26
Abbildung 2.4.2-1 : Schematische Darstellung einer typischen Sättigungskurve	30
Abbildung 2.4.2-2: Schematische Darstellung einer Verdrängungskurve	31
Abbildung 2.5.1-1: Blut-Hirn-Schranke	34
Abbildung 3.1.1.2-1: HPLC-Anlage	38
Abbildung 3.1.1.2-2: RP-Säule	39
Abbildung 3.1.2.2.2-1: Thermomixer Compact	43

Abbildung 3.1.2.2.2-2: Zentrifuge	44
Abbildung 3.2.2.1-1: Reine Werkbank	47
Abbildung 3.2.2.2-1: Brutschrank	49
Abbildung 3.2.2.3-1: Neubauer Zählkammer	50
Abbildung 3.2.2.3-2: Netzteilung einer Neubauer Zählkammer	50
Abbildung 3.2.2.4-1: Ligand-Tracer Technologie [24]	52
Abbildung 3.2.2.4-2: Ligand Tracer Yellow [24]	53
Abbildung 3.2.2.4-3: Ligand Tracer Grey [24]	54
Abbildung 3.3.1.2-1: Supelco® -Säule	56
Abbildung 4.1.1-1: Lösungsmittelvergleich für FE@SUPPY	61
Abbildung 4.1.1-2: Lösungsmittelvergleich für SUPPY:0	61
Abbildung 4.1.2-1: Kalibrationsgerade von SUPPY:0 und FE@SUPPY	63
Abbildung 4.1.2-2: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 0.Stunde	64
Abbildung 4.1.2-3: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 1.Stunde	64
Abbildung 4.1.2-4: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 2.Stunde	65
Abbildung 4.1.2-5: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 3.Stunde	65
Abbildung 4.1.2-6: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 4.Stunde	66
Abbildung 4.1.2-7: enzymatischer Abbau von FE@SUPPY nach der 6.Stunde	66
Abbildung 4.1.2-8: Abnahme von FE@SUPPY- Zunahme von SUPPY:0 bei 20µg/ml	67
Abbildung 4.1.2-9: Abnahme von FE@SUPPY - Zunahme von SUPPY:0 bei 50µg/ml	67
Abbildung 4.1.2-10: Abnahme von FE@SUPPY -Zunahme von SUPPY:0 bei 100µg/ml..	68
Abbildung 4.1.2-11: Abnahme von FE@SUPPY -Zunahme von SUPPY:0 bei 200µg/ml..	68
Abbildung 4.1.2-12: Abnahme von FE@SUPPY -Zunahme von SUPPY:0 bei 350µg/ml..	69
Abbildung 4.1.2-13: Michaelis Menten Kinetik von FE@SUPPY	70
Abbildung 4.2.1-1: Selektivität von FE@SUPPY gegenüber ^[125] I-AB-MECA	72
Abbildung 4.2.1-2: Uptake/Retention von [¹⁸ F]FE@SUPPY:2	73
Abbildung 4.3.1-1:Chromatogramm der logP-Bestimmung	75

A2-Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1.1-1: Vergleich 2-er Eluenten bei einer Flussrate von 3ml/min.....	58
Tabelle 4.1.1-2: Optimierung der Stopplösung für PBS+TWEEN20®.....	62
Tabelle 4.1.1-3: Optimierung der Stopplösung für das PBS-Konzentrat.....	62
Tabelle 4.2.1-1: Vergleich der beiden Ligand Tracer®	74
Tabelle 4.3.1-1: logP-Werte der A3AR-Antagonisten bei unterschiedlichen pH-Werten.....	76

A3-Abkürzungsverzeichnis

A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃	Adenosin-Rezeptor-Subtypen
AcN	Acetonitril
Bq	Bequerel
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHO	Chinese Hamster Ovary Cells
Ci	Curie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DASB	3-amino-4-[2-[(di(methyl)amino)methyl]phenyl]sulfanylbenzonitrile
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F-12	Medium für die Züchtung von CHO-Zellen
FE@CIT	2-[18F]fluoroethyl 3β-(4-iodophenyl) tropane 2β-carboxylate
FE@SUPPY	5-(2-fluoroethyl)2,4-diethyl-3-(ethylsulfanylcarbonyl)-6-phenylpyridine-5-carboxylate
FE@SUPPY:2	Ethyl-4,6-diethyl-5-[[2-fluorethyl)sulfanyl]carbonyl]-2-phenylnicotinat
FETO	2-[18F]fluoroethyl-desethyl-(R)-etomidate
FKS	Fetales Kälber Serum
G418	Geneticin
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I.U.	Internationale Units
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration
[¹²⁵ I]-AB-MECA	([¹²⁵ I]-4-Aminobenzyl-5'-N-Methylcarboxamideoadenosine)

k	Retentionsfaktor
K_D	Dissoziationskonstante
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_i	Dissoziationskonstante eines Inhibitors
K_m	Michaelis Menten Konstante
logP	Lipophilie-Parameter
M	Molar
MeOH	Methanol
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	phosphate buffered saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PSG	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
R	Auflösung
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SUPPLY:0	4,6-diethyl-5-(mercaptocarbonyl)-2-phenylnicotinic acid
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
tm	Totzeit
t_R	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN 20 [®]	Polysorbate 20
Vmax	maximale Umsatzgeschwindigkeit
α	Trennfaktor

A4-Literaturverzeichnis

- [1] Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:7432-6.
- [2] Baraldi PG, Cacciari B, Romagnoli R, Merighi S, Varani K, Borea PA, Spalluto G. A3 adenosine receptor ligands: history and perspectives. *Med Res Rev*. 2000; 20:103-28.
- [3] Bolcato C, Cusan C, Pastorin G, Spalluto G, Cacciari B, Klotz KN, Morizzo E, Moro S. Pyrazolo-triazolo-pyrimidines as adenosine receptor antagonists: Effect of the N-5 bond type on the affinity and selectivity at the four adenosine receptor subtypes. *Purinergic Signal*. 2008; 4:39-46.
- [4] DeNinno MP, Masamune H, Chenard LK, DiRico KJ, Eller C, Etienne JB, Tickner JE, Kennedy SP, Knight DR, Kong J, Oleynek JJ, Tracey WR, Hill RJ. 3'-Aminoadenosine-5'-uronamides: discovery of the first highly selective agonist at the human adenosine A3 receptor. *J Med Chem*. 2003; 46:353-5.
- [5] Moro S, Li AH, Jacobson KA. Molecular modeling studies of human A3 adenosine antagonists: structural homology and receptor docking. *J Chem Inf Comput Sci*. 1998; 38:1239-48.
- [6] Li AH, Moro S, Forsyth N, Melman N, Ji XD, Jacobson KA. Synthesis, CoMFA analysis, and receptor docking of 3,5-diacyl-2, 4-dialkylpyridine derivatives as selective A3 adenosine receptor antagonists. *J Med Chem*. 1999; 42:706- 21.
- [7] <http://www.radiologie-linz.at/cms/index.php?home> (27.10.2008)
- [8] <http://zrw.web.psi.ch/lectures> (28.10.2008)
- [9] <http://www.med.uni-marburg.de/stpg/ukm/lb/nuklearmed/nukleus/radiopharmaka.html> (27.10.08)
- [10] www.pet.at (27.10.2008)
- [11] www.onmeda.de/behandlung/verfahren/pet.html (30.07.08)
- [12] Schober O, Heindel W. PET-CT, Georg Thieme Verlag, 2007.
- [13] Wolfgang Hauber. Adenosin: ein Purinnukleosid mit neuromodulatorischen Wirkungen. *Neuroforum* 3/02: 228-234.
- [14] Andrea Behrenswerth. Adenosin-Rezeptoren und neurodegenerative Erkrankungen: Untersuchung des Einflusses von Cholesterol und Evaluierung neuer funktionalisierter Liganden als pharmakologische Werkzeuge. Dissertation, 2008.

- [15] Gunnar Schulte. Adenosin, Adenosinrezeptoren und adenosinrezeptoraktivierte Signalwege. BIOSpektrum 2/04; 159-161.
- [16] Auterhoff, Knabe, Höltje. Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 14.Auflage, 1999.
- [17] Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier Urban & Fischer Verlag, 9.Auflage, 2005.
- [18] H. Bisswanger. Enzymkinetik- Theorie und Methoden. Weinheim (Wiley-VCH), 3. Auflage, 2000.
- [19] Kromidas Stavros. HPLC für Neueinsteiger. <http://www.novia.de> (20.05.2008)
- [20] <http://www.chugaipharma.de/web-content/FuerAertzeApotheker/arzuapos-grano-7.html> (01.12.2008)
- [21] Toni Lindl. Zell-und Gewebekultur. Spektrum, Akademischer Verlag, 5.Auflage, 2002.
- [22] Marc Breidenbach. Trägerarm markierte 6-Aminopurinderivate als potentielle Adenosin-A2A Rezeptorliganden für die Positronen-Emissions-Tomographie Dissertation, 2003.
- [23] <http://homepage.univie.ac.at/Michael.Berger/vorles/9inhib.htm> (01.12.2008)
- [24] <http://www.ridgeviewinstruments.com/> (25.10.2008)
- [25] Gerhard Ecker. Biophysikalische Pharmazeutische Chemie. 2006
<http://homepage.univie.ac.at/gerhard.f.ecker> (25.10.2008)
- [26] Dominik, Steinhilber. Instrumentelle Analytik. Deutscher Apotheker Verlag , 2. Auflage, 2002.
- [27] Donovan SF, Pescatore MC. Method for measuring the logarithm of the octanol-water partition coefficient by using short octadecyl-poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns. J Chromatogr A. 2002; 952:47-61.
- [28] Ettlinger DE, Wadsak W, Mien LK, Machek M, Wabnegger L, Rendl G, Karanikas G, Viernstein H, Kletter K, Dudczak R, Mitterhauser M. [¹⁸F]FETO: metabolic considerations. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006; 33:928-31.
- [29] Ettlinger DE, Häusler D, Wadsak W, Girschele F, Sindelar KM, Mien LK, Ungersböck J, Viernstein H, Kletter K, Dudczak R, Mitterhauser M. Metabolism and autoradiographic evaluation of [(18)F]FE@CIT: a Comparison with [(123)I]beta-CIT and [(123)I]FP-CIT. Nucl Med Biol. 2008 May;35(4):475-9.

- [30] <http://www.goethegym.asn-wien.ac.at/projekte/proteom/Skriptum/WirkungEnzyme2.html> (01.12.2008)
- [31] Olah ME, Gallo-Rodriguez C, Jacobson KA, Stiles GL. 125I-4-aminobenzyl-5'-N-methylcarboxamidoadenosine, a high affinity radioligand for the rat A3 adenosine receptor. *Mol Pharmacol*. 1994; 45:978-82.
- [32] Michael H. Abraham, Claude Treiner, Marti Roses, Clara Rafols, Yasushi Ishihama. Linear free energy relationship analysis of microemulsion electrokinetic chromatographic determination of lipophilicity. *Journal of Chromatography A*, 752 (1996) 243-249.
- [33] <http://www.kernchemie.uni-mainz.de/downloads/jb1999/b4.pdf> (05.11.2008)
- [34] Sindelar KM, Mien LK, Haeusler D, Ungersböck J, Nics L, Dudczak R, Kletter K, Mitterhauser M, Wadsak W. THE DILEMMA USING LOG P TO DEFINE LIPOHILICITY OF PET TRACERS. Kongress-Abstract, München, 2008.
- [35] Stefan Förster. Präsynaptische Wirkungen von Cholinesterase-Hemmstoffen im Neocortex des Menschen und der Ratte, Dissertation, 2005.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: EL-SAMAH I Hoda
Adresse: Jerusalemgasse 29/34/15
1210 Wien, Austria
Email: hodaelsamahi@hotmail.com
Geburtsdatum: 08. Oktober 1984
Geburtsort: Wien, Österreich
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung:

09/ 1992 – 06/ 1995 Volksschule Phorugasse, Wien
09/ 1995 – 06/ 2001 Haydn Gymnasium, Wien
09/ 2001 – 06/ 2003 Brigittenauer Gymnasium, Wien
06/ 2003 Matura

10/ 2003 Studium der Pharmazie, Universität Wien
01/ 2009 Abschluss

Sprachkenntnisse

Arabisch: Muttersprache
Deutsch: Fließend in Schrift und Sprache
Englisch: Grundlagen