

Derivate von Pergolid, Lisurid und Tergurid als Liganden serotonerger, adrenerger und dopaminerger Rezeptoren

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

**Tilo Görnemann
aus Riesa**

März 2008

1. Gutachter: Professor Dr. H.H. Pertz
2. Gutachter: Professor Dr. B. Kleuser

Disputation am 10. Juni 2008

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. Heinz H. Pertz am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Professor Dr. Heinz H. Pertz bin ich zu großem Dank verpflichtet. Meinem Doktorvater danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen sowie Ratschläge. Seine Präsenz und die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft waren mir von großem Wert. „Es ist an der Zeit die nächste Wette zu verlieren - egal wer.“

Für die großzügige Bereitstellung finanzieller Mittel, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit und die Teilnahme an Kongressen nicht möglich gewesen wäre, möchte ich den Herren Dr. Reinhard Horowski und Dr. Johannes Tack (axxonis Pharma AG) herzlich danken.

Die Anfertigung der Arbeit wurde teilweise aus Mitteln des Europäischen Fonds für Regionale Entwicklung (Projekt 10021471) kofinanziert.

Für die fachlichen Diskussionen und die gute praktische Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. Sven Jähnichen bedanken. Frau Dr. A. Moritz danke ich für präparative Unterstützung. Den Herren Professor Dr. Peter Gmeiner und Dr. Harald Hübner (beide Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen) bzw. Dr. Henrik von Wenckstern und Professor Dr. Burkhard Kleuser (beide FU Berlin) danke ich für die Durchführung der Zellexperimente an D₂-Rezeptoren bzw. der RTQ-PCR Experimente. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser für die uneingeschränkte Nutzung verschiedener Laborgeräte bedanken.

Bei Herrn Dr. Miroslav Flieger (Akademie věd České republiky, Prag, Tschechien) möchte ich mich für die Bereitstellung der Ergolinderivate bedanken, deren pharmakologische Untersuchung ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war.

Mein Dank gilt insbesondere Annedore und Axel Emmrich. Beiden bin ich für den Rückhalt und die unkomplizierte Erfüllung unzähliger Dinge sehr dankbar.

Bei Frau Studienrätin Katharina Gorjew und Reannon Gibson bedanke ich mich für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Philipp Kaiser danke ich für die Bereitstellung seines privaten PKWs, der zur Beschaffung der Lungen und Herzen mitunter benötigt wurde sowie der Übersendung zahlreicher wissenschaftlicher Artikel.

Gerhard Hermle danke ich für die Gestaltung des Umschlags.

Meinen Eltern, die mich all die Jahre großzügig unterstützt und meine Arbeit mit großem Interesse verfolgt haben, gilt ebenfalls mein Dank.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Ergoline.....	1
1.2.	Migräne.....	3
1.2.1.	Epidemiologie.....	3
1.2.2.	Pathophysiologie.....	3
1.2.3.	Therapie.....	6
1.3.	Morbus Parkinson.....	7
1.3.1.	Epidemiologie.....	7
1.3.2.	Pathophysiologie.....	7
1.3.3.	Therapie.....	8
1.4.	α -Adrenozeptoren.....	10
1.4.1.	Klassifikation.....	10
1.4.2.	α -Adrenozeptoren in der Migränetherapie.....	10
1.4.3.	α -Adrenozeptoren in der Therapie des Morbus Parkinson.....	11
1.5.	5-HT-Rezeptoren.....	11
1.5.1.	Klassifikation.....	11
1.5.2.	5-HT-Rezeptoren in der Migränetherapie.....	12
1.5.3.	5-HT-Rezeptoren in der Therapie des Morbus Parkinson.....	13
1.6.	Das mitogene Potenzial von 5-HT-Rezeptoragonisten.....	13
1.7.	Zielsetzung.....	16
2.	Material und Methoden.....	18
2.1.	Material.....	18
2.1.1.	Reagenzien.....	18
2.1.1.1.	Chemikalien und Biochemikalien.....	18
2.1.1.2.	Kits.....	20
2.1.1.3.	Nähr- und Pufferlösungen für Untersuchungen an isolierten Tierorganen.....	20
2.1.1.4.	Oligonukleotide.....	21
2.1.2.	Apparative Ausstattung.....	21
2.2.	Tiere.....	22
2.3.	Methoden.....	23
2.3.1.	Experimente an isolierten Tierorganen (Organbadstudien).....	23
2.3.1.1.	Allgemeine Versuchsdurchführung.....	23

2.3.1.2.	α_{1A} -Adrenozeptoren (Rattenschwanzarterie).....	24
2.3.1.3.	α_{1B} -Adrenozeptoren (Rattenschwanzarterie).....	24
2.3.1.4.	α_{1D} -Adrenozeptoren (Rattenaorta).....	25
2.3.1.5.	α_{2C} -Adrenozeptoren (Schweinepulmonalvene).....	26
2.3.1.6.	Serotonin 5-HT _{2A} -Rezeptoren (Schweinekoronararterie).....	27
2.3.1.7.	Serotonin 5-HT _{2B} -Rezeptoren (Schweinepulmonalarterie).....	28
2.3.1.8.	Serotonin 5-HT ₇ -Rezeptoren (Pulmonalarterie vom Absetzferkel (Läuferschwein)).....	29
2.3.1.9.	Inkubations- und Auswaschexperimente.....	29
2.3.2.	Biochemische Methoden.....	30
2.3.2.1.	[³⁵ S]GTP γ S-Bindungs-Assay.....	30
2.3.3.	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.3.3.1.	RNA-Isolierung.....	31
2.3.3.2.	Reverse Transkription (RT).....	31
2.3.3.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.3.3.4.	Elektrophorese.....	32
2.3.3.5.	Real-Time-quantitative-Polymerase Kettenreaktion (RTQ-PCR).....	32
2.4.	Datenanalyse und Statistik.....	32
2.4.1.	Pharmakologische Parameter.....	32
2.4.2.	Statistik.....	39
2.4.2.1.	Datenpräsentation und Datenberechnung.....	39
2.4.2.2.	Nichtlineare Regression.....	39
2.4.2.3.	Lineare Regression und Korrelationsanalyse.....	39
2.4.2.4.	Statistische Beurteilung.....	40
3.	Ergebnisse und Diskussion.....	41
3.1.	α_2 -Adrenozeptoren.....	41
3.1.1.	Charakterisierung des postsynaptischen α_2 -Adrenozeptors in der Schweinepulmonalvene.	41
3.1.1.1.	Effekte von α -Adrenozeptoragonisten.....	42
3.1.1.2.	Effekte von α_2 -Adrenozeptorantagonisten gegen UK14304.....	43
3.1.1.3.	RT-PCR und RTQ-PCR.....	46
3.1.1.4.	Diskussion.....	48
3.2.	Ergoline.....	49
3.2.1.	Charakterisierung des molekularen Fragments, das für den Agonismus von Pergolid an 5-HT _{2B} - und 5-HT _{2A} -Rezeptoren verantwortlich ist.....	49
3.2.1.1.	Effekte an 5-HT _{2B} -Rezeptoren.....	50

3.2.1.2.	Effekte an 5-HT _{2A} -Rezeptoren.....	52
3.2.1.3.	Effekte an rekombinanten hD _{2S} - und hD _{2L} -Rezeptoren.....	56
3.2.1.4.	Diskussion.....	57
3.2.2.	Tergurid - Erstellung des pharmakologischen Profils.....	59
3.2.2.1.	Effekte an 5-HT _{2A} -Rezeptoren.....	60
3.2.2.2.	Effekte an 5-HT _{2B} -Rezeptoren.....	61
3.2.2.3.	Effekte an 5-HT ₇ -Rezeptoren.....	64
3.2.2.4.	Effekte an α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren.....	65
3.2.2.5.	Effekte an α_{2C} -Adrenozeptoren.....	66
3.2.2.6.	Effekte an Histamin H ₁ -Rezeptoren.....	66
3.2.2.7.	Diskussion.....	67
3.2.3.	Neue 8 α -Aminoergoline - Pharmakologisches Profil und Vergleich zu deren Muttersubstanzen Lisurid und Tergurid.....	71
3.2.3.1.	Effekte an 5-HT _{2A} -, 5-HT _{2B} - und 5-HT ₇ -Rezeptoren.....	71
3.2.3.2.	Effekte an α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren.....	81
3.2.3.3.	Diskussion.....	85
4.	Zusammenfassung.....	89
5.	Summary.....	92
6.	Literaturverzeichnis.....	96
7.	Publikationsverzeichnis.....	113
7.1.	Originalarbeiten.....	113
7.2.	Poster.....	114
8.	Anhang.....	115
8.1.	Erklärung zur eigenständigen Anfertigung der Dissertation.....	115

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CHO-Zellen	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster
COMT	Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase
CSD	Cortical spreading depression (kortikale Streudepolarisierung)
5-CT	5-Carboxamidotryptamin
DHE	Dihydroergotamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E/[A]</i> -Kurve	Konzentrations-Wirkungs(Effekt)-Kurve
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ET-3	Endothelin-3
GABA	γ -Aminobuttersäure
GTP	Guanosintriphosphat
h(Rezeptor)	humaner(Rezeptor)
HEK293E-Zellen	menschliche embryonale Nierenzellen
HEPES-Puffer	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffer
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
L-DOPA	Levodopa, L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAO-B	Monoaminoxidase-B
NA	Noradrenalin
NKA	Neurokinin A
NO	Stickstoffmonoxid
p.o.	peroral
SP	Substanz P
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β

1. Einleitung

1.1. Ergoline

Ergoline gehören zu den Indolalkaloiden, deren bekannteste natürliche Vertreter die Mutterkornalkaloide sind. Produziert werden sie z. B. vom Namensgeber der Stoffklasse, dem Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* (Clavicipitaceae), der zur Klasse der Ascomyceten gehört und vorzugsweise Roggen (*Secale cereale*) parasitisch befällt. Natürlich vorkommende Ergolin-Alkaloide werden in 4 Hauptgruppen unterteilt: 1) Ergopeptine, z.B.

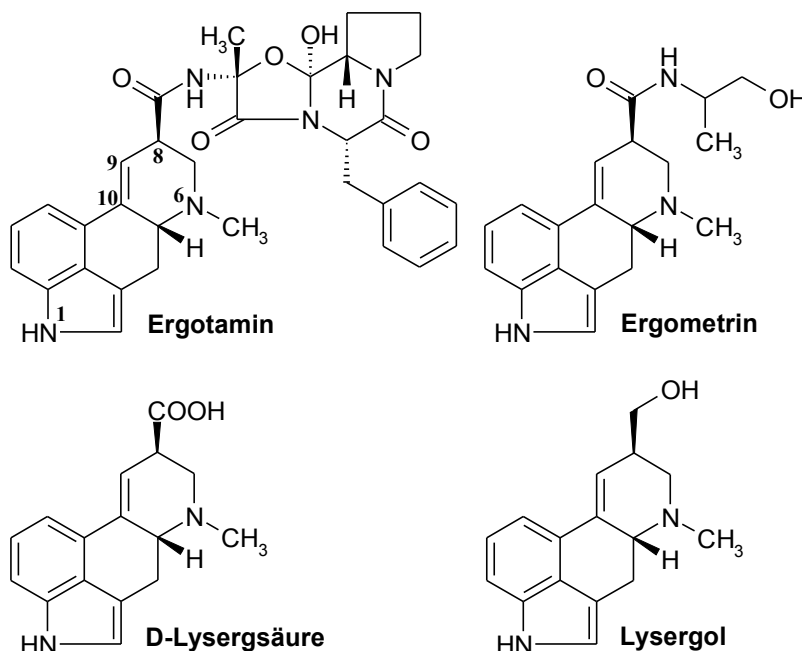


Abbildung 1: Strukturen natürlich vorkommender Ergoline.

Ergotamin, bei denen der Lysergsäure-Anteil mit einem trizyklischen Peptid verknüpft ist; 2) einfache Lysergsäureamide, z.B. Ergometrin; 3) Lysergsäuren, z.B. D-Lysergsäure und 4) Clavine, z.B. Lysergol, deren C(8) Substituent im Gegensatz zu den vorgenannten Alkaloid-Typen eine niedrigere Oxidationsstufe besitzt (Berde und Stürmer, 1978; Abbildung 1). Chemisch betrachtet ist das große gemeinsame Merkmal aller Ergolinderivate deren tetrazyklische Ergolin-Grundstruktur. Diese tetrazyklische Anordnung beinhaltet die grundlegenden Strukturelemente der Monoamin-Neurotransmitter 5-HT, Dopamin und Noradrenalin (Abbildung 2) und lässt erkennen, dass Mutterkornalkaloide mit Rezeptoren aller drei Transmitter interagieren können. Bedenkt man, dass gegenwärtig 14 Serotonin (5-HT)-Rezeptoren, 5 Dopaminrezeptoren und 6 α -Adrenozeptoren bekannt sind, und dass Ergolinderivate an diesen überwiegend G-Protein-gekoppelten Rezeptoren als Agonisten, Partialagonisten oder Antagonisten fungieren können, wird ersichtlich, dass die Pharmakodynamik dieser Substanzen komplex ist. Innerhalb der Gruppe der Naturstoffe nehmen die Ergoline aufgrund ihres äußerst umfangreichen Wirkspektrums somit eine singuläre Stellung ein. Wegen ihrer geringen Rezeptorspezifität und -selektivität werden sie als „dirty drugs“ charakterisiert (Pertz und Eich, 1999). Da zahlreiche Ergolinderivate durch eine hohe biologische Aktivität gekennzeichnet sind, war und

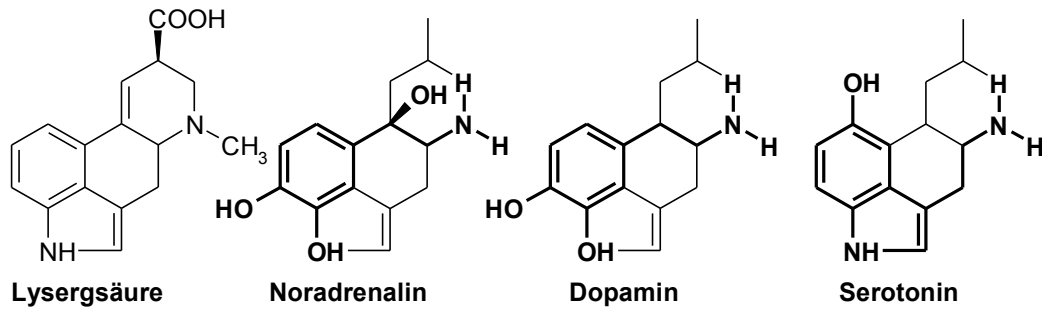


Abbildung 2: Strukturelle Verwandtschaft zwischen Ergolinen (Lysergsäure) und drei biogenen Aminen: Noradrenalin, Dopamin und Serotonin.

ist diese Naturstoffklasse für partialsynthetische Modifikationen interessant. Mit natürlichen Ergolinen als Ausgangspunkt, führten chemische Modifikationen zu einer Vielzahl partialsynthetischer Ergolinderivate, die aufgrund ihrer dann partiell spezifischen Wirksamkeit teilweise Eingang in die experimentelle Pharmakologie gefunden haben oder als Arzneistoffe verwendet werden. Tabelle 1 zeigt die Indikationsgebiete für eine Auswahl von in Deutschland therapeutisch verwendeten Ergolinen, den in das betreffende Krankheitsgeschehen involvierten Rezeptor(subtyp) sowie die Beeinflussung der Rezeptorfunktion durch diese Arzneistoffe. Wichtige partialsynthetische Ergolinderivate werden in den folgenden Kapiteln abgebildet.

Tabelle 1: Auswahl von in Deutschland verwendeten Ergolinderivaten, deren Indikationsgebiet, involvierter Rezeptor und Rezeptorfunktion (Rote Liste 2008).

Arzneistoff	Therapie	Rezeptor	Rezeptorfunktion ^a
Ergotamin	Migräne	5-HT _{1B/1D}	Agonismus
DHE	(akut)	5-HT _{1B/1D}	Agonismus
Lisurid ^b	Migräneprophylaxe	5-HT _{2B} , 5-HT ₇	Antagonismus
Methylergometrin	Blutung (post partum)	5-HT _{2A}	Agonismus
Bromocriptin	Morbus Parkinson Prolaktinhemmung	D ₂	Agonismus
Lisurid			
Cabergolin			
α-Dihydroergocriptin	Morbus Parkinson	D ₁ + D ₂	Agonismus
Pergolid	Morbus Parkinson	D ₁ + D ₂	Agonismus
Dihydroergotoxin ^c	Blutdruck ↓	α ₁	Antagonismus

^aAgonismus kann je nach Modell voller oder partieller Agonismus sein; ^bfreiwillige Markrücknahme durch die Schering AG Berlin (2001); ^cStoffgemisch.

Hauptsächlich bei der Behandlung der Migräne und des Morbus Parkinson werden gegenwärtig Ergolinderivate verwendet. Beide Krankheitsbilder und deren Therapien sind Gegenstand der sich anschließenden Kapitel.

1.2. Migräne

1.2.1. Epidemiologie

In den USA leiden ca. 18 % der Frauen und ca. 6 % der Männer an Migräne. Die Prävalenz einer Migräneattacke zu erleiden steigt mit dem 20. Lebensjahr an und gipfelt im ca. 40. Lebensjahr (Lipton *et al.*, 2001; Abbildung 3). Die Verteilung zwischen Geschlecht, Alter und der Krankheitshäufigkeit weist auf eine hormonelle Komponente bei der Migräne hin (Gupta *et al.*, 2007). Trotz der hohen Verbreitung und den körperlich belastenden Auswirkungen erhielt die Erkrankung in der Gesellschaft lange keine hinreichende Beachtung (Hu *et al.*, 1999), da es sich „nur“ um Kopfschmerzen handelt. Die Migräne ist mit immensen Kosten verbunden. In den USA wurden 1994 \$1 Milliarde Dollar zur Behandlung der Migräne verwendet (direkte Krankheitskosten), wohingegen im gleichen Zeitraum ein volkswirtschaftlicher Schaden (indirekte Krankheitskosten durch Wertschöpfungsverlust) von \$13 Milliarden Dollar durch die Krankheit entstand (Hu *et al.*, 1999). Für Deutschland konnte das Verhältnis von 1 : 13 für das Jahr 2000 bestätigt werden, wobei die Ausgaben für Migräne-Arzneimittel nur 7 % der direkten Krankheitskosten betragen. Es muss daher das vorrangige Ziel sein, den Patienten gezielt mit Migränetherapeutika zu versorgen, zumal bei erfolgreicher Therapie die indirekten Krankheitskosten deutlich gesenkt werden könnten (Neubauer und Ujlaky, 2002).

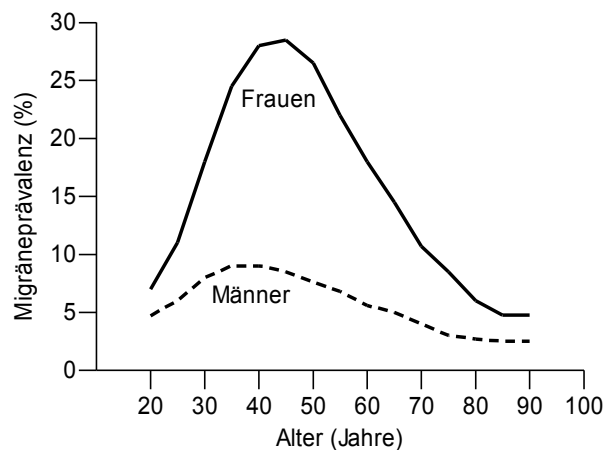


Abbildung 3: Alters- und geschlechtsspezifische Migräneprävalenz. Adaptiert nach Lipton *et al.* (2001).

1.2.2. Pathophysiologie

Die Migräne ist eine neurovaskuläre Erkrankung, deren Pathogenese noch nicht vollständig erklärt werden konnte. Migräne zeichnet sich durch starke, einseitige, pochende und pulsierende Kopfschmerzattacken aus. Diese Kopfschmerzattacken dauern 4 bis 72 Stunden und sind von Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Lichtempfindlichkeit (Photophobie), und/oder Geräuschempfindlich-

keit (Phonophobie) gekennzeichnet (Headache Classification Committee of the International Headache Society, 2004). Die Krankheit wird in Migräne ohne Aura (einfache Migräne) und Migräne mit Aura (klassische Migräne) unterteilt. Die Migräne-Aura tritt bei ca. 15 % der Patienten auf, geht dem Kopfschmerz voran oder begleitet ihn und ist durch neurologische Symptome, wie Wahrnehmungsstörungen, Gesichtsfeldausfälle, Sehstörungen, Störungen des Geruchsempfindens und andere neurologische Ausfälle charakterisiert (Gupta *et al.*, 2007; Diener 2002). Eine bedeutende Rolle an der Entstehung der Migräneattacke wird dem serotonergen System zugeschrieben, da sich die 5-HT-Spiegel bzw. die des Hauptmetaboliten (5-Hydroxyindolylessigsäure, 5-HIAA) in Blut, Urin und Gehirn während und nach der Migräneattacke unterscheiden (Hamel, 2007; Schwedt, 2007). Als eine weitere Ursache in der Entstehung der Migräne kann dem α -adrenergen System Beachtung beigemessen werden. Hierbei soll die stressbedingte Dauerstimulation des sympathischen Nervensystems im Ergebnis zu einem Nettoverlust von Noradrenalin führen, was die Dilatation extracranialer Arterien und die Stimulation des trigeminalen Systems zur Folge hat (Peroutka, 2004). Die Migräneattacke wird durch drei verschiedene Phasen charakterisiert: 1) ein initiiender Trigger, 2) die Aura und schließlich 3) der Kopfschmerz (Villalón *et al.*; 2002, 2003). Verschiedene Erkenntnisse bezüglich des initiiierenden Triggers sind publiziert worden, dennoch gibt es noch keine schlüssige Erklärung. Einerseits (Hypothese 1) soll die plötzlich gesteigerte Freisetzung von 5-HT ein Bestandteil der Trigger-Geschehnisse sein, die in der Migräneattacke enden (Fozard und Kalkman 1994; Hamel 2007). Diese Hypothese wird damit begründet, dass die einmalige Gabe eines Arzneistoffs, der 5-HT aus den perivaskulären Neuronen und/oder Thrombozyten freisetzt (Reserpin, Fenfluramin), einen Migräneanfall auslösen kann (Fozard, 1992). Selbiges Phänomen wurde für 5-HT-Wiederaufnahmehemmer (Sertralin, Zimelidin) beobachtet, wo zu Beginn der Behandlung die Konzentration an pharmakologisch aktivem 5-HT ansteigt (Fozard, 1992; Bickel, 2005). Andererseits (Hypothese 2) konnte an Migränepatienten festgestellt werden, dass während einer spontanen Attacke eine Änderung des regionalen cerebralen Blutflusses im Bereich des kontralateralen Hirnstamms eintritt. Diese Hirnregion wird heute als „Migränegenerator“ aufgefasst (Weiller *et al.*, 1995; Schaible und Ebersberger, 2002). Die sich anschließenden Ereignisse, die zum Kopfschmerz führen, können auf der Grundlage der neurovaskulären Hypothese erklärt werden (Abbildung 4). Im Fall der gesteigerten Freisetzung von endogenem 5-HT wird die Aktivierung endothelialer 5-HT_{2B}-Rezeptoren und die Aktivierung glattmuskulär-vasorelaxierender 5-HT₇-Rezeptoren in Blutgefäßen der Hirnhäute angenommen (Fozard und Kalkman, 1994; Terrón und Falcón-Neri, 1999; Schmuck *et al.*, 1996). 5-HT_{2B}-Rezeptor-vermittelt wird rasch Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel freigesetzt, das folgend an der cGMP-induzierten Vasorelaxation der Meningialarterien und der Initiation der sterilen, neurogenen Entzündung beteiligt ist. Die Kopfschmerzphase setzt ein (siehe

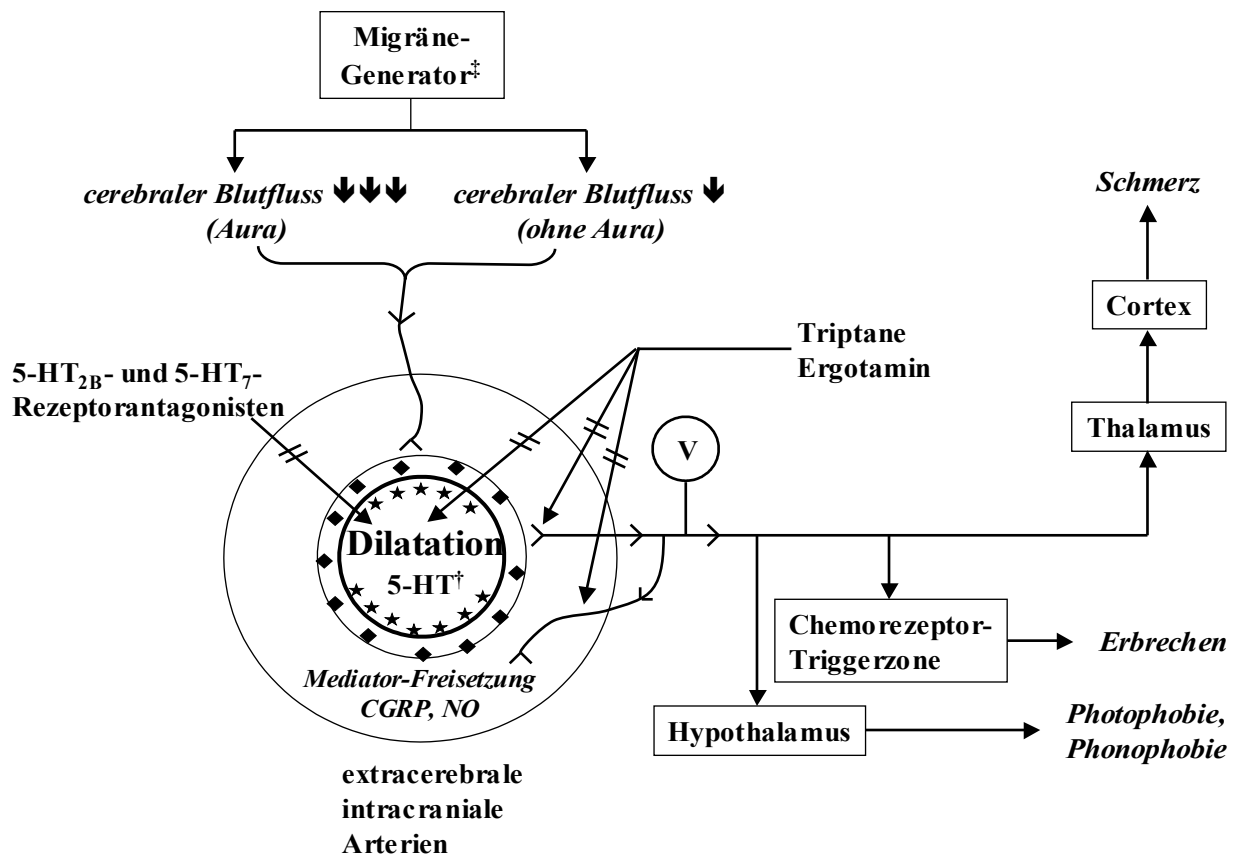


Abbildung 4: Schematische Darstellung der putativen pathophysiologischen Veränderungen in der Migräne und Angriffspunkte von prophylaktisch (5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptorantagonisten) und akut wirksamen Migränetherapeutika (Triptane, Ergotamin). Für Details siehe Text. ★ 5-HT_{2B}-, ◆ 5-HT₇-Rezeptoren. † endogenes 5-HT nach Hypothese 1, ‡ Migränegenerator nach Hypothese 2. Abbildung nach Ferrari und Saxena, 1993.

untent). In der Hypothese des „Migränegenerators“ kann es nach dessen Stimulation zu einer Reduzierung des cerebralen Blutflusses kommen (Ferrari und Saxena, 1993). Bei ca. 15 % der Patienten fällt der Blutfluss unter einen kritischen Wert und es können die oben genannten Aura-Symptome auftreten. Die Aura-Symptomatik entspricht einem Phänomen, das im Tierexperiment *Cortical Spreading Depression* (CSD) bezeichnet wird. Dass eine CSD die Aktivierung des trigeminovaskulären Systems verursachen kann, ist bisher nur im Tierexperiment nachgewiesen worden (Bolay *et al.*, 2002). Die folgende Kopfschmerzphase ist durch die Dilatation extracerebraler, intracranialer Arterien (Meningialarterien), die sich in den Hirnhäuten (*Pia mater encephali* und *Dura mater encephali*) befinden, charakterisiert. Aus den perivaskulären Neuronen der Trigeminasfasern, welche die intracranialen Arterien versorgen, werden verschiedene vasoaktive, proinflammatorische Mediatoren, wie z.B. CGRP, SP, NKA, ET-3 und NO freigesetzt. Als Folge kommt es zur neurogenen Entzündung, die durch neurogene Vasodilatation der Meningialarterien und Permeabilitätserhöhung der Gefäße, wobei Plasmaproteine in den extravasalen Raum austreten, gekennzeichnet ist (Ferrari, 1998; Peroutka, 2005). Im Ergebnis verstärken die

freigesetzten Mediatoren demzufolge die bereits bestehende Vasodilatation und erhöhen die Aktivität der perivaskulären Nervenfasern. Die nozizeptiven Signale aus den Gefäßwänden und den Hirnhäuten werden über die afferenten Fasern des *Nervus trigeminus* (fünfter Hirnnerv, V) weitergeleitet: 1) zum *Nucleus caudalis* des Trigemini, dort umgeschaltet und über den Thalamus in die Hirnrinde (Cortex) gesandt, wo der Schmerz wahrgenommen wird; 2) zum Hypothalamus, was Photophobie und Phonophobie verursacht und 3) zur Chemorezeptor-Triggerzone, was Erbrechen auslösen kann (Ferrari und Saxena, 1993; Diener, 2002; Abbildung 4). Freigesetztes NO verursacht bei migräneanfälligen Personen stärkere und länger andauernde Kopfschmerzen (Olesen *et al.*, 1994), relaxiert cGMP-vermittelt die glatte Muskulatur der Gefäße und stimuliert die perivaskulären Trigeminálnerven, wobei CGRP freigesetzt wird (Wei *et al.*, 1992). CGRP ist selbst ein Vasodilatator (Wei *et al.*, 1992; Goadsby, 2005; Peroutka, 2005; Mehrotra *et al.*, 2006), erhöht aber nicht selbst die Gefäßpermeabilität (Goadsby, 2005; Peroutka, 2005). Dafür kann CGRP die Bildung von NO triggern, was zu einem „Teufelskreis“ führen kann (Gray und Marshall, 1992; Schmuck *et al.*, 1996; Akerman *et al.*, 2002). Die Erweiterung Meningialarterien führt zu einem erhöhten Blutvolumen in den Gefäßen. Diese mechanische Reizung wird vermutlich von Dehnungsrezeptoren in der Gefäßwand wahrgenommen und sensibilisiert die perivaskulären Nerven zusätzlich. Fühlbares Zeichen der Sensibilisierung ist das Pulsieren und Pochen des Kopfschmerzes, da bereits die normale Gefäßbewegung durch die Blutdruckamplitude einen ausreichenden Reiz für die Aktivierung der Nervenfaser darstellt.

1.2.3. Therapie

Die Arzneistoffe, die derzeit Verwendung finden, werden in zwei Gruppen eingeteilt: 1) Arzneistoffe zur Akutbehandlung des Migränekopfschmerz und 2) Arzneistoffe zur Prophylaxe der Migräneattacke (Ferrari, 1998; Diener, 2002; Villalón *et al.*; 2002, 2003). In der Akuttherapie stehen unspezifisch (Analgetika, Antiemetika) und spezifisch (Triptane, Ergotamin, DHE) wirkende Substanzen zur Verfügung. Die Therapie sollte sich nach einem Stufenplan richten, um die optimale Medikation herauszufinden (Diener, 2002). Welchen Anteil α -Adrenozeptoren und 5-HT-Rezeptoren in der Therapie der Migräne haben, wird ausführlicher in den Kapiteln 1.4.2. und 1.5.2. beschrieben.

Als unwirksam in der Migränetherapie erwiesen sich Substanzen, die die Plasmaextravasation hem-

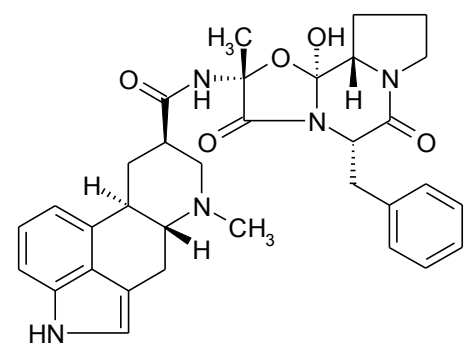


Abbildung 5: Struktur von Dihydroergotamin (DHE).

men (Goadsby, 2005; Peroutka, 2005). Hingegen war der CGRP-Antagonist Olcegepant (BIBN 4096 BS) in der Behandlung der akuten Migräneattacke effektiv (Olesen *et al.*, 2004). Somit könnte diese Substanzklasse als alternative Therapieoption zu den Triptanen ein großer Fortschritt in der Akutbehandlung der Migräneattacke sein. Dass Olcegepant infundiert werden muss, ist ein wesentlicher Nachteil dieser Verbindung.

1.3. Morbus Parkinson

1.3.1. Epidemiologie

Morbus Parkinson ist eine neurodegenerative Erkrankung, die erstmals 1817 von James Parkinson in „An essay on the shaking palsy“ beschrieben wurde. Der idiopathische Morbus Parkinson ist die verbreitetste Variante (Standaert und Young, 2005) und macht 80 bis 90 % aller Parkinson-Syndrome aus (Feuerstein, 2005). Die Prävalenz steigt zwischen dem 65. und 90. Lebensjahr exponentiell an, beträgt 0.3 % in der Gesamtbevölkerung bzw. 3 % bei Personen über 65 Jahre und wird aufgrund der höheren Lebenserwartung weiter zunehmen (Lang und Lozano, 1998). Morbus Parkinson ist durch 4 Hauptsymptome gekennzeichnet: Akinese (Bewegungsarmut), Ruhetremor (Zittern), Rigor (erhöhte Muskelanspannung) und später Verlust der Stell- und Haltereфлекse (Standaert und Young 2005; Samii *et al.*, 2004). Die moderne Pharmakotherapie begann 1961, als Walther Birkmayer und Oleh Hornykiewicz erstmals L-DOPA (i.v.) an Parkinsonpatienten mit großem Erfolg testeten (Böckler, 2006). Trotz zahlreicher Fortschritte bleibt die Progredienz der Erkrankung durch die Therapie (noch) unbeeinflusst. Die gegenwärtige Pharmakotherapie bessert lediglich die Symptome und ist hauptsächlich auf den Dopaminersatz beschränkt. Dennoch stieg die Lebenserwartung und die Lebensqualität der Patienten (Schapira, 2005; Feuerstein, 2005).



Abbildung 6: Körperhaltung eines Mannes mit Morbus Parkinson (Zeichnung von William Richard Gowers, 1886).

1.3.2. Pathophysiologie

Nach ca. 50 bis 70 %-iger Degeneration der von der *Sustantia nigra pars compacta* zum *Corpus striatum* ziehenden Dopaminneurone werden die ersten klinischen Symptome beobachtet (Lang und Lozano, 1998; Samii *et al.*, 2004; Standaert und Young 2005). Aufgrund des im *Corpus striatum*

auftretenden Dopaminverlusts (ca. 80 %) ist die Funktion exzitatorischer D₁- und inhibitorischer D₂-Rezeptoren vermindert, was die Hauptursache des Morbus Parkinson ist und mit dem Auftreten der Akinesie und des Rigors in Verbindung gebracht wird (Lang und Lozano, 1998; Samii *et al.*, 2004; Standaert und Young, 2005). Ein weiteres pathologisches Merkmal ist das Auftreten von Lewy-Körpern, die cytoplasmatische Aggregate sind, hauptsächlich das Protein α -Synuklein enthalten und in zu Grunde gehenden Neuronen der *Substantia nigra* und anderen Kerngebieten auftreten (Feuerstein, 2005; Büeler, 2006). Die Degeneration dopaminergener Neurone kann mit der Autotoxizität von Dopamin erklärt werden. Unter Katalyse der Monoaminoxidase und der Aldehyddehydrogenase wird Dopamin zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, Ammoniak (NH₃) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) abgebaut. In Anwesenheit von Fe²⁺ reagiert H₂O₂ zu einem Hydroxylradikal (\cdot OH) weiter (Fenton Reaktion). Hydroxylradikale sind cytotoxisch und bei erniedrigtem Glutathionspiegel das eigentlich schädliche Agens (Standaert und Young, 2005; Feuerstein, 2005; Olanow *et al.*, 2001). Pathologisch-anatomisches Kennzeichen des Zelluntergangs ist die Depigmentierung der *Substantia nigra*. Der Mangel an Dopamin hat zwei entscheidende Folgen: 1) cholinerge Interneurone im *Corpus striatum* werden enthemmt und 2) in einem komplexen Verschaltungssystem, an dem GABA- und Glutamat-Neurone beteiligt sind, wird die Filterfunktion des Thalamus für sensomotorische Meldungen zum Cortex verstärkt (Standaert und Young, 2005). Aus dem Mehr an Acetylcholin und kortikaler Hemmung resultiert die Parkinson-Krankheit.

1.3.3. Therapie

Die Therapieoptionen sind zahlreich und sollen an dieser Stelle auf den Dopaminersatz im *Corpus striatum* beschränkt bleiben (symptomatische Therapie). Levodopa (L-DOPA) ist das Prodrug von Dopamin und kann als Aminosäure die Blut-Hirn-Schranke überschreiten, was für Dopamin nicht möglich ist. Es ist der wirksamste und der am häufigsten gebrauchte Arzneistoff (Olanow *et al.*, 2001; Schapira, 2005), der vor allem am Anfang der Behandlung effektiv die Akinese- und Rigorsymptome verbessert. Nach cerebraler Decarboxylierung von L-DOPA wird das gebildete Dopamin in präsynaptischen neuronalen Vesikeln gespeichert und anschließend physiologisch über einen längeren Zeitraum gleichmäßig in den synaptischen Spalt freigesetzt. L-DOPA wird mit Arzneistoffen kombiniert, die nur peripher wirken und den Abbau von L-DOPA verhindern sollen, wodurch sich die Dosis und folglich die Nebenwirkungen reduzieren lassen. Nur peripher wirken Decarboxylase-Blocker (Benserazid, Carbidopa) und Entacapon (COMT-Hemmer). Zusätzlich kann Selegilin (MAO-B-Hemmer) gegeben werden, das ebenfalls einen L-DOPA-sparenden Effekt hat. Nach ca. 3 bis 5 Jahren Dauermedikation nimmt die anfänglich gute Wirkung von L-DOPA aufgrund des fortschreitenden Untergangs der präsynaptischen dopaminspeichernden Neurone ab. Diese nachlassen-

de Fähigkeit, Dopamin zu speichern, und die kurze Halbwertszeit von L-DOPA machen es erforderlich, dass die Dosis erhöht oder das Einnahmeintervall verkürzt werden muss. Demzufolge wird die Gehirndopaminkonzentration bei andauernder Krankheit zunehmend von peripherem L-DOPA abhängig. Die pulsartig schwankenden L-DOPA-Plasmaspiegel sowie eine geänderte Rezeptorsensitivität werden für die Wirkungsfluktuationen und die motorischen Komplikationen (on-off-Phänomen, wearing-off-Phänomen, Dyskinesien) verantwortlich gemacht. Während das wearing-off-Phänomen vorhersehbar (end-of-

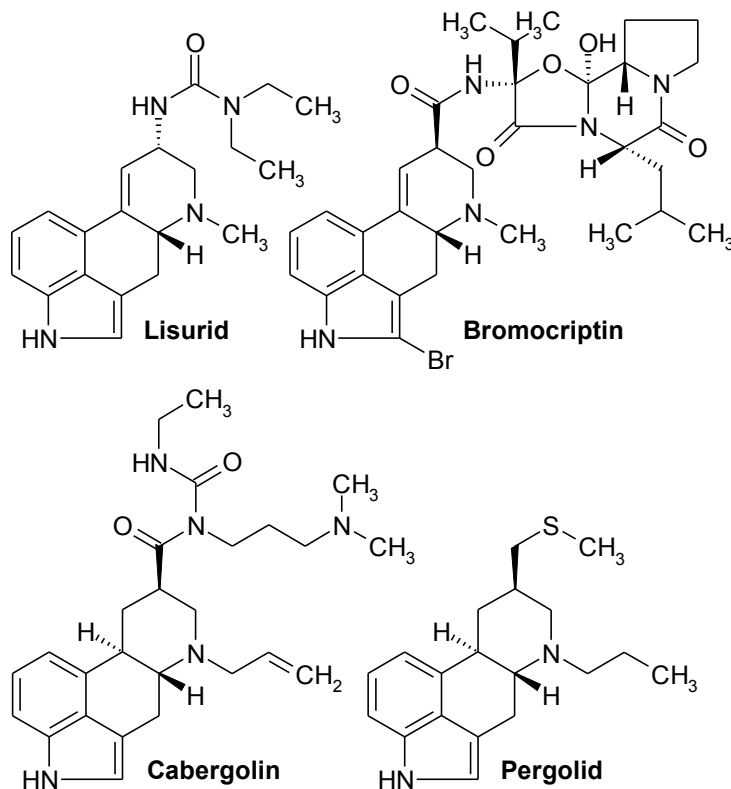


Abbildung 7: Strukturen von ausgewählten D₂-Agonisten, die derzeit in Deutschland in der Parkinson-Therapie verwendet werden.

dose-Akinese) und durch Steigerung der Dosis und/oder der Einnahmefrequenz von L-DOPA kontrollierbar ist (Olanow *et al.*, 2001; Standaert und Young, 2005), sind on-off-Perioden (gute - schlechte Beweglichkeit) unvorhersagbar. Dyskinesien treten meist bei hohen L-DOPA-Plasmaspiegeln auf. Um die Nebenwirkungen der L-DOPA-Langzeittherapie, die letztendlich unumgänglich ist, hinauszuzögern bzw. zu minimieren, sollte die Dopaminersatztherapie, vor allem bei „jüngeren“ Parkinsonpatienten, mit einem D₂-Agonisten beginnen (Olanow *et al.*, 2001; Samii *et al.*, 2004; Schapira, 2005). D₂-Agonisten werden in zwei Gruppen eingeteilt: 1) Dopaminagonisten mit Ergolin-Grundstruktur und 2) Dopaminagonisten ohne Ergolinstruktur. Wirkstoffe beider Gruppen zeigen Affinität zu weiteren Dopaminrezeptoren (Newman-Tancredi *et al.*, 2002a; Standaert und Young, 2005). Eine Auswahl von D₂-Agonisten mit Ergolinstruktur, die derzeit in Deutschland mit der Indikation Parkinson zugelassen sind, ist in Abbildung 7 wiedergegeben. Die kontinuierliche Stimulation dopaminerger Neurone ahmt die physiologische Situation nach, reduziert die motorischen Komplikationen und ist somit für die Therapie erstrebenswert (Stocchi *et al.*, 2002; Stocchi, 2003). Für diesen Therapieansatz werden verschiedene Strategien, wie Retardformulierungen, transdermale Systeme, aus dem Magen freisetzende Arzneiformen und Infusionssysteme verfolgt. Diese Darreichungsformen setzen den Dopaminagonist über einen längeren Zeitraum kontrolliert frei, was

zu konstanten Plasmaspiegeln führt (Riebesehl und Lipp, 2006).

Die Therapie des Morbus Parkinson wird auch durch α -Adrenozeptoren und 5-HT-Rezeptoren beeinflusst. Die Rolle dieser Rezeptoren wird detaillierter in den Kapiteln 1.4.3. und 1.5.3. beschrieben.

1.4. α -Adrenozeptoren

1.4.1. Klassifikation

Die Catecholamine Noradrenalin (Neurotransmitter) und Adrenalin (Hormon und Neurotransmitter) sind die physiologischen Agonisten an α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren. Basierend auf pharmakologischen und molekularbiologischen Daten werden α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren gegenwärtig in jeweils drei Subtypen unterteilt (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} und α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}). α -Adrenozeptoren sind membranständig, gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und werden in nahezu allen peripheren Geweben sowie im zentralen Nervensystem oder auf Thrombozyten exprimiert (präsynaptisch, postsynaptisch, glattmuskulär und/oder endothelial). α_1 -Adrenozeptoren sind $G_{q/11}$ -Protein gekoppelt. Deren Aktivierung stimuliert die Phospholipase C, worauf die *Second messenger* Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat entstehen. Stimulation von α_2 -Adrenozeptoren aktiviert in erster Linie $G_{i/o}$ -Proteine, wodurch die Adenylylcyclase inhibiert und folgend die cAMP-Bildung gehemmt wird. Weiterhin kann die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle verhindert werden bzw. es werden K^+ -Kanäle durch α_2 -Adrenozeptoragonisten aktiviert. α_2 -Adrenozeptoren können auch an intrazelluläre Enzyme, wie Phospholipase A₂, C und D, gekoppelt sein (Docherty, 1998; Guimarães und Moura, 2001).

1.4.2. α -Adrenozeptoren in der Migränetherapie

α_{1A} -, α_{1D} -, α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptoren vermitteln die Kontraktion der Halsschlagader des Hundes, einem vaskulären Modell, prädiktiv zur Charakterisierung von Wirkstoffen für die Akutherapie der Migräne (Willems *et al.*, 2003; Villalón *et al.*, 2002, 2003). Migränetherapeutika, wie Ergotamin und Dihydroergotamin, besitzen hohe Affinität zu α_1 - und α_2 -Adrenorezeptoren (Closse *et al.*, 1984; Megens *et al.*, 1986; Tfelt-Hansen *et al.*, 2000; Görnemann *et al.*, 2008a). Beide Arzneistoffe kontrahierten die Halsschlagader des Hundes über α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptoren (Valdivia *et al.*, 2004; Villalón *et al.*, 2004). Für Ergotamin konnte an diesem Gefäß zusätzlich Agonismus an α_1 -Adrenozeptoren beobachtet werden, der aber nicht weiter untersucht wurde (Valdivia *et al.*, 2004). Vermutlich ist der α_{1D} -Subtyp involviert, da Ergotamin an α_{1A} -Adrenozeptoren keinen Agonismus zeigte (Görnemann *et al.*, 2008a). Ob sich α_1 - und/oder α_2 -Adrenozeptoragonisten, insbesondere an α_{1B} -

und α_{2C} -Adrenozeptoren, zur Akuttherapie eignen, muss mit potenten, selektiven Agonisten, die gegenwärtig noch nicht verfügbar sind, in weiteren Experimenten gezeigt werden (Willems *et al.*, 2003).

1.4.3. α -Adrenozeptoren in der Therapie des Morbus Parkinson

Noradrenerge Mechanismen sind in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, wie Morbus Parkinson impliziert (Marien *et al.*, 2004). α_2 -Adrenozeptorantagonisten, wie Idazoxan, Yohimbin, Rauwolscin und Fipamezol reduzierten die L-DOPA-induzierten Dyskinesien im Tiermodell (Gomez-Mancilla und Bédard, 1993; Henry *et al.*, 1998, 1999; Fox *et al.*, 2001; Savola *et al.*, 2003). Idazoxan und Fipamezol verlängerten zusätzlich die „antiparkinsonerge“ Wirkung von L-DOPA am Primatenmodell (Henry *et al.*, 1999; Savola *et al.*, 2003). Klinische Studien mit Idazoxan ergaben ebenfalls ein positives Ergebnis im Bezug auf die Reduzierung L-DOPA-induzierter Dyskinesien, wenn auch das Resultat mangels Patientenzahl nicht signifikant war (Rascol *et al.*, 2001). Die Rolle von α_1 -Adrenozeptoren in der Therapie des Morbus Parkinson wird noch widersprüchlich diskutiert. Während in einer Arbeitsgruppe α_1 -Adrenozeptoragonisten vorteilhaft waren bzw. α_1 -Adrenozeptorblockade sich als nachteilig herausstellte (Colpaert, 1987; Mavridis *et al.*, 1991), scheinen α_{1B} -Antagonisten eine neue Therapieoption zu sein, da die α_{1B} -Adrenozeptoraktivierung in der Manifestation des Morbus Parkinson offensichtlich involviert ist (Zuscik *et al.*, 2000). Neue Wirkstoffe, die das noradrenerge System beeinflussen, insbesondere potente α_2 -Adrenozeptorantagonisten, können in der Therapie des Morbus Parkinson nutzbringend sein. Um die unerwünschten Arzneimittelwirkungen, die Idazoxan als unselektiver α_2 -Adrenozeptorantagonist hat (Rascol *et al.*, 2001), zu minimieren, wäre die Bestimmung des beteiligten α_2 -Adrenozeptorsubtyps von Bedeutung.

1.5. 5-HT-Rezeptoren

1.5.1. Klassifikation

Serotonin (5-HT) ist einer der am längsten bekannten Neurotransmitter. Gegenwärtig sind 14 verschiedene, membranständige Serotoninrezeptoren (ohne Splicevarianten) bekannt, die im zentralen Nervensystem und im peripheren Gewebe oder auf Thrombozyten exprimiert werden (präsynaptisch, postsynaptisch, glattmuskulär, endothelial, und/oder im Herzgewebe). Die IUPHAR hat auf der Basis: 1) struktureller (Aminosäuresequenz und Genlokalisierung), 2) signalübertragender und 3) pharmakologischer (ligandenbezogene Eigenschaften) Kriterien die Rezeptoren 7 unterschiedlichen Rezeptorklassen (5-HT₁ – 5-HT₇) zugeordnet. Mit Ausnahme des 5-HT₃-Rezeptors, welcher ein liganden-gesteuerter Ionenkanal ist, gehören die 5-HT-Rezeptoren zur Familie der G-Protein-gekopp-

pelten Rezeptoren. Zur Klasse der 5-HT₁-Rezeptoren gehören 5 Subtypen (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} und 5-HT_{1F}), welche G_{i/o}-Protein-gekoppelt sind und folglich durch Hemmung der Adenylylcyclase die cAMP-Bildung in der Zelle inhibieren. 5-HT₂-Rezeptoren (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} und 5-HT_{2C}) sind G_{q/11}-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Stimulation die Phospholipase C aktiviert und zu einem intrazellulären Anstieg der *Second messenger* Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) führt. Der 5-HT₃-Rezeptor ist ein Na⁺/K⁺-Ionenkanal, der aus 5 Untereinheiten besteht. 5-HT_{5A}-Rezeptoren sind ebenfalls G_{i/o}-gekoppelt, wohingegen bei 5-HT₄-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptorstimulation die Konzentration des *Second messengers* cAMP intrazellulär nach Aktivierung der Adenylylcyclase erhöht wird (G_s-Protein-gekoppelte Rezeptoren). Bei 5-HT_{5B}-Rezeptoren ist der Signalweg noch unbekannt (Hoyer *et al.*, 1994, 2002; Villalón und Centurión, 2007).

1.5.2. 5-HT-Rezeptoren in der Migränetherapie

Derzeit wird den 5-HT_{1B}-, 5-HT_{1D}- bzw. den 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptoren eine Rolle in der Akuttherapie bzw. in der Prophylaxe der Migräne zugeschrieben. Triptane (Sumatriptan, Eletriptan, Rizatriptan etc.) werden zur Akutbehandlung eingesetzt, da sie: 1) Agonisten an glattmuskulären 5-HT_{1B}-Rezeptoren sind und dilatierte meningiale Blutgefäße kontrahieren, 2) durch Aktivierung präsynaptischer 5-HT_{1D}-Rezeptoren die Freisetzung der vasoaktiven und proinflammatorischen Mediatoren verhindern und somit die neurogene Entzündung unterbrechen und 3) die Neurotransmission in den trigeminalen *Nucleus caudalis* durch Stimulation von 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren blockieren (nicht Sumatriptan, da kein Übergang ins zentrale Nervensystem) (Ferrari, 1998; Goadsby *et al.*, 2002). Ergotamin und DHE vermitteln ihre Wirkung ebenfalls durch die Aktivierung von 5-HT_{1B}- und möglicherweise durch 5-HT_{1D}-Rezeptoren (Buzzi und Moskowitz, 1991; MaassenVanDenBrink *et al.*, 1998; Villalón *et al.*, 1999; Tfelt-Hansen *et al.*, 2000; Villalón *et al.*, 2004; Valdivia *et al.*, 2004; Göthert und Starke, 2005). Aufgrund der hohen Affinität zu einer Vielzahl weiterer Rezeptoren (Tfelt-Hansen *et al.*, 2000; Villalón *et al.*, 1999), was die Nebenwirkungen von Ergotamin und DHE teilweise erklärt, sollte deren Anwendung eine strenge Indikationsstellung vorausgehen. Bei kardiovaskulären Erkrankungen ist die Verwendung von 5-HT_{1B}-Agonisten kontraindiziert (Saxena und Tfelt-Hansen, 2006), da Koronararterien ebenfalls mit kontraktilen 5-HT_{1B}-Rezeptoren ausgestattet sind und das Risiko koronarer Vasospasmen besteht (MaassenVanDenBrink *et al.*, 1998; van den Broek *et al.*, 2002). Aus diesem Grund darf ein Triptan nie mit Ergotamin oder DHE kombiniert werden. Schlägt die Therapie mit Triptanen nicht an, oder treten mehr als drei Attacken pro Monat auf, ist die Indikation zur medikamentösen Migräneprophylaxe gegeben. Die Stimulation von 5-HT_{2B}- und/oder 5-HT₇-Rezeptoren kann eine Migräneattacke initiieren (siehe Kapitel 1.2.2.). Beide Rezeptorsubtypen stellen somit eine mögliche Zielstruktur für die Migräneprophylaxe dar (Johnson

et al., 1998; Terrón, 2002). Propranolol (Weerasuriya *et al.*, 1982; Pryse-Phillips *et al.*, 1997; Limmroth und Michel, 2001; Silberstein, 2005) und Lisurid (Sommerville und Herrmann, 1978; Herrmann *et al.*, 1978; Soyka und Frieling, 1989; Diener *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 2006) sind zur Migräneprophylaxe geeignet. Beide Arzneistoffe sind 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonisten (Kalkman, 1994; Schmuck *et al.*, 1996, Jähnichen *et al.*, 2005a) und Lisurid zusätzlich ein potenter Antagonist an 5-HT₇-Rezeptoren (Terrón, 1996; Villalón *et al.*, 1997; diese Arbeit).

Ob 5-HT_{1F}-Rezeptoren für die Akuttherapie eine Rolle spielen, wird noch diskutiert (Villalón und Centurión, 2007).

5-HT-Agonisten, genauer 5-HT_{1B/1D}-Agonisten, werden in der Akuttherapie der Migräneattacke weiterhin eine bedeutende Rolle spielen. Trotz des Risikos koronarer Vasospasmen, bieten Triptane eine sichere Medikation (Saxena und Tfelt-Hansen, 2006). Ob selektive 5-HT_{1B}-Agonisten wirksam sind, muss sich nach deren Entwicklung noch zeigen. Hingegen waren PNU-142633 und 179,202 (5-HT_{1D}-Agonisten) unwirksam (Saxena und Tfelt-Hansen, 2006; Villalón und Centurión, 2007). Gegenwärtig ist Propranolol das einzige Migräneprophylaktikum, welches putativ 5-HT_{2B}-Rezeptoren als Zielstruktur hat. Weitere 5-HT_{2B}- und/oder 5-HT₇-Antagonisten haben ein hohes Nebenwirkungspotenzial (Methysergid, siehe Kapitel 1.6.) oder sind in Deutschland zurzeit nicht zugelassen (Pizotifen, Lisurid).

Neue Arzneistoffe zur Migräneprophylaxe sollten potente Antagonisten an 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptoren sein.

1.5.3. 5-HT-Rezeptoren in der Therapie des Morbus Parkinson

In der Behandlung des Morbus Parkinson haben 5-HT_{2A}- und besonders 5-HT_{2B}-Rezeptoren Aufmerksamkeit erlangt. D₂-Agonisten vom Ergolintyp (Pergolid und Cabergolin) können diese Rezeptoren aktivieren, was zeit- und dosisabhängig zu schweren Nebenwirkungen führen kann (siehe Kapitel 1.6.).

1.6. Das mitogene Potenzial von 5-HT-Rezeptoragonisten

Pergolid und Cabergolin, beides Dopamin D₂-Rezeptoragonisten vom Ergolintyp, sind zur Behandlung des Morbus Parkinson eingesetzt worden (Standaert und Young, 2005). In zwei kürzlich publizierten Studien konnte gezeigt werden, dass Parkinsonpatienten, die mit Pergolid oder Cabergolin behandelt wurden, ein höheres Risiko hatten einen Herzklappenschaden zu erleiden, als Patienten deren Parkinson mit anderen D₂-Agonisten behandelt wurde. Das Risiko eines Herzklappenschadens war insbesondere bei Patienten erhöht, deren tägliche Dosis mindestens 3 mg Pergolid oder Cabergolin für 6 Monate oder länger betrug (Schade *et al.*, 2007; Zanettini *et al.*, 2007). Als Konse-

quenz wurde Pergolid 2007 in den USA vom Markt genommen (U.S. Food and Drug Administration, 2007).

Die Inzidenz dieser unerwünschten Arzneimittelwirkung wird in erster Linie mit der Aktivierung von 5-HT_{2B}-Rezeptoren in Verbindung gebracht (Roth, 2007), die in Herzklappen exprimiert werden (Setola *et al.*, 2003) und deren mRNA in diesem Gewebe nachgewiesen wurde (Fitzgerald *et al.*, 2000). Die Stimulation dieses Rezeptorsubtyps initiiert die Proliferation von Myofibroblasten in den Herzklappen, was eine Verdickung, Verkürzung und Versteifung der Klappen zur Folge hat und schließlich zu unvollständigem Verschluss der Herzklappen (Herzklappeninsuffizienz) und somit zum Rückfließen des Blutes (Regurgitation) in die Herzkammern führt (Setola *et al.*, 2003; Baseman *et al.*, 2004; Horvath *et al.*, 2004; Van Camp *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2007; Zanettini *et al.*, 2007).

Das mitogene Potenzial von 5-HT und weiterer Agonisten, die im Zusammenhang mit der Stimulation von 5-HT_{2B}-Rezeptoren stehen, wurde in mehreren Studien detailliert untersucht. Zu den Arzneistoffen -oder deren Metaboliten-, für die Herzklappenschäden publiziert wurden, zählen unter anderem: Pergolid (Baseman *et al.*, 2004; Horvath *et al.*, 2004; Pritchett *et al.*, 2002; Van Camp *et al.*, 2004), Cabergolin (Horvath *et al.*, 2004; Pinero *et al.*, 2005), Ergotamin (Flaherty und Bates, 1996; Redfield *et al.*, 1992), Methysergid -Methylergometrin- (Bana *et al.*, 1974; Redfield *et al.*, 1992), Fenfluramin -Norfenfluramin- (Connolly *et al.*, 1997) und MDMA (3,4-Methylenedioxy-methamphetamin) -MDA (3,4-Methylenedioxyamphetamin)- (Setola *et al.*, 2003). Diese Substanzen oder deren Metabolite sind Agonisten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren (Glusa und Roos, 1996; Fitzgerald *et al.*, 2000; Jähnichen *et al.*, 2005a; Setola *et al.*, 2003) und verursachen Herzklappenschäden, wie sie beim Karzinoid Syndrom, einer Tumorerkrankung, die mit einem erhöhten Serotoninplasmaspiegel einhergeht (Robiolio *et al.*, 1995), beobachtet wurden (Abbildung 8). An humanen Interstitialzellen aus Herzklappen und 5-HT_{2B}-Rezeptor-exprimierenden HEK293E-Zellen konnte für MDA bzw. Norfenfluramin und 5-HT die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges (ERK-1 und ERK-2) gezeigt werden (Fitzgerald *et al.*, 2000; Setola *et al.*, 2003). Die Aktivierung dieses Signalwegs kann von der Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (z.B. 5-HT_{2B}-Rezeptoren) herrühren und führt im Ergebnis zur Zellteilung (Launay *et al.*, 1996; Lopez-Illasaca, 1998). Dass 5-HT_{2B}-Agonisten mitogenes Potenzial besitzen, konnte weiterhin durch den gesteigerten Einbau von [³H]-Thymidindesoxyribose in neu synthetisierte DNA in humane Herzklappenzellen bestätigt werden (Setola *et al.*, 2003).

Die Stimulation von 5-HT_{2B}-Rezeptoren ist ausschlaggebend für die Entwicklung von Herzklappenschäden (Rothman *et al.*, 2000). Dennoch gibt es Hinweise, dass eine Beteiligung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren an der Entstehung nicht ausgeschlossen werden kann (Fitzgerald *et al.*, 2000). Es konnte

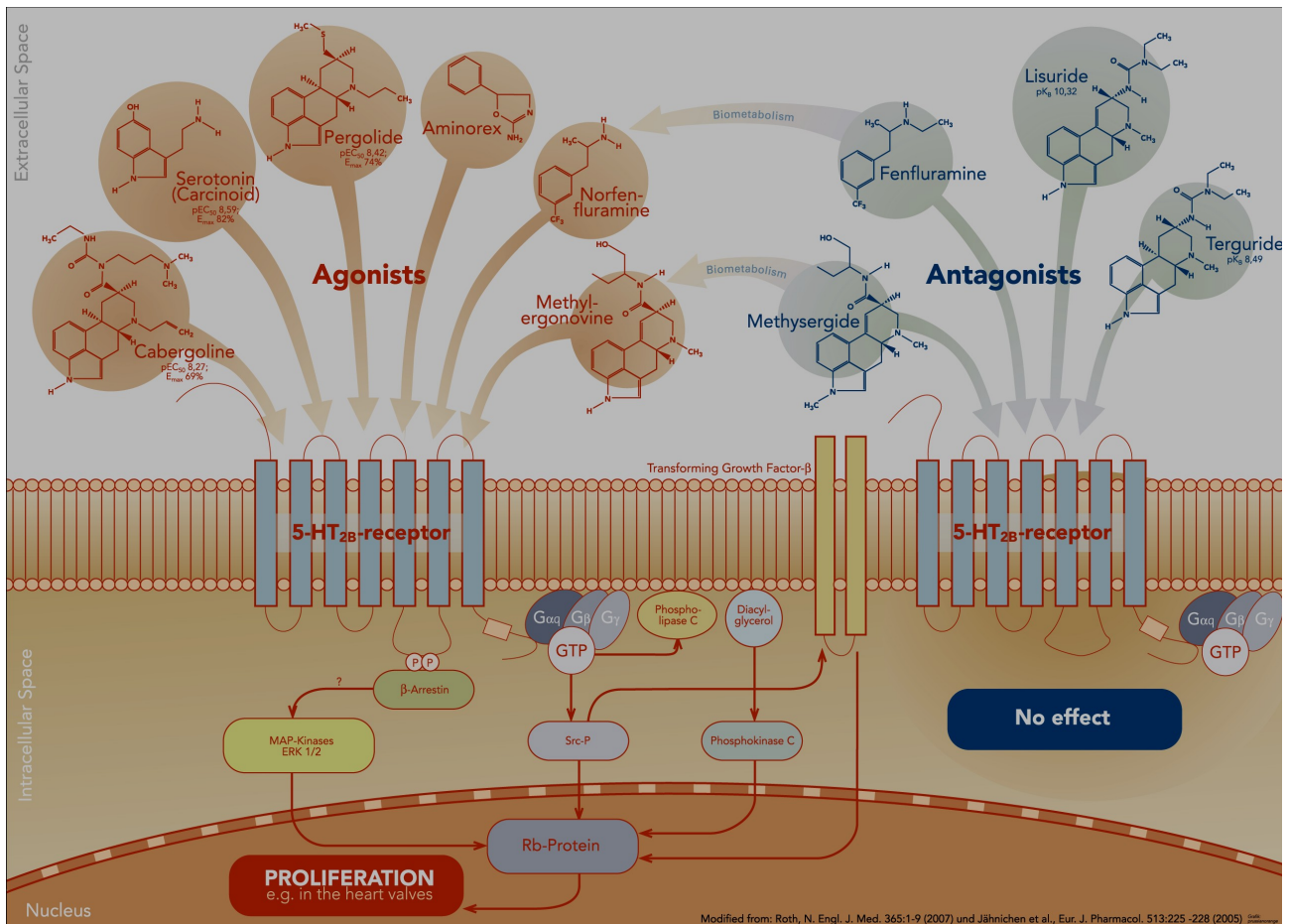


Abbildung 8: 5-HT_{2B}-Rezeptoragonisten (z.B. Pergolid und Cabergolin) induzieren proliferative Effekte.

gezeigt werden, dass: 1) 5-HT_{2A}-Rezeptoraktivierung mitogene Effekte hervorruft (Xu *et al.*, 2002), 2) humane Herzklappen hohe mRNA-Level für den 5-HT_{2A}-Rezeptor haben (Fitzgerald *et al.*, 2000), 3) der Einbau von [³H]-Thymidindesoxyriboside in neu synthetisierte DNA in Herzklappenzellen nicht vollständig durch SB206553 (5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonist) gehemmt wurde (Setola *et al.*, 2003) und 4) 5-HT_{2B}-Rezeptoragonisten (Pergolid und Cabergolin) auch 5-HT_{2A}-Rezeptoren aktivieren (Newman-Tancredi *et al.*, 2002b).

5-HT_{2B}-Rezeptoren sind auch an der Pathogenese der primären pulmonalen Hypertonie beteiligt. In einem Mausmodell führte die Stimulation von 5-HT_{2B}-Rezeptoren, die hypoxieinduziert vermehrt exprimiert wurden, zu gesteigerter vaskulärer Proliferation und weiterhin, Elastase- und TGF- β -abhängig, zu irreversiblen vaskulärem Remodeling der Lungengefäße. Als Folge ist der pulmonal arterielle und der rechtsventrikulär systolische Druck pathologisch erhöht (Launay *et al.*, 2002).

Aufgrund dieser Befunde sollten Arzneistoffe und neue Substanzen auf ihre Aktivität an 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren getestet werden.

1.7. Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Testung neuer Wirkstoffkandidaten, die sich für die Migräneprophylaxe und zur Behandlung des Morbus Parkinson eignen. Lisurid ist ein partialsynthetisches Ergolinderivat, das sich in der Parkinson-Therapie und der Migräneprophylaxe bewährt hat. Lisurid und Tergurid (9,10-Transdihydrolisurid) sind die Leit- bzw. Muttersubstanzen dieser Arbeit (Abbildung 9), deren

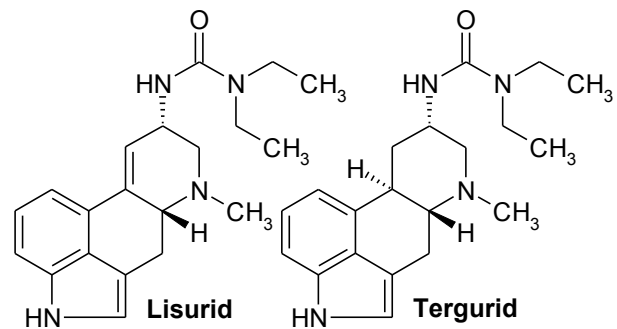


Abbildung 9: Strukturen von Lisurid und Tergurid.

Struktur chemisch gezielt modifiziert wurde. Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Rezeptormodelle (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} und 5-HT₇) sollte von Lisurid, Tergurid und den neuen Substanzen das Rezeptoraffinitätsprofil vervollständigt bzw. neu erstellt werden und die gewonnenen Erkenntnisse in die Synthese weiterer Verbindungen einfließen. Anhand der erhaltenen Affinitätsdaten sollten ein oder mehrere Wirkstoffkandidaten benannt werden, die sich zur Migräneprophylaxe oder zur Therapie des Morbus Parkinson eignen. Hauptaugenmerk wurde hierbei auf den fehlenden Agonismus an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren gelegt. Die Migräneprophylaxe und der Morbus Parkinson bedürfen einer anhaltenden Behandlung. Um das Dosisintervall zu reduzieren und die Patientencompliance zu erhöhen, sollte daher zusätzlich mithilfe des Rezeptoraffinitätsprofils abgeschätzt werden, ob die jeweilige Substanz transdermal appliziert werden kann.

Pergolid ist ebenfalls ein Ergolinderivat, welches sich geringfügig in der Substitution der Ergolin-Grundstruktur von Lisurid und Tergurid unterscheidet (Abbildung 7). Im Gegensatz zu Lisurid und Tergurid verursacht Pergolid Herzklappenschäden, die mit dessen potentem und vollen Agonismus an 5-HT_{2B}-Rezeptoren assoziiert werden. Es war daher von Bedeutung, das molekulare Fragment, welches für den Agonismus an 5-HT_{2B}-Rezeptoren verantwortlich ist, zu bestimmen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten in die weitere Entwicklung neuer Wirkstoffe eingehen.

In der Therapie des Morbus Parkinson werden neue α_2 -Adrenozeptorantagonisten zur Reduzierung L-DOPA-induzierter Dyskinesien benötigt (siehe Kapitel 1.4.3.). Zur Behandlung der akuten Migräneattacke eignen sich der Voraussicht nach α_{2C} -Agonisten, während α_{2C} -Antagonisten zur Therapie des Morbus Raynaud nützlich wären. Lisurid und Tergurid sind potente Antagonisten an den α_2 -Adrenozeptorsubtypen und Ergotamin vermittelt seine Antimigränewirkung partiell als α_{2C} -Adrenozeptor-

toragonist (siehe Kapitel 1.4.2.). Ein vordringliches Ziel war daher die Etablierung eines funktionellen, vaskulären α_2 -Adrenozeptor-Testmodells, welches nur einen α_2 -Adrenozeptorsubtyp umfasst und an dem bekannte und neue Wirkstoffe im Hinblick auf die genannten Erkrankungen getestet werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien

2.1.1.1. Chemikalien und Biochemikalien

Folgende Chemikalien und Biochemikalien wurden gekauft oder waren Substanzspenden der angegebenen Firmen:

100-bp-DNA-Leiter (äquimolar), Agarose NEEO, Ethidiumbromid und Rotiphorese® TAE-Puffer von Carl Roth, Deutschland; dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), M-MLV Reverse Transkriptase (einschließlich Puffer), Random-Hexamere (Primer), RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 u/μl) und RQ1 RNase-Free DNase (einschließlich Puffer) von Promega, USA; Taq-DNA-Polymerase (einschließlich Puffer und MgCl₂) von roboklon, Deutschland; 5-Carboxamidotryptamin (5-CT) von GSK, Großbritannien; 5-Hydroxytryptamincreatininsulfat (5-HT), Ketanserintartrat, (*R*)-Phenylephrinhydrochlorid und Yohimbinhydrochlorid von Janssen, Belgien; Bradykininriacetat, Carbachol, Clonidinhydrochlorid, Chloroethylclonidindihydrochlorid, Corticosteron, Idazoxanhydrochlorid, Indometacin, Methysergidhydrogenmaleat, Noradrenalinbitartrat, Mepyraminhydrogenmaleat, Prazosinhydrochlorid, (±)-Propranololhydrochlorid, Rauwolscinhydrochlorid, (2*S*-trans)-1,3,4,5',6,6',7,12b-Octahydro-1',3'-dimethyl-spiro[2*H*-benzofuro[2,3-*a*]quinolizine-2,4'(1'*H*)-pyrimidin]-2'(3'*H*)-on-hydrochlorid (MK912) und *N*-(1-Methyl-1*H*-5-indolyl)-*N*-(3-methyl-5-isothiazolyl)harnstoff (SB204741) von Sigma-Aldrich, Deutschland; 2-[2-(4-(2-Methoxyphenyl)piperazin-1-yl)ethyl]-4,4-dimethyl-1,3-(2*H*,4*H*)-isoquinolindion-dihydrochlorid (ARC239), 2-[(4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-2,3-dihydro-1-methyl-1*H*-isoindol-maleat (BRL44408) and 2-(2,6-Dimethoxyphenoxyethyl)aminomethyl-1,4-benzodioxan- hydrochlorid (WB4101) von Tocris, Großbritannien; (±)-1,3,5-Trimethyl-6-[(3-{4-[(2,3-dihydro-2-hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-5-yl]-1-piperazinyl}propyl)amino]-2,4-(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (B8805-033) von ALTANA, Deutschland; Cocainhydrochlorid von Merck (Darmstadt) Deutschland; 9,11-Dideoxy-11α,9α-epoxymethanoprostaglandin F_{2α} (U46619) und Dinoprosttromethamin (PGF_{2α}) von Upjohn, Deutschland; 6-Methyl-1-(methylethyl)-ergolin-8β-carbonsäure-2-hydroxy-1-methylpropylestermaleat (LY53857) von Eli Lilly, USA sowie Brimonidintartrat (UK14304) von Allergan Pharmaceuticals, Irland.

Folgende Ergolinderivate wurden von Dr. Miroslav Flieger vom Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prag, Tschechien synthetisiert: Pergolidmesilat, 6-Nor-6-ethylpergolid (6-Ethylpergolid), 6-Nor-6-methylpergolid (6-Methylpergolid), 6-Norpergolid, 8 β -(Methyloxymethyl)-6-propylergolin (*O*-Pergolid), 8 β -(Methyloxymethyl)-6-ethylergolin (6-Ethyl-*O*-pergolid), 8 β -(Methyloxymethyl)-6-methylergolin (6-Methyl-*O*-pergolid), 8 β -(Methyloxymethyl)ergolin (6-Nor-*O*-pergolid), 8 β -(Methyloxymethyl)-6-cyclopropylmethylergolin (6-Cyclopropylmethyl-*O*-pergolid), Lisuridhydrogenmaleat, 1-Allyl-6-nor-6-ethylisurid (1-Allyl-6-ethylisurid), 1-Methylisurid, 6-Norlisurid, 6-Nor-6-ethylisurid (6-Ethylisurid), 8 β -Lisurid, *N*'-Monodesethylisurid, 1,1-Dimethyl-3-(9,10-didehydro-6-methyl-8 α -ergolinyl)harnstoff (Didehydrometergurid), 1,1-Diisopropyl-3-(9,10-didehydro-6-methyl-8 α -ergolinyl)harnstoff (Didehydrodipergurid), *N*-(9,10-Didehydro-6-methyl-8 α -ergolinyl)pyrrolidin-1-carboxamid (Didehydropyrrogurid), *N*-(9,10-Didehydro-6-methyl-8 α -ergolinyl)piperidin-1-carboxamid (Didehydropipergurid), *N*-(9,10-Didehydro-6-methyl-8 α -ergolinyl)-4-morpholin-1-carboxamid (Morpholinolisurid), Tergurid, 1-Allyl-6-nor-6-ethyltergurid (1-Allyl-6-ethyltergurid), 1-Allyl-6-nor-6-propyltergurid (1-Allyl-6-propyltergurid), 1-Allyl-10 α -methoxytergurid, 1-Methyltergurid, 6-Nortergurid, 6-Nor-6-ethyltergurid (6-Ethyltergurid), 6-Nor-1,6-diallyltergurid (1,6-Diallyltergurid), 8 β -Tergurid, 10 α -Methoxytergurid, *N*'-Monodesethyltergurid, 1,1-Dimethyl-3-(6-methyl-8 α -ergolinyl)harnstoff (Metergurid), 1,1-Diisopropyl-3-(6-methyl-8 α -ergolinyl)harnstoff (Dipergurid), *N*-(6-Methyl-8 α -ergolinyl)pyrrolidin-1-carboxamid (Pyrrogurid), *N*-(6-Methyl-8 α -ergolinyl)piperidin-1-carboxamid (Pipergurid), 1,1-Dimethyl-3-(1-allyl-6-methyl-8 α -ergolinyl)harnstoff (1-Allyl-metergurid), und 3-((2*S*,4*aR*,10*bR*)-7-Amino-4-methyl-6-oxo-1,2,3,4,4*a*,5,6,10*b*-octahydrobenzo[*f*]chinolin-2-yl)-1,1-diethylharnstoff (Oxtergurid). 2-Bromlisurid (Bromergurid) wurde von der axxonis Pharma AG, Berlin, Deutschland zur Verfügung gestellt.

Von allen Substanzen wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 1, 3, 10, 30 oder 100 mM hergestellt. Als Lösungsmittel wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Zur Verbesserung der Löslichkeit und/oder stabilitätsbedingt fanden abweichend folgende Lösungsmittel Anwendung: DMSO (B8805-033, Corticosteron und SB204741), 50 % Ethanol (Indometacin, Methysergid und Prazosin) oder 96 % Ethanol (U46619). Die in dieser Arbeit untersuchten Ergolinderivate und Oxtergurid wurden äquimolar mit HCl in 50 % Ethanol gelöst. Die Stammlösungen wurden bei -18 °C gelagert und kurz vor Gebrauch mit demineralisiertem Wasser weiter verdünnt.

Zur Herstellung der Nähr- und Pufferlösungen wurden folgende Salze von Merck, Deutschland bezogen: Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), D-Glucose-Monohydrat, Kaliumchlorid (KCl), Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), Natriumchlorid (NaCl), und Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3).

2.1.1.2. Kits

Ein RNAagents® Total RNA Isolation System Kit zur Isolation der Gesamt-RNA aus Geweben wurde von Promega, USA bezogen. Die Aufreinigung der erhaltenen Gesamt-RNA erfolgte mit dem GeneMATRIX UNIVERSAL RNA Purification Kit von roboklon, Berlin. RTQ-PCR Experimente wurden mit dem SYBR® Green PCR Mastermix Kit von Applied Biosystems, USA durchgeführt.

2.1.1.3. Nähr- und Pufferlösungen für Untersuchungen an isolierten Tierorganen

Die in Kapitel 2.1.1.1. genannten Salze von Merck (Deutschland) wurden verwendet, um die verschiedenen, in Tabelle 2 aufgeführten, Nähr- und Pufferlösungen herzustellen. Die Lösungen wurden täglich frisch mit demineralisiertem Wasser hergestellt und permanent mit Carbogen (5 % CO_2 in O_2) gesättigt. Sie wiesen bei 37 °C einen pH-Wert von ca. 7.4 auf.

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Nähr- und Pufferlösungen für Untersuchungen an isolierten Organen (Konzentrationen in mM).

	Modifizierte Krebs-Henseleit (Lösung A)	Modifizierte Krebs-Henseleit (Lösung B)	Modifizierte Krebs-Henseleit (Lösung C)
NaCl	118.00	118.00	118.00
KCl	4.70	4.70	4.70
NaHCO_3	25.00	25.00	25.00
KH_2PO_4	1.20	1.20	1.20
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2.50	1.60	1.25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1.20	1.20	1.20
D-Glucose · H_2O	10.00	10.00	10.00

2.1.1.4. Oligonukleotide

Für die im Zusammenhang mit der Schweinepulmonalvene durchgeführten Polymerasekettenreaktionen (PCR, siehe Kapitel 2.3.3.3. und 2.3.3.5.), wurden die in Tabelle 3 genannten Oligonukleotide als Primer verwendet (TIB MOLBIOL, Deutschland).

Tabelle 3: Verwendete spezifische Primer in der RTQ-PCR und RT-PCR.

Gen	Sequenz (Sense-und Antisense-Primer)	Transkript	Literatur
p α_{2A} ^a	5`-CGC TTG TCA TCC CTT TCT CG-3`	170bp	NM214400 ^b
	5`-CTC TAT GGC CTG GGT GAT GG-3`	(251-420)	
p α_{2A} ^c	5`-ATC ATT GCC GTG TTC ACA AGC-3`	455bp	NM214400 ^b
	5`-AAG AAG GAG CCG ATG CAA GAC-3`	(163-617)	
p α_{2B}	5`-AAC TGG CCA CTG CTG GAG AG-3`	179bp	NM001037148 ^b
	5`-TTC AGC CTC CTC CTC TGG TG-3`	(681-859)	
b α_{2C}	5`-CCA ACG AGC TCA TGG CCT AC-3`	220bp	AJ488281 ^b
	5`-GAG ATG ACG GCC GAG ATG AG-3`	(85-304)	
pGAPDH ^a	5`-CAA ATT CCA CGG CAC AGT CA-3`	244bp	AF017079 ^b
	5`-CAT GCC CAT CAC AAA CAT GG-3`	(156-399)	
pGAPDH ^c	5`-GTC AAG GCT GAG AAT GGG-3`	383bp	AF017079 ^b
	5`-GTC TTC TGG GTG GCA GTG ATG-3`	(513-895)	

^aPrimer für RTQ-PCR, ^bPrimer erstellt mit Hilfe der Nukleotidsequenzen (GenBank), ^cPrimer für RT-PCR.

2.1.2. Apparative Ausstattung

Präparierbesteck: Scheren und Pinzetten verschiedener Größen aus rostfreiem Stahl waren von Carl Teufel, Deutschland.

Pipetten: DISCOVERY-Einkanalpipetten in den Volumenbereichen 0.2 bis 5000 μ l mit unsterilen Einmalspitzen (Abimed, Deutschland) und sterilen, DNase-/RNase-freien Filterspitzen (Carl Roth, Deutschland).

Organbäder und zugehörige Messtechnik: Die Einkammerbäder (TSE, Deutschland) bestehen aus Glas und haben ein Organbadvolumen von 20 ml. Die Apparatur besitzt getrennte Zu- und Abläufe für die Nähr- und Pufferlösung bzw. das Wasserumlaufsystem. Im äußeren Mantel zirkuliert permanent auf 37 °C temperiertes Wasser, welches die Nähr- und Pufferlösung im inneren Kreislauf konstant auf 37 °C erwärmt. Das Organbad ist mit einem oder zwei Organhaltern bestückt, welche gleichzeitig den Zulauf und die Fritte für die Begasung der Nähr- und Pufferlösung haben. Die Fixierung der Organpräparate erfolgte mit Organhäkchen (L-förmig mit Durchmesser $d = 0.15$ oder triangel förmig $d = 0.3$ mm, Edelstahl, Eigenanfertigung) und Faden („Mersilene[®] EH 451“, Ethicon, Deutschland). Zur Messtechnik gehörten die elektromechanischen Druckwandler (Transducer) „TF6V5“ (Fleck, Deutschland), Verstärker „Tranducer Coupler 4711“ (TSE, Deutschland) und Vierkanal- x/t -Kompensationsschreiber „Kompensograph C1016“ (Siemens, Deutschland).

Mischen, Trennen, Wägen und Zerkleinern: Ultraschallbad „Bandelin Sonorex TK52“, Reagenzglasschüttler „IKA LabDancer“ (Carl Roth, Deutschland), Tischzentrifuge „Mikro 20“ (Hettich, Deutschland), Analysenwaage XS205 DualRange (Mettler Toledo, Deutschland) und Kugelmühle „Mikro-Dismembrator[®]U“ (B. Braun, Deutschland).

Molekularbiologie und Biochemie: Thermocycler „Stratagene[®] Robocycler Gradient 40“ (Stratagene, Niederlande), Elektrophoresekammer „Midi 105 x 110 mm“ (C.B.S. Scientific, USA) mit Spannungsquelle bis 150 V (VWR, Deutschland). Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. B. Kleuser (FU Berlin, Deutschland) erfolgte die Nutzung folgender Geräte: Geldokumentationssystem „Biometra[®] BioDocAnalyze[®]“ und UV-Vis-Photometer „Biometra[®] GeneRay[®]“ (beides Whatman Biometra, Deutschland).

2.2. Tiere

Lungen, Herzen und Gehirn von Schweinen (*Sus scrofa*) beiderlei Geschlechts wurden von der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung, Teltow-Ruhlsdorf, Deutschland bzw. vom Institut für Tierernährung der FU Berlin, Berlin-Dahlem, Deutschland bezogen. Die Tiere hatten entweder ein Gewicht von 100 bis 120 kg (Schlachtschweine, Alter: ca. 165 d) oder 15 bis 35 kg (Absetzferkel (Läuferschweine), Alter: ca. 40 bis 100 d). Die Organe wurden in eisgekühlter und mit Carbogen (5 % CO₂ in O₂) gesättigter Krebs-Henseleit-Lösung transportiert.

Männliche Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*, 280 bis 420 g) wurden von der DIMED Schönwalde GmbH, Deutschland gekauft. Die Tiere wurden in einem voll klimatisierten Tierstall bei 19 bis 25

°C und ca. 60 % Luftfeuchte gehalten. Sie erhielten Wasser und ein Standardfutter *ad libitum*. Die Tötung erfolgte durch Dekaptieren nach Betäubung mit Kohlenstoffdioxid (CO₂). Nach dem Entbluten wurde die thorakale Aorta (*Aorta thoracalis*) und die Schwanzarterie (*Arteria caudalis*) entnommen.

2.3. Methoden

2.3.1. Experimente an isolierten Tierorganen (Organbadstudien)

2.3.1.1. Allgemeine Versuchsdurchführung

Die aus den Tierorganen (Schweinelunge, Schweineherz) bzw. den Tieren (Ratten) entnommenen Blutgefäße wurden in mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllte Präparierschalen überführt, vom anhaftenden Fett und umgebenden Gewebe befreit und vor dem Experiment in Ringe geschnitten. Die Nähr- und Pufferlösung entsprach der im Experiment verwendeten Zusammensetzung und wurde kontinuierlich mit Carbogen (5 % CO₂ in O₂) gesättigt. Die so erhaltenen Geweberinge wurden jeweils horizontal auf zwei Organhäkchen aufgezogen und in einzelne Organbäder eingebracht. Die Organbäder enthielten auf 37 °C temperierte und permanent begaste (Carbogen) Pufferlösung. Das untere Häkchen war mittels einer Fadenschlaufe fest mit dem Organhalter fixiert, wohingegen das obere Häkchen über Faden und Fixierungshäkchen mit dem elektromechanischen Druckwandler (Transducer) verbunden war. Zu Beginn des Experiments wurden die Organpräparate vorgespannt. In der folgenden Stabilisierungsphase (45 bis 90 min) wurde jeweils nach 30 min für 3 min gespült und im Anschluss die Ruhespannung durch Justierung am elektromechanischen Druckwandler wieder eingestellt. Durch 2 bis 5 submaximale Kontraktionen wurden die Gewebe anschließend vorstimuliert (Äquilibrationsphase). Nach jeder Vorstimulation erfolgte eine Spülung (5 bis 10 min) bis die Basallinie wieder erreicht wurde. Je nach Versuchsdesign wurden 1 bis 2 kumulative oder nicht-kumulative $E/[A]$ -Kurven für einen Test- oder Referenzagonisten aufgenommen. Bei Verwendung der kumulativen Technik wurde die Agonistenkonzentration kontinuierlich in halblogarithmischen Schritten erhöht. Beginnend mit der niedrigsten Konzentration wurde nach Erreichen des Plateaufeffekts die nächst höhere Konzentration appliziert und der Vorgang wiederholt, bis der Maximaleffekt erreicht war. Die nichtkumulative Technik („*single point*“-Technik) fand nur bei Versuchen am Serotonin 5-HT_{2B}-Rezeptor Verwendung. Es ist bekannt, dass bestimmte Gewebe nur einmalig adäquat auf die Zugabe einer Konzentration eines Ergolins reagieren und die Anwendung der kumulativen Technik sich somit ausschließt (Müller-Schweinitzer, 1990). Sollte die Affinität von Antagonisten oder Partialagonisten bestimmt werden, wurden diese 60 bis 120 min vor Zugabe des Test-

oder Referenzagonisten vorinkubiert. In allen funktionellen Organbadstudien wurden Änderungen der Kontraktionskraft isometrisch gemessen und aufgezeichnet. Dafür stand eine Apparatur, bestehend aus elektromechanischen Druckwandlern (Transducer TF6V5), Verstärkern (Transducer Couplern TSE 4711) und Schreibern (Siemens C 1016 compensograph) zur Verfügung.

2.3.1.2. α_{1A} -Adrenozeptoren (Rattenschwanzarterie)

Die Durchführung der Experimente an der Rattenschwanzarterie zur Charakterisierung kontraktile α_{1A} -Adrenozeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte erfolgte weitestgehend wie bereits von Jähnichen *et al.* (2004) beschrieben. Die isolierte Rattenschwanzarterie wurde in modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) präpariert und vom Endothel durch Einführen eines Edelstahldrahtes ($d = 0.3$ mm) in das innere Gefäßlumen befreit. Die aus der Arterie präparierten zylinderförmigen Ringe ($l = 3$ bis 5 mm, 20 Stück) wurden auf Organhäkchen (L-förmig, $d = 0.15$ mm) aufgezogen und in ein mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) gefülltes Organbad ohne Fixierung gehängt. Nach Protektion mit B8805-033 (3 μM , 20 min, selektiver α_{1A} -Adrenozeptorantagonist) erfolgte durch weitere Zugabe von Chloroethylclonidin (100 μM , 30 min) die irreversible Alkylierung der α_{1B} -Adrenozeptoren. Im Anschluss wurden die Ringe mit Nährlösung gespült (15 min), in separate Organbäder überführt und mit einer Vorlast von 7.5 mN gespannt. Während der Stabilisierungsphase (45 min) wurde die Pufferlösung nach 30 min erneuert (3 min Spülzeit) und die Ruhespannung (7.5 mN) nach 15 und 30 min wiederhergestellt. Es folgte eine Äquilibrationsphase (100 min), in der die Gefäße viermal mit Noradrenalin (1 μM) submaximal kontrahiert wurden. Nach jeder Kontraktion wurde für 5 min gespült. Arterielle Ringe mit ungenügender Kontraktionskraft (< 2 mN) wurden verworfen. Im Anschluss an die erste kumulative $E/[A]$ -Kurve (0.01 bis 100 μM) für Noradrenalin wurde nach einer Inkubationszeit von 60 min eine zweite kumulative $E/[A]$ -Kurve (0.01 μM bis 1 mM) für Noradrenalin in Abwesenheit oder Anwesenheit eines Testantagonisten aufgezeichnet. Die Nähr- und Pufferlösung enthielt permanent: Cocain (30 μM), Corticosteron (30 μM), Idazoxan (0.1 μM), Propranolol (1 μM) und Methysergid (1 μM), um die neuronale und extraneuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin zu hemmen und α_2 -Adrenozeptoren, β -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A} -Rezeptoren zu blockieren. Die kontraktile Effekte (zweite $E/[A]$ -Kurve) wurden prozentual auf den Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin (erste $E/[A]$ -Kurve) bezogen.

2.3.1.3. α_{1B} -Adrenozeptoren (Rattenschwanzarterie)

Die Durchführung der Experimente an der Rattenschwanzarterie zur Charakterisierung kontraktile α_{1B} -Adrenozeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte erfolgte weitestgehend

wie bereits von Jähnichen *et al.* (2004) beschrieben. Die isolierte Rattenschwanzarterie wurde in modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) präpariert und vom Endothel durch Einführen eines Edelstahldrahtes ($d = 0.3$ mm) in das innere Gefäßlumen befreit. Die aus der Arterie präparierten zylinderförmigen Ringe ($l = 3$ bis 5 mm, 20 Stück) wurden auf Organhäkchen (L-förmig, $d = 0.15$ mm) aufgezogen, in separate, mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) gefüllte, Organbäder überführt, fixiert und auf 7.5 mN vorgespannt. Während der Stabilisierungsphase (45 min) wurde die Pufferlösung nach 30 min erneuert (3 min Spülzeit) und die Ruhespannung (7.5 mN) nach 15 und 30 min wiederhergestellt. Es folgte eine Äquilibrationsphase (100 min), in der die Gefäße viermal mit Noradrenalin ($1 \mu\text{M}$) submaximal kontrahiert wurden. Nach jeder Kontraktion wurde für 5 min gespült. Arterielle Ringe mit ungenügender Kontraktionskraft (< 2 mN) wurden verworfen. Im Anschluss an die erste kumulative $E/[A]$ -Kurve (0.01 bis $30 \mu\text{M}$) für Noradrenalin wurde nach einer Inkubationszeit von 60 min eine zweite kumulative $E/[A]$ -Kurve (0.01 bis $300 \mu\text{M}$) für Noradrenalin in Abwesenheit oder Anwesenheit eines Testantagonisten aufgezeichnet. Die Nähr- und Pufferlösung enthielt permanent: Cocain ($30 \mu\text{M}$), Corticosteron ($30 \mu\text{M}$), B8805-033 ($3 \mu\text{M}$), Idazoxan ($0.1 \mu\text{M}$), Propranolol ($1 \mu\text{M}$) und Methysergid ($1 \mu\text{M}$), um die neuronale und extraneuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin zu hemmen und α_{1A} -Adrenozeptoren, α_2 -Adrenozeptoren, β -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A} -Rezeptoren zu blockieren. Die kontraktile Effekte (zweite $E/[A]$ -Kurve) wurden prozentual auf den Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin (erste $E/[A]$ -Kurve) bezogen.

2.3.1.4. α_{1D} -Adrenozeptoren (Rattenaorta)

Die Durchführung der Experimente an der Rattenaorta zur Charakterisierung kontraktile α_{1D} -Adrenozeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte erfolgte wie bereits von Schöning *et al.* (2001) beschrieben. Die entnommene thorakale Aorta wurde in Carbogen gesättigter modifizierter Krebs-Henseleit (Lösung C) präpariert und in Ringe geschnitten ($l = 3$ bis 4 mm, 4 bis 6 Ringe), bei denen das Endothel durch Einführen einer Pinzette in das innere Ringlumen und vorsichtiges Rollen mechanisch entfernt wurde. Die Ringe wurden auf Organhäkchen (triangelförmig, $d = 0.3$ mm) aufgezogen, in separate, mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung C) gefüllte, Organbäder überführt, fixiert und auf 10 mN vorgespannt. Während der Stabilisierungsphase (45 min) wurde die Pufferlösung nach 30 min erneuert (3 min Spülzeit) und die Ruhespannung (10 mN) nach 15 und 30 min wiederhergestellt. Während der Äquilibrationsphase (180 min) wurden die Arterienringe dreimal mit Noradrenalin ($0.3 \mu\text{M}$) kontrahiert und nach dem Erreichen des Plateaufektes folgte jeweils eine Spülung (10 min) mit Nähr- und Pufferlösung. Im Anschluss an die erste kumulative $E/[A]$ -Kurve (1 nM bis $3 \mu\text{M}$) für Noradrenalin wurde nach einer Inkubationszeit von

60 min eine zweite kumulative $E/[A]$ -Kurve (1 nM bis 100 μM) für Noradrenalin in Abwesenheit oder Anwesenheit eines Testantagonisten aufgezeichnet. Die Nähr- und Pufferlösung enthielt permanent: Cocain (10 μM), Corticosteron (30 μM), Yohimbin (0.1 μM), Propranolol (1 μM) und LY53857 (3 μM), um die neuronale und extraneuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin zu hemmen und α_2 -Adrenozeptoren, β -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren zu blockieren. Die kontraktile Effekte (zweite $E/[A]$ -Kurve) wurden prozentual auf den Maximaleffekt des Kontrollagonisten Noradrenalin (erste $E/[A]$ -Kurve) bezogen.

2.3.1.5. α_{2C} -Adrenozeptoren (Schweinepulmonalvene)

Standardexperimente: Die aus der Lunge von Schlachtschweinen entnommenen Pulmonalvenen (*Venae pulmonales*) zweiter bis vierter Ordnung wurden in modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) präpariert und bei 4 °C bis zum nächsten Tag in vorher mit Carbogen gesättigter Nähr- und Pufferlösung gelagert. Um die α_{2C} -Adrenozeptor-vermittelten, kontraktile Effekte an den Pulmonalvenen zu bestimmen, wurden die Gefäße in Ringsegmente ($l = 3$ mm, 24 Stück) geschnitten, anschließend auf Häkchen ($d = 0.3$ mm, triangelförmig) aufgezogen, in separaten, mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) gefüllten, Organbädern fixiert und mit 10 mN vorgespannt. Der Stabilisierungsphase (90 min, mit Spülung alle 30 min) folgte die Äquilibrationsphase (180 min), in der die Gefäße einmal mit KCl (45 mM) und anschließend viermal mit UK14304 (0.3 μM ; selektiver α_2 -Adrenozeptoragonist; Cambridge, 1981) kontrahiert wurden. Jeder Kontraktion folgte eine Spülung (8 min) bis die Basallinie wieder erreicht war. Die Ruhespannung von 10 mN wurde erneut eingestellt und blieb nach der dritten Kontraktion mit UK14304 unverändert. Eine kumulative $E/[A]$ -Kurve (0.3 nM bis 100 μM) für UK14304 oder einen Testagonisten in Abwesenheit oder Anwesenheit eines Antagonisten (30 bis 120 min Inkubation) wurde aufgenommen. Isometrische Änderungen der Kontraktionskraft der Organe wurden dabei aufgezeichnet. Die kontraktile Effekte ($E/[A]$ -Kurve) wurden prozentual auf die vierte UK14304 (0.3 μM)-induzierte Kontraktion bezogen.

Versuche mit intaktem und ohne Endothel: In einem Set von Vorexperimenten wurde überprüft, ob mechanisches Entfernen des Endothels einen Einfluss auf die Kontraktilität der pulmonalen Gefäßringe hat. Dazu wurde Zahnseide (Oral-B®, Superfloss) durch das innere Lumen von Venensegmenten (ca. 2 bis 3 cm) geführt und 3 bis 4 Mal vorsichtig durchgezogen. Das Ausbleiben der durch Carbachol (10 μM) induzierbaren Vasorelaxation im Maximum der dritten Kontraktion mit UK14304 (0.3 μM) diente als Nachweis für die quantitative Entfernung des Endothels. Die unter diesen Bedingungen aufgenommenen kumulativen $E/[A]$ -Kurven für UK14304 waren kongruent zu

kumulativen $E/[A]$ -Kurven für UK14304 an Gefäßen mit intaktem Endothel (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde auf die mechanische Entfernung des Endothels für die sich anschließenden Experimente verzichtet.

Agonistenexperimente: Eine vergleichende Beurteilung kontraktiver Effekte (*potency* und *efficacy*) vermittelt durch α -Adrenozeptoragonisten (Noradrenalin, Phenylephrin, UK14304 und Clonidin) an der Schweinepulmonalvene erfolgte durch Aufnahme kumulativer $E/[A]$ -Kurven (0.3 nM bis 100 μ M) nach einer Inkubationszeit von 30 min. Während der Agonistenexperimente enthielt die Nähr- und Pufferlösung zusätzlich Cocain (10 μ M) und Propranolol (1 μ M), um die neuronale Wiederaufnahme zu hemmen und β -Adrenozeptoren zu blockieren.

Antagonistenexperimente: Zur funktionellen Charakterisierung des α_2 -Adrenozeptorsubtyps, der die UK14304 induzierte Gefäßkontraktion bewirkt, wurden verschiedene, relativ selektive α -Adrenozeptor Antagonisten verwendet und 60 min (ARC239, BRL44408, WB4101, Prazosin, Yohimbin und Rauwolscin) oder 120 min (MK912 und Rauwolscin 0.3, 1 nM) vor der Aufzeichnung der kumulativen $E/[A]$ -Kurve für UK14304 inkubiert. Ungeachtet der Inkubationszeit (60 oder 120 min) zeigten die UK14304 Kontrollkurven keinen Unterschied im E_{\max} und pEC_{50} -Wert. Während der Antagonistenexperimente wurde auf die Zugabe von Cocain und Propranolol verzichtet, da beide Substanzen keinen Einfluss auf die kumulativen $E/[A]$ -Kurven für UK14304 hatten (nicht gezeigt).

2.3.1.6. Serotonin 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Schweinekoronararterie)

Die Durchführung der Experimente an der Schweinekoronararterie zur Charakterisierung kontraktiver 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte erfolgte weitestgehend wie bereits von Cushing und Cohen (1993) beschrieben. Aus Schweineherzen wurden der absteigende Ast der linken Koronararterie (*Ramus interventricularis anterior*) und die rechte Koronararterie (*Arteria coronaria dextra*) entnommen und in modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung B) präpariert. Die Arterie wurde in Ringe (l = 2 bis 3 mm, 24 Stück) geschnitten und das Endothel durch vorsichtiges Rollen mittels einer in das Gefäßlumen eingeführten Pinzette entfernt. Die Arterienringe wurden auf Organhäkchen (d = 0.3 mm, triangelförmig) aufgezogen, in separate, mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung B) gefüllte, Organbäder überführt, fixiert und auf 20 mN vorgespannt. Während der Stabilisierungsphase (60 min) wurde die Pufferlösung nach 30 min erneuert (3 min Spülzeit) und die Ruhespannung (20 mN) nach 15 und 30 min wiederhergestellt. Es folgte eine Äquilibrationsphase (115 min), in der die Gefäße zweimal mit KCl (50 mM) submaximal kontrahiert wurden. Nach jeder Kontraktion wurde mit Nähr- und Pufferlösung gespült (5 bzw.

10 min). Das Ausbleiben der durch Bradykinin (0.1 μM) induzierbaren Vasorelaxation im Maximum der zweiten Kontraktion mit KCl (50 mM) diene als Nachweis für die quantitative Entfernung des Endothels. Eine kumulative $E/[A]$ -Kurve (0.01 bis 30 μM) für 5-HT wurde nach 60 oder 120 min Inkubation in Abwesenheit oder Anwesenheit eines Testantagonisten aufgenommen. Die Aufzeichnung der kumulativen $E/[A]$ -Kurve für Testagonisten erfolgte ebenfalls nach einer Ruhephase von 60 min, wobei zusätzlich eine kumulative $E/[A]$ -Kurve für den Testagonisten in Anwesenheit von Ketanserin (0.01 μM , selektiver 5-HT_{2A}-Antagonist) parallel aufgezeichnet wurde. Die Nähr- und Pufferlösung enthielt permanent: Indometacin (5 μM), Cocain (6 μM) und Prazosin (0.1 μM), um die Cyclooxygenase-induzierte Prostaglandinsynthese und die neuronale Wiederaufnahme von 5-HT zu hemmen und α_1 -Adrenozeptoren zu blockieren. Die kontraktile Effekte ($E/[A]$ -Kurve) wurden prozentual auf die zweite KCl (50 mM)-induzierte Kontraktion bezogen.

2.3.1.7. Serotonin 5-HT_{2B}-Rezeptoren (Schweinepulmonalarterie)

Die Durchführung der Experimente an der Schweinepulmonalarterie zur Charakterisierung relaxierender 5-HT_{2B}-Rezeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte erfolgte weitestgehend wie bereits von Glusa und Pertz (2000) beschrieben. Die aus der Lunge von Schlachtschweinen entnommenen Pulmonalarterien (*Arteria pulmonalis*) zweiter bis vierter Ordnung wurden in modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) präpariert und in Ringe (l = 2 bis 3mm, 24 Stück) geschnitten. Die Arterienringe wurden auf Organhäkchen (d = 0.3 mm, triangelförmig) aufgezogen, in separate, mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) gefüllte, Organbäder überführt, fixiert und auf 20 mN vorgespannt. Während der Stabilisierungsphase (60 min) wurde die Pufferlösung nach 30 min erneuert (3 min Spülzeit) und die Ruhespannung (20 mN) nach 15 und 30 min wiederhergestellt. Mit einem zeitlichen Abstand von jeweils 45 min wurden die Gefäße einmal mit KCl (30 mM) und dreimal mit PGF_{2 α} (3 μM) oder U46619 (0.01 μM) stimuliert, bis die Kontraktion konstant war. Durch Zugabe von Bradykinin (0.01 μM) in das Maximum der ersten und zweiten Kontraktion mit einem Prostaglandinderivat wurde die Integrität des Endothels (ca. 80 % Vasorelaxation) überprüft. Nach der dritten Kontraktion mit PGF_{2 α} oder U46619 wurde nach 60 oder 120 min Inkubation eine kumulative $E/[A]$ -Kurve (0.1 nM bis 3 μM) für 5-HT in Abwesenheit oder Anwesenheit eines Testantagonisten aufgezeichnet. Die Aufzeichnung der nichtkumulativen $E/[A]$ -Kurve („single point“-Technik) für Testagonisten (Ergoline) erfolgte bereits nach einer Ruhephase von 30 min, wobei zusätzlich eine nichtkumulative $E/[A]$ -Kurve für den Testagonisten in Anwesenheit von SB204741 (3 μM , selektiver 5-HT_{2B}-Antagonist) parallel aufgezeichnet wurde. Nach Erreichen des Maximaleffekts durch 5-HT oder durch das Ergolinderivat (Agonist), wurde jedes Or-

gan nach weiterer Zugabe von Bradykinin (0.01 μM) maximal relaxiert. Die Nähr- und Pufferlösung enthielt permanent: Ketanserin (0.1 oder 1 μM), um 5-HT_{2A}-Rezeptoren zu blockieren. Die relaxierenden Effekte ($E/[A]$ -Kurve) wurden prozentual auf die durch den Agonisten (5-HT oder Ergolinderivat) plus Bradykinin (0.01 μM)-induzierte, maximale Relaxation bezogen.

2.3.1.8. Serotonin 5-HT₇-Rezeptoren (Pulmonalarterie vom Absetzferkel (Läuferschwein))

Die Durchführung der Experimente an der Pulmonalarterie vom Absetzferkel (Läuferschwein) zur Charakterisierung relaxierender 5-HT₇-Rezeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte erfolgte weitestgehend wie bereits von Jähnichen *et al.* (2005b) beschrieben. Die aus der Lunge von Absetzferkeln (Läuferschweinen) entnommenen Pulmonalarterien (*Arteria pulmonalis*) zweiter bis vierter Ordnung wurden in modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) präpariert und das Endothel entfernt. Dazu wurde Zahnseide (Oral-B®, Superfloss) durch das innere Lumen eines Arteriensegments (ca. 2 bis 3 cm) geführt und 3 bis 4 Mal vorsichtig durchgezogen. Die Arterienringe wurden auf Organhäkchen (d = 0.3 mm, triangelförmig) aufgezogen, in separate, mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) gefüllte, Organbäder überführt, fixiert und auf 10 oder 20 mN vorgespannt. Bei Tieren mit einem Lebendgewicht unter 20 kg wurden die Arteriensegmente auf 10 mN vorgespannt. Während der Stabilisierungsphase (60 min) wurde die Pufferlösung nach 30 min erneuert (3 min Spülzeit) und die Ruhespannung (10 oder 20 mN) nach 15 und 30 min wiederhergestellt. Mit einem zeitlichen Abstand von jeweils 45 min wurden die Gefäße einmal mit KCl (30 mM) und dreimal mit PGF_{2 α} (1 μM) oder U46619 (3 nM) stimuliert bis die Kontraktion konstant war. Das Ausbleiben der durch Bradykinin (0.01 μM) induzierbaren Vasorelaxation im Maximum der ersten und zweiten Kontraktion mit einem Prostaglandinderivat diente als Nachweis für die quantitative Entfernung des Endothels. Nach der dritten Kontraktion mit PGF_{2 α} oder U46619 wurde eine kumulative $E/[A]$ -Kurve (1 nM bis 30 μM) für 5-CT nach 60 oder 120 min Inkubation in Abwesenheit oder Anwesenheit eines Testantagonisten aufgenommen. Die Nähr- und Pufferlösung enthielt permanent: Ketanserin (0.1 μM), um 5-HT_{2A}-Rezeptoren zu blockieren. Die kontraktiven Effekte ($E/[A]$ -Kurve) wurden prozentual auf die dritte PGF_{2 α} (1 μM)- bzw. U46619 (3 nM)-induzierte Kontraktion bezogen.

2.3.1.9. Inkubations- und Auswaschexperimente

In Abhängigkeit von der Zeit wurde die Assoziation und Dissoziation für Tergurid (0.01 μM) zum bzw. vom endothelialen 5-HT_{2B}-Rezeptor der Schweinepulmonalarterie untersucht. Die Organe wurden präpariert, äquilibriert und stimuliert wie im Kapitel 2.3.1.7. beschrieben. Für die Inkubationsexperimente wurde eine kumulative $E/[A]$ -Kurve (0.1 nM bis 3 μM) für 5-HT nach 5, 10, 20, 30

und 60 min jeweils in Abwesenheit und Anwesenheit von Tergurid (0.01 μM) aufgezeichnet. Bezüglich der Auswaschexperimente wurde Tergurid (0.01 μM) vor Beginn der Spülphasen für 30 min vorinkubiert. Im Anschluss an 0, 15, 30, 45 und 60 min diskontinuierlicher Spülung (7.5 min Rhythmus mit zwischengeschalteter 5 min Ruhephase) mit Nähr- und Pufferlösung erfolgte nach Zugabe von Ketanserin (0.1 μM , 5 min Inkubation) und U46619 (0.01 μM) die Aufzeichnung einer kumulativen $E/[A]$ -Kurve (0.1 nM bis 3 μM) für 5-HT. Jeder Spülphase entsprechend wurde eine Kontrollkurve (ohne Terguridzugabe) für 5-HT aufgenommen.

2.3.2. Biochemische Methoden

2.3.2.1. [^{35}S]GTP γ S-Bindungs-Assay

Die [^{35}S]GTP γ S-Bindungs-Assays wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Hübner (Friedrich Alexander Universität, Erlangen) übernommen und, wie bereits durch Schlotter *et al.* (2005) beschrieben, durchgeführt.

Membranen von CHO-Zellen, die rekombinant humane (h) D_{2SHORT(S)}- oder hD_{2LONG(L)}-Rezeptoren stabil exprimieren, wurden, wie bereits in der Literatur beschrieben, präpariert (Hübner *et al.*, 2000). Die Rezeptordichte in den Membranen betrug $B_{\text{max}} = 1.44 \text{ pmol}/\mu\text{g}$ und $1.11 \text{ pmol}/\mu\text{g}$ für hD_{2S}- bzw. hD_{2L}-Rezeptoren. Die Homogenate wurden mit HEPES-Puffer (20 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl; pH 7.4) verdünnt und bei 37 °C mit Guanosindiphosphat (GDP, 1 μM in HEPES-Puffer) und der Testsubstanz (in HEPES-Puffer versetzt mit 0.1 mM Dithiothreitol) in einem Endvolumen von 200 μl in einer 96-Well Mikrotiterplatte inkubiert. Die Testsubstanzen wurden in Hexaduplikaten in Konzentrationen von 0.01 nM bis 100 μM untersucht. Nach 30 min wurde 0.1 nM [^{35}S]GTP γ S (spezifische Aktivität 1250 Ci/mmol, PerkinElmer) hinzupipettiert und für weitere 30 min inkubiert. Mit der raschen Filtration, unter Verwendung eines automatischen Cell-Harvester (Zellsammler), durch einen GF/B-Filter war das Experiment terminiert. Die Filter wurden fünfmal mit eiskaltem Puffer (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) gewaschen, 180 min bei 60 °C getrocknet und im Anschluss die Radioaktivität mit einem Mikroplattenszintillator gemessen. In allen Experimenten lag die mit 100 μM Quinpirol maximal induzierbare Stimulation ca. 35 % über der Basalaktivität. Die für jede Substanz aus den jeweiligen Experimenten ermittelten [^{35}S]GTP γ S-Bindungsdaten wurden auf den respektiven Maximaleffekt von Quinpirol normiert.

2.3.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.3.1. RNA-Isolierung

Pulmonalvenen (*Venae pulmonales*) zweiter bis vierter Ordnung und Teile der Großhirnrinde (*Cortex cerebri*) vom Schwein wurden präpariert. Die Großhirnrinde diente für die Kontrollexperimente, da das Vorkommen der drei α_2 -Adrenozeptorsubtypen im zentralen Nervensystem bereits berichtet wurde (Wikberg-Matsson *et al.*, 1995; Saunders und Limbird, 1999). Bis zur Verarbeitung lagerten die Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Isolierung der Gesamt-RNA (RNA) erfolgte mit dem RNAgents® Total RNA Isolation System nach dem Verfahren von Chomczynski und Sacchi (1987). Die gefrorenen Gewebe (ca. 50 mg) wurden zusammen mit einer Wolframcarbidkugel ($d = 5\text{ mm}$) und Guanidinthiocyanat-Denaturierungslösung in ein Kryoröhrchen ($V = 2\text{ ml}$) gegeben und mit dem Mikro-Dismembrator®U homogenisiert. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Natriumacetatlösung und phenolgesättigtem Chloroform wurde inkubiert (15 min) und danach für 10 min bei $10000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Durch vorsichtiges Abpipettieren der oberen wässrigen Phase konnte die RNA von der genomischen DNA und den Proteinen abgetrennt werden. Das gleiche Volumen an Isopropanol wurde zur wässrigen Phase hinzugegeben und die RNA gefällt (mindestens 30 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der anschließenden Zentrifugation (10 min bei $10000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) folgte das Waschen der RNA mit Ethanol (1 ml, 75 % V/V, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und die Resuspendierung in Wasser (40 μl). Eventuell noch vorhandene genomische DNA wurde durch zwei weitere Aufreinigungsschritte entfernt. Für die DNase Behandlung wurde die Probe mit 10 μl Mastermix (5 μl Puffer, 2 μl DNase, 2 μl Wasser und 1 μl RNasin) versetzt, in den Robocycler gestellt (30 min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) und im Anschluss chromatographisch über Säulen (GeneMATRIX UNIVERSAL RNA Purification Kit) aufgereinigt. Nach erneuter Resuspendierung in Wasser (50 μl), wurde die RNA UV-photometrisch bei 260 nm quantifiziert.

2.3.3.2. Reverse Transkription (RT)

Die RT wurde nach dem Protokoll von Promega (M-MLV Reverse Transkriptase) durchgeführt. Mit einem Denaturierungsschritt (5 min, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden Sekundärstrukturen der eingesetzten RNA (2 μg) vor der cDNA Synthese geschmolzen. In der Abkühlphase lagerten sich die Random-Hexamere (Primer) an die RNA an. Die anschließende Synthese der cDNA erfolgte unter Zugabe des RT-Puffers (50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl_2 ; 10 mM Dithiothreitol), der dNTPs (0.5 mM), RNasin® (25 u) und der Reversen Transkriptase (M-MLV, 200 u) in einem Gesamtvolumen von 25 μl für 60 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Robocycler. Für jede RNA Probe wurde parallel ein weiterer Ansatz bereitet, bei dem das Enzym Reverse Transkriptase weggelassen wurde (Negativkontrolle).

2.3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung von 2 µl synthetisierter cDNA (siehe Kapitel 2.3.3.2.) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter Zugabe des AmpliBuffer B (1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.01 % Triton X-100), der dNTPs (0.2 mM), der Taq-DNA-Polymerase (1.25 u) und je 1 µM der spezifischen Sense- und Antisense-Primer (siehe Kapitel 2.1.1.4.). Der Robocycler wurde vorgeheizt und die Amplifikation verlief nach folgenden Schritten: initiale Denaturierung (5 min, 95 °C), 40 Amplifikationszyklen (Denaturierungsphase: 1 min, 95 °C; Annealingphase: 1 min, 55 °C; Synthesephase: 1.5 min, 72 °C) und finale Synthesephase (7 min, 72 °C).

2.3.3.4. Elektrophorese

Die PCR-Amplifikate (je 7 µl) wurden in das Agarosegel (2 %) pipettiert und bei konstanter Spannung (100 V) elektrophoretisch getrennt. Der TAE-Puffer (Laufpuffer) und das Agarosegel enthielten Ethidiumbromid (0.3 µg/ml). Nach der Trennung wurde das Gel mit Wasser abgespült und unter Fluoreszenzanregung (302 nm) fotografiert.

2.3.3.5. Real-Time-quantitative-Polymerase Kettenreaktion (RTQ-PCR)

Die Durchführung der RTQ-PCR Experimente wurde freundlicherweise von Herrn Dr. H. von Wenckstern (FU Berlin) übernommen.

Für die Quantifizierungsexperimente wurden cDNA aus Schweinepulmonalvenen (siehe Kapitel 2.3.3.1. und 2.3.3.2.) sowie spezifische Sense- und Antisenseprimer (siehe Kapitel 2.1.1.4.) und der SYBR[®] Green PCR Mastermix Kit verwendet. Die Durchführung der Experimente erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die RTQ-PCR wurde in 10 µl Reaktionsansätzen (0.25 µM Primer, 1xSYBR Green Master Mix) mit je 2 µl cDNA (äquivalent zu 10 ng RNA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: initiale Denaturierung (10 min, 95 °C), 40 Amplifikationszyklen (Denaturierungsphase: 15 s, 95 °C; Annealing- und Synthesephase: 1 min, 60 °C). Nach jeder Reaktion wurde abschließend eine Dissoziationskurve zur Analyse von möglichen Primerdimeren durchgeführt.

2.4. Datenanalyse und Statistik

2.4.1. Pharmakologische Parameter

Die Verwendung der Symbole, Parameter und Begriffe erfolgte in Anlehnung an die Empfehlung des Komitees für Rezeptornomenklatur und Wirkstoffklassifizierung der IUPHAR (Jenkinson *et al.*, 1995; Neubig *et al.*, 2003; Kenakin, 2006).

Allgemeine Definitionen:

$c_x, [X]$	Stoffmengenkonzentration der Substanz X.
$\log x$	Dekatischer Logarithmus ($= \log_{10}x = \lg x$).
Agonist, A	Eine Substanz, die an einen Rezeptor bindet, dadurch dessen Zustand verändert und folglich einen biologischen Effekt hervorruft. Für gewöhnlich erhöhen Agonisten die Rezeptoraktivität.
Antagonist, B	Eine Substanz, die an einen Rezeptor bindet und die agonistische Aktivität einer anderen Substanz vermindert oder aufhebt.
Allosterischer Modulator	Eine Substanz, die die Aktivität eines Agonisten erhöhen oder mindern kann, wobei Agonist und allosterischer Modulator verschiedene Bindungsstellen am Rezeptor haben.
Affinität (<i>Affinity</i>)	Maß für die Bindungsstärke (Assoziation) einer Substanz an einen Rezeptor. Die Assoziationskonstante entspricht dem Reziproken der Rezeptor-Dissoziationskonstante.
Wirksamkeit (<i>Efficacy</i> , e_A)	Entspricht der Fähigkeit von Agonisten nach Bindung an einen Rezeptor, diesen so zu verändern (Konformationsänderung), dass dadurch ein zellulärer Effekt bzw. eine zelluläre Reaktion hervorgerufen wird. In der experimentellen Pharmakologie äußern sich Unterschiede in der Wirksamkeit darin, dass verschiedene Agonisten bei gleicher relativer Rezeptorbesetzung unterschiedlich ausgeprägte Effekte erzielen. Die Wirksamkeit an sich ist somit vom Agonisten selbst und vom untersuchten Gewebe abhängig. Das Produkt aus e_A und dem Anteil der besetzten Rezeptoren (p_{AR}) resultiert im „Stimulus S_A “ ($S_A = e_A p_{AR}$, Stephenson, 1956). Nach Furchgott (1966) entspricht der Term „ <i>intrinsic efficacy</i> (ϵ) dem Anteil an Stimulus, der vom Agonisten über den einzelnen Rezeptor vermittelt wird, mit $e_A = \epsilon[R_t]$. $[R_t]$ ist die Gesamtrezeptoranzahl und ϵ der agonistenabhängige Anteil an der Wirksamkeit (Furchgott, 1966).

Potenz
(*Agonist potency*)

Maß für die Aktivität eines Agonisten A . Sie entspricht einer Stoffmengenkonzentration, die notwendig ist, um einen bestimmten Effekt zu erreichen. Die Potenz ist von der Affinität und der Wirksamkeit der Verbindung abhängig.

Agonisten und Partialagonisten:

EC_{50} , $[A]_{50}$
 pEC_{50} , $p[A]_{50}$

Stoffmengenkonzentration (bzw. der negative dekadische Logarithmus der Stoffmengenkonzentration), die den halbmaximalen Effekt eines Agonisten A hervorruft.

E_{\max}

Maximal beobachteter Effekt eines Agonisten A in einem bestimmten Präparat unter den jeweiligen Bedingungen.

α

Verhältnis zwischen den E_{\max} eines Testagonisten und eines vollen Referenzagonisten am selben (oder gleichen) Präparat unter gleichen Bedingungen. Wird auch als „intrinsische Aktivität“ bezeichnet (Kenakin, 2006).

$$\alpha = \frac{E_{\max}(A_{\text{Test}})}{E_{\max}(A_{\text{Ref}})} \quad [1]$$

K_p , pK_p

Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (bzw. der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante) des Partialagonisten P -Rezeptor-Komplex.

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante lässt sich aus zwei verschiedenen funktionellen Experimenten bestimmen:

Methode A:

Äquieffektive Konzentrationen zwischen vollem Referenzagonisten A und Partialagonisten P werden verglichen. Nach der klassischen Rezeptortheorie gilt folgender Zusammenhang, der einer Geradengleichung entspricht (Kenakin, 1993; Abbildung 10):

$$[A] = \frac{K_P}{\left(\frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A}\right) - 1} \cdot \frac{[A]}{[P]} + \frac{K_A}{\left(\frac{\varepsilon_A}{\varepsilon_P}\right) - 1} \quad [2]$$

$$[A] = m \cdot \frac{[A]}{[P]} + b, \quad [3]$$

mit K_A als Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des vollen Referenzagonisten A , ε_A bzw. ε_P als „*intrinsic efficacies*“ von Referenz- bzw. Partialagonist, m ist die Steigung und b der Ordinatenschnittpunkt der Gerade. K_P wird wie folgt berechnet:

$$K_P = m \cdot \left(\frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A} - 1 \right). \quad [4]$$

Unter der Voraussetzung $\varepsilon_A \gg \varepsilon_P$, was für schwache Partialagonisten zutrifft, ergibt sich K_P :

$$K_P = -m. \quad [5]$$

K_P entspricht der negativen Steigung der Ausgleichsgeraden im $[A] / ([A] / [P])$ -Diagramm (Abbildung 10).

Für Partialagonisten mit $\alpha \ll 1$ ist deren pEC_{50} -Wert eine zuverlässige Näherung für den respektiven pK_P -Wert.

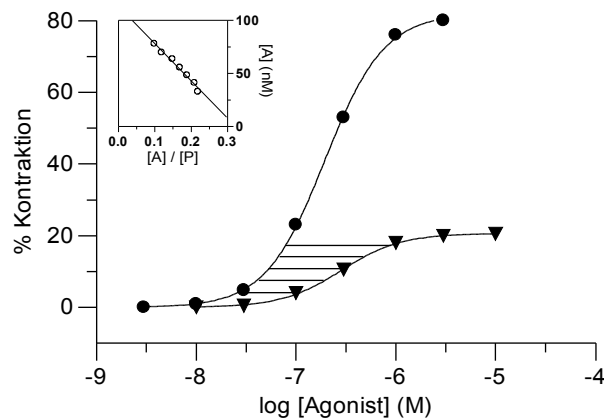


Abbildung 10: Bestimmung des K_P -Wertes eines Partialagonisten P aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven eines Referenzagonisten A (●) und des Partialagonisten P (▼).

Methode B:

Äquieffektive Konzentrationen des vollen Referenzagonisten A in Abwesenheit und Anwesenheit des Partialagonisten P , der als Antagonist fungiert, werden verglichen. Nach der klassischen Rezeptortheorie gilt folgender Zusammenhang, der einer Geradengleichung entspricht (Marano und Kaumann, 1976; Abbildung 11):

$$[A] = \frac{1}{1 + \left(1 - \frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A}\right) \cdot \frac{[P]}{K_P}} \cdot [A]^* + \frac{\frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A} \cdot \frac{[P]}{K_P} \cdot K_A}{1 + \left(1 - \frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A}\right) \cdot \frac{[P]}{K_P}} \quad [6]$$

$$[A] = m \cdot [A]^* + b \quad , \quad [7]$$

mit $[A]$ und $[A]^*$ als äquieffektive Konzentrationen des Referenzagonisten A in Abwesenheit und Anwesenheit des Partialagonisten P , K_A als Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Referenzagonisten, ε_A bzw. ε_P als „*intrinsic efficacies*“ von Referenz- bzw. Partialagonist, m ist die Steigung und b der Ordinatenschnittpunkt der Gerade. K_P wird wie folgt berechnet:

$$K_P = \frac{[P] \cdot m}{1 - m} \cdot \left(1 - \frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A}\right) \quad . \quad [8]$$

Unter der Voraussetzung $\varepsilon_A \gg \varepsilon_P$, was für schwache Partialagonisten zutrifft, ergibt sich K_P :

$$K_P = \frac{[P] \cdot m}{1 - m} \quad , \quad [9]$$

wobei m die Steigung der gewichteten Ausgleichsgeraden im $[A] / [A]^*$ -Diagramm entspricht (Abbildung 11). Die Gewichte werden aus der Beziehung

$$w_i = ([A]^* + [A]_{50}^*)^{-4} \quad [10]$$

berechnet.

In der vorliegenden Arbeit wird die $E/[A]$ -Kurve des Referenzagonisten in Anwesenheit von P mittels Strahlensatz auf den Maximalwert des Referenzagonisten (in Abwesenheit von P) extrapoliert und abgebildet.

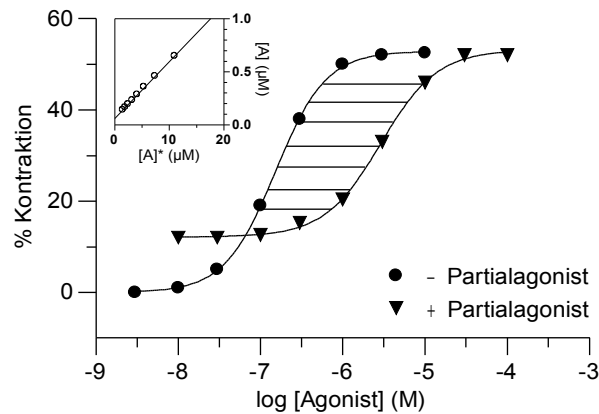


Abbildung 11: Bestimmung des K_p -Wertes eines Partialagonisten P aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven eines Referenzagonisten A in Ab- (●) bzw. Anwesenheit von P (▼).

Antagonisten:

r (Concentration ratio) Verhältnis der Agonistenkonzentrationen in Anwesenheit ($[A]^*$) und Abwesenheit ($[A]$) eines Antagonisten B , die zur Erzielung gleicher (üblicherweise halbmaximaler) Effekte notwendig sind.

$$r = \frac{[A]_{50}^*}{[A]_{50}} \quad [11]$$

pA_2 Negativ dekatischer Logarithmus der Stoffmengenkonzentration eines Antagonisten B , die es erforderlich macht, die Agonistenkonzentration zu verdoppeln, um den ursprünglichen Effekt in Abwesenheit des Antagonisten B zu erzielen. Der pA_2 -Wert ist ein Maß für die Affinität eines Antagonisten B zum Rezeptor, unabhängig wie der Antagonist B wirkt.

Vorzugsweise wird der pA_2 -Wert nach der Methode von Arunlakshana und Schild (1959) bestimmt. Liegen für einen Antagonisten B experimentelle Daten über einen größeren Konzentrationsbereich vor (idealerweise ≥ 2 Zehnerpotenzen), entspricht die Nullstelle der Ausgleichsgeraden im $\log(r-1) / \log[B]$ -Diagramm (Schild-Plot) dem pA_2 -Wert. Dazu muss der funktionale Zusammenhang auf Linearität geprüft werden. Ist die Steigung, der durch lineare Regression bestimmten Ausgleichsgerade

nicht signifikant von 1 verschieden und sind die Mindestanforderungen (parallele Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurven ohne Depression des Maximaleffektes) erfüllt, wird der pA_2 -Wert mittels einer Ausgleichsgeraden mit $m = 1$ berechnet. Der Antagonismus wird als kompetitiv eingestuft. Abgebildete Schild-Plots zeigen in der vorliegenden Arbeit die Ausgleichsgerade mit $m = 1$. Synonym wird auch der Begriff „voller pA_2 -Wert“ verwendet.

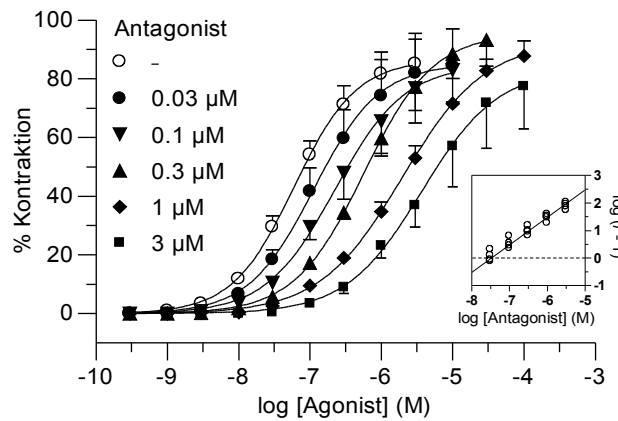


Abbildung 12: Bestimmung des pA_2 -wertes eines Antagonisten nach der Methode von Arunlakshana und Schild.

Vereinfacht kann die Wirksamkeit eines Antagonisten B als „scheinbarer pA_2 -Wert“ für eine einzelne Konzentration $[B]$ bestimmt werden (Furchgott, 1972):

$$pA_2 = -\log[B] + \log(r-1) \quad [12]$$

K_B, pK_B

Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (bzw. der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante) des Antagonist B -Rezeptor-Komplex.

Für kompetitive Antagonisten ist der mittels Schild-Analyse bestimmte pA_2 -Wert eine zuverlässige Näherung des pK_B -wertes. Auch der vom „scheinbaren pA_2 -Wert“ abgeleitete „scheinbare pK_B -Wert“ ist gebräuchlich.

In der vorliegenden Arbeit ist ein „scheinbarer pA_2 -Wert“ (siehe oben) als pA_2 -Wert und der nach der Methode von Arunlakshana und Schild (1959) berechnete pA_2 -Wert als pK_B -Wert des Antagonisten angegeben.

pD'_2 Der negative dekadische Logarithmus der Stoffmengenkonzentration eines Antagonisten B , die den Maximaleffekt eines Agonisten auf die Hälfte reduziert. Verglichen werden die Maximaleffekte eines Agonisten (E_{\max} bzw. E^*_{\max}) in Abwesenheit bzw. Anwesenheit eines Antagonisten. Die $E/[A]$ -Kurve ist in Anwesenheit des Antagonisten nicht oder minimal rechtsverschoben. Der Antagonismus wird als nicht-kompetitiv eingestuft und der pD'_2 -Wert mit folgender Gleichung berechnet (van Rossum, 1963):

$$pD'_2 = -\log[B] + \log \frac{E_{\max}}{E^*_{\max}} \quad [13]$$

2.4.2. Statistik

2.4.2.1. Datenpräsentation und Datenberechnung

Die Daten werden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für n Tiere oder Einzelerperimente im Text, in Tabellen und Diagrammen angegeben.

2.4.2.2. Nichtlineare Regression

Die experimentell gewonnenen Konzentrations-Wirkungsdaten wurden mit der Software GraphPad Prism[®] 4.0 (Graph-Pad Software, USA) ausgewertet. Die $E/[A]$ -Kurven wurden an eine „Vier-Parameter-Logistik-Funktion“ (Hill-Gleichung) nach der Methode der kleinsten Abstandsquadrate iterativ angepasst („*curve fitting*“) und die Steigung der Kurven (n_H , „Hill-Slope“) sowie deren E_{\max} und pEC_{50} -Werte berechnet. Für die Berechnung der $E/[A]$ -Kurven wurde der unterste Wert mit 0 % über Basallinie festgelegt. Nur für pK_P -Experimente nach Marano und Kaumann (1976) erfolgte die Bestimmung aller vier Parameter.

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + 10^{(-pEC_{50} - \log[A]) \cdot n_H}} \quad (\text{Hill-Gleichung}) \quad [14]$$

2.4.2.3. Lineare Regression und Korrelationsanalyse

Mit der Methode der kleinsten Abstandsquadrate wurde die Abhängigkeit der Variable (y) von der Variable (x) in einer linearen Regression berechnet. Die Steigung der Ausgleichsgerade wurde ermittelt und das Bestimmtheitsmaß r^2 diente als Beurteilung der Güte der Regression. Der Grad des

Zusammenhangs beider Variablen (x und y) wurde mittels einer Korrelationsanalyse ermittelt, wobei die Korrelation statistisch (F -Test) durch eine Steigung der Ausgleichsgerade, die von 0 verschieden war, aufgezeigt wurde.

2.4.2.4. Statistische Beurteilung

Auf Unterschiede zwischen entweder zwei oder mehreren Stichproben wurde mit Hilfe des t -Tests nach *Student* oder einfaktorieller Varianzanalyse (One-way-ANOVA) geprüft. Unterschiede galten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0.05$ als signifikant.

Prüfung auf Normalverteilung: Bereits durch Elz (1995) und Jähnichen (2005c) konnte eine Normalverteilung von pEC_{50} -, pK_B - und E_{max} -Werten in verschiedenen Experimenten an der Rattenschwanzarterie (α_{1A} , α_{1B} , 5-HT_{2A}), Rattenaorta (α_{1D}), Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}), Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B}) und der Läufer Schweinepulmonalarterie (5-HT₇) gezeigt werden. Normalverteilung der Messwerte aus Experimenten an der Schweinepulmonalvene (α_{2C}) wurde mit Hilfe des *D'Agostino-Pearson-K2-Omnibustests* verifiziert.

Tabelle 4: Exemplarische Prüfung der E_{max} - und pEC_{50} -Werte von UK14304 an der Schweinepulmonalvene auf Normalverteilung mit Hilfe des *D'Agostino-Pearson-K2-Omnibustests*.

Modell	Agonist	n	E_{max}	P	pEC_{50}	P
Schweinepulmonalvene (α_{2C})	UK14304	29	114 ± 5	0.65	7.24 ± 0.03	0.94

E_{max} von UK14304 in %, bezogen auf UK14304 (0.3 μ M).

Vergleich zweier Mittelwerte: Bei normalverteilten Stichproben, deren Varianzhomogenität mittels F -Test nach Fischer nachgewiesen wurde, erfolgte der Vergleich der Mittelwerte durch Anwendung des Zwei-Stichproben- t -Test (zweiseitig) für unabhängige Stichproben. Lag keine Varianzhomogenität vor (Fisher-Behrens-Problem), wurden die Mittelwerte mit dem nach Welch modifizierten t -Test verglichen.

Vergleich mehrerer Mittelwerte: Der Vergleich von Mittelwerten aus mehr als zwei, jeweils normalverteilten Stichproben, erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-way-ANOVA).

3. Ergebnisse und Diskussion

Für die Durchführung dieser Arbeit standen im Arbeitskreis Prof. Pertz die in Tabelle 5 genannten *in vitro* Testmodelle zur Verfügung. Ein Testsystem für α_2 -Adrenozeptoren sollte neu etabliert werden, da diese Rezeptoren unter anderem in der Behandlung der Migräne und des Morbus Parkinson involviert sein könnten und therapeutisch verwendete Ergolinderivate Affinität zu diesen Rezeptoren haben (Newman-Tancredi *et al.*, 2002a; Tfelt-Hansen *et al.*, 2000). Für die Therapie der Migräne wären vermutlich α_{2C} -Adrenozeptoragonisten und für die Therapie des Morbus Parkinson D_2 -Agonisten, die gleichzeitig α_2 -Adrenozeptorantagonisten sind, von Bedeutung (siehe auch Einleitung).

Tabelle 5: In der vorliegenden Arbeit verwendete und neu etablierte funktionelle *in vitro* Testmodelle.

Rezeptor	Spezies	Gewebe	Effekt	Quelle
5-HT _{2A}	Schwein	Koronararterie	Kontraktion	Cushing und Cohen, 1993
5-HT _{2B}	Schwein	Pulmonalarterie	Relaxation	Glusa und Pertz, 2000
5-HT ₇	Schwein	Pulmonalarterie	Relaxation	Jähnichen <i>et al.</i> , 2005b
α_{1A}	Ratte	Schwanzarterie	Kontraktion	Jähnichen <i>et al.</i> , 2004
α_{1B}	Ratte	Schwanzarterie	Kontraktion	Jähnichen <i>et al.</i> , 2004
α_{1D}	Ratte	Aorta	Kontraktion	Schöning <i>et al.</i> , 2001
H ₁	Meerschweinchen	Ileum	Kontraktion	Pertz <i>et al.</i> , 2006
neu etabliert				
α_{2C}	Schwein	Pulmonalvene	Kontraktion	

3.1. α_2 -Adrenozeptoren

3.1.1. Charakterisierung des postsynaptischen α_2 -Adrenozeptors in der Schweinepulmonalvene

In *in vivo* und *in vitro* Experimenten an Hund und Katze konnte die α_1 - und α_2 -Adrenozeptor-vermittelte Kontraktion von Lungengefäßen gezeigt werden (Hyman und Kadowitz, 1985; Shebuski *et al.*, 1986; Ohlstein *et al.*, 1989), wobei nach Erhöhung des vaskulären Lungentonus die Ansprechbarkeit der α_2 -Adrenozeptoren selektiv erhöht war (Hyman und Kadowitz, 1986; Shebuski *et al.*, 1987). *In vitro*-vermittelte Effekte durch α_2 -Adrenozeptoren waren bevorzugt in den Pulmonalvenen

nachweisbar (Shebuski *et al.*, 1987; Ohlstein *et al.*, 1989). Sowohl in den *in vivo* als auch in den *in vitro* Experimenten blieb der α_2 -Adrenozeptorsubtyp unbestimmt.

Ziel war es, mit Hilfe funktioneller Experimente, Schild-Analyse und Korrelationsanalyse zu bestimmen, ob α_2 -Adrenozeptoren an der Kontraktion der Schweinepulmonalvene ebenfalls beteiligt sind und welcher α_2 -Adrenozeptorsubtyp die Kontraktion vermittelt. Anschließend sollte mittels RT-PCR und RTQ-PCR die mRNA für den Rezeptor nachgewiesen bzw. quantifiziert werden. Ein weiteres Ziel war die Etablierung eines funktionellen Testsystems zur Charakterisierung vaskulärer Effekte von Arzneistoffen an α_2 -Adrenozeptoren.

3.1.1.1. Effekte von α -Adrenozeptoragonisten

Noradrenalin, Phenylephrin, UK14304 und Clonidin kontrahierten die Schweinepulmonalvene konzentrationsabhängig bis der jeweilige Maximaleffekt (E_{\max}) erreicht war (Abbildung 13). Anhand der respektiven pEC_{50} Werte ergibt sich folgende Rangordnung mit abnehmender Potenz: Noradrenalin \approx UK14304 \approx Clonidin $>$ Phenylephrin. Der maximal beobachtete Effekt für Noradrenalin, war, verglichen mit den anderen Agonisten, signifikant größer, wohingegen das E_{\max} von Clonidin gegenüber den Agonisten signifikant kleiner war. Die E_{\max} von UK14304 und Phenylephrin unterschieden sich nicht. Anhand der Potenz von UK14304 und Clonidin, beides selektive α_2 -Adrenozeptoragonisten, kann auf die Anwesenheit von kontraktilen α_2 -Adrenozeptoren in der Schweinepulmonalvene geschlossen werden. Basierend auf den Agonistenexperimenten kann der α_2 -Adrenozeptorsubtyp aber nicht identifiziert werden, da die Potenz eines Agonisten mit dem Gewebe und dem experimentellen Design variiert (Hoyer und Boddeke, 1993). Vermutlich ist das Gefäß auch mit α_1 -Adrenozeptoren ausgestattet, da Phenylephrin als nichtselektiver α_1 -Adrenozeptoragonist ebenfalls Kontraktionen verursachte. Die Effekte der Agonisten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

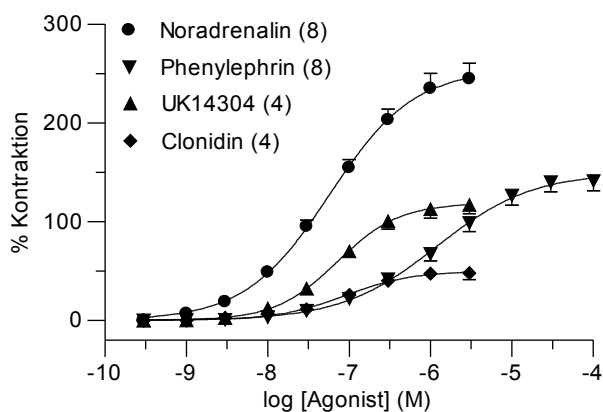


Abbildung 13: $E/[A]$ -Kurven von α -Adrenozeptoragonisten an der Schweinepulmonalvene. Dargestellt sind die kontraktile Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf UK14304 von (n) Tieren.

Tabelle 6: Agonistische Effekte von α -Adrenozeptoragonisten an der Schweinepulmonalvene.

	<i>n</i>	pEC_{50}	E_{max}
Noradrenalin	8	7.27 ± 0.07	254 ± 17
UK14304	4	7.16 ± 0.06	118 ± 10
Clonidin	4	7.04 ± 0.08	50 ± 7
Phenylephrin	8	5.92 ± 0.07	150 ± 10

E_{max} in %, bezogen auf UK14304 (0.3 μ M). *n* = Anzahl der Tiere.

3.1.1.2. Effekte von α_2 -Adrenozeptorantagonisten gegen UK14304

$E/[A]$ -Kurven für UK14304 in Abwesenheit und Anwesenheit sieben relativ selektiver α_2 -Adrenozeptorantagonisten wurden aufgezeichnet und anhand des ermittelten Affinitätsprofils der Rezeptorsubtyp durch Korrelationsanalyse bestimmt. Bis auf MK912 und Rauwolscin verursachten alle Verbindungen eine dosisabhängige Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurven, ohne zusätzlich Einfluss auf den Maximaleffekt (E_{max}) von UK14304 zu haben (Abbildung 15). Die Daten von 4 oder 5 verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Antagonisten wurden einer Schild-Analyse unterzogen und für jeden Antagonisten die Steigung der Ausgleichsgeraden errechnet, welche im Ergebnis nicht signifikant von 1 verschieden war. Diese Substanzen verhalten sich somit in diesem Gewebe gegen UK14304 als kompetitive Antagonisten. Für Rauwolscin (1 nM) wurde ein scheinbarer pA_2 -Wert berechnet, da die $E/[A]$ -Kurven für UK14304 mit steigender Antagonistenkonzentration zwar rechtsverschoben waren, der Antagonismus aber nicht überwunden werden konnte, was sich durch Depression des Maximaleffekts für UK14304 zeigte (pseudo-irreversible Hemmung, Abbildung 14). Dieser Umstand schloss eine Schild-Analyse für Rauwolscin aus. MK912 (0.1 nM) verursachte neben einer geringfügigen, aber signifikanten Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve ($\log r = 0.42 \pm 0.11$, $n = 5$) eine deutliche Depression des Maximaleffekts für UK14304 (Abbildung 14). Der Antagonismus von MK912 wurde als nicht-kompetitiv eingestuft und der pD'_{2} -Wert berechnet. Die Effekte der Antagonisten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Die funktionell ermittelten Bindungsdaten der Antagonisten (pK_B -Werte, pA_2 -Wert und pD'_{2} -Wert) wurden mit ihren publizierten Radioligandbindungsdaten (pK_i -Werte) an rekombinanten humanen α_{2a} -, α_{2b} - und α_{2c} -Adrenozeptoren korreliert (Uhlén *et al.*, 1994). Eine sehr gute Korrelation lag zwischen den funktionell bestimmten Affinitäten und den respektiven Radioligandbindungsdaten am humanen α_{2c} -Adrenozeptor vor ($r^2 = 0.96$, $P = 0.0001$), wohingegen eine schlechtere bzw. keine Korrelation zu humanen α_{2b} - bzw. α_{2a} -Adrenozeptoren bestand ($r^2 = 0.74$, $P > 0.01$; $r^2 = 0.53$, $P >$

0.05; Abbildung 16). Schließt man nur die Werte der kompetitiven Antagonisten in die Berechnung ein (d. h. Ausschluss von MK912 und Rauwolscin), erhält man eine weiterhin hochsignifikante Korrelation für humane α_{2c} -Adrenozeptoren ($r^2 = 0.94$, $P < 0.01$) und keine Korrelation für humane α_{2a} - und α_{2b} -Adrenozeptoren ($r^2 = 0.32$, $P > 0.30$; $r^2 = 0.40$, $P > 0.25$).

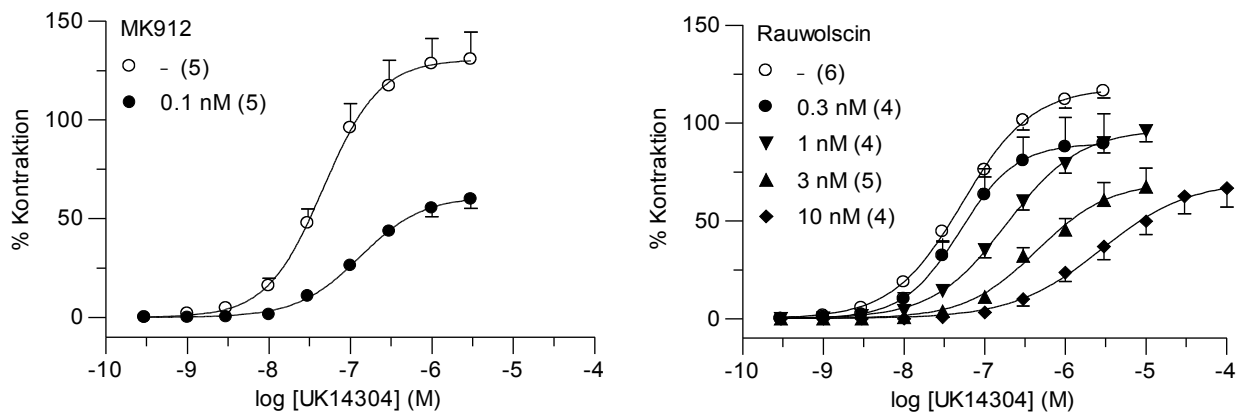


Abbildung 14: $E/[A]$ -Kurven von UK14304 in Ab- oder Anwesenheit von α_2 -Adrenozeptorantagonisten an der Schweinepulmonalvene. Dargestellt sind die kontraktile Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf UK14304 (0.3 μ M) von (n) Tieren.

Tabelle 7: Bindungsaffinitäten (pK_i -Werte) der α_2 -Adrenozeptorantagonisten an rekombinanten humanen α_{2a} -, α_{2b} - und α_{2c} -Adrenozeptoren in Korrelation zu den berechneten Bindungsaffinitäten (pK_B -Werte) der Antagonisten aus Experimenten an der Schweinepulmonalvene gegen UK14304.

Antagonist	α_{2a} (pK_i)	α_{2b} (pK_i)	α_{2c} (pK_i)	n	Pulmonalvene (pK_B)
ARC239	5.88	7.71	7.50	4 - 7	7.48 \pm 0.03
BRL44408	8.25	6.19	6.82	4 - 8	7.02 \pm 0.08
MK912	8.90	8.87	10.07	5	10.05 \pm 0.04 ^a
Rauwolscin	8.43	8.34	9.11	4	9.53 \pm 0.08 ^b
Prazosin	5.65	6.94	7.24	4	7.06 \pm 0.06
Yohimbin	8.43	7.87	8.52	4 - 5	9.09 \pm 0.05
WB4101	7.84	7.11	8.50	4 - 6	8.65 \pm 0.05

Radioligandbindungsdaten (pK_i -Werte) sind von Uhlén *et al.* (1994), ^a pD'_{2} -Wert, ^b pA_{2} -Wert. Die Steigung der Ausgleichsgeraden der Schild-Plots ist wie folgt: ARC239, 0.92 \pm 0.05; BRL44408, 1.00 \pm 0.11; Prazosin, 1.09 \pm 0.11; Yohimbin, 1.12 \pm 0.08; WB4101, 0.97 \pm 0.09. Der jeweilige Anstieg ist nicht signifikant von 1 verschieden. n = Anzahl der Tiere.

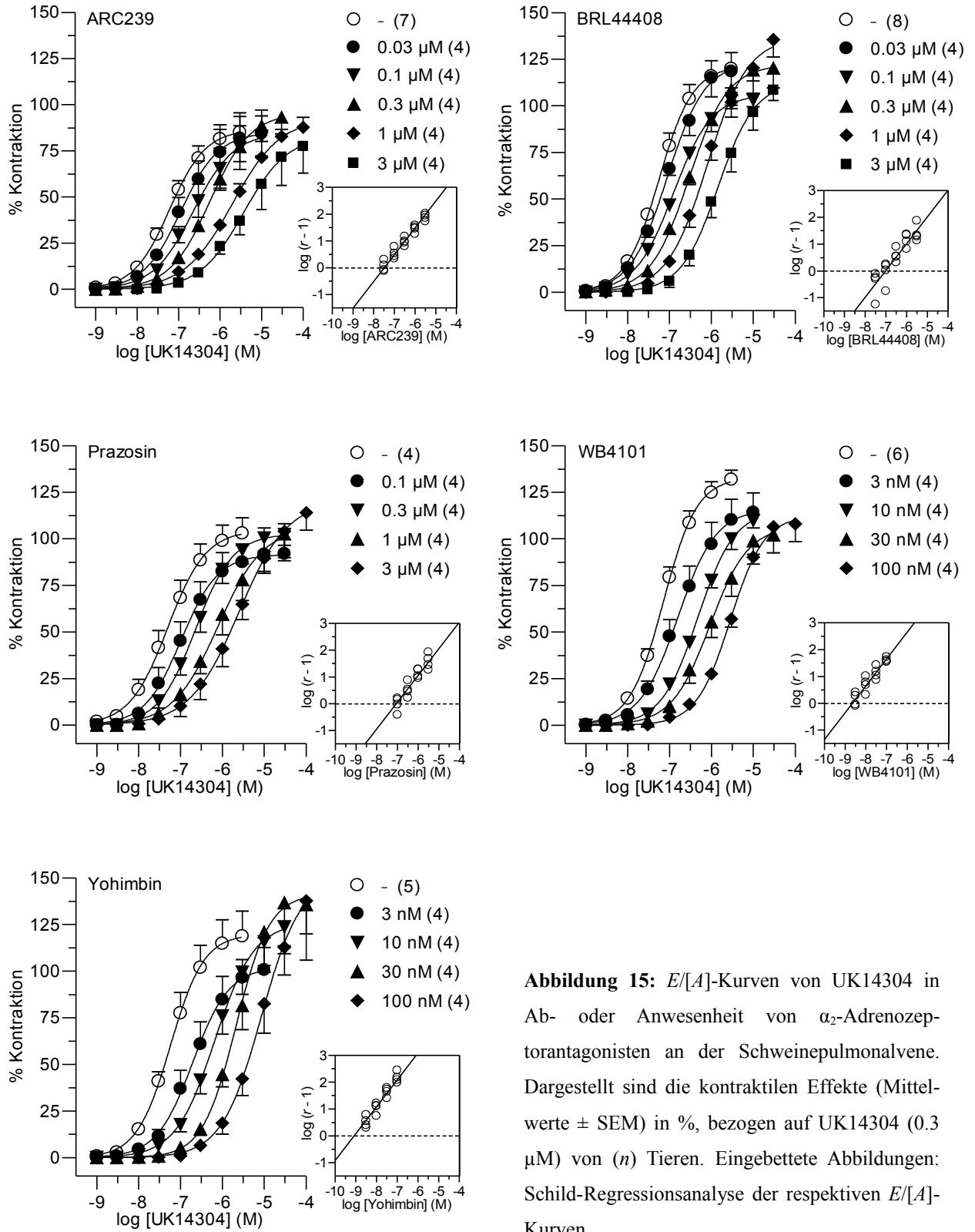


Abbildung 15: $E/[A]$ -Kurven von UK14304 in Ab- oder Anwesenheit von α_2 -Adrenozeptorantagonisten an der Schweinepulmonalvene. Dargestellt sind die kontraktile Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf UK14304 (0.3 μ M) von (n) Tieren. Eingebettete Abbildungen: Schild-Regressionsanalyse der respektiven $E/[A]$ -Kurven.

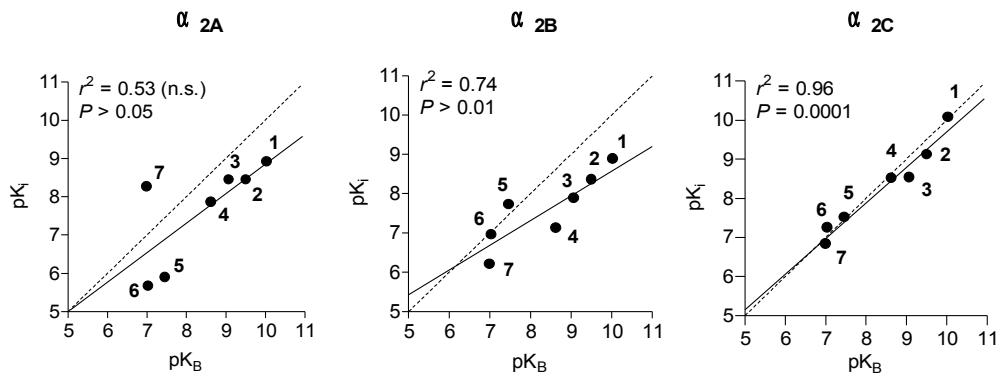


Abbildung 16: Korrelation zwischen ermittelten Affinitätsdaten (pK_B , pD'_2 für MK912, pA_2 für Rauwolscin) für α_2 -Adrenozeptorantagonisten gegen UK14304 an der Schweinepulmonalvene und den respektiven Radioligandbindungsaffinitäten (pK_I) an rekombinanten humanen α_2 -Adrenozeptorsubtypen (α_{2a} , α_{2b} und α_{2c}). Radioligandbindungsdaten von Uhlén *et al.* (1994). Die gestrichelte Linie entspricht der Identitätslinie („line of identity“) und die durchgezogene Linie der aus den abgebildeten Punkten berechneten Korrelationsgeraden. Die nummerierten Punkte entsprechen folgenden α_2 -Adrenozeptorantagonisten: MK912 (1), Rauwolscin (2), Yohimbin (3), WB4101 (4), ARC239 (5), Prazosin (6) und BRL44408 (7).

3.1.1.3. RT-PCR und RTQ-PCR

In RT-PCR-Experimenten wurde auf Expression von mRNA für die drei α_2 -Adrenozeptorsubtypen in der Schweinepulmonalvene geprüft. An der Großhirnrinde des Schweins wurden in Kontrollexperimenten die Primerpaare verifiziert und es konnte die mRNA für α_{2A} -, α_{2B} - und α_{2C} -Adrenozeptoren nachgewiesen werden. In der Pulmonalvene wurde lediglich mRNA für α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptoren detektiert (Abbildung 17). Die Amplifikation der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-cDNA (GAPDH, Haushaltsgen) bestätigte die Qualität der Proben und der Methode (Positivkontrolle). Weitere Qualitätskontrollen schlossen: 1) die Anwesenheit von genomischer DNA (entsprechende RNA-Proben ohne Behandlung mit der Reversen Transkriptase) sowie 2) die Kontamination der verwendeten PCR-Reagenzien (entsprechender PCR-Mastermix versehen mit GAPDH-Primerpaar, ohne cDNA) aus (Negativkontrollen).

Mittels RTQ-PCR-Experimenten wurde der jeweilige mRNA-Gehalt der drei α_2 -Adrenozeptorsubtypen quantifiziert und relativ auf den mRNA-Gehalt des Haushaltsgens (GAPDH) bezogen. Es konnte kein Signal für den α_{2B} -Adrenozeptor erfasst werden, während der mRNA-Gehalt für den α_{2C} -Subtyp beträchtlich über dem des α_{2A} -Adrenozeptors lag (Abbildung 18).

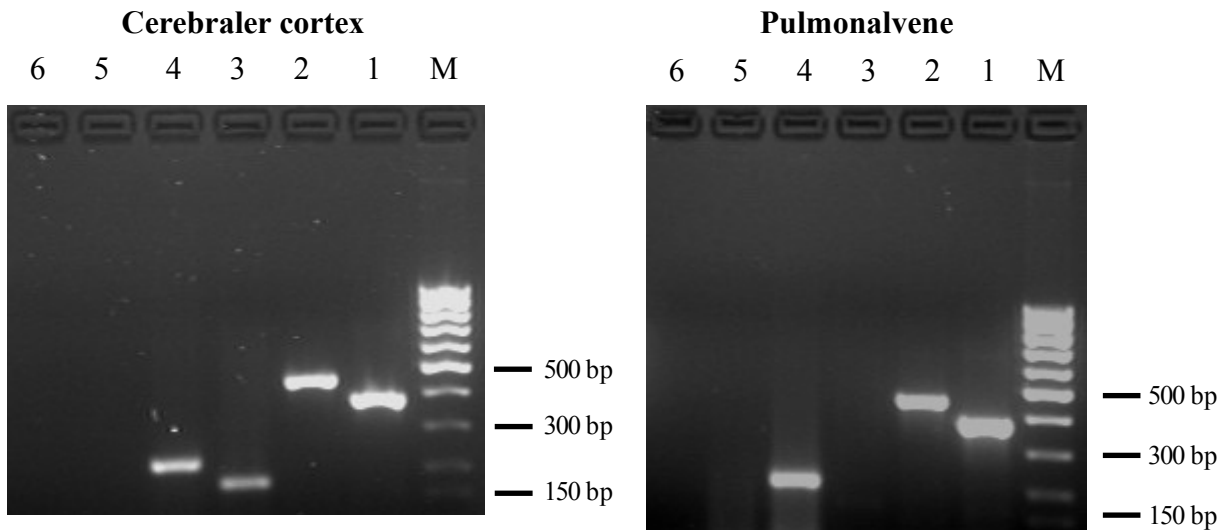


Abbildung 17: Agarose-Gel-Elektrophorese von RT-PCR Produkten. mRNA für α_{2A} -, α_{2B} - und α_{2C} -Adrenozeptoren konnte am cerebralen Cortex (links) und für α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptoren an der Pulmonalvene (rechts) des Schweins nachgewiesen werden. Die gekennzeichneten Spuren bedeuten: 100 bp DNA Leiter (M), 383 bp GAPDH-Positivkontrolle (1), 455 bp α_{2A} -Adrenozeptor (2), 179 bp α_{2B} -Adrenozeptor (3), 220 bp α_{2C} -Adrenozeptor (4), Negativkontrolle mit GAPDH-Primern im PCR-Ansatz unter vorherigem Ausschluss der Reversen Transkriptase (5) und Negativkontrolle mit GAPDH-Primern ohne cDNA im PCR-Ansatz (6). Die Größe (bp) von drei Markerbanden ist jeweils am rechten Rand angegeben.

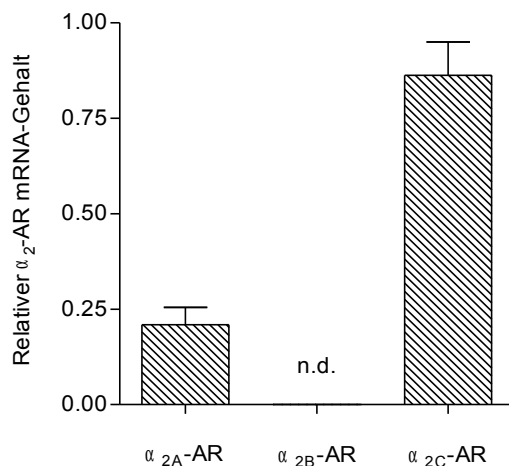


Abbildung 18: Expression von mRNA für α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptoren in der Schweinepulmonalvene. Dargestellt ist der mRNA-Gehalt (Mittelwerte \pm SEM) bezogen auf das Haushaltsgen (GAPDH) von $n = 3$ Einzelexperimenten. n.d. = nicht detektierbar.

3.1.1.4. Diskussion

Anhand der durchgeführten Experimente konnte der postsynaptische α_{2C} -Adrenozeptor identifiziert werden, welcher die UK14304-induzierte Kontraktion der Schweinepulmonalvene vermittelt (Görnemann *et al.*, 2007).

Eine Beteiligung von α_{2A} - und α_{2B} -Adrenozeptoren an der Kontraktion kann ausgeschlossen werden und wird im Folgenden begründet. Mit Agonistenexperimenten ergibt sich eine Rangfolge der Potenzen der Agonisten, die als Anhaltspunkt dient und mit Ergebnissen von anderen Gefäßen oder Geweben verglichen werden kann. Die Identifikation eines Rezeptorsubtyps ist mit dieser Methode nicht möglich. Die pharmakologische Charakterisierung des α_2 -Adrenozeptorsubtyps in der Pulmonalvene basierte daher auf der Bestimmung der Rezeptoraffinitäten verschieden α_2 -selektiver Antagonisten. Die eindeutigsten Hinweise, dass die UK14304-induzierte Kontraktion der Vene durch einen *einzelnen* Rezeptorsubtyp verursacht wird, ergaben sich aus den Berechnungen der Schild- und Korrelationsanalyse. Der respektive Anstieg der Ausgleichsgeraden im Schild-Plot der Antagonisten, welche keine Depression verursachten, ist nicht von 1 verschieden (Kenakin, 1993) und die Korrelation ergibt nur den hochsignifikanten Zusammenhang zum α_{2C} -Adrenozeptor. RT-PCR und RTQ-PCR ergaben ein positives Ergebnis für α_{2C} - und α_{2A} -Adrenozeptoren, während mRNA für α_{2B} -Adrenozeptoren mit beiden Methoden nicht detektiert wurde. Der Nachweis von mRNA für α_{2A} -Adrenozeptoren kann darauf zurückgeführt werden, dass dieser Rezeptorsubtyp möglicherweise präsynaptisch in der Adventitia der Gefäße (Trendelenburg *et al.*, 1997) und/oder als relaxierender Rezeptor auf dem Endothel vorkommt (Bockman *et al.*, 1993), welches für die Experimente nicht entfernt wurde. Der alleinige Nachweis von mRNA für einen Rezeptor ist noch kein Beweis, dass dieser an der Kontraktion des Gefäßes beteiligt ist (Piascik *et al.*, 1995; Civantos Calzada und de Artiñano, 2001). Die dominante Expression der mRNA des α_{2C} -Adrenozeptors betont zusätzlich die maßgebliche Rolle dieses Rezeptorsubtyps in diesem Gewebe.

Da unter erhöhtem vaskulären Lungentonus die über α_2 -Adrenozeptoren verursachten Kontraktionen der Pulmonalgefäße *in vivo* selektiv deutlich erhöht waren, ist es von Interesse, ob selektive α_{2C} -Adrenozeptorantagonisten zur Behandlung der pulmonal venösen Hypertonie eingesetzt werden können.

In der Therapie des Morbus Parkinson sind Arzneistoffe indiziert, die Antagonisten an α_2 -Adrenozeptoren sind (siehe Kapitel 1.4.3.). Indessen werden zur Behandlung der Migräne Substanzen benötigt, die α_{2A} - und/oder α_{2C} -Adrenozeptor-vermittelt arterielle Cranialgefäße kontrahieren (siehe Kapitel 1.4.2.). Für die Etablierung eines α_2 -Adrenozeptor Testsystems wurde auf eine Vene zurück-

gegriffen, da im Allgemeinen die *in vitro* Charakterisierung α_2 -Adrenozeptor-vermittelter-Effekte hauptsächlich an isolierten Venen verschiedener Spezies erfolgte. Das begründet sich darin, dass Widerstandsgefäße überwiegend durch α_1 -Adrenozeptoren beeinflusst werden und α_2 -Adrenozeptoragonisten keine kontraktile Effekte in großen Arterien zeigten (Guimarães und Moura, 2001). Die UK14304-induzierte Kontraktion der Schweinepulmonalvene wird selektiv durch den α_{2C} -Adrenozeptor vermittelt. Somit kann dieses Gefäß als *in vitro*-Bioassay zur Charakterisierung von Arzneistoffen an α_{2C} -Adrenozeptoren verwendet werden. Die Frage, welcher α_2 -Adrenozeptorsubtyp (α_{2A} , α_{2B} oder α_{2C}) bei der Reduktion von Dyskinesien in der Parkinsonschen Krankheit eine Rolle spielen könnte, ist bisher nicht geklärt. Mit der Etablierung des Modells für den α_{2C} -Adrenozeptor an der Pulmonalvene des Schweins käme man der Beantwortung dieser Frage ein Stück näher.

3.2. Ergoline

3.2.1. Charakterisierung des molekularen Fragments, das für den Agonismus von Pergolid an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren verantwortlich ist

Pergolid ist ein potenter Agonist an Dopamin D₁- und D₂-Rezeptoren (Fuller und Clemens, 1991), der in der Therapie des Morbus Parkinson (Standaert und Young, 2005) eingesetzt worden ist. Zwei kürzlich publizierte Studien bestätigten, dass Patienten, die mit Pergolid behandelt wurden, ein erhöhtes Risiko hatten, einen Herzklappenschaden zu erleiden (Schade *et al.*, 2007; Zanetti *et al.*, 2007). Diese schwerwiegende Nebenwirkung

ist mit der durch Pergolid bewirkten Aktivierung von 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren assoziiert (siehe Kapitel 1.6.). Ziel der Untersuchungen war es, anhand chemisch modifizierter Pergolidderivate herauszufinden, welches strukturelle Fragment für den Agonismus an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren verantwortlich sein könnte. Hierfür wurden die Substituenten in N(6) und C(8) von Pergolid geändert und 8 Derivate synthetisiert (Abbildung 19). Die Modifikationen waren wie folgt: die Propylgruppe in N(6) von Pergolid wurde durch eine Ethyl- oder Methylgruppe oder durch Wasserstoff ersetzt. Weiterhin wurde der Schwefel, der sich in der Seitenkette von Pergolid an C(8) befindet, durch Sauerstoff ausgetauscht (*O*-Pergolid). Die Propylgruppe dieser Verbindung ist ebenfalls durch eine Ethyl- oder Methylgruppe oder durch Wasserstoff substituiert worden. Zusätzlich wurde in dieser Reihe die N(6)-Propylgruppe durch eine sperrige Cyclopropylmethyl-Gruppe ersetzt

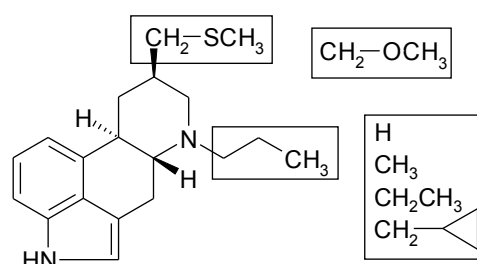


Abbildung 19: Struktur von Pergolid und seinen Derivaten.

(neunte Verbindung). Welchen Einfluss der Ersatz der N(6)-Propylgruppe von Pergolid auf die agonistische Wirksamkeit an D_2 -Rezeptoren hat, sollte an rekombinanten hD_{2S} - und hD_{2L} -Rezeptoren, die stabil in CHO-Zellen exprimiert wurden, für ausgewählte Substanzen untersucht werden. Als funktionelle Modelle dienten die Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B}-Rezeptor-Bioassay), die Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptor-Bioassay) und das [³⁵S]GTPγS-Bindungs-Assays (Assay zur Bestimmung der G-Proteinaktivierung).

3.2.1.1. Effekte an 5-HT_{2B}-Rezeptoren

Die Derivate von Pergolid und *O*-Pergolid, die eine Ethyl- oder Cyclopropylmethylgruppe in N(6) aufwiesen, relaxierten die vorkontrahierte Pulmonalarterie im selben Ausmaß wie 5-HT, Pergolid und *O*-Pergolid. Pergolid, 6-Ethylpergolid, *O*-Pergolid, 6-Ethyl-*O*-pergolid und 6-Cyclopropylmethyl-*O*-pergolid waren volle Agonisten in diesem Gewebe, da deren E_{max} nicht vom E_{max} der respektiven 5-HT-Kontrollkurven verschieden war. Die Potenz der Agonisten nahm in der Reihenfolge 5-

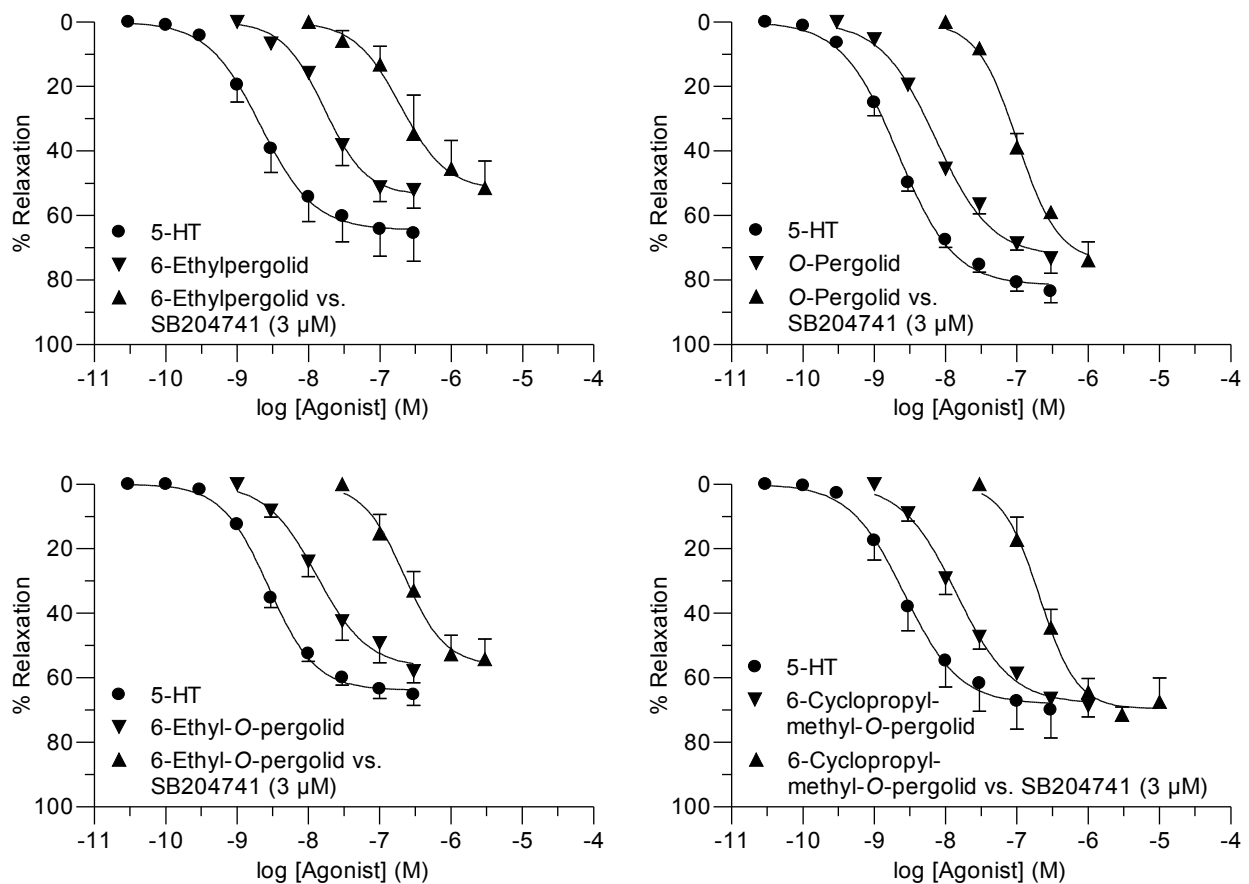


Abbildung 20: $E/[A]$ -Kurven von 5-HT und Pergolidderivaten in Ab- oder Anwesenheit von SB204741 (3 µM) an der Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B}-Rezeptoren). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte (Mittelwerte ± SEM) in %, bezogen auf die maximale Relaxation induziert durch 5-HT oder das Pergolidderivat und Bradykinin (0.01 µM) von jeweils $n = 4$ Tieren.

HT \approx Pergolid $>$ *O*-Pergolid \approx 6-Cyclopropylmethyl-*O*-pergolid \approx 6-Ethylpergolid \approx 6-Ethyl-*O*-pergolid ab. Die Relaxationen von Pergolid konnten durch SB206553 (1 μ M; 5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonist; Jähnichen *et al.*, 2005a) inhibiert und die der anderen vollen Agonisten durch SB204741 (3 μ M; selektiver 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonist) antagonisiert werden (Abbildung 20). Die pA_2 -Werte für SB204741 waren in derselben Größenordnung wie der pA_2 -Wert berechnet gegen 5-HT, was für die Beteiligung von relaxierenden 5-HT_{2B}-Rezeptoren spricht (Tabelle 8). 6-Norpergolid (0.3 μ M) und 6-Nor-*O*-pergolid (1 μ M) brachten nur geringfügige Relaxationen hervor ($E_{\max} = 8 \pm 1$ bzw. 12 ± 2 %), die mit SB204741 (3 μ M, nicht gezeigt) vollständig aufgehoben werden konnten. Demgegenüber erzeugten 6-Methylpergolid (0.01 μ M) und 6-Methyl-*O*-pergolid (0.03 μ M) keine agonistischen Effekte, sondern antagonisierten die Relaxationen von 5-HT (Abbildung 21). Erst hohe Konzentrationen beider N(6)-Methylderivate (jeweils 1 μ M) relaxierten die Lungenarterie geringfügig. Die Relaxationen von 6-Methylpergolid (1 μ M, $E_{\max} = 15 \pm 4$ %, $n = 6$) blieben durch SB204741 (3 μ M) unbeeinflusst ($P > 0.05$, $n = 6$, nicht gezeigt), wohingegen die Relaxationen von 6-Methyl-*O*-

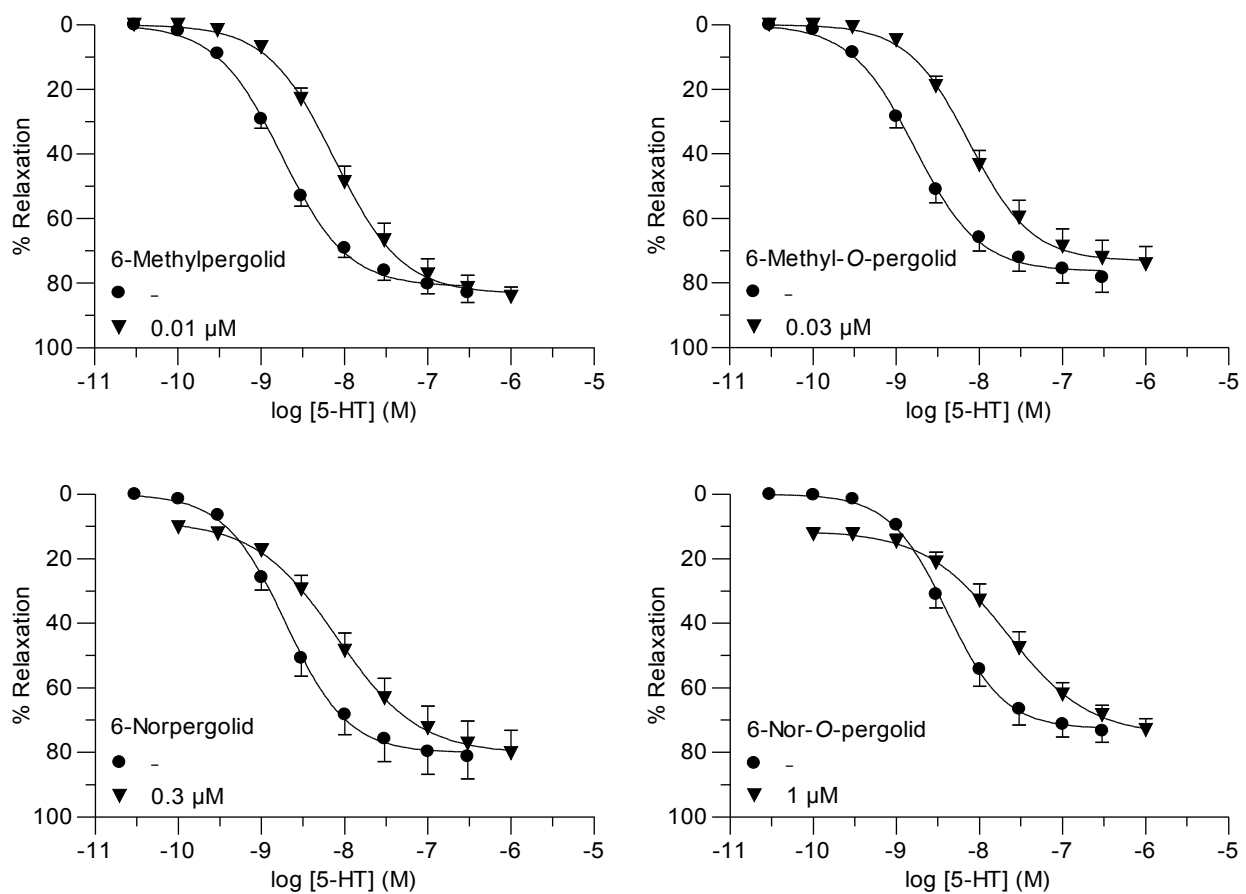


Abbildung 21: $E/[A]$ -Kurven von 5-HT in Ab- oder Anwesenheit von Pergolidderivaten an der Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B}-Rezeptoren). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf die maximale Relaxation induziert durch den Agonisten (Pergolidderivat und/oder 5-HT) und Bradykinin (0.01 μ M) von jeweils $n = 4$ Tieren.

pergolid (1 μM , $E_{\text{max}} = 19 \pm 4 \%$, $n = 6$) durch SB204741 (3 μM) signifikant reduziert wurden ($E_{\text{max}} = 7 \pm 2 \%$, $P = 0.04$, $n = 6$, nicht gezeigt). Die agonistischen und antagonistischen Effekte der Substanzen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Agonistische und antagonistische Effekte von Pergoliderivaten an der Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B}-Rezeptoren).

	<i>n</i>	pEC_{50}	E_{max}	pK_P^{a}	pA_2
Volle Agonisten					
5-HT	34	$8.63 \pm 0.03^{\text{b}}$	$73 \pm 2^{\text{b}}$		$6.59 \pm 0.07^{\text{c,d}}$
Pergolid ^e	-	8.42 ± 0.11	-		$7.30 \pm 0.19^{\text{f}}$
6-Ethylpergolid	4	7.75 ± 0.07	55 ± 5		$6.63 \pm 0.18^{\text{c}}$
<i>O</i> -Pergolid	4	8.12 ± 0.10	74 ± 5		$6.61 \pm 0.12^{\text{c}}$
6-Ethyl- <i>O</i> -pergolid	4	7.77 ± 0.12	61 ± 3		$6.69 \pm 0.09^{\text{c}}$
6-Cyclopropylmethyl- <i>O</i> -pergolid	4	7.85 ± 0.06	68 ± 2		$6.66 \pm 0.02^{\text{c}}$
Partialagonisten					
6-Norpergolid	4		8 ± 1	$7.10 \pm 0.14^{\text{g}}$	
6-Nor- <i>O</i> -pergolid	4		12 ± 2	$6.68 \pm 0.08^{\text{h}}$	
Antagonisten					
6-Methylpergolid	4		$80 \pm 7^{\text{i}}$		$8.43 \pm 0.07^{\text{j}}$
6-Methyl- <i>O</i> -pergolid	4		$69 \pm 10^{\text{i}}$		$8.00 \pm 0.04^{\text{k}}$

E_{max} in %, bezogen auf maximale Relaxation induziert durch den Agonisten und Bradykinin (0.01 μM). ^a pK_P -Wert berechnet nach Marano und Kaumann (1976), ^bgepoolte Daten von allen Experimenten, ^c pA_2 -Wert für SB204741 (3 μM), ^dDaten von Glusa und Pertz (2000), ^eDaten von Jähnichen *et al.* (2005a), ^f pA_2 -Wert für SB206553 (1 μM), ^gDerivat getestet bei 0.3 μM , ^hDerivat getestet bei 1 μM , ⁱ E_{max} von 5-HT in Anwesenheit des Antagonisten, ^j pA_2 -Wert für Derivat getestet bei 0.01 μM , ^k pA_2 -Wert für Derivat getestet bei 0.03 μM . $n = \text{Anzahl der Tiere}$.

3.2.1.2. Effekte an 5-HT_{2A}-Rezeptoren

Pergolid, 6-Ethylpergolid, *O*-Pergolid, 6-Ethyl-*O*-pergolid und 6-Cyclopropylmethyl-*O*-pergolid bewirkten konzentrationsabhängige Kontraktionen der Schweinekoronararterie. Die entsprechenden pEC_{50} -Werte dieser Derivate waren größer als der pEC_{50} -Wert für 5-HT und die Rangfolge der Potenz der Agonisten war *O*-Pergolid > Pergolid > 6-Cyclopropylmethyl-*O*-pergolid \approx 6-Ethylpergolid

\approx 6-Ethyl-*O*-pergolid > 5-HT. Die Pergolid- und *O*-Pergolidderivate, die agonistische Effekte hervorbrachten, waren Partialagonisten relativ zu 5-HT (Abbildung 22). Der pEC_{50} -Wert des jeweiligen Partialagonisten war in guter Übereinstimmung mit dessen pK_P -Wert, der anhand äquieffektiver Konzentrationen von 5-HT und dem Partialagonisten berechnet wurde (Kenakin, 1993). Die maximalen Effekte (E_{max}) der Partialagonisten unterschieden sich nicht untereinander ($P > 0.05$, One-way ANOVA, $n = 4 - 5$). Ketanserin (0.01 μ M, selektiver 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonist) inhibierte die durch die Agonisten hervorgerufenen Kontraktionen. Die $E/[A]$ -Kurven wurden in Anwesenheit des Antagonisten ohne Depression des E_{max} rechtsverschoben. Die pA_2 -Werte für Ketanserin waren in derselben Größenordnung wie der pA_2 -Wert berechnet gegen 5-HT, was für die

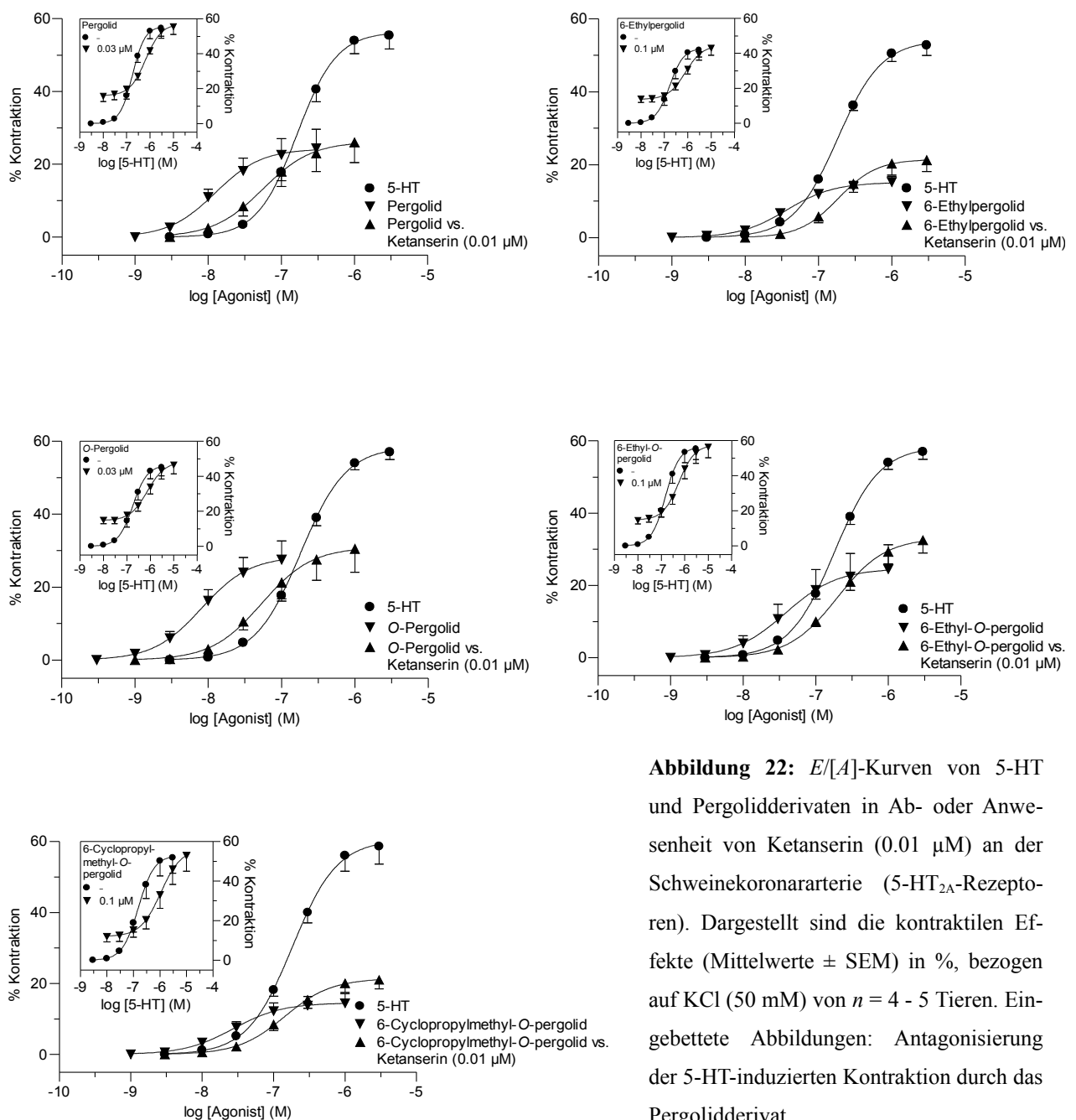


Abbildung 22: $E/[A]$ -Kurven von 5-HT und Pergolidderivaten in Ab- oder Anwesenheit von Ketanserin (0.01 μ M) an der Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren). Dargestellt sind die kontraktile Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf KCl (50 mM) von $n = 4 - 5$ Tieren. Eingebettete Abbildungen: Antagonisierung der 5-HT-induzierten Kontraktion durch das Pergolidderivat.

Beteiligung von kontraktile 5-HT_{2A}-Rezeptoren spricht (Tabelle 9). Wie für Partialagonisten zu erwarten, antagonisierten Pergolid, 6-Ethylpergolid, *O*-Pergolid, 6-Ethyl-*O*-pergolid und 6-Cyclopropylmethyl-*O*-pergolid, die Kontraktionen von 5-HT (eingebettete Abbildungen in Abbildung 22). Die nach der Methode von Marano und Kaumann (1976) berechnete Gleichgewichts-Dissoziationskonstante für jeden Partialagonist *P*-Rezeptor-Komplex (pK_P -Wert) ist ebenfalls in guter Übereinstimmung mit dem pEC_{50} -Wert, bestimmt aus der $E/[A]$ -Kurve des jeweiligen Partialagonisten (Tabelle 9). Im Gegensatz dazu verursachten 6-Methylpergolid und 6-Methyl-*O*-pergolid bis zu einer Konzentration von 1 μ M keine kontraktile Effekte. Vielmehr verhielten sich 6-Methylpergolid (0.02 μ M) und 6-Methyl-*O*-pergolid (0.02 μ M) als überwindbare Antagonisten der 5-HT-vermittelten Kontraktionen in der Schweinekoronararterie (Abbildung 23). Die Verbindungen mit einem Wasserstoff in N(6), 6-Norpergolid (1 μ M) und 6-Nor-*O*-pergolid (1 μ M), fungierten ebenso als Antagonisten. Beide Substanzen zeigten in der getesteten Konzentration unüberwindbaren Antagonismus, da in ihrer Anwesenheit die $E/[A]$ -Kurve für 5-HT gleichzeitig nach rechts verschoben und der maximale Effekt für 5-HT erniedrigt war (Abbildung 23). Die agonisti-

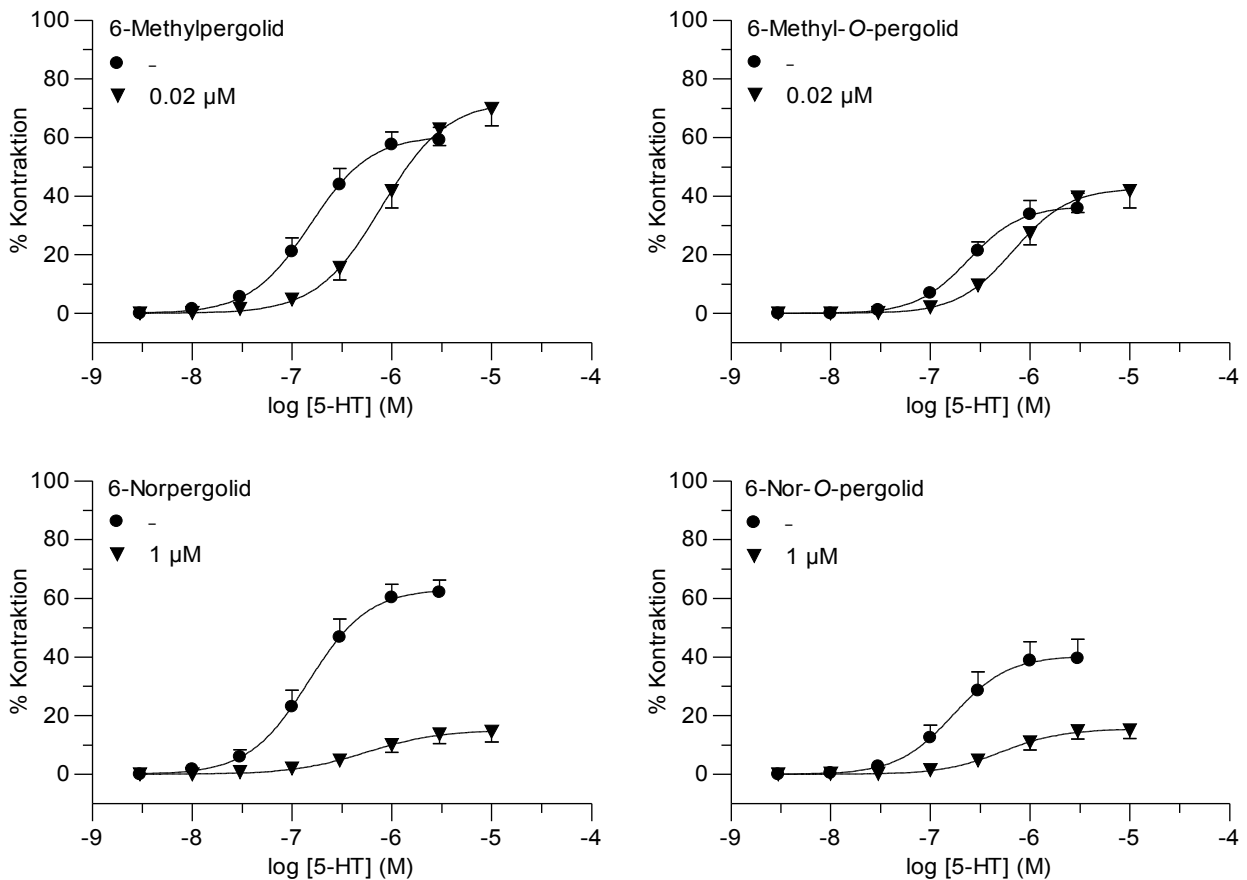


Abbildung 23: $E/[A]$ -Kurven von 5-HT in Ab- oder Anwesenheit von Pergolidderivaten an der Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren). Dargestellt sind die kontraktile Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf KCl (50 mM) von jeweils $n = 4$ Tieren.

schen und antagonistischen Effekte der Substanzen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Agonistische und antagonistische Effekte von Pergolidderivaten an der Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren).

	<i>n</i>	<i>pEC</i> ₅₀	<i>E</i> _{max}	<i>pK</i> _P ^{a,b}	<i>pA</i> ₂
Agonisten					
5-HT	33	6.75 ± 0.02 ^c	52 ± 2 ^c	-	8.88 ± 0.03 ^d
Pergolid	5	7.92 ± 0.05	24 ± 5	7.83 ± 0.06 ^a 7.92 ± 0.11 ^{b,f}	8.61 ± 0.13 ^e
6-Ethylpergolid	4	7.44 ± 0.07	15 ± 2	7.43 ± 0.07 ^a 7.52 ± 0.06 ^{b,g}	8.60 ± 0.11 ^e
<i>O</i> -Pergolid	4	8.09 ± 0.01	29 ± 6	7.93 ± 0.04 ^a 7.93 ± 0.07 ^{b,g}	8.74 ± 0.04 ^e
6-Ethyl- <i>O</i> -pergolid	4	7.39 ± 0.06	25 ± 7	7.25 ± 0.04 ^a 7.39 ± 0.07 ^{b,g}	8.58 ± 0.06 ^e
6-Cyclopropylmethyl- <i>O</i> -pergolid	5	7.55 ± 0.03	15 ± 3	7.50 ± 0.06 ^a 7.74 ± 0.08 ^{b,f}	8.63 ± 0.06 ^e
Antagonisten					
6-Methylpergolid	4		72 ± 6 ^h		8.30 ± 0.05 ⁱ
6-Norpergolid	4		15 ± 4 ^h		6.41 ± 0.02 ^j
6-Methyl- <i>O</i> -pergolid	4		43 ± 6 ^h		7.95 ± 0.05 ⁱ
6-Nor- <i>O</i> -pergolid	4		15 ± 3 ^h		6.33 ± 0.07 ^j

*E*_{max} in %, bezogen auf KCl (50 mM). ^a*pK*_P-Wert berechnet nach Kenakin (1993), ^b*pK*_P-Wert berechnet nach Marano und Kaumann (1976), ^cgepoolte Daten von allen Experimenten, ^d*pK*_B-Wert für Ketanserin, ^e*pA*₂-Wert für Ketanserin (0.01 μM), ^fDerivat getestet bei 0.03 μM, ^gDerivat getestet bei 0.1 μM, ^h*E*_{max} von 5-HT in Anwesenheit des Antagonisten, ⁱ*pA*₂-Wert für Derivat getestet bei 0.02 μM, ^j*pA*₂-Wert für Derivat getestet bei 1 μM. *n* = Anzahl der Tiere.

3.2.1.3. Effekte an rekombinanten hD_{2S} - und hD_{2L} -Rezeptoren

Pergolid und 6-Methylpergolid waren, verglichen mit dem selektiven D_2 -Rezeptoragonisten Quinpirol, volle Agonisten an hD_{2S} - und hD_{2L} -Rezeptoren. Der Austausch der Propylgruppe in N(6) (Pergolid) gegen eine Methylgruppe (6-Methylpergolid) hatte keinen Einfluss auf die Potenz des Agonisten, weder an hD_{2S} - noch an hD_{2L} -Rezeptoren. Der Metabolit von Pergolid, 6-Norpergolid, zeichnete sich als Partialagonist mit hoher intrinsischer Aktivität an hD_{2S} - und hD_{2L} -Rezeptoren aus, besaß aber jeweils eine ca. 10-fach schwächere agonistische Potenz als die Muttersubstanz (Abbildung 24, Tabelle 10).

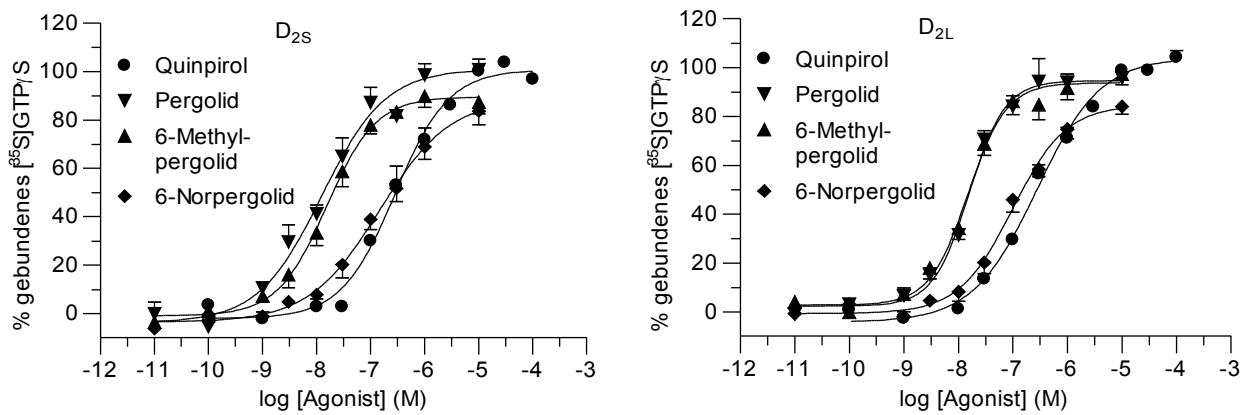


Abbildung 24: $E/[A]$ -Kurven von Pergolid, Pergolidderivaten und Quinpirol im $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungs-Assay (hD_{2S} -, hD_{2L} -Rezeptoren). Dargestellt ist die Bindung von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf den Maximaleffekt von Quinpirol von $n = 6$ Einzelexperimenten.

Tabelle 10: Agonistische Effekte von Pergolid und Pergolidderivaten im $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungs-Assay (hD_{2S} - und hD_{2L} -Rezeptoren).

	D_{2L}			D_{2S}		
	n	pEC_{50}	E_{\max}	n	pEC_{50}	E_{\max}
Pergolid	6	7.80 ± 0.04	95 ± 4	6	7.85 ± 0.07	99 ± 6
6-Methylpergolid	6	7.84 ± 0.07	97 ± 4	6	7.79 ± 0.13	90 ± 4
6-Norpergolid	6	6.87 ± 0.17	83 ± 3	6	6.95 ± 0.12	81 ± 5

E_{\max} in %, bezogen auf den Maximaleffekt des Kontrollagonisten (Quinpirol). n = Anzahl der Einzelexperimente.

3.2.1.4. Diskussion

Pergolid ist, neben Cabergolin, Bromocriptin und Lisurid, ein partialsynthetisches Ergolin, das als Dopaminrezeptoragonist in der Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt worden ist. Deren Molekülstruktur betrachtend, besitzen Pergolid und Cabergolin keine Methylgruppe an N(6), die für Bromocriptin, Lisurid und andere therapeutisch verwendete Alkaloide mit Ergolinstruktur charakteristisch ist. Pergolid trägt an N(6) eine Propyl- und Cabergolin eine ähnlich große Allylgruppe. Hauptsächlich für Pergolid und Cabergolin wurde berichtet, dass deren Einnahme zu schweren Herzklappenschäden führen kann, was mit deren Potenzial 5-HT_{2B}-Rezeptoren zu aktivieren, assoziiert worden ist (Pritchett *et al.*, 2002; Horvath *et al.*, 2004; Van Camp *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu Pergolid und Cabergolin konnte für Bromocriptin im Zusammenhang mit Herzklappenschäden bis heute nur ein einziger Fall mit schwerwiegender Trikuspidalklappeninsuffizienz berichtet werden (Serratrice *et al.*, 2002). Für Lisurid konnte in der Literatur kein Fall von Herzklappenschäden gefunden werden, was mit dessen antagonistischem Effekt an 5-HT_{2B}-Rezeptoren in Übereinstimmung ist (Hofmann *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Beobachtungen war anzunehmen, dass der N(6)-Propyl- oder Allylsubstituent einen ausschlaggebenden Faktor für die Aktivierung von 5-HT_{2B}-Rezeptoren und folgend für die Ätiologie der Herzklappenschäden spielen könnte. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass Protergurid, das N(6)-Propylderivat von Tergurid, ein potenter Partialagonist an 5-HT_{2B}-Rezeptoren war, wohingegen Tergurid (N(6)-Methylgruppe) keine intrinsische Aktivität zeigte (Schurad *et al.*, 2006; Jähnichen *et al.*, 2005a, diese Arbeit).

Kürzlich konnte, diese Problematik betreffend, gezeigt werden, dass sich Pergolid und Cabergolin als potente, volle Agonisten sowohl an endothelialen 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie als auch an rekombinanten h5-HT_{2B}-Rezeptoren in CHO-Zellen verhielten (Jähnichen *et al.*, 2005a; Newman-Tancredi *et al.*, 2002b). Unter der Verwendung von Pergolid und dessen in N(6) chemisch modifizierten Derivaten sollte im Rahmen dieser Arbeit bestimmt werden, ob diese Strukturveränderungen mit einer Änderung der agonistischen Potenz von Pergolid einhergehen und wenn ja, ob die Änderungen der agonistischen Potenz einem vorhersagbaren Muster folgen. Zusätzlich wurde der Schwefel, der in Ergolinen selten vorkommt, in der Seitenkette durch Sauerstoff ersetzt.

Die Experimente an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie ergaben, dass das unterschiedliche Substitutionsmuster an N(6) und die intrinsische Wirksamkeit der Pergolid- und *O*-Pergolidderivate einem bestimmten Muster folgten. Die Verbindungen mit einer Propyl-, Ethyl- oder Cyclopropylmethylgruppe waren volle Agonisten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren, während sich jene mit einer Methylgruppe als stille Antagonisten und die 6-Norderivate als Partialagonisten mit minimaler intrinsischer Aktivität auszeichneten. Ob die minimal agonistische Aktivität von 6-Norpergolid, ei-

nem Metaboliten vom Pergolid (Rubin *et al.*, 1981), eine klinische Relevanz hat, bleibt ungeklärt. Es wird darauf hingewiesen, dass die intrinsische Aktivität einer Substanz variabel ist und von folgenden Faktoren abhängen kann: dem verwendeten Gefäß oder Gewebe, der Spezies und dem Ausmaß der Rezeptor/G-Proteinreserve (Hoyer und Boddeke, 1993). Da die Derivate von Pergolid und *O*-Pergolid gleiche pharmakologische Effekte zeigten, scheint der Schwefel keine Determinante für 5-HT_{2B}-Rezeptoragonismus zu sein.

Das pharmakologische Profil von Pergolid und dessen Derivaten an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schweinekoronararterie ähnelte deren Effekten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie. Dieses Verhalten ist nicht unerwartet, da Mutterkornalkaloide nur geringe diskriminatorische Eigenschaften für die 5-HT₂-Rezeptorfamilie (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} und 5-HT_{2C}) aufweisen (Pertz und Eich, 1999). Verglichen mit 5-HT zeigten die Pergolid- und *O*-Pergolidderivate mit einer Propyl-, Ethyl- und Cyclopropylmethylgruppe in N(6) partiellen Agonismus an 5-HT_{2A}-Rezeptoren, wohingegen die N(6)-Methyl- und N(6)-Norderivate keine Kontraktionen der Schweinekoronararterie verursachten. Auch an 5-HT_{2A}-Rezeptoren hatte die Substitution des Schwefels durch Sauerstoff keinen Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften der Verbindungen und somit scheint dieser keine Determinante für 5-HT_{2A}-Rezeptoragonismus zu sein. 6-Methylpergolid und 6-Methyl-*O*-pergolid antagonisierten, ohne Depression des maximalen Effekts, die durch 5-HT vermittelten Kontraktionen und zeichneten sich durch nanomolare Affinität aus. Für Pergolid konnte an rekombinanten h5-HT_{2A}-Rezeptoren ein voller Agonismus bestimmt werden, der 8-fach potenter war, als durch die vorliegenden Experimente ermittelt (Newman-Tancredi *et al.*, 2002b). Dass Experimente an Zellen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können, wird in Kapitel 3.2.2.7. diskutiert.

Es konnte gezeigt werden, dass der Schwefel in der Seitenkette von Pergolid an C(8) nicht zum Agonismus der Substanz an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren beiträgt. Kann aber die Stereochemie an C(8) eine Rolle spielen? Tergurid (8 α -substituiert) und 6-Methylpergolid (8 β -substituiert), beide mit N(6)-Methylgruppe, weisen unterschiedliche Stereochemie in C(8) auf und sind beide stille Antagonisten an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren. Ungeachtet der Stereochemie in Position C(8) konvertierte der Antagonismus zu Agonismus, wenn die N(6)-Methylgruppe durch eine Propylgruppe ersetzt wurde (Schurad *et al.*, 2006; Jähnichen *et al.*, 2005a). Demnach spielt der N(6)-Substituent die Hauptrolle als Determinante für den Agonismus an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren und nicht die sterische Stellung der C(8)-Seitenkette.

Pergolid, 6-Methylpergolid und 6-Norpergolid sind (Partial)Agonisten an hD_{2S}- und hD_{2L}-Rezeptoren. Der Umstand, dass 6-Methylpergolid äquieffektiv und äquipotent zu Pergolid ist und gleichzeitig Antagonismus an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren zeigt, macht die Verbindung zu einer interessanten potenziellen Substanz, die für experimentelle Zwecke verwendet werden kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der potente Agonismus von Pergolid an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren in Antagonismus übergeht, wenn die N(6)-Propylgruppe durch eine Methylgruppe ersetzt wird. Diese Konvertierung konnte an D₂-Rezeptoren nicht beobachtet werden. Es wurde in einigen Studien demonstriert und diskutiert, dass 5-HT_{2B}-Rezeptor Aktivierung für die Inzidenz und die Progression Pergolid-induzierter Herzklappenschäden, die mit Herzklappeninsuffizienz einhergehen, mitverantwortlich ist (siehe Kapitel 1.6.). Eine Mitwirkung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren kann bzgl. des Krankheitsverlaufes nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der agonistischen Eigenschaften von Pergolid und dem Versagen von 6-Methylpergolid als Agonist zu wirken, kann geschlossen werden, dass die N(6)-Propylgruppe von Pergolid das molekulare Fragment ist, das besonders für 5-HT_{2B}-vermittelte Effekte verantwortlich und folglich eine Determinante für Herzklappeninsuffizienz ist. Es wird darauf hingewiesen, dass auch andere Strukturmerkmale des Ergolinmoleküls, deren Untersuchung nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, zur Entwicklung von Herzklappenschäden beitragen können. So konnten für das Mutterkornalkaloid Ergotamin, das ein potenter Agonist an 5-HT_{2B}-Rezeptoren ist (Glusa und Roos, 1996), Mitralklappenschäden beobachtet werden (Redfield *et al.*, 1992; Flaherty und Bates, 1996). Ob 6-Methylpergolid aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften (D₂-Agonist, Antagonist an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren) keine Herzklappenschäden hervorruft und zur Therapie des Morbus Parkinson geeignet ist, muss in weiteren Experimenten und Studien geprüft werden.

3.2.2. Tergurid - Erstellung des pharmakologischen Profils

Tergurid ist ein partialsynthetisches 8 α -Aminoergolin (Abbildung 9), welches hohe Affinität zu Dopamin D₂-Rezeptoren besitzt (Millan *et al.*, 2002). Aufgrund seiner agonistischen Wirkung an Dopamin D₂-Rezeptoren hemmt Tergurid die Prolaktinfreisetzung aus der Adenohypophyse und senkt folglich den Prolaktinspiegel im Blut (Venturini *et al.*, 1986). Die Prolaktinfreisetzung wird vermutlich durch Stimulation der „kurzen“ Variante des Dopaminrezeptors (D_{2S}-Rezeptor) gehemmt, da diese Isoform als Autorezeptor die Dopaminfreisetzung in der Hypophyse reguliert (Khan *et al.* 1998) und für Tergurid nur an D_{2S}-Rezeptoren, nicht aber an D_{2L}-Rezeptoren, agonistische Aktivität gezeigt werden konnte (Newman-Tancredi *et al.*, 2002a). Zur Behandlung der Hyperprolaktinämie wird Tergurid in Japan (Teluron[®]) und Tschechien (Mysalfon[®]) eingesetzt.

Im Rahmen einer Zulassungsstudie sollte Tergurid in *in vitro* Experimenten untersucht werden. Ziel war es, für den Arzneistoff Tergurid ein an Serotonin 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}-, 5-HT₇-Rezeptoren; α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -, α_{2C} -Adrenozeptoren und Histamin H₁-Rezeptoren umfassendes Affinitätsprofil zu erstellen. Die ermittelten Rezeptoraffinitäten, verglichen mit denen von Referenzsubstanzen für den jeweiligen Rezeptorsubtyp, sollten Auskunft über das pharmakologische Profil von Tergurid geben.

Um beurteilen zu können, wie schnell sich das Wirkstoff-Rezeptor-Gleichgewicht zwischen Tergurid (0.01 μM) und endothelialen 5-HT_{2B}-Rezeptoren einstellt (Assoziation), wurden Inkubationsexperimente durchgeführt. Im Gegenzug sollte die Beständigkeit dieses Gleichgewichts anhand von Auswaschexperimenten (Dissoziation) überprüft werden. Im Hinblick auf ein mögliches mitogenes Potenzial (siehe Kapitel 1.6.) wurden zusätzlich die mutmaßlichen Metaboliten von Tergurid (*N*''-Monodesethyltergurid und 6-Nortergurid; Hümpel *et al.*, 1984 (für Lisurid exemplarisch); Förster, 1987) und 8 β -Tergurid an 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren untersucht.

3.2.2.1. Effekte an 5-HT_{2A}-Rezeptoren

Tergurid (1 nM bis 0.1 μM) verursachte keine Kontraktion der Schweinekoronararterie (nicht gezeigt). Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Newman-Tancredi *et al.* (2002b), die Partialagonismus für Tergurid an rekombinanten h5-HT_{2A}-Rezeptoren in CHO-Zellen nachweisen konnten ($pEC_{50} = 7.62$). In den vorliegenden Experimenten antagonisierte Tergurid (1 nM) die 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelte Kontraktion der Koronararterie durch 5-HT. Der Antagonismus ist als

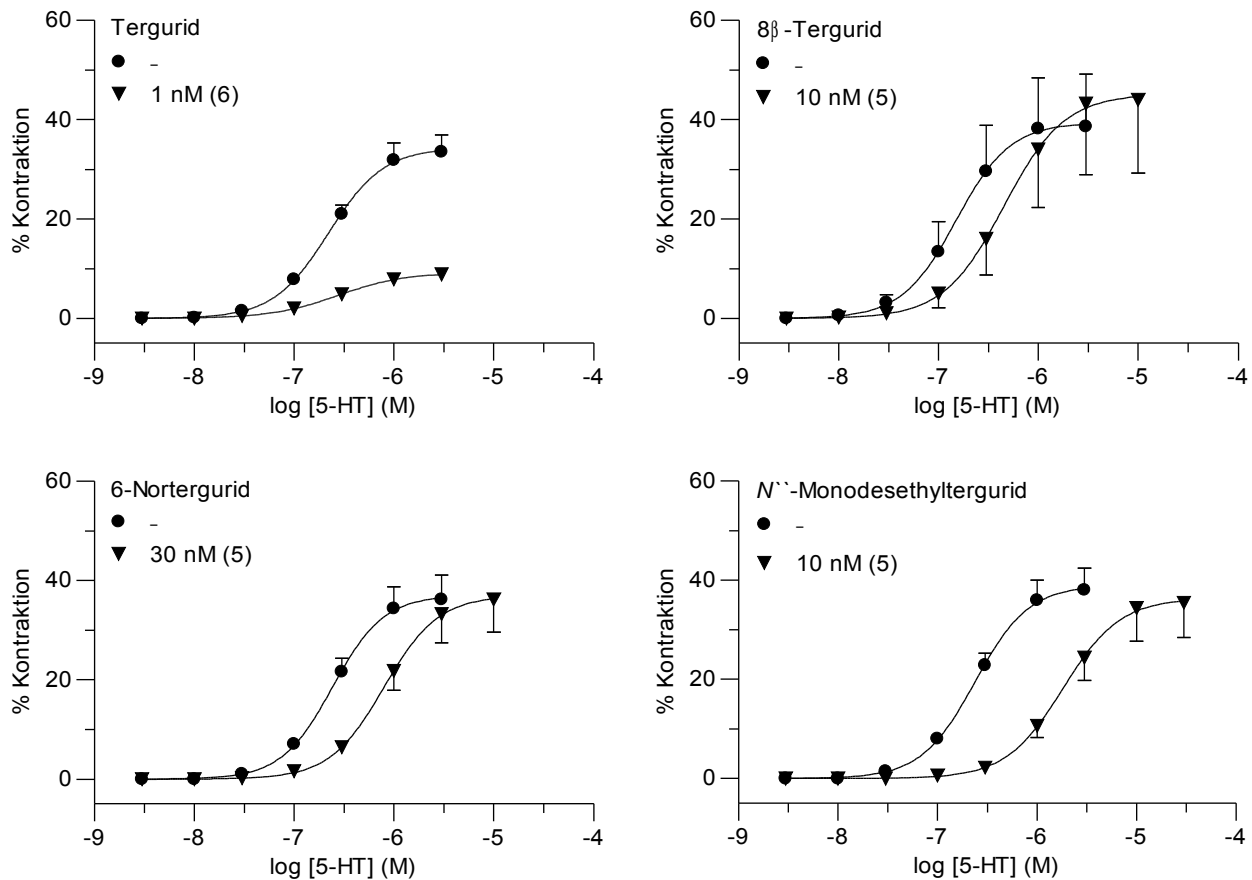


Abbildung 25: *E/[A]*-Kurven von 5-HT in Ab- oder Anwesenheit von Tergurid, 8 β -Tergurid, 6-Nortergurid und *N*''-Monodesethyltergurid an der Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren). Dargestellt sind die kontraktilen Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf KCl (50 mM) von (*n*) Tieren.

nicht-kompetitiv anzusehen, da die $E/[A]$ -Kurve für 5-HT in Anwesenheit von Tergurid (1 nM) nicht rechtsverschoben wurde, dafür der Maximaleffekt aber deutlich reduziert war (Abbildung 25). Die Metaboliten und das Epimer von Tergurid (N'' -Monodesethyltergurid, 6-Nortergurid und 8 β -Tergurid) zeigten ebenfalls keine agonistischen Effekte. Diese Verbindungen antagonisierten die 5-HT-vermittelte Kontraktion ohne Depression des Maximaleffekts und zeichneten sich im Vergleich zu Tergurid durch eine geringere antagonistische Potenz aus (Abbildung 25).

Die Effekte von Tergurid, den Metaboliten und 8 β -Tergurid sind gemeinsam mit dem Wert für Ketanserin (Referenzantagonist) in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Antagonistische Effekte von Ergolinen und Ketanserin an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schweinekoronararterie.

	<i>n</i>	Konz. (μ M)	pA_2 , pD_2	E_{max}^a	E_{max}^b
Tergurid	6	0.001	9.43 \pm 0.08	9 \pm 1*	34 \pm 4
6-Nortergurid	5	0.03	7.85 \pm 0.04	37 \pm 7	37 \pm 5
N'' -Monodesethyltergurid	5	0.01	7.82 \pm 0.06	36 \pm 7	39 \pm 4
8 β -Tergurid	5	0.01	8.29 \pm 0.03	45 \pm 15	39 \pm 11
Ketanserin ^c			8.88 \pm 0.03 ^d		

E_{max} von 5-HT in %, bezogen auf KCl (50 mM). ^a E_{max} in Anwesenheit und ^b E_{max} in Abwesenheit des Antagonisten, ^cDaten von Jähnichen (2005c), ^d pK_B -Wert, *signifikant verschieden zur 5-HT-Kontrolle ($P < 0.05$). n = Anzahl der Tiere.

3.2.2.2. Effekte an 5-HT_{2B}-Rezeptoren

Tergurid (1 nM bis 1 μ M) rief keine Relaxation der vorkontrahierten Schweinepulmonalarterie hervor und weist somit keine agonistischen Eigenschaften in diesem Gewebe auf (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Daten von Newman-Tancredi *et al.* (2002b) an rekombinanten h5-HT_{2B}-Rezeptoren in CHO-Zellen. Die $E/[A]$ -Kurve für 5-HT war in Anwesenheit von Tergurid (0.01 μ M) deutlich rechtsverschoben und eine Depression des Maximaleffekts von 5-HT beobachtbar (Abbildung 26).

N'' -Monodesethyltergurid und 6-Nortergurid sind wie Tergurid frei von agonistischer Aktivität an 5-HT_{2B}-Rezeptoren. Beide Verbindungen antagonisierten, wenn auch schwächer als Tergurid, die durch 5-HT verursachte Relaxation, ohne Einfluss auf den Maximaleffekt von 5-HT zu haben. Im Gegensatz dazu ergaben hohe Konzentrationen von 8 β -Tergurid (1 μ M) geringfügige Relaxationen, die in Anwesenheit von SB204741 (3 μ M) signifikant reduziert waren (nicht gezeigt, Tabelle 12). Wie für einen Partialagonisten zu erwarten, hemmte 8 β -Tergurid (0.03 μ M), die durch 5-HT

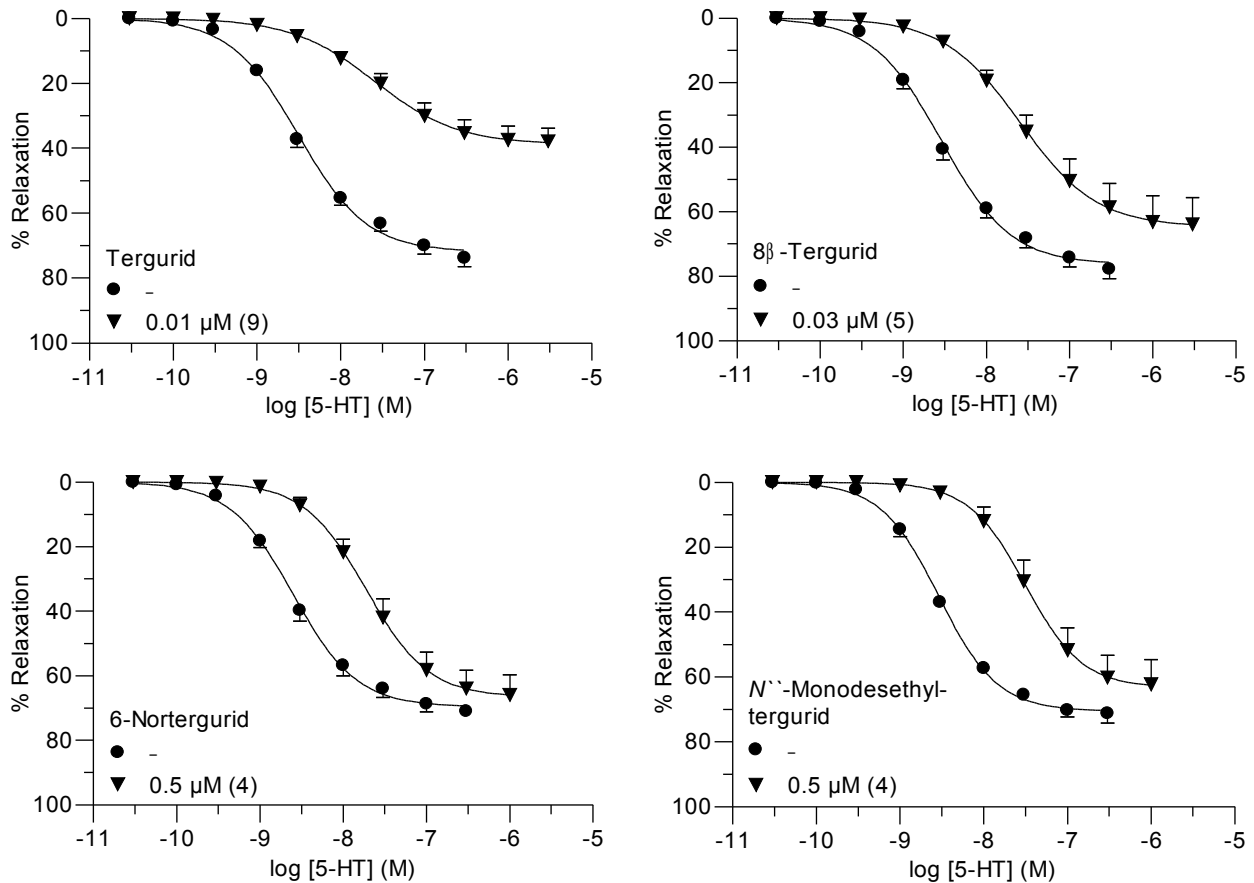


Abbildung 26: $E/[A]$ -Kurven von 5-HT in Ab- oder Anwesenheit von Tergurid, 8β -Tergurid, 6-Nortergurid und N'' -Monodesethyltergurid an der Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B} -Rezeptoren). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf die maximale Relaxation induziert durch 5-HT und Bradykinin ($0.01 \mu\text{M}$) von (n) Tieren.

ausgelöste Relaxation an 5-HT_{2B} -Rezeptoren (Abbildung 26).

Die Effekte von Tergurid, den Metaboliten und 8β -Tergurid sind gemeinsam mit dem Wert für SB204741 (Referenzantagonist) in Tabelle 12 zusammengefasst.

Inkubationsexperimente ergaben, dass sich das thermodynamische Gleichgewicht zwischen Tergurid und den endothelialen 5-HT_{2B} -Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie sehr schnell einstellt. Die respektiven $E/[A]$ -Kurven für 5-HT in Anwesenheit von Tergurid ($0.01 \mu\text{M}$), gemessen nach 10, 20 und 30 min, unterschieden sich nicht in pEC_{50} und E_{max} (One-way-ANOVA $P > 0.05$, $n = 4 - 5$) von denen, die nach 5 und 60 min aufgezeichnet wurden. Auf die entsprechenden $E/[A]$ -Kontrollkurven für 5-HT nach 5, 10, 20, 30 und 60 min trifft das Gleiche zu (One-way-ANOVA $P > 0.05$, $n = 4 - 5$). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich die Resonanz der Organe über den Zeitraum von 60 min nicht signifikant verändert. In Abbildung 27 sind die $E/[A]$ -Kurven für die Bestimmung nach 5 und 60 min Inkubationszeit angegeben.

Tabelle 12: Antagonistische Effekte von Ergolinen und SB204741 sowie Agonismus von 8 β -Tergurid an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie.

Antagonismus	<i>n</i>	Konz. (μ M)	pA_2	E_{max}^a	E_{max}^b
Tergurid	9	0.01	8.87 ± 0.06	39 ± 4	73 ± 3
6-Nortergurid	4	0.5	7.11 ± 0.08	67 ± 6	70 ± 2
<i>N</i> '-Monodesethyltergurid	4	0.5	7.30 ± 0.02	63 ± 7	71 ± 3
8 β -Tergurid	5	0.03	8.39 ± 0.09	65 ± 8	74 ± 3
SB204741 ^c			6.59 ± 0.07^d		
Agonismus	<i>n</i>	Konz. (μ M)	E_{max}^e	E_{max}^f	E_{max}^b
8 β -Tergurid	6	1	16 ± 3	$7 \pm 1^*$	69 ± 5

E_{max} des Agonisten (5-HT oder 8 β -Tergurid) in %, bezogen auf maximale Relaxation induziert durch den Agonisten und Bradykinin (0.01 μ M). ^a E_{max} von 5-HT in Anwesenheit und ^b E_{max} in Abwesenheit des Antagonisten oder Partialagonisten, ^cDaten von Glusa und Pertz (2000), ^d pK_B -Wert, ^e E_{max} von 8 β -Tergurid, ^f E_{max} von 8 β -Tergurid in Anwesenheit von SB204741 (3 μ M), *signifikant verschieden zu 8 β -Tergurid in Abwesenheit von SB204741 ($P < 0.05$). n = Anzahl der Tiere.

In den Auswaschexperimenten wurde Tergurid (0.01 μ M) vor Beginn der Spülphase für 30 min inkubiert. Sämtliche $E/[A]$ -Kurven für 5-HT (mit und ohne Terguridbehandlung) wiesen nach 15, 30, 45 und 60 min diskontinuierlicher Spülung keinen Unterschied in pEC_{50} und E_{max} zu den $E/[A]$ -Kontrollkurven für 5-HT nach 0 min Spülung auf (One-way-ANOVA, $P > 0.05$, $n = 4$). Unter diesen Bedingungen dissoziiert Tergurid somit ungewöhnlich schnell aus dem Rezeptorkompartiment. Dass der Spülprozess keinen signifikanten Einfluss auf die Ermittlung der Ergebnisse hatte, konnte

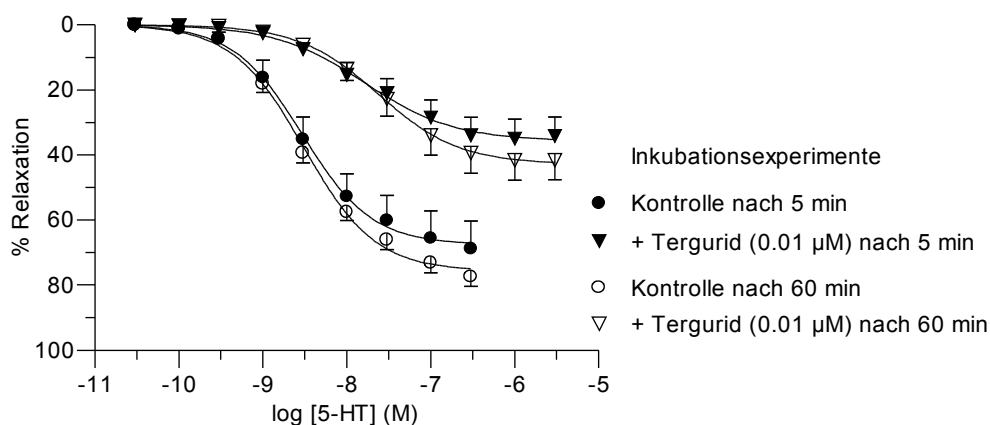


Abbildung 27: $E/[A]$ -Kurven von 5-HT in Ab- oder Anwesenheit von Tergurid nach 5 oder 60 min Inkubation an der Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B}-Rezeptoren). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf die maximale Relaxation induziert durch 5-HT und Bradykinin (0.01 μ M) von jeweils $n = 5$ Tieren.

anhand der Kongruenz der $E/[A]$ -Kontrollkurven für 5-HT gezeigt werden. In Abbildung 28 sind die $E/[A]$ -Kurven für die Bestimmung nach 0 und 15 min Spülzeit angegeben.

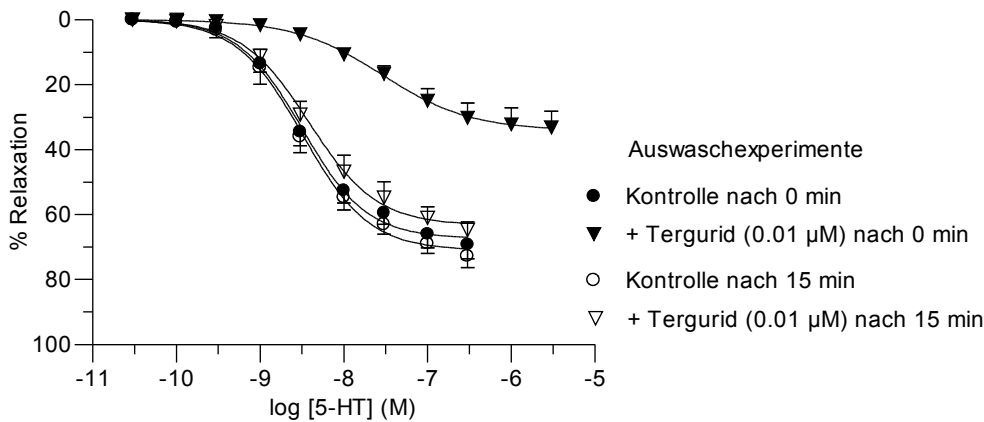


Abbildung 28: Antagonisierung der 5-HT-induzierten Relaxation der Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B}-Rezeptoren) durch Tergurid. Nach 30 min Inkubation von Tergurid folgte eine 0 oder 15 min Spülphase. Anschließend wurden die Gefäße mit U46619 (0.01 μM) kontrahiert und eine $E/[A]$ -Kurven mit 5-HT aufgezeichnet. Dargestellt sind die relaxierenden Effekte (Mittelwerte ± SEM) in %, bezogen auf die maximale Relaxation induziert durch 5-HT und Bradykinin (0.01 μM) von jeweils $n = 4$ Tieren.

3.2.2.3. Effekte an 5-HT₇-Rezeptoren

Tergurid (3 nM) zeigte keine agonistischen Eigenschaften an der mit PGF_{2α} (1 μM) vorkontrahierten Pulmonalarterie vom Absetzferkel (Läuferschwein). Tergurid antagonisierte die durch 5-CT vermittelte endothelunabhängige Gefäßrelaxation ohne Depression des Maximaleffekts (Abbildung 29). Der pA_2 -Wert ist gemeinsam mit dem Wert für SB269970 (Referenzantagonist) in Tabelle 13 zusammengefasst.

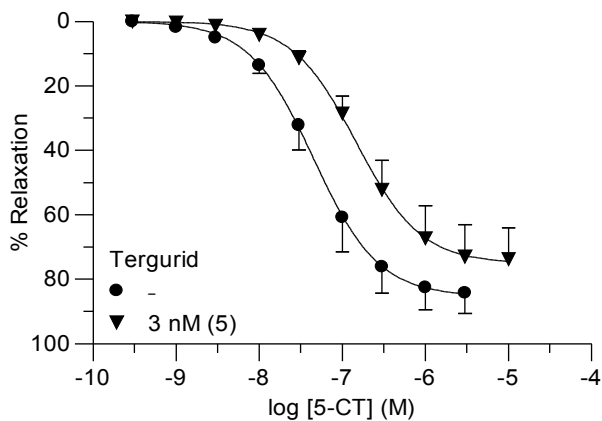


Abbildung 29: $E/[A]$ -Kurven von 5-CT in Ab- oder Anwesenheit von Tergurid an der Schweinepulmonalarterie ohne Endothel (5-HT₇-Rezeptoren). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte (Mittelwerte ± SEM) in %, bezogen auf die dritte durch PGF_{2α} (1 μM) induzierte Kontraktion von (n) Tieren.

Tabelle 13: Antagonistische Effekte von Tergurid und SB269970 an 5-HT₇-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie nach Endothelentfernung.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	<i>pA</i> ₂	<i>E</i> _{max} ^a	<i>E</i> _{max} ^b
Tergurid	5	0.003	8.82 ± 0.08	75 ± 10	86 ± 6
SB269970 ^c			8.50 ± 0.03 ^d		

*E*_{max} von 5-CT in %, bezogen auf PGF_{2α} (1 μM). ^a*E*_{max} in Anwesenheit und ^b*E*_{max} in Abwesenheit des Antagonisten, ^cDaten von Jähnichen (2005c), ^d*pK*_B-Wert. *n* = Anzahl der Tiere.

3.2.2.4. Effekte an α_{1A}-, α_{1B}- und α_{1D}-Adrenozeptoren

Diese *in vitro* Experimente wurden von Herrn Dr. Sven Jähnichen durchgeführt und dienen der Vollständigkeit der vorliegenden Arbeit. Die Experimente an α_{1B}-Adrenozeptoren wurden an der Meerschweinchenmilz durchgeführt.

Tergurid zeigte an keinem der drei untersuchten α₁-Adrenozeptorsubtypen (α_{1A}, α_{1B} und α_{1D}) agonistische Effekte und ist daher ein stiller Antagonist in den verwendeten *in vitro* Modellen (nicht gezeigt). Tergurid (0.1 μM) antagonisierte die Noradrenalin-induzierte Kontraktion in jedem Gewebe mit vergleichbarer antagonistischer Potenz und besitzt demzufolge keine differenzierenden Eigenschaften unter den α₁-Adrenozeptorsubtypen. Der *pA*₂-Wert für Tergurid (*pA*₂ = 7.81) an α_{1A}-Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie ist in guter Übereinstimmung zum *pA*₂-Wert (*pA*₂ = 8.00) ermittelt an rekombinanten hα_{1A}-Adrenozeptoren in CHO-Zellen (Newman-Tancredi *et al.*, 2002a).

Die *pA*₂-Werte sind gemeinsam mit den Werten für die Referenzantagonisten in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Antagonistische Effekte von Tergurid und dem respektiven Referenzantagonisten an α_{1A}-Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie, α_{1B}-Adrenozeptoren der Meerschweinchenmilz und α_{1D}-Adrenozeptoren der Rattenaorta.

	α _{1A}	α _{1B}	α _{1D}
Tergurid	7.81 ± 0.07	7.73 ± 0.04	7.90 ± 0.06
B8805-033	7.87 ± 0.03 ^a		
Prazosin		8.81 ± 0.06 ^a	
BMY7378			8.10 ± 0.06 ^a

^a*pK*_B-Wert, alle Werte von Jähnichen (2005c).

3.2.2.5. Effekte an α_{2C} -Adrenozeptoren

Tergurid (1 nM) verursachte keine Kontraktion der Schweinepulmonalvene und agierte stattdessen als potenter Antagonist am postsynaptischen α_{2C} -Adrenozeptor, ohne eine Depression des Maximaleffekts für UK14304 hervorzurufen (Abbildung 30). Mit einer Affinität im subnanomolaren Bereich ($pA_2 = 9.90$) war Tergurid in diesem Gewebe 6-fach stärker antagonistisch wirksam, als an rekombinanten $h\alpha_{2C}$ -Adrenozeptoren in CHO-Zellen ($pA_2 = 9.07$; Newman-Tancredi *et al.*, 2002a).

Der pA_2 -Wert ist gemeinsam mit dem Wert für Yohimbin (Referenzantagonist) in Tabelle 15 zusammengefasst.

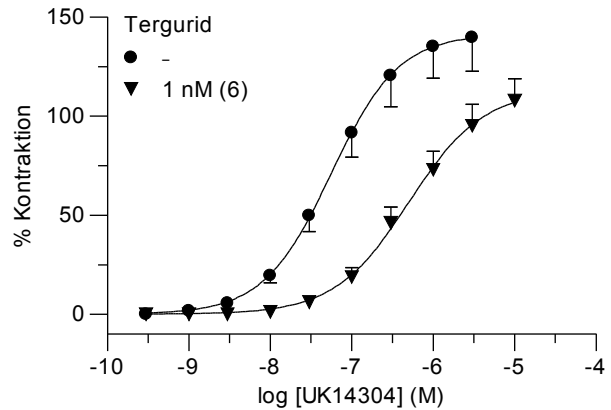


Abbildung 30: $E/[A]$ -Kurven von UK14304 in Ab- oder Anwesenheit von Tergurid, an der Schweinepulmonalvene (α_{2C} -Adrenozeptoren). Dargestellt sind die kontraktile Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf UK14304 (0.3 μ M) von (n) Tieren.

Tabelle 15: Antagonistische Effekte von Tergurid und Yohimbin an α_{2C} -Adrenozeptoren der Schweinepulmonalvene.

	n	Konz. (μ M)	pA_2	E_{max}^a	E_{max}^b
Tergurid	6	0.001	9.90 ± 0.04	113 ± 12	142 ± 18
Yohimbin ^c			9.09 ± 0.05^d		

E_{max} von UK14304 in %, bezogen auf UK14304 (0.3 μ M). ^a E_{max} in Anwesenheit und ^b E_{max} in Abwesenheit von Tergurid, ^cDaten von Görnemann *et al.* (2007), ^d pK_B -Wert. n = Anzahl der Tiere.

3.2.2.6. Effekte an Histamin H_1 -Rezeptoren

Diese *in vitro* Experimente wurden von Herrn Prof. Dr. H. Pertz durchgeführt und dienen der Vervollständigung der vorliegenden Arbeit.

Tergurid (10 μ M) erzeugte eine geringfügige isotonische Kontraktion des Meerschweinchenileums (9 ± 1 % relativ zum Maximaleffekt von Histamin), die vollständig durch Mepyramin (0.01 μ M, selektiver H_1 -Rezeptorantagonist) unterdrückt wurde (nicht gezeigt). Wie für einen Partialagonisten zu erwarten, hemmte Tergurid (10 μ M) die durch Histamin ausgelöste Kontraktion des Ileums (nicht gezeigt). Nach Marano und Kaumann (1976) wurde die Gleichgewichts-Dissoziationskon-

stante für Tergurid am H_1 -Rezeptor ($pK_P = 6.92 \pm 0.05$) berechnet, die in guter Übereinstimmung mit dessen Bindungswert ($pK_i = 6.47$) am Meerschweinchenkleinhirn ist (Millan *et al.*, 2002). Die Affinität des H_1 -Referenzantagonisten Mepyramin beträgt in diesem Modell $pK_B = 9.07 \pm 0.03$ (alle Daten sind von Prof. Pertz).

3.2.2.7. Diskussion

Tergurid ist ein partialsynthetisches 8α -Aminoergolin, welches hohe Bindungsaffinität an dopaminergen, serotonergen und α -adrenergen Monoaminrezeptoren besitzt (Millan *et al.*, 2002). Radioligandbindungsdaten können unter bestimmten Versuchsbedingungen zwar ergeben, ob eine Substanz als Agonist oder Antagonist an einem Rezeptor wirkt, doch kann auf die agonistische und antagonistische Potenz einer Substanz nicht geschlossen werden (Kenakin, 2006). Funktionelle Experimente an Zellen, die rekombinante humane Dopaminrezeptoren, Serotoninrezeptoren oder α -Adrenozeptoren überexprimieren, sind mit Tergurid durchgeführt worden (Newman-Tancredi *et al.*; 2002a, 2002b). Rezeptorüberexpression in Zelllinien, die den Rezeptor gewöhnlich nicht synthetisieren, kann zur Folge haben, dass es nach Rezeptorstimulation zu anomalen Kopplungen zwischen Rezeptor und G-Protein und/oder „receptor-cross-talk“ kommt (Sanders-Bush und Canton, 1995). Als Konsequenz kann die intrinsische Wirksamkeit und/oder die Potenz eines Agonisten in solch einem Testsystem erhöht sein bzw. kann ein Antagonist anschließend in einem System mit höherer Rezeptordichte agonistische Effekte zeigen (Hoyer und Boddeke, 1993). Daher können Studien an Zellen, die mit humanen Rezeptoren transfiziert sind, nicht immer die physiologische Situation widerspiegeln. Die gegensätzlichen Ergebnisse von Tergurid an Serotonin 5-HT_{2A}-Rezeptoren bestätigen die Problematik.

Aus den genannten Gründen und um die Datenlage zu erweitern, wurden ergänzend Experimente an physiologisch intaktem tierischen Gewebe durchgeführt. Ob Tergurid agonistische oder antagonistische Wirksamkeit an 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}-, 5-HT₇-Rezeptoren, α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -, α_{2C} -Adrenozeptoren und Histamin H_1 -Rezeptoren zeigt, konnte durch dessen Testung an verschiedenen Arterien unterschiedlicher Spezies, der Schweinepulmonalvene sowie der Meerschweinchenmilz und des Meerschweinchenileums verifiziert werden.

Tergurid war, mit Ausnahme des H_1 -Rezeptors, frei von agonistischer Wirksamkeit an den verwendeten Rezeptormodellen. Stattdessen verhielt sich Tergurid in den getesteten Konzentrationen als potenter Antagonist, der die durch Referenzagonisten vermittelten Effekte inhibierte und Affinitäten im nanomolaren und subnanomolaren Bereich zeigte ($pA_2 = 7.73$ bis 9.90).

Für die Verwendung von Ergolinen als Arzneimittel ist das Ausbleiben agonistischer Effekte an 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren von Bedeutung (siehe Kapitel 1.6.). Sowohl Tergurid als auch seine

mutmaßlichen Metaboliten (*N*'-Monodesethyltergurid und 6-Nortergurid) sind keine Agonisten an diesen Rezeptoren. Die Metaboliten sind ca. 40-fach schwächer wirksam als die Muttersubstanz und sollten nach ihrer Entstehung nur geringfügig, wenn überhaupt, zum pharmakologischen Effekt von Tergurid an diesen Rezeptoren beitragen. Im Gegensatz dazu scheint in diesem Fall die sterische Stellung der Aminogruppe in Position C(8) des Ergolinmoleküls eine Determinante für Agonismus an 5-HT_{2B}-Rezeptoren zu sein, da das Epimer 8β-Tergurid geringfügige Relaxationen der Schweinepulmonalarterie verursachte (siehe auch Kapitel 3.2.1.4.). Dieser relaxierende Effekt kann im Bezug auf die pharmakologische Beurteilung von Tergurid mit niedrigster Priorität eingestuft werden, da die Epimerisierung von 8α- zu 8β-Tergurid *in vivo* aufgrund der Molekülstruktur von Tergurid (fehlende Doppelbindung in C(9) und keine Carbonsäurefunktion in C(8)) nicht möglich ist. In zwei Studien konnte zudem die Stabilität von Lisurid, dem 9,10-Didehydroderivat von Tergurid, gezeigt werden. Sowohl nach 24-stündigem Einwirken von Kaliumhydroxid im Gemisch Pyridin-Ethanol-Wasser, als auch während der Lagerung trat keine Epimerisierung von Lisurid an C(8) ein (Zikán und Semonský, 1959; Kvasnička *et al.*, 2005).

Die Inkubations- und Auswaschexperimente ergaben, dass sich der maximal beobachtbare Effekt von Tergurid (0.01 μM) an endothelialen 5-HT_{2B}-Rezeptoren bereits nach 5 min einstellte (Rezeptor-onset) und die antagonistische Wirkung schon nach 15 min Spülung reversibel aufgehoben war (Rezeptor-offset). Die für Tergurid ermittelte Kinetik ist für ein Ergolin ungewöhnlich schnell und steht im Gegensatz zu publizierten Daten anderer Ergolinderivate. Einzelkonzentrationen von Ergotamin, Dihydroergotamin, Ergovalin benötigten mindestens 20 min bis der gemessene Effekt (Gefäßkontraktion) das Gleichgewicht erreichte (Østergaard *et al.*, 1981; MaassenVanDenBrink *et al.*, 1998; Müller-Schweinitzer, 1980; Schöning *et al.*, 2001). Dieser Gegensatz kann sowohl aus den strukturellen Unterschieden zwischen Tergurid und den Ergopeptinen, als auch aus der endothelialen Lage des 5-HT_{2B}-Rezeptor herrühren. Deutlich größer war der zeitliche Unterschied bezüglich der Reversibilität der gemessenen Effekte. Ergopeptine sind im Vergleich zu Tergurid gewissermaßen auswaschresistent, da auch nach 60 min Spülung der induzierte Effekt (Kontraktion) annähernd unverändert Bestand hatte (Østergaard *et al.*, 1981; MaassenVanDenBrink *et al.*, 1998; Müller-Schweinitzer, 1980; Schöning *et al.*, 2001). Zum selben Ergebnis kommen Tfelt-Hansen *et al.* (1995), die *in vivo* eine persistierende Kontraktion der humanen Beinarterien zeigen konnten, obwohl Ergotamin (0.5 mg i.m.) im Blut nicht mehr nachweisbar war (Plasmahalbwertszeit von Ergotamin: 120 min vs. Halbwertszeit der Kontraktion: 600 min). Dieser durch Ergopeptine erzeugte langanhaltende Effekt wird mit deren langsamer Dissoziation vom Rezeptor begründet (Jähnichen, 2005c; MaassenVanDenBrink *et al.*, 1998; Schöning *et al.*, 2001) und steht im völligen Kontrast zu den für Tergurid ermittelten Resultaten. Bezüglich der Auswaschexperimente kann ebenfalls vermu-

tet werden, dass die strukturellen Unterschiede zwischen Tergurid und den Ergopeptinen sowie die endotheliale Lage des 5-HT_{2B}-Rezeptors, Einfluss auf die unterschiedliche Kinetik haben. Ob die Exprimierung des 5-HT_{2B}-Rezeptors, endothelial oder glattmuskulär, möglicherweise entscheidenden Einfluss auf die Assoziation bzw. Dissoziation von Tergurid zum bzw. vom Rezeptor hat, muss in weiteren Experimenten am glattmuskulären 5-HT_{2B}-Rezeptor des Rattenvormagens (Baxter *et al.*, 1994) bestätigt werden.

Tergurid ist ein Antagonist an α -adrenergen Rezeptoren. Mit ca. 100-facher Präferenz für α_{2C} -Adrenozeptoren gegenüber den α_1 -Adrenozeptorsubtypen antagonisierte Tergurid die α -Adrenozeptoragonist-induzierten Kontraktionen. Dass Ergoline zwischen den α_1 -Adrenozeptorsubtypen nicht diskriminieren, scheint ein Klasseneffekt der Substanzklasse zu sein (Görnemann *et al.*, 2008a), welcher zumindest für Tergurid an rekombinanten α_2 -Adrenozeptoren ebenfalls zutrifft (Newman-Tancredi *et al.*, 2002a).

Tergurid ist ein Partialagonist mit geringer intrinsischer Aktivität und mittlerer Affinität an H₁-Rezeptoren des Meerschweinchenileums. Die Experimente an diesem Rezeptor waren von Interesse, da Lisurid (9,10-Didehydrotergurid) als potentester H₁-Partialagonist in diesem Gewebe beschrieben wurde (Pertz *et al.*, 2006). Unter klinischen Aspekten kann damit gerechnet werden, dass keine (anti)histaminergen Wirkungen am Menschen auftreten, da die empfohlene Dosis von Tergurid bei 1 mg (p.o.) pro Tag liegt (Nihon Schering KK, Japan, 2005).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Tergurid als Arzneistoff zur Therapie verschiedener Krankheiten potenziell eingesetzt werden kann.

Von großem Interesse ist die Verwendung von Tergurid zur symptomatischen Behandlung des Raynaud-Syndroms, einer Gefäßerkrankung, die sich durch reversible Kontraktionen der distalen Arterien und Arteriolen in Fingern oder/und Zehen auszeichnet und durch Kälte beeinflusst wird (Herrick, 2005; Boin und Wigley, 2005). In der Pathogenese dieser Erkrankung spielen kontraktile α_2 -Adrenozeptoren, neben anderen Faktoren, eine Schlüsselrolle. Beim Menschen führte die kältevermittelte Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren zu vasospastischen Attacken in den Fingern (Freedman *et al.*, 1995). An der Mausschwanzarterie, einem geeigneten Modell der kutanen Zirkulation, bewirkte Kälteeinfluss (28 °C), dass α_{2C} -Adrenozeptoren, die unter Normalbedingungen (37 °C) ohne Funktion waren, dann beachtlich das Gefäß kontrahierten (Chotani *et al.*, 2000). Dieser Mechanismus der Hochregulierung der α_{2C} -Adrenozeptoren basiert auf einer kältevermittelten (28 °C) Translokation der α_{2C} -Adrenozeptoren vom Golgi-Apparat zur Zellmembran und führt damit zu einer Demaskierung der funktionellen Ansprechbarkeit dieses Rezeptorsubtyps (Jeyarai *et al.*, 2001). Als potenter α_{2C} -Adrenozeptorantagonist stellt Tergurid eine neue medikamentöse Therapieoption zur Behandlung des Raynaud-Syndroms dar.

Serotonin verfügt unter anderem über mitogene Eigenschaften, was sich dadurch offenbart, dass Aktivierung von 5-HT_{2B}- und vermutlich 5-HT_{2A}-Rezeptoren in Herzklappen bzw. 5-HT_{2B}-Rezeptoren in der Lungenarterie zu vermehrter Proliferation von Zellen führen kann (siehe Kapitel 1.6.). Tergurid ist an beiden Rezeptorsubtypen ein potenter Antagonist und weist Rezeptoraffinitäten im nanomolaren Bereich auf. Aufgrunddessen, dass die proliferativen Eigenschaften von 5-HT vorwiegend durch den 5-HT_{2B}-Rezeptorsubtyp vermittelt werden, zu dem Tergurid eine günstige Kinetik besitzt (siehe oben), stellt Tergurid eine neue Option zur Prävention und Behandlung 5-HT_{2B}-Rezeptor-vermittelter fibrotischer Gewebeveränderungen dar, die zum Beispiel mit Herzklappenschäden oder/und arterieller Lungenhypertonie einhergehen.

Ob Tergurid in seiner Eigenschaft als 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptorantagonist zur medikamentösen Prophylaxe von Migräneattacken eingesetzt werden kann, muss bezüglich der Entstehung der Migräneattacke noch hinreichend untersucht werden. Derzeit wird angenommen, dass die Freisetzung von Serotonin aus perivaskulären Neuronen und/oder Thrombozyten die arteriellen Cranialgefäße endothelabhängig durch 5-HT_{2B}- und/oder endothelunabhängig durch 5-HT₇-Rezeptoren dilatieren lässt (siehe Kapitel 1.2.2.). Die auf diesem Weg induzierbare Migräneattacke ließe sich durch Blockade dieser Serotoninrezeptorsubtypen abschwächen oder im Idealfall verhindern. Im Gegensatz zu ihrem prophylaktischen Potenzial, sind 5-HT_{2B}- und/oder 5-HT₇-Rezeptorantagonisten während einer Migräneattacke wirkungslos, da die Gefäße bereits dilatiert sind und freigesetztes CGRP und NO den weiteren Verlauf der Migräne beeinflussen (siehe Kapitel 1.2.2.).

Die angesprochenen Erkrankungen (Hyperprolaktinämie, Raynaud-Syndrom, fibrotische Gewebeveränderungen und Migräne), die potenziell mit Tergurid behandelbar wären, bedürfen abhängig von deren Schweregrad einer Dauertherapie, da die Erkrankungen gegenwärtig entweder nicht heilbar sind (Raynaud-Syndrom, Migräne) oder durch inoperable Tumoren verursacht werden können (Hyperprolaktinämie, fibrotische Gewebeveränderungen). Im Rahmen einer verbesserten Patientencompliance und einer erhöhten Arzneimittelsicherheit, wäre die transdermale Applikation von Tergurid in der Dauertherapie zu bevorzugen.

3.2.3. Neue 8 α -Aminoergoline - Pharmakologisches Profil und Vergleich zu deren Muttersubstanzen Lisurid und Tergurid

Ausgehend von Lisurid und Tergurid, zwei partialsynthetischen 8 α -Aminoergolinen, konnten durch gezielte, chemische Modifikationen an N(1), N(6), C(2), C(8), C(10) und/oder der Harnstoffstruktur neue Ergolinderivate synthetisiert werden. Im Einzelnen waren die möglichen Strukturveränderungen wie folgt: N(1) – Methyl oder Allyl; N(6) – Wasserstoff, Ethyl, Propyl oder Allyl; C(2) – Brom; C(8) – Seitenkette in 8 β -Position; C(10) – Methoxy und/oder an der Harnstoffstruktur – *N,N*-Diisopropyl, *N,N*-Dimethyl, *N*-Monodesethyl oder Ringschluss zu Pyrrolidin bzw. Ringschluss und Ringerweiterung zu Piperidin und Morpholin. Oxtergurid ist ein ringoffenes Derivat von Tergurid (Ring B geöffnet). In welcher Kombination Lisurid oder Tergurid verändert wurden, kann aus Tabelle 16 und Abbildung 31 entnommen werden. Ob die Derivate für die Entwicklung eines neuen Arzneimittels geeignet sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe unterschiedlicher *in vitro*-Monoaminrezeptormodelle pharmakologisch überprüft werden. Neben der Identifizierung eines potenziellen Arzneistoffs, sollte anhand des Rezeptoraffinitätsprofils abgeschätzt werden, ob der Wirkstoffkandidat mit einem transdermalen therapeutischen System appliziert werden kann.

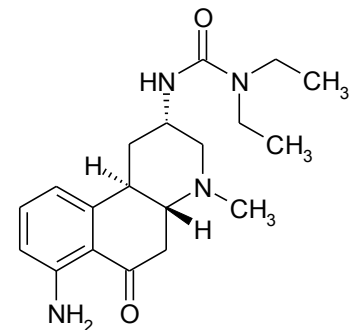
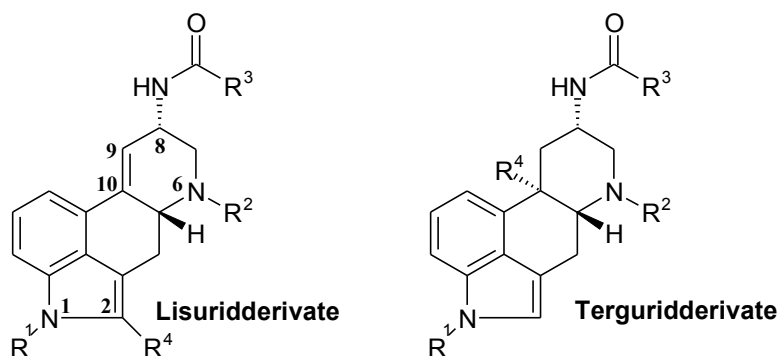


Abbildung 31: Struktur von Oxtergurid.

3.2.3.1. Effekte an 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptoren

Die Tabellen 17, 18 und 19 geben eine Gesamtübersicht über die ermittelten Rezeptoraffinitäten der Ergolinderivate an den drei 5-HT-Rezeptorsubtypen.

Mit Ausnahme von 7 Substanzen, die separat besprochen werden, vermochte keines der Lisurid- und Terguridderivate agonistische Effekte an den drei unterschiedlichen Monoaminrezeptoren hervorzurufen. In den getesteten Konzentrationen antagonisierten die Substanzen, die durch den Referenzagonisten vermittelten Kontraktionen bzw. Relaxationen. Dem Verhalten des respektiven Antagonisten entsprechend, wurde entweder der pA₂- oder der pD₂-Wert als Maß für seine Affinität am entsprechenden Rezeptorsubtyp berechnet. Unter allen Derivaten variierten die Rezeptoraffinitäten über einen großen Bereich, von sehr potentem Antagonismus bis kein messbarer Effekt (maximale Testkonzentration 1 μ M). Dieser Unterschied umfasste für jeden 5-HT-Rezeptorsubtyp mehr als 3 Zehnerpotenzen, wobei die größte Differenz (ca. 5000-fach) an den endothelialen 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie bestimmt werden konnte (1-Methylisurid vs. 1-Allyl-10 α -

Tabelle 16: Strukturformeln der untersuchten Ergolinderivate (Lisurid, Tergurid und deren Abkömmlinge).

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Lisuridderivate				
Lisurid	H	-CH ₃	-N(CH ₃) ₂	H
1-Allyl-6-ethylisurid			-N(CH ₃) ₂	H
1-Methylisurid	-CH ₃	-CH ₃	-N(CH ₃) ₂	H
6-Ethylisurid	H		-N(CH ₃) ₂	H
6-Norlisurid	H	H	-N(CH ₃) ₂	H
8β-Lisurid	H	-CH ₃	-N(CH ₃) ₂	H
Bromergurid	H	-CH ₃	-N(CH ₃) ₂	-Br
Didehydrodipergurid	H	-CH ₃	-N(CH(CH ₃) ₂) ₂	H
Didehydrometergurid	H	-CH ₃	-N(CH ₃) ₂	H
Didehydropipergurid	H	-CH ₃	-N	H
Didehydropyrrogurid	H	-CH ₃	-N	H
Morpholinolisurid	H	-CH ₃	-N	H
N''-Monodesethylisurid	H	-CH ₃	-NHCH ₃	H

Tabelle 16: Strukturformeln der untersuchten Ergolinderivate - Fortsetzung

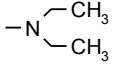
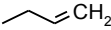

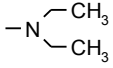
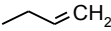

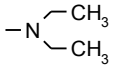
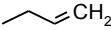
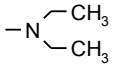
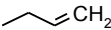
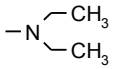
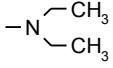
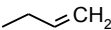
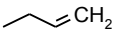
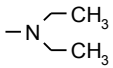

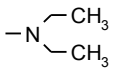
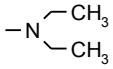
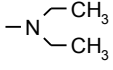
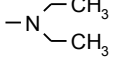
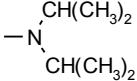



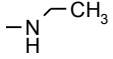
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Terguridderivate				
Tergurid	H	-CH ₃		H
1-Allyl-6-ethyltergurid				H
1-Allyl-6-propyltergurid				H
1-Allyl-10 α -methoxytergurid		-CH ₃		-OCH ₃
1-Allylmetergurid		-CH ₃		H
1-Methyltergurid	-CH ₃	-CH ₃		H
1,6-Diallyltergurid				H
6-Ethyltergurid	H			H
6-Nortergurid	H	H		H
8 β -Tergurid	H	-CH ₃		H
10 α -Methoxytergurid	H	-CH ₃		-OCH ₃
Dipergurid	H	-CH ₃		H
Metergurid	H	-CH ₃		H
Pipergurid	H	-CH ₃		H
Pyrrgurid	H	-CH ₃		H
N`-Monodesethyltergurid	H	-CH ₃		H

Tabelle 17: Antagonistische Effekte von Ergolinen an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schweinekoronararterie.

	<i>n</i>	Konz. (µM)	pA_2, pD_2	E_{max}^a	E_{max}^b
Lisurid ^c			9.40 ± 0.05		
1-Allyl-6-ethylisurid	4	0.1	7.71 ± 0.05	34 ± 4	38 ± 7
1-Methylisurid	5	0.01	8.52 ± 0.02	19 ± 3	34 ± 7
6-Norlisurid	4	0.01	8.84 ± 0.04	17 ± 5	39 ± 6
8β-Lisurid	9	0.01	8.54 ± 0.04	42 ± 6	45 ± 7
Bromergurid	5	0.01	8.64 ± 0.08	31 ± 6	56 ± 5
Didehydrometergurid	4	0.0003	9.50 ± 0.12	30 ± 5	60 ± 3
Didehydropipergurid	6	0.0003	9.54 ± 0.08	30 ± 2	65 ± 4
Didehydropyrrogurid	4	0.001	9.29 ± 0.12	21 ± 4	60 ± 3
Morpholinolisurid	4	0.01	8.20 ± 0.03	19 ± 4	36 ± 8
<i>N</i> '-Monodesethylisurid	5	0.01	8.29 ± 0.03	32 ± 7	37 ± 5
Tergurid	6	0.001	9.43 ± 0.08	9 ± 1	34 ± 4
1-Allyl-6-ethyltergurid	4	0.1	7.28 ± 0.14	54 ± 11	57 ± 5
1-Allyl-10α-methoxytergurid	4	1	< 6.0	-	-
1-Allylmetergurid	4	0.01	8.44 ± 0.10	41 ± 6	60 ± 5
1-Methyltergurid	4	0.03	8.06 ± 0.04	18 ± 4	37 ± 5
6-Nortergurid	5	0.03	7.85 ± 0.04	37 ± 7	37 ± 5
8β-Tergurid	5	0.01	8.29 ± 0.03	45 ± 15	39 ± 11
10α-Methoxytergurid	4	1	5.94 ± 0.12	19 ± 4	35 ± 5
Dipergurid	5	0.01	8.25 ± 0.09	37 ± 4	75 ± 6
Metergurid	7	0.001	9.59 ± 0.07	12 ± 2	55 ± 7
Pipergurid	4	0.001	9.03 ± 0.09	29 ± 3	60 ± 6
Pyrogurid	7	0.003	8.74 ± 0.09	19 ± 3	52 ± 6
<i>N</i> '-Monodesethyltergurid	5	0.1	7.82 ± 0.06	36 ± 7	39 ± 4
Oxtergurid	4	1	6.99 ± 0.04	51 ± 10	62 ± 11

E_{max} von 5-HT in %, bezogen auf KCl (50 mM). ^a E_{max} in Anwesenheit und ^b E_{max} in Abwesenheit des Antagonisten, ^cDaten von Jähnichen (2005c). *n* = Anzahl der Tiere.

Legende zu Tabelle 18: E_{max} von 5-HT in %, bezogen auf die maximale Relaxation induziert durch 5-HT und Bradykinin (0.01 µM). ^a E_{max} in Anwesenheit und ^b E_{max} in Abwesenheit des Antagonisten, ^cDaten von Jähnichen (2005c). *n* = Anzahl der Tiere.

Tabelle 18: Antagonistische Effekte von Ergolinen an 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	<i>pA</i> ₂	<i>E</i> _{max} ^a	<i>E</i> _{max} ^b
Lisurid ^c			10.32 ± 0.10		
1-Allyl-6-ethylisurid	4	0.03	8.40 ± 0.16	61 ± 9	73 ± 10
1-Allylisurid ^c			8.17 ± 0.16		
1-Methylisurid	4	0.001	9.81 ± 0.17	42 ± 8	72 ± 6
6-Ethylisurid	4	0.003	9.16 ± 0.06	43 ± 8	71 ± 9
6-Norlisurid	4	0.05	8.39 ± 0.12	45 ± 10	66 ± 4
8β-Lisurid	4	0.003	9.27 ± 0.11	69 ± 7	77 ± 4
Bromergurid	5	0.01	8.45 ± 0.05	80 ± 2	78 ± 3
Didehydrodipergurid	5	0.005	9.19 ± 0.11	35 ± 3	75 ± 4
Didehydrometergurid	5	0.01	9.14 ± 0.06	34 ± 4	73 ± 5
Didehydropipergurid	5	0.03	8.25 ± 0.08	55 ± 6	73 ± 5
Didehydropyrrogurid	5	0.3	7.59 ± 0.03	66 ± 6	75 ± 5
Morpholinolisurid	4	0.03	7.80 ± 0.14	63 ± 7	75 ± 4
<i>N</i> ''-Monodesethylisurid	6	0.05	8.08 ± 0.05	64 ± 7	73 ± 2
Tergurid	9	0.01	8.87 ± 0.06	39 ± 4	72 ± 3
1-Allyl-6-ethyltergurid	4	0.3	7.33 ± 0.12	81 ± 4	81 ± 2
1-Allyl-6-propyltergurid	5	0.3	6.95 ± 0.12	70 ± 2	73 ± 3
1-Allyl-10α-methoxytergurid	5	1	< 6.0	-	-
1-Allylmetergurid	5	0.1	7.71 ± 0.07	79 ± 4	80 ± 2
1-Allyltergurid ^c			7.67 ± 0.14		
1-Methyltergurid	4	0.03	8.37 ± 0.13	48 ± 2	71 ± 3
1,6-Diallyltergurid	5	1	6.94 ± 0.06	74 ± 3	73 ± 3
6-Ethyltergurid	4	0.02	8.22 ± 0.12	62 ± 10	80 ± 7
6-Nortergurid	4	0.5	7.11 ± 0.08	67 ± 6	70 ± 2
8β-Tergurid	5	0.03	8.39 ± 0.09	65 ± 8	74 ± 3
10α-Methoxytergurid	5	1	6.51 ± 0.28	72 ± 6	82 ± 3
Dipergurid	11	0.01	8.40 ± 0.10	41 ± 7	72 ± 4
Metergurid	11	0.01	8.62 ± 0.08	50 ± 5	71 ± 4
Pipergurid	4	0.1	7.57 ± 0.06	80 ± 3	79 ± 4
Pyrrogurid	5	0.3	6.82 ± 0.06	79 ± 5	77 ± 6
<i>N</i> ''-Monodesethyltergurid	4	0.5	7.30 ± 0.02	63 ± 7	71 ± 3
Oxtergurid	4	1	6.42 ± 0.20	84 ± 2	79 ± 6

Tabelle 19: Antagonistische Effekte von Ergolinen an 5-HT₇-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	p <i>A</i> ₂	<i>E</i> _{max} ^a	<i>E</i> _{max} ^b
Lisurid	5	0.003	9.55 ± 0.18	100 ± 33	122 ± 19
1-Methylisurid	5	0.001	9.98 ± 0.09	73 ± 15	142 ± 5
Didehydrodipergurid	5	0.003	9.42 ± 0.15	122 ± 16	171 ± 16
Didehydrometergurid	4	0.02	8.31 ± 0.11	212 ± 41	170 ± 22
Didehydropipergurid	4	0.02	8.24 ± 0.10	244 ± 52	170 ± 22
Didehydropyrrogurid	5	0.1	7.65 ± 0.18	200 ± 13	171 ± 16
Tergurid	5	0.003	8.82 ± 0.08	75 ± 10	86 ± 6
1-Allyl-6-ethyltergurid	5	0.05	7.83 ± 0.17	109 ± 19	122 ± 16
1-Allyl-6-propyltergurid	5	0.3	6.82 ± 0.23	194 ± 15	138 ± 22
1-Allylmetergurid	4	0.1	8.10 ± 0.13	133 ± 12	125 ± 21
1-Methyltergurid	5	0.001	9.70 ± 0.11	105 ± 17	142 ± 5
1,6-Diallyltergurid	4	0.05	7.98 ± 0.16	123 ± 21	132 ± 16
Dipergurid	7	0.003	8.81 ± 0.12	73 ± 22	104 ± 16
Metergurid	6	0.1	8.07 ± 0.11	140 ± 18	133 ± 20
Pyrrogurid	5	0.3	7.42 ± 0.09	175 ± 30	132 ± 23
Oxtergurid	4	0.1	7.49 ± 0.33	123 ± 12	116 ± 11

*E*_{max} von 5-CT in %, bezogen auf PGF_{2α} (1 μM) oder U46619 (3 nM), ^a*E*_{max} in Anwesenheit und ^b*E*_{max} in Abwesenheit des Antagonisten. *n* = Anzahl der Tiere.

methoxytergurid). Eine ebenso beachtliche Variabilität zeigten die neuen Verbindungen an 5-HT_{2A}- bzw. 5-HT₇-Rezeptoren (ca. 4000-fach bzw. ca. 1500-fach). Dass der Unterschied an 5-HT₇-Rezeptoren nicht größer ist, liegt vermutlich an der kleineren Anzahl getesteter Verbindungen. Als Ergebnis kann festgestellt werden, dass das Einführen und das Weglassen (Monodesethyl-derivate) der oben genannten Substituenten, bis auf wenige Ausnahmen, bzw. die Öffnung der Ringstruktur (Oxtergurid) eine Reduzierung der antagonistischen Potenz zur Folge hatte. Besonders der Austausch des Wasserstoffs an N(1) gegen eine Methylgruppe (1-Methylisurid und 1-Methyltergurid) oder eine Allylgruppe (1-Allylisurid, 1-Allyltergurid, 1-Allyl-6-ethylisurid, 1-Allyl-6-ethyltergurid und 1-Allylmetergurid) verminderte die Affinität im ersten Fall um ca. 8- bzw. 23-fach an 5-HT_{2A}-Rezeptoren und im zweiten Fall um ca. 141-, 16-, 6-, 8- bzw. 8-fach an 5-HT_{2B}-Rezeptoren. Substanzen mit veränderter Harnstoffstruktur oder nach N(1)-Methylierung behielten in der Regel ihre antagonistische Potenz, die im nanomolaren und subnanomolaren Bereich liegt,

entweder an 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Didehydrometergurid, Didehydropyrrogurid, Didehydropipergurid, Metergurid und Pipergurid) oder 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptoren (1-Methylisurid, 1-Methyltergurid, Didehydrometergurid, Didehydrodipergurid, Metergurid und Dipergurid).

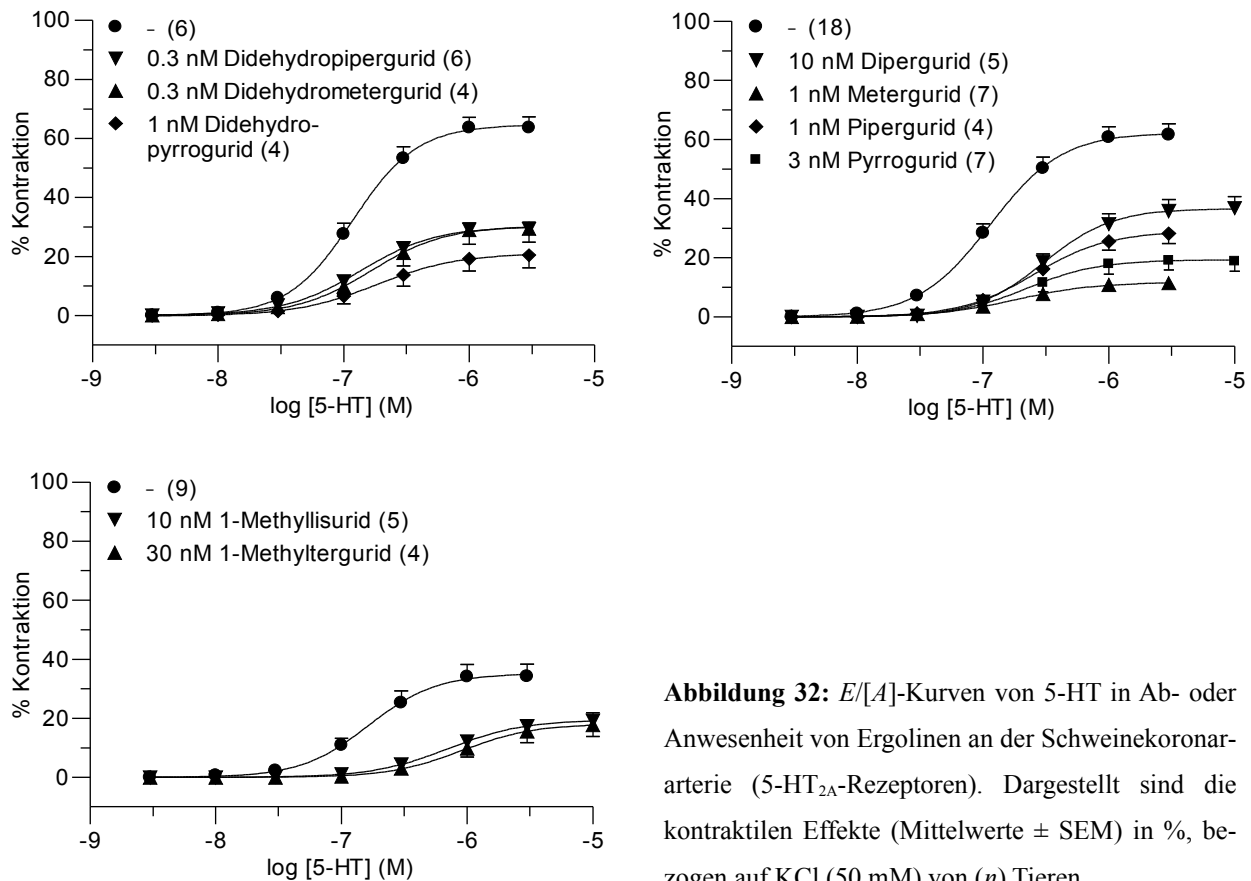


Abbildung 32: *E/[A]*-Kurven von 5-HT in Ab- oder Anwesenheit von Ergolinen an der Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptoren). Dargestellt sind die kontraktilen Effekte (Mittelwerte ± SEM) in %, bezogen auf KCl (50 mM) von (*n*) Tieren.

Im Hinblick auf die chemischen Modifikationen der Ausgangsstrukturen (Lisurid und Tergurid) und die Eigenschaft deutlicher zwischen den 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptoren zu diskriminieren, lassen sich zwei Beobachtungen festhalten. Die in der Harnstoffstruktur ringgeschlossenen Derivate (Didehydropipergurid, Didehydropyrrogurid, Pipergurid und Pyrrogurid) besitzen eine höhere Selektivität für den 5-HT_{2A}-Rezeptor gegenüber 5-HT_{2B}- und teilweise 5-HT₇-Rezeptoren (Tabellen 17, 18 und 19). Die bedeutendsten Steigerungen wurden für Didehydropyrrogurid und Pyrrogurid beobachtet. Die Selektivität der Substanzen an 5-HT_{2A}- zu 5-HT_{2B}-/5-HT₇-Rezeptoren ist wie folgt: Didehydropyrrogurid ca. 50-/44-fach, Pyrrogurid ca. 83-/21-fach, Didehydropipergurid ca. 19-/20-fach und Pipergurid ca. 29-fach zu 5-HT_{2B}-Rezeptoren. Somit scheint ein Ringschluss und insbesondere als Pyrrolidinpartialstruktur Auswirkung auf das Bindungsvermögen der Substanzen an 5-HT_{2B}- bzw. 5-HT₇-Rezeptoren zu haben, da die Affinität an diesen Rezeptoren abnimmt. Lisurid

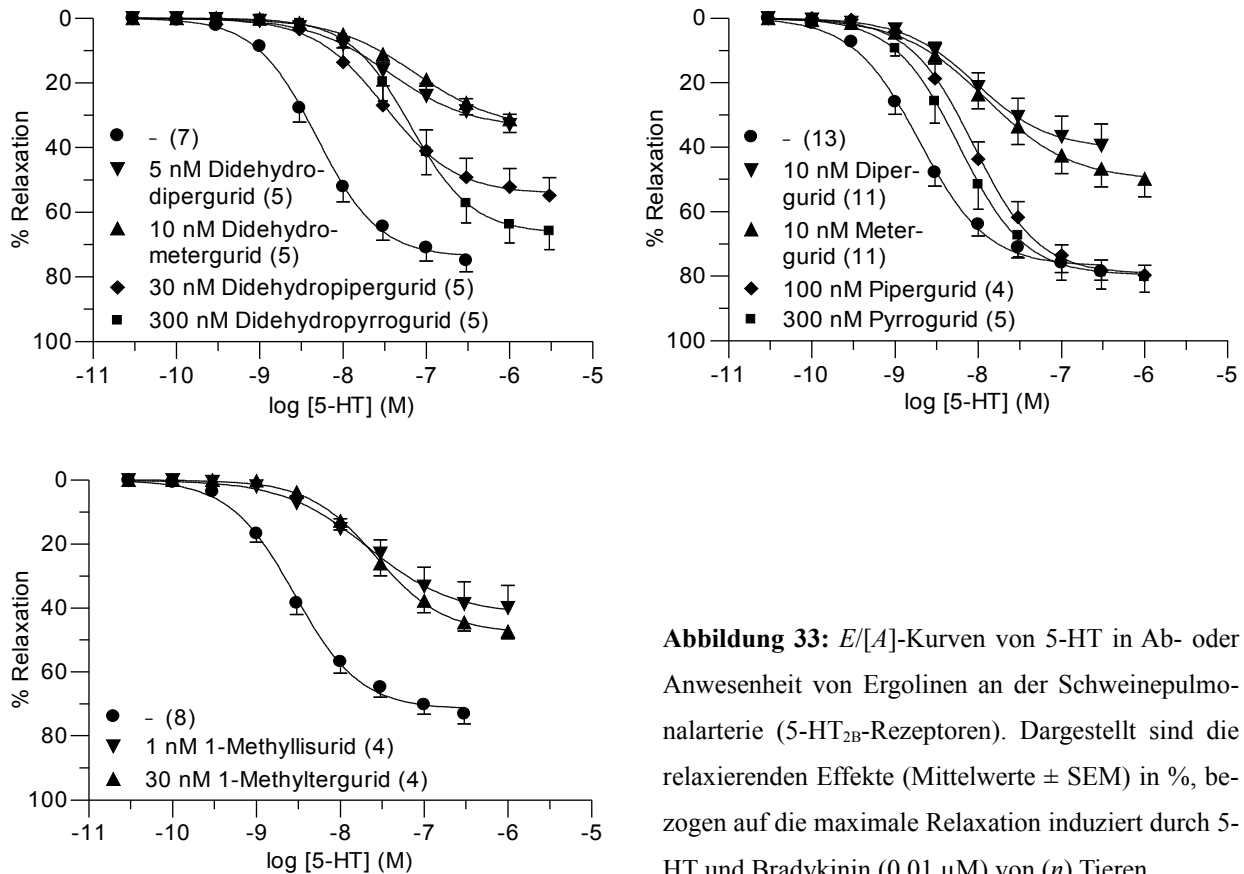


Abbildung 33: $E/[A]$ -Kurven von 5-HT in Ab- oder Anwesenheit von Ergolinen an der Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B} -Rezeptoren). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf die maximale Relaxation induziert durch 5-HT und Bradykinin ($0.01 \mu\text{M}$) von (n) Tieren.

hingegen zeigt eine ca. 8-fach höhere Selektivität zu 5-HT_{2B} -Rezeptoren, die durch Hydrierung der Doppelbindung in $\Delta^{9,10}$ -Position zum Tergurid verloren geht. Weiterhin kann festgehalten werden, dass die Einführung einer Methylgruppe in N(1) (1-Methylisurid und 1-Methyltergurid) eine moderate Erhöhung der Affinität an 5-HT_7 -Rezeptoren gegenüber Lisurid (ca. 3-fach) und Tergurid (ca. 8-fach) zur Folge hatte. Gleichzeitig nahm die Affinität an 5-HT_{2A} -Rezeptoren ab. Die Selektivität für 1-Methylisurid bzw. 1-Methyltergurid an 5-HT_7 - zu 5-HT_{2A} -Rezeptoren ist ca. 29- bzw. 44-fach.

6-Ethyllisurid, Didehydrodipergurid, 6-Ethyltergurid und 1,6-Diallyltergurid riefen kontraktile Effekte an der Schweinekoronararterie hervor (5-HT_{2A} -Rezeptor-Bioassay) und waren 22-, 8- und 3-fach potenter bzw. äquipotent im Vergleich zu 5-HT (Abbildung 35). Nur 6-Ethyllisurid war ein voller Agonist (Tabelle 20). Ketanserin ($0.01 \mu\text{M}$, 5-HT_{2A} -Rezeptorantagonist) verschob die $E/[A]$ -Kurven für die vier Agonisten signifikant nach rechts. Für 6-Ethyltergurid und Didehydrodipergurid konnte kein pA_2 -Wert berechnet werden, da die Kontraktionen durch Ketanserin nicht ausreichend gehemmt wurden. Die Kontraktion des Gefäßes wird offensichtlich nicht (nur) über 5-HT_{2A} -Rezeptoren vermittelt. Der pA_2 -Wert für Ketanserin gegen 5-HT an 5-HT_{2A} -Rezeptoren beträgt in diesem Modell $pA_2 = 8.7$ (Cushing und Cohen, 1993). In diesem Fall ist von Bedeutung, dass Ketanserin

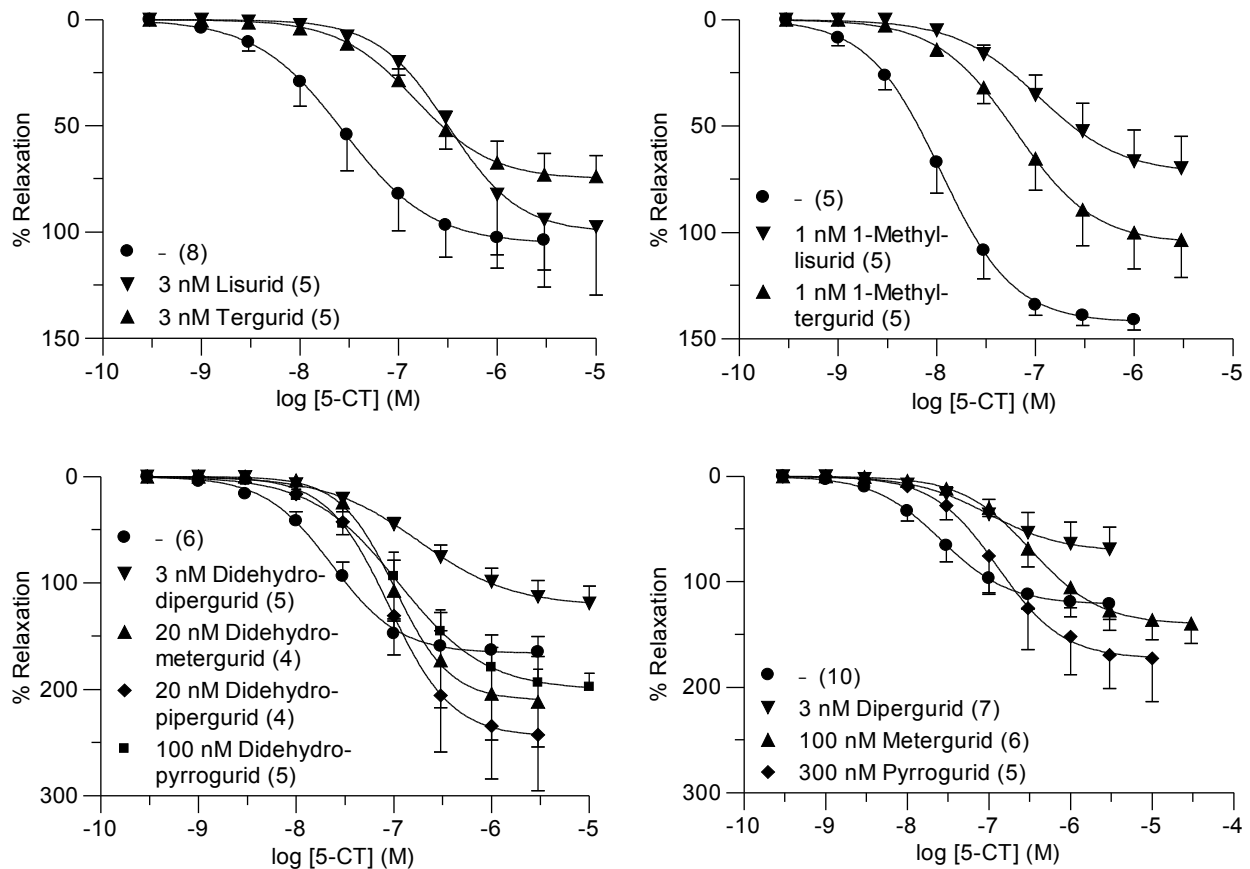


Abbildung 34: $E/[A]$ -Kurven von 5-CT in Ab- oder Anwesenheit von Ergolinderivaten an der Schweinepulmonalarterie ohne Endothel (5-HT₇-Rezeptoren). Dargestellt sind die relaxierenden Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf die dritte durch PGF_{2 α} (1 μ M) oder U46619 (3 nM) induzierte Kontraktion von (n) Tieren.

Tabelle 20: Agonistische Effekte von Ergolinen an der Schweinekoronararterie.

	n	pEC_{50} , pK_p^a	E_{max}^b	E_{max}^c	$\log r^d$, pA_2 (Ketanserin) ^e
6-Ethyllisurid	5	8.01 ± 0.05	37 ± 9^f	54 ± 6	0.54 ± 0.05^g , 8.38 ± 0.08
Didehydrodipergurid	5	7.62 ± 0.01	13 ± 2	42 ± 9	0.22 ± 0.07^g , -
Didehydrodipergurid	4	7.56 ± 0.08	10 ± 1	51 ± 8	$0.99 \pm 0.11^{g,h}$, 8.44 ± 0.13^i
1,6-Diallyltergurid	4	6.47 ± 0.09	13 ± 3	32 ± 4	0.55 ± 0.11^g , 8.38 ± 0.16
6-Ethyltergurid	4	7.29 ± 0.08	34 ± 4	59 ± 4	0.29 ± 0.11^g , -
1-Allyl-6-propyltergurid	6	7.21 ± 0.07^j	9 ± 3	40 ± 7	-

^a pK_p -Wert berechnet nach Marano und Kaumann (1976), ^b E_{max} des Ergolinderivats und ^c E_{max} von 5-HT in %, bezogen auf KCl (50 mM), ^dconcentration ratio der Ergolinderivate gegen Ketanserin (0.01 μ M), ^e pA_2 -Wert für Ketanserin (0.01 μ M), ^fkein Unterschied zur 5-HT-Kontrolle ($P > 0.05$), ^gsignifikante Rechtsverschiebung ($P < 0.05$), ^hconcentration ratio für Didehydrodipergurid gegen Mepyramin (0.03 μ M), ⁱ pA_2 -Wert für Mepyramin (0.03 μ M), ^jDerivat getestet bei 1 μ M. n = Anzahl der Tiere.

ein äquipotenter Antagonist an H_1 -Rezeptoren ist ($pA_2 = 8.53$ am Meerschweinchenileum; Pertz und Elz, 1995), die ebenfalls glattmuskulär an der Schweinekoronararterie exprimiert werden (Hagen und Paegelow, 1979). Die Konzentration des Antagonisten sollte folglich ausreichend gewesen sein, um $5-HT_{2A}$ -Rezeptoren und H_1 -Rezeptoren zu blockieren. Die geringe Rechtsverschiebung der $E/[A]$ -Kurve von Didehydrodipergurid (H_1 -Agonist, siehe unten) in Anwesenheit von Ketanserin ($0.01 \mu M$) bestätigt diese Annahme. Der für Ketanserin ($0.01 \mu M$) gegen 6-Ethyllisurid und 1,6-Diallyltergurid bestimmte pA_2 -Wert ist an diesem Gefäß zu niedrig und befindet sich nur in Näherung zum dem Wert, der durch Cushing und Cohen (1993) bestimmt wurde (Tabelle 20). Die Kontraktionen durch 6-Ethyllisurid und 1,6-Diallyltergurid können rein H_1 -Rezeptor-vermittelt sein (oder eine Kombination aus $5-HT_{2A}$ - und H_1 -Rezeptoren), da der berechnete pA_2 -Wert von Ketanserin an H_1 -Rezeptoren (Pertz und Elz, 1995) mit dem an der Schweinekoronararterie übereinstimmt. Dies muss in weiteren Experimenten gegen Mepyramin und/oder einen anderen $5-HT_{2A}$ -Rezeptorantagonisten überprüft werden. Lisurid, ein Partialagonist an H_1 -Rezeptoren (Pertz *et al.*, 2006), verursachte an der Schweinekoronararterie ebenfalls Kontraktionen, die durch Ketanserin ($0.01 \mu M$) nicht hemmbar waren (Jähnichen, 2005c). Mepyramin ($0.03 \mu M$, selektiver H_1 -Antagonist) antagonisierte die Effekte von Didehydrodipergurid und ergab einen pA_2 -Wert von 8.44 (Abbildung 35, Tabelle 20). Dieser Affinitätswert ist in guter Übereinstimmung mit dem pA_2 -Wert von 8.28 für Mepyramin gegen Histamin, der am H_1 -Rezeptor des Schweinebronchus ermittelt wurde (Görnemann *et al.*, 2008b). 1-Allyl-6-propyltergurid ($1 \mu M$) verursachte ebenfalls Kontraktionen an der Schweinekoronararterie, die durch Ketanserin ($1 \mu M$), nicht aber durch Mepyramin ($1 \mu M$), hemmbar waren (nicht gezeigt, Tabelle 20).

8β -Lisurid und 8β -Tergurid (jeweils $1 \mu M$) induzierten geringfügige Relaxationen der Schweinepulmonalarterie ($5-HT_{2B}$ -Rezeptor-Bioassay, nicht gezeigt). Die durch 8β -Lisurid ($E_{max} = 17 \pm 5 \%$, $n = 5$) verursachten Relaxationen konnten, im Gegensatz zu denen von 8β -Tergurid, durch SB204741 ($3 \mu M$) nicht inhibiert werden (siehe auch Kapitel 3.2.2.2.). Im Falle von 8β -Lisurid ist die Relaxation des Gefäßes nicht $5-HT_{2B}$ -Rezeptor-vermittelt. Eine Beteiligung anderer Rezeptoren muss in weiteren Experimenten bestätigt werden. Wie schon für 8β -Tergurid erwähnt, spielt dieser relaxierende Effekt keine Rolle, da eine Epimerisierung der Muttersubstanzen ausgeschlossen werden kann (siehe Kapitel 3.2.2.7.).

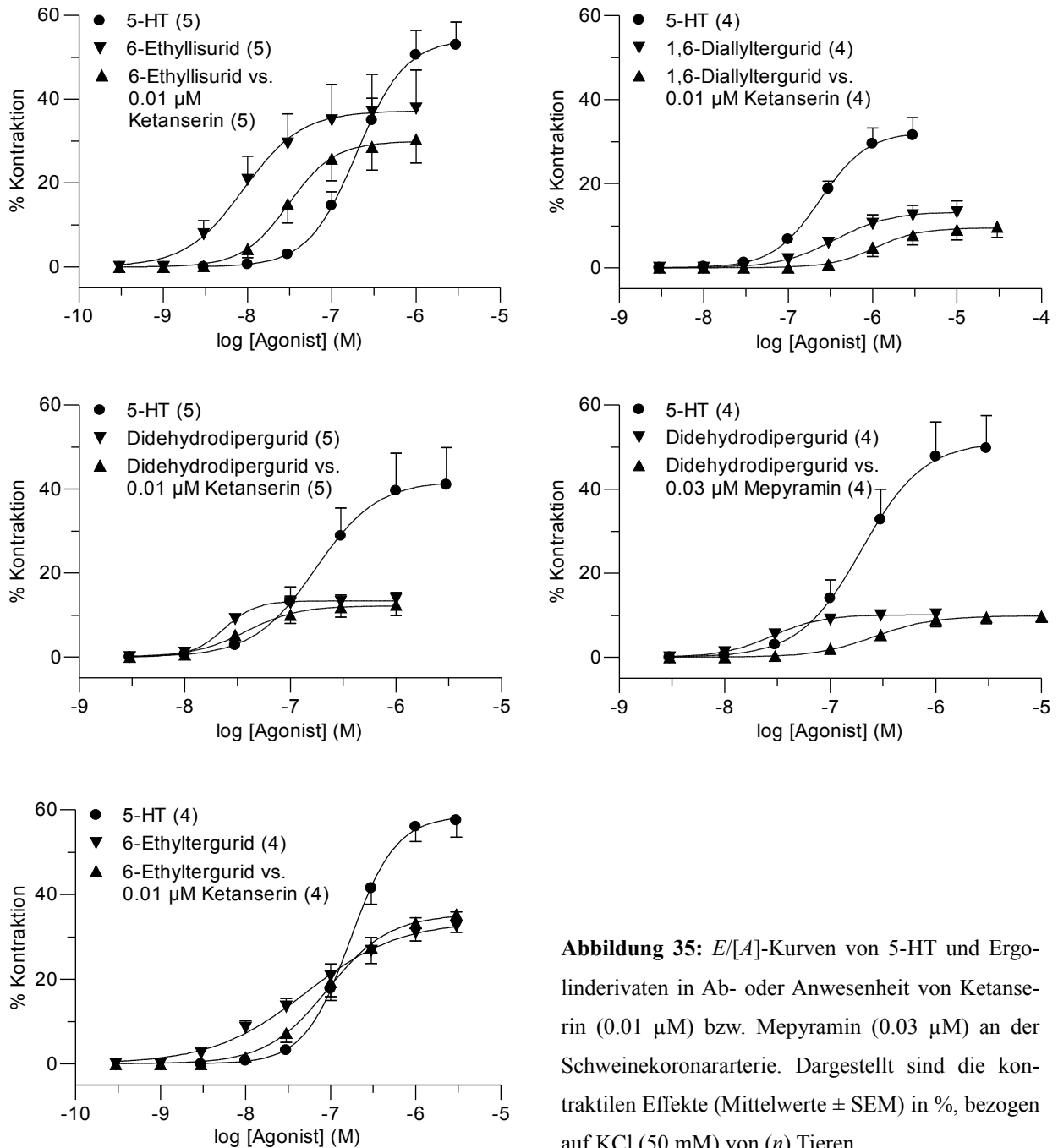


Abbildung 35: $E/[A]$ -Kurven von 5-HT und Ergolinderivaten in Ab- oder Anwesenheit von Ketanserin (0.01 μM) bzw. Mepyramin (0.03 μM) an der Schweinekoronararterie. Dargestellt sind die kontraktile Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf KCl (50 mM) von (n) Tieren.

3.2.3.2. Effekte an α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren

Die Tabellen 21, 22 und 23 geben eine Gesamtübersicht über die ermittelten Rezeptoraffinitäten der Ergolinderivate an den α_1 -Adrenozeptorsubtypen.

Wie Lisurid und Tergurid, verursachte, bis auf Didehydrometergurid, keines der neuen Ergolinderivate kontraktile Effekte an den untersuchten Gefäßen. Didehydrometergurid (0.01 bis 100 μM) erzeugte rhythmische Kontraktionen an der Rattenaorta, die durch Prazosin (3 nM) nicht hemmbar waren. Da die Effekte scheinbar nicht α_{1D} -Adrenozeptor-vermittelt sind bzw. nicht durch α_2 -

Tabelle 21: Antagonistische Effekte von Ergolinen an α_{1A} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pA_2	E_{max}
Lisurid ^a			7.89 ± 0.05	
1-Methylisurid	4	0.1	7.26 ± 0.05	98 ± 3
Didehydrodipergurid	4	0.3	7.29 ± 0.07	96 ± 3
Didehydrometergurid	4	1	6.51 ± 0.02	93 ± 2
Didehydropipergurid	3	1	6.36 ± 0.04	100 ± 3
Didehydropyrrogurid	4	1	< 6.0	-
Morpholinolisurid	3	1	< 6.0	-
Tergurid ^a			7.81 ± 0.07	
1-Allyl-6-ethyltergurid	4	1	7.03 ± 0.05	90 ± 3
1-Allyl-6-propyltergurid	4	1	7.00 ± 0.05	87 ± 2
1-Allylmetergurid	4	1	7.15 ± 0.04	92 ± 2
1-Methyltergurid	4	0.1	7.81 ± 0.08	100 ± 2
1,6-Diallyltergurid	4	1	6.91 ± 0.03	88 ± 1
Dipergurid	8	1	7.29 ± 0.02	87 ± 3
Metergurid	6	1	6.89 ± 0.05	101 ± 0
Pyrogurid	4	1	< 6.0	-
Oxtergurid	4	1	7.19 ± 0.03	91 ± 1

E_{max} in %, bezogen auf den Maximaleffekt des Kontrollagonisten (Noradrenalin). ^aDaten von Jähnichen (2005c). *n* = Anzahl der Tiere.

Adrenozeptoren oder 5-HT_{2A}-Rezeptoren verursacht werden konnten (Anwesenheit von Yohimbin und LY53857), wurden sie im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Mit Ausnahme einiger Substanzen, für die keine Affinität bei einer maximalen Testkonzentration (1 μM) bestimmbar war, antagonisierten die weiteren Verbindungen, die durch Noradrenalin hervorgerufenen Kontraktionen an α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren, ohne Einfluss auf den Maximaleffekt des Agonisten zu haben. Als Maß für die Affinität zu den α_1 -Adrenozeptoren wurde der pA_2 -Wert berechnet. Unter den Lisuridderivaten war die Muttersubstanz selbst an allen drei Rezeptorsubtypen am potentesten wirksam. Mit einer Trennschärfe von weniger als 10-fach wies keines der Lisuridabkömmlinge die Fähigkeit auf, zwischen α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren zu diskriminieren. Unter den Terguridderivaten ergab sich, mit Ausnahme von 1-Methyltergurid, die gleiche Situation. 1-Methyltergurid besitzt, wenn verglichen mit α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren, eine 10-fach höhere Affinität zu α_{1A} -Adrenozeptoren

und somit geringe diskriminatorische Eigenschaften. Weiterhin ist 1-Methyltergurid die einzige Substanz, die zumindest am α_{1A} -Adrenozeptorsubtyp, äquipotent zur Muttersubstanz (Tergurid) ist. Mit weniger als 2 Zehnerpotenzen Unterschied (mit 1 μM als maximale Testkonzentration) ist die Variabilität der Affinitäten an α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren unter allen getesteten Ergolinderivaten geringer ausgeprägt, als an den untersuchten Serotoninrezeptoren (siehe oben).

Tabelle 22: Antagonistische Effekte von Ergolinen an α_{1B} -Adrenozeptoren der Rattenschwanzarterie.

	<i>n</i>	Konz. (μM)	pA_2	E_{max}
Lisurid ^{a,b}			7.86 ± 0.05	
1-Methylisurid	4	1	6.57 ± 0.04	99 ± 1
Didehydrodipergurid	3	1	6.91 ± 0.05	100 ± 7
Didehydrometergurid	3	1	6.19 ± 0.09	89 ± 5
Didehydropipergurid	3	1	6.30 ± 0.07	106 ± 5
Didehydropyrrogurid	3	1	< 6.0	-
Morpholinolisurid	4	1	< 6.0	-
Tergurid ^{a,b}			7.73 ± 0.04	
1-Allyl-6-ethyltergurid	4	1	6.36 ± 0.05	91 ± 4
1-Allyl-6-propyltergurid	4	1	6.21 ± 0.06	92 ± 2
1-Allylmetergurid	4	1	6.31 ± 0.10	104 ± 1
1-Methyltergurid	4	1	6.85 ± 0.07	105 ± 3
1,6-Diallyltergurid	4	1	6.21 ± 0.09	92 ± 1
Dipergurid	8	1	6.24 ± 0.12	105 ± 6
Metergurid	8	1	6.35 ± 0.13	100 ± 3
Pyrrogurid	4	1	< 6.0	-
Oxtergurid	4	1	6.45 ± 0.08	102 ± 2

E_{max} in %, bezogen auf den Maximaleffekt des Kontrollagonisten (Noradrenalin). ^aDaten von Jähnichen (2005c), ^ban der Meerschweinchenmilz bestimmt. *n* = Anzahl der Tiere.

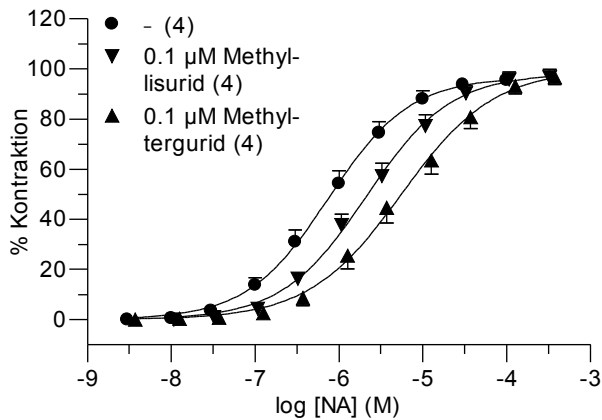
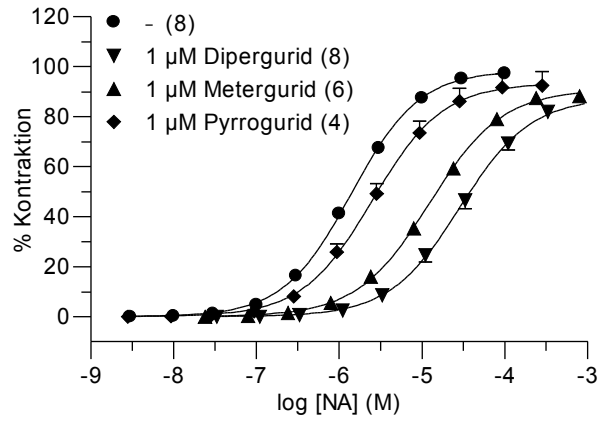
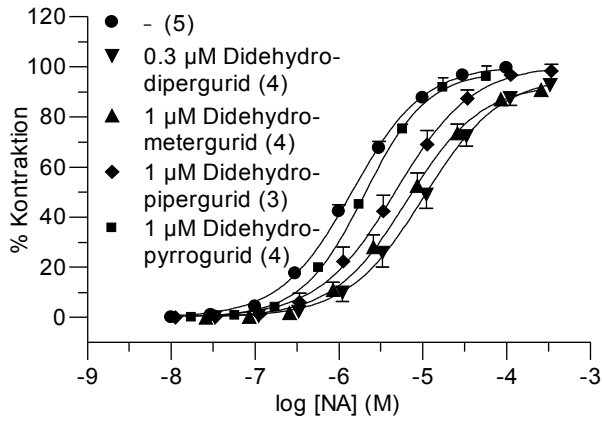


Abbildung 36: $E/[A]$ -Kurven von NA in Ab- oder Anwesenheit von Ergolinen an der Rattenschwanzarterie (α_{1A} -Adrenozeptoren). Dargestellt sind die kontraktile Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf die durch NA maximal induzierte Kontraktion von (n) Tieren.

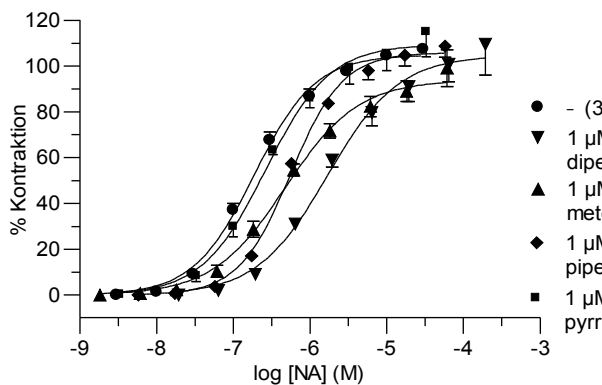
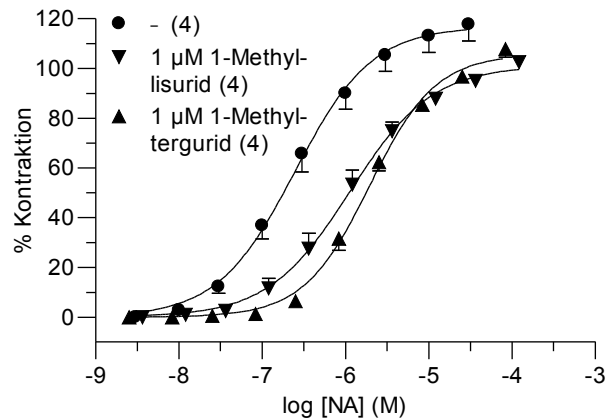
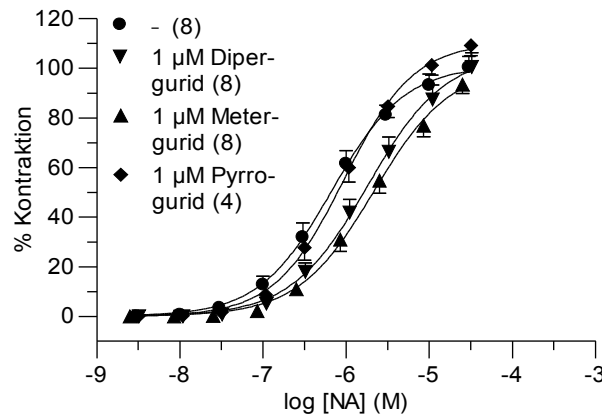


Abbildung 37: $E/[A]$ -Kurven von NA in Ab- oder Anwesenheit von Ergolinen an der Rattenschwanzarterie (α_{1B} -Adrenozeptoren). Dargestellt sind die kontraktile Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf die durch NA maximal induzierte Kontraktion von (n) Tieren.

3.2.3.3. Diskussion

Das Ergolinmolekül stellt aufgrund seiner vielfältigen Interaktionen mit Serotonin-, Dopamin- und α -adrenergen Rezeptoren ein geeignetes Target zur Entwicklung neuer Arzneistoffe dar. Durch gezielte, chemische Modifikation des Ergolin-Pharmakophors lässt sich die Selektivität gegenüber einem oder mehreren Rezeptorsubtypen erhöhen (Mantegani *et al.*, 1999; Krisch *et al.*, 1992). Dies hat zur Folge, dass man Arzneistoffe zur Behandlung von Erkrankungen, wie der Migräne und des Morbus Parkinson, erhält, die zum Beispiel über ein günstigeres Nebenwirkungsprofil im Vergleich zu etablierten Therapeutika verfügen. Neben der angestrebten Minimierung des Nebenwirkungspotenzials und der Erhöhung der Rezeptorselektivität war es wünschenswert, dass durch die strukturelle Modifikation der Muttersubstanzen gleichzeitig die Affinität zum Zielrezeptor erhöht bzw. beibehalten wird. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden 30 Ergoline an den jeweiligen Rezeptoren, die

Tabelle 23: Antagonistische Effekte von Ergolinen an α_{1D} -Adrenozeptoren der Rattenaorta.

	<i>n</i>	Konz. (μ M)	pA_2	E_{max}
Lisurid ^a			7.94 ± 0.14	
1-Methylisurid	4	1	6.82 ± 0.04	95 ± 1
Didehydrodipergurid	3	1	6.77 ± 0.07	99 ± 4
Didehydrometergurid ^b			-	-
Didehydropipergurid	3	1	7.14 ± 0.11	107 ± 6
Didehydropyrrogurid	3	1	6.13 ± 0.17	97 ± 2
Morpholinolisurid	3	1	< 6.0	-
Tergurid ^a			7.90 ± 0.06	
1-Allyl-6-ethyltergurid	4	1	6.19 ± 0.04	97 ± 8
1-Allyl-6-propyltergurid	4	1	6.49 ± 0.07	93 ± 4
1-Allylmetergurid	4	1	6.80 ± 0.06	100 ± 3
1-Methyltergurid	4	0.3	6.90 ± 0.04	98 ± 1
1,6-Diallyltergurid	4	1	6.29 ± 0.14	97 ± 2
Dipergurid	7	1	6.56 ± 0.10	105 ± 3
Metergurid	7	1	7.05 ± 0.11	102 ± 4
Pyrogurid	7	1	6.48 ± 0.11	106 ± 3
Oxtergurid	4	1	7.34 ± 0.12	97 ± 3

E_{max} in %, bezogen auf den Maximaleffekt des Kontrollagonisten (Noradrenalin). ^aDaten von Jähnichen (2005c),

^brhythmische Kontraktionen verhinderten Affinitätsbestimmung. *n* = Anzahl der Tiere.

aus pathophysiologischer Sicht bei den oben genannten Erkrankungen eine Rolle spielen, in verschiedenen *in vitro*-Modellen pharmakologisch untersucht. Besonders hervorzuheben sind die Untersuchungen am 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptor, die unmittelbaren Einfluss auf die Auswahl potenzieller Wirkstoffkandidaten hatten. Denn nur solche Substanzen eignen sich, bei denen aufgrund des Fehlens von agonistischer Aktivität an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren, das Risikopotenzial für fibrotische Veränderungen der Herzklappen ausgeschlossen werden kann (siehe Kapitel 1.6.). Die Beobachtung, dass die Arzneistoffe Lisurid und Tergurid 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonisten sind, zeigt, dass Agonismus an 5-HT_{2B}-Rezeptoren kein Klasseneffekt der Ergoline ist (Jähnichen *et al.*, 2005a). Für Lisurid konnte kein Fall von Herzklappenschäden in der Literatur gefunden werden, was mit dessen antagonistischem Effekt an 5-HT_{2B}-Rezeptoren in Übereinstimmung ist (Hofmann *et al.*, 2006). Insgesamt wiesen die Verbindungen ein ausgeprägteres Wirkprofil an 5-HT-Rezeptoren auf als an α_1 -Adrenozeptoren. Wenn man von Lisurid und Tergurid absieht, zeigten die Verbindungen mäßige Affinitäten zu α_1 -Adrenozeptoren. Die geringe Diskriminierung zwischen den α_1 -Subtypen (α_{1A} , α_{1B} , und α_{1D}) scheint ein Klasseneffekt der Ergoline zu sein (Görnemann *et al.*, 2008a).

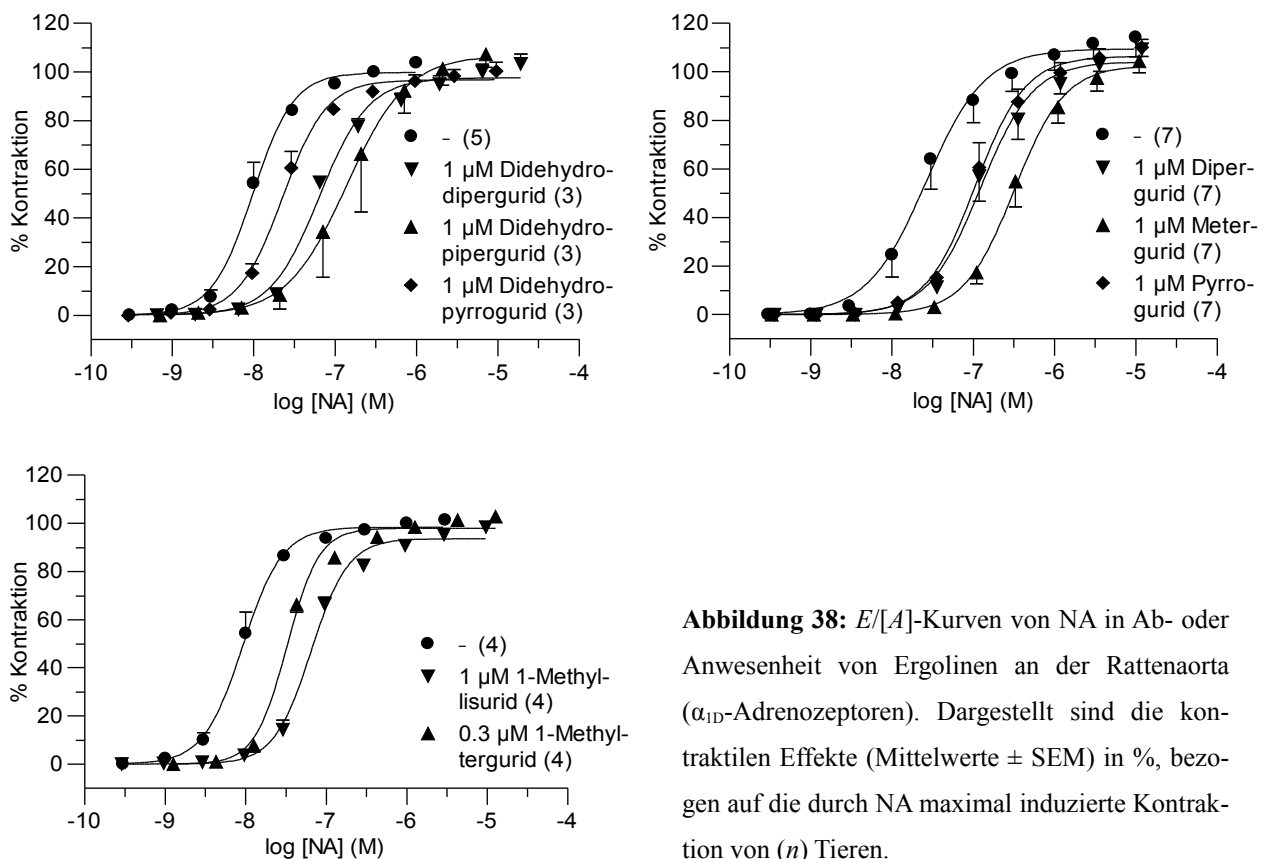


Abbildung 38: $E/[A]$ -Kurven von NA in Ab- oder Anwesenheit von Ergolinen an der Rattenaorta (α_{1D} -Adrenozeptoren). Dargestellt sind die kontraktile Effekte (Mittelwerte \pm SEM) in %, bezogen auf die durch NA maximal induzierte Kontraktion von (n) Tieren.

Die Einführung der Alkylsubstituenten (Methyl und Allyl) in N(1) des Ergolinmoleküls erfolgte, um die Potenz der Antagonisten zum 5-HT_{2B}-Rezeptor zu erhöhen, wie es zuvor für Ergotamin beobachtet wurde. Bei Ergotamin wandelte sich durch 1-Allylierung der Agonismus an 5-HT_{2B}-Rezeptoren (Glusa und Roos, 1996) in einen potenten Antagonismus (Jähnichen, 2005c). Fortführende Experimente zur metabolischen Stabilität der N(1)-Alkylierung von 1-Allylergotamin ergaben, dass in humanen Hepatozyten neben weiteren Abbauprodukten, auch die N(1)-Allylgruppe abgespalten wird (persönliche Kommunikation von axxonis). Ähnliche Biotransformationen an N(1) konnten ferner für Methysergid und das Ergolin CQA 206-291 *in vivo* und an Zellpräparaten von Hepatozyten gezeigt werden (Müller-Schweinitzer und Tapparelli, 1986; Bredberg *et al.*, 1986; Vickers *et al.*, 1993). Wenn auch das Ausmaß der Metabolisierung für jede Substanz individuell bestimmt werden muss, lassen die genannten Biotransformationsexperimente erwarten, dass N(1)-Alkylreste an Ergolinen *in vivo* abgespalten werden. Die N(1)-Substituierung führte bei keiner neuen Verbindung zur gewünschten Erhöhung der Affinität am 5-HT_{2B}-Rezeptor und scheint (vorerst) auf Ergotamin (1-Allylergotamin) beschränkt zu sein.

Im Folgenden werden die Wirkstoffkandidaten diskutiert, die aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit als potenzielle Arzneistoffe vorgeschlagen werden können. Dazu zählen: 6-Ethyllisurid, 1-Allyl-6-ethylisurid, 6-Ethyltergurid, 1-Allyl-6-ethyltergurid, 1-Methylisurid, 1-Methyltergurid, Didehydrodipergurid, Didehydrometergurid, Dipergurid und Metergurid. Als Auswahlkriterien galten das Vermögen in niedriger Konzentration am Zielrezeptor zu wirken, das Nebenwirkungsprofil und die Möglichkeit sie potenziell transdermal applizieren zu können. Da die Substanzen Antagonisten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren sind, sollte das Potenzial für fibrotische Veränderungen nicht vorhanden sein. Auch für die Metaboliten von Lisurid, N`'-Monodesethylisurid und 6-Norlisurid sowie den Pendants zu Tergurid konnte Antagonismus an 5-HT_{2B}-Rezeptoren gezeigt werden. Demnach sollten Substanzen, die ähnliche oder gleiche Strukturelemente haben sowie ihre Metaboliten, ebenfalls Antagonisten an diesem Rezeptorsubtyp sein. Beispiele dafür, dass die Biotransformation Metaboliten hervorbringen kann, die 5-HT_{2B}-Rezeptoren aktivieren, sind Fenfluramin, Methysergid und 1-Allylergotamin (Fitzgerald *et al.*, 2000; Glusa und Roos, 1996; persönliche Kommunikation von axxonis, Abbildung 8).

Ein Arzneistoff ist eher über die Haut verfügbar, wenn er ein Antagonist an α_1 -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren ist, da der Tonus der Hautgefäße über diese Rezeptoren reguliert wird (Borbujo *et al.*, 1989; Blessing und Seaman, 2003). Agonisten an diesen Rezeptoren kontrahieren die Hautgefäße, verringern die Durchblutung und folglich ihre Bioverfügbarkeit und wären somit für die Applikation mittels Pflaster weniger geeignet. Ob die agonistischen Effekte von 6-Ethyllisurid an 5-HT_{2A}-Rezeptoren für die transdermale Absorption von Relevanz sind und ob ein α_1 -Adrenozeptor

torantagonismus diesen Effekt kompensieren kann, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Die Kontraktion der Schweinekoronararterie durch 6-Ethyltergurid ist nicht 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelt und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Ethylgruppe in N(6) scheint eine Determinante für agonistische Effekte zu sein, die durch Allylierung von N(1) maskiert werden konnten. Insbesondere für 1-Allyl-6-ethylisurid und 1-Allyl-6-ethyltergurid, beides Antagonisten an 5-HT_{2A}-Rezeptoren (letzteres Derivat auch an α_1 -Adrenozeptoren), wäre somit die metabolische Stabilität bei transdermaler Applikation von Bedeutung. 1-Allyl-6-ethylisurid, 1-Allyl-6-ethyltergurid, 1-Methylisurid, 1-Methyltergurid, Didehydrodipergurid, Didehydrometergurid, Dipergurid und Metergurid sind Antagonisten an 5-HT_{2A}-Rezeptoren und α_1 -Adrenozeptoren (1-Allyl-6-ethylisurid an α_1 -Adrenozeptoren noch nicht getestet) und sollten für die Applikation über die Haut geeignet sein. Um den H₁-Agonismus von Didehydrodipergurid bzgl. der Hautverträglichkeit bewerten zu können, muss die Substanz in weiteren Experimenten in Relation zu Histamin und Lisurid gesetzt werden. Lisurid ist am Meerschweinchenileum ein potenter H₁-Partialagonist (Pertz *et al.*, 2006) und dennoch oral, als auch transdermal beim Menschen bioverfügbar. 6-Ethylisurid mit 1-Allyl-6-ethylisurid als Prodrug kann zur Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt werden, da es, wie Lisurid, ein potenter Dopamin D₂-Agonist ist (persönliche Kommunikation von axxonis). 1-Methylisurid, 1-Methyltergurid, Didehydrodipergurid, Didehydrometergurid, Dipergurid und Metergurid zeigten hohe Affinitäten zu 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptoren, die in der Entstehung einer Migräneattacke wahrscheinlich eine Rolle spielen (siehe Kapitel 1.2.2.). Die ausgeprägte Hemmung der endothelabhängigen (5-HT_{2B}) und endothelunabhängigen (5-HT₇) Vasorelaxation der arteriellen Cranialgefäße, die den Initiationsprozess des Migräneanfalls charakterisiert, legt die Eignung dieser Verbindungen als Migräneprophylaktika, insbesondere in Form eines transdermalen Systems, nahe. Zusätzlich, da nicht Gegenstand dieser Arbeit, soll erwähnt werden, dass 6-Ethyltergurid mit 1-Allyl-6-ethyltergurid als Prodrug zur Behandlung der Hyperprolaktinämie geeignet sind. Beides sind Dopamin D₂-Agonisten (persönliche Kommunikation von axxonis) und der Austausch der Methylgruppe (Tergurid) gegen eine Ethylgruppe in N(6) ist obendrein mit einer 22-fachen Steigerung der prolaktinhemmenden Wirkung verbunden (Černý *et al.*, 1983), wodurch die Dosis und infolgedessen die unerwünschten Arzneimittelwirkungen reduziert werden können.

Abschließend kann festgehalten werden, dass Lisurid und Tergurid anscheinend optimale räumliche Strukturen für die untersuchten Monoaminrezeptoren besitzen, die anderweitig und/oder an anderer Position als in der vorliegenden Arbeit chemisch abgewandelt werden müssen, um wesentliche Verbesserungen der antagonistischen Potenz zu erhalten. Eine weiter optimierte Harnstoffpartialstruktur könnte zu einer höheren und/oder anderen als der beobachteten Rezeptorselektivität führen.

4. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich: 1) mit der Etablierung eines neuen vaskulären *in vitro* Rezeptormodells, 2) mit der Bestimmung des molekularen Fragments von Pergolid, das für die Aktivierung von 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren verantwortlich ist und 3) mit der pharmakologischen Charakterisierung von Ergolinderivaten an verschiedenen Monoaminrezeptoren. Zusammen dienen die bearbeiteten Teilgebiete dem Ziel: 1) einen potenziellen Arzneistoffkandidaten zu identifizieren, der idealerweise transdermal zur Migräneprophylaxe oder Behandlung des Morbus Parkinson eingesetzt werden kann, 2) die gewonnenen Erkenntnisse in die Synthese weiterer Substanzen einfließen zu lassen, und 3) das mögliche Testspektrum im Arbeitskreis von Prof. Pertz zu erweitern, um Substanzen, die voraussichtlich zur Behandlung der Migräne oder des Morbus Parkinson eingesetzt werden können, noch präziser zu charakterisieren.

Für die Charakterisierung des kontraktiven postsynaptischen α_2 -Adrenozeptors der Schweinepulmonalvene wurde zuerst mit dem α_2 -adrenozeptorselektiven Agonisten UK14304 geprüft, ob das Gefäß mit diesen Rezeptoren ausgestattet ist. Um den α_2 -Adrenozeptorsubtyp (α_{2A} , α_{2B} und/oder α_{2C}) zu identifizieren, erfolgte anschließend die Bestimmung der Rezeptoraffinitäten für verschieden selektive α_2 -Adrenozeptorantagonisten gegen UK14304. Antagonisten (ARC239, BRL44408, Prazosin, WB4101 und Yohimbin), die bei mindestens vier verschiedenen Konzentrationen getestet werden konnten und keine Depression des Maximaleffekts von UK14304 hervorriefen, wurden einer Schild-Analyse unterzogen. Mit molekularbiologischen Experimenten (RT-PCR und RTQ-PCR) konnte die mRNA für α_{2A} - und α_{2C} -Adrenozeptoren nachgewiesen und der Gehalt bestimmt werden. Die eindeutigsten Hinweise, dass die durch UK14304 verursachte Kontraktion der Schweinepulmonalvene nur durch α_{2C} -Adrenozeptoren vermittelt wird, brachten die Resultate der Schild-Plots (Steigung nicht von 1 verschieden) und der Korrelationsanalyse (pK_i -Werte an humanen α_2 -Adrenozeptoren vs. ermittelte pK_B -Werte und pA_2 - bzw. pD'_2 -Wert) hervor. Auch nach Ausschluss der Rezeptoraffinitätswerte für Rauwolscin und MK912, da sie in diesem Gefäß keine kompetitiven Antagonisten sind, war die Korrelation für den humanen α_{2C} -Adrenozeptor ($r^2 = 0.94$, $P < 0.01$) weiterhin hochsignifikant, während keine Korrelation zu humanen α_{2A} - und α_{2B} -Adrenozeptoren bestand. In RT-PCR und RTQ-PCR Experimenten konnte keine mRNA für den α_{2B} -Adrenozeptorsubtyp in der Schweinepulmonalvene nachgewiesen werden, wohl aber für die beiden anderen Subtypen. α_{2A} -Adrenozeptoren könnten präsynaptisch als Autorezeptoren und/oder endothelial in der Pulmonalvene lokalisiert sein, was die Anwesenheit der mRNA für den Rezeptor erklärt. Der beträchtlich höhere mRNA-Gehalt unterstreicht die dominierende Rolle des α_{2C} -Adrenozeptors in dem Blut-

gefäß. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die durch UK14304 ausgelöste Kontraktion der Schweinepulmonalvene nur durch postsynaptische α_{2C} -Adrenozeptoren vermittelt wird. Die Beteiligung von α_{2A} - und α_{2B} -Adrenozeptoren kann anhand der vorliegenden Ergebnisse (Steigung der Schild-Plots, Korrelationsanalyse, RT-PCR und RTQ-PCR) ausgeschlossen werden.

Pergolid ist wie Cabergolin ein Ergolinderivat, das in Deutschland zur Behandlung des Morbus Parkinson eingesetzt wird. Beide Arzneistoffe zeigen potenten und vollen Agonismus an 5-HT_{2B} -Rezeptoren, der dosis- und zeitabhängig mit dem Auftreten von Herzklappenschäden und folgender Regurgitation assoziiert wird. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung von 5-HT_{2A} -Rezeptoren am Auftreten dieser unerwünschten Arzneimittelwirkungen beteiligt ist. Von Pergolid ausgehend, konnten acht Derivate synthetisiert werden. Zum einen wurde die N(6)-Propylgruppe von Pergolid durch Ethyl, Methyl und Wasserstoff ersetzt und zum anderen der Schwefel in der Seitenkette an C(8) durch einen Sauerstoff (*O*-Pergolid) substituiert. Bei *O*-Pergolid wurde ebenfalls der N(6)-Propylsubstituent durch eine Ethyl-, Methylgruppe bzw. durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Zusätzlich gab es in der Reihe der *O*-Pergolide ein Derivat mit einer N(6)-Cyclopropylmethylgruppe. An 5-HT_{2B} - (Schweinepulmonalarterie) und 5-HT_{2A} -Rezeptoren (Schweinekronararterie) wurde die Aktivität der neun Substanzen untersucht. Zusätzlich wurde für Pergolid, 6-Methylpergolid und 6-Norpergolid an hD_{2S} - und hD_{2L} -Rezeptoren überprüft, ob sich die agonistische Potenz aufgrund der unterschiedlichen Substituenten an N(6) ändert. An beiden untersuchten 5-HT_2 -Rezeptorsubtypen verhielten sich die Pergolidderivate nach einem ähnlichen Muster. Unabhängig ob die untersuchte Verbindung ein Schwefel- oder Sauerstoffatom in der Seitenkette an C(8) aufwies, riefen Verbindungen mit einer Propyl-, Ethyl- oder Cyclopropylmethylgruppe in N(6) vollen Agonismus an 5-HT_{2B} - bzw. partiellen Agonismus an 5-HT_{2A} -Rezeptoren hervor, der durch den jeweiligen Referenzantagonisten (5-HT_{2B} : SB204741 bzw. 5-HT_{2A} : Ketanserin) in der getesteten Konzentration kompetitiv hemmbar war. Die entsprechend berechneten pA_2 -Werte für SB204741 bzw. Ketanserin waren mit den pA_2 -Werten vergleichbar, die gegen den Referenzagonisten (5-HT) bestimmt wurden, was für die Aktivierung der untersuchten Rezeptoren spricht. Demgegenüber zeigten die Derivate mit einer N(6)-Methylgruppe Antagonismus an 5-HT_{2B} - und 5-HT_{2A} -Rezeptoren. Die N(6)-unsubstituierten Derivate sind schwache Antagonisten an 5-HT_{2A} -Rezeptoren und schwache Partialagonisten an 5-HT_{2B} -Rezeptoren. Die Reduzierung der N(6)-Propylgruppe von Pergolid zu einer Methylgruppe hatte keinen Einfluss auf die agonistische Potenz der Substanz an hD_{2S} - und hD_{2L} -Rezeptoren. Der putative Metabolit von Pergolid, 6-Norpergolid, zeichnete sich als Partialagonist mit hoher intrinsischer Aktivität an hD_{2S} - und hD_{2L} -Rezeptoren aus, besaß aber jeweils eine ca. 10-fach schwächere agonistische Potenz als die Muttersubstanz. Zusammenfassend

kann festgehalten werden, dass die N(6)-Propylgruppe von Pergolid eine Determinante für Agonismus an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren ist, was zur Entwicklung von Herzklappenschäden führen kann. Derivate von *O*-Pergolid und Pergolid zeigten an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren vergleichbare pharmakologische Effekte. Der Schwefel scheint somit keinen Einfluss auf die Aktivität der Derivate an den untersuchten Rezeptoren zu haben.

Ausgehend von Lisurid und Tergurid wurden 28 weitere Ergolinderivate synthetisiert, die sich durch gleich bleibende bzw. höhere Rezeptoraffinität an den Zielrezeptoren auszeichnen sollten und gleichzeitig eine höhere Rezeptorselektivität besitzen. Im Hinblick auf deren potenzielle Verwendung als Arzneistoffe in der Migränetherapie bzw. zur Behandlung des Morbus Parkinson wurden diese an verschiedenen Monoaminrezeptoren (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₇, α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , (H₁, α_{2C})) in *in vitro* Testmodellen untersucht. In der vorbeugenden Therapie von Migräneattacken wird der Antagonismus von Arzneistoffen an 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptoren diskutiert. Ergolinderivate, die zur Behandlung des Morbus Parkinson verwendet werden (aber nicht nur diese), können Agonisten an 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren sein, was schwerwiegende Nebenwirkungen, wie Herzklappenschäden, zur Folge haben kann (siehe oben). Daher wurde diesen beiden Rezeptorsubtypen besondere Aufmerksamkeit beigemessen. Sowohl die Migräneprophylaxe als auch die Therapie des Morbus Parkinson bedürfen einer Dauermedikation, die sich durch Verwendung von transdermalen Systemen patientenfreundlicher gestalten lässt, da das Einnahmeintervall für Tabletten wegfällt und gleichzeitig konstantere Wirkstoffspiegel im Blut erzielt werden können. Für die transdermale Applikation eignen sich Wirkstoffe, die Antagonisten an α_1 -Adrenozeptoren und 5-HT_{2A}-Rezeptoren sind, da diese Rezeptoren in den Blutgefäßen der Haut vorkommen und deren Stimulation die Gefäße kontrahieren würde, was folglich die Bioverfügbarkeit des Arzneistoffs reduziert.

Bis auf wenige Ausnahmen waren alle Derivate in den getesteten Konzentrationen Antagonisten an den untersuchten Rezeptoren. Besonders an den 5-HT-Rezeptorsubtypen (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₇) variierten die Rezeptoraffinitäten der neuen Verbindungen. Mit ca. 5000-fach fiel der Unterschied an 5-HT_{2B}-Rezeptoren am größten aus (1-Methylisurid vs. 1-Allyl-10 α -methoxytergurid). An 5-HT_{2A}- und 5-HT₇-Rezeptoren betrug er ca. 4000- bzw. ca. 1500-fach. Demgegenüber war der gemessene Affinitätsunterschied aller Ergolinderivate an jedem α_1 -Adrenozeptorsubtyp geringer als 100-fach. Dass das respektive Ergolinderivat nicht zwischen den α_1 -Adrenozeptorsubtypen (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) diskriminiert, scheint ein Effekt dieser Klasse zu sein.

Die gewünschte und bei Ergotamin (zu 1-Allylergotamin) beobachtete Erhöhung der 5-HT_{2B}-Rezeptoraffinität nach N(1)-Alkylierung, konnte bei den vorliegenden Ergolinderivaten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden. Durch Ringschluss der Harnstoffpartialstruktur von Li-

surid und Tergurid zu Didehydropyrrogurid und Pyrrogurid konnte die Selektivität, nicht aber die Affinität, für den 5-HT_{2A}-Rezeptor gegenüber 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptoren erhöht werden.

Folgende Substanzen können anhand der ermittelten Daten als potenzielle Arzneistoffkandidaten vorgeschlagen werden: 6-Ethyllisurid mit 1-Allyl-6-ethylisurid als Prodrug kann zur Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt werden, da es, wie Lisurid, ein potenter Dopamin D₂-Agonist ist. Ob 6-Ethyllisurid 5-HT_{2A}- und/oder H₁-Rezeptoren aktiviert und ob dies Einfluss auf seine Verwendung als Arzneistoff hat, muss noch getestet werden. 1-Methyllisurid, 1-Methyltergurid, Didehydrodipergurid, Didehydrometergurid, Dipergurid und Metergurid sind potente Antagonisten an 5-HT_{2B}- und 5-HT₇-Rezeptoren und eignen sich als Migräneprophylaktika. 6-Ethyltergurid mit 1-Allyl-6-ethyltergurid als Prodrug kann bei Hyperprolaktinämie verwendet werden, da es, wie Tergurid, ein potenter Dopamin D₂-Agonist ist. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die chemischen Abwandlungen von Lisurid und Tergurid mehrere potenzielle Arzneistoffkandidaten hervorgebracht haben. Dennoch müssen Lisurid und Tergurid anderweitig und/oder an anderer Position als in der vorliegenden Arbeit chemisch abgewandelt werden, um wesentliche Verbesserungen der antagonistischen Potenz zu erhalten. Eine weiter optimierte Harnstoffpartialstruktur könnte zu einer höheren und/oder anderen als der beobachteten Rezeptorselektivität führen.

5. Summary

The goals of the present study were: 1) the establishment of a new vascular *in vitro* receptor model, 2) the characterisation of the molecular fragment that is responsible for agonism of pergolide at 5-HT_{2B} and 5-HT_{2A} receptors and 3) the characterisation of the pharmacological profile of ergolin derivatives at different monoamine receptors. Unifying these topics this thesis was aimed at: 1) identifying a new compound that ideally can be applied using a transdermal drug delivering system for the prophylactic treatment of migraine or in the therapy of Parkinson's disease, 2) introducing the obtained results in the synthesis of new compounds and 3) extending the number of receptor models in Prof. Pertz's group to characterise new compounds that may be suitable for the treatment of migraine or Parkinson's disease more precisely.

Characterising the contractile postsynaptic α_2 -adrenoceptor in porcine pulmonary veins, the non-subtype-selective α_2 -adrenoceptor agonist UK14304 was initially used to clarify whether this blood vessel is endowed with α_2 -adrenoceptors. Subsequently a number of more or less selective α_2 -adrenoceptor antagonists were used in organ bath experiments and their affinity was calculated to identify the subtype(s) that is involved in the UK14304-induced contraction of the tissue. Antagonists

(ARC239, BRL44408, prazosin, WB4101 and yohimbine) that showed no depression of the maximal response (E_{\max}) to UK14304 and additionally could be investigated at least at four different concentrations were analysed by the method of Schild (Schild-plot). Performing RT-PCR and RTQ-PCR experiments the mRNA for α_{2A} - and α_{2C} -adrenoceptors were detected and quantified. The most unambiguous evidence that the UK14304-induced contraction of the pulmonary vein is mediated by a single receptor type (namely the α_{2C} -adrenoceptor) resulted from the Schild-plots (respective slope not different from unity) and a correlation analysis (pK_i -values from $h\alpha_2$ -adrenoceptors vs. estimated pK_B -, pA_2 - and pD'_{2} -values). As both drugs failed to show competitive antagonism of the UK14304 response, recalculation of the correlation excluding the affinities for rauwolscine and MK912 still yielded a highly significant correlation for α_{2C} -adrenoceptors ($r^2 = 0.94$, $P < 0.01$) and non-significant correlations for α_{2A} - and α_{2B} -adrenoceptors. RT-PCR and RTQ-PCR experiments indicated the absence of mRNA for the α_{2B} -adrenoceptor but the presence of mRNA for both the α_{2A} - and α_{2C} -adrenoceptors in porcine pulmonary veins. The presence of mRNA for the α_{2A} -adrenoceptor may result from the existence of pre-junctional inhibitory α_{2A} -adrenoceptors in the adventitia and/or relaxant α_{2A} -adrenoceptors in the endothelium. The considerably higher content of mRNA for α_{2C} -adrenoceptors emphasises the prominent role of this receptor in that blood vessel. In summary, the contraction of the porcine pulmonary vein elicited by UK14304 is mediated by post-junctional α_{2C} -adrenoceptors. The present data (Schild-plots, correlation analysis, RT-PCR and RTQ-PCR) provide evidence that α_{2A} - and α_{2B} -adrenoceptors are not involved in the contraction induced by UK14304.

Pergolide and cabergoline are ergot alkaloids that are approved for the treatment of Parkinson's disease in Germany. Both drugs show full potent agonism at 5-HT_{2B} receptors, which is time- and dose-dependently associated with the incidence of human restrictive valvular heart disease and regurgitation in man. A participation of 5-HT_{2A} receptors in the development of these side effects cannot completely be ruled out. Starting with pergolide, 8 derivatives were synthesised showing the following features: the propyl group at N(6) of pergolide was replaced by ethyl, methyl or hydrogen. Furthermore, the sulfur located in the side chain attached to position 8 of pergolide was substituted by an oxygen and this drug was also modified by replacing the N(6) propyl group by ethyl, methyl or hydrogen. In the *O*-pergolide series the N(6) propyl group was additionally replaced by a bulky cyclopropylmethyl substituent (9th compound). The agonist and/or antagonist effects of the nine compounds were investigated at 5-HT_{2B} (porcine pulmonary artery) and 5-HT_{2A} (porcine coronary artery) receptors. Pergolide, 6-methylpergolide and 6-norpergolide were additionally tested at hD_{2S} and hD_{2L} receptors to verify whether replacing the N(6) substituent of pergolide influences the

agonist activity. Pergolide derivatives acted in a similar pattern at both 5-HT₂ receptor subtypes, irrespective of whether a sulfur or an oxygen was in the side chain at C(8). All derivatives with a propyl, ethyl or cyclopropylmethyl group at N(6) caused full agonism at 5-HT_{2B} and partial agonism at 5-HT_{2A} receptors that were competitively blocked by SB204741 and ketanserin, respectively. The corresponding pA₂ values calculated for SB204741 and ketanserin were in the same range as obtained with the reference agonist (5-HT) and prove the involvement of 5-HT_{2B} and 5-HT_{2A} receptors. In contrast, 6-methylpergolide and 6-methyl-*O*-pergolide behaved as antagonists at 5-HT_{2B} and 5-HT_{2A} receptors. Compounds with N(6) hydrogen were weak antagonists at 5-HT_{2A} receptors and weak partial agonists at 5-HT_{2B} receptors, respectively. The reduction of N(6) propyl (pergolide) to a N(6) methyl (6-methylpergolide) did not affect the agonist potency at hD_{2S} and hD_{2L} receptors as well. The putative metabolite of pergolide, 6-norpergolide, was a high-efficacy partial agonist at both sites exhibiting a 10-fold lower agonist potency compared with the parent drug pergolide. In summary, the present data provide evidence that the N(6) propyl substituent of pergolide is the molecular fragment that is especially responsible for 5-HT_{2B} receptor agonist effects and thus a determinant of valvular regurgitation. The activation of 5-HT_{2A} receptors may also be involved in this severe side effect of pergolide.

Lisuride and terguride were the parent compounds of this thesis whose structures have been chemically modified. The 28 new derivatives were tested in *in vitro* bioassays comprising different monoamine receptors (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₇, α_{1A}, α_{1B}, α_{1D}, (H₁, α_{2C})) to identify a potentially new compound that can be used in the prophylactic treatment of migraine or in the therapy of Parkinson's disease. Compared to lisuride and terguride the new compounds ideally display a higher receptor selectivity and the same or enhanced affinity to the receptors involved in the therapy of the mentioned diseases. Antagonists at 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptors may be beneficial in the prophylactic treatment of migraine. Ergoline derivatives used in the treatment of Parkinson's disease (e.g. pergolide) can activate 5-HT_{2B} and 5-HT_{2A} receptors leading to restrictive valvular heart disease and regurgitation. Therefore, attention was paid regarding to these 5-HT₂ receptor subtypes. Both diseases (Parkinson's disease and migraine prophylaxis) require a long-term medication recommending the usage of a transdermal drug delivering system to avoid the permanent intake of tablets and to achieve constant plasma concentrations of the drug. Especially for transdermal application the drug should show antagonism at α₁-adrenoceptors and 5-HT_{2A} receptors, because blood vessels of the skin are endowed with these receptors and activation leads to vessel constriction with reduced transdermal bioavailability.

The new ergoline derivatives, with the exception of few compounds, all showed antagonism at the

investigated receptors. The receptor affinities varied over a wide range among the derivatives at the 5-HT receptor subtypes. The maximum difference (1-methylisuride vs. 1-allyl-10 α -methoxyterguride) was approx. 5000-fold at 5-HT_{2B} receptors. At 5-HT_{2A} and 5-HT₇ receptors the difference amounted approx. 4000-fold and 1500-fold, respectively. In contrast, the estimated affinities for all ergoline derivatives differed less than 100-fold at α_1 -adrenoceptors. A low discriminatory power between the α_1 -adrenoceptors (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) seems to be a class effect of the ergolines.

The expected increase in the affinity at 5-HT_{2B} receptors as observed with ergotamine (to 1-allylergotamine) due to N(1)-alkylation was not achieved with any new N(1)-alkylated compound. Closing the urea partial structure of lisuride and terguride to didehydropyrroguride and pyrroguride enhanced the selectivity but not the affinity of the respective ergoline derivative to 5-HT_{2A} receptors compared with 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptors.

Based on the collected data the following derivatives of lisuride and terguride are recommended as potential drug candidates: 6-ethylisuride (prodrug 1-allyl-6-ethylisuride) is a potent D₂ receptor agonist as well as lisuride and hence may be used in the treatment of Parkinson's disease. Whether 6-ethylisuride activates 5-HT_{2A} and/or H₁ receptors and whether this has an impact on the usage of the compound has to be substantiated in further studies. 1-Methylisuride, 1-methylterguride, didehydriperguride, didehydrometerguride, diperguride and meterguride may be applied for the prophylactic therapy of migraine because these ergoline derivatives showed potent antagonism at 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptors. 6-Ethylterguride (prodrug 1-allyl-6-terguride) can be used in the therapy of hyperprolactinemia as it activates D₂ receptors as well as terguride. In summary, the structural modification of lisuride and terguride revealed some new potential drug candidates. However, the parent compounds have to be chemically modified in a different manner and/or at different positions of the ergoline skeleton to observe considerable increased antagonist potencies. A further optimised urea partial structure may result in a increased and/or different receptor selectivity compared to the present data.

6. Literaturverzeichnis

- Akerman S, Williamson DJ, Kaube H, Goadsby PJ (2002). Nitric oxide synthase inhibitors can antagonize neurogenic and calcitonin gene-related peptide induced dilation of dural meningeal vessels. *Br J Pharmacol* **137**: 62–68.
- Arunlakshana O, Schild HO (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol* **14**: 48–58.
- Bana DS, MacNeal PS, LeCompte PM, Shah Y, Graham JR (1974). Cardiac murmurs and endocardial fibrosis associated with methysergide therapy. *Am Heart J* **88**: 640–655.
- Baseman DG, O’Suilleabhain PE, Reimold SC, Laskar SR, Baseman JG, and Dewey RB Jr (2004). Pergolide use in Parkinson disease is associated with cardiac valve regurgitation. *Neurology* **27**: 301–303.
- Baxter GS, Murphy OE, Blackburn TP (1994). Further characterization of 5-hydroxytryptamine receptors (putative 5-HT_{2B}) in rat stomach fundus longitudinal muscle. *Br J Pharmacol* **112**: 323–331.
- Berde B, Stürmer E (1978). Introduction to the pharmacology of ergot alkaloids and related compounds as a basis of their therapeutic application. In: *Handbook of experimental pharmacology: Ergot alkaloids and related compounds* (Berde B, Schild HO; Hrsg), Band 49, Springer-Verlag, Berlin, S. 1–28.
- Bickel A, Kornhuber J, Maihöfner C, Ropohl A (2005). Exacerbation of migraine attacks during treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline. A case report. *Pharmacopsychiatry* **38**: 327–328.
- Blessing WW, Seaman B (2003). 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. *Neuroscience* **117**: 939–948.
- Bockman CS, Jeffries WB, Abel PW (1993). Binding and functional characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtypes on pig vascular endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* **267**: 1126–1133.
- Böckler F (2006). Rezeptor-vermittelte Parkinson-Therapie. *Pharmazie in unserer Zeit* **35**: 204–

216.

- Boin F, Wigley FM (2005). Understanding, assessing and treating Raynaud's phenomenon. *Curr Opin Rheumatol* **17**: 752–760.
- Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA (2002). Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* **8**: 136–142.
- Borbujo J, García-Villalón AL, Valle J, Gómez B, Diéquez G (1989). Postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in human skin arteries. An in vitro study. *J Pharmacol Exp Ther* **249**: 284–287.
- Bredberg U, Eyjolfsdottir GS, Paalzow L, Tfelt-Hansen P, Tfelt-Hansen V (1986). Pharmacokinetics of methysergide and its metabolite methylergometrine in man. *Eur J Clin Pharmacol* **30**: 75–77.
- Büeler H (2006). Die Parkinson-Krankheit. *Pharmazie in unserer Zeit* **35**: 198–203.
- Buzzi MG, Moskowitz MA (1991). Evidence for 5-HT_{1B/1D} receptors mediating the antimigraine effect of sumatriptan and dihydroergotamine. *Cephalalgia* **11**: 165–168.
- Cambridge D (1981). UK-14,304, a potent and selective α_2 -agonist for the characterisation of α -adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* **72**: 413–415.
- Černý A, Křepelka J, Zikán V, Vlčková D, Vachek J, Holubek J, Řežábek K, Frühaufová M, Šeda M, Chlebounová J, Marhan O (1984). Some 6-substituted 1-[(5R,8S,10R)-8-Ergolinyl]-3,3-diethylureas. *Collect Czech Chem Commun* **49**: 2828–2836.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156–159.
- Chotani MA, Flavahan S, Mitra S, Daunt D, Flavahan NA (2000). Silent α_{2C} -adrenergic receptors enable cold-induced vasoconstriction in cutaneous arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**: H1075–1083.
- Civantos Calzada B, de Artiñano A (2001). Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res* **44**: 195–208.

- Closse A, Frick W, Dravid A, Bolliger G, Hauser D, Sauter A, Tobler HJ (1984). Classification of drugs according to receptor binding profiles. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **327**: 95–101.
- Colpaert FC (1987). Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology* **26**: 1431–1440.
- Connolly HM, Crary JL, McGoon MD, Hensrud DD, Edwards BS, Edwards WD, Schaff HV (1997). Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N Engl J Med* **337**: 581–588.
- Cushing DJ, Cohen ML (1993). Serotonin-induced contraction in porcine coronary artery: use of ergolines to support vascular 5-hydroxytryptamine₂-receptor heterogeneity. *J Pharmacol Exp Ther* **264**: 193–200.
- Diener HC (2002). *Migräne: Taschenatlas spezial*, Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Diener HC, Kaube H, Limmroth V (1999). Migräne. Klinik, Diagnostik, medikamentöse Therapie. *Anaesthesist* **48**: 845–856.
- Docherty JR (1998). Subtypes of functional α_1 - and α_2 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **361**: 1–15.
- Elz S (1995). 5-HT_{2A}-Rezeptorliganden: Synthese, Pharmakologie und Struktur-Wirkungsbeziehungen. *Habilitationsschrift*. Freie Universität Berlin.
- Ferrari MD (1998). Migraine. *Lancet* **351**: 1043–1051.
- Ferrari MD, Saxena PR (1993). Clinical and experimental effects of sumatriptan in humans. *Trends Pharmacol Sci* **14**: 129–133.
- Ferrari MD, Odink J, Tapparelli C, Van Kempen GM, Pennings EJ, Bruyn GW (1989). Serotonin metabolism in migraine. *Neurology* **39**: 1239–1242.
- Feuerstein TJ (2005). Antiparkinsonmittel – Pharmakotherapie des Morbus Parkinson. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; Hrsg.), 9. Auflage, Elsevier GmbH, München, Deutschland, S. 305–311.
- Fitzgerald LW, Burn TC, Brown BS, Patterson JP, Corjay MH, Valentine PA, Sun JH, Link JR,

- Abbaszade I, Hollis JM, Largent BL, Hartig PR, Hollis GF, Meunier PC, Robichaud AJ, Robertson DW (2000). Possible role of valvular serotonin 5-HT_{2B} receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol Pharmacol* **57**: 75–81.
- Flaherty KR, Bates JR (1996). Mitral regurgitation caused by chronic ergotamine use. *Am Heart J* **131**: 603–606.
- Förster K (1987). Untersuchungen zur Biotransformation von Tergurid: Vergleich zwischen dem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber und dem Ganztiersversuch an Ratte, Hund und Affe. *Dissertationsschrift* Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Fox SH, Henry B, Hill MP, Peggs D, Crossman AR, Brotchie JM (2001). Neural mechanisms underlying peak-dose dyskinesia induced by levodopa and apomorphine are distinct: evidence from the effects of the alpha₂ adrenoceptor antagonist idazoxan. *Mov Disord* **16**: 642–650.
- Fozard JR, Kalkman HO (1994). 5-Hydroxytryptamine (5-HT) and the initiation of migraine: new perspectives. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **350**: 225–229.
- Fozard JR (1992). 5-HT_{1C} receptor agonism as an initiating event in migraine. In: *5-Hydroxytryptamine mechanism in primary headache* (Olesen J, Saxena PR; Hrsg.), Raven Press, New York, S. 200–212.
- Freedman RR, Baer RP, Mayes MD (1995). Blockade of vasospastic attacks by alpha₂-adrenergic but not alpha₁-adrenergic antagonists in idiopathic Raynaud's disease. *Circulation* **92**: 1448–1451.
- Fuller RW, Clemens JA (1991). Pergolide: a dopamine agonist at both D₁ and D₂ receptors. *Life Sci* **49**: 925–930.
- Furchgott RF (1972). The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. In: *Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 33, Catecholamines* (Blaschko H, Muscholl E; Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, S. 283–335.
- Furchgott RF (1966). The use of beta-haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes. *Adv Drug Res* **3**: 21–55.
- Glusa E, Pertz HH (2000). Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is

- mediated by endothelial 5-HT_{2B} receptors. *Br J Pharmacol* **130**: 692–698.
- Glusa E, Roos A (1996). Endothelial 5-HT receptors mediate relaxation of porcine pulmonary arteries in response to ergotamine and dihydroergotamine. *Br J Pharmacol* **119**: 330–334.
- Goadsby PJ (2005). Calcitonin gene-related peptide antagonists as treatments of migraine and other primary headaches. *Drugs* **65**: 2557–2567.
- Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD (2002). Migraine--current understanding and treatment. *N Engl J Med* **346**: 257–270.
- Gomez-Mancilla B, Bédard PJ (1993). Effect of nondopaminergic drugs on L-dopa-induced dyskinesias in MPTP-treated monkeys. *Clin Neuropharmacol* **16**: 418–427.
- Görnemann T, Nayal R, Pertz HH, Melzig MF (2008b). Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. *J Ethnopharmacol*, „in press“.
- Görnemann T, Jähnichen S, Schurad B, Latté KP, Horowski R, Tack J, Flieger M, Pertz HH (2008a). Pharmacological properties of a wide array of ergolines at functional alpha₁-adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **376**: 321–330.
- Görnemann T, von Wenckstern H, Kleuser B, Villalón CM, Centurión D, Jähnichen S, Pertz HH (2007). Characterization of the postjunctional α_{2C}-adrenoceptor mediating vasoconstriction to UK14304 in porcine pulmonary veins. *Br J Pharmacol* **151**: 186–194.
- Göthert M, Starke K (2005). Pharmakologie des Serotonins – Pharmakotherapie primärer Kopfschmerzen. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; Hrsg.), 9.Auflage, Elsevier GmbH, München, Deutschland, S. 213–221.
- Gray DW, Marshall I (1992). Human alpha-calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. *Br J Pharmacol* **107**: 691–696.
- Guimarães S, Moura D (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* **53**: 319–356.
- Gupta S, Mehrotra S, Villalón CM, Perusquía M, Saxena PR, MaassenVanDenBrink A (2007). Potential role of female sex hormones in the pathophysiology of migraine. *Pharmacol Ther* **113**:

321–340.

- Hagen M, Paegelow I (1979). Histamine H₁- and H₂-receptors in coronary arteries of pigs. *Agents Actions* **9**: 253–256.
- Hamel E (2007). Serotonin and migraine: biology and clinical implications. *Cephalalgia* **27**: 1293–1300.
- Headache Classification Committee of the International Headache Society (2004). The international classification of headache disorders: (2nd ed.). *Cephalalgia* **24**: 9–160.
- Henry B, Fox SH, Peggs D, Crossman AR, Brotchie JM (1999). The α_2 -adrenergic receptor antagonist idazoxan reduces dyskinesia and enhances anti-parkinsonian actions of L-dopa in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Mov Disord* **14**: 744–753.
- Henry B, Crossman AR, Brotchie JM (1998). Characterization of enhanced behavioral responses to L-DOPA following repeated administration in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **151**: 334–342.
- Herrick AL (2005). Pathogenesis of Raynaud's phenomenon. *Rheumatology* **44**: 587–596.
- Herrmann WM, Kristof M, Sastre M, Sastre M (1978). Preventive treatment of migraine headache with a new isoergolenyl derivative. *J Int Med Res* **6**: 476–482.
- Hofmann C, Penner U, Dorow R, Pertz HH, Jähnichen S, Horowski R, Latté KP, Palla D, Schurad B (2006). Lisuride, a dopamine receptor agonist with 5-HT_{2B} receptor antagonist properties: absence of cardiac valvulopathy adverse drug reaction reports supports the concept of a crucial role for 5-HT_{2B} receptor agonism in cardiac valvular fibrosis. *Clin Neuropharmacol* **29**: 80–86.
- Horvath J, Fross RD, Kleiner-Fisman G, Lerch R, Stalder H, Liaudat S, Raskoff WD, Flachsbart KD, Rakowski H, Pache JC, Burkhard MD, Lang AE (2004). Severe multivalvular heart disease: a new complication of the ergot derivative dopamine agonists. *Mov Disord* **19**: 656–662.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **71**: 533–554.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine

(Serotonin). *Pharmacol Rev* **46**: 157–203.

Hoyer D, Boddeke HWGM (1993). Partial agonists, full agonists, antagonists: dilemmas of definition. *Trends Pharmacol Sci* **14**: 270–275.

Hu XH, Markson LE, Lipton RB, Stewart WF, Berger ML (1999). Burden of migraine in the United States: disability and economic costs. *Arch Intern Med* **159**: 813–818.

Hübner H, Haubmann C, Utz W, Gmeiner P (2000). Conjugated enynes as nonaromatic catechol bioisosteres: synthesis, binding experiments, and computational studies of novel dopamine receptor agonists recognizing preferentially the D₃ subtype. *J Med Chem* **43**: 756–762.

Hümpel M, Krause W, Hoyer G-A, Wendt H, Pommerenke G (1984). The pharmacokinetics and biotransformation of ¹⁴C-Lisuride hydrogen maleate in rhesus monkey and in man. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **9**: 347–357.

Hyman AL, Kadowitz PJ (1986). Enhancement of α - and β -adrenoceptor responses by elevations in vascular tone in pulmonary circulation. *Am J Physiol* **250**: H1109–H1116.

Hyman AL, Kadowitz PJ (1985). Evidence for existence of postjunctional α_1 - and α_2 -adrenoceptors in cat pulmonary vascular bed. *Am J Physiol* **249**: H891–H898.

Jähnichen S (2005c). Charakterisierung vaskulärer α_1 -Adrenozeptoren und 5-HT-Rezeptoren als Zielstrukturen natürlicher und partialsynthetischer Ergoline. *Dissertationsschrift* Freie Universität Berlin.

Jähnichen S, Glusa E, Pertz HH (2005b). Evidence for 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptor-mediated relaxation in pulmonary arteries of weaned pigs. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**: 89–98.

Jähnichen S, Horowski R, and Pertz HH (2005a). Agonism at 5-HT_{2B} receptors is not a class effect of the ergolines. *Eur J Pharmacol* **513**: 225–228.

Jähnichen S, Eltze M, Pertz HH (2004). Evidence that α_{1B} -adrenoceptors are involved in noradrenaline-induced contractions of rat tail artery. *Eur J Pharmacol* **488**: 157–167.

Jenkinson DH, Barnard EA, Hoyer D, Humphrey PP, Leff P, Shankley NP (1995). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. IX.

Recommendations on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* **47**: 255–266.

Jeyaraj SC, Chotani MA, Mitra S, Gregg HE, Flavahan NA, Morrison KJ (2001). Cooling evokes redistribution of α_{2C} -adrenoceptors from golgi to plasma membrane in transfected human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* **60**: 1195–1200.

Johnson KW, Phebus LA, Cohen ML (1998). Serotonin in migraine: theories, animal models and emerging therapies. *Prog Drug Res* **51**: 219–244.

Kalkman HO (1994). Is migraine prophylactic activity caused by 5-HT_{2B} or 5-HT_{2C} receptor blockage? *Life Sci* **54**: 641–644.

Kenakin T (2006). *A pharmacology primer*, 2.Auflage, Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.

Kenakin T (1993). *Pharmacologic analysis of drug-receptor-interaction*, 2.Auflage, Raven Press, New York.

Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic PS (1998). Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 7731–7736.

Kilbinger H (2005). Pharmaka zur Beeinflussung der Funktionen von Magen, Dünn- und Dickdarm – Pharmakotherapie gastrointestinaler Erkrankungen. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; Hrsg.), 9.Auflage, Elsevier GmbH, München, Deutschland, S. 553–581.

Krisch I, Budihna MV, Rucman R (1992). Structure-activity study of some newly synthesized ergoline derivatives on 5-HT₂ receptors and alpha-adrenoceptors in rabbit isolated aorta. *Pharmacology* **45**: 195–208.

Kvasnička F, Biba B, Cvak L (2005). Capillary zone electrophoresis separation of enantiomers of lisuride. *J Chromatogr A* **1066**: 255–258.

Lang AE, Lozano AM (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* **339**: 1044–1053.

Launay JM, Hervé P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, Nebigil CG, Etienne N, Drouet L, Humbert

- M, Simonneau G, Maroteaux L (2002). Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* **8**: 1129–1135.
- Launay JM, Birraux G, Bondoux D, Callebert J, Choi DS, Loric S, Maroteaux L (1996). Ras involvement in signal transduction by the serotonin 5-HT_{2B} receptor. *J Biol Chem* **271**: 3141–3147.
- Limmroth V, Michel MC (2001). The prevention of migraine: a critical review with special emphasis on β -adrenoceptor blockers. *Br J Clin Pharmacol* **52**: 237–243.
- Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M (2001). Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache* **41**: 646–657.
- Lopez-Illasaca M (1998). Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol* **56**: 269–277.
- MaassenVanDenBrink A, Reekers M, Bax WA, Ferrari MD, Saxena PR (1998). Coronary side-effect potential of current and prospective antimigraine drugs. *Circulation* **98**: 25–30.
- Mantegani S, Brambilla E, Varasi M (1999). Ergoline derivatives: receptor affinity and selectivity. *Farmaco* **54**: 288–296.
- Marano M, Kaumann AJ (1976). On the statistics of drug-receptor constants for partial agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **198**: 518–525.
- Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC (2004). Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res Brain Res Rev* **45**: 38–78.
- Mavridis M, Colpaert FC, Millan MJ (1991). Differential modulation of (+)-amphetamine-induced rotation in unilateral substantia nigra-lesioned rats by α_1 as compared to α_2 agonists and antagonists. *Brain Res* **562**: 216–224.
- Megens AA, Leysen JE, Awouters FH, Niemegeers CJ (1986). Further validation of in vivo and in vitro pharmacological procedures for assessing the α_2 / α_1 -selectivity of test compounds: (1) α -adrenoceptor antagonists. *Eur J Pharmacol* **129**: 49–55.
- Mehrotra S, Gupta S, Garrelds IM, Villalón CM, Saxena PR, Bogers AJ, Maassenvandenbrink A

- (2006). Effects of current and prospective antimigraine drugs on the porcine isolated meningeal artery. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **374**: 163–175.
- Millan MJ, Maiofiss L, Cussac D, Audinot V, Boutin JA, and Newman-Tancredi A (2002). Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned, recombinant, human receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **303**: 791–804.
- Müller-Schweinitzer E (1990). Venoconstrictor responses to dihydroergocristine and dihydroergotamine: evidence for the involvement of 5-HT₁ like receptors. *Cardiovasc Drugs Ther* **4**: 1455–1460.
- Müller-Schweinitzer E, Tapparelli C (1986). Metylergometrine, an active metabolite of methysergide. *Cephalalgia* **6**: 35–41.
- Müller-Schweinitzer E (1980). In vitro studies on the duration of action of dihydroergotamine. *Int J Clin Pharmacol* **18**: 88–91.
- Neubauer G, Ujlaky R (2002). Migräne-eine Volkskrankheit und ihre Kosten. *Pharmazie in unserer Zeit* **31**: 494–497.
- Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A; International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* **55**: 597–606.
- Newman-Tancredi A, Cussac D, Quentric Y, Touzard M, Verrièle L, Carpentier N, and Millan MJ (2002b). Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. III. Agonist and antagonist properties at serotonin, 5-HT₁ and 5-HT₂, receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **303**: 815–822.
- Newman-Tancredi A, Cussac D, Audinot V, Nicolas JP, De Ceuninck F, Boutin JA, and Millan MJ (2002a). Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. II. Agonist and antagonist properties at subtypes of dopamine D₂-like receptor and α_1/α_2 -adrenoceptor. *J Pharmacol Exp Ther* **303**: 805–814.
- Nihon Schering KK (2005). Teluron[®] tablets 0.5mg, *Fachinformation*, Japan.

- Ohlstein EH, Horohonich S, Shebuski RJ, Ruffolo Jr RR (1989). Localization and characterization of alpha-2 adrenoceptors in the isolated canine pulmonary vein. *J Pharmacol Exp Ther* **248**: 233–239.
- Olanow CW, Watts RL, Koller WC (2001). An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson`s disease (2001): treatment guidelines. *Neurology* **56**: S1–S88.
- Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM; BIBN 4096 BS Clinical Proof of Concept Study Group (2004). Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med* **350**: 1104–1110.
- Olesen J, Thomsen LL, Iversen H (1994). Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *Trends Pharmacol Sci* **15**: 149–153.
- Østergaard JR, Mikkelsen E, Voldby B (1981). Effects of 5-hydroxytryptamine and ergotamine on human superficial temporal artery. *Cephalalgia* **1**: 223–228.
- Peroutka SJ (2005). Neurogenic inflammation and migraine: implications for the therapeutics. *Mol Interv* **5**: 304–311.
- Peroutka SJ (2004). Migraine: a chronic sympathetic nervous system disorder. *Headache* **44**: 53–64.
- Pertz HH, Görmemann T, Schurad B, Seifert R, Straßer A (2006). Striking differences of action of lisuride stereoisomers at histamine H₁ receptors. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **374**: 215–222.
- Pertz H, Eich E (1999). Ergot alkaloids and their derivatives as ligands for serotonergic, dopaminergic, and adrenergic receptors. In: *Ergot The Genus Claviceps* (Křen V, Cvak L; Hrsg.), Harwood academic publishers, Amsterdam, The Netherlands, S. 411–440.
- Pertz H, Elz S (1995). In-vitro pharmacology of sarpogrelate and the enantiomers of its major metabolite: 5-HT_{2A} receptor specificity, stereoselectivity and modulation of ritanserin-induced depression of 5-HT contractions in rat tail artery. *J Pharm Pharmacol* **47**: 310–316.
- Piasek MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL, Perez DM (1995). The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J*

Pharmacol Exp Ther **275**: 1583–1589.

Pinero A, Marcos-Alberca P, Fortes J (2005). Cabergoline-related severe restrictive mitral regurgitation. *N Engl J Med* **353**: 1976–1977.

Pritchett AM, Morrison JF, Edwards WD (2002). Valvular heart disease in patients taking pergolide. *Mayo Clin Proc* **77**: 1280–1286.

Pryse-Phillips WE, Dodick DW, Edmeads JG, Gawel MJ, Nelson RF, Purdy RA, Robinson G, Stirling D, Worthington I (1997). Guidelines for the diagnosis and management of migraine in clinical practice. Canadian Headache Society. *CMAJ* **156**: 1273–1287.

Rascol O, Arnulf I, Peyro-Saint Paul H, Brefel-Courbon C, Vidailhet M, Thalamas C, Bonnet AM, Descombes S, Bejjani B, Fabre N, Montastruc JL, Agid Y (2001). Idazoxan, an alpha-2 antagonist, and L-DOPA-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* **16**: 708–713.

Redfield MM, Nicholson WJ, Edwards WD, Tajik AJ (1992). Valve disease associated with ergot alkaloid use: echocardiographic and pathologic correlations. *Ann Intern Med* **117**: 50–52.

Riebesehl B, Lipp R (2006). Darreichungsformen in der Parkinson-Therapie. *Pharmazie in unserer Zeit* **35**: 226–233.

Robiolio PA, Rigolin VH, Wilson JS, Harrison JK, Sanders LL, Bashore TM, Feldman JM (1995). Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation* **92**: 790–795.

Roth BL (2007). Drugs and valvular heart disease. *N Engl J Med* **356**: 6–9.

Rothman RB, Baumann MH, Savage JE, Rauser L, McBride A, Hufeisen SJ, Roth BL (2000). Evidence for possible involvement of 5-HT_{2B} receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* **102**: 2836–2841.

Rubin A, Lemberger L, Dhahir P (1981). Physiologic disposition of pergolide. *Clin Pharmacol Ther* **30**: 258–265.

Samii A, Nutt JG, Ransom BR (2004). Parkinson's disease. *Lancet* **363**: 1783–1793.

- Sanders-Bush E, Canton H (1995). Serotonin receptors. Signal transduction pathways. In: *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress* (Bloom FE, Kupfer DJ; Hrsg.), Raven Press, New York, S. 431–441.
- Saunders C, Limbird LE (1999). Localization and trafficking of α_2 -adrenergic receptor subtypes in cells and tissues. *Pharmacol Ther* **84**: 193–205.
- Savola JM, Hill M, Engstrom M, Merivuori H, Wurster S, McGuire SG, Fox SH, Crossman AR, Brotchie JM (2003). Fipamezole (JP-1730) is a potent α_2 adrenergic receptor antagonist that reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Mov Disord* **18**: 872–883.
- Saxena PR, Tfelt-Hansen P (2006). Triptans, 5-HT_{1B/1D} receptor agonists in the acute treatment of migraines. In: *The Headaches* (Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan NM, Tfelt-Hansen P, Welch KMA; Hrsg), 3. Auflage, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, S. 469–503.
- Schade R, Andersohn F, Suissa S, Haverkamp W, Garbe E (2007). Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N Engl J Med* **356**: 29–38.
- Schaible HG, Ebersberger A (2002). Migräne, Cluster- und Spannungskopfschmerz. *Pharmazie in unserer Zeit* **31**: 452–457.
- Schapira AH (2005). Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**: 1472–1478.
- Schlotter K, Boeckler F, Hübner H, Gmeiner P (2005). Fancy Bioisosteres: metallocene-derived G-protein-coupled receptor ligands with subnanomolar binding affinity and novel selectivity profiles. *J Med Chem* **48**: 3696–3699.
- Schmuck K, Ullmer C, Kalkman HO, Probst A, Lübbert H (1996). Activation of meningeal 5-HT_{2B} receptors: an early step in the generation of migraine headache? *Eur J Neurosci* **8**: 959–967.
- Schöning C, Flieger M, Pertz HH (2001). Complex interaction of ergovaline with 5-HT_{2A}, 5-HT_{1B/1D}, and α_1 receptors in isolated arteries of rat and guinea pig. *J Anim Sci* **79**: 2202–2209.
- Schurad B, Horowski R, Jähnichen S, Görnemann T, Tack J, Pertz HH (2006). Proterguride, a highly potent dopamine receptor agonist promising for transdermal administration in Parkinson's

- disease: interactions with α_1 -, 5-HT₂- and H₁-receptors. *Life Sci* **78**: 2358–2364.
- Schwedt TJ (2007). Serotonin and migraine: the latest developments. *Cephalalgia* **27**: 1301–1307.
- Serratrice J, Disdier P, Habib G, Viallet F, Weiller P (2002). Fibrotic valvular heart disease subsequent to bromocriptine treatment. *Cardiol Rev* **10**: 334–336.
- Setola V, Hufeisen SJ, Grande-Allen KJ, Vesely I, Glennon RA, Blough B, Rothman RB, and Roth BL (2003). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") induces fenfluramine-like proliferative actions on human cardiac valvular interstitial cells in vitro. *Mol Pharmacol* **63**: 1223–1229.
- Shebuski RJ, Ohlstein EH, Smith Jr JM, Ruffolo Jr RR (1987). Enhanced pulmonary alpha-2 adrenoceptor responsiveness under conditions of elevated pulmonary vascular tone. *J Pharmacol Exp Ther* **242**: 158–165.
- Shebuski RJ, Fujita T, Ruffolo Jr RR (1986). Evaluation of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the *in situ*, autoperfused pulmonary circulation of the anaesthetized dog. *J Pharmacol Exp Ther* **238**: 217–223.
- Silberstein SD (2005). Preventive treatment of headaches. *Curr Opin Neurol* **18**: 289–292.
- Somerville BW, Herrmann WM (1978). Migraine prophylaxis with Lisuride hydrogen maleate--a double blind study of Lisuride versus placebo. *Headache* **18**: 75–79.
- Soyka D, Frieling B (1989). Lisurid in der Migräneprophylaxe. Ergebnisse einer multizentrischen Studie. *Fortschr Med* **107**: 763–766.
- Standaert DG, Young AB (2005). Treatment of central nervous system degenerative disorders. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11. Auflage (Brunton LL, Lazo JS, Parker KL; Hrsg.), McGraw-Hill, New York, S. 527–545.
- Stephenson RP (1956). A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol* **11**: 379–393.
- Stocchi F (2003). Prevention and treatment of motor fluctuations. *Parkinsonism Relat Disord* **9**: S73–S81.
- Stocchi F, Ruggieri S, Vacca L, Olanow CW (2002). Prospective randomized trial of lisuride

infusion versus oral levodopa in patients with Parkinson's disease. *Brain* **125**: 2058–2066.

Terrón JA (2002). Is the 5-HT₇ receptor involved in the pathogenesis and prophylactic treatment of migraine? *Eur J Pharmacol* **439**: 1–11.

Terrón JA, Falcón-Neri A (1999). Pharmacological evidence for the 5-HT₇ receptor mediating smooth muscle relaxation in canine cerebral arteries. *Br J Pharmacol* **127**: 609–616.

Terrón JA (1996). The relaxant 5-HT receptor in the dog coronary artery smooth muscle: pharmacological resemblance to the cloned 5-HT₇ receptor subtype. *Br J Pharmacol* **118**: 1421–1428.

Tfelt-Hansen P, Saxena PR, Dahlöf C, Pascual J, Láinez M, Henry P, Diener H, Schoenen J, Ferrari MD, Goadsby PJ (2000). Ergotamine in the acute treatment of migraine: a review and European consensus. *Brain* **123**: 9–18.

Tfelt-Hansen P, Saxena PR, Ferrari MD (1995). Ergot alkaloids. In: *Handbook of Clinical Neurology, Vol. 21 (65): Intoxications of the nervous system, Part II* (de Wolff FA; Hrsg.), Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, S. 61–78.

Trendelenburg AU, Sutej I, Wahl CA, Molderings GJ, Rump LC, Starke K (1997). A re-investigation of questionable subclassifications of presynaptic α_2 -autoreceptors: rat vena cava, rat atria, human kidney and guinea-pig urethra. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**: 721–737.

Uhlén S, Porter AC, Neubig RR (1994). The novel alpha-2 adrenergic radioligand [3H]-MK912 is alpha-2C selective among human alpha-2A, alpha-2B and alpha-2C adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* **271**: 1558–1565.

U.S. Food and Drug Administration (2007). Pergolide (market as Permax). *FDA Public Health Advisory* (<http://www.fda.gov/cder/drug/advisory/pergolide.htm>).

Valdivia LF, Centurión D, Arulmani U, Saxena PR, Villalón CM (2004). 5-HT_{1B} receptors, $\alpha_{2A/2C}$ - and, to a lesser extent, α_1 -adrenoceptors mediate the external carotid vasoconstriction to ergotamine in vagosympathectomised dogs. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **370**: 46–53.

Van Camp G, Flamez A, Cosyns B, Weytjens C, Muyldermans L, Van Zandijcke M, de Sutter J,

- Santens P, Decoodt P, Moerman C, Schoors D (2004). Treatment of Parkinson's disease with pergolide and relation to restrictive valvular heart disease. *Lancet* **363**: 1179–1183.
- Van den Broek RW, Bhalla P, VanDenBrink AM, de Vries R, Sharma HS, Saxena PR (2002). Characterization of sumatriptan-induced contractions in human isolated blood vessels using selective 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptor antagonists and *in situ* hybridization. *Cephalalgia* **22**: 83–93.
- Van Rossum JM (1963). Cumulative dose-response curves. II. Technique for making dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **143**: 299–330.
- Venturini PL, Horowski R, Valenzano M, Costantini S, Fasce V, Gorlero F, Rainer E, de Cecco L (1986). Effect of terguride on prolactin levels in normal, puerperal and hyperprolactinaemic women. *Eur J Clin Pharmacol* **30**: 195–197.
- Vickers AEM, Connors S, Zollinger M, Biggi WA, Larrauri A, Vogelaar JPW, Brendel K (1993). The biotransformation of the ergot derivative CQA 206-291 in human, dog, and rat liver slice cultures and prediction of *in vivo* plasma clearance. *Drug Metab Dispos* **21**: 454–459.
- Villalón CM, Centurión D (2007). Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **376**: 45–63.
- Villalón CM, Centurión D, Willems EW, Arulmani U, Saxena PR, Valdivia LF (2004). 5-HT_{1B} receptors and $\alpha_{2A/2C}$ -adrenoceptors mediate external carotid vasoconstriction to dihydroergotamine. *Eur J Pharmacol* **484**: 287–290.
- Villalón CM, Centurión D, Valdivia LF, de Vries P, Saxena PR (2003). Migraine: pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends. *Curr Vasc Pharmacol* **1**: 71–84.
- Villalón CM, Centurión D, Valdivia LF, de Vries P, Saxena PR (2002). An introduction to migraine: from ancient treatment to functional pharmacology and antimigraine therapy. *Proc West Pharmacol Soc* **45**: 199–210.
- Villalón CM, de Vries P, Rabelo G, Centurión D, Sánchez-López A, Saxena P (1999). Canine external carotid vasoconstriction to methysergide, ergotamine and dihydroergotamine: role of 5-

- HT_{1B/1D} receptors and α_2 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* **126**: 585–594.
- Villalón CM, Heiligers JP, Centurión D, de Vries P, Saxena PR (1997). Characterization of putative 5-HT₇ receptors mediating tachycardia in the cat. *Br J Pharmacol* **121**: 1187–1195.
- Weerasuriya K, Patel L, Turner P (1982). Beta-adrenoceptor blockade and migraine. *Cephalalgia* **2**: 33–45.
- Wei EP, Moskowitz MA, Boccalini P, Kontos HA (1992). Calcitonin gene-related peptide mediates nitroglycerin and sodium nitroprusside-induced vasodilation in feline cerebral arterioles. *Circ Res* **70**: 1313–1319.
- Weiller C, May A, Limmroth V, Jüptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC (1995). Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med* **1**: 658–660.
- Wikberg-Matsson A, Wikberg JE, Uhlén S (1995). Identification of drugs subtype-selective for α_{2A} -, α_{2B} -, and α_{2C} -adrenoceptors in the pig cerebellum and kidney cortex. *Eur J Pharmacol* **284**: 271–279.
- Willems EW, Valdivia LF, Villalón CM, Saxena PR (2003). Possible role of α -adrenoceptor subtypes in acute migraine therapy. *Cephalalgia* **23**: 245–257.
- Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, Dunlop J, Rosenzweig-Lipson S, McGonigle P, Levy RJ, Liang B (2002). Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT₂ receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol* **161**: 2209–2218.
- Zanettini R, Antonini A, Gatto G, Gentile R, Tesei S, Pezzoli G (2007). Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N Engl J Med* **356**: 39–46.
- Zikán V, Semonský M (1960). Mutterkornalkaloide XVI. Einige N-(D-6-Methylisoergolenyl-8)-, N-(D-6-Methylergolenyl-8)- und N-(D-6-Methylergolin(I)-yl-8)-N'-substituierte Harnstoffe. *Collect Czech Chem Commun* **25**: 1922–1928.
- Zuscik MJ, Sands S, Ross SA, Waugh DJ, Gaivin RJ, Morilak D, Perez DM (2000). Overexpression of the α_{1B} -adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration: multiple system atrophy. *Nat Med* **6**: 1388–1394.

7. Publikationsverzeichnis

7.1. Originalarbeiten

- Cobos-Puc LE, Villalón CM, Sánchez-López A, Ramírez-Rosas MB, Lozano-Cuenca J, Pertz HH, Görnemann T, Centurión D (2008). Pharmacological characterization of ergotamine-induced inhibition of the cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats. *Br J Pharmacol*, „submitted“.
- Villalón CM, Albarrán-Juárez JA, Lozano-Cuenca J, Pertz HH, Görnemann T, Centurión D (2008). Pharmacological profile of the clonidine-induced inhibition of vasodepressor sensory outflow in pithed rats: correlation with $\alpha_{2A/2C}$ -adrenoceptors. *Br J Pharmacol*, „in press“.
- Görnemann T, Nayal R, Pertz HH, Melzig MF (2008). Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. *J Ethnopharmacol*, „in press“.
- Görnemann T, Hübner H, Gmeiner P, Horowski R, Latté KP, Flieger M, Pertz HH (2008). Characterization of the molecular fragment that is responsible for agonism of pergolide at serotonin 5-hydroxytryptamine_{2B} and 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **324**: 1136–1145.
- Görnemann T, Jähnichen S, Schurad B, Latté KP, Horowski R, Tack J, Flieger M, Pertz HH (2008). Pharmacological properties of a wide array of ergolines at functional α_1 -adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **376**: 321–330.
- Görnemann T, von Wenckstern H, Kleuser B, Villalón CM, Centurión D, Jähnichen S, Pertz HH (2007). Characterization of the postjunctional α_{2C} -adrenoceptor mediating vasoconstriction to UK14304 in porcine pulmonary veins. *Br J Pharmacol* **151**: 186–194.
- Cobos-Puc LE, Villalón CM, Sánchez-López A, Lozano-Cuenca J, Pertz HH, Görnemann T, Centurión D (2007). Pharmacological evidence that α_{2A} - and α_{2C} -adrenoceptors mediate the inhibition of cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats. *Eur J Pharmacol* **554**: 205–211.
- Pertz HH, Görnemann T, Schurad B, Seifert R, Strasser A (2006). Striking differences of action of lisuride stereoisomers at histamine H₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **374**:

215–222.

Schurad B, Horowski R, Jähnichen S, Görnemann T, Tack J, Pertz HH (2006). Proterguride, a highly potent dopamine receptor agonist promising for transdermal administration in Parkinson's disease: interactions with α_1 -, 5-HT₂- and H₁-receptors. *Life Sci* **78**: 2358–2364.

7.2. Poster

Görnemann T, Glusa E, Pertz HH (2008). Phenylephrine activates both α_1 - and α_2 -adrenoceptors in porcine pulmonary veins. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **377** (suppl 1): 18. 49. *Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 11. - 13. März 2008.*

Görnemann T, Latté KP, Schurad B, Pertz HH (2007). Lisuride is devoid of 5-HT_{2B} receptor agonism and there are no case reports of cardiac valvulopathy. *Parkinsonism Relat Disord* **13** (suppl 2): S120. *XVII WFN World Congress on Parkinson's Disease and related Disorders, Amsterdam, 9. - 13. Dezember 2007.*

Görnemann T, Pertz HH (2006). Characterization of the postsynaptic α_2 -adrenoceptor in porcine pulmonary veins. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372** (suppl 1): 39. 47. *Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 4. - 6. April 2006.*

Görnemann T, Jähnichen S, Moritz A, Pertz HH (2005). Characterization of the postsynaptic α_2 -adrenoceptor in porcine pulmonary veins. *Jahrestagung der DPhG, Mainz. 5. - 8. Oktober 2005* Abstract-Book P06, Seite 147.

Pertz HH, Görnemann T, Schurad B, Jähnichen S (2005). Effects of antiparkinsonian drugs of the ergoline family at histamine H₁ receptors. *Jahrestagung der DPhG, Mainz. 5. - 8. Oktober 2005* Abstract-Book P19, Seite 149.

Schumacher M, Görnemann T, Straßer A, Pertz HH, Elz S (2005). New chiral serotonin analogues as selective 5-HT_{2B}-receptor agonists. *Jahrestagung der DPhG, Mainz. 5. - 8. Oktober 2005* Abstract-Book C139, Seite 43.

8. Anhang

8.1. Erklärung zur eigenständigen Anfertigung der Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Berlin, März 2008

Tilo Görnemann