



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Pharmakologische Charakterisierung und QSAR-basiertes Design neuartiger Liganden des FFAR1 (Freie-Fettsäure-Rezeptor 1)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Urban

aus Gelnhausen

Düsseldorf, Januar 2012

aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Matthias U. Kassack

Koreferent: Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 02. März 2012

Verfassererklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese oder eine ähnliche Arbeit ist von mir nicht anderweitig als Dissertation eingereicht.

Düsseldorf, 18. Juni 2012

(Christian Urban)

***Für meine Eltern,
Gertrud und Manfred***

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	1
1.2 Freie Fettsäure-Rezeptoren.....	5
1.2.1 Allgemeines	5
1.2.2 hFFA1-Rezeptor	5
1.2.3 hFFA2- und hFFA3-Rezeptor.....	9
1.2.4 hGPR120-Rezeptor	10
1.3 Insulinsekretion und physiologische Wirkungen des FFA1	11
1.4 3D-QSAR und strukturbasiertes Wirkstoffdesign	15
1.5 Diabetes mellitus Typ 2 und Metabolisches Syndrom	19
2. Zielsetzung.....	22
3. Material und Methoden	24
3.1 Materialien	24
3.1.1 Programme	24
3.1.2 Chemikalien, Enzyme und Materialien.....	25
3.1.3 Geräte	28
3.1.4 Testkits.....	29
3.1.5 Reaktions-, Pufferlösungen und Medien.....	29
3.2 Methoden	32
3.2.1 Zellkultur	32
3.2.1.1 Zelllinien.....	32
3.2.1.1.1 1321N1-Zellen (rekombinantes Zellsystem).....	32
3.2.1.1.2 Pankreatische INS-1(E)-Zellen der Ratte (physiologisches Zellsystem)...	32
3.2.1.1.3 Zellkultivierung	33
3.2.1.1.4 Zellzahlbestimmung.....	34

Inhaltsverzeichnis

3.2.2 Funktionelle Charakterisierung	34
3.2.2.1 Substanzvorbereitung	34
3.2.2.2 Funktionelle Methoden	35
3.2.2.2.1 Ca ²⁺ -Assay	35
3.2.2.2.2 cAMP-Reporter-Gen-Assay	41
3.2.2.2.3 Zellimpedanzmessung	44
3.2.2.2.4 Insulinsekretions-Assay	49
3.2.2.2.5 MTT-Test	51
3.2.2.2.6 β -Galactosidase-Test	52
3.2.3 In vivo-Charakterisierung	54
3.2.4 Gentechnische Methoden	56
3.2.4.1 Stabiler Einbau von Genen in die FlpIn [®] Host-Zelllinie	56
3.2.4.1.1 Transformation, Vermehrung und Aufreinigung von Vektoren in E.coli	56
3.2.4.1.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung	58
3.2.4.1.3 Gel-Extraktion	59
3.2.4.1.4 Ligation	60
3.2.4.1.5 Transfektion in die 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie	61
3.2.5 Computergestützte Methoden	64
3.2.5.1 Aufbereitung der Ligandstrukturen	64
3.2.5.2 Anpassung der Verbindungen in die hFFAR1-Bindetasche	64
3.2.5.3 Berechnung der Potential- und Interaktionsfelder	66
3.2.5.4 Aufstellen des AFMoC-Modells	67
3.2.5.5 Statistische Parameter zur Beurteilung des AFMoC-Modells	68
3.2.5.6 Aktivitätsvorhersage anhand des AFMoC-Modells	69
4. Ergebnisse	70

Inhaltsverzeichnis

4.1 Testsysteme zur Identifizierung und Charakterisierung möglicher hFFAR1-Liganden	70
4.1.1 Untersuchungen zur zellulären Signaltransduktion in 1321N1-hFFAR1-Zellen	70
4.1.1.1 Ca ²⁺ -Signaltransduktionsweg.....	70
4.1.1.2 cAMP-Signaltransduktionsweg.....	74
4.1.2 Einflüsse auf die Aktivität von hFFAR1-Liganden	76
4.1.2.1 Bovines Serumalbumin	76
4.1.2.2 Polymere Lösungsvermittler.....	80
4.1.2.3 Variation der Messzeit.....	81
4.1.3 Vortest zur Identifizierung möglicher hFFAR1-Liganden.....	83
4.2 In vitro-Charakterisierung von hFFAR1-Liganden.....	84
4.2.1 hFFAR1-Agonisten	85
4.2.1.1 Charakterisierung im Ca ²⁺ -Assay	85
4.2.1.2 Charakterisierung im cAMP-Reporter-Gen-Assay.....	86
4.2.1.3 Korrelation der pharmakologischen Ca ²⁺ - und cAMP-Daten	88
4.2.1.4 Struktur-Wirkungsbeziehungen	89
4.2.1.4.1 Definierung von Leitstrukturen	89
4.2.1.4.2 TUG 20 als Leitstruktur	91
4.2.1.4.3 TUG 309 als Leitstruktur	94
4.2.2 hFFAR1-Antagonisten	99
4.2.2.1 Charakterisierung im Ca ²⁺ -Assay	99
4.2.2.2 Charakterisierung im cAMP-Reporter-Gen-Assay.....	103
4.3 Molekulares Wirkstoffdesign mit dem 3D-QSAR-Modell (AFMoC).....	107
4.3.1 Validierung des AFMoC-Modells	108
4.3.2 hFFAR1-inaktive Verbindungen	111
4.3.3 Vorhersage der Wirkstärke von Literatur-hFFAR1-Agonisten.....	116

Inhaltsverzeichnis

4.3.4 Vorhersage der Wirkstärke von neuen Verbindungen	117
4.3.5 Pharmakophormodell und Entwurf neuer Liganden.....	128
4.3.5.1 Tolan-Verbindungen (TUG 770-Analoga)	130
4.3.5.2 GW9508/TUG 501-Analoga	131
4.3.5.3 Biphenyl-Verbindungen (TUG 469-Analoga)	133
4.3.5.3.1 Entwurf der Verbindungen.....	133
4.3.5.3.2 Biologische Prüfung der Vorhersage	135
4.4 Ex vivo-Charakterisierung ausgewählter hFFAR1-Agonisten	138
4.4.1 Funktionelle Studien.....	138
4.4.1.1 Ca ²⁺ -Assay	138
4.4.1.2 Impedanz-Messung	139
4.4.2 Insulinsekretion an INS-1-Zellen.....	141
4.5 In vivo-Charakterisierung des hFFAR1-Agonisten TUG 469	142
4.5.1 Tierstudie an normalen Mäusen	142
4.5.2 Tierstudie an diabetogenen Mäusen.....	143
4.6 Selektivitäten der hFFAR1-Agonisten.....	148
4.6.1 Überexprimierende FlpIn-Zelllinien	148
4.6.1.1 Humaner FFA1-Rezeptor	148
4.6.1.2 Humaner GPR120-Rezeptor	152
4.6.2 Selektivität der hFFAR1-Liganden zwischen hFFAR1 und hGPR120.....	153
5. Diskussion	156
5.1 Identifizierung und Charakterisierung von hFFAR1-Liganden.....	156
5.2 Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Agonisten (2D-Struktur).....	157
5.3 3D-QSAR und das Design neuer hFFAR1-Liganden	161

Inhaltsverzeichnis

5.4 Auswahl eines Kandidaten und weiterführende in vitro- und ex vivo-Charakterisierung	165
5.5 In vivo-Tierstudie	169
6. Zusammenfassung	171
7. Abstract.....	172
8. Abbildungsverzeichnis	173
9. Tabellenverzeichnis	177
10. Literaturverzeichnis	178
11. Abkürzungsverzeichnis	185
Anhänge.....	188
A1) cDNA-Sequenzen.....	188
A2) Vektorkarte (transiente Transfektion).....	189
A3) Vektorkarten (stabile Transfektion).....	189
A4) Einbau der GOI in FlpIn-Host-Zelllinie.....	190
B1) Strukturformeln.....	191
B2) Pharmakologische und prediktive Daten (hFFAR1-Agonisten).....	197
B3) Pharmakologische Daten (hFFAR1-Antagonisten).....	207
C) Sequenzanalyse	208
D) Curriculum vitae.....	209
E1) Eigene Veröffentlichungen	210
E2) Eigene Veröffentlichungen in Vorbereitung.....	211
F) Danksagung.....	212

1. Einführung

1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (kurz: GPCRs) repräsentieren die größte Familie von Membranproteinen im menschlichen Genom (Kobilka, 2007), spielen bei etlichen Signaltransduktionsprozessen eine wichtige Rolle und stellen damit interessante Zielproteine für die Entwicklung von Pharmaka dar. Rund 30 % der derzeit auf dem Markt erhältlichen Arzneistoffe wirken über GPCRs (Baneres, 2011). Es sind derzeit rund 850 im humanen Genom codierte GPCRs bekannt (Dunworth, 2009; Steinhilber, 2010; Insel, 2011), welche sich nach dem GRAFS-System anhand ihrer sequentiellen oder funktionellen Ähnlichkeit in 5 Klassen einordnen lassen (Fredriksson, 2003; Kobilka, 2007): Rhodopsin-ähnliche (Klasse A), Sekretin- (Klasse B), metabotrope Glutamat-/Pheromon- (Klasse C), Adhäsions- und Frizzled-Rezeptoren. Rund 90% der GPCRs sind Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren, die sich wiederum in Unterklassen gemäß der Art des bindenden Liganden einteilen lassen: α -, β -, γ - und δ -Unterklasse (Bjarnadottir, 2006).

GPCRs sind membranständige heptahelikale Proteine, die nach der Bindung von spezifischen Liganden auf der extrazellulären Seite intrazelluläre Signalkaskaden auslösen können und damit in einer Zelle für die Signalübertragung ins Zellinnere sorgen. Abb. 1 zeigt den schematischen Aufbau eines GPCR anhand eines Homologiemodells des humanen freien Fettsäurerezeptors (hFFAR1). In Abb. 1 A sind die sieben transmembranären Helices (TM1-7) zu sehen, welche über je drei intra- und extrazelluläre, meist flexible Schleifen (Loops) verbunden sind. Das N-terminale Ende des GPCRs befindet sich extrazellulär, das C-terminale Ende intrazellulär. Abb. 1 B zeigt die Rezeptorbindetasche des hFFAR1 mit Aufsicht aus dem extrazellulären Raum. Als ein nativer Ligand ist hier Linolsäure in die Bindetasche eingepasst (Tikhonova, 2007).

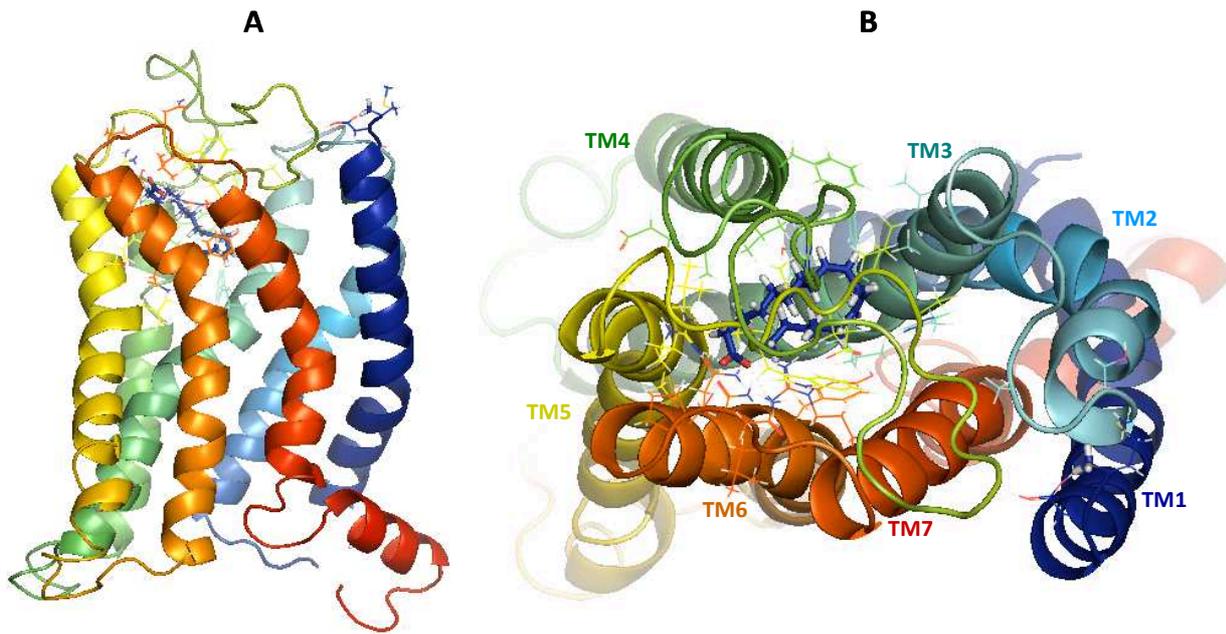


Abbildung 1:

Aufbauprinzip eines GPCRs anhand eines Homologiemodells des humanen Freie-Fettsäure-Rezeptors 1 (hFFAR1) im Komplex mit dem nativen Liganden Linolsäure (blaue sticks). **A:** Seitenansicht des Rezeptors als Querschnitt durch Zellmembran. **B:** Ansicht auf die Rezeptorbindetasche aus dem Extrazellulärraum. Der hFFAR1-Linolsäure-Komplex stammt von Tikhonova et al. (Tikhonova, 2007).

Die höchste Ähnlichkeit in der Sequenzabfolge besitzen GPCRs innerhalb der transmembranären Segmente (Kobilka, 2007). So scheint die Lage der Ligandbindetasche bei Klasse A-Rezeptoren hoch konserviert zu sein (Fatakia, 2009). Die Ligandbindung induziert einen Bruch der ionischen Salzbrücke zwischen Arginin- und Glutamat-Resten der Helices 3 und 6 bei Klasse A-Rezeptoren (hFFAR1). Die Trennung dieser Brücke führt zu einer Drehung bzw. Neigung des zytoplasmatischen Endes von Helix 6 und gilt als Schalter zum Konformationswechsel zwischen einem inaktiven und aktiven Zustand des Rezeptors (Kobilka, 2007; Standfuss, 2011; Sum, 2009). Der am meisten variable Sequenzabschnitt der GPCRs ist neben den C- und N-Termini der zytoplasmatische Loop, der TM5 und TM6 verbindet. Dieser spielt bei der Kopplung des G-Proteins eine Rolle (Kobilka, 2007). G-Proteine liegen im inaktiven Zustand als heterotrimerer Komplex der α -, β - und γ -Untereinheiten vor. Die intrazelluläre Signalkaskade wird von drei Haupttypen von G-Proteinen eingeleitet, die sich in der Art der α -Untereinheit unterscheiden: $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha s}$ und $G_{\alpha i}$. Durch die Bindung von Agonisten wird die aktive Konformation des GPCR stabilisiert, was die Bindestelle für das G-Protein im Zellinneren freilegt. Das G-Protein kann koppeln und ein Austausch des an der α -

1. Einführung

Untereinheit des G-Proteins bindenden GDPs mit GTP findet statt. Daraufhin löst sich die α -Untereinheit von der β/γ -Untereinheit (siehe Abb. 2 und 3). Beide Untereinheiten können in Folge dessen an verschiedenen Effektorproteinen wirken. Es sind bis heute 17 verschiedene α -Untereinheiten bekannt. Abb. 2 zeigt den intrazellulären Effekt, ausgelöst durch einen $G_{\alpha q}$ -gekoppelten GPCR. Die aktivierte α -Untereinheit führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2) durch Aktivierung der Phospholipase-C (PLC). Das eine Spaltprodukt, Diacylglycerol (DAG), erhöht die Proteinkinase-C (PKC)-Aktivität, was wiederum nachgeschaltete Effekte nach sich zieht. Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) hingegen bewirkt durch Stimulation von IP_3 -Rezeptoren (IP_3 -R) an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eine Freisetzung des *Second Messengers*, Calcium (Ca^{2+}), welcher weitere Effekte induziert (Steinhilber, 2010).

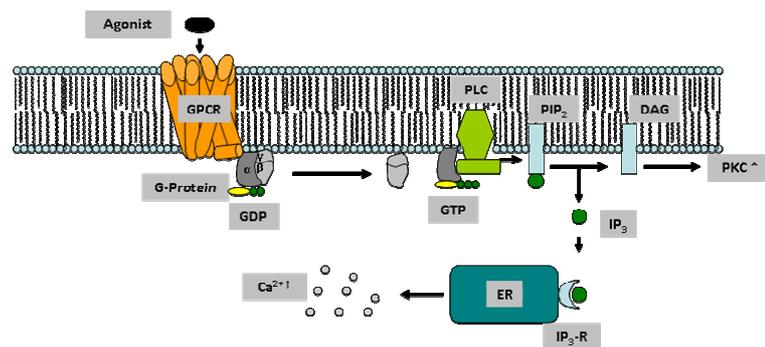


Abbildung 2:

Mechanismus der intrazellulären Signalübermittlung durch einen $G_{\alpha q}$ gekoppelten GPCR. Guanosin-diphosphat/-triphosphat (GDP/GTP), Phospholipase C (PLC), Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2), Diacylglycerol (DAG), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3), Proteinkinase C (PKC), IP_3 -Rezeptor (IP_3 -R), Endoplasmatisches Retikulum (ER), Calcium (Ca^{2+}).

$G_{\alpha s}$ -gekoppelte GPCRs wirken über die Aktivierung der Adenylatzyklase (AC), welche ATP zu cAMP umwandelt (Abb. 3). Dieser *Second Messenger* aktiviert u.a. die Proteinkinase-A, die das cAMP-Response Element-bindende Protein (CREB) phosphoryliert. Phospho-CREB wirkt dann als Transkriptionsfaktor. $G_{\alpha i}$ -inhibiert die AC. In Folge dessen sinkt der intrazelluläre cAMP-Spiegel und die Transkription wird vermindert. Zudem ist bekannt, dass die aktivierte, meist an der γ -Untereinheit gebundene, β -Untereinheit des G-Proteins zellabhängig eine eigene Signalkaskade induziert. Sie stimuliert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI_3K), welche nachgeschaltete Proteine, wie die Proteinkinasen-B, steuert. Des Weiteren

1. Einführung

konnte ebenfalls zellabhängig eine $G_{\beta/\gamma}$ -vermittelte Aktivierung der Phospholipase-C beobachtet werden, die analog über den vom G_q -vermittelten Signalweg zur Ca^{2+} -Freisetzung führt (Steinhilber, 2010).

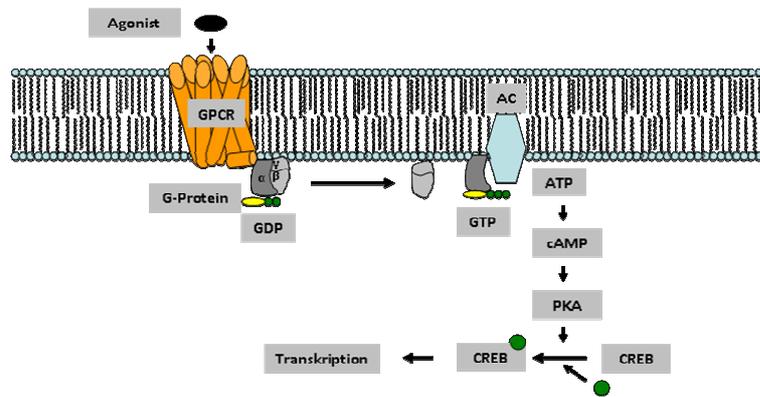


Abbildung 3:

Mechanismus der intrazellulären Signalübermittlung durch einen $G_{\alpha s}/G_{\alpha i}$ gekoppelten GPCR. Guanodin-di- (bzw. tri-)phosphat (GDP/GTP), Adenylcyclase (AC), Adenosin-triphosphat (ATP), cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP), Proteinkinase A (PKA), cAMP-Response Element-bindendes Protein (CREB).

GPCRs sind nicht nur schnelle Signalvermittler ins Zellinnere, sie können auch sehr schnell wieder inaktiviert werden. Zum einen führt die durch die GTPase-Funktion der α -Untereinheit hervorgerufene Hydrolyse des GTP im aktiven Zustand zu einer Rückformung des Komplexes mit der β/γ -Untereinheit und damit zum inaktiven Zustand des G-Proteins. Zum anderen können GPCRs durch Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten desensitiviert und down-reguliert werden (Voet und Voet, 2004). Als Folge dieser Phosphorylierung kommt es zu einer Bindung von β -Arrestin und einer Konformationsänderung des Rezeptors, welche die Interaktion des Rezeptors mit dem G-Protein beeinflusst. Die Bildung des Rezeptor- β -Arrestin-Komplexes kann durch die Bindung an Clathrin zu einer Internalisierung des Rezeptors führen (Luttrell und Lefkowitz, 2002). Eine Feinregulation der durch die GPCRs ausgelösten Wirkungen kann neben der bereits beschriebenen unterschiedlichen Signaltransduktionswege auch durch das Zusammenspiel mehrerer unterschiedlich gekoppelter Rezeptoren oder durch eine gewebsspezifische Expression von GPCRs erfolgen (Steinhilber, 2010).

1.2 Freie Fettsäure-Rezeptoren

1.2.1 Allgemeines

Fettsäuren kommen ubiquitär in allen Organismen dieser Erde vor und nehmen hier lebenswichtige Funktionen ein. So werden diese als strukturbildende Bestandteile von Zellmembranen und Lipiden (auch Lipoproteinen) genutzt und stellen sowohl eine Energiequelle durch Fettsäureabbau sowie eine Möglichkeit des Energiespeicherns durch den entsprechenden Aufbau dar. Ferner werden diese zunehmend auch als Botenstoffe ins Gespräch gebracht, die bei der Übermittlung von Signalen beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wurde 1997 eine neue G-Protein gekoppelte Rezeptorfamilie auf dem Chromosomabschnitt 19q13.1 entdeckt (Sawzdargo, 1997). Seit 2003, als die Familie als freie Fettsäurerezeptoren (FFAR) bezeichnet wurde (Itoh, 2003), hat die Forschung an diesen Rezeptoren stark zugenommen. Mitglieder der FFAR-Familie zählen zur γ -Unterklasse der Rhodopsin-ähnlichen GPCRs. Ihre Vertreter sind der freie Fettsäurerezeptor 1, 2 und 3 (FFAR1, FFAR2, FFAR3) (Bjarnadottir, 2006). Die Rezeptorfamilie besitzt untereinander eine Sequenzidentität von 30-40% (Miyauchi, 2010). Darüber hinaus ist der Rezeptor GPR120 bekannt, der mit dem hFFAR1 eine Aminosäureidentität von lediglich 10% besitzt, jedoch mit mittellang- bis langkettigen freien Fettsäuren gemeinsame native Liganden teilt (Hara, 2011; Miyauchi, 2010; Rayasam, 2007). Dieser pharmakologische Zusammenhang macht den GPR120 bei der Entwicklung von selektiven FFAR1-Liganden daher sehr interessant.

1.2.2 hFFA1-Rezeptor

Das erste Mitglied der Rezeptorfamilie stellt das bereits am intensivsten untersuchte Zielprotein dar. Als der FFAR1 (früher: GPR40) 2003 u.a. von Itoh et al. (Briscoe, 2003; Itoh, 2003) näher charakterisiert und sowohl das Ligandprofil als auch die Funktion im Organismus geklärt werden konnte, stieg die Zahl von Veröffentlichungen im Bereich des FFAR1 rasant an. Als native Liganden des FFAR1 sind mittellang- bis langkettige freie Fettsäuren (C6-C24) bekannt. Es gibt keine erkennbare Bevorzugung, was den Grad an Ungesättigtheit betrifft. Freie Fettsäuren der Länge C16-22 sind die potentesten nativen

1. Einführung

Agonisten (Briscoe, 2003). Als native Bezugsliganden des FFAR1 haben sich die Öl-, und Linolsäure mit einem pEC_{50} -Werte von 4,39 respektive 5,02 bewährt (Briscoe, 2003).

Der FFAR1 wird vorwiegend in den humanen β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas exprimiert und steigert die glucoseabhängige Ausschüttung von Insulin (Itoh, 2003). Der FFAR1 koppelt an $G_{\alpha q}$ -Proteine (Feng, 2006; Fujiwara, 2005; Kebede, 2009; Yang, 2010). Rezeptorstimulation führt daher zu einer Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} (Kap. 1.1). Der Anstieg der zytoplasmatischen $[Ca^{2+}]$ nach FFAR1-Stimulation kann zudem in Gegenwart eines L-Typ-Calciumkanal-Blockers von der Glucoseabhängigkeit entkoppelt werden (Yang, 2010). Ferner gibt es Hinweise, dass der FFAR1 noch weiteren Kopplungswegen unterliegt, beispielsweise wurde eine $G_{\alpha i}$ -Kopplung in rekombinanten Zellen (Fujita, 2011; Itoh, 2003; Schröder, 2010) und auch eine $G_{\alpha s}$ -Kopplung in physiologischen Zellen (Feng, 2006; Gromada, 2006) beobachtet. Hierbei sind jedoch auch zellspezifische Eigenheiten zu berücksichtigen.

Neben den nativen Liganden wie der Linolsäure gibt es bereits eine Fülle an synthetischen FFAR1-Agonisten (Abb. 4). Als gemeinsames Merkmal ist der anionische Teil anzuführen: Carbonsäurefunktion bei den freien Fettsäuren und den Vertretern der großen Gruppe von 3-Phenyl-Propionsäure-Derivaten (GW9508 und TUG 424), Thiazolidindione wie bei Cpd B sowie eine vinyloge Carbonsäure wie bei Substanz 58. Die Wirkstärke bei der Aktivierung des FFAR1 liegt bei den nativen Liganden im micromolaren, bei den potentesten synthetischen Vertretern im nanomolaren Konzentrationsbereich (pEC_{50} : 7,0-8,5).

1. Einführung

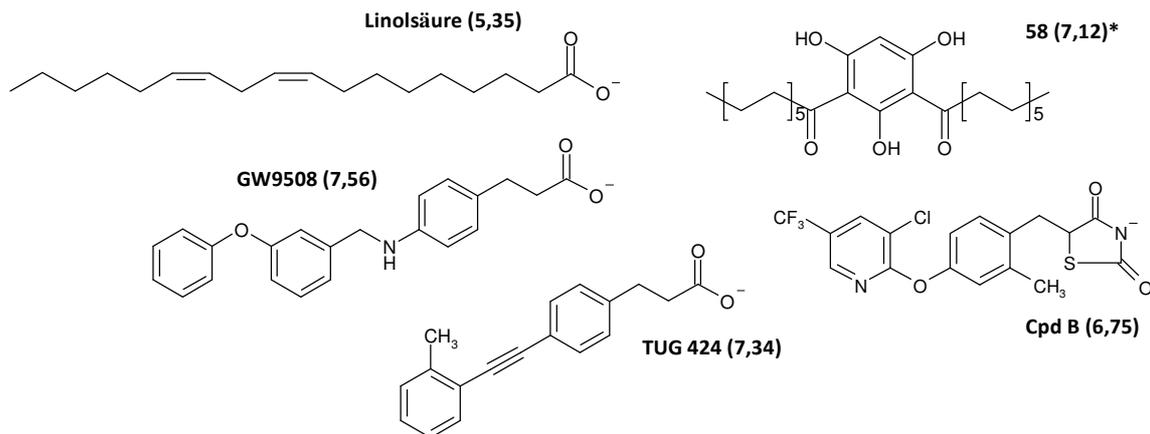


Abbildung 4:

Vertreter bisher veröffentlichter Gruppen von FFAR1-Agonisten (Wirkstärke als pEC_{50}). * pEC_{50} -Wert stammt nicht aus eigener Arbeit. Quellen: GW9508 (Garrido, 2006), 58 (Bharate, 2008), Cpd B (Tan, 2008).

Antagonisten des FFAR1 hingegen sind wenige bekannt. Abb. 5 zeigt vier Beispiele von strukturell unterschiedlichen Antagonisten. Alle aufgeführten Beispiele besitzen einen IC_{50} -Wert im mikromolaren Konzentrationsbereich und sind damit schwach potent (nur die pIC_{50} von Cpd 2 = TUG 762 stammt aus dieser Arbeit). Stärker potente Antagonisten sind bis dato nicht bekannt. Bei Cpd 65 handelt es sich um einen allosterisch wirkenden Antagonisten, alle übrigen in Abb. 5 aufgeführten Antagonisten sind kompetitiv.

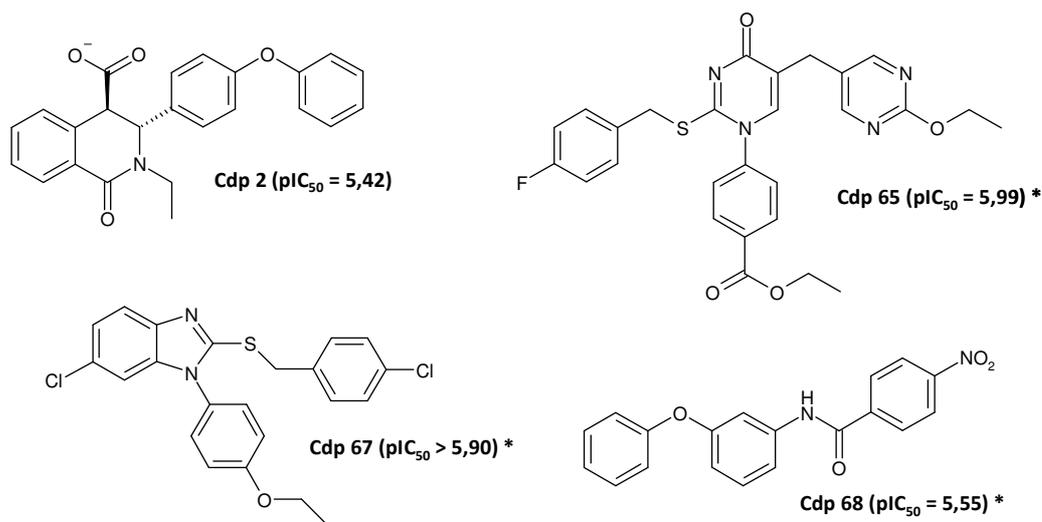


Abbildung 5:

Ausgewählte bisher bekannte Antagonisten (Wirkstärke als pIC_{50}). * pIC_{50} -Wert stammt nicht aus eigener Arbeit. Quellen: Cdp 2 (Humphries, 2009), Cpd 65, 67 und 68 (Bharate, 2009).

1. Einführung

Das Tetrahydroisochinolin (Cpd 2) besitzt als einziger hier aufgeführter Antagonist ein anionisches Carboxylat. Gemeinsamkeit aller Antagonisten sind die lipophilen aromatischen Ringe.

Erste strukturspezifische Eigenschaften des hFFAR1 haben Tikhonova et al. 2007 beschrieben. Ausgehend von der Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin wurde ein Homologie-modell des hFFAR1 entwickelt. Da sich Rhodopsin und hFFAR1 in ihrer Sequenzidentität der transmembranären Helices nur zu 16% gleichen, wurden 30 Aminosäurereste aus dem oberen Teil des helikalen Bündels einer Konformationsanalyse unterzogen. Nach einer Auswahl verschiedener Konformationen, dem Einpassen des Liganden GW9508 in die Rezeptorbindetasche und unterstützenden Mutagenesestudien, wurde eine Model für die Rezeptorbindetasche im Komplex mit der Verbindung GW9508 postuliert (Sum, 2007; Tikhonova, 2007). Abb. 6 zeigt die laut Modell zur Bindetasche gehörenden und für die Bindung von GW9508 benötigten Aminosäurereste. Der Carboxylatanker setzt sich aus zwei Argininen (183, 258), einem Serin (247) und einem Asparagin (244) zusammen. Hier treten Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen auf. Ferner wird eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen Tyrosin (91) und dem Oxy-Linker sowie eine π/π - bzw. π /Kation-Wechselwirkung zwischen Histidin (137) und dem terminalen Phenylring postuliert.

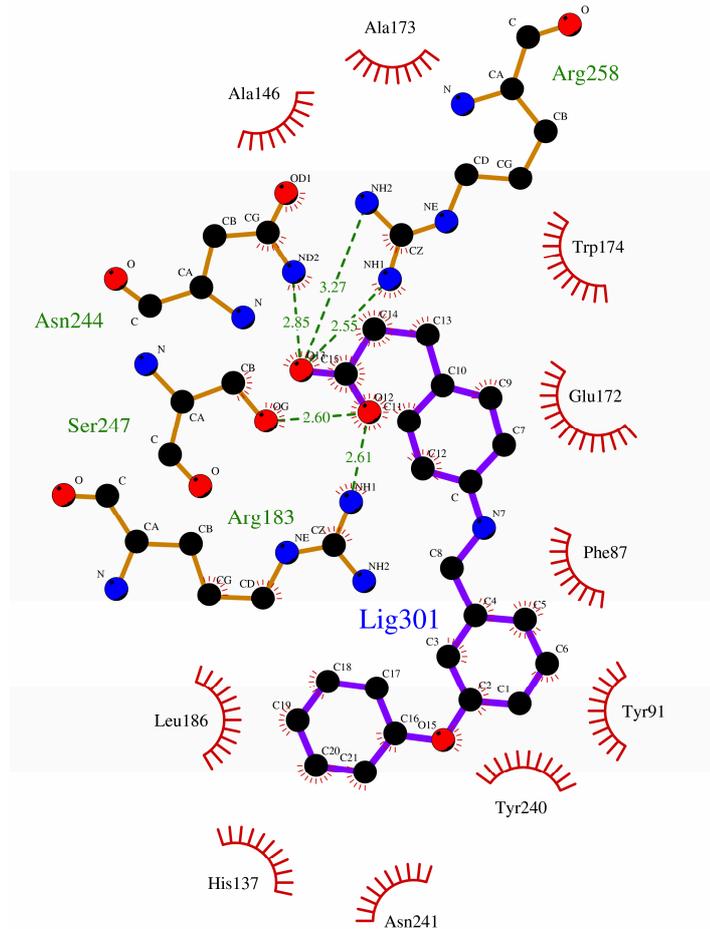


Abbildung 6:

Aminosäurereste der postulierten hFFAR1-Bindetasche und Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mit dem Agonist GW9508 (Lig301) (Tikhonova, 2007).

Zwei Jahre später zeigte dann die gleiche Arbeitsgruppe, dass eine Bindung der FFA1-Liganden GW9508 und Linolsäure in die Tasche zu einer Schwächung der Salzbrücken zwischen Glu145/Arg183 bzw. Glu172/Arg258 führt. Dies gilt als initialer Vorgang zum Konformationswechsel zwischen aktivem und inaktivem Rezeptorzustand (Sum, 2007).

1.2.3 hFFA2- und hFFA3-Rezeptor

Die mit dem FFAR1 bezüglich ihrer Aminosäuresequenz stark verwandten Rezeptoren FFAR2 (früher: GPR43) und FFAR3 (früher: GPR41) werden von kurzkettigen freien Fettsäuren (C2-C6) aktiviert und besitzen somit keine gemeinsamen nativen Liganden mit dem FFAR1.

Der FFAR2 wird primär auf Neutrophilen, Eosinophilen und anderen Immunzellen, sowie Adipozyten und Zellen des Intestinaltrakts exprimiert. Er spielt bei der Rekrutierung von Neutrophilen bei Immunprozessen im Bereich des Darms eine Rolle und wird mit der Energiehomöostase und der Appetitregulierung in Verbindung gebracht (Cox, 2009; Hirasawa, 2008; Swaminath, 2011).

Der FFAR3 wird vorwiegend in Adipozyten exprimiert und erhöht bei Aktivierung die Produktion von Leptin (Milligan, 2009; Xiong, 2004). Ferner ist weiteres FFAR3-exprimierendes Gewebe bekannt, wie Pankreas, Milz, die Lymphknoten, Knochenmark u. a., was den FFAR3 ebenfalls zu einem interessanten Wirkstoffzielprotein macht (Milligan, 2009).

Die Arbeit von Schmidt et al. eröffnete erste Struktur-Wirkungsbeziehungen und mögliche Ursachen einer selektiven Bindung am FFAR2 gegenüber FFAR3 und stellt damit eine erste Grundlage zur gezielten Entwicklung von selektiven FFAR2- und FFAR3-Liganden dar (Schmidt, 2011).

1.2.4 hGPR120-Rezeptor

Der hGPR120 nimmt eine Einzelstellung unter den hFFA-Rezeptoren ein, er weist mit dem hFFAR1 lediglich 10% Gemeinsamkeit bezüglich der Aminosäureidentität auf (Miyachi, 2010). Mittel- bis langkettige freie Fettsäuren als native Liganden besitzt er ebenso wie der FFAR1, wobei bevorzugt ω -3-ungesättigte freie Fettsäuren (C16-22) binden (Burns und Moniri, 2010; Miyachi, 2010). Den GPR120 exprimieren vorwiegend Zellen des Intestinaltrakts, wo er eine vermehrte Ausschüttung von GLP-1 bewirkt, die zu einer Erhöhung der Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas führt. Ferner wird der GPR120 im Fettgewebe sowie Makrophagen exprimiert, wo er Effekte auf chronische Entzündungsprozesse zeigt. Der inhibitorische Effekt des GPR120 auf die Induktion inflammatorischer Prozesse kann der Entwicklung einer Insulinresistenz entgegenwirken (Hara, 2011; Oh, 2010; Sun, 2010). Diese GPR120-induzierten Effekte machen den GPR120 ebenfalls zu einem interessanten Zielprotein für das Design neuartiger Wirkstoffe zur Behandlung des Typ 2 Diabetes mellitus.

1. Einführung

Der GPR120 ist $G_{\alpha q}$ -gekoppelt, erhöht die intrazelluläre $[Ca^{2+}]$ und aktiviert eine ERK-Kaskade (Hirasawa, 2008). Abb. 7 zeigt einen Überblick über die derzeit bekannten GPR120-Liganden und deren Potenz am hGPR120 sowie am hFFAR1. Der native Ligand α -Linolensäure zeigt einen pEC_{50} am hGPR120 von 5,6, am hFFAR1 von 5,3 und ist somit unselektiv (Suzuki, 2008). GW9508, ein bekannter FFAR1-Agonist, besitzt laut Angaben der Literatur am hGPR120 eine Potenz von 5,65 (pEC_{50}) und am hFFAR1 von 7,32 und ist damit etwa 50-fach potenter am hFFAR1 als am hGPR120 (Briscoe, 2006). Aus den Daten dieser Arbeit geht ebenfalls eine Selektivität von GW9508 für den hFFAR1 hervor, allerdings ist diese hier wesentlich geringer (Kap. 4.7.2).

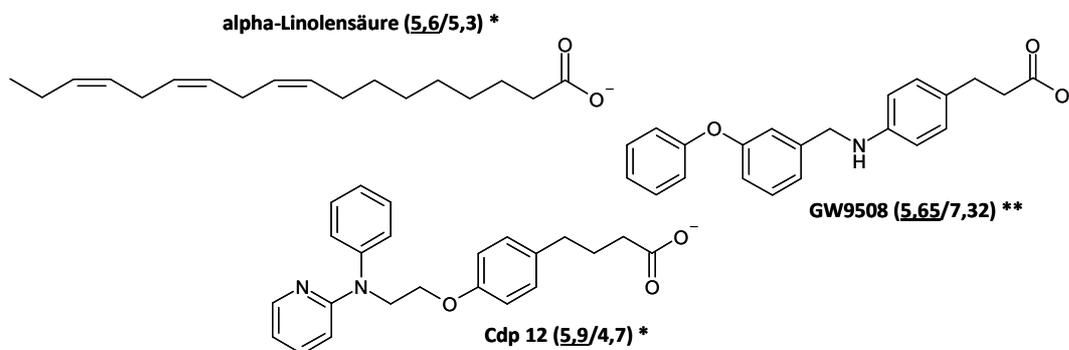


Abbildung 7:

Strukturen ausgewählter bekannter GPR120-Agonisten (pEC_{50} am hGPR120 / pEC_{50} am hFFA1). * pEC_{50} -Werte (Suzuki, 2008) ** pEC_{50} -Werte (Briscoe, 2006).

Ein relativ selektiver GPR120-Agonist ist Cpd 12 mit einer 16-fach höheren Potenz am hGPR120 als am hFFAR1. Die strukturellen Unterschiede, die die Selektivität bedingen, stellen zum einen die um eine Methyleneinheit verlängerte Säureeinheit, sowie der verzweigte terminale Bereich dar. Bei Cpd 12 handelt es sich um einen modifizierten Agonisten des PPAR γ (Suzuki, 2008). GPR120-Antagonisten sind noch keine bekannt.

1.3 Insulinsekretion und physiologische Wirkungen des FFA1

Die Produktion und Ausschüttung von Insulin findet in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas statt. Insulin ist eines der wichtigsten Peptidhormone im Nährstoffwechsel und für die Verwertung der aufgenommenen Glucose zuständig. Abb. 8 zeigt die

1. Einführung

Induktion der Insulinsekretion aus einer β -Zelle. Die Aufnahme von Glucose durch Glucosetransporter-2 und der anschließende enzymatische Abbau von Glucose-6-Phosphat nach Aktivierung durch Glucosekinase führen zur Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses. Dies bedingt den Verschluss von ATP-abhängigen Kaliumkanälen, was eine Depolarisation der Zellmembran nach sich zieht. Eine Depolarisation hat das Öffnen von L-Typ-Calciumkanälen zur Folge, die intrazelluläre $[Ca^{2+}]$ steigt an und bewirkt den Efflux von Insulin aus den intrazellulären Speicherorganellen (Granula) (Shapiro, 2005).

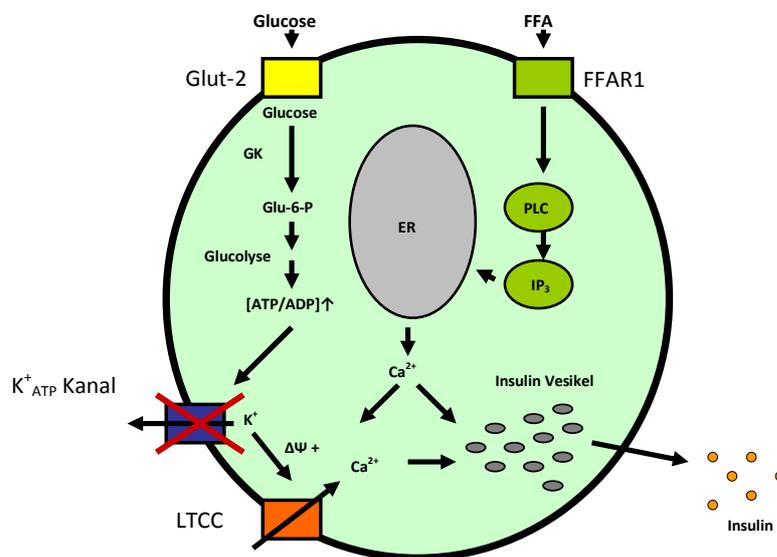


Abbildung 8:

Induktion der Insulinsekretion durch Glucose und Steigerung der Insulinsekretion durch den FFAR1-vermittelten Signaltransduktionsweg. Graphik adaptiert von Shapiro et al. und Gromada (Gromada, 2006; Shapiro, 2005). Glut-2: Glucosetransporter-2; GK: Glucosekinase; Glu-6-P: Glucose-6-Phosphat; K⁺_{ATP} Kanal: ATP-abhängiger Kaliumkanal; $\Delta\Psi+$: Depolarisation der Zellmembran; LTCC: L-Typ-Calciumkanal; ER: Endoplasmatisches Retikulum; PLC: Phospholipase-C; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat.

Der FFAR1 bewirkt über die Aktivierung von Phospholipase-C (vgl. Kap. 1.1) einen Anstieg der [IP₃], was durch IP₃-Rezeptorstimulation einen Efflux von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol nach sich zieht. Dies führt zu einer Erhöhung der sezernierten Insulinmenge (Shapiro, 2005). Es wurde berichtet, dass der FFAR1-Effekt abhängig von der Glucosekonzentration ist (Briscoe, 2006; Christiansen, 2008). Diese Abhängigkeit lässt sich jedoch unter Verwendung eines Sulfonylharnstoffs oder eines Aktivators von L-Typ-Calciumkanälen in der Ratten- β -Zelllinie INS-1E vom FFAR1-Effekt entkoppeln (Yang, 2010).

1. Einführung

Die FFAR1-vermittelte Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion (GSIS) in physiologischen Systemen wurde in kultivierbaren Ratten- und Maus-Zelllinien (MIN-6 und INS-1), sowie in primären β - oder Inselzellen des Pankreas nachgewiesen und kann daher als eine allgemein gültige Kurzzeitwirkung des FFAR1 angesehen werden (Briscoe, 2006; Christiansen, 2008; Fujiwara, 2005; Shapiro, 2005; Wu, 2010; Yang, 2010).

Ob sich eine langfristige FFAR1-Stimulation ebenso positiv auswirkt, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Langkettige freie Fettsäuren führen zu einer Erniedrigung der GSIS und β -Zelldysfunktion bei Langzeitgabe. Es gibt Hinweise darauf, dass dieser Langzeiteffekt freier Fettsäuren über den FFAR1 vermittelt wird (Steneberg, 2005; Zhao, 2008). Steneberg et al. zeigten, dass FFAR1-„*knock-down*“-Mäuse vor der Entwicklung einer fettinduzierten Insulinresistenz und Glucoseintoleranz geschützt sind. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine FFAR1-Überexpression zur Verminderung der Insulinsekretion und Diabetes mellitus führt (Steneberg, 2005). Dem entgegen zeigten Latour et al. an isolierten primären Langerhansschen Inseln von FFAR1-„*knock-out*“-Mäusen, dass sich nach Langzeitbehandlung mit freien Fettsäuren im Vergleich zum Wildtyp der gleiche verminderte Effekt auf die Insulinsekretion ergibt. Latour et al. folgerten aus ihren Ergebnissen, dass der FFAR1 zwar für die Vermittlung der Kurzzeitwirkung verantwortlich ist, der negative Langzeiteffekt jedoch nicht FFAR1-vermittelt zu sein scheint (Latour, 2007). Die Ergebnisse der Arbeiten von Nagasumi et al. und Wu et al. sind im Einklang mit den Aussagen von Latour (Nagasumi, 2009; Wu, 2010). Anhand einer transgenen Maus (hFFAR1), die den hFFAR1 überexprimiert, wurde beobachtet, dass die Überexpression keinen Einfluss auf den metabolischen Status bei Nährstoffgabe hat. Die Nüchternwerte der transgenen hFFAR1-Maus waren sogar erniedrigt und die Glucosetoleranz verbessert gegenüber der Kontrolle (Nagasumi, 2009). Bei der Beurteilung dieser widersprüchlichen Befunde muss bedacht werden, dass sich das Maß der Expressionsunterschiede bei den Arbeiten von Steneberg et al. und Nagasumi et al. unterscheidet und andere Promotoren verwendet wurden (Alquier und Poitout, 2009). Tan et al. berichteten neben der akuten Verbesserung der Glucosetoleranz bei C57/BL-6-Mäusen durch einen potenten synthetischen FFAR1-Agonisten der Gruppe der Glitazone auch von einem verbesserten Langzeiteffekt dieser Verbindung auf die Glucosetoleranz. Eine verbesserte Glucosetoleranz bestand bei fettgefütterten Mäusen weiter, auch nach 10 Tagen einer Behandlung mit täglich einmal 10 mg/kg des FFAR1 Agonisten (Tan, 2008). Bei

1. Einführung

der Arbeit einer chinesischen Forschergruppe wurde die FFAR1-Expression bei der Insulinomazelllinie β TC3 der Maus mit shRNA herunterreguliert. Es zeigte sich, dass die akute freie Fettsäure-induzierte Erhöhung der Insulinsekretion ausblieb. Der FFAR1 ist somit für die kurzzeitige Steigerung der Insulinsekretion notwendig. Langzeitbehandlung mit freien Fettsäuren führte hingegen bei normaler und herunterregulierter shRNA-Expression des FFAR1 zu einer Reduktion der Insulinsekretion. Wu et al. folgern hieraus, dass freie Fettsäuren den negativen Langzeiteffekt zwar bedingen, dieser jedoch nicht FFAR1-vermittelt ist (Wu, 2010).

FFAR1 hat im Pankreasgewebe und anderen Geweben weitere Effekte. So wird dem FFA1 eine Rolle bei der Inkretinausschüttung zugesprochen. Laut Steneberg et al. 2008 wird der FFAR1 in endokrinen Zellen der Maus exprimiert und führt dort zu einer FFA-induzierten Ausschüttung der Darmhormone (Edfalk, 2008). Inkretine (wie GLP-1) zeigen einen insulinotropen Effekt an pankreatischen β -Zellen ebenso wie der FFA1-induzierte direkte Effekt an den Zellen. Sie induzieren eine gesteigerte Insulinsekretion über membranständige GLP-1-Rezeptoren. Zudem können sie die Insulinproduktion fördern (Kim und Egan, 2008). Ferner konnten Wang et al. beobachten, dass eine Stimulation mit Linolsäure zu einer Erhöhung der Glucagonausschüttung aus primären pankreatischen Inseln bei 3 und 15 mM Glucose führt. Grund hierfür soll eine FFA1-vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ über Phospholipase-C-Stimulierung in pankreatischen α -Zellen sein (Wang, 2011).

Der Einsatz weiterer synthetischer hFFAR1-Agonisten zeigte in Tierstudien eine gesteigerte Insulinsekretion und positive systemische Kurzeiteffekte auf die Glucosetoleranz (Doshi, 2009; Negoro, 2010; Sasaki, 2011). Zwei FFA1-Rezeptor-Agonisten befinden sich in klinischen Studien: TAK-875 und AMG837 (Morrison, 2011; Negoro, 2010).

Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine FFAR1-Expression im Hippocampus von Affen (Ma, 2008), eine Rolle des FFAR1 bei der Differenzierung neuronaler Stammzellen bei Ratten (Ma, 2010) sowie bei der Proliferation von humanem Brusttumorgewebe und bronchialen Epithelialzellen (Gras, 2009; Hardy, 2005). Ferner zeigen neuere Untersuchungen einen antiinflammatorischen Effekt des FFAR1 in der Haut und einen möglichen Einfluss bei der Neurogenese von Erwachsenen (Boneva, 2011; Fujita, 2011).

1.4 3D-QSAR und strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Die Bestimmung von quantitativen Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR) ist der Versuch, die strukturellen Eigenschaften von Wirkstoffen mit ihrer Aktivität am Zielprotein in einen quantitativen Zusammenhang zu bringen. Zum einen sind QSAR-Analysen ein probates Mittel um die pharmakophoren Elemente einer Wirkstoffgruppe herauszustellen und die Aktivitätsunterschiede anhand struktureller Unterschiede zu erklären. Auf der anderen Seite kann eine solche Analyse aber auch dazu verwendet werden, ausgehend von einem Ensemble bekannter Verbindungen neue Strukturen zu entwickeln, die idealer Weise eine erhöhte Aktivität gegenüber vorherigen Verbindungen besitzen.

Hansch und Fujita entwickelten 1964 ein mathematisches Modell, um quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen zu bestimmen. Dabei werden biologische Aktivitäten mit physikochemischen Eigenschaften (z.B. Log P-Wert, Polarisierbarkeit, sterische Parameter etc.) einer Wirkstoffreihe korreliert (Klebe, 2009). Etwa zeitgleich wählten Free und Wilson einen anderen Weg zur Ermittlung erster SAR. Sie gingen davon aus, dass sich innerhalb einer strukturell ähnlichen Wirkstoffgruppe eine Referenzverbindung (meist die Leitstruktur) ausmachen lässt, auf die sich strukturelle Änderungen, die die Aktivität positiv oder negativ beeinflussen, relativieren lassen. Da in dieser sog. *Free-Wilson-Analyse* die An- und Abwesenheit, sowie die Position bestimmter struktureller Gegebenheiten an der Grundstruktur direkt mit der Aktivität in Beziehung gesetzt werden, spricht man hier von einer ersten echten QSAR-Methode (Klebe, 2009). Als einer der ersten 3D-Ansätze zur Erstellung einer QSAR kann CoMFA (*comparative molecular field analysis*) angesehen werden. CoMFA bindet zunächst die überlagerten und energieminierten Strukturen einer Wirkstoffreihe in ein 3D-Gitter ein, sodass sich alle einzelnen Bestandteile (Atome) dieser Verbindungen im Raum beschreiben lassen. Anschließend werden die Gitterschnittpunkte mit atomaren Sonden abgefahren und physikalische Potenziale (van-der-Waals-Wechselwirkung, Coulomb) zwischen der Sonde und den Atomen der überlagerten Moleküle berechnet (Cramer, 1988). Die Gesamtheit dieser Potenziale wird dann einer PLS (*partial-least-squares*)-Analyse unterzogen und kann anschließend SAR quantitativ wiedergeben. Informationen zur Proteinumgebung bleiben hierbei jedoch unberücksichtigt.

1. Einführung

Neben 3D-Strukturen von Wirkstoffmolekülen sind immer mehr strukturelle Informationen zu diversen Zielproteinen mit Hilfe der NMR oder Röntgen-Strukturanalyse zugänglich, zunehmend auch von Membranproteinen wie GPCRs (Kobilka, 2007).

Ein auf dem CoMFA-Ansatz aufbauendes 3D-QSAR-Verfahren, das zusätzlich Informationen über die Proteinumgebung berücksichtigt, ist die AFMoC (*adaption of fields for molecular comparison*)-Analyse, die 2002 von Gohlke und Klebe vorgestellt wurde (Gohlke und Klebe, 2002b). Hier wird ebenfalls ein 3D-Gitter verwendet, welches noch vor dem Einsatz der Liganden in die Rezeptorumgebung (Bindetasche) eingebettet wird. Die atomaren Sonden (z.B. C.2, C.3, C.ar, N.3, N.ar, N.pl3, O.2, O.3 usw.) fahren die Gitterpunkte ab und Potenziale, die sich zwischen den Gitterpunkten und den Atomen des Proteins ergeben, werden berechnet und prägen das Gitter so vor (Potentialfelder). Anschließend werden analog zum CoMFA-Ansatz die überlagerten und minimierten Ligandstrukturen in das Gitter eingesetzt und eine erneute Berechnung der Potenziale an den vorgeprägten Gitterpunkten durchgeführt. Die Berechnung der Paarpotenziale erfolgt durch die wissensbasierte Bewertungsfunktion *DrugScore*, die aus 1376 kristallographisch bestimmten Protein-Ligand-Komplexen abgeleitet wurde (Gohlke und Klebe, 2002a). Zur Charakterisierung dieser Paarpotenziale nutzt man die in Abb. 9 dargestellten Annahmen. Eine wechselseitige Anziehung ergibt sich bei negativen Potenzialen (Klebe, 2009). Der *Gaußsche* Term für die Abstoßung ist bei geringen Abständen limitiert. Zur Berechnung der Interaktionsfelder zwischen den Ligandatomen und den vorgeprägten Potenzialfeldern wird die *Gaußfunktion* bis zur Distanz $d_{\max+dr}$ und anschließend bis zur Distanz r_{\max} die wissensbasierte *DrugScore*-Funktion verwendet.

1. Einführung

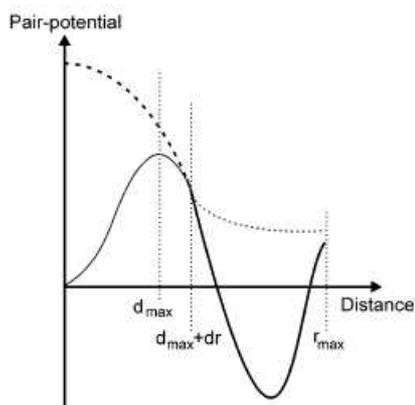


Abbildung 9:

DrugScore-Funktion (durchgezogene Linie) und Gaußfunktion (gestrichelte Linie) für die Bestimmung interatomarer Potenziale. Graphik entnommen aus (Gohlke und Klebe, 2002b).

Die Gesamtheit der errechneten Paarpotenziale aller Atomtypen und Liganden bilden die Grundlage zur Generierung der QSAR. Mit diesem Datensatz wird ein Gleichungssystem mit den experimentellen Daten der Liganden aufgestellt und einer *PLS*-Analyse unterzogen. Hiernach wird der Datensatz auf wenige, den Zusammenhang zwischen experimentellen und strukturellen Daten möglichst gut beschreibenden Deskriptoren reduziert. Die gewichteten Faktoren (Deskriptoren) als Ergebnis der *PLS* werden in Form von $\text{Stddev} \cdot \text{Koeff}$ -Feldern jedes verwendeten Atomtyps dargestellt. So können die distanzabhängigen und an den Gittersonden lokalisierten Paarpotenziale in Form von Isokonturfeldern visualisiert werden, wodurch für jeden verwendeten Atomtyp günstige Bereiche (sog. *Hot Spots*) identifiziert werden können. Die *Hot Spots* bieten zum einen Möglichkeiten zur Strukturweiterung oder -änderung auf, können aber auch dazu herangezogen werden, das Pharmakophor der Liganden zu formulieren (Gohlke und Klebe, 2002a). Diese Konturkarten weisen für jeden Atomtyp Räume auf, in denen die Anwesenheit entsprechender Atomtypen die vorhergesagte Aktivität eines hFFAR1-Liganden begünstigt oder auch erniedrigt.

Einen Vorteil kann der AFMoC-Ansatz gegenüber der CoMFA-Analyse letztlich nur dann haben, wenn Informationen über das verwendete Zielprotein vorhanden sind. Je genauer diese sind, desto besser ist das Modell für die Vorhersage von Aktivitäten geeignet. Liegen für ein Zielprotein keine Kristallstrukturen vor, wie es bei GPCRs oft der Fall ist, muss ein Homologiemodell entwickelt werden, das diese Informationslücke schließen soll. Zur Erstellung eines solchen Modells werden zunächst bekannte Kristallstrukturen von GPCRs

1. Einführung

(z. B. Rhodopsin-, β 2-Adrenerger- oder H1-Rezeptor) als Grundlage herangezogen. Des Weiteren müssen die Aminosäurereste adaptiert werden. Mutagenesestudien helfen, die Ligand-Protein-Beziehung auf molekularer Ebene aufzudecken. Elektrostatische (Salzbrücken, Wasserstoffbrücken, Dipol/Dipol-Wechselwirkungen und Wechselwirkungen zu Metallionen), sterische Wechselwirkungen, sowie Van-der-Waals-Wechselwirkungen (z.B. hydrophobe Wechselwirkungen) sind an der Bildung des Ligand-Protein-Komplexes beteiligt, aber auch Beiträge aus der Solvatisierung bzw. Desolvatisierung von Ligand und Protein spielen oft eine wichtige Rolle. Idealerweise kann mit Hilfe der Modellierung des Proteins und der QSAR ein zur Proteinstruktur komplementärer Ligand entworfen werden, dessen Bindungsstärke möglichst hoch ist.

In dieser Arbeit wurde eine von der Gruppe um M. Gershengorn der National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) modellierte Proteinstruktur des humanen FFAR1 verwendet (Tikhonova, 2007). Dieses Homologiemodell wurde ausgehend von der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins erstellt, wobei 30 für die Bindung des Liganden wichtige Aminosäurereste im oberen, dem Extrazellulärraum zugewandten Teil des Rezeptors, neu energetisiert werden mussten, um strukturelle Unterschiede der Sequenz abzubilden. Tikhonova et al. berichten hier ferner von einer Mutagenesestudie, in der gezeigt werden konnte, welche Aminosäurereste (Kap 1.2.2) für die Ligandbindung des potenten hFFAR1-Agonisten GW9508 notwendig sind. Der gedockte Komplex zwischen diesem Agonisten und der zur postulierten Rezeptorbindetasche gehörenden Aminosäurereste diente als Schablone für die Ausrichtung der hFFAR1-Agonisten und zur Erstellung eines 3D-QSAR-Modells mit Hilfe des AFMoC-Ansatzes. Das hier geschaffene Modell soll eine Erklärung für die Aktivitätsunterschiede zwischen den getesteten Liganden liefern und Aktivitäten von neu entworfenen Verbindungen vorhersagen. Ziel hierbei war, durch rationales Wirkstoffdesign verbesserte Wirkstärken zu erzielen.

1.5 Diabetes mellitus Typ 2 und Metabolisches Syndrom

Wie bereits im Kapitel 1.3 beschrieben wurde, sind die Effekte des FFAR1 in β -Zellen des Pankreas und vereinzelt in anderen Gewebstypen (Brustkrebs, endokrine Zellen und Pankreas- α -Zellen) sehr zahlreich. Dieses Kapitel beschränkt sich auf die Rolle des FFAR1 bei einer möglichen Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) und dem metabolischen Syndrom. Diabetes mellitus ist seit einigen Jahrzehnten zu einer Volkskrankheit geworden. Er trat bisher vorwiegend in Industrieländern auf, erfährt aber in zunehmendem Maße auch in Entwicklungs- und Schwellenländern starken Zuwachs. Die weltweite Prävalenz steigt stetig und soll Prognosen des Internationalen Diabetes Verbandes (IDF) zufolge bis 2030 in Wohlstandsländern wie den nordamerikanischen Staaten oder den reichen Golfstaaten in Nahost zweistellige Prozentzahlen annehmen. Ferner können auch Schwellenländer wie Brasilien, Indien oder China Prävalenzen um die 5% erreichen, was gemessen an der Bevölkerungszahl dieser Länder eine dramatische Anzahl an Erkrankungen bedeuten würde. Nach den Hochrechnungen des IDF für das Jahr 2010 liegt die Prävalenz für Diabetes bei den rund 62 Mill. Deutschen zwischen 20 und 79 Jahren bei 12,0% (komparative Prävalenz beträgt 8,9%) (IDF, 2009).

Bei etwa 90% aller Diabeteserkrankungen handelt es sich um den Typ 2, der mit einem relativen Insulinmangel einhergeht. Die Entwicklung dieses Typs verläuft über eine Kompensationsphase, in der das Pankreas durch vermehrte Proliferation, Vergrößerung und/oder Erhöhung der Ergiebigkeit von β -Zellen versucht, die hohen Blutglucosekonzentrationen zu verwerten. Das Krankheitsbild geht letztlich mit der β -Zelldysfunktion und Insulinresistenz von Muskel-, Fett- und Lebergewebe einher (Kahn, 2006). Ist die Erkrankung eingetreten, kann der Körper keine ausreichende Menge an Insulin zur Verfügung stellen. Es zeigen sich stark erhöhte Gelegenheits- (> 200 mg/dl) und Nüchternblutzuckerspiegel (> 120 mg/dl), ein zumindest anfänglich erhöhter Insulinspiegel, sowie das Unvermögen nach der Aufnahme einer definierten Menge an Glucose nach einer bestimmten Zeit wieder den Wert des Nüchternzuckers zu erreichen (Glucosetoleranz-Test).

Die Pathogenese des DMT2 wird in Zusammenhang gebracht mit den übrigen Wohlstandserkrankungen wie Übergewicht, Bluthochdruck und Fettstoffwechselstörungen (Ferrannini, 2007; Steneberg, 2005). Hauptursachen für dieses auch als „metabolisches Syndrom“

1. Einführung

bezeichnete Krankheitsbild sind unumstritten die mit dem modernen Lebenswandel einhergehenden Veränderungen des täglichen Lebens, wie das Überangebot an Nahrung, ungesunde fettreiche Ernährung, Mangel an körperlicher Betätigung und Bewegung, aber auch länger anhaltender Stress und/oder psychosomatische Erkrankungen können einen Teil zur Entwicklung der Krankheit beitragen.

Vor und während des Verlaufs der Erkrankung spielen dauerhaft hohe Blutglucose- und freie Fettsäurekonzentrationen sowie Adipokine eine entscheidende Rolle (Donath, 2011; Ouchi, 2011). Diese stoßen inflammatorische Prozesse an und haben Zellstress und eine metabolische Überladung von Muskel- und Leberzellen mit freien Fettsäuren zur Folge (Muoio und Newgard, 2008). Des Weiteren können eine pränatale Prägung, sowie Stoffwechselstörungen, hormonelle Störungen und Über- bzw. Unterernährung in früher Kindheit unverschuldete Ursachen sein (Morris und Chen, 2009). Darüber hinaus kann eine genetische Disposition die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung der Erkrankung erhöhen. Bekannte Beispiele sind das Peptidhormon Leptin und dessen Rezeptor, Insulinrezeptor sowie der Transkriptionsfaktor PPAR γ (Kahn, 2006).

Seltener (1-2% aller weltweit an T2DM-Erkrankter) sind rein genetisch bedingte Diabetes Erkrankungen, welche durch Mutationen von wichtigen β -Zell-Transkriptionsfaktoren, z.B. HNF4 α und PDX1 oder der Glucokinase bedingt sind (Muoio und Newgard, 2008).

Die Folgen eines länger anhaltenden und stark erhöhten Blutzuckerspiegels sind Glycosylierungen von Plasmaproteinen oder Strukturproteinen, was zu einer Verengung der Blutgefäße und einer Erniedrigung der Durchblutung führt. Dies zieht dann angiopathische Folgeerkrankungen nach sich, wie z.B. Retino-, Nephro- oder Neuropathien sowie Durchblutungsstörungen. Eine Verschlechterung der Sehfähigkeit, Niereninsuffizienz bis hin zum Absterben peripheren Gewebes sind zu beobachten und vermindern die Lebensqualität und das Befinden der Erkrankten stark und erhöhen zuletzt die Sterblichkeit. Aufgrund der hohen Prävalenz fallen enorme Kosten für das Gesundheitssystem an. Die derzeitigen Zahlen und Prognosen für das Vorliegen der Diabeteserkrankungen weltweit lassen verstehen, wie wichtig es ist, wirkungsvolle und kosteneffiziente Therapien für den DMT2 zu entwickeln.

1. Einführung

Therapeutisch werden bereits seit längerem die insulinotropen Sulfonylharnstoffe (z.B. Glibenclamid) und Glinide (Nateglinid) eingesetzt, welche K^+ -Kanäle inhibieren und so über die Depolarisation der Zellmembran der β -Zelle die Insulinsekretion steigern. Ferner gibt es die nicht-insulinotrope Gruppe der Insulinsensitizer (Glitazone), welche die Wirkung des Insulins in den Effektorzellen verbessern, indem sie die Expression hierzu nötiger Proteine steigern, und das Biguanid Metformin. Auch eine Therapie mit entzündungshemmenden Medikamenten (IL-1-Rezeptor-Antagonisten, z.B. Anakinra), die das Fortschreiten der Erkrankung hemmen, wurde als günstig bewertet (Larsen, 2007). Des Weiteren werden Kombinationstherapien von insulinotropen und nicht-insulinotropen Arzneistoffen angewandt. Blutdrucksenkende (ACE-Hemmer, Sartane) und fettsenkende Medikamente (Fibrate, Statine) können ebenfalls therapeutisch sinnvoll sein (Tocci, 2011).

Obwohl bereits viele therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung des T2DM existieren, stellt der FFA1-Rezeptor eine interessante Wirkstoff-Zielstruktur für die Entwicklung eines neuen Therapieansatzes bzw. möglicher Kombinationstherapien mit bereits eingesetzten Arzneistoffen dar. Die Stimulation des FFAR1 führt zu einer Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion und verbessert die Glucosetoleranz (Doshi, 2009; Negoro, 2010; Tan, 2008). Ferner wurde ein FFAR1-induzierter Effekt auf die Erhöhung der Inkretinausschüttung aus Darmzellen beobachtet (Kim und Egan, 2008). Beides bewirkt letztlich eine Senkung der Blutglucosekonzentration. Ob der Einsatz von FFAR1-Agonisten oder gar Antagonisten bei einer längeren Therapiezeit sinnvoll ist, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Es spricht zum momentanen Zeitpunkt jedoch vieles für einen Einsatz von Agonisten (Alquier und Poitout, 2009).

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst Substanzen aus der Arbeitsgruppe von Prof. T. Ulven (University of Southern Denmark, Odense) mit Hilfe eines funktionellen Assays (Kassack, 2002) auf agonistische oder antagonistische Aktivität an rekombinanten hFFAR1 Zellen getestet und die experimentelle Wirkstärke (pEC_{50} , pIC_{50}) bestimmt werden. Im zweiten Schritt sollten in einer QSAR-Analyse die Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und der Wirkstärke herausgearbeitet werden. Da ein Homologiemodell des hFFAR1 zur Verfügung stand, wurde für die Erstellung des QSAR-Modells ein 3D-Ansatz (AFMoC) nach Gohlke und Klebe gewählt (Abb. 10). Das QSAR-Modell sollte zum Design neuer Verbindungen herangezogen werden, um in einem iterativen Verfahren eine kontinuierliche Steigerung der Wirkstärke von FFAR1-Liganden zu erzielen.

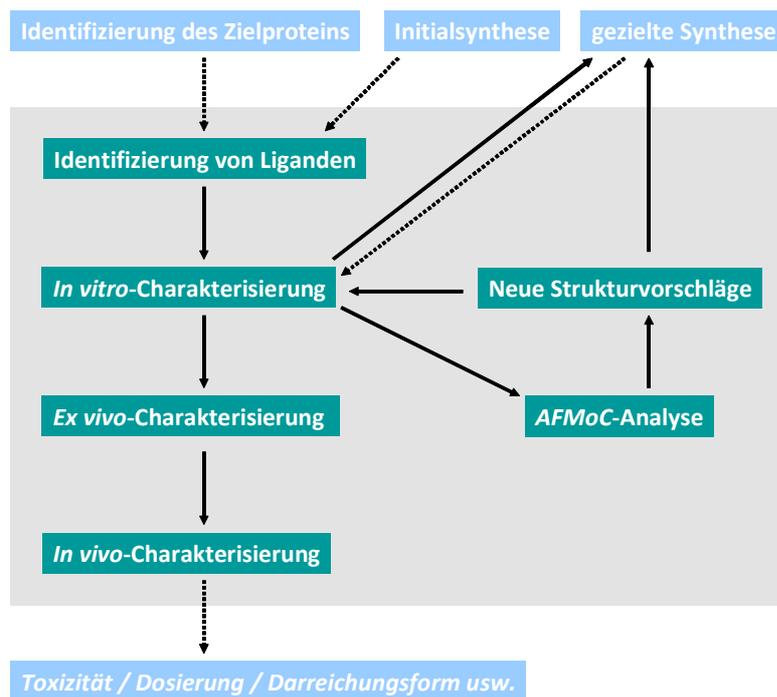


Abbildung 10:

Schematische Darstellung der Entwicklung möglicher Kandidaten zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 anhand von FFAR1-Liganden. Die in dieser Arbeit untersuchten Teilbereiche sind grau hinterlegt. Die Identifizierung des FFAR1 als Zielprotein erfolgte 2003 durch verschiedene Gruppen (Briscoe, 2003; Itoh, 2003). Die Identifizierung und *in vitro*-Charakterisierung von Liganden erfolgt an einem hFFAR1-exprimierenden rekombinanten Zellsystem mit funktionellen Messmethoden. Die *ex vivo*-Charakterisierung hoch-potenter Kandidaten wurde an einer pankreatischen Inselzelllinie der Ratte hinsichtlich der Insulinsekretion durchgeführt. Eine *in vivo*-Charakterisierung fand in einem adipösen Mausmodell statt.

2. Zielsetzung

Hochpotente FFAR1-Agonisten sollten ferner anhand eines physiologischen Zellsystems bezüglich ihrer Wirkung auf die Insulinsekretion untersucht werden. Hierzu sollten pankreatischen Inselzellen der Ratte verwendet werden. Ferner sollte an diesen Inselzellen auch ein funktioneller Nachweis der Rezeptorstimulierung erbracht werden, um einen eventuellen insulinsekretierenden Effekt der Testverbindungen an diesem physiologischen Zellsystem mit dem FFAR1 zu korrelieren. Sofern eine im *in vitro*-Test hoch potente Substanz auch eine insulinsekretierende Wirkung aufweist, sollte diese in fettleibigen prädiabetogenen Mäusen auf eine systemische blutzuckersenkende Wirkung untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Programme

ANTECHAMBER	Molecular Format Converter, Version 1.5, AMBER Software Administrator, University of California, San Francisco, CA, USA
BABEL	Molecular Structure File Conversion, Version 3.3, OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, NM, USA
ChemSketch	ACD/ChemSketch, Advanced Chemistry Development, Inc., (ACD/Labs), Toronto, Kanada.
<i>FLUOstar</i> [®] Software	BMG Labtech, Version 4.31-0, Offenburg
ISIS draw	MDL Information System, Version 2.5/SP4, San Ramon, CA, USA
LIGPREP	2D to 3D Structure Conversions, Version 2.3, Schrödinger, Mannheim
<i>LUMIstar</i> [®] Software	BMG Labtech, Version 4.30-0, Offenburg
MOLOC	Molecular Design Software Suite, Version (2008), Roche Biostructural Community, Basel, Schweiz
<i>Motic</i> [®] Images Plus	Motic Deutschland GmbH, Version 2.0 von 2006, Wetzlar
<i>NOVOstar</i> [®] Software	BMG Labtech, Version 1.20-0, Offenburg
OMEGA2	Conformer Ensembles Containing Bioactive Conformations, Version 2.2.1, OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, NM, USA
Prism [®]	GraphPad Software Inc., Version 4.03, 2005, La Jolla, CA, USA
PYMOL	Molecular Graphics System, Version 0.99rc6, DeLano Scientific LLC, South San Francisco, CA, USA
ROCS	Shape Similarity for Virtual Screening & Lead Hopping, Version 2.3.1, OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fe, NM, USA
<i>RTCA</i> Software	ACEA Biosciences Inc., Version 1.2.1, San Diego, CA, USA

3.1.2 Chemikalien, Enzyme und Materialien

Agar	BD Biosciences, #214010, Heidelberg
Agarose DNA > 500 bp	Biozym Scientific GmbH, #02092, Hess. Oldendorf
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Roth), #K029.1, Karlsruhe
Ampuwa® (Aqua ad injectabilia)	Fresenius Medical Care, #41275, Hof a.d. Saale
Aqua bidestillata	aus eigener Herstellung
ATP	Sigma-Aldrich, #A7699, Taufkirchen
BSA (Essentially fatty acid free)	Sigma-Aldrich, #7030, Taufkirchen
CaCl ₂	Merck, #1.02382, Darmstadt
CIAP (Calf intestine alkaline phosphatase)-Lösung [10 U/μl]	Finzymes, #F-201S, Espoo, Finnland
CIAP-Reaktionspuffer 10x	Finzymes, #F-201B, Espoo, Finnland
Coenzym A (Trilithiumsalz)	Applichem, #A0813, Darmstadt
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma-Aldrich, #D6546, Taufkirchen; Gibco, #31966, Karlsruhe; PAN, #P04-035883, Aidenbach
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, #472301, Taufkirchen
DNA-Leiter GeneRuler™ 1 kb	Fermentas, #SM0314, St. Leon-Rot
DTT (Dithiothreitol)	Fluka, #43815, Buchs, Schweiz
E.coli XL-1 Blue competent cells	Stratagen, #200249, Waldbronn
EDTA	ICN Biomedicals Inc., #800682, Frankfurt a.M.
Eosin B	Roth, #0306.1, Karlsruhe
E-Plate (16-Well) für RTCA DP Analyzer	Roche Diagnostics GmbH, #05469830001
Essigsäure (100%)	Roth, #3738.4, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, #F7524 (Lot 114K3397); PAN, #3302 (Lot P100203)
Formaldehyd 37% (v/v)	Sigma-Aldrich, #F8775, Taufkirchen

3. Material und Methoden

Forskolin	Applichem Biochemica, #A2165, Darmstadt
Fura-2, AM	Molecular Probes, #F1201, Eugene, Oregon, USA
Geneticin-Disulfat (G-418)	Calbiochem, #345810, Darmstadt bzw. Roth, #0239
Gewebekulturflasche (T-25 / T-75)	Sarstedt, #83.1810.002 / #83.1813.002, Nümbrecht
D-Glucose	Riedel-de Haën, #16325, Seelze
Glucoselösung, 40 % (m/v), steril	B. Braun, Melsungen
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, #G7513, Taufkirchen
Hefeextrakt	BD Biosciences, #212750, Heidelberg
HEPES (freie Säure)	Applichem, #A1069, Darmstadt
HindIII [10 U/μl]	Fermentas, #ER0501, St. Leon-Rot
Hygromycin B	Roth, #CP13.3, Karlsruhe
Injektions-Kanüle 100 Sterican	B. Braun, #4566300, Melsungen
Isopropanol (2-Propanol)	CROMASOLV® (Sigma), #34863, Steinheim
Kanamycin	Applichem, #A1493, Darmstadt
KCl	VWR, #26764.298, Langenfeld
K ₃ Fe(CN ₆)	Laborat GmbH, #00895, Berlin
K ₄ Fe(CN ₆) x 3 H ₂ O	Merck KGaA, #4984, Darmstadt
K	R
..	-
Kristallviolett	Roth, #T123.1, Karlsruhe
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Sarstedt, #72.380, Nümbrecht
Loading Puffer 6x	Fermentas, #R0611, St. Leon-Rot
D-Luciferin (Kaliumsalz)	Synchem OHG, #BC219, Felsberg/Altenburg
2-Mercaptoethanol 99% p.a.	Roth, #4227.1, Karlsruhe
Methanol (HPLC-rein)	VWR, #20837.320, Langenfeld
Mikrotiterplatte (6-Well), F-Form (aus Polystyrol)	Sarstedt, #83.1839.300, Nümbrecht

3. Material und Methoden

Mikrotiterplatte (24-Well), F-Form, (aus Polystyrol)	Sarstedt, #83.1836.300, Nümbrecht
Mikrotiterplatte (96-Well), F-Form, (aus Polystyrol)	Sarstedt, #83.1835.300, Nümbrecht
Mikrotiterplatte (96-Well), U-Form, (aus Polypropylen)	Greiner, #651 201, Frickenhausen
Mikrotiterplatte (96-Well), F-Form, weiß mit transparentem Boden	Greiner, # 675098, Frickenhausen
MgCl ₂	Roth, #2189.1, Karlsruhe
MgSO ₄	Merck, #1.05886, Darmstadt
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Serva Electrophoresis, #20395.03, Heidelberg
NaCl	J.T. Baker, #0278, Griesheim
NaHCO ₃	VWR, #27778.293, Langenfeld
Na ₂ HPO ₄	VWR, #28029.292, Langenfeld
Natriumpyruvat	Applichem, #A4859, Darmstadt
Oregon Green® 488 BAPTA-1 AM	Molecular Probes, #O6807, Eugene, Oregon, USA
pcDNA5/FRT-Plasmid	Invitrogen, #K6010, Carlsbad, CA, USA
pOG44-Plasmid	Invitrogen, #V6005-20, Carlsbad, CA, USA
pCRE-Luc-Plasmid	Stratagene, #219076, La Jolla, CA, USA
pCR-BluntII-TOPO (hGPR120)	Biocat, Clone-ID: 40016354, Heidelberg
Penicillin G (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)	Sigma-Aldrich, #P0781, Taufkirchen
Pluronic® F-127	Sigma-Aldrich, #P2443, Taufkirchen
PolyFect® Transfektionsreagenz	Qiagen, #301105, Hilden
Puffer R 10x	Fermentas, #BR5, St. Leon-Rot
Reagenzreservoir	Brand, #703459, Wertheim
Reagiergefäße PP (1,5 ml)	Sarstedt, #72.690, Nümbrecht

3. Material und Methoden

Reagiergefäße PP (2,0 ml)	Sarstedt, #72.695, Nümbrecht
RPMI-Medium	Sigma-Aldrich, #R8758; Gibco, #61870; PAN
Schraubröhre (15 ml)	Sarstedt, #62.554.001, Nümbrecht
Schraubröhre (50 ml)	Sarstedt, #62.547.004, Nümbrecht
Spritze Injekt®-F Luer Solo (1 ml)	B. Braun, #9166017V, Melsungen
SYBR-Green® II-Lösung (1:100 in TE, bei -20 °C gelagert)	Sigma-Aldrich; #S9305, Steinheim
T4-DNA-Ligase [5 u/μl] und passender Reaktionspuffer	Fermentas, #EL0014, St. Leon-Rot
Tricin	Applichem, #A3954, Darmstadt
Tris (Base)	Sigma, #T1503, Steinheim
Triton®-X 100	Applichem, #A4975, Darmstadt
Trypsin (0,05%)-/EDTA (0,02%)-Lsg.	Sigma-Aldrich, #T3924, Taufkirchen
Trypton	BD Biosciences, #211705, Heidelberg
Tween®20 Ph. Eur.	Roth, #9127.1, Karlsruhe
U-73122	Cayman Chemicals, #70740, Ann Arbor, MI, USA
XhoI [10 U/μl]	Fermentas, #ER0691, St. Leon-Rot
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Fermentas, #R0401, St. Leon-Rot
Zellkulturschale (58 cm ²)	Greiner, #664160, Frickenhausen
Zeocin™-Lösung [100 mg/ml]	InvivoGen, #ant-zn-5b, Toulouse, Frankreich

3.1.3 Geräte

FluoStar® Microplate Reader	BMG Labtech, Offenburg
Gammazähler LB 2111	Bertold Technologies, Bad Wildbad
Inkubator	Thermo Electron Co./Heraeus, Typ BB15, Langenselbold

3. Material und Methoden

LUMIstar® Galaxy	BMG Labtech, Offenburg
Laminar Airflow	Thermo Scientific, Typ MSC 1.2, Langenselbold
Microküvette	Hellma, #105.204-QS, Müllheim
NOVOstar® mit integriertem Pipettier-system	BMG Labtech, Offenburg
Precision Xceed (Blutzuckermessgerät) mit Precision Xtra Plus (Teststreifen)	Abbott GmbH & Co. KG, PZN 7005578, Wiesbaden
RTCA DP Analyzer xCelligence®	Roche Diagnostics GmbH, REF 05 469 759 001, SN 32-1-1010-1319-2, Mannheim
Schüttelinkubator	Edmund Bühler GmbH, Typ SM 30A, Hechingen
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Typ 2405, Tuttlingen
Thermocycler-Mastercycler personal	Eppendorf, #5332 51420, Hamburg
UV-Spektrometer Genesys 10 Bio	Thermo Electron Co, Madison, WI, USA
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Typ 4706, Tuttlingen

3.1.4 Testkits

DNA mini Kit (DNA-Isolierung)	BioBudget, #55 5000, Krefeld
EndoFree® Plasmid Maxi Prep Kit	Qiagen, #12362, Hilden
¹²⁵ I-Insulin-Radioimmunoassay (RIA) Kit	Millipore, #RI-13K, Billerica, MA, USA
InnuPrep Gel Extraction Kit	Jena Analytik, #845-KS-5030, Jena

3.1.5 Reaktions-, Pufferlösungen und Medien

Zur Herstellung aller Lösungen wurde Aqua bidestillata (eigene Herstellung).

Ampicillin-Stammlsg.	50 mg Ampicillin wurden in 1,0 ml Aqua bidest. gelöst, steril filtriert und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.
Eosin-Lösung	40 mg Eosin B wurden in 10,0 ml NaCl-(0,9%, w/v)-Lösung verdünnt. Die Konzentration von Eosin B betrug 0,4 % (w/v).

3. Material und Methoden

Hygromycin B-Stammlsg.	100 mg Hygromycin B wurden in 1,0 ml sterilem PBS 1x gelöst, steril filtriert und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.
KHP (Krebs-HEPES-Puffer)	118,6 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH ₂ PO ₄ , 4,2 mM NaHCO ₃ , 11,7 mM D-Glucose, 10 mM HEPES (freie Säure), 1,3 mM CaCl ₂ , 1,2 mM MgSO ₄ , pH-Wert 7,4, in Aqua bidest.
Kanamycin-Stammlsg.	30 mg Kanamycin wurden in 1,0 ml Aqua bidest. gelöst, steril filtriert und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.
KRBH (Krebs-Ringer-Bicarbonat (HEPES)-Puffer)	135 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 5 mM NaHCO ₃ , 0,5 mM KH ₂ PO ₄ , 0,5 mM MgCl ₂ , 1,5 mM CaCl ₂ , 10 mM HEPES (freie Säure), pH-Wert 7,4, in Aqua bidest.
LAR (Assayreagenz im cAMP-Assay)	30 mM Tricin, 10 mM MgSO ₄ , 0,5 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 0,5 mM Coenzym A, 0,5 mM D-Luciferin, pH-Wert 7,8, in Aqua bidest.
LB-Agarplatten	7,5 g Agar wurden in 500 ml frischem LB-Medium gelöst, autoklaviert und auf 50°C abkühlen gelassen. Nach Zugabe von 500 µl der Ampicillin- oder Kanamycin-Stammlösung (je nach Resistenzgen) wurde die Lösung auf Zellkulturschalen (58 cm ²) aufgetragen, bei RT für 1 Stunde auskühlen gelassen und bei 4°C unter Luft- und Lichtabschluss gelagert. Die LB-Agarplatten wurden zeitnah zur Verwendung hergestellt.
LB (Lysogeny Broth)-Medium	5,0 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt und 5,0 g NaCl wurden in 400 ml Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt, die Lösung anschließend auf 500 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt und autoklaviert. Der Siedeverlust wurde durch steriles Aqua bidest. ersetzt. Das Medium wurde bei Bedarf frisch hergestellt. Die Zugabe des Selektionsantibiotikums durch 500 µl der Ampicillin- bzw. Kanamycin-Stammlösung (je nach Resistenzgen) erfolgte kurz vor Gebrauch.
LLR (Lysereagenz im cAMP-Assay)	8 mM Tricin, 2 mM EDTA, 1 mM DTT und 5% (w/v) Triton®-X 100, pH-Wert 7,8, in Aqua bidest.
MTT-Lösung	5 mg MTT in 1,0 ml PBS 1x.
0,9%-ige NaCl-Lösung	9,0 g NaCl wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Der Siedeverlust wurde mit sterilem Aqua bidest. ersetzt.
OG (Oregon Green)-Lösung	50 µg Oregon Green® 488 BAPTA-1 AM wurde in 39,7 µl DMSO gelöst, zu 3,0 µl in 2,0 ml Reagiergefäße aliquotiert und unter Lichtschutz bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert. Am Tag des Assays wurden dem Aliquot 3 µl der Pluronic F-127-Lösung und 2,0 ml KHP zugegeben und gründlich gemischt. Die Konzentration

3. Material und Methoden

	von OG betrug final 1,5 μ M.
PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	137 mM NaCl, 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl, pH-Wert 7,4, in Aqua bidest., autoklaviert. Der Siedeverlust wurde mit sterilem Aqua bidest. ersetzt.
Pluronic F-127-Lösung	0,2 g Pluronic® F-127 wurden mit DMSO ad 1,0 g aufgefüllt und unter Wärme gelöst (20 %, w/w).
SOB (Super Optimal Broth)-Medium	2,0 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 0,05 g NaCl, 1 ml einer 250 mM KCl-Lösung (final 2,5 mM) und 0,5 ml einer 2 M MgCl ₂ -Lösung (final 10 mM) wurden in 80 ml Aqua bidest. gelöst, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt, auf 100 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt und autoklaviert. Das Medium wurde bei Bedarf frisch hergestellt.
SOC (Super Optimal Catabolite Repres- sion)-Medium	Zu 100 ml SOB-Medium wurden 2 ml einer steril-filtrierten 1 M Glucoselösung zugegeben. Die Zugabe erfolgte unter sterilen Bedingungen.
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	Zur Herstellung eines TAE-Puffers wurde zunächst ein 50-fach konzentrierter TAE-Puffer (<u>TAE 50x</u>) hergestellt: 2 M Tris (Base), 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA, pH-Wert 8,5, bei 4°C gelagert. Bei Bedarf wurden 20 ml mit 980 ml Aqua bidest. vermengt und neu auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt (<u>TAE 1x</u>).
Tris-EDTA (TE)-Puffer	Zur Herstellung eines TE-Puffers wurde zunächst ein 10-fach konzentrierter TE-Puffer (<u>TE 10x</u>) hergestellt: 100 mM Tris (Base), 10 mM EDTA, pH-Wert 8,0, bei -20°C gelagert. Bei Bedarf wurde 1 ml mit 9 ml Aqua bidest. vermengt (<u>TE 1x</u>).
Vehicle-Lösung	250 mg Tween® 20 wurden zu 50,0 ml steriler NaCl-Lösung gegeben und gut vermischt. Die Konzentration von Tween® 20 betrug folglich 0,5 % (w/v).
Lösungen zur Bestim- mung der β -Galacto- sidase-Aktivität	4% (v/v)-Formaldehyd-Lösung: 2,16 ml Formaldehyd 37% (v/v) + 17,84 mL PBS; X-Gal-Stammlösung: 20 mg X-Gal wurde in 1,0 ml DMSO gelöst und bei -20°C gelagert. Reaktionspuffer: 2 mM K ₃ Fe(CN ₆), 2,7 mM K ₄ Fe(CN ₆), 1,5 mM MgSO ₄ , in PBS 1x, pH-Wert 7,4, sterilfiltriert und gelagert bei 4-8°C. Am Versuchstag wurde X-Gal-Stammlösung zu einer finalen Konzentration des X-Gal von 1 mg/ml zum Reaktionspuffer gegeben (Reaktionslösung).

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Zelllinien

3.2.1.1.1 1321N1-Zellen (rekombinantes Zellsystem)

Bei der 1321N1-Zelllinie handelt es sich um eine Tumorzelllinie, die ihren Ursprung in humanen Astrozyten haben (Meis, 2008). Diese sternförmig wachsenden Gliazellen dienen im zentralen Nervensystem „*der homöostatisch-regulativen Kontrolle des Extrazellulärraumes durch Aufnahme, Speicherung und Abgabe von Transmittern, besitzen Entgiftungsfunktionen durch Phagozytose und immunologische Kompetenz*“ (Schwaller, 2005). In dieser Arbeit wurde zunächst eine hFFAR1-überexprimierende Zelllinie und der entsprechende Wildtyp zum Vortest und zur Charakterisierung von hFFAR1-Liganden verwendet (freundlicherweise bereitgestellt von Euroscreen, Gosselies, Belgien). Zur Untersuchung auf Selektivität kamen drei 1321N1-FlpIn-Zelllinien, zwei die den hFFAR1 bzw. hGPR120 exprimieren und eine Leervektor-transfizierte Zelllinie, zum Einsatz. Bei diesen FlpIn-Zelllinien handelt es sich um transfizierte Zellklone der 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie (Klon C2), die von Sabine Meis 2008 generiert wurde und von der 1321N1-Wildtyp-Zelllinie (Euroscreen) abstammt. Die adhärent wachsenden 1321N1-Zelllinien wurden mit DMEM wechselnder Hersteller (Sigma-Aldrich, Gibco, PAN) kultiviert. Dem DMEM von Sigma-Aldrich wurden 5 mM L-Glutamin zugesetzt. Allen DMEM-Medien wurden 10% (v/v) fötales Kälberserum (FKS) wechselnder Hersteller (Sigma-Aldrich, PAN), sowie 100 U/mL Penicillin G und 100 µg/mL Streptomycin zugesetzt. Zur Selektion wurde 400 µg/ml Geneticin-Disulfat (G-418) für die hFFAR1-exprimierende Zelllinie (Euroscreen) bzw. 250 µg/ml Hygromycin B für alle transfizierten 1321N1-FlpIn-Zelllinien dem Medium zugesetzt.

3.2.1.1.2 Pankreatische INS-1(E)-Zellen der Ratte (physiologisches Zellsystem)

Bei der INS-1-Zelllinie handelt es sich um insulinsekretierende pankreatische Zellen aus einem transplantierten Ratten-Insulinom, welches durch Röntgenstrahlung induziert wurde (Asfari, 1992). INS-1E-Zellen stammen aus einem Subklon der polyklonalen INS-1-Zelllinie, der

einen höheren Insulingehalt besitzt und eine höhere glucosestimulierte Insulinsekretion zeigt und sich daher gut für Untersuchungen zur Insulinsekretion eignet (Janjic, 1999; Merglen, 2004). INS-1(E)-Zellen exprimieren den Ratten-FFAR1 nativ und sind daher gut geeignet, um die Wirkung von FFAR1-Agonisten auszutesten (Schnell, 2007; Shapiro, 2005). Beim Insulinsekretionsassay (Kap. 3.2.2.2.4) wurde die Zelllinie INS-1E (freundlicherweise bereitgestellt von Dr. S. Ullrich, Universität Tübingen), bei der Zellimpedanzmessung (Kap. 3.2.2.2.3) die Zelllinie INS-1 (freundlicherweise bereitgestellt von Dr. S. Schinner, Universitätsklinikum Düsseldorf) verwendet. Die Kultivierung der adhären wachsenden Zelllinien erfolgte mit RPMI-Medium wechselnder Hersteller (Sigma-Aldrich, Gibco). Dem RPMI von Sigma-Aldrich musste 5 mM L-Glutamin zugesetzt werden. Allen RPMI-Medien wurden 10% (v/v) fötales Kälberserum (FKS) wechselnder Hersteller zugegeben. Das FKS wurde zunächst hitzedeaktiviert, nach dem ersten Ein- und Ausfriervorgang wurde mit unbehandeltem FKS weiter kultiviert. Alle generierten Daten an INS-1(E)-Zellen in dieser Arbeit stammen aus der Kultivierung mit unbehandeltem FKS. Weitere Zusätze waren 100 U/mL Penicillin G und 100 µg/mL Streptomycin, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 10 mM HEPES und 1 mM Natriumpyruvat.

3.2.1.1.3 Zellkultivierung

Die 1321N1- und INS-1(E)-Zellen wurden in T75-Gewebekulturflaschen unter den üblichen Bedingungen (37°C, 5% CO₂ und hohe Luftfeuchtigkeit) kultiviert und einmal wöchentlich subkultiviert. Die Subkultivierung erfolgte nach Waschen des Zellrasens mit 3 ml PBS 1x und anschließender Trypsinierung mit 3 ml 0,05% Trypsin-0,02% EDTA-1x für 1-2 Minuten bei RT. Anschließend wurde der Zellrasen mit Hilfe einer Glaspipette und zusätzlichen 7 ml frischem Nährmedium vom Flaschenboden abgelöst, in eine Schraubröhre (50 ml) überführt, bei 4°C und 266 x g für 4 Minuten abzentrifugiert und in 10 ml frischem Nährmedium resuspendiert. 0,1 bis 1,0 ml der Zellsuspension wurde ad 10 ml Nährmedium in eine frische Zellkulturflasche überführt und weiter unter den üblichen Kultivierbedingungen inkubiert. Am Folgetag wurde das Nährmedium ausgewechselt. Die 1321N1-Zellen wurden alle 2-3 Tage, die INS-1 Zellen alle 3-5 Tage mit frischem Nährmedium versorgt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen aus einer konfluenten T75-Gewebekulturflasche wie oben beschrieben abgeerntet und abschließend in 2,7 ml frischem FKS-haltigen Nährmedium

resuspendiert. Pro Einfrier aliquot wurden 900 µl Zellsuspension und 100 µl DMSO in ein 1,5 ml-Kryoröhrchen überführt, ca. 30 min. bei -20°C und anschließend für mehrere Wochen bei -80°C gelagert. Zur Langzeitlagerung der Zellen wurden die Kryoröhrchen bei -196°C gelagert. Zum Ausfrieren der Zellen erfolgte nach raschem Auftauen bei 37°C im Wasserbad eine Überführung der Zellsuspension in das auf 37°C vorgewärmte Vollmedium einer T25- bzw. T75-Zellkulturflasche. Nach etwa 6 Stunden wurde das Nährmedium ausgewechselt.

3.2.1.1.4 Zellzahlbestimmung

Nach dem Abernten wurden 20 µl der 10 ml Zellsuspension mit 80 µl Eosin-Lösung gemischt. Etwa 10-15 µl der Mischung wurden in die Neubauer-Zählkammer per Sogwirkung pipettiert und vier Eckquadrate ausgezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach folgender Gleichung:

Zellzahl in 4 Eckquadraten / 4 * 500 000 = Gesamtzahl der Zellen in 10 ml Zellsuspension

3.2.2 Funktionelle Charakterisierung

Zuvor sei hier kurz erwähnt, dass mit der Angabe einer Signifikanz bei allen biologischen Messverfahren in dieser Arbeit eine statistische Prüfung auf Signifikanz zweier Daten- gruppen gemeint ist. Es wurde ein F-Test durchgeführt, der die Unterschiede der Varianzen zweier Gruppierungen beurteilt. Waren die Varianzen nicht-signifikant voneinander unterschieden, wurde ein zweiseitiger ungepaarter T-Test durchgeführt. Dieser vergleicht die Mittelwerte der Gruppierungen und beurteilt ob diese sich signifikant voneinander unterscheiden, und zwar unabhängig davon in welcher Richtung sich der Unterschied zeigt.

3.2.2.1 Substanzvorbereitung

Von allen in Wasser unlöslichen oder schwerlöslichen Testsubstanzen wurden zunächst Stammlösungen in einer Konzentration von 10 mM in 100% DMSO hergestellt. Aus diesen Stammlösungen wurden am Versuchstag jeweils 1+9 bzw. 3,16+6,84 - Verdünnungen in Assaypuffer (Ca²⁺-Assay, Insulinsekretionsassay), FKS-freiem Nährmedium (cAMP-Reporter-

3. Material und Methoden

gen-Assay) oder FKS-haltigem Nährmedium (Zellimpedanzmessung) hergestellt. Die Verdünnungsschritte wurden so gewählt, damit der Effekt einer Substanz über den logarithmierten Konzentrationsbereich äquidistant ermittelt werden konnten (1- bzw. 0,5-Log-Einheiten als Intervall). Hierbei waren Verdünnungsschritte größer 1+99 ausgeschlossen. Testsubstanzen, bei denen die erste 1+9-Verdünnung (Testsubstanz-Konzentration von 1 mM) zu einer Trübung oder zum Ausfallen der Substanz führte, wurden mit einer BSA (0,05-2,5%, w/v)-haltigen oder Pluronic®-F127 (0,01%, w/v)-haltigen KHP-Lösung suspendiert.

3.2.2.2 Funktionelle Methoden

3.2.2.2.1 Ca^{2+} -Assay

Der Ca^{2+} -Assay ist ein funktioneller Assay zur direkten Bestimmung des Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Hierzu wird ein membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff (Oregon Green 488 BAPTA-1/AM, kurz OG) verwendet, der eine Ca^{2+} -komplexierende Komponente (hier: BAPTA) enthält (Abb. 11). Die Carbonsäurereste des OG liegen zunächst acetoxymethyliert (AM) vor.

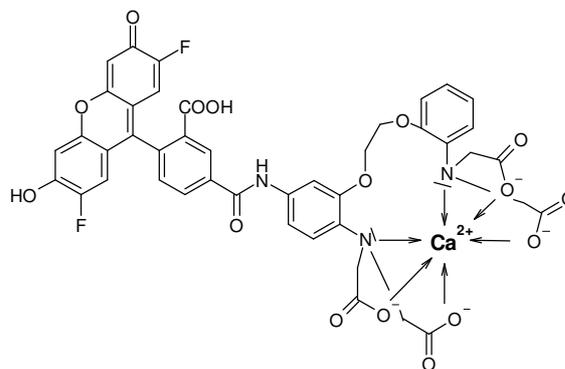


Abbildung 11:

Strukturformel von Oregon Green 488 BAPTA-1/AM nach Spaltung der Acetoxymethylester durch unspezifische intrazelluläre Esterasen. Das Molekül besteht aus einem Fluoreszenzfarbstoff (2',7'-difluoro-Fluorescein) und einem Ca^{2+} -Chelator (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure, kurz BAPTA).

Diese Methylierung sorgt für eine gute Membrangängigkeit des Farbstoffs. Nach passiver Diffusion des OG durch die Zellmembran werden die AM-Ester durch unspezifische Ester-

3. Material und Methoden

asen gespalten. Der Farbstoff wird hydrophiler und kann die Zelle nicht mehr verlassen. Die Komplexierung mit Ca^{2+} erhöht die Fluoreszenzemission des Farbstoffs proportional zur Ca^{2+} -Konzentration. Aus dem Anstieg der Fluoreszenz kann so direkt auf den Grad an Komplexierung und damit die Erhöhung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ geschlossen werden.

Die Durchführung des Ca^{2+} -Assays wurde im Arbeitskreis bereits etabliert (Hamacher, 2007; Meis, 2008) und hier nur an die verwendeten Zelllinien angepasst. Zur Messung der Änderung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ wurde der NOVOstar® Microplate Reader mit integriertem Pipettiersystem verwendet. 1321N1-Zellen wurden auf 96-Well-Zellkulturplatten mit flachem Boden (Messplatten) mit einer Zelldichte von 30,000 - 40,000 Zellen pro Well ausplattiert. Nach 24 ± 2 Stunden wurde der Zellenrasen mit KHP gewaschen und eine Stunde unter den üblichen Kultivierbedingungen mit 20 μl der OG-Lösung pro Well inkubiert. Währenddessen wurden die Konzentrationsreihen der Testsubstanzen aus den Stammlösungen (Kap. 3.2.2.1) in 1,5 ml-Reagiergefäßen hergestellt und auf Reagenzienplatten (96-Well-Zellkulturplatten mit rundem Boden) zu 80 μl (Agonistplatte) bzw. 40 μl (Antagonistplatte) pro Well vorpipettiert. Hierbei sei zu beachten, dass alle Lösungen aufgrund des 1+9-Verdünnungsschritts von Reagenzien- auf Messplatte 10-fach höher konzentriert waren, als final gewollt. Nach einer Stunde Inkubation der Zellen wurde die Farbstofflösung abgesaugt und von 160 μL (im Antagonistmodus) bzw. 180 μl (im Agonistmodus) KHP ersetzt. Im Antagonistmodus wurden an dieser Stelle 20 μl Antagonistlösung pro Well aus der Antagonistplatte auf die Messplatte pipettiert und für 20 Minuten bei 37°C preinkubiert. Im Agonistmodus entfiel dieser Schritt. Die Messplatte wurde in den NOVOstar® transferiert und für weitere 15 Minuten unter Lichtausschluss bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Messung der Fluoreszenz gestartet. Während der Messung wurden 20 μl der Agonistlösung aus der Agonistplatte über das Pipettiersystem aufgezogen und in das jeweilige Well der Messplatte injiziert. Die Fluoreszenz wurde gemessen bei 520 nm (Bandbreite 25 nm) für 4 Intervalle von 1,0 Sekunde vor und 50 Intervalle von 0,4 Sekunden nach der Injektion der Agonistlösungen. Die Anregung fand bei 485 nm (Bandbreite 25 nm) statt. Die Gesamtmesszeit betrug unter Berücksichtigung der Injektionszeit von 7,2 Sekunden 31,2 Sekunden (Standardmessung). Bei Testsubstanzen, die eine längere Kinetik bei der Induktion des Ca^{2+} -Signals zeigten (Abb. 12), wurden die Messintervalle nach der Injektion der Agonistlösung auf 170 bzw. 240 erhöht. Die gesamte Mess-

3. Material und Methoden

zeit stieg demnach auf 80 bzw. 120 Sekunden. Eine solche Messzeitverlängerung wird in dieser Arbeit als verlängerte Messzeitbedingung bezeichnet.

Die gemessenen Daten der Fluoreszenz-Zeit-Verläufe wurden mit Hilfe der NOVOstar®-Software ausgewertet. Die maximale Fluoreszenz des Ca^{2+} -Signals nach Injektion der Testsubstanz wurde um den Mittelwert der vier Basis-Fluoreszenzwerte vor der Injektion reduziert. Der für die Ermittlung der maximalen Fluoreszenz nach Injektion der Testsubstanz definierte Bereich galt ausnahmslos für alle Messungen derselben Messplatte. Er wurde so gelegt, dass er alle Kurvenmaxima einschließt und das Basalsignal (Injektion von Assaypuffer) möglichst gering ausfiel. Abb. 12 zeigt ein typisches Messsignal der Standardsubstanz TUG 20 (schwarze Kurve), einer Testsubstanz TUG 178 mit langsamer Kinetik (blaue Kurve) und der Assaypuffer-Injektion (graue Kurve).

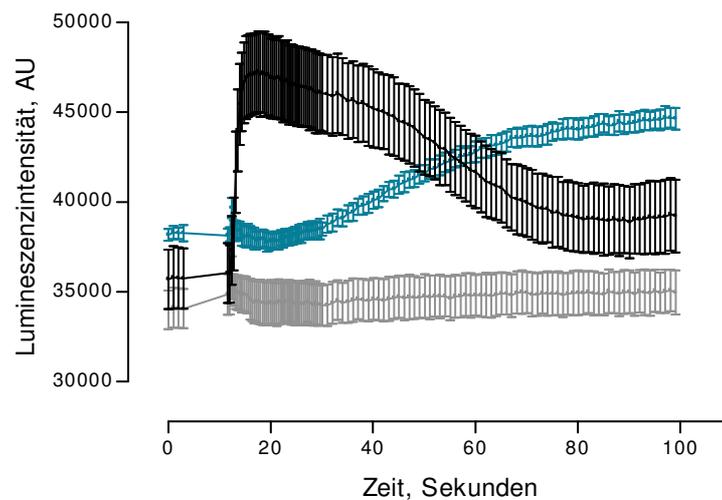


Abbildung 12:

Fluoreszenz-Zeit-Verlauf während Injektion von hFFAR1-Agonisten im Vergleich mit der Kontroll-Injektion von Assaypuffer bei verlängerter Messung an hFFAR1-1321N1-Zellen (Euroscreen). 10 μM TUG 20: schwarze Kurve, 10 μM TUG 178: blaue Kurve, KHP: graue Kurve. Die Kurven stellen Mittelwerte \pm SEM dreier Bestimmungen dar.

Die berechnete Differenz zwischen gemittelter Basisfluoreszenz und maximaler Fluoreszenz nach Injektion ist das eigentliche Messsignal (Effekt). Damit mehrere Experimente zusammengefasst werden konnten, wurden alle Effekte normiert gegen den Effekt, der von 10 μM TUG 20 (Standard-hFFAR1-Vollagonist) im Agonistmodus bzw. der 5-8-fachen EC_{50} des im

3. Material und Methoden

Antagonistmodus verwendeten Agonisten hervorgerufen wurde. Die normalisierten Effekte wurden gegen die logarithmierte Konzentration der Testsubstanz im Auswerteprogramm GraphPad Prism® 4.03 aufgetragen (Abb. 13).

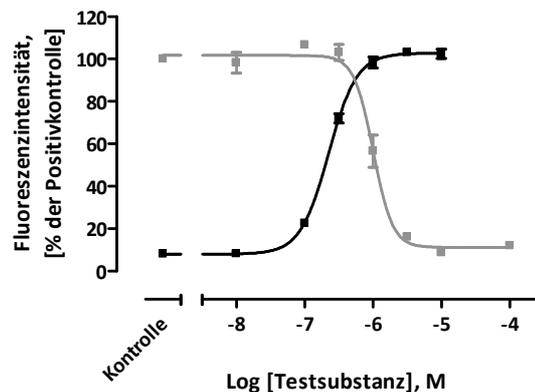


Abbildung 13:

Konzentrations-Effekt-Kurve des FFAR1-Standardagonisten TUG 20 (schwarze Kurve) und Konzentrations-Inhibitions-Kurve des Inhibitors TUG 761 (graue Kurve). Die Positivkontrolle zur Normierung der Werte im Agonistmodus ist das TUG 20 (10 μ M)-induzierte Signal, das der Werte im Antagonistmodus das TUG 20 (2,5 μ M) bzw. GW9508 (200 nM)-induzierte Signal (entspricht dem 5-8-fachen EC_{50} des Agonisten). Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten (jeweils in Triplikaten gemessen). Kontrolle meint Stimulation mit Assaypuffer (Agonistmodus, schwarze Kurve) bzw. Kontrollstimulation mit der 5-8-fachen EC_{50} des eingesetzten Agonisten.

Aus der erhaltenen sigmoidal-verlaufenden Konzentrations-Effekt-(bzw. Inhibitions)-Kurve, die für eine Substanz aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten stammen (jeweils gemessen in Triplikaten), werden folgende charakteristische pharmakologische Parameter einer Testsubstanz ermittelt: pEC_{50} , E_{min} , E_{max} und Hillslope. Der pEC_{50} ist der negativ dekadische Logarithmus der halbmaximalen Wirkkonzentration und kann mit Hilfe der 4-Parameter-logistischen Gleichung (G 1) errechnet werden:

$$Y = E_{min} + \frac{E_{max} - E_{min}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \cdot Hillslope}} \quad (G 1)$$

wobei:

3. Material und Methoden

X	=	Logarithmus der Substanzkonzentration
Y	=	Messsignal (Effekt) nach Stimulation mit der Testsubstanz
E_{max}	=	Maximaler Effekt nach Stimulation mit der Testsubstanz
E_{min}	=	Minimaler Effekt nach Stimulation mit Assaypuffer (basale Stimulation)
$Hillslope$	=	Steigung der Kurve am Wendepunkt

Anhand eines Vergleichs der intrinsischen Aktivität (Differenz aus E_{max} und E_{min}) einer aktiven Testsubstanz mit der intrinsischen Aktivität eines Vollagonisten kann die Testsubstanz als Voll- oder Partialagonist bezeichnet werden. Der Hillslope, die Steigung der sigmoidalen Kurve am Wendepunkt, kann unter gewissen Umständen dazu dienen die Kooperativität von Liganden/Modulatoren zu klären, z. B. O_2 an Hämoglobin (Voet, 2004).

Zur Charakterisierung möglicher hFFAR1-Antagonisten wurde zunächst eine Konzentrations-Inhibitions-Kurve zur Bestimmung der IC_{50} , also der Antagonistkonzentration bei 50 % Inhibition eines Agonist-induzierten Effekts bei einer 5- bis 8-fachen EC_{50} des Agonisten. Der apparente K_i -Wert des Antagonisten kann anschließend über die Gleichung nach Cheng und Prusoff (G 2) (Cheng und Prusoff, 1973) berechnet werden:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[Agonist]}{EC_{50}}} \quad (G 2)$$

wobei:

IC_{50}	=	Konzentration des Antagonisten bei 50 % Inhibition des Agonist-induzierten Effekts
$[Agonist]$	=	verwendete Agonistkonzentration (5-8-fache EC_{50})
EC_{50}	=	Konzentration des Agonisten bei 50 % seines maximalen Effekts

Zur Angabe des Fehlers des K_i -wertes wurde die Standardabweichung (SD) verwendet. Diese wurde abgeschätzt anhand des vierten Teils des Konfidenzintervalls (CI).

Mit Hilfe der Schild-Analyse konnte das Verhalten der hFFAR1-Antagonisten näher beschrieben werden (Arunlakshana und Schild, 1959). Hierbei werden die EC_{50} -Werte eines Standardagonisten ohne bzw. mit verschiedenen fixen Konzentrationen des Antagonisten bestimmt und folgender Verschiebungsfaktor errechnet:

$$VF = \frac{EC_{50}(+Antagonist)}{EC_{50}(-Antagonist)} \quad (G 3)$$

3. Material und Methoden

Von den erhaltenen Verschiebungsfaktoren wird der Wert 1 subtrahiert und anschließend dekadisch logarithmiert ($\text{Log } [VF-1]$). Dieser Wert wird gegen den dekadischen Logarithmus der Antagonisten-Konzentration aufgetragen (Schild-Plot). Die entsprechende Gleichung wird Schild-Gleichung (G 4) genannt:

$$\text{Log}(VF - 1) = pA_2 + \text{Log}[A] \quad (\text{G } 4)$$

Der pA_2 -Wert ist der negative dekadische Logarithmus der Konzentration des Antagonisten, bei der der Verschiebungsfaktor des Agonisten den Wert 2 annimmt. Wenn Agonist und Antagonist kompetitiv sind, hat der Schild-Plot eine Steigung von 1 und der Schnittpunkt mit der x-Achse (pA_2 -Wert) entspricht dem pK_b des Antagonisten.

Als Alternative zur Auswertung nach Schild wurde in dieser Arbeit auch die Methode nach Lew und Angus (Lew und Angus, 1995) angewandt. Diese legt eine nicht-lineare Korrelation zwischen den apparenten pEC_{50} -Werten und der molaren Konzentration des Inhibitors zugrunde. Hierbei werden die pEC_{50} -Werte des Agonists bei unterschiedlicher Inhibitorkonzentration ohne die Bildung eines Verhältnisses verwendet, wie dies nach Schild der Fall ist. Das hat den Vorteil, dass jeder einzelne pEC_{50} bei der Auftragung nach Lew und Angus gleich gewichtet wird. Die Schild-Analyse übergewichtet den Fehler der pEC_{50} -Bestimmung ohne Inhibitor hingegen, da dieser in alle Verschiebungsfaktoren eingeht. Die Auftragung nach Lew und Angus geht von folgender Gleichung (G 5) aus:

$$pEC_{50} = -\log\left([B] + 10^{-pK_b}\right) - \log c \quad (\text{G } 5)$$

wobei:

- pEC_{50} = negativ dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration bei 50% des E_{\max}
- $[B]$ = Konzentration des Antagonisten
- pK_b = Bindungskonstante des Antagonisten
- c = Konstante

Aus dieser Auftragung wird der pK_b -Wert des Antagonisten bestimmt, der anschließend in den Clark-Plot einfließt. Der Clark-Plot stellt eine doppelt-logarithmische Auftragung da, wobei die pEC_{50} -Werte gegen $-\log([B] + K_b)$ aufgetragen werden. Als Ergebnis dieser Auftragung erhält man einen linearen Zusammenhang. Aus dem Wert der Steigung kann auf die

Art der Inhibierung durch den Antagonisten geschlossen werden. Bei einem Wert der Steigung von 1 handelt es sich um einen kompetitiven Antagonisten (Kenakin, 1982).

3.2.2.2 cAMP-Reportergen-Assay

Der cAMP-Reportergen-Assay (kurz: cAMP-Assay) basiert auf der Verwendung eines in die Zellen eingebrachten Plasmids, dessen CREB (*cAMP response element binding protein*)-induzierte Transkription eine Expression von Luciferase bewirkt. CREB wird zuvor durch Protein-kinase-A aktiviert, welche ihrerseits von cAMP aktiviert wird. Daher lässt sich die Funktion G_s - bzw. G_i -gekoppelter GPCRs, deren α -Untereinheiten des G-Proteins die Adenylatzyklase modulieren, indirekt beobachten. Die Vektorkarte des verwendeten Plasmids befindet sich im Anhang A2. Das Ampillicin-Resistenzgen dient zur Selektion der transformierten E.coli. Das *enhancer*-Element besitzt eine Bindedomäne für das aktivierte CREB. Nach dessen Bindung wird das nachgeschaltete Firefly-Luciferase-Gen des *Photinus pyralis* (Dewet, 1987) abgelesen. Die Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration ($[cAMP]_i$) kann folglich über das Ausmaß an Luciferase-Expression dargestellt werden, welche mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Reaktion bestimmt wird. Abb. 14 zeigt den Mechanismus dieser Reaktion.

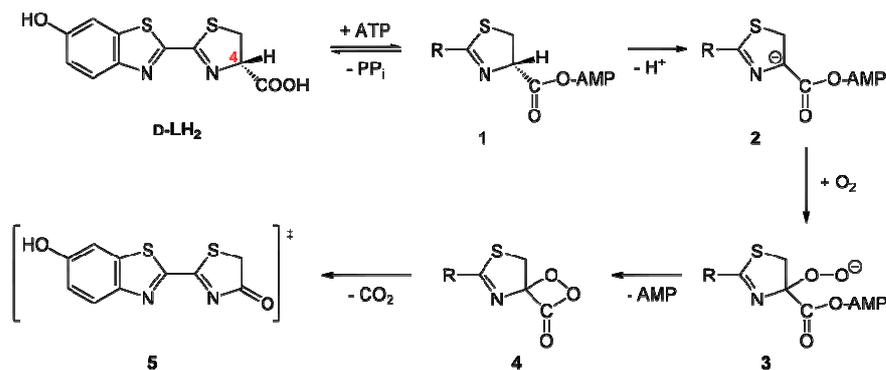


Abbildung 14:

Mechanismus der Luciferin-Luciferase-Reaktion. D-LH₂: D-Luciferin. D-LH₂ wird zunächst vom Coenzym ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat adenyliert (1). Diese Aktivierung bewirkt die Abspaltung des Protons an C4 unter Bildung eines Carbanions (2). Anschließend wird das Luciferin an C4 oxygeniert, es bildet sich ein Peroxid (3). Unter Abspaltung von AMP bildet sich im nächsten Schritt ein Dioxetanonring (4). Nach Decarboxylierung wird das Oxyluciferin, welches entweder als Monoanion (Ketoform, 5) oder Dianion (Enolform) vorliegen kann. Das Oxyluciferin liegt in einem energetisch angeregten Zustand vor und ist daher extrem instabil. Es fällt unter Abgabe eines Photons (rotes oder gelb-grünes Licht) in seinen Grundzustand zurück (Maghami, 2010; Shimomura, 1977).

3. Material und Methoden

Die Durchführung des cAMP-Assays wurde im Arbeitskreis bereits etabliert (Hamacher, 2007; Meis, 2008) und konnte ohne Abänderungen an der 1321N1-Zelllinie angewendet werden. Die Zellen einer 50-80%-ig konfluenten T75-Gewebekulturflasche wurden transient transfiziert mit 30 µg pCRE-luc-Plasmid unter Verwendung von 80 µl PolyFect als Transfektionsreagenz für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Danach wurden die Zellen abgeerntet, in 60 ml frischem Nährmedium resuspendiert, auf 3 Messplatten (weiße 96-Well-Mikrotiterplatten mit F-Form, mit transparentem Boden) ausplattiert (200 µl Zellsuspension pro Well) und für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 80 µl (Agonistmodus) bzw. 70 µl (Antagonistmodus) frisches zusatzfreies Nährmedium ersetzt. Die Konzentrationsreihen der Testsubstanzen wurden aus den Stammlösungen (Kap. 3.2.2.1) in 1,5 ml-Reagiergefäßen und zusatzfreiem Nährmedium hergestellt und auf Reagenzienplatten (96-Well-Zellkulturplatten mit rundem Boden) zu 20 µl pro Well vorpipettiert. Hierbei sei zu beachten, dass alle Lösungen aufgrund des 1+9-Verdünnungsschritts von Reagenzien- auf Messplatte 10-fach höher konzentriert waren, als final gewollt. Im Antagonistmodus wurden vor Zugabe der Agonistlösungen 10 µl der Antagonistlösung zugegeben und die Zellen für 20 Minuten unter den üblichen Kultivierbedingungen inkubiert. Anschließend wurden 20 µL der Agonistlösung zupipettiert. Da für hFFAR1-Signale eine Forskolinabhängigkeit an den 1321N1-Zellen vorlag, handelte es sich bei der Agonistlösung um ein 1+1-Gemisch einer 100 µM Forskolinlösung und der jeweiligen Agonistlösung. Die Dauer der Stimulation mit den Testsubstanzen betrug 3 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µl KHP pro Well gewaschen und 100 µl Lysereagenz (LLR) pro Well zupipettiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei 4°C unter Lichtausschluss wurden die Messplatten in das LumiStar® Messgerät überführt. Die Lumineszenz wurde in 130 Intervallen zu 0,1 Sekunden gemessen. 100 µl Assayreagenz (LAR) wurden 0,3 Sekunden nach Messbeginn mit Hilfe des Pipettiersystems injiziert.

Das Lumineszenzsignal steigt nach etwa 1,2 Sekunden Messzeit an, da die Luciferin-Luciferase-Reaktion nach Injektion des Substrats und der Coenzyme startet. Nach etwa 2 Sekunden Messzeit bleiben der Substratumsatz und damit das Signal konstant (Abb. 15). Forskolin, ein unspezifischer Stimulator der Adenylatzyklase, erhöht das Lumineszenz-Signal im Vergleich zur Kontrollstimulation mit zusatzfreiem Nährmedium.

3. Material und Methoden

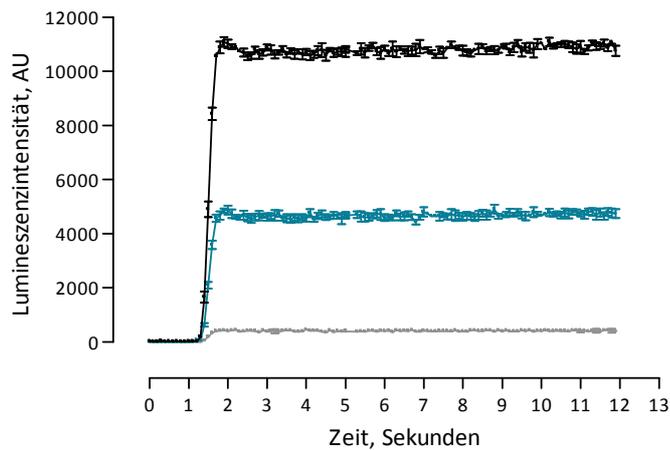


Abbildung 15:

Lumineszenz-Zeit-Verlauf der Luciferin-Luciferase-Reaktion nach Stimulation der hFFAR1-1321N1-Zellen (Euroscreen) mit einem hFFAR1-Agonisten im Vergleich zur Kontrollstimulation mit Nährmedium. Die Injektion von LAR erfolgte bei 0,3 Sekunden. Stimulation mit: 10 µM TUG 20 + 10 µM Forskolin (schwarzer Verlauf), 10 µM Forskolin (blauer Verlauf), zusatzfreies Nährmedium (grauer Verlauf). Die Kurven stellen Mittelwerte \pm SEM dreier Bestimmungen dar.

Die Stimulation mit hFFAR1-Agonisten führt zu einer schwachen Erhöhung der Lumineszenz im Vergleich zur Kontrollstimulation mit Nährmedium (Kap. 4.1.1.2). Werden die Zellen in Gegenwart von 10 µM Forskolin mit einem hFFAR1-Agonisten stimuliert, steigt die Lumineszenz im Vergleich zur alleinigen Stimulation deutlich an (Kap. 4.1.1.2). Bei der Differenz aus dem Signal der Kombinationsstimulation und dem alleinigen Forskolin-induzierten Signal handelt es sich um das hFFAR1-vermittelte Signal (Abb. 15). Das Messsignal dieses Assays stellt die Differenz der Lumineszenz vor und nach der Injektion da. Zur Auswertung der hFFAR1-induzierten Signale wurde zunächst der Mittelwert aller Messsignale der Kontrollstimulationen mit zusatzfreiem Nährmedium pro Messplatte von den Messsignalen der Stimulationen mit den Testsubstanzen abgezogen. In einem zweiten Schritt wurde dann das Forskolin-induzierte Messsignal von allen übrigen abgezogen und anschließend bezüglich des Agonist (10 µM TUG 20)-induzierten Signals normalisiert. Die Konzentrations-Effekt-Kurven wurden wie in Kapitel 3.2.2.2.1 beschrieben erstellt und ausgewertet.

3.2.2.2.3 Zellimpedanzmessung

Die Messung der Zellimpedanz wurde mit dem RTCA DP Analyzer durchgeführt. Dieses Messsystem basiert auf einer labelfreien Technologie, die es erlaubt die Zellen unter möglichst nativen Umständen zu untersuchen. Die Zellen wurden hierzu auf 16-Well-E-Platten gegeben, deren Wells eine Oberfläche mit Gold beschichteten Mikroelektroden besitzen (Abb. 16).

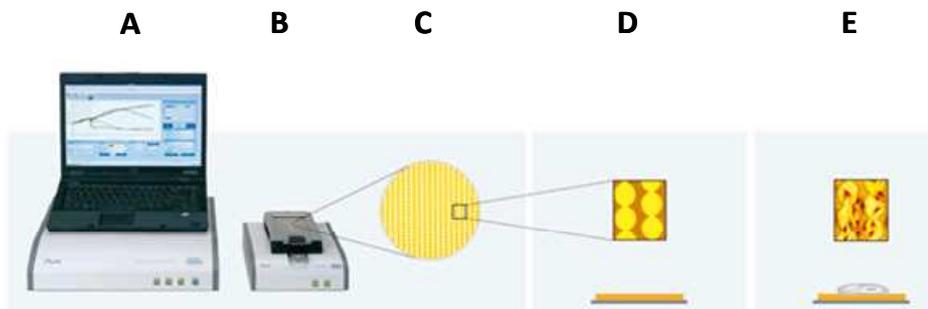


Abbildung 16:

Aufbau des Messsystems (RTCA DP Analyzer). **A:** Messinstrument und Steuerung, **B:** 16-Well-Platte (E-Plate), **C:** Oberfläche der Wells mit Gold beschichteten Mikroelektroden, **D:** Mikroelektroden ohne Zellen, **E:** Mikroelektroden mit angehefteten Zellen. Diese und folgende Abbildung stammt von Roche Diagnostics Deutschland GmbH und darf mit deren freundlicher Genehmigung hier verwendet werden (Roche, 2011).

Der durch die Elektroden fließende schwache Wechselstrom erfährt durch die Anheftung von Zellen einen Widerstand (Zellimpedanz), der abhängig ist von der Anzahl der Zellen (Abb. 17). Ferner kann auch eine strukturelle Umformierung der Zellen, ausgelöst durch externe Stimuli, zu einem veränderten Widerstand führen.

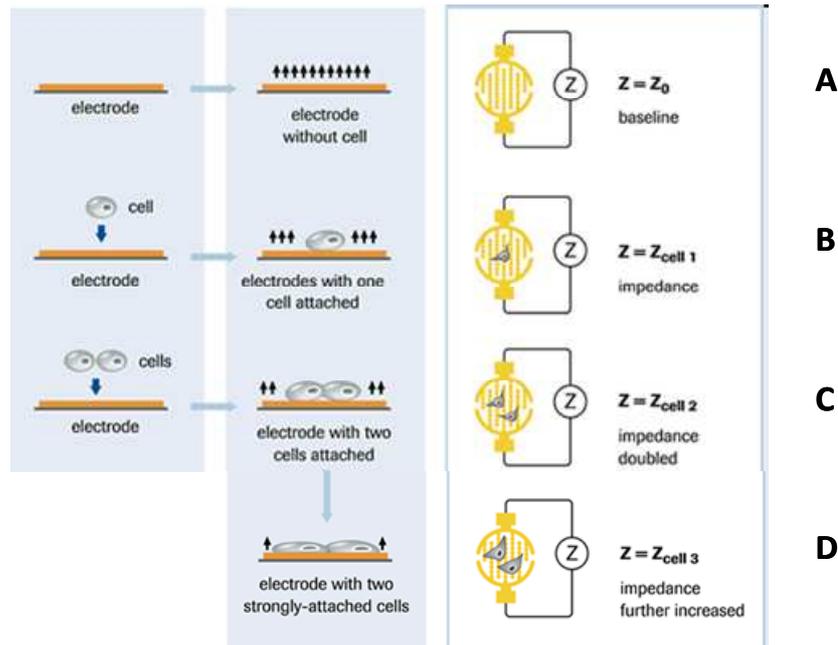


Abbildung 17:

Messprinzip des RTCA DP Analyzers. **A:** Zellfreie Oberfläche mit unbeeinflusstem Wechselstrom, **B:** Die Anheftung von Zellen bewirkt eine Erhöhung des Widerstands und damit eine Reduzierung des Wechselstromflusses, **C:** Die Reduktion des Wechselstromflusses ist proportional zur Zellanzahl, **D:** Einfluss der Änderung nach zellulärer Umformung.

Als Maß für die Impedanz wird in diesem Messsystem der zeitabhängige Cell Index CI herangezogen (G 6):

$$CI(t) = \frac{R(f_n, t) - R(f_n, t_0)}{Z_n} \quad (\text{G 6})$$

wobei gilt:

- f_n = Frequenz der Impedanzmessung
- $R(f_n, t)$ = gemessene Impedanz bei Frequenz f_n zum Zeitpunkt t
- $R(f_n, t_0)$ = gemessene Impedanz bei Frequenz f_n zum Zeitpunkt t_0 (t_0 ist der ermittelte Hintergrund)
- Z_n = Jeweiliger Frequenzfaktor von f_n

Die Ermittlung des CI kann zur Charakterisierung von Proliferation oder schlichtem Anheftungsverhalten von Zellen dienen. In dieser Arbeit wurde das Verhalten der pankreatischen Ratten-Zelllinie INS-1 und der rekombinanten hFFAR1-exprimierenden 1321N1-Zelllinie nach Stimulation durch hFFAR1-Liganden untersucht und dadurch eine weitere funktionelle Charakterisierung der Testsubstanzen ermöglicht.

3. Material und Methoden

Anhand einer Titrationsmessung mit unterschiedlichen Zellzahlen wurden zunächst die optimale Zellzahl und ein passender Injektionszeitpunkt für die Testsubstanzen bestimmt (Abb. 18). Der maximale Wert des *CI* bei 150 000 Zellen pro Well von etwa 1,9 entspricht dem maximal erreichbaren Widerstand, den die Zellen ausüben können, und ist gleichzusetzen mit dem maximalen Grad an Konfluenz. Da bei Substanzinjektion ein Ausschlag zu höheren Werten möglich sein sollte, muss sich die *CI*-Kurve noch im Anstieg befinden. Daher wurden als optimale Messbedingungen für diese Zelllinie eine Zellzahl von 70 000 Zellen pro Well und ein Injektionszeitpunkt nach 14-16 Stunden gewählt (Abb. 18). Die optimalen Bedingungen für die 1321N1-Zellen lagen bei 20 000 Zellen und einem Injektionszeitpunkt nach 24 Stunden.

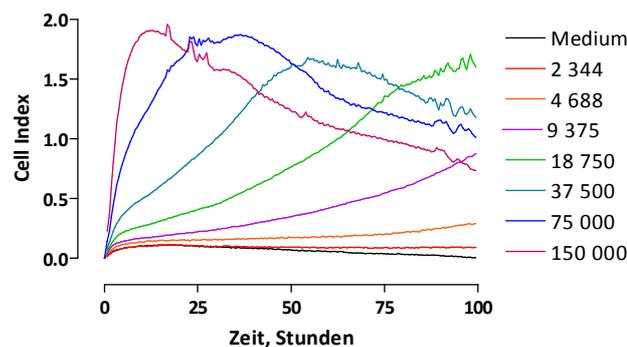


Abbildung 18:

Validierung von optimaler Zellzahl und passendem Injektionszeitpunkt an INS-1-Zellen. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus zwei Messverläufen eines Vorexperiments dar.

Vor Messbeginn wurde das Messplattensystem durch Zugabe von 95 μ l Nährmedium (Vollmedium) zunächst vorkalibriert. Danach wurden die Zellen zu 100 μ l Nährmedium (Vollmedium) auf die Messplatten ausplattiert und über 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellen sanken in dieser Zeit auf den Messplattenboden ab. Anschließend wurden die Platten in den RTCA DP Analyzer, der sich im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ befand, überführt und bis zum passenden Injektionszeitpunkt inkubiert. Das Injektionsvolumen der Testsubstanzlösung betrug 5 μ L, um Störeffekte durch das Injizieren selbst möglichst gering zu halten. Der *CI* wurde beginnend ab der Zellinkubation im Gerät bis 5-8 Stunden nach Substanzgabe bestimmt. Abb. 19 zeigt den Verlauf einer repräsentativen Messung an den INS-1-Zellen.

3. Material und Methoden

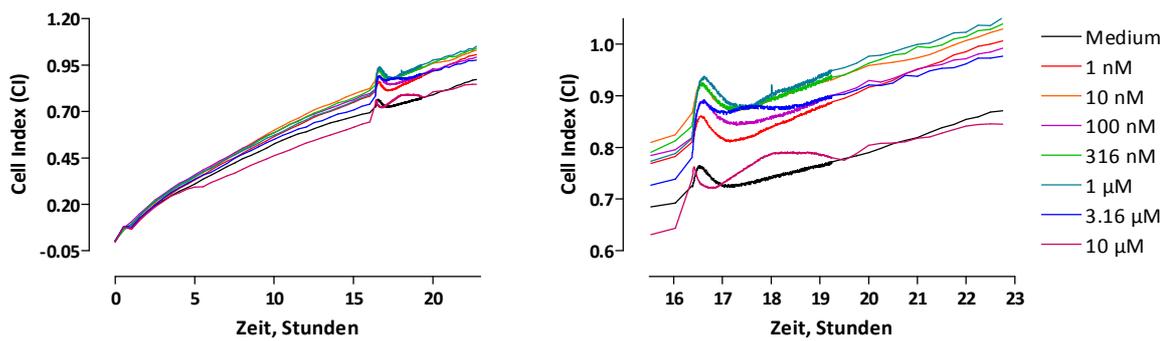


Abbildung 19:

Verlauf des Impedanzsignals in Abhängigkeit der injizierten TUG 469-Konzentration an INS-1-Zellen (**links**) und detaillierte Darstellung der Effekte nach Injektion (**rechts**). Die Injektion der Testsubstanzen erfolgte 16 Stunden nach Ausplattierung der Zellen. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus zwei Messverläufen eines repräsentativen Experiments dar.

Zur Auswertung der hFFAR1-Agonist-induzierten Effekte wurden alle Kurvenverläufe basalnormiert. Das bedeutet, dass zunächst alle Kurvenwerte auf den Wert des letzten Signals ($CI_{well_x}(t_{norm})$, siehe G 7) vor der Agonistinjektion normiert werden:

$$NCI_{well_x}(t) = \frac{CI_{well_x}(t)}{CI_{well_x}(t_{norm})} \quad (G 7)$$

wobei gilt:

$CI_{well_x}(t_{norm}) \neq 0$ und $x = 1, 2, \dots, n$

- $NCI_{well_x}(t)$ = Normalisierter Cell Index in jedem Well x zum Zeitpunkt t
- $CI_{well_x}(t)$ = Cell Index des Wells x zum Zeitpunkt t
- $CI_{well_x}(t_{norm})$ = Cell Index des Wells x zum Normierungszeitpunkt t_{norm}

Anschließend erfolgt die Reduktion dieser normierten Werte um den Mittelwert der auf gleicher Weise normierten Werte der Kontrollmessung bei Injektion von Nährmedium (Basalsignal):

$$BNCI_{well_x}(t) = NCI_{well_x}(t) - \bar{x}(NCI_{basal_well_1}(t), NCI_{basal_well_2}(t), \dots, NCI_{basal_n}(t)) \quad (G 8)$$

wobei gilt:

3. Material und Methoden

$BNCI_{well\ x}(t)$	=	Basal-normierter Cell Index in jedem Well x zum Zeitpunkt t
$NCI_{well\ x}(t)$	=	Normierter CI jedes Wells x zum Zeitpunkt t
$NCI_{basal_well\ 1}(t), NCI_{basal_well\ 2}(t), \dots,$ $NCI_{basal_well\ n}(t)$	=	Normierte Cell Indices ausgewählter Basalsignale $1, 2, \dots, m$ zum Zeitpunkt t

Abb. 20 zeigt die Kurvenverläufe nach Umrechnung der Rohdaten. Eine Abhängigkeit der Höhe und Dauer des Signals von der Konzentration des injizierten hFFAR1-Agonisten TUG 469 kann sowohl an den INS-1, als auch an den 1321N1-hFFAR1-Zellen beobachtet werden.

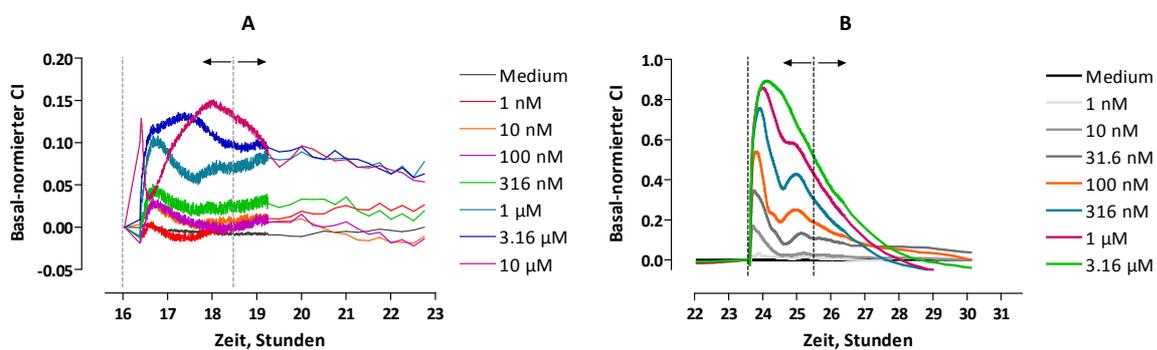


Abbildung 20:

Basal-normiertes Impedanzsignal in Abhängigkeit der injizierten TUG 469-Konzentration an INS-1-Zellen (A) und hFFAR1 1321N1-Zellen (B). Die Messsignale wurden normiert anhand der Werte bei 16 (A) bzw. 23,5 Stunden (B). Datenpunkte stellen Mittelwerte aus zwei Messungen eines repräsentativen Experimentes dar.

Ein letzter Schritt zur Bestimmung der Aktivität von hFFAR1-Liganden ist die Definition einer Art und eines Intervalls für die Ermittlung des Auswertesignals. Abb. 21 zeigt mit den gestrichelten Linien die Grenzen des Auswertebereichs, das zu längeren Messzeiten variabel ist. Die Art der Auswertung wurde über die Bestimmung der Fläche-unter-der-Kurve (AUC) oder der Differenz aus minimalem und maximalem Effekt ($E_{Max} - E_{Min}$) innerhalb des Auswertebereichs durchgeführt (Abb. 18).

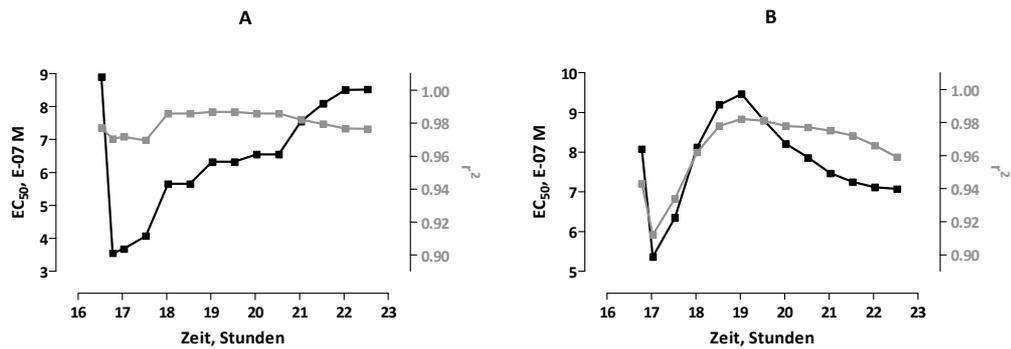


Abbildung 21:

Darstellung der EC_{50} -Werte und des jeweiligen Bestimmtheitsmaßes (r^2) in Abhängigkeit des letzten herangezogenen Wertes des basal-normierten Cell Index mit der Min-Max (**A**)- und AUC (**B**)-Auswertemethode. Datenpunkte wurden ermittelt aus einem repräsentativen Experimente mit den Effekten des hFFAR1-Agonist TUG 469 bei unterschiedlichen Konzentrationen (jeweils als Duplikate).

Die Güte der Auswertung bei beiden Methoden zeigt für ein Intervall von mind. 2 Stunden nach Substanzinjektion die besten Ergebnisse. Das Auswertesignal wurde daher innerhalb einer Zeitspanne von 2-3 Stunden nach Substanzinjektion bestimmt. Die Auswertung an den 1321N1 ermittelten Signalen erfolgte analog.

3.2.2.2.4 Insulinsekretions-Assay

Die pankreatische Ratten-INS-1-Zelllinie können in Abhängigkeit von Glucose Insulin freisetzen und exprimieren den FFAR1-Rezeptor nativ. Daher eignen sich gut für Untersuchung der FFAR1-Aktivität bezüglich der Insulinsekretion (Schnell, 2007; Shapiro, 2005). Wie die Arbeiten von Christiansen et al. und Yang et al. zeigen, ist für eine FFAR1-vermittelte Wirkung auf die Insulinsekretion eine Mindestkonzentration von 12 mM Glucose notwendig (Christiansen, 2008; Yang, 2010). Die Stimulation der Zellen mit FFAR1-Agonisten wurde daher in Gegenwart von 16,7 mM Glucose durchgeführt. Das Maß für die relative Insulinsekretion gegenüber einer alleinigen Stimulation mit Glucose wurde mit Hilfe eines ^{125}I -Insulin-Radioimmunoassays (RIA) ermittelt. Der Zellüberstand wird hierzu mit einer bekannten Menge von mit ^{125}I radioaktiv markiertem Insulin zu einer fixen Menge an Ratten-Insulin-IgG Antikörpern (AK1) gegeben. Markiertes und unmarkiertes Insulin konkurrieren um eine begrenzte und konstante Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Nach einer Inkubationsphase wird der Antigen-AK1-Komplex unter Anwesenheit eines zweiten Anti-

3. Material und Methoden

körpers (AK2) und Polyethylenglycol (PEG) gefällt. AK2 richtet sich gegen den ersten Antikörper, nicht gegen das Antigen. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Messung der radioaktiven Strahlung findet im Gammazähler statt. Je geringer die ermittelte Strahlung, desto höher war die sezernierte Insulinmenge im Zellüberstand.

120 000 - 150 000 INS-1E-Zellen wurden pro Well auf sterile 96-Well-Mikrotiterplatten ausplattiert und für 48 Stunden bei den üblichen Kultivierbedingungen inkubiert (11 mM Glucose). Im Anschluss wurde der Zellrasen mit 50 µl Waschpuffer (KRBH + 0,5% (w/v) BSA, 0,5 mM Glucose) gewaschen. Nach 30 Minuten Inkubation mit 100 µl KRBH (0,5 mM Glucose, ohne BSA) wurde der Puffer durch 90 µl glucosefreiem KRBH ersetzt. Für die Stimulation der Zellen wurden 10 µl Testsubstanzlösung (10-fach höher konzentriert als final gewollt) in KRBH (167 mM Glucose) zupipettiert. Die Stimulation wurde nach 30 Min. beendet, indem die Platte auf Eis gesetzt wurde. 80 µl Zellüberstand wurde bei 10 000 rpm für 5 min. mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde bis zur Messung der Insulin-Konzentration bei -80°C gelagert. Die eingefrorenen Proben wurden am Tag der Messung auf Eis aufgetaut und in einem Verhältnis von 1:50 bis 1:100 mit Assaypuffer (siehe Insulin-RIA Kit) auf ein Volumen von 120 µl verdünnt. Zur Durchführung des Insulin-RIA Kits wurden 100 µl Probe verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Gammazähler.

Zur Bestimmung der Insulinkonzentration in den Proben wurden zunächst die Konzentrationen der Kalibrierlösungen logarithmiert. Abb. 22 zeigt den sigmoidalen Verlauf dieser Werte. Zur Bestimmung der minimalen Strahlung wurden Ansätze, die anstelle der Probe und des AK1 eine entsprechende Menge an Insulin-freiem Assaypuffer enthielten, mitgeführt und vermessen (Basal). Für eine Ermittlung der maximalen Strahlung wurde Insulin-freier Assaypuffer anstelle der Probe mitgeführt und vermessen (Kontrolle).

3. Material und Methoden

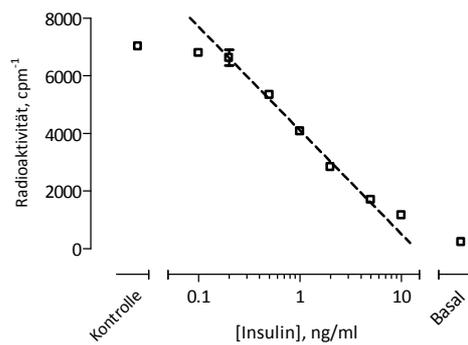


Abbildung 22:

Werte einer Kalibrierreihe zur Bestimmung der Insulin-Konzentration mit dem Insulin-RIA Kit. Alle dargelegten Werte entsprechen Mittelwerten (\pm SD) einer Doppelbestimmung. (Kontrolle) Assaypuffer anstelle der Probe und AK1, (Basal) Assaypuffer anstelle der Probe. Zur Ermittlung der Konzentration aus dem Strahlungswert wurde eine lineare Regression durchgeführt (gestrichelte Linie).

Zur Umrechnung der Strahlungswerte in Konzentrationen wurde der Kalibrierbereich von 0,2 bis 5 ng/ml Insulin gewählt. Hierzu wurde eine lineare Regression der Kalibrierwerte angewandt (Abb. 22). Die erhaltenen logarithmischen Konzentrationen konnten als Exponenten zur Basis 10 wieder in ng/ml angegeben und mit dem Verdünnungsfaktor verrechnet werden. Für die Kombination von Datensätzen verschiedener Experimente wurde die Insulinkonzentration auf den jeweiligen Mittelwert der Kontrollstimulationen mit Assaypuffer (inkl. entsprechendem DMSO-Anteil) normiert. Pro Experiment wurde die Stimulation pro Stimulans in Duplikaten angesetzt. Die Insulinkonzentration jedes Ansatzes wurde einfach bestimmt.

3.2.2.5 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitätstest, der auf einem Nachweis der Zellvitalität beruht (Berridge und Tan, 1993; Ferrari, 1990). Die Ermittlung der Zellvitalität erfolgt über das Reduktionsvermögen zellulärer Reduktasen, welche den gelben, wasserlöslichen Farbstoff MTT in das blau-violette, wasserunlösliche Formazan umwandeln (Abb. 23).

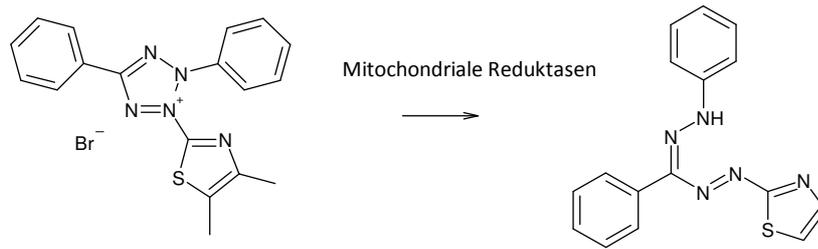


Abbildung 23:

Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch zelluläre Hydrogenasen als Grundlage des MTT-Zellvitalitätstests.

Anhaftende 1321N1 Zellen wurden je nach Inkubationsdauer der Testsubstanz mit einer Zellzahl von 7000/Well bei 72 h bzw. 1000/Well bei 120 h auf eine sterile 96-Well-Mikrotiterplatte ausplattiert und 24 Stunden bei den üblichen Kultivierbedingungen inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium durch frisches Nährmedium ersetzt (90 µl bei 72 h; 225 µl bei 120 h). 10 µl (bei 72 h) bzw. 25 µl (bei 120 h) der Testsubstanzlösung (10-fach höher konzentriert im Vollmedium) wurde zupipettiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer unter den üblichen Kultivierbedingungen wurde der Überstand abgesaugt und durch 30 µl MTT-Lösung ersetzt. Nach 30 Minuten Einwirkzeit bei 37°C und unter visueller Kontrolle der Bildung von Formazankristallen, wurde die MTT-Lösung vorsichtig abgesaugt und durch 50 µl DMSO ersetzt. Nach einer weiteren kurzen Einwirkzeit unter leichtem Schwenken der Platte wurde die Absorption bei 544 nm und 690 nm im FluoStar® ermittelt.

Die Absorptionswerte bei 690 nm wurden von jenen bei 544 nm abgezogen. Dieses Messsignal wurde gegen den Logarithmus der Testsubstanzkonzentration aufgetragen. Die Ermittlung der pharmakologischen Daten einer Testsubstanz (IC_{50} , E_{min} und E_{max}) wurden wie in Kap. 3.2.2.2.1) beschrieben durchgeführt.

3.2.2.2.6 β -Galactosidase-Test

Der Test auf β -Galactosidase-Aktivität gibt Auskunft über das Vorliegen eines zur β -Galactosidase-Expression fähigen Klons und wird häufig als Reporterfunktion bei Transformation oder Transfektion eingesetzt. Das LacZeo-Gen codiert für die Expression der β -Galactosidase (Voet, 2004). Die Nachweisreaktion der β -Galactosidase-Aktivität ist in Abb. 24 dargestellt.

3. Material und Methoden

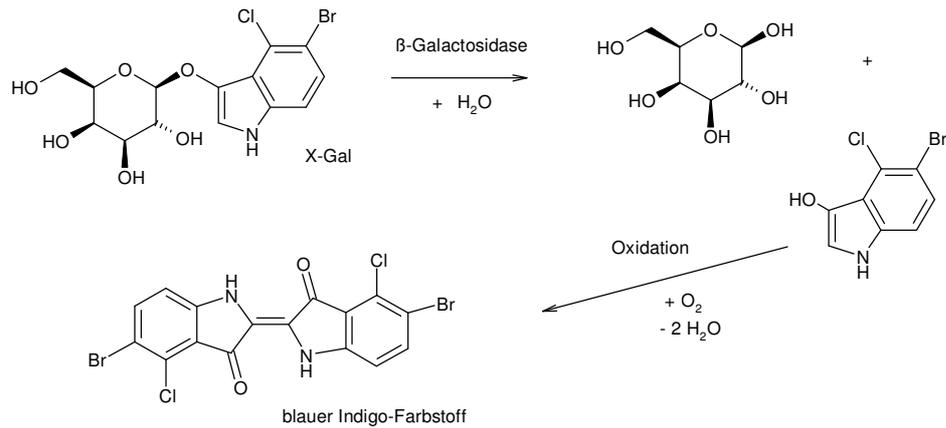


Abbildung 24:

β-Galactosidase-Reaktion als Nachweis einer erfolgreich transfizierten FlpIn-Host-Zelllinie. X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) wird durch β-Galactosidase hydrolysiert. Anschließend findet eine Oxidation des Indols unter Verbrauch von Luftsauerstoff zu einem blauen Indigo-Farbstoff statt.

Zellklone, die mit dem pFRT/5-Plasmid transfiziert wurden, besitzen mit dem LacZeo-Gen die Fähigkeit zur Expression von β-Galactosidase und färben sich nach Zugabe von X-Gal unter Bildung eines blauen Indigo-Farbstoffs (Abb. 24). Eine erneute Kotransfektion mit pOG44 und pcDNA5/FRT-GOI führt zum Verlust an β-Galactosidase-Aktivität (Kap. 3.2.4.1.5) (Invitrogen, 2002).

Pro Well einer 24-Well-Mikrotiterplatte wurden 10 000 Zellen ausgesät und 1-3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Reaktionspuffer (Kap. 3.1.5) wurde am Versuchstag frisch hergestellt. Der Zellrasen wurde mit 500 µl PBS gewaschen und die Zellen mit 500 µl der 4%-(v/v)-Formaldehydlösung für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Beim zweiten Waschschrift verblieb PBS für 10 Minuten auf den Zellen. Danach wurden 220 µl Reaktionslösung pro Well zugegeben und für 3-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platte konnte anschließend zur Auswertung bis zu 7 Tage bei 4°C gelagert werden.

Zur Identifizierung einer erfolgten Transfektion fiel die Auswertung rein qualitativ aus. Zellklone, bei denen alle Zellen eine Weiß- bzw. Blaufärbung zeigten, wurden als transfiziert respektive nicht-transfiziert angesehen. Zellklone, die eine Mischung aus weiß- und blaugefärbten Zellen aufwiesen, wurden nicht weiter verwendet. Von jedem untersuchten Zellklon wurden digitale Photographien mit Hilfe der Mikroskop-Kamera aufgenommen. Abb. 25 zeigt beispielhaft zwei Abbildungen eines weiß- (A) bzw. blaugefärbten (B) Zellklons.

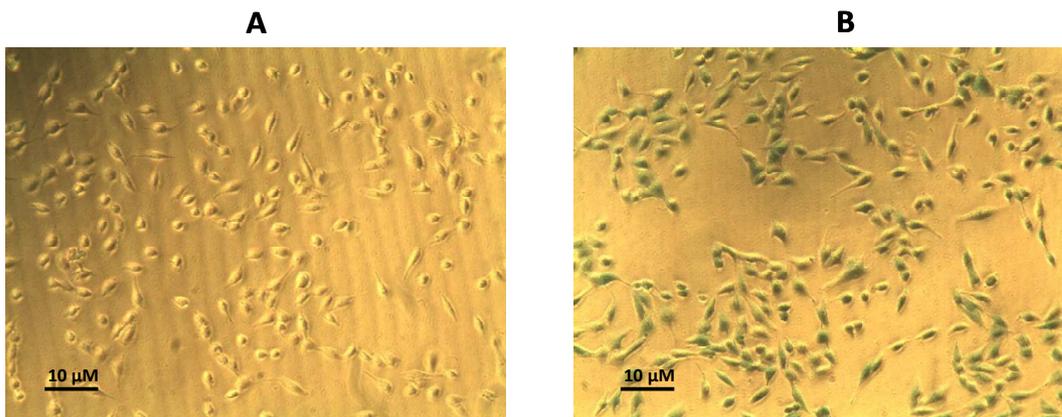


Abbildung 25:

Test auf β -Galactosidase-Aktivität zweier hFFAR1-transfizierter 1321N1-FlpIn-Zellklone. Klon D (A) hat die Fähigkeit β -Galactosidase zu exprimieren verloren. Demnach war der Einbau des Transfektionsvektors pcDNA5/FRT-hFFAR1 erfolgreich. Klon E (B) zeigt eine β -Galactosidase-Aktivität. Ein Einbau des Vektors in die FlpIn-Kassette fand nicht statt.

3.2.3 In vivo-Charakterisierung

Ein Glucosetoleranz-Test (GTT) wird neben dem HbA1c-Werte zur Diagnose eines Diabetes Mellitus bzw. der Insulin-Resistenz beim Menschen herangezogen (Kerner und Bruckel, 2010). Hierbei setzt der Proband 3 Tage vor dem Test alle Medikamente, die die Glucosetoleranz beeinflussen können, ab und ernährt sich normal. Nach einer Nahrungskarenzzeit von 10-16 h wird dem Probanden laut U.S. National Library of Medicine eine einmalige Dosis von 1 g Glucose / kg Körpergewicht verabreicht (NIH, 2010). Die Darreichungsform ist generell oral, bei gastrointestinalen Problemen auch intravenös. Der Nüchternzucker vor sowie der Blutzucker zu festgelegten Zeiten nach der Glucosegabe wird erfasst. Die Bewertung des Messergebnisses richtet sich nach Stand des Nüchternzuckers (normal < 110 mg/dl), der maximal erreichten Glucosekonzentration, sowie dem Wert 2 Stunden nach Glucosegabe (normal < 200 mg/dl). Der GTT und die genannten Normwerte beziehen sich auf den Test am Menschen. Zur *in vivo*-Testung des hFFAR1-Agonisten wurden Mäuse verwendet, deren Stoffwechsel gegenüber dem des Menschen erhöht ist, so dass höhere Blutzuckerwerte zu erwarten sind. Die Mechanismen, die der Glucosetoleranz zugrunde liegen, sind jedoch vergleichbar und lassen in begrenztem Maße Rückschlüsse auf die Anwendung der FFAR1-Agonisten am Menschen zu. Die Versuchsgestaltung des GTT im

3. Material und Methoden

Mausmodell wurde weitestgehend von der am Menschen übernommen. Bezüglich der Applikationsform und -menge der Glucose kam es zu Änderungen. Anstelle einer Dosis von 1 g wurden 2,5 g Glucose / kg Körpergewicht auf intraperitonealem Wege verabreicht. Eine orale Gabe hätte längere Messzeiten und eine höhere Variabilität der Messergebnisse erwarten lassen. Eine intravenöse Applikation konnte aufgrund der geringen Venengröße bei Mäusen nicht durchgeführt werden.

TUG 469 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Trond Ulven, University of Southern Denmark, Odense) wurde in Form der freien Säure in DMSO gelöst zu einer Konzentration von 66,7 mg/ml (Stammlösung). Die Stammlösung wurde am Vortag des Experiments frisch in einer steriler 0,9%-igen NaCl-Lösung zu einer finalen Konzentration von 0,5 mg/ml verdünnt (Testsubstanzlösung). Die 0,9%-ige NaCl-Lösung enthielt 0,5% (w/v) Tween®20 zur Lösungsvermittlung von TUG 469 in wässriger Lösung. Die Vehikelkontrolllösung entspricht der Testsubstanzlösung ohne Testsubstanz, demnach wurde anstelle der Stammlösung die gleiche Menge an reinem DMSO in der 0,5% (w/v) Tween®20-haltigen 0,9%-igen NaCl-Lösung verdünnt. Männliche *New Zealand Obese* (NZO)-Mäuse wurden 6 Stunden vor Versuchsbeginn unter Nahrungskarenz gesetzt und ca. 1,5 Stunden vor Versuchsbeginn gewogen. 60 Minuten vor Glucosegabe wurden je Gramm Körpergewicht der Maus 10 µl Testsubstanzlösung, Vehikelkontrolllösung bzw. 0,9%-ige NaCl-Lösung intraperitoneal in die rechte Bauchseite injiziert. Bei Versuchsbeginn (Zeitpunkt 0) wurden pro Gramm Körpergewicht 6,25 µl einer sterilen 40%-igen Glucoselösung intraperitoneal in die linke Bauchseite gespritzt (finale Konzentration der Glucose: 2,5 g/kg Körpergewicht). Zur Verabreichung aller Lösungen wurden sterile Einmal-Injektions-Kanülen und sterile Einmalspritzen verwendet. Die Lösungen wurden zeitnah zur Applikation blasenfrei vorbereitet. Zur Konzentrationsbestimmung der Blutglucose wurde ein Tropfen venöses Blut aus der Schwanzspitze der Maus entnommen und mit Hilfe eines handelsüblichen Blutzuckermessgerätes (Precision Xceed) und passender Teststreifen (Precision Xtra Plus) vermessen. Da das obere Messlimit des Blutzuckermessgeräts bei 500 mg/dl liegt, wurden Werte, die über- oder knapp unterhalb des Limits lagen, über eine 1+1-Verdünnung des Bluts mit 5 µl PBS erneut bestimmt. Die Ermittlung der Blutglucosekonzentration fand zu folgenden Zeiten statt: -60, 0, 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten.

Die Blutzuckerwerte der Mäuse wurden zunächst in Gruppen (TUG 469, Vehikel, NaCl-Kontrolle) eingeteilt. Bei Mehrfachbestimmung eines Einzelwerts wurde gemittelt. Um den Verlauf der Blutzuckerwerte zu normieren, wurde der ermittelte Nüchternwert bei Testsubstanzgabe von allen übrigen Messwerten je Versuchstier abgezogen. Der Nüchternwert nimmt demnach den Wert null an und ein direkter Vergleich der Blutzucker-Zeit-Verläufe nach Substanzgabe ist möglich. Zur Bestimmung der Fläche-unter-der-Kurve (AUC) der sich ergebenden Blutzucker-Zeit-Verläufe wurde die Trapezregel angewandt.

3.2.4 Gentechnische Methoden

3.2.4.1 Stabiler Einbau von Genen in die FlpIn[®] Host-Zelllinie

3.2.4.1.1 Transformation, Vermehrung und Aufreinigung von Vektoren in E.coli

Die cDNA der mRNA beider Freie-Fettsäure-Rezeptoren hFFAR1 (früher hGPR40 genannt, Gen-ID: 2864; Locus: EF611308; Länge: 903 bp) und hGPR120 (Gen-ID: 338557; Locus: BC101175; Länge: 1086 bp) wurden separat zur Testung potenter hFFAR1-Liganden auf ihre Selektivität in ein 1321N1-FlpIn-Host-Zellsystem (Invitrogen, 2002) eingebracht. Im Anhang dieser Arbeit sind die Gensequenzen beider Rezeptoren aufgeführt. Die hFFAR1-codierende Sequenz wurde im Vektor pcDNA3.1(+) mit einem extrazellulären His-Tag von Prof. E. Kostenis (Universität Bonn, Institut für Pharmazeutische Biologie) dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Die GPR120-codierende Sequenz wurde im Vektor pCR-BluntII-TOPO käuflich erworben. Alle pcDNA3.1(+)-tragende E.coli-Stämme besitzen ein Ampicillin-Resistenzgen, alle pCR-Blunt II-TOPO-tragende E.coli-Stämme ein Kanamycin-Resistenzgen und wurden mit 50 µg/ml Ampicillin respektive 30 µg/ml Kanamycin selektiert.

Vor Transformationsbeginn wurden LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin (je nach Resistenzgen) frisch hergestellt (Kap. 3.1.5) und 3-4 Stunden bei 37°C vorgewärmt. Das zu transformierende Plasmid wurde auf Eis aufgetaut und auf eine Konzentration von 5-20 ng/µl in TE-Puffer verdünnt. Die kompetenten E.coli Stämme (XL-1 Blue) wurden 1 Stunde vor der Transformation auf Eis gelagert und der Arbeitsbereich desinfiziert. Das SOC-Medium wurde auf 37°C vorgewärmt. 100 µl der E.coli-Suspension

3. Material und Methoden

(entspricht 5-15 ng) wurden in eine Schraubröhre (50 ml) pipettiert, 2 µl der Plasmidlösung (entspricht 1-3 ng Plasmid) zugegeben und durch leichtes Rühren mit einer Pipettenspitze vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Schraubröhre für den Hitzeschock genau 45 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad gehalten und anschließend wieder für 2 Minuten auf Eis gelagert. Es wurden 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und im Schüttelinkubator bei 37 °C unter Schütteln (150-175 rpm) für 1 Stunde inkubiert. Verschiedene Mengen (80-120 µl) dieses E.coli-Ansatzes wurden mit einer Pipette auf Agarplatten aufgebracht. Die Beschickung der Agarplatten wurde mit Hilfe eines ausgeglühten (und wieder abgekühlten) Drigalskispatels durchgeführt. Die Agarplatten wurden bei 37 °C und hoher Luftfeuchte für 16-18 Stunden inkubiert. Danach wurden Einzelklone mit einer ausgeglühten (und wieder abgekühlten) Impföse gepickt und in eine Schraubröhre (50 ml) mit 12 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium (+ Selektionsantibiotikum) gegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C unter Schütteln (150-175 rpm) für mehrere Stunden inkubiert, bis eine Trübung erfolgte. Anschließend wurde der Ansatz in einem Messkolben (2 l) mit 250 ml auf 37°C vorgewärmtem LB-Medium vermengt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (150-175 rpm) inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte am Folgetag mit Hilfe eines Endotoxin-freien Maxi-Prep Kits nach Angaben des Herstellers. Die aufgereinigte DNA wurde in TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

UV-Gehaltsbestimmung der Plasmid-DNA

In einer Verdünnung von 1:50 bis 1:100 der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde in einer Micro-Küvette und einem UV-Spektrometer die Absorption bei 260 nm (A_{260}) und bei 280 nm (A_{280}) gegen reinen TE-Puffer bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der Tatsache, dass bei einer Küvetten-Schichtdicke von 10 mm die Absorption A_{260} von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht (Clark und Pazdernik, 2009; FIZ, 2008):

$$[DNA] = A_{260} \cdot 50 \left[\frac{\mu g}{ml} \right] \cdot \frac{V_{Gesamt}}{V_{Probe}} \quad (G 9)$$

Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt aufgrund der Absorption aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm. Das Verhältnis zwischen A_{260} und A_{280} zeigt an, wie stark eine DNA-Lösung noch durch Reste von Proteinen verunreinigt ist. Reine DNA besitzt hier ein Verhältnis von 1,8. Bei einer Verunreinigung der Nukleinsäure-Lösung mit Proteinen oder Phenol liegt der Wert signifikant unter 1,8 (FIZ, 2008).

3.2.4.1.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Um die cDNA der Gene des hFFA1-Rezeptors bzw. hGPR120-Rezeptors (im folgenden Inserts genannt) in den pcDNA5/FRT-Transfektionsvektor einzubauen, musste zunächst die vermehrte und aufgereinigte Plasmid-DNA der Ursprungsvektoren beider Rezeptoren mit zwei Restriktionsendonukleasen verdaut werden. Beide Ursprungsvektoren (pcDNA3.1(+) und pCR-BluntII-TOPO) besitzen eine multiple Klonierungsstelle mit Schnittstellen für HindIII (upstream vom Insert) und XhoI (downstream vom Insert) (Anhang A3). Um eine erneute Rezyklisierung bzw. Religation des linearen Transfektionsvektors zu verhindern, wurden dieser anschließend mit einer alkalischen Phosphatase (CIAP) behandelt, welche die Hydrolyse der 5'-Phosphatgruppe von DNA, RNA bzw. Ribo- und Desoxyribonukleosid Trisphosphaten katalysiert.

Es wurden Ansätze gemäß Tab. 1 für den Doppel-Restriktionsverdau von beiden Inserts und dem Transfektionsvektor pipettiert.

Tabelle 1:

Ansatz für den Doppel-Restriktionsverdau.

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA	abhängig von [Plasmid], 10 μ g
HindIII [10 U/ μ l]	2 μ l
XhoI [10 U/ μ l]	2 μ l
Puffer R 10x	5 μ l
Ampuwa [®]	ad 50 μ l

Nach einer 3- bis 10-stündigen Inkubation bei 37°C im Thermocycler wurde dem Restriktionsverdau eine Inaktivierung der Enzyme bei 65°C für 10 Minuten angeschlossen. Es

wurden 4 μl einer CIAP-Lösung (40 U) und 6 μl 10x CIAP-Reaktionspuffer zu dem Ansatz gegeben und für weitere 30 Minuten bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde CIAP durch Erhitzen für 10 Minuten auf 85°C inaktiviert.

3.2.4.1.3 Gel-Extraktion

Um die geschnittenen Plasmide vom Rest des Restriktionsansatzes abzutrennen, wurde eine mit Kristallviolett gefärbte Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Banden der jeweiligen Plasmide wurden anschließend aus dem Agarosegel geschnitten und mit einem Gel-Extraktions-Kit aufgereinigt. Für die Auftrennung wurde ein 10 cm-langes 1%-iges Agarosegel verwendet, das vor dem Guss mit wenigen Tropfen einer 1%-igen Kristallviolett-Lösung angefärbt wurde. Als Längenvergleich wurde ein Teil der aufgereinigten Restriktionsansätze in zusätzlichen Taschen mit SYBRGreen® versetzt und parallel mitentwickelt. Die verwendeten Komponenten und deren Menge sind in Tab. 2 angegeben.

Tabelle 2:
Ansätze für Agarose-Gelelektrophorese.

Komponente	Volumen
Restriktionsansatz (DNA)	25 μl (entspricht etwa 5 μg)
SYBR-Green [1/100] bzw. TAE 1x	2 μl
Loading Puffer 6x	6 μl
TAE 1x	ad 36 μl

Das Gel wurde bei 60-80 V für mindestens 40 Minuten entwickelt. Die Verteilung der Banden auf dem Gel wurde über die Anregung mit UV-Strahlung überprüft (Abb. 26). Durch den Zusatz von Kristallviolett konnten die DNA-Banden ohne den Einsatz von DNA-schädigendem UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Mit einem Gel-Extraktions-Kit wurde die ausgeschnittene Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, in TE-Puffer gelöst und bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (Kap. 3.2.4.1.1).

3. Material und Methoden

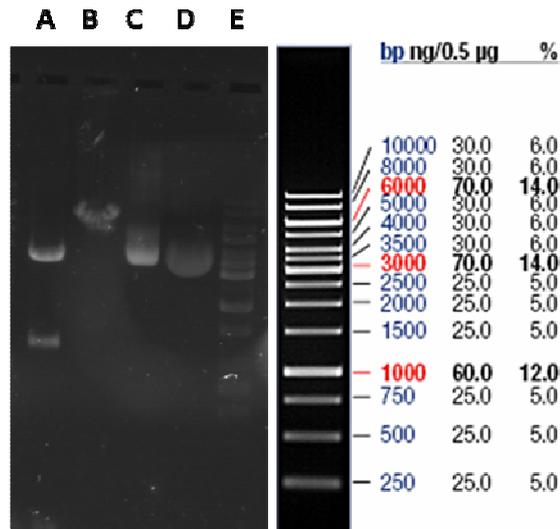


Abbildung 26:

Aufnahme eines Agarose-Gels nach elektrophoretischer Auftrennung doppelt-verdauter Plasmid-DNA. Da die Färbung der verwendeten DNA-Leiter nicht ausreichend deutlich zum Vorschein kommt, wurde rechts eine entsprechende Leiter zum Größenmaßstab angefügt. **A:** verdaute pCR-BluntII-TOPO-hGPR120 (4605 bp ungeschnitten, 1186 bp + 3419 bp mit HindIII/XhoI doppelt-geschnitten), **B:** verdautes pcDNA5/FRT (5070 bp ungeschnitten, 4996 bp mit HindIII/XhoI doppelt-geschnitten), **C:** pCR-BluntII-TOPO-hGPR120 (ungeschnittenes Plasmid), **D:** pcDNA5/FRT (ungeschnittenes Plasmid), **E:** DNA-Leiter 1 kb.

3.2.4.1.4 Ligation

Für die Transformation in *E.coli* wurden beide Fragmente (Insert und offener Transfektionsvektor) zu einem geschlossenen Plasmid ligiert. Hierzu wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, die die „sticky ends“ der jeweils komplementären Enden der beiden Fragmente verknüpft. Die Ringform der Plasmid-DNA ist notwendig, damit eine hohe Replikationsrate in *E.coli* gewährleistet werden kann. So konnte eine ausreichende Plasmidmenge für die Transfektion in das 1321N1-FlpIn-Host-Zellsystem gewonnen werden. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:3. Die nötigen Plasmidmengen wurden nach Gleichung G 10 berechnet:

$$m_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \frac{m_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \cdot \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] \cdot 3}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]} \quad (\text{G } 10)$$

Für die Ligation wurde folgender Ansatz pipettiert (Tab. 3). Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 22°C im Thermocycler inkubiert. Die Ligation wurde danach durch Erhitzen auf 65°C für 10 min inaktiviert.

3. Material und Methoden

Tabelle 3:

Ansatz zur Ligation des offenen pcDNA5/FRT-Vektors und des Inserts (hFFAR1 bzw. hGPR120).

Komponente	Menge
DNA _{Insert}	gemäß G 10 errechnet
DNA _{Vektor}	100 ng
Ligationspuffer 10x	2 µl
T4-DNA-Ligase [5 Weiss u/µl]	2 µl
Ampuwa [®]	ad 20 µl

Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente XL-1 Blue E. coli-Bakterien. Hierfür wurden 2,0 µl des Ligationsansatzes verwendet. Mit dem ligierten Plasmid wurde wie in Kap. 3.2.4.1.1 beschrieben verfahren. Die Sequenz des eingebauten Inserts wurde mit einer Sequenzierung der aufgereinigten Plasmid-DNA überprüft.

3.2.4.1.5 Transfektion in die 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie

In Anhang A4 ist der schematische Einbau der Gene von Interesse (GOI; hFFAR1 bzw. hGPR120) in die humane 1321N1 FlpIn-Host-Zelllinie dargestellt. Diese Host-Zelllinie (Klon C2) wurde von S. Meis etabliert und stammt aus der 1321N1-Wildtyp-Zelllinie (Euroscreen). Hierbei fand ein stabiler Einbau der FlpIn-Kassette (pFRT/lacZeo) in das 1321N1-Genom statt. Die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen wurde durch die Verwendung des Antibiotikums Zeocin erreicht, da das pFRT/lacZeo-Plasmid die Sequenz eines Zeocin-Resistenzgens enthält.

Es wurden Einzelklone selektiert und auf den Erfolg der stabilen Transfektion über Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität (Kap. 3.2.2.2.6) überprüft. Eine mit dem pFRT/lacZeo-Plasmid transfizierte Zelle bildet β -Galactosidase aus und färbt sich im Test blau. Als 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie wurde Klon C2 verwendet, da die Blaufärbung bei diesen gegenüber anderen Klonen intensiver und vor allem durchgängig über alle Zellen vorhanden war. Daher kann angenommen werden, dass die Zellkolonie die FlpIn-Kassette enthält, was eine einheitliche und effiziente Expression des GOI gewährleistet. Der Einbau eines GOI in die FlpIn-Kassette erfolgt in einer zweiten Transfektion mit einem modifizierten pcDNA5/FRT-Plasmid, in das das GOI eingebaut wurde. Bei diesem Schritt muss ein Covektor pOG44, der die FlpIn-Rekombinase-Expression bewirkt, kotransfiziert werden. Die FlpIn-Rekombinase

3. Material und Methoden

baut schließlich das modifizierte pcDNA5/FRT-Plasmid über die FRT-Bindedomäne an der passenden Stelle der FlpIn-Kassette in das Genom ein. Durch den Einbau wird die Zelle gegenüber Zeocin wieder sensitiv und verliert ihre β -Galactosidase-Aktivität, da die Expression des lacZ-Zeocin-Fusionsgens durch dessen räumliche Entfernung vom Promotor unterbleibt. Die Expression der eingebauten GPCR-Gene (hFFAR1 und hGPR120) wurde über die funktionelle Wirkung der exprimierten Rezeptoren mit Hilfe des Ca^{2+} - und cAMP-Reporter-Gen-Assays (Kap. 3.2.2.2) indirekt nachgewiesen. Als Kontrollzelllinie wurde die 1321N1-FlpIn-LV (Leervektor) Zelllinie generiert, in die der bloße pcDNA5/FRT-Vektor (ohne Insert) transfiziert wurde. Sie besitzt wie die GOI-transfizierte Zellen auch eine Zeocin-Sensitivität und zeichnet sich durch den Verlust der β -Galactosidase-Expression aus.

1321N1-FlpIn-Zellen (Klon C2) wurden auf eine Mikrotiterplatte (6-Well) zu $2,5 - 5,0 \times 10^5$ Zellen/Well ausgesät. Die übrigen Zellen wurden als Backup eingefroren. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen schloss sich die Transfektion mit folgenden eingesetzten DNA-Mengen an:

Tabelle 4:

Transfektionsmischung mit verwendeter Menge an Plasmid-DNA.

Komponente	Menge
pOG44	25 μg
pcDNA5/FRT-GOI bzw. -LV	2,5 μg
reines DMEM	ad 250 μl

Die Vorbereitung der Komplexmischung zur Transfektion wurde wie folgt durchgeführt: 6 μl Lipofectamin wurden zu 250 μl DMEM (ohne Zusätze) gegeben und für 5 Minuten bei RT inkubiert (Lipofectaminansatz). Lipofectaminansatz und Transfektionsmischung aus Tab. 4 wurden gemischt und 20 Minuten bei RT inkubiert (Komplexmischung). Das Nährmedium in den Wells der Zellkulturplatte wurde vorsichtig abgesaugt und 1,5 ml Vollmedium (ohne Selektionsantibiotika) zupipettiert. Nach Zugabe der Komplexmischung und vorsichtiger Durchmischung wurden die Zellen für 24 Stunden bei $37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit frischem Vollmedium (ohne Selektionsantibiotika) versorgt und weitere 1-2 Tage inkubiert. Bei Vorliegen einer 70-100% Konfluenz wurden die Zellen auf Gewebekulturflaschen (25 cm^2) zu einer finalen Konfluenz von 15-25% subkultiviert. In den folgenden Tagen wurde dem Zellkulturmedium Hygromycin B zugesetzt. Die Konzentration

3. Material und Methoden

wurde dabei sukzessive von 100 auf 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erhöht. Eine Überprüfung der minimalen Konzentration an Hygromycin B, die zur Selektion notwendig ist, wurde mit einem MTT-Assay durchgeführt. Abb. 27 zeigt diese Ergebnisse bei einer Inkubationsdauer mit Hygromycin B von 3 bzw. 5 Tagen. Bei einer Behandlung mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B nach 3 Tagen sind noch etwa 30-35% der Zellen aktiv, nach 5 Tagen Behandlungszeit waren es noch etwa 5%.

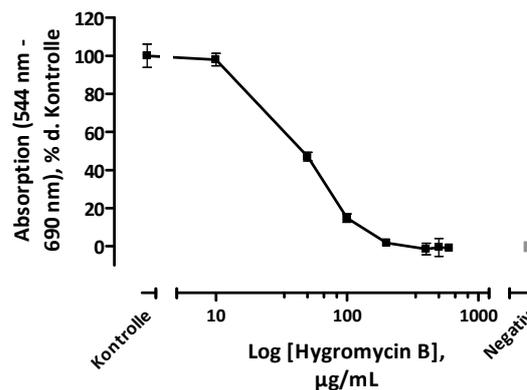


Abbildung 27:

MTT-Assay mit Inkubation der 1321N1-FlpIn-Zellen (Klon C2) mit Hygromycin B über 5 Tage. Alle Werte sind normalisiert auf die Kontrolle (Inkubation mit PBS 1x), die Negativkontrolle entspricht der Inkubation mit 10% DMSO. Die Messung über 5 Tage wurde in zwei voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten durchgeführt.

Nachdem die Zellen 1-2 Wochen bei einer Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B kultiviert wurden, wurde eine stark verdünnte Zellsuspension auf 96-Well-Zellkulturplatten ausplattiert, sodass sich im Schnitt pro Well 1 Zelle befinden sollte. Zur Kultivierung von Einzelklonen wurden nur die ausgewählt, bei denen zu Beginn davon ausgegangen werden konnte, dass es sich hierbei um Einzelklone handelt (eine Kolonie pro Well). Die Einzelklone wurden über mehrere Wochen kultiviert. Hierbei wurden lediglich die Zellklone weiter in Kultur gehalten, die eine Einzelkolonie im Well aufwiesen. Bei 5-6 dieser Einzelklone wurde eine Prüfung auf den erfolgten Einbau des GOI-tragenden Vektors durchgeführt. Der Test auf Zeocin-Sensitivität erfolgte über einen MTT-Assay (analog zur Durchführung in Abb. 27). Ferner wurde der Test auf β -Galactosidase-Aktivität durchgeführt. Nur Klone, die Zeocin-sensitiv waren und einen Verlust an β -Galactosidase-Aktivität aufwiesen, wurden zur Charakterisierung von Standardliganden des hFFAR1- bzw. hGPR120-Rezeptors verwendet (vgl. Kap. 4.6.1).

3.2.5 Computergestützte Methoden

3.2.5.1 *Aufbereitung der Ligandstrukturen*

Die Molekülstrukturen aller am hFFAR1 charakterisierten Liganden (Anhand B1) wurden mit Hilfe eines herkömmlichen Programms zur 2D-Darstellung chemischer Strukturen (*ISIS draw*) gezeichnet. Hierbei wurde explizit auf die Darstellung der Wasserstoffe geachtet, um Fehler bei der späteren Umwandlung in 3D-Format zu vermeiden. Über die Konvertierungsprogramme *BABEL* (STFC, 2008) und *LIGPREP* (Chen und Foloppe, 2010) wurden die exportierten 2D-Strukturen umgewandelt und erhielten damit 3D-Struktureigenschaften (Hybridisierungszustände der Atome und die damit verbundenen Konfigurationen). Mit *OMEGA2* (Bostrom, 2003; Perola und Charifson, 2004) wurden für jeden Liganden Konformationen generiert, die dann mit *ROCS* (Bostrom, 2003; Rush, 2005) auf das hFFAR1-Ligandtemplat GW9508 (Tikhonova, 2007) überlagert wurden. Die Koordinaten von GW9508 stammen aus der Arbeit von Tikhonova et al. (Tikhonova, 2007). Pro Verbindung wurden die 10 energetisch günstigsten Konformationen ermittelt. Die für eine genauere Anpassung am besten geeignete Ausgangskonformation jedes Liganden wurde ausgewählt und in *MOLOC* (Gerber und Muller, 1995) importiert.

3.2.5.2 *Anpassung der Verbindungen in die hFFAR1-Bindetasche*

Die vorausgerichteten Liganden wurden mit *MOLOC* auf das hFFAR1-Ligandtemplate GW9508 (Tikhonova, 2007) überlagert und in die hFFAR1-Bindetasche (Tikhonova, 2007) eingepasst. Zur manuellen Ausrichtung jedes einzelnen Liganden in der Proteinumgebung wurde das Protein starr gehalten. Alle sauren- und basischen Gruppen wurden gemäß einem physiologischen pH-Wert von 7,4 angepasst (z.B. deprotonierte Carbonsäure). Danach wurde eine Energieminimierung durchgeführt, die unter Verwendung des MAB-Kraftfeldes (Gerber und Muller, 1995; Gohlke und Klebe, 2002b) zu einer optimierten Lage des Liganden in der Rezeptorumgebung führt. Abb. 28 zeigt die Überlagerung eines Großteils der eingepassten Liganden, die bereits eine Gruppierung der Liganden in zwei Klassen andeutet.

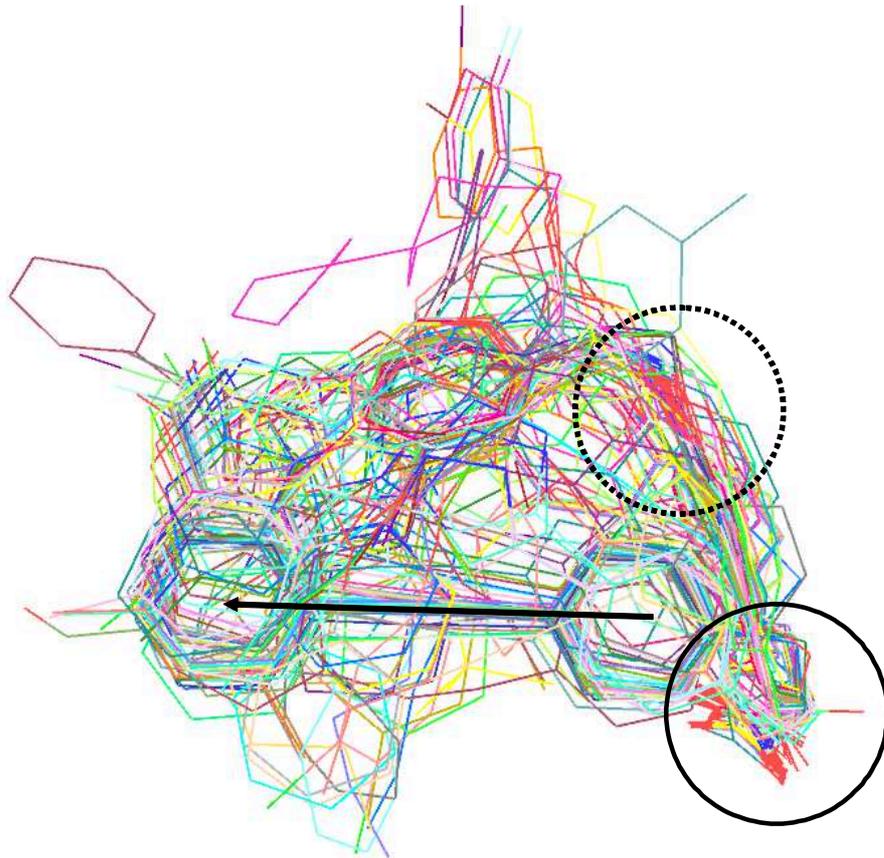


Abbildung 28:

Ensemble der Liganden in der hFFAR1-Rezeptorbindetasche. Die Liganden wurden auf den von Tikhonova et al. postulierten Bindungsmodus von GW9508 (Tikhonova, 2007) ausgerichtet und im Rezeptor energieminiert. Der gestrichelte Kreis deutet die Position des Oxy- bzw. Amin-Linkers an, der bei entsprechenden Verbindungen einen räumlichen Knick bewirkt. Der durchgezogene Kreis grenzt die Position des Anions ein, und der Pfeil verdeutlicht die Lage der Tolan-Verbindungen.

Bei vielen Verbindungen war mehr als eine Ausrichtung im Rezeptor denkbar. Für die Tolan-Verbindungen wurden zwei Bindungsmodi angenommen. Eine erste Ausrichtung wurde bei der Überlagerung mit dem hFFAR1-Ligandtemplat GW9508 ermittelt. Eine alternative Ausrichtung bot die von Lu et al. postulierte Lage für TUG 424 (Lu, 2010). Lu et al. dockten diesen Tolanliganden ebenfalls in das von Tikhonova et al. postulierte hFFAR1-Rezeptor-Modell und postulierten Wechselwirkungen des terminalen Phenylrings von TUG 424 mit den Aminosäureresten Tyr91, Tyr240 und His86 (Christiansen, 2008; Lu, 2010; Tikhonova, 2007). Abb. 29 zeigt die beiden geschriebenen Bindungsmodi in der hFFAR1-Bindetasche für die Leitstruktur TUG 309.

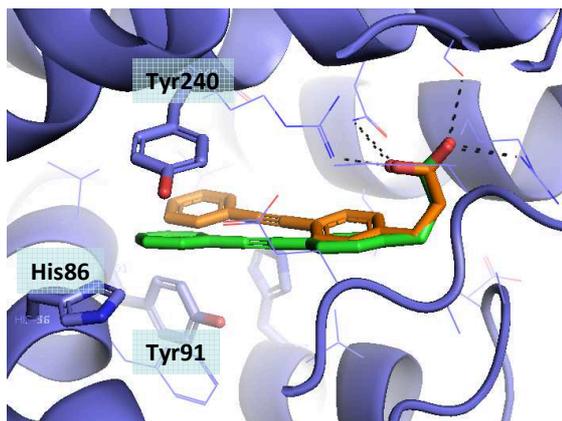


Abbildung 29:

Erste angenommene (orange) und alternative (grün) Ausrichtung der Tolanverbindung TUG 309 in der hFFAR1-Bindetasche als Beispiel für diese Ligandgruppe. Die für die Wechselwirkung mit dem terminalen Phenylring postulierten Aminosäurereste His86, Tyr240 und Tyr91 sind in Stabform dargestellt.

Von den meisten Verbindungen wurden mehrere Bindungsmodi erstellt und im Folgenden weiter berücksichtigt. Nach der Anpassung wurden die Moleküle mit *ANTECHAMBER* (AMBER, 2011) umgewandelt, um auch Atome zu typisieren, die von MOLOC nicht beschrieben werden können (z.B. C.ar, Cl, Br). Nach der Umwandlung wurde eine visuelle Kontrolle der Struktur und Atomtypisierung in *PYMOL* (PyMOL, 2011) angeschlossen.

3.2.5.3 Berechnung der Potential- und Interaktionsfelder

Zunächst wurde die Größe und Lage des Gitternetzes definiert. Hierzu diente eine Verbindung des Trainingsdatensatzes, die die größte räumliche Ausdehnung nach der Anpassung besitzt (TUG 628). Das Gitter wurde quaderförmig um TUG 628 gespannt, mit einer Randbreite von 4 Å und einem Maschenabstand von 1 Å. Tab. 5 zeigt das Lage und Ausdehnung des gewählten Gitters.

Tabelle 5:

Lage und Ausdehnung des Gitters für die AFMoC-Analyse.

Maschenabstand	1.0 Å
x^a	20.43 (20)
y^a	24.05 (17)
z^a	-7.59 (13)
Ansatz der Gitterpunkte	4420

^a Angegeben ist die Koordinate der unteren linken Frontecke. Angaben in Klammern geben die Anzahl der Gitterpunkte pro Richtung an.

Im nächsten Schritt wurden die durch die Proteinumgebung bedingten Potentialfelder an den Gitterpunkten mit Hilfe der wissensbasierten Bewertungsfunktion *DrugScore* (Gohlke und Klebe, 2002a) berechnet. Hierzu wurden Sondenatome gängiger und mehrheitlich im Ligandensatz vorzufindender SYBYL-Atomtypen (C.2, C.3, C.ar, N.3, N.ar, N.pl3, O.2, O.3 usw.) verwendet. Anschließend wurden Interaktionen der Liganden mit der Proteinumgebung auf die Liganden benachbarten Gitterpunkte projiziert, indem die Potentialfelder atomtypspezifisch mit 3D-Gaussfunktionen multipliziert wurden, die an den Orten von Ligandatomen mit diesem Atomtyp lokalisiert sind (Gohlke und Klebe, 2002b). Hieraus resultieren die so genannten Interaktionsfelder.

3.2.5.4 Aufstellen des AFMoC-Modells

Die Gesamtzahl der sich aus den berechneten Interaktionsfeldern ergebenden Deskriptoren (Interaktionswerte an allen Gitterpunkten und für alle Atomtypen) der Liganden lassen sich in x Reihen (Anzahl der Liganden) mit jeweils n Deskriptoren (Anzahl der Atomtypen multipliziert mit Anzahl der Gitterpunkte) zusammenfassen. Zusammen mit n zu bestimmenden Koeffizienten lassen sich die Reihen mit den jeweiligen experimentell ermittelten Aktivitäten (pEC_{50}) zu einem linearen, unterbestimmten Gleichungssystem komplettieren. Hiermit wurde eine „*Partial Least Squares*“-Analyse durchgeführt. Dieses Verfahren bestimmt gleichzeitig die Komponenten größter Varianz im Deskriptorraum und korreliert diese mit den experimentell ermittelten Aktivitäten. Hierbei werden Deskriptoren, die keinen Beitrag zur Erklärung von Unterschieden in der Ligandaktivität haben, beseitigt und/oder Eigenschaften so zusammengefasst, dass der Zusammenhang zwischen räumlicher Struktur und Aktivität der Liganden beschrieben werden kann. Hinzu kommt, dass eine Auswahl der zur Verfügung stehenden Atomtypen zur Gitterberechnung getroffen werden kann, denn nicht alle Atomtypen leisten einen Beitrag zur Erklärung des Modells. Eine geeignete Auswahl dieser Deskriptoren wurde durch Ausprobieren bestimmt. Ein gutes QSAR-Modell liegt vor, wenn der q^2 -Wert, das Maß für die Güte einer Vorhersage nach der *Leave-One-Out*-Methode (Kap. 3.2.5.5), einen Wert $> 0,5$ annimmt (Gohlke und Klebe, 2002b). Waren für Verbindungen des Trainings-Datensatzes mehrere Bindungsmodi angenommen worden, wurden diese einzeln zur Aufstellung des AFMoC-Modells verwendet.

Letztlich floss derjenige Bindungsmodus in das AFMoC-Modell ein, der zum höchsten q^2 -Werte führte.

3.2.5.5 Statistische Parameter zur Beurteilung des AFMoC-Modells

Die Vorhersagekraft für die hFFAR1-Aktivität lässt sich mit dem q^2 -Wert ermitteln. Dieser und andere wichtige statistische Parameter wurden folgendermaßen ermittelt (Gohlke und Klebe, 2002b):

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (x_{i,pred} - x_{i,exp})^2; \quad \text{wobei } n = \text{Anzahl der Liganden}$$

$$SSD = \sum_{i=1}^n \left(x_{i,exp} - \bar{x}_{exp} \right)^2; \quad \text{wobei } \bar{x}_{exp} = \text{Mittelwert aller } x_{i,exp}$$

$$q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SSD};$$

$$s_{PRESS} = \sqrt{\frac{PRESS}{n-h-1}}; \quad \text{wobei } h = \text{Anzahl der Komponenten (Deskriptoren)}$$

$$r^2 = \frac{\text{Kovarianz}(x, y)}{\sqrt{\text{Varianz}(x)} \cdot \sqrt{\text{Varianz}(y)}}$$

$$S = \sqrt{\frac{RSS}{n-h-1}}; \quad \text{wobei } RSS = \sum_{i=1}^n (x_{i,fit} - x_{i,exp})$$

$$F = \frac{r^2}{1-r^2} \times \frac{n-h-1}{h} \quad \text{Fisher's F-Wert}$$

Die Beurteilung der Vorhersagekraft des AFMoC-Modells erfolgte zunächst über die Kreuzvalidierungsmethoden „Leave-One-Out“ (LOO) bzw. „Leave-Ten-Out“ (LTO) mit internen Daten (Trainingsdatensatz). Hierbei wurde(n) eine bzw. zehn zufällig ausgewählte Verbindung(en) aus dem Trainingsdatensatz entfernt und mit dem Rest der Verbindungen eine neue PLS-Analyse durchgeführt. Anschließend wurden die Aktivitäten der entnommenen Verbindungen durch das Teilmodell vorhergesagt. Es ergeben sich somit vorhergesagte Aktivitäten ($pEC_{50 \text{ pred}}$) für jede entnommene Verbindung des Trainingssets. Eine Angabe der

Güte zwischen vorhergesagter und experimenteller Aktivität erfolgt dann über den q^2 -Wert. Ein q^2 -Wert von eins zeigt eine perfekte Vorhersage. Ist dieser negativ, so führt das Modell zu einer schlechteren Vorhersage als eine einfache Gleichsetzung aller Aktivitäten mit dem Mittelwert aller experimentellen Daten. Ab einem q^2 -Wert von 0,3 gilt das Modell als signifikant (Agarwal, 1993).

3.2.5.6 Aktivitätsvorhersage anhand des AFMoC-Modells

Erste Hinweise für Strukturabänderungen der Liganden konnten durch eine Betrachtung der Liganden in der Proteinumgebung gewonnen werden. So konnten beispielsweise zwischen Wasserstoffbrücken-Donoren (Hydroxylgruppe, primäres und sekundäres Amin etc.) und - Akzeptoren (Carbonylgruppe, Pyridin-Stickstoff etc.) am Rezeptor komplementäre Gruppen am Ligand entworfen werden. Die Ergebnisse der AFMoC-Analyse werden in Form von so genannten Stddev*Koeff-Feldern wiedergegeben. Diese Konturkarten weisen für jeden im Modell verwendeten Atomtyp Räume auf, in denen die An- bzw. Abwesenheit entsprechender Atomtypen die vorhergesagte Aktivität eines hFFAR1-Liganden begünstigt oder erniedrigt. Die Darstellung dieser Positionen für bestimmte Atomtypen ergibt sich hierbei aus dem gewichteten Profil der Deskriptoren aus der *PLS*. So konnten ferner distinkte Bereiche für die An- oder Abwesenheit bestimmter Atomtypen zur Unterstützung des Designs neuer Liganden herangezogen werden. Der Ausgangspunkt für die strukturellen Abänderungen bzw. Erweiterungen waren die potenten hFFAR1-Liganden TUG 469, 501 und 770. Die dabei entworfenen neuartigen Strukturen wurden dann wiederum mit *MOLOC* in der hFFAR1-Bindetasche auf das Templat GW9508 ausgerichtet. Eine Vorhersage der Potenz ($pEC_{50 \text{ pred}}$) dieser neuen Verbindungen erfolgte unter Verwendung des oben erstellten AFMoC-Modells, wobei die aus dem Modell bekannten und gewichteten Potentiale pro Gitterpunkt und Atomtyp verwendet wurden.

4. Ergebnisse

4.1 Testsysteme zur Identifizierung und Charakterisierung möglicher hFFAR1-Liganden

4.1.1 Untersuchungen zur zellulären Signaltransduktion in 1321N1-hFFAR1-Zellen

Wie im Kap. 1.2.2 näher erläutert wurde, wird der hFFAR1 generell als G_q-gekoppelt beschrieben (Feng, 2006; Kebede, 2009). Zudem sind einige Hinweise auf eine G_s- oder eine G_i-Kopplung des hFFAR1-Signals bekannt (Feng, 2006; Schröder, 2010). Ob der hFFAR1 generell mit einer Signaltransduktion über die Adenylatzyklase verbunden ist, konnte aber noch nicht eindeutig belegt werden. Um die am 1321N1-hFFAR1-Zellsystem vorliegenden Signaltransduktionswege nach hFFAR1-Stimulation näher zu untersuchen, wurden einige Inhibitoren zur selektiven Inhibition von Mediatoren in beiden funktionellen Testsystemen (Ca²⁺- und cAMP-Reporter-Gen-Assay) verwendet.

4.1.1.1 Ca²⁺-Signaltransduktionsweg

Zunächst wurde geprüft, ob das von den Testsubstanzen induzierte Calciumsignal an 1321N1-hFFAR1-Zellen auch hFFAR1-vermittelt ist. Hierzu wurden 1321N1-Wildtypzellen mit den bekannten hFFAR1-Agonisten Linolsäure (Briscoe, 2003) und GW9508 (Garrido, 2006) stimuliert (Abb. 30). Das von diesen Verbindungen bei 10 µM hervorgerufene Ca²⁺-Signal am Wildtyp (WT) war gegenüber der Basal- sowie Lösemittel (DMSO)-Kontrolle nicht signifikant verschieden und lag bei etwa 20% des Histamin-induzierten Signals. Analog hierzu erzeugten auch einige ausgewählte Testsubstanzen der TUG-Reihe am Wildtyp keine Effekte, die sich von der Basal- und Lösemittelkontrolle signifikant unterschieden.

4. Ergebnisse

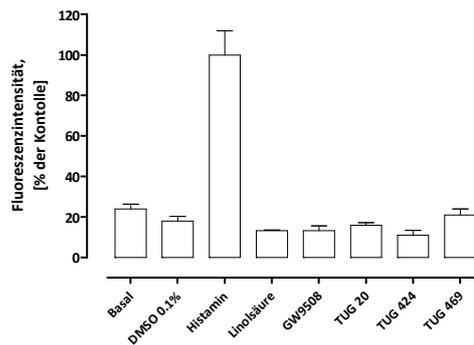


Abbildung 30:

Effekte ausgewählter Verbindungen an 1321N1-WT-Zellen bei 10 μM im Ca^{2+} -Assay. Linolsäure besitzt am hFFAR1 einen EC_{50} von 4,4 μM , GW9508 und alle TUG-Substanzen besitzen am hFFAR1 einen EC_{50} unter 500 nM. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SD aus mind. 3 Messwerten eines repräsentativen Experiments dar. Bei der Kontrolle handelt es sich um das Histamin-induzierte Signal bei 10 μM . Die angeführte Konzentration des Lösemittels (DMSO) von 0,1% entspricht der Konzentration bei Stimulation mit einer Testsubstanz bei 10 μM . Basal meint eine Stimulation mit Assaypuffer.

TUG 20, 424 und 469 erwiesen sich bei der Ca^{2+} -Messung an 1321N1-hFFAR1-Zellen als aktiv (Kap. 4.2.1.1, Abb. 45) und stellen für diese Arbeit relevante Leitstrukturen für die Entwicklung potenter hFFAR1-Agonisten dar. Ob eine Testsubstanz auch an 1321N1-WT-Zellen Ca^{2+} -Signale hervorruft, konnte nicht für alle in dieser Arbeit als hFFAR1-Ligand bezeichneten Verbindungen überprüft werden. Die hier beschriebenen ausgebliebenen Effekte der Leitstrukturen TUG 20, 469 und 424 auf das Ca^{2+} -Signal an den WT-Zellen lassen jedoch vermuten, dass eine hFFAR1-Vermittlung der Ca^{2+} -Signale an den hFFAR1-exprimierenden Zelllinien auch für deren Analoga anzunehmen ist.

Ferner wurde untersucht, ob die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nach hFFAR1-Rezeptorstimulation durch Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} oder aus intrazellulären Speichern stammt. Hierzu wurde die Aktivität des hFFAR1-Agonisten GW9508 in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem Assaypuffer bestimmt (Abb. 31). Abb. 31 A zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven von GW9508 in Abwesenheit von freiem Ca^{2+} und Mg^{2+} bzw. in Anwesenheit von 1 mM des Ca^{2+} -Chelators EDTA.

4. Ergebnisse

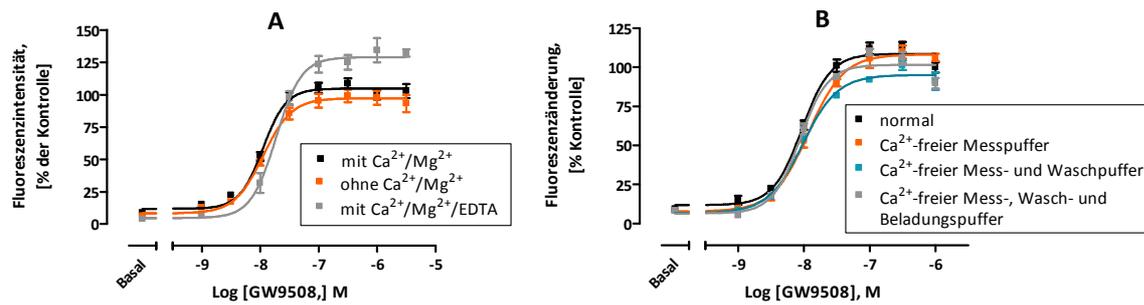


Abbildung 31:

(A) Konzentrations-Effekt-Kurven von GW9508 mit und ohne freies Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie mit 1 mM EDTA. Kontrolle: GW9508 (1 μM)-induziertes Signal aus der Messung mit freiem Ca^{2+} und Mg^{2+} . Die Daten stammen aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten mit je Triplikaten. (B) Konzentrations-Effekt-Kurven von GW9508 bei unterschiedlicher Zellvorbereitung. Kontrolle: GW9508 (1 μM)-induziertes Signal aus der Messung mit unverändertem Protokoll. Die Daten stammen aus einem repräsentativen Experiment mit Triplikaten.

Die Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} hat keine Auswirkung auf die Wirkstärke von GW9508. Der E_{max} -Wert war in Gegenwart von EDTA sogar leicht erhöht. Um sicherzustellen, dass die Zellen während der Vorbereitung beim Ca^{2+} -Assay vollständig Ca^{2+} -freien Bedingungen ausgesetzt sind, wurden zudem Konzentrations-Effekt-Kurven nach unterschiedlichen Zellvorbereitungen betrachtet (Abb. 31 B). Die Zellen wurden bei der Durchführung des Assays dreimal mit Assaypuffer inkubiert (1. Waschschrift, 2. Farbstoffbeladung, 3. Messung). Es zeigt sich auch hier, dass die Abwesenheit von Ca^{2+} im Waschpuffer und Wasch- und Beladungspuffer keine Aktivitätsunterschiede ergibt.

Des Weiteren wurden zwei Calcium-Kanal-Blocker (Nimodipin und Verapamil) eingesetzt, um den Einstrom durch membranständige Ca^{2+} -Kanäle aus dem extrazellulären Raum nach der hFFAR1-Stimulation zu inhibieren (Abb. 32).

4. Ergebnisse

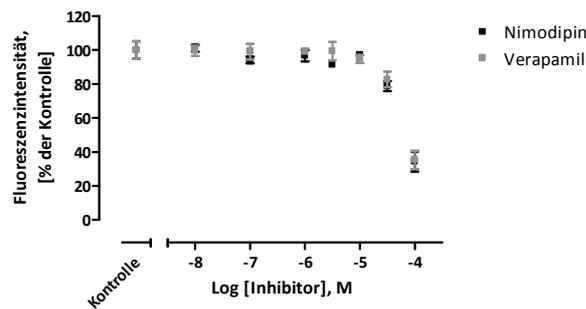


Abbildung 32:

Inhibition des GW9508 (316 nM)-induzierten Signals in Abhängigkeit der Konzentration zweier Ca²⁺-Kanal-Blocker (Verapamil und Nimodipin) an 1321N1-hFFAR1-Zellen. Kontrolle: GW9508 (316 nM)-induziertes Signal ohne Inhibitor. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit je Triplikaten.

Erst ab einer Konzentration von 31,6 μM Calciumkanal-Blocker kommt es zu einer Abnahme des GW9508-induzierten Ca²⁺-Signals. Beide Inhibitoren blocken bei 100 μM das Agonist-induzierte Signal auf etwa 30-40% der Kontrolle. Da eine Blockade von L-Typ-Calciumkanälen durch Nimodipin und Verapamil bereits im nanomolaren bis unteren micromolaren Konzentrationsbereich zu erwarten ist (Cohen, 1987; Kanaide, 1988), hier Effekte aber erst ab 31,6 μM auftreten, deutet dies darauf hin, dass das Ca²⁺-Signal nach hFFAR1-Stimulation unabhängig vom Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellulärraum ist.

Zuletzt fand ein selektiver Phospholipase-C (PLC)-Inhibitor (U73122) Verwendung. Abb. 33 A zeigt die Inhibition des hFFAR1-vermittelten Ca²⁺-Signals durch U73122 mit einem apparenten K_i von 1,8 μM. U73122 zeigte keinen Ca²⁺-freisetzenden Effekt an der Zelllinie bis einschließlich 31,6 μM. Abb. 33 B zeigt den Effekt von 10 und 50 μM U73122 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von GW9508. Bei 10 μM steigt der EC₅₀ von 18 nM auf 43 nM bei gleichem E_{max}, bei 50 μM wird das Signal von GW9508 komplett inhibiert (Abb. 33 B).

4. Ergebnisse

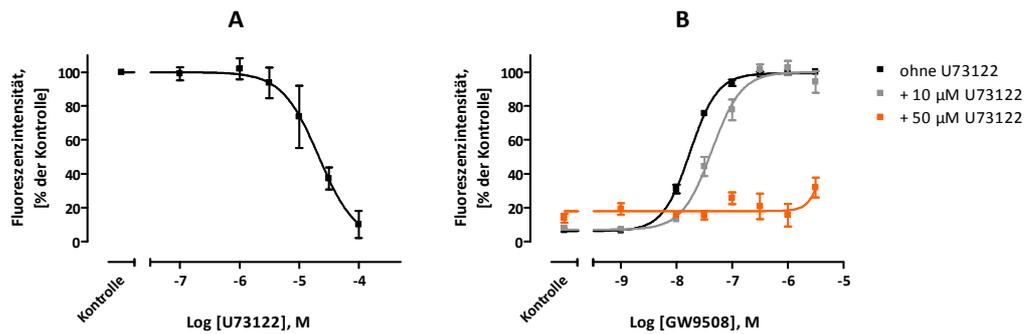


Abbildung 33:

Inhibition des GW9508 (316 nM)-induzierten Signals in Abhängigkeit der Konzentration von U73122 an 1321N1-hFFAR1-Zellen (A). Kontrolle: GW9508 (316 nM)-induziertes Signal ohne U73122. Konzentrations-Effekt-Kurven von GW9508 in Abhängigkeit von U73122 an 1321N1-hFFAR1-Zellen (B). Kontrolle: GW9508 (1 µM)-induziertes Signal ohne U73122. Alle Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je Triplikaten.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die von dem bekannten hFFAR1-Agonisten GW9508 hervorgerufenen Ca^{2+} -Signale an 1321N1-hFFAR1-Zellen durch den hFFAR1 und die PLC vermittelt werden. Die aus der Literatur bekannte $G_{\alpha q}$ -Kopplung des hFFAR1 (Feng, 2006; Kebede, 2009) konnte in dem rekombinanten 1321N1-Zellsystem demnach bestätigt werden. Der Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration als Folge eines Ca^{2+} Einstroms aus dem extrazellulären Raum kann aufgrund der Ergebnisse mit den Calciumkanal-Blockern sowie der Messungen in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium ausgeschlossen werden. Eine intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum ist daher nahe liegend.

4.1.1.2 cAMP-Signaltransduktionsweg

Die Testsubstanzen GW9508, TUG 469 und TUG 770 (alle 1 µM) erzeugten an den 1321N1-hFFAR1-Zellen ein cAMP-Reportergergen-Signal (kurz: cAMP-Signal), dass im Schnitt 39% höher ist als das Signal nach basaler Stimulation mit bloßem Assaypuffer (Abb. 34 A, weiße Balken). Dieser Unterschied war nur für GW9508 signifikant ($p \leq 0,01$), nicht für TUG 469 und TUG 770. In Gegenwart von Forskolin, einem unspezifischen Stimulator der Adenylatzyklase, erzeugten GW9508, TUG 469 und TUG 770 (alle 1 µM) ein cAMP-Signal, das im Schnitt 90% höher als die alleinige Stimulation mit Forskolin war (Abb. 34 A, schwarze Balken). Diese Unterschiede waren für alle drei Testverbindungen signifikant ($p \leq 0,0001$).

4. Ergebnisse

Der hFFAR1-vermittelte Effekt auf das cAMP-Signal ist in Anwesenheit von 10 μM Forskolin damit höher. Um für die Charakterisierung von hFFAR1-Liganden einen möglichst großen hFFAR1-vermittelter Effekt zu gewährleisten, wurden die Testsubstanzen daher stets in Gegenwart von 10 μM Forskolin untersucht. Die durch TUG 469 und TUG 770 (beide 1 μM) induzierten cAMP-Signale an den 1321N1-hFFAR1-Zellen lassen sich ferner nach einer 20-minütigen Präinkubation mit dem kompetitiven hFFAR1-Inhibitor TUG 761 (20 μM) bis auf Kontrollniveau (Basal + 10 μM Forskolin) unterdrücken. Die pharmakologische Charakterisierung des kompetitiven hFFAR1-Inhibitors TUG 761 wird in Kap. 4.2.2 detailliert beschrieben.

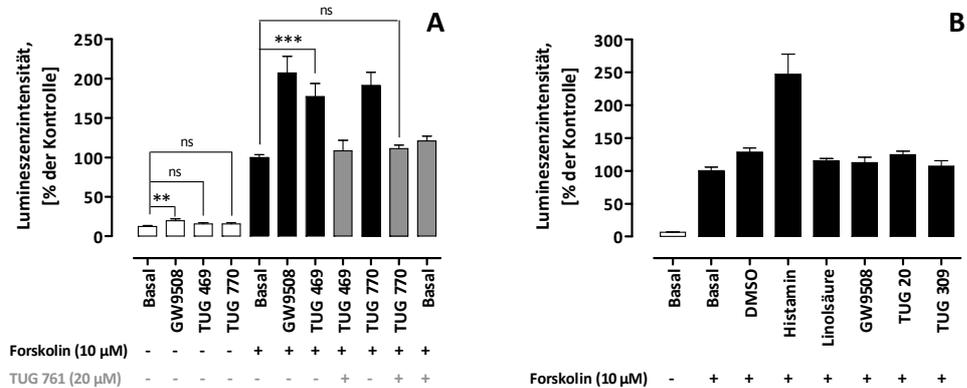


Abbildung 34:

(A) Abhängigkeit des cAMP-Signals von Forskolin (10 μM) und Inhibierung des cAMP-Signals durch den kompetitiven hFFAR1-Inhibitor TUG 761 (20 μM) bei einer Testsubstanzenkonzentration für GW9508, TUG 469 und TUG 770 von 1 μM an 1321N1-FlpIn-hFFAR1-Zellen. Kontrolle: Basalstimulation mit 10 μM Forskolin (Basal: Stimulation mit Assaymedium). Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit mindesten Duplikaten. Signifikanter Unterschied im zweiseitigen ungepaarten T-Test: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$. **(B)** cAMP-Signal an 1321N1-WT-Zellen. Die Stimulation mit den Testsubstanzen (31,6 μM) erfolgte in Gegenwart von 10 μM Forskolin. Kontrolle: Basalstimulation mit 10 μM Forskolin (Basal: Stimulation mit Assaymedium). Die Daten stammen aus einem repräsentativen Experiment mit Triplikaten.

Des Weiteren zeigt die Stimulation des 1321N1-Wildtyps (WT) mit dem hFFAR1-Agonist GW9508 bzw. einigen Leitstrukturen dieser Arbeit (TUG 20 und TUG 309) in Gegenwart von 10 μM Forskolin keinen Effekt auf das cAMP-Signal (siehe Abb. 34 B), der sich signifikant von der DMSO-Kontrolle (ebenfalls + 10 μM Forskolin) unterscheidet. Histamin führt in Gegenwart von Forskolin am WT zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels verglichen mit der Forskolin-Kontrolle.

Eine hFFAR1-Vermittlung des Signals im cAMP-Assay konnte anhand der Kontrollmessung an den WT-Zellen nach Stimulation mit den Standardagonisten GW9508, dem nativen hFFAR1-Agonisten Linolsäure bzw. zwei relevanten Leitverbindungen in dieser Arbeit (TUG 20, TUG 309) nachgewiesen werden. Weiter konnte eine hFFAR1-Inhibierung durch den kompetitiven hFFAR1-Antagonisten TUG 761 die induzierten cAMP-Effekte zweier Testsubstanzen (TUG 469 und TUG 770) bis auf Basalniveau senken. Eine hFFAR1-Vermittlung des cAMP-Signals bei den genannten Testsubstanzen gilt daher als gesichert. Ferner ist eine Forskolin-induzierte Verstärkung des hFFAR1-vermittelten Signals im cAMP-Assay gezeigt worden. Der hFFAR1-Rezeptor bewirkt also eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Daher kann von einer $G_{\alpha s}$ -Kopplung in diesem Zellsystem ausgegangen werden.

4.1.2 Einflüsse auf die Aktivität von hFFAR1-Liganden

4.1.2.1 Bovines Serumalbumin

Serumalbumine besitzen sechs Bindestellen für freie Fettsäuren (Parks, 1983) und können daher auch als Transportproteine für mögliche hFFAR1-Liganden fungieren. Dies würde einen Depoteffekt auf hFFAR1-Liganden haben. Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurde die Aktivität von sechs hFFAR1-Agonisten mit unterschiedlicher chemischer Struktur (Abb. 35) bei unterschiedlichen Konzentrationen an bovinem Serumalbumin (BSA) bestimmt (Abb. 36 und 37).

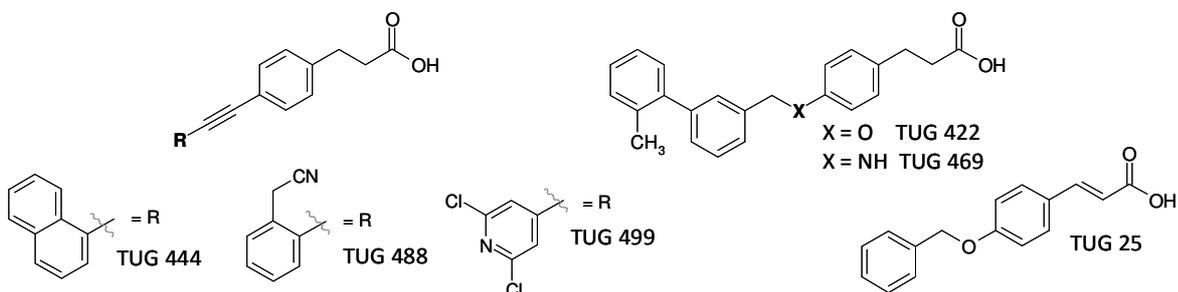


Abbildung 35:

Strukturen der Testsubstanzen, die zur Bestimmung des Effekts von bovinem Serumalbumin auf ihre pharmakologischen Eigenschaften verwendet wurden.

Für diese Experimente wurde ausschließlich fettsäurefreies BSA verwendet, da gebundene freie Fettsäuren zu einer eigenen Rezeptoraktivierung führen würden. Im Hinblick auf einen

4. Ergebnisse

möglichen Einsatz *in vivo* sollen diese Untersuchungen den Effekt von Serumalbumin auf die pharmakologischen Eigenschaften (Wirkstärke, E_{max}) der hFFAR1-Agonisten zeigen.

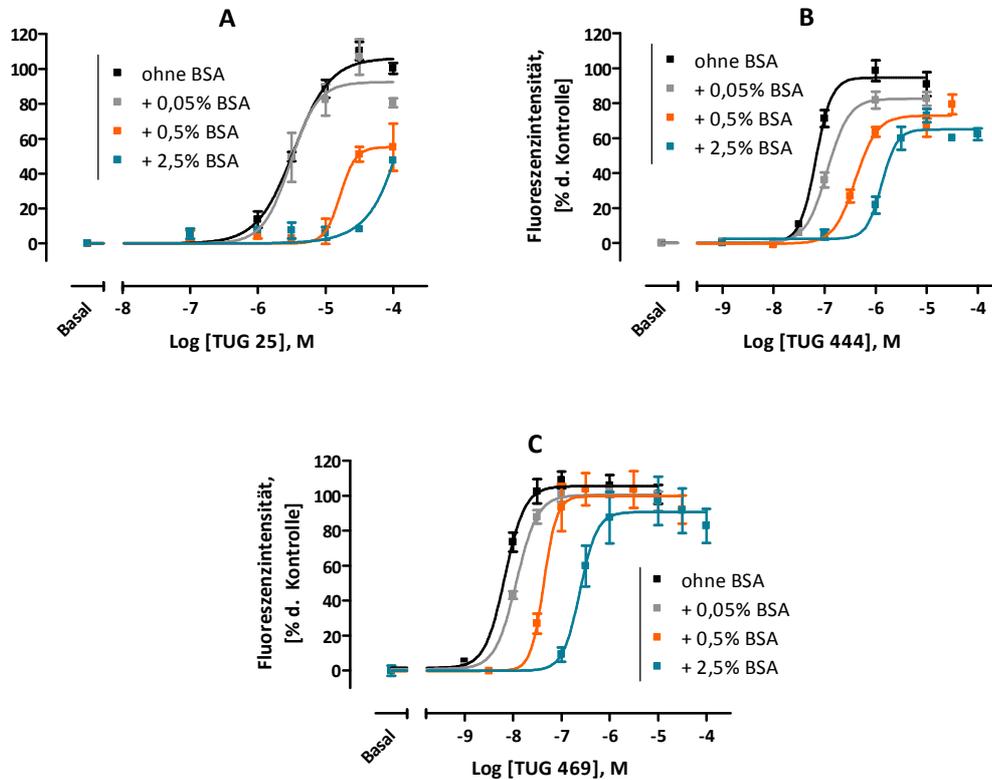


Abbildung 36:

Einfluss von fettsäurefreiem BSA auf die pharmakologischen Eigenschaften von TUG 25, 444 und 469 im Ca^{2+} -Assay an 1321N1-hFFAR1-Zellen (A-C). Die Signale der Stimulation mit Assaypuffer (Basal) wurden für jede BSA-Konzentration von allen übrigen Daten subtrahiert. Kontrolle: TUG 20 (10 μ M)-induziertes Signal. Alle Daten stammen aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten mit je Triplikaten. [BSA] in % (w/v).

Abb. 37 zeigt, dass BSA überwiegend zu einer Reduktion der Wirkstärke aller verwendeten Substanzen führt. Das Zimtsäurederivat TUG 25, die Tolanverbindungen TUG 444, 488 und 499 sowie die Biphenyle TUG 422 und 469 sind sehr lipophile Substanzen. TUG 469 ist eine der potentesten hier untersuchten hFFAR1-Agonisten. Bei einer BSA-Konzentration von 0,05% ist der Effekt von BSA moderat (Abb. 36). Die näher am physiologischen Bereich liegende BSA-Konzentration von 2,5% senkt den pEC_{50} -Wert von TUG 444 und 469 um etwa 1,4-1,5 Log-Einheiten (Abb. 37). TUG 25 verliert bei 2,5% BSA nahezu vollständig die Aktivität (Abb. 36).

4. Ergebnisse

Abb. 37 fasst die Ergebnisse für alle auf den Effekt des BSA getesteten Verbindungen anhand der Wirkstärken zusammen. Die Verminderung der Wirkstärke in Anwesenheit von 0,5% BSA verläuft bei allen Verbindungen ähnlich und beträgt 0,6-0,9 Log-Einheiten.

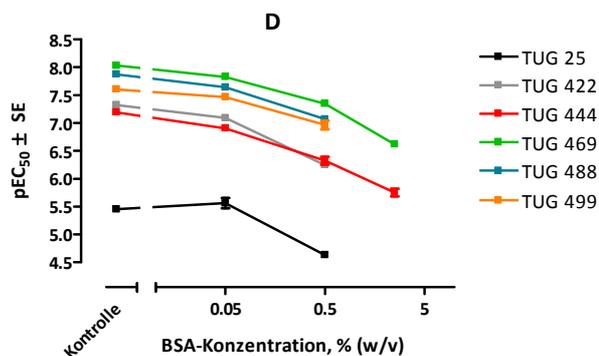


Abbildung 37:

Einfluss von fettsäurefreiem BSA auf die pharmakologischen Eigenschaften von TUG 25, 444 und 469 im Ca^{2+} -Assay an 1321N1-hFFAR1-Zellen sowie für alle untersuchten Verbindungen in Form der Wirkstärke. Die Signale der Stimulation mit Assaypuffer (Basal) wurden für jede BSA-Konzentration von allen übrigen Daten subtrahiert. Kontrolle: TUG 20 (10 μM)-induziertes Signal. Alle Daten stammen aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten mit je Triplikaten.

Die physiologische Albuminkonzentration im Plasma liegt bei 35-50 mg/ml (3,3-4,8%) (Kratz, 2011). Bei den Untersuchungen zum Einfluss von BSA auf die Aktivität von hFFAR1-Liganden wurden jedoch maximal 2,5% BSA verwendet. Eine grobe Einschätzung des Effekts von Albumin auf die Wirkstärke der Verbindungen *in vivo* lassen die Ergebnisse für 2,5 % BSA dennoch zu. So ist davon auszugehen, dass unter physiologischen Bedingungen die Aktivität der Verbindungen um das 30- bis 40-fache abnehmen kann.

In Abb. 37 ist erkennbar, dass 0,05% BSA keinen Einfluss auf die Wirkstärke von TUG 25 hat. Es stellte sich die Frage, ob BSA auch als Lösungsvermittler fungieren kann. Abb. 39 zeigt am Beispiel von TUG 508 und 608 (Abb. 38), dass in einigen Fällen die Gegenwart von 0,05% BSA zu einer Erhöhung der Wirkstärke am hFFAR1 geführt hat.

4. Ergebnisse

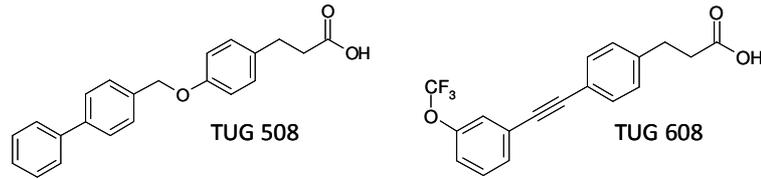


Abbildung 38:

Strukturen von Testsubstanzen TUG 508 und TUG 608, deren Wirkstärke am hFFAR1 unter Verwendung von bovinem Serumalbumin signifikant anstieg.

Der pEC_{50} -Wert für TUG 508 steigt in Gegenwart von 0,05% BSA um mindestens 1,5 Log-Einheiten an, der von TUG 608 um eine Log-Einheit. Bei TUG 604 und 605 wurde dieser Effekt ebenfalls beobachtet (Anhang B2).

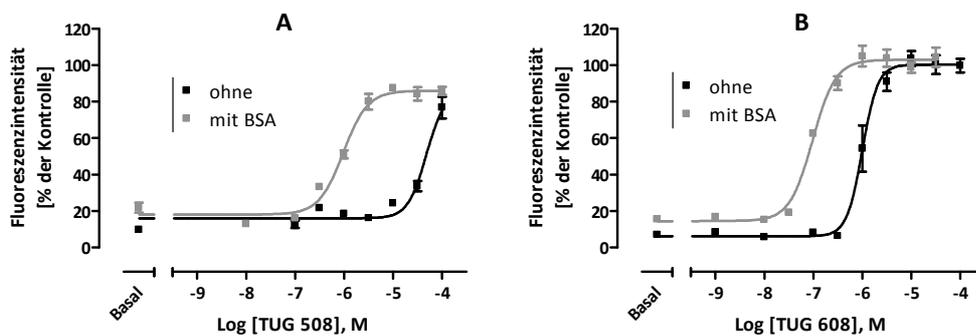


Abbildung 39:

Einfluss von 0,05% (w/v) fettsäurefreiem BSA auf die Aktivität von TUG 608 im Ca^{2+} -Assay an hFFAR1-1321N1-Zellen. Der Eigeneffekt von BSA ist hier in der erhöhten basalen (Assaypuffer-induzierten) Fluoreszenz erkennbar. Kontrolle: TUG 20 (10 μ M)-induziertes Signal ohne BSA. Daten stammen aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten mit je Triplikaten. Aktivitäten (pEC_{50}): (A) < 4,5 (ohne), $6,01 \pm 0,05$ (mit BSA); (B) $6,00 \pm 0,04$ (ohne), $7,02 \pm 0,04$ (mit BSA).

Die Verwendung von 0,05% BSA führte bei der Charakterisierung von Testsubstanzen (Bsp. TUG 422, 444, 469, 488, 499) im Ca^{2+} -Assay in vielen Fällen zu einer moderaten Verminderung der Wirkstärke am hFFAR1 (Abb. 37). Bei anderen Verbindungen (TUG 508 und 608) hingegen konnte die Anwesenheit von 0,05% BSA die Wirkstärke erhöhen (Abb. 39). Generell sind alle Testsubstanzen zunächst in Abwesenheit von BSA charakterisiert worden. Kam es bei einer Testsubstanz zu Löslichkeitsproblemen im Assaypuffer (Trübung oder Niederschlag bei 1 mM) wurde diese in Gegenwart von 0,05% BSA untersucht. BSA besitzt

4. Ergebnisse

im fluoreszenzbasierten Ca^{2+} -Testsystem bei einer Konzentration von 0,05% eine lediglich geringe Eigenfluoreszenz.

4.1.2.2 Polymere Lösungsvermittler

Pluronic® F-127, auch Poloxamer 407 genannt, ist ein nichtionisches Tensid mit einer molekularen Masse von ~ 12500 Dalton. Das Polymer, das aus Verkettungen veretherter Ethylen- und n-Propylenglykole besteht (BASF, 2004), wird oft zur Lösungsvermittlung schwerlöslicher Substanzen verwendet. Es eignet sich auch für die Lösungsvermittlung der hFFAR1-Liganden. Abb. 40 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven zweier schwerlöslicher Testsubstanzen (TUG 26 und TUG 508). Unter Verwendung von Pluronic® F-127 ist eine um mindestens 0,5 Log-Einheiten höhere Wirkstärke dieser Verbindungen zu beobachten.

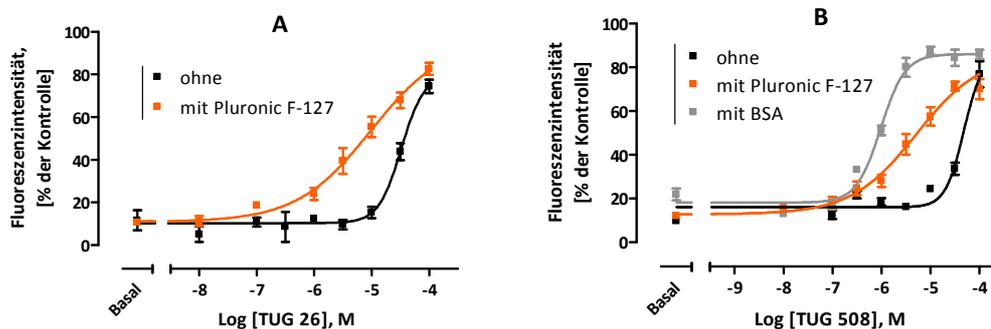


Abbildung 40:

Einfluss von 0,01% (w/v) Pluronic® F-127 auf die Aktivität von TUG 26 (A) und 508 (B) im Ca^{2+} -Assay an hFFAR1 1321N1 Zellen. Ein Eigeneffekt von 0,01% Pluronic® F-127 wurde nicht beobachtet. Kontrolle: 10 μM TUG 20-induziertes Signal. Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je Triplikaten. Aktivitäten als pEC_{50} : (A) $4,49 \pm 0,06$ (ohne), $5,01 \pm 0,28$ (mit Pluronic); (B) $< 4,5$ (ohne), $5,29 \pm 0,08$ (mit Pluronic), $6,01 \pm 0,05$ (mit BSA).

Die Verwendung von 0,05% BSA als Lösungsvermittler bewirkt bei TUG 508 eine weitere Erhöhung der Wirkstärke gegenüber der Verwendung von Pluronic (Abb. 40 B). Pluronic® F-127 zeigt in diesem Testsystem und bei der gewählten Konzentration keine Eigenfluoreszenz und Eigeneffekte an Ca^{2+} -Signal. Diese Eigenschaften machen ihn neben BSA als Lösungsvermittler zu einem geeigneten Mittel, um die physiologisch relevante Wirkstärke schwerlöslicher Substanzen besser einschätzen zu können. Da die Verwendung von 0,05%

4. Ergebnisse

BSA im Vergleich zu 0,01% Pluronic jedoch eine größere Steigerung der Wirkstärke bewirkte (TUG 508), wurden lediglich vier Verbindungen (TUG 26, 27, 28, 29) in Gegenwart von Pluronic F-127 charakterisiert.

4.1.2.3 Variation der Messzeit

Einige Verbindungen unterschieden sich in ihrer Kinetik bezüglich des im 1321N1-hFFAR1-Zellsystem hervorgerufenen Ca^{2+} -Signals. Die schwerlösliche Verbindung TUG 178 (Abb. 41) besitzt einen Log P-Wert von $5,27 \pm 0,40$ (Quelle: ChemSketch) und führte im verwendeten wässrigen Assaypuffer (KHP) zu einer Trübung der Lösung bei 1 mM Substanzkonzentration. Daher ist davon auszugehen, dass sich TUG 178 schlechter im Assaypuffer verteilt und damit langsamer an das Zielprotein diffundiert als eine Substanz mit besseren Löslichkeits-eigenschaften, z. B. TUG 20 (Abb. 41) mit einem Log P-Wert von $3,41 \pm 0,23$ (Quelle: ChemSketch).

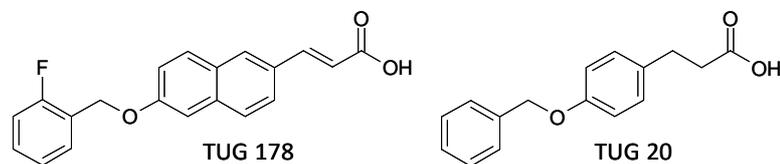


Abbildung 41:

Strukturen von TUG 178 und TUG 20. Die Verbindungen unterscheiden sich in ihrer Kinetik im Bezug auf das Ca^{2+} -Signal.

Für solche schwerlöslichen Verbindungen kann es ausreichen, anstelle der Verwendung von Lösungsvermittlern, wie BSA oder Pluronic® F127 (Kap. 4.1.2.1/4.1.2.2), die Messzeiten nach Substanzinjektion zu verlängern. Abb. 42 zeigt den Messverlauf nach Stimulation mit TUG 20 bzw. TUG 178. Beide Substanzen besitzen eine Wirkstärke am hFFAR1 von unter 1 μM und zeigen bei 10 μM einen maximalen Effekt (Abb. 43). Nach der Injektion von TUG 20 folgt ein sofortiger Fluoreszenzanstieg, der nach etwa 18 Sekunden ein Maximum annimmt und dann wieder absinkt. TUG 178 hingegen induziert erst nach etwa 35-40 Sekunden ein Ca^{2+} -Signal, das ab etwa 80-90 Sekunden ein Maximum erreicht.

4. Ergebnisse

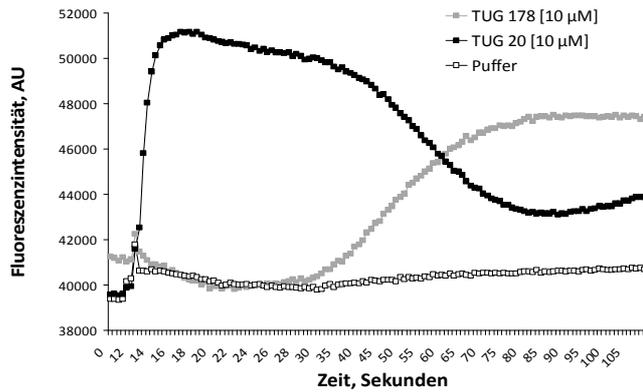


Abbildung 42:

Fluoreszenz-Zeit-Verlauf von TUG 20 und TUG 178 im Ca²⁺-Assay an hFFAR1-1321N1-Zellen. Daten stammen aus einer repräsentativen Einzelmessung. Die Injektion erfolgte bei 12 Sek.

TUG 178 wäre unter Standardmessbedingungen (Messzeit bis 31,6 Sekunden) als inaktiv angesehen worden. Um die Gefahr einer falsch negativen Bezeichnung als hFFAR1-inaktiv von hFFAR1-aktiven Substanzen zu minimieren, wurden Verbindungen, die eine Trübung bei einer Konzentration von 1 mM in Assaypuffer (KHP) erzeugten, bei einer Messzeitverlängerung von bis zu 120 Sekunden nachgetestet. Die Messzeit wurde an den jeweiligen Signalverlauf angepasst, sodass die Ermittlung eines Signalmaximums gewährleistet war.

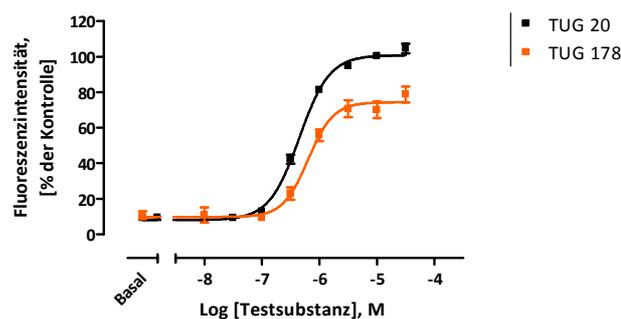


Abbildung 43:

Konzentrations-Effekt-Kurven von TUG 20 und TUG 178 im Ca²⁺-Assay an hFFAR1-1321N1-Zellen. Die Ca²⁺-Signale der Stimulation mit TUG 20 wurden unter Standardmessbedingungen (31,2 Sekunden), mit TUG 178 unter verlängerten Messbedingungen (120 Sekunden) ermittelt. Kontrolle: TUG 20 (10 µM)-induziertes Signal. Daten stammen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten mit je Triplikaten. Aktivitäten als pEC₅₀ ± SEM (E_{max} ± SEM): 6,16 ± 0,06 (74 ± 2) für TUG 178 und 6,37 ± 0,02 (98 ± 1) für TUG 20.

Die Methode der Messzeitverlängerung wurde bei der Charakterisierung der hFFAR1-aktiven Analoga der Naphthylverbindung TUG 178 herangezogen (TUG 29, 379, 380, 381, 419), bei denen ebenfalls verzögerte Calciumsignale beobachtet wurden.

4.1.3 Vortest zur Identifizierung möglicher hFFAR1-Liganden

Testsubstanzen wurden zunächst bei einer Konzentration von 10 μM auf eine Aktivität am hFFAR1 getestet. Diese Vortestung wurde an 1321N1-hFFAR1-Zellen von Euroscreen mit dem Ca^{2+} -Assay durchgeführt. Abb. 44 A und B zeigt beispielhaft die Ergebnisse eines solchen Vortests anhand ausgewählter Verbindungen im Agonistmodus (A) und Antagonistmodus (B). Im Agonistmodus wurde der Effekt einer Testsubstanz als Prozent des Effekts von 10 μM TUG 20 (liegt im E_{max} -Bereich von TUG 20). Testsubstanzen, die im Agonistmodus einen Effekt über 50 % des Kontrolleffekts zeigten, wurden als aktiv im Agonistmodus bezeichnet. Im Antagonistmodus wurden die hFFAR1-Zellen mit 10 μM einer Testsubstanz für 20 min präinkubiert und dann mit einer 5-8-fachen EC_{50} eines hFFAR1-Agonisten (TUG 20 oder GW9508) stimuliert. Wurde im Vergleich zur Kontrolle (hFFAR1-Stimulation ohne eine präinkubierte Substanz) eine Inhibierung des Agonist-induzierten Effekts beobachtet (z.B. TUG 631 oder TUG 761), galt die Testsubstanz als aktiv im Antagonistmodus. Testsubstanzen (wie TUG 761), die im Agonistmodus inaktiv, im Antagonistmodus aktiv waren, wurden als Antagonisten näher charakterisiert (Kap. 4.2.2). Verbindungen, die in beiden Modi eine Aktivität zeigten, wurden im Agonistmodus näher charakterisiert (TUG 469, TUG 501, TUG 770) (Kap. 4.2.1). Substanzen (wie TUG 631), die weder einen Effekt im Agonistmodus zeigten, noch eine signifikante inhibierende Wirkung auf das Agonist-induzierte Signal ausübten, wurden als hFFAR1-inaktiv angesehen. Das Lösemittel für die Testsubstanzen (DMSO) erzeugte bei den verwendeten Konzentrationen in beiden Modi kein stärkeres Signal als die Pufferkontrolle.

4. Ergebnisse

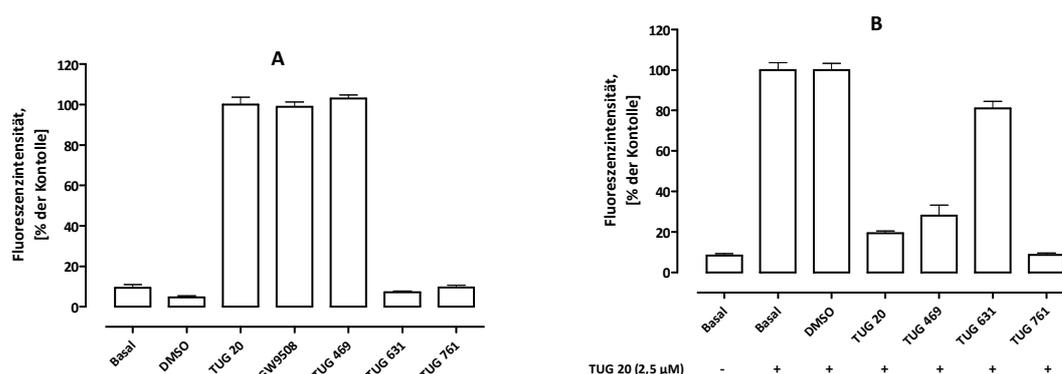


Abbildung 44:

Ergebnisse der Vortests auf eine agonistische Aktivität ausgewählter Verbindungen bei einer Konzentration von 10 µM (A). Kontrolle: TUG 20 (10 µM)-induziertes Signal (A). Ergebnisse der Vortests auf eine antagonistische Aktivität ausgewählter Verbindungen bei einer Konzentration von 10 µM (B). Die Zellen wurden mit den Testsubstanzen bei B 20 Minuten vor Stimulation mit 2,5 µM TUG 20 präinkubiert. Kontrolle: TUG 20 (2,5 µM)-induziertes Signal (B). Alle Daten stellen Mittelwerte \pm SD aus mind. drei Messwerten eines repräsentativen Experiments an hFFAR1-1321N1-Zellen dar. Basal meint Stimulation mit Assaypuffer. Die Konzentration des Lösemittels (DMSO) lag bei 0,1% (entspricht der Konzentration von DMSO bei 10 µM Testsubstanz).

Auf diese Weise wurden über 450 Verbindungen auf eine Aktivität am hFFAR1-Rezeptor getestet. 238 Verbindungen konnten als hFFAR1-Agonisten und 5 als hFFAR1-Antagonisten identifiziert werden. Mit dem cAMP-Assay wurde kein Vortest der Testsubstanzen durchgeführt. Aufgrund des hohen zeitlichen und finanziellen Aufwands wurden im cAMP-Assay nur rund die Hälfte der aus dem Ca^{2+} -Assay als aktive hFFAR1-Liganden hervorgegangenen Verbindungen charakterisiert.

4.2 In vitro-Charakterisierung von hFFAR1-Liganden

Um Testsubstanzen auf eine hFFAR1-Aktivität zu prüfen und diese bei vorhandener Aktivität näher zu charakterisieren, wurde das rekombinante hFFAR1-1321N1-Zellsystem von Euroscreen verwendet. Die hierbei ermittelten pharmakologischen Daten (pEC_{50} , E_{max} , Hillslope) mit beiden verwendeten funktionellen Assaymethoden (Ca^{2+} und cAMP) sind im Anhang B2 und B3 aufgelistet.

4.2.1 hFFAR1-Agonisten

4.2.1.1 Charakterisierung im Ca^{2+} -Assay

Abb. 45 führt beispielhaft die Konzentrations-Effekt-Kurven einiger näher charakterisierter Testsubstanzen, inkl. des Literatur-bekanntes hFFAR1-Liganden GW9508 (Tikhonova, 2007), im Agonistmodus auf. Das DMSO-induzierte Signal zeigt an, welchen Einfluss das bei allen hFFAR1-Liganden verwendete Lösungsmittel auf das rekombinante Zellsystem 1321N1 hat. Bei einer Testsubstanzkonzentration von 100 μM eine Lösemittelkonzentration von 1% vorlag (Kap. 3.2.2.1). DMSO erzeugt erst bei einer Konzentration von 1% ein Fluoreszenzsignal, das auf Höhe von etwa 50% der Kontrolle liegt. Bei einer Konzentration von 0,316% (entsprechen 31,6 μM Testsubstanz) zeigte DMSO keinen Effekt im Vergleich zur Pufferkontrolle. Der Standardagonist GW9508 weist im verwendeten Zellsystem einen pEC_{50} von 7,56 auf und ist damit um 0,4-0,9 Log-Einheiten potenter als Vergleichsuntersuchungen, die einen pEC_{50} von 6,65 (Tikhonova, 2007) bzw. 7,19 (Garrido, 2006) zeigen.

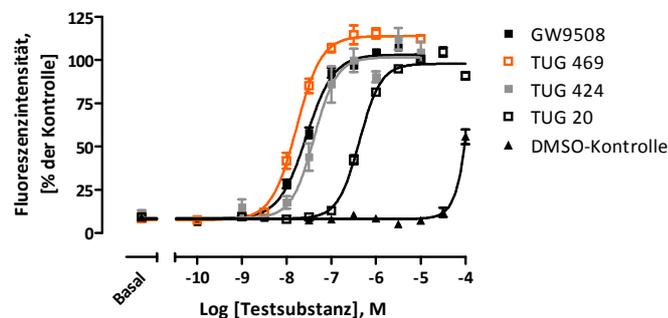


Abbildung 45:

Konzentrations-Effekt-Kurven von hFFAR1-Agonisten am rekombinanten 1321N1 Zellsystem mit dem Ca^{2+} -Assay. Alle Daten stammen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. Kontrolle: TUG 20 (10 μM)-induziertes Signal. DMSO Kontrolle meint das Fluoreszenzsignal, das durch die bei der jeweiligen Testsubstanzkonzentration vorliegende DMSO Konzentration hervorgerufen wird. GW9508 mit $\text{pEC}_{50} = 7,56 \pm 0,02$ ($nH = 1,43 \pm 0,10$; $E_{\text{max}} = 103 \pm 1$), TUG 469 mit $\text{pEC}_{50} = 7,78 \pm 0,03$ ($nH = 1,55 \pm 0,14$; $E_{\text{max}} = 114 \pm 2$), TUG 424 mit $\text{pEC}_{50} = 7,39 \pm 0,07$ ($nH = 1,72 \pm 0,42$; $E_{\text{max}} = 102 \pm 4$), TUG 20 mit $\text{pEC}_{50} = 6,38 \pm 0,02$ ($nH = 1,82 \pm 0,12$; $E_{\text{max}} = 97 \pm 1$).

In dieser Arbeit wurden über 450 Verbindungen auf Aktivität an hFFAR1-überexprimierenden 1321N1-Zellen mit Hilfe eines funktionellen Ca^{2+} -Assays getestet. Diese Verbindungen stammen zum größten Teil aus der Synthesearbeit von Prof. T. Ulven und Mitarbeiter (University of Southern Denmark). Bei dem Vortest auf hFFAR1-Aktivität konnten 238

4. Ergebnisse

Agonisten identifiziert und anhand der Ermittlung ihrer pharmakologischen Daten näher charakterisiert werden. Abb. 46 zeigt die Verteilung der identifizierten hFFAR1-Agonisten im Ca^{2+} -Assay anhand ihrer Wirkstärke.

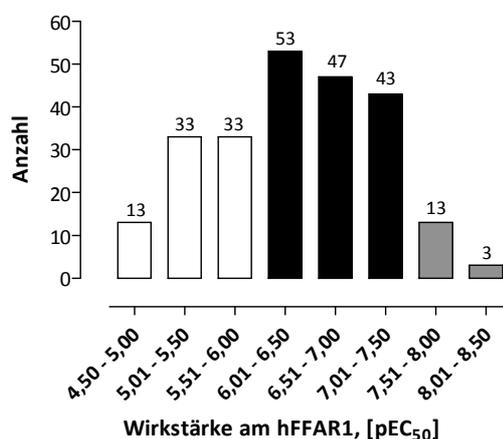


Abbildung 46:

Verteilung der identifizierten hFFAR1-Agonisten im Ca^{2+} -Assay anhand ihrer Wirkstärke am hFFAR1 in pEC_{50} .

79 hFFAR1-Agonisten (33%, weiße Balken) besitzen eine Wirkstärke im micromolaren Konzentrationsbereich (schwach potent). Der überwiegende Teil aller Agonisten (143, 60%, schwarze Balken), weisen eine Wirkstärke im nanomolaren Bereich bis zur Untergrenze von 31,6 nM auf (potent). 13 Verbindungen besitzen einen EC_{50} -Wert zwischen 10 - 31,5 nM (hoch potent). Die Wirkstärke von drei hFFAR1-Agonisten liegt unter 10 nM.

4.2.1.2 Charakterisierung im cAMP-Reportergen-Assay

Die Höhe des hFFAR1-induzierten cAMP-Reportergen-Signals im 1321N1-hFFAR1-Zellsystem (wie auch in den 1321N1-FlpIn-hFFAR1-Zellklonen) ist abhängig von Forskolin (Kap. 4.1.1.2). Daher wurde der cAMP-Assay in Gegenwart von 10 μM Forskolin durchgeführt. Abb. 47 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven der hFFAR1-Agonisten im cAMP-Assay, die auch im vorhergehenden Kapitel unter Verwendung des Ca^{2+} -Assays dargestellt sind (Abb. 45). Das Lösemittel (DMSO) der Testsubstanzen erzeugte lediglich bei einer Testsubstanzkonzentration von 100 μM ein von der Kontrolle signifikant verschiedenes Signal in Höhe von 20%.

4. Ergebnisse

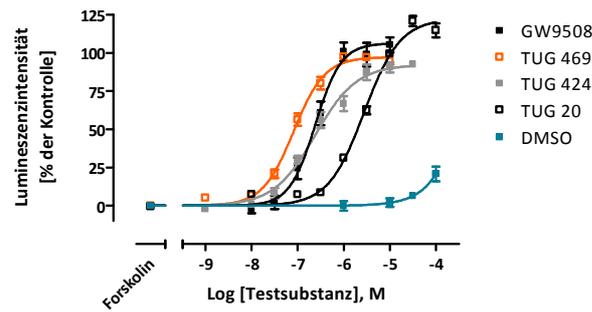


Abbildung 47:

Konzentrations-Effekt-Kurven von hFFAR1-Agonisten an 1321N1-hFFAR1-Zellen mit dem cAMP-Assay in Gegenwart von 10 µM Forskolin. Kontrolle: TUG 20 (10 µM)-induziertes Signal; Forskolin: Forskolin (10 µM)-induziertes Signal ohne Testsubstanz. Das DMSO-induzierte Signal entspricht dem Lösemiteleinfluss bei der entsprechenden dargestellten Testsubstanzkonzentration. Alle Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. GW9508 mit $pEC_{50} = 6,62 \pm 0,05$ ($nH = 1,55 \pm 0,26$; $E_{max} = 106 \pm 4$), TUG 469 mit $pEC_{50} = 7,09 \pm 0,03$ ($nH = 1,29 \pm 0,10$; $E_{max} = 97 \pm 2$), TUG 424 mit $pEC_{50} = 6,62 \pm 0,06$ ($nH = 0,96 \pm 0,11$; $E_{max} = 92 \pm 3$), TUG 20 mit $pEC_{50} = 5,56 \pm 0,03$ ($nH = 1,11 \pm 0,08$; $E_{max} = 122 \pm 3$). E_{max} = max. Effekt in % der Kontrolle; nH = Hillslope.

Aus zeitlichen Gründen sowie aufgrund eines hohen Kostenaufwands konnten im cAMP-Assay nicht alle 238 hFFAR1-Agonisten charakterisiert werden, die im Ca^{2+} -Assay identifiziert wurden. Es wurden lediglich die pharmakologischen Eigenschaften von 115 hFFAR1-Liganden mit Hilfe des cAMP-Assays ermittelt. Abb. 48 zeigt die Verteilung dieser hFFAR1-Agonisten anhand ihrer Wirkstärke. 66 Verbindungen (57%, weiße Balken) besitzen eine Wirkstärke im micromolaren Konzentrationsbereich (schwach potent).

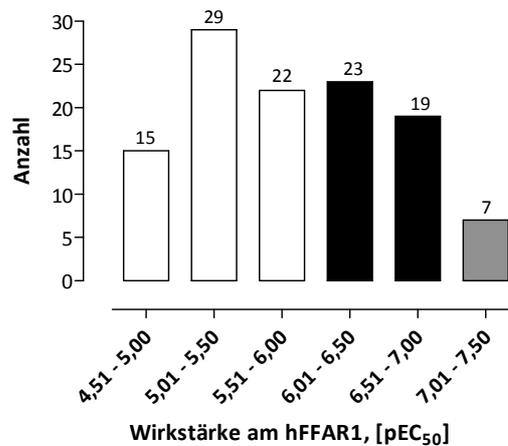


Abbildung 48:

Verteilung der identifizierten hFFAR1-Agonisten im cAMP-Assay anhand ihrer Wirkstärke am hFFAR1 in pEC₅₀.

4. Ergebnisse

42 der 115 Agonisten (37%, schwarze Balken) weisen eine Wirkstärke im nanomolaren Bereich bis zur Untergrenze von 100 nM auf (potent). Die Wirkstärke von 7 hFFAR1-Agonisten liegt unter 100 nM (hoch potent).

4.2.1.3 Korrelation der pharmakologischen Ca^{2+} - und cAMP-Daten

Als nächstes wurde überprüft, ob die Ca^{2+} - und cAMP-Daten korrelieren bzw. ob sich Liganden in ihrer Wirkung am hFFAR1 bezüglich der beiden *Second messenger* unterscheiden. Es sind durchaus Unterschiede bezüglich der Wirkstärke oder des maximalen Effekts denkbar, denn die Einwirkzeit der Liganden auf die hFFAR1-Zellen beträgt im cAMP-Assay 3 Stunden, im Ca^{2+} -Assay nur wenige Sekunden. Abb. 49 A zeigt die Korrelation zwischen den Wirkstärken (pEC_{50}) im Ca^{2+} - und cAMP-Assay für die 115 hFFAR1-Agonisten. Das Bestimmtheitsmaß (r^2) der Regression von 0,75 und der Korrelationskoeffizient (Pearson r) von 0,87 deuten einen guten linearen Zusammenhang der Ca^{2+} - und cAMP-Daten an. Die Steigung der Ausgleichsgerade der Regression beträgt 0,80, die Aktivität der 115 Verbindungen ist daher im Ca^{2+} -Assay im Schnitt größer als im cAMP-Assay. Eine Einteilung der Agonisten in Gruppen ähnlicher chemischer Struktur zeigt Abb. 49 B. Die Steigung der Regressionsgeraden bei beiden großen Substanzgruppen, der klassischen 3-Phenyl-Propionsäure-Gruppe um die Leitstruktur TUG 20 (Abb. 51) und der Ethinylverbindungen um TUG 309 (Abb. 51), unterscheiden sich.

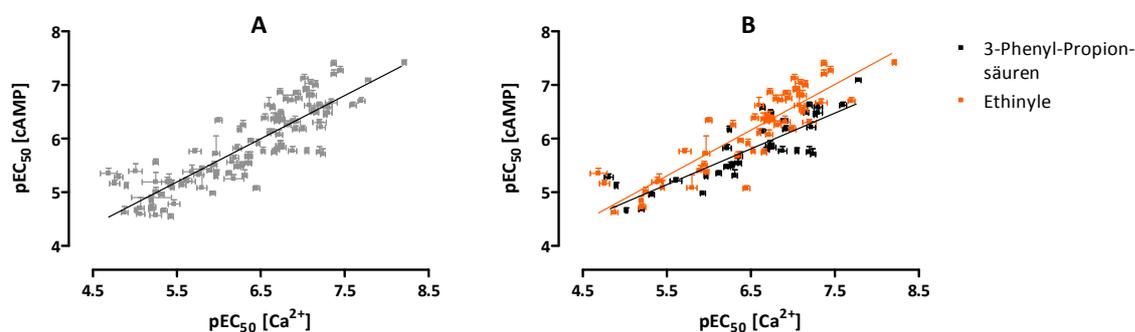


Abbildung 49:

(A) Korrelation der Wirkstärke von 115 hFFAR1-Agonisten im Ca^{2+} - und cAMP- Assay. Steigung der Regressionsgerade = $0,80 \pm 0,04$ (\pm SD); Bestimmtheitsmaß (r^2) = 0,75; Pearson r = 0,87. (B) Korrelation aufgeteilt in Gruppen ähnlicher chemischer Struktur. 3-Phenyl-Propionsäuren: Steigung der Regressionsgerade = $0,67 \pm 0,07$ (\pm SD); r^2 : 0,72; Pearson r = 0,85. Ethinylverbindungen: Steigung der Regressionsgerade = $0,85 \pm 0,06$ (\pm SD); r^2 = 0,79; Pearson r = 0,89.

Die Ethinylverbindungen sind strukturell deutlich rigider und zeigen im Vergleich zu den 3-Phenyl-Propionsäuren eine im Schnitt höhere Aktivität im cAMP-Assay auf. Bei der Betrachtung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der hFFAR1-Agonisten (Kap. 4.2.1.4) wurde ebenfalls zwischen den beiden Substanzklassen unterschieden.

4.2.1.4 Struktur-Wirkungsbeziehungen

4.2.1.4.1 Definierung von Leitstrukturen

Aufgrund der hohen Anzahl identifizierter und charakterisierter hFFAR1-Agonisten in dieser Arbeit (238 Verbindungen), kann hier nur auf die wesentlichen Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) eingegangen werden. Abb. 50 zeigt das grundlegende Strukturgerüst der hFFAR1-Agonisten.

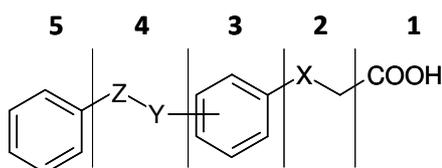


Abbildung 50:

Grundstruktur der in dieser Arbeit charakterisierten hFFAR1-Agonisten mit den Abschnitten 1-5.

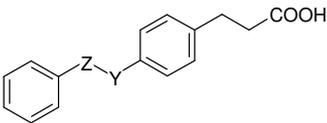
Der Austausch der Carbonsäurefunktion mit einer Amidfunktion führte am Beispiel TUG 20 und TUG 203 bzw. TUG 309 und TUG 631 zu einem Wirkverlust am hFFAR1 (Strukturen und Wirkstärken sind im Anhang B1 und B2 gelistet). Bei der Verknüpfung der Carbonsäurefunktion mit dem Phenylring (Abschnitt 3) ist ein Ethylen-Linker (Abschnitt 2) geeignet. Aus der Arbeit von Garrido et al. war bekannt, dass im Abschnitt 2 ein Methyl- oder Propyl-Linker sowie der Austausch des Benzylmethylens (X) mit Sauerstoff, zu einem Verlust an Wirkstärke führen. Gleiches gilt für die Abwesenheit eines Linkers in diesem Bereich (Garrido, 2006). Das Einbringen eines trans-Ethens als Linker (Zimtsäure), zeigt ebenfalls einen Verlust an Wirkstärke um mindestens das 3-fache (TUG 185 vs. TUG 186; TUG 309 vs. 604; TUG 424 vs. TUG 605; TUG 672 vs. TUG 793; alle Strukturen und Wirkstärken sind im Anhang B1 und B2 gelistet) (Garrido, 2006). Eine para-Verknüpfung am Phenylring in Abschnitt 3 führt zu einer höheren Potenz des Liganden als eine meta-Verknüpfung (TUG 14 vs. TUG 245; TUG 20 vs. TUG 186; siehe Anhang B1 und B2), eine ortho-verknüpfte Verbin-

4. Ergebnisse

ung wurde nicht untersucht. Die in Abschnitt 4 charakterisierten Strukturvariationen sind in Tab. 6 aufgeführt. Das Einbringen eines Sauerstoffs und Stickstoffs an Position Z führt zu niedrigeren, an Position Y zu höheren Wirkstärken am hFFAR1 im Vergleich zur Ethylenverlinkten Verbindung (Abschnitt 4). Eine Verknüpfung der beiden Phenylringe durch einen Sauerstoff bewirkt eine moderate Erniedrigung der Potenz (TUG 742). Die deutlichste Steigerung der Potenz lässt sich mit einer Ethinverlinkung der beiden Phenylringe erreichen (Tolan). Ein Stilbenderivat wurde nicht untersucht, da diese Teilstruktur bei der Gruppe der Acetoxyphenyle zu einem vollständigen Wirkverlust bis 10 μM führte (TUG 376).

Tabelle 6 :

Strukturvariationen im Abschnitt 4 der Grundstruktur von hFFAR1-Agonisten.



Z	Y	Code	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]
-CH ₂ -	-CH ₂ -	TUG 668	5,44 ± 0,04 [116]
-O-	-CH ₂ -	TUG 568	5,20 ± 0,03 [88]
-NH-	-CH ₂ -	TUG 534	4,67 ± 0,01 [101]
-CH₂-	-O-	TUG 20	6,37 ± 0,02 [98]
-CH₂-	-NH-	TUG 495	6,12 ± 0,03 [89]
	-O-	TUG 742	5,51 ± 0,07 [102]
	-C≡C-	TUG 309	6,69 ± 0,03 [105]

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20 (10 μM)-induzierten Signals

Ein Austausch des Phenylrings in Abschnitt 3 durch eine 2,6-substituierte Naphthylgruppe erfolgte bei den Verbindungen TUG 29, 178, 377-381 und 419 (siehe Anhang B1 und B2) und bewirkt im Schnitt eine Reduzierung der hFFAR1-Potenz. Ein Triazol an dieser Stelle bewirkte ein Verlust der Aktivität (TUG 668 vs. TUG 222). Aus den bis dato geschilderten SAR lassen sich zwei erste Leitstrukturen für hFFAR1-Liganden definieren (Abb. 51). Anhand dieser beiden Strukturen werden im Folgenden Variationen der beiden Phenylringe (Abschnitt 3 und 5) vorgestellt.

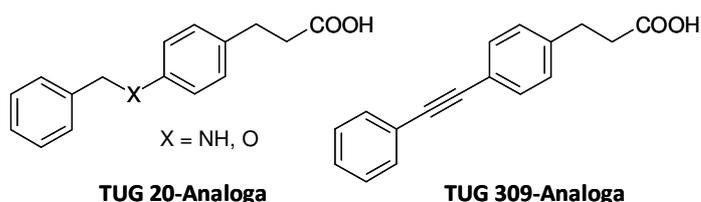


Abbildung 51:

Erste Leitstrukturen für die Entwicklung von hoch-potenten hFFAR1-Agonisten. Die Analoga zu TUG 20 (X=O) bzw. TUG 495 (X = NH) werden im Folgenden TUG 20-Analoga genannt. Tolane sind Ethin-verknüpfte Phenyle.

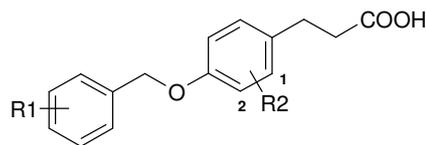
4. Ergebnisse

4.2.1.4.2 TUG 20 als Leitstruktur

Teile der folgenden SAR für die Leitstrukturen TUG 20 und 495 wurden 2010 veröffentlicht (Christiansen, 2010). Dort wurden je zwei Reihen von Derivaten von TUG 20 und TUG 495 miteinander verglichen: Verbindungen mit bzw. ohne Substitution mit einem weiteren Phenylring an R1 (Tab. 7). Es konnte tendenziell festgestellt werden, dass bei Liganden ohne zusätzliche Phenylsubstitution eine Methylenoxy-Verlinkung eine Erhöhung der hFFAR1-Potenz begünstigt. Bei Liganden mit einer Phenylsubstitution begünstigt die Methylenamin-Verlinkung die Potenz. Im Weiteren werden die beiden Leitstrukturen TUG 20 und TUG 495 getrennt behandelt. Tab. 7 zeigt die SAR für die TUG 20-Derivate.

Tabelle 7:

Strukturvariation an der Leitstruktur TUG 20.



Code	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	R1	R2
TUG 20	6,37 ± 0,02 [98]	H	H
TUG 182	6,35 ± 0,04 [99]	2-Br	H
TUG 221	7,05 ± 0,02 [99]	3-Br	H
TUG 21	6,26 ± 0,03 [98]	4-Br	H
TUG 357	6,22 ± 0,05 [103]	3-I	H
TUG 567	7,11 ± 0,04 [99]	3-CF₃	H
TUG 358	6,28 ± 0,02 [102]	3-CN	H
TUG 564	6,24 ± 0,03 [99]	3-NO ₂	H
TUG 563	6,40 ± 0,04 [95]	3-OMe	H
TUG 356	6,20 ± 0,04 [97]	2,3-CH=CHCH=CH	H
TUG 670	5,73 ± 0,04 [97]	2-Ph	H
TUG 420	6,88 ± 0,05 [103]	3-Ph	H
TUG 508	6,04 ± 0,05 [87]	4-Ph	H
TUG 561	5,65 ± 0,03 [98]	4-(2-CN-C ₆ H ₄)	H
TUG 187	7,24 ± 0,02 [98]	3-OPh	H
TUG 509	6,69 ± 0,03 [98]	4-OPh	H
TUG 725	7,12 ± 0,02 [104]	2-F, 5-CF₃	H
TUG 728	6,62 ± 0,02 [96]	2-Cl, 5-CF ₃	H
TUG 726	7,39 ± 0,03 [103]	3-F, 5-CF₃	H
TUG 727	7,34 ± 0,02 [103]	4-F, 5-CF₃	H
TUG 562	6,24 ± 0,03 [98]	3,5-di-OMe	H
TUG 565	5,51 ± 0,02 [108]	3,5-Di-tBut	H
TUG 422	7,30 ± 0,05 [112]	3-(2-Me-C₆H₄)	H
TUG 421	6,92 ± 0,04 [105]	3-(2-MeOC₆H₄)	H
TUG 510	6,31 ± 0,03 [86]	3-(4-Me-C ₆ H ₄)	H
TUG 423	7,30 ± 0,05 [102]	3-(2,6-di-Me-C₆H₃)	H
TUG 179	6,64 ± 0,04 [100]	3-O(3,4-di-Chlor-C ₆ H ₃)	H
TUG 418	4,90 ± 0,02 [81]	H	2-I
TUG 451	5,02 ± 0,01 [81]	3-Oph	2-I

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20 (10 µM)-induzierten Signals

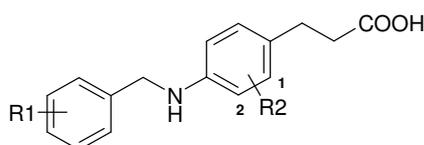
4. Ergebnisse

Bei einer Monosubstitution am terminalen Phenylring führt vor allem eine Halogenierung mit Trifluormethyl und Brom an Position 3 zu einer Steigerung der Wirksamkeit am hFFAR1. Disubstitutionen mit Fluor (TUG 725, 726, 727) erhöhen die Potenz gegenüber TUG 20 um das 10-fache. Iod, Methoxy-, Cyano- und Nitrogruppe an Position 3, sowie der Austausch des Phenylrings durch eine Naphthylgruppe (TUG 356) erhöhen die Potenz nicht. Bei einer Phenyl- od. Phenoxy-Substitution begünstigt ebenfalls Position 3 des terminalen Phenylrings die Potenz (TUG 187, 420). Eine zusätzliche Methylierung in Position 2 bzw. 2,6 des substituierten Phenylrings (TUG 421-423) steigert die Potenz weiter. Eine Iodierung am zentralen Phenylring in Position 2 erniedrigt die Potenz und zudem moderat die Wirksamkeit.

Wie bei TUG 20 führt auch bei TUG 495 eine Halogenierung an Position 3 des terminalen Phenylrings zu einer Potenzsteigerung, jedoch nicht in dem Maße wie bei den TUG 20-Derivaten (Tab. 8). Das Einbringen eines weiteren Phenyl- bzw. Phenoxyrests in Position 3 des terminalen Phenylrings führt jedoch zu einer höheren Steigerung der hFFAR1-Potenz (TUG 475, GW9508) als bei den TUG 20-Derivaten. Der Austausch des zusätzlichen Phenyl-oxyrings bei GW9508 durch einen 2-Pyridinring führt zu einer 10-fach niedrigeren Potenz (TUG 743). Eine weitere Mono- bzw. Dimethylierung des zusätzlichen Phenylrings von TUG 475 erhöht die Wirkstärke um weitere 0,3-0,5 Log-Einheiten (TUG 469 und TUG 738).

Tabelle 8:

Strukturvariation an der Leitstruktur TUG 495.



Code	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	R1	R2
TUG 495	6,12 ± 0,03 [89]	H	H
TUG 471	6,76 ± 0,04 [110]	3-Br	H
TUG 578	6,73 ± 0,05 [96]	3-CF ₃	H
TUG 476	5,97 ± 0,02 [97]	2-Ph	H
TUG 475	7,27 ± 0,02 [101]	3-Ph	H
TUG 502	6,38 ± 0,02 [92]	4-Ph	H
GW9508	7,56 ± 0,04 [110]	3-OPh	H
TUG 501	6,74 ± 0,03 [100]	4-OPh	H
TUG 743	6,56 ± 0,03 [102]	3-O-(2-Pyridin)	H
TUG 472	7,16 ± 0,03 [109]	3-(2-MeOC₆H₄)	H
TUG 469	7,78 ± 0,03 [114]	3-(2-Me-C₆H₄)	H
TUG 500	6,90 ± 0,04 [92]	3-(4-Me-C ₆ H ₄)	H
TUG 738	7,51 ± 0,03 [107]	3-(2,3-di-Me-C₆H₃)	H
TUG 723	7,22 ± 0,05 [98]	3-(2,5-di-Me-C ₆ H ₃)	H

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20 (10 µM)-induzierten Signals

4. Ergebnisse

Als Folge einer β -Oxidation von 3-Propionsäure-Derivaten als FFAR1-Agonisten wurde von Negoro et al. ein Dihydrobenzofuran-Derivat (TAK-875) entworfen und als potenter und selektiv wirkender sowie oral verfügbarer FFAR1-Agonist identifiziert (Negoro, 2010; Sasaki, 2011). Dieser befindet sich derzeit in Phase II der klinischen Studien (Naik, 2011) (Abb. 52).

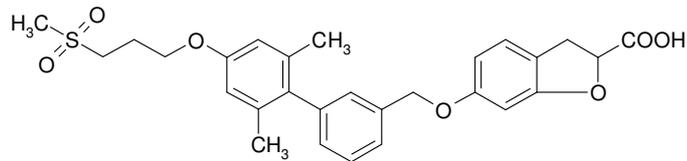


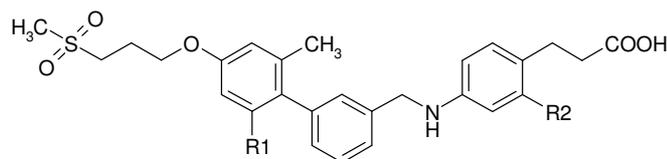
Abbildung 52:

Strukturformel von TAK-875. Das *S*-Enantiomer ($EC_{50} = 14 \text{ nM}$) ist das Eutomer mit einer 10-fach höheren Wirkstärke gegenüber dem *R*-Distomer (Negoro, 2010).

Das racemische Gemisch von TAK-875 konnte in dieser Arbeit am hFFAR1 charakterisiert werden. Ferner konnten einige Verbindungen getestet werden, die die potenzsteigernden Elemente aus der Substanzreihe um TUG 495 (Tab. 8) mit dem Sulfonylrest von TAK-875 vereinen (Tab. 9). Das Methyl-sulfonyl-*n*-propylether-Derivat von TUG 469, Substanz TUG 866 (Tab. 9), führt zu keiner Änderung der Wirkstärke des bis dahin potentesten TUG 469. Das am Terminus dimethylierte Derivat von TUG 866 (TUG 867) besitzt eine ähnliche Wirkstärke wie TUG 866. Über den Zweck des Sulfonylrests lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren, eine Erhöhung der Aktivität am hFFAR1 ist jedoch nicht beobachtet worden. Auch Negoro et al. äußern sich hierzu nicht (Negoro, 2010).

Tabelle 9:

Derivate der Leitstruktur TUG 469 mit dem Methyl-sulfonyl-*n*-propylether-Element des potenten hFFAR1-Agonisten TAK-875* ($pEC_{50}: 7,59 \pm 0,04$; $E_{max}: 91\%$)[#].



Code	$pEC_{50} \pm SEM$ [#] [E_{max} [§]]	R1	R2
TUG 866	$7,76 \pm 0,06$ [98]	H	H
TUG 867	$7,83 \pm 0,04$ [92]	Me	H
TUG 905	$8,04 \pm 0,02$ [102]	H	F

* Racemat, [#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca^{2+} -Assay, [§] in % des TUG 20-induzierten Signals

4. Ergebnisse

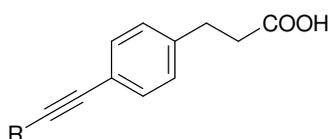
Eine Fluorierung des Phenylrings in ortho-Position zur Propionsäurerest kann die Potenz von TUG 866 jedoch verdoppeln. Als Vorgriff sei hier erwähnt, dass auch eine ähnliche Erhöhung der Wirkstärke am ortho-fluorierten TUG 469-Analogon (TUG 863) beobachtet wurde (Kap. 4.3.4).

4.2.1.4.3 TUG 309 als Leitstruktur

Die Ethinyl-verknüpften Verbindungen um die Leitstruktur TUG 309 sind strukturell rigider als die TUG 20-Analoga und daher als eine eigene Klasse von hFFAR1-Liganden anzusehen. In Tab. 10 werden die grundlegenden Variationen am Grundgerüst dieser Ethinyle dargestellt. Eine Verlängerung des Phenylterminus, ausgehend von der Ethinyleinheit, um ein bzw. zwei Kohlenstoffe erniedrigt die hFFAR1-Potenz (TUG 711, TUG 760). Der Austausch des terminalen Phenylrings mit einem Naphthylrest erhöht die Potenz um das 3-fache (TUG 444); ein isosterer Ersatz durch Heterozyklen (TUG 445, 447, 572 und 575) hingegen führt zu einem Verlust an Wirkstärke, mit Ausnahme des Austauschs mit Thiophen (TUG 576). Hier ist die Aktivität ähnlich wie bei TUG 309.

Tabelle 10:

Grundlegende Strukturvariationen an Ethinyl-verlinkten Verbindungen um TUG 309.



Code	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	R
TUG 309	6,69 ± 0,03 [105]	Ph
TUG 711	5,74 ± 0,07 [128]	2-Ph-Ethyl
TUG 760	6,41 ± 0,03 [103]	2-Ph-Metyl
TUG 444	7,20 ± 0,08 [107]	1-Naphthyl
TUG 445	4,88 ± 0,04 [98]	2-Pyridinyl
TUG 447	5,20 ± 0,02 [96]	3-Pyridinyl
TUG 572	5,39 ± 0,07 [96]	4-Pyridinyl
TUG 575	5,41 ± 0,03 [99]	4-Thiazolyl
TUG 576	6,60 ± 0,05 [97]	2-Thiophenyl
TUG 712	5,30 ± 0,03 [128]	c-Propyl
TUG 715	6,31 ± 0,04 [94]	c-Pentyl
TUG 714	6,29 ± 0,06 [98]	c-Hexyl
TUG 713	6,70 ± 0,05 [100]	c-(1,2-Hexen-yl)
TUG 717	6,38 ± 0,02 [108]	2-Allyl
TUG 757	7,05 ± 0,02 [92]	2-(cis-Buten-yl)
TUG 758	7,25 ± 0,04 [95]	2-(trans-Buten-yl)
TUG 759	7,08 ± 0,03 [105]	2-(3-Me-2,3-buten-yl)

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20 (10 µM)-induzierten Signals

4. Ergebnisse

Der Austausch des terminalen Phenylrings mit zyklischen Alkylen unterschiedlicher Größe (TUG 712, 715 und 714) bewirkt eine Erniedrigung der Potenz, wobei der Cyclohexen-Rest in TUG 713 die Potenz gegenüber der von TUG 309 nicht ändert. Kleine allylische Variationen anstelle des terminalen Phenylrings zeigen eine moderate Erhöhung der Potenz am hFFAR1 (TUG 757 bis 759) mit Ausnahme des Austauschs mit einem unsubstituierten Allylrest (TUG 717). Weiter konnte bei den Derivaten TUG 733 und 734 (Anhang B1 und B2), welche ein Pyridin anstelle des zentralen Phenylrings besitzen, eine Abnahme der Potenz um das 10-fache festgestellt werden (Anhang B2). Letztlich kann nur ein Austausch des terminalen Phenylrings mit einer Naphthyl- bzw. Butenylgruppe die Wirksamkeit am hFFAR1 steigern.

Auf eine detaillierte Darstellung der Variationen von Verbindungen, bei denen der terminale Phenylring durch ein Pyridin (TUG 445, 447 und 572) ersetzt wurde (Christiansen, 2011), wird aufgrund der Fülle an Variationen verzichtet. Zwei Verbindungen aus dieser Reihe sind in Abb. 53 dargestellt. Es hat sich hierbei weiter herausgestellt, dass ein Ersatz mit 4-Pyridin und die Substitution des Pyridinrings mit Chloratomen zu einer Steigerung der Wirkstärke führen. Der Ersatz durch Pyridin ist insofern interessant, als dass sich hierdurch die Lipophilie der Verbindung erniedrigen und eine bessere Löslichkeit durch die basische Gruppe erwarten lässt. Ferner kann von einer erhöhten metabolischen Stabilität ausgegangen werden (Christiansen, 2011).

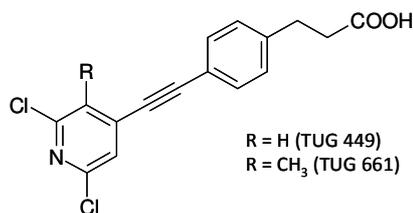


Abbildung 53:

Strukturformeln von potenten Pyridin-substituierten Ethinyl-Derivaten der TUG 309-Serie. $pEC_{50} \pm SEM^{\#}$ [E_{max}^{\S}]: $7,37 \pm 0,03$ [103] für TUG 499, $7,36 \pm 0,04$ [91] für TUG 661.

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca^{2+} -Assay, [§] in % des TUG 20 (10 μ M)-induzierten Signals

Im Folgenden werden die wichtigsten Derivate von TUG 309, die vorwiegend am terminalen Phenylring strukturelle Änderungen aufweisen, in Tab. 11 dargestellt. Eine Fixierung der

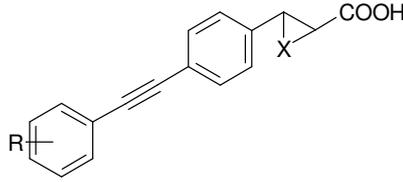
4. Ergebnisse

Propionsäure durch das Einbringen eines cyclo-Propyl-Linkers bringt keinen Vorteil hinsichtlich der Wirkstärke am hFFAR1. In Position 2 des terminalen Phenylrings sind Methyl-, Ethyl-, od. längere Cyanoreste vorteilhaft (TUG 424, 496, 488 und 736), eine Halogenierung bringt im Schnitt keinen Vorteil (TUG 492, 571 und 606). Eine Hydroxylgruppe sowie ein weiterer Phenylring bewirkt einen Abfall der Potenz (TUG 541, 537 und 538). Mit einer Substitution in Position 3 sind generell geringere Steigerungen der Potenz des Liganden zu erreichen gegenüber Position 2. Eine Methoxylierung (TUG 540) erhöht die Wirkstärke. Eine Verlängerung dieser Methoxygruppe mit einem Sulfonylrest (analog zu TAK-875, vgl. Abb. 52) reduziert die Potenz (TUG 741, 768) bzw. ändert diese nicht (TUG 767). Eine Halogenierung dieser Position bringt keinen Vorteil. Eine Nitrogruppe (TUG 450) erhöht, eine Amin- (TUG 462) und eine Hydroxylgruppe (TUG 427 und 474) erniedrigen die Potenz.

4. Ergebnisse

Tabelle 11:

Erweiterte Strukturvariationen von der Leitstruktur TUG 309.



Code	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	R	X
TUG 309	6,69 ± 0,03 [105]	H	-
TUG 493*	6,80 ± 0,03 [108]	H	CH ₂
TUG 424	7,34 ± 0,07 [102]	2-Me	-
TUG 531*	6,86 ± 0,02 [99]	2-Me	CH ₂
TUG 496	7,05 ± 0,03 [101]	2-Et	-
TUG 488	7,70 ± 0,04 [103]	2-CH₂CN	-
TUG 529*	7,45 ± 0,03 [99]	2-CH₂CN	CH₂
TUG 514	6,73 ± 0,04 [101]	2-Acetyl	-
TUG 473	6,66 ± 0,03 [99]	2-OMe	-
TUG 607	6,65 ± 0,03 [106]	2-OCF ₃	-
TUG 736	7,33 ± 0,03 [105]	2-OC₂H₄CN	-
TUG 492	6,82 ± 0,04 [107]	2-Cl	-
TUG 571	7,08 ± 0,06 [99]	2-Br	-
TUG 606	6,47 ± 0,02 [98]	2-CF ₃	-
TUG 541	4,79 ± 0,07 [83]	2-OH	-
TUG 537	6,24 ± 0,02 [111]	2-CH ₂ OH	-
TUG 538	5,69 ± 0,02 [106]	2-C ₂ H ₄ OH	-
TUG 526	6,00 ± 0,02 [91]	2-Ph	-
TUG 425	7,13 ± 0,05 [97]	3-Me	-
TUG 532*	7,03 ± 0,02 [102]	3-Me	CH ₂
TUG 443	6,45 ± 0,04 [95]	3-CHO	-
TUG 570	6,72 ± 0,04 [98]	3-CH ₂ CN	-
TUG 461	6,76 ± 0,03 [101]	3-C≡CH	-
TUG 540	7,15 ± 0,03 [101]	3-OMe	-
TUG 608	6,00 ± 0,04 [100]	3-OCF ₃	-
TUG 544	6,84 ± 0,03 [100]	3-OCH ₂ C=CH	-
TUG 543	7,12 ± 0,02 [98]	3-OCH ₂ C≡C	-
TUG 737	6,58 ± 0,03 [105]	3-OC ₂ H ₄ CN	-
TUG 542	6,28 ± 0,03 [93]	3-OCH ₂ Ph	-
TUG 767	6,84 ± 0,03 [102]	3-OC ₂ H ₄ SO ₂ Me	-
TUG 741	6,09 ± 0,03 [100]	3-OC ₃ H ₆ SO ₂ Me	-
TUG 768	6,37 ± 0,03 [106]	3-OC ₄ H ₈ SO ₂ Me	-
TUG 460	6,95 ± 0,04 [101]	3-CF ₃	-
TUG 449	6,60 ± 0,02 [100]	3-CN	-
TUG 450	7,00 ± 0,04 [95]	3-NO ₂	-
TUG 462	5,98 ± 0,02 [97]	3-NH ₂	-
TUG 474	6,35 ± 0,04 [103]	3-OH	-
TUG 427	5,80 ± 0,06 [101]	3-CH ₂ OH	-
TUG 426	6,55 ± 0,04 [109]	4-Me	-
TUG 533*	6,51 ± 0,02 [107]	4-Me	CH ₂
TUG 619	6,10 ± 0,02 [100]	4-Acetyl	-
TUG 621	6,28 ± 0,05 [96]	4-F	-
TUG 458	6,93 ± 0,04 [107]	2,3-di-Me	-
TUG 497	6,91 ± 0,06 [102]	2,5-di-Me	-
TUG 491	6,38 ± 0,03 [103]	2,6-di-Me	-
TUG 459	7,08 ± 0,03 [102]	3,5-di-Me	-
TUG 730	7,40 ± 0,03 [105]	2-Me, 5-CN	-
TUG 731	6,33 ± 0,02 [103]	2-CN, 5-Me	-
TUG 732	6,86 ± 0,02 [103]	2-Me, 4-Cl	-

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20 (10 µM)-induzierten Signals, * Racemat

In Position 4 ist eine Methylierung nicht von Vorteil (TUG 426). Dimethylierte Derivate (TUG 458, 459, 497 und 491) sind nicht potenter als TUG 424. Eine zusätzliche Cyanogruppe an TUG 424 macht die Verbindung ähnlich potent (TUG 730). Letztlich ist anhand der hier

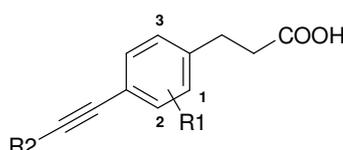
4. Ergebnisse

gezeigten Daten eine Substitution des terminalen Phenylrings vor allem in Position 2 mit einer Cyanomethyl-, Methyl- od. Methoxygruppe geeignet zur Steigerung der Wirkstärke. Vor allem der Ligand TUG 488 bringt eine Verzehnfachung der Potenz mit sich.

Eine Fluorierung des zentralen Phenylrings in ortho-Position des Propionsäurerests ist von einem potenten hFFAR1-Agonisten bekannt (Negoro, 2010). Wird dieses Motiv auf TUG 309-Analoga übertragen (Tab. 12), so führt dies ebenfalls zu einer Steigerung der Potenz, und zwar um das 6-fache (TUG 735) gegenüber der Leitstruktur TUG 309. Eine Fluorierung in meta-Position bzw. eine Difluorierung in den ortho-Positionen ergibt nur eine moderate Steigerung (TUG 774 und 773).

Tabelle 12:

Einfluss des Fluorsubstituenten in ortho-Position der Propionsäure von TUG 309-Analoga.



Code	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	R1	R2
TUG 309	6,69 ± 0,03 [105]	H	Ph
TUG 735	7,48 ± 0,05 [100]	1-F	Ph
TUG 774	6,84 ± 0,02 [100]	2-F	Ph
TUG 773	6,85 ± 0,02 [108]	1,3-di-F	Ph
TUG 769	7,48 ± 0,03 [107]	1-F	2-Me-Ph
TUG 770	8,21 ± 0,02 [112]	1-F	2-CH ₂ CN-Ph
TUG 771	7,77 ± 0,03 [104]	1-F	(2-Me,5-CN)-Ph
TUG 772	7,09 ± 0,04 [106]	1-F	2-Buten-yl

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20 (10 µM)-induzierten Signals

Werden die potenzsteigernden Substituenten aus Tab. 11 (TUG 424, 488, 730) mit dem Fluor in meta-Position der Propionsäure kombiniert, führt dies zu einer weiteren Steigerung der Wirkstärke (TUG 769 bis 771). Insbesondere das TUG 488-Analogon (TUG 770) besitzt eine Wirkstärke im einstelligen nanomolaren Bereich. TUG 770 ist damit die potenteste, in dieser Arbeit charakterisierte Verbindung am hFFA1-Rezeptor.

4.2.2 hFFAR1-Antagonisten

4.2.2.1 Charakterisierung im Ca^{2+} -Assay

Es wurden in dieser Arbeit fünf Antagonisten, von denen zwei bereits von Humphries et al. als hFFAR1-Antagonisten (TUG 762 und 763) beschrieben wurden (Humphries, 2009), identifiziert. Bei der Grundstruktur dieser Verbindungen handelt es sich um das 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-1-on. Abb. 54 zeigt Konzentrations-Inhibitions-Kurven der drei in dieser Arbeit entdeckten Antagonisten (TUG 761, 764 und 765) und der beiden Vergleichssubstanzen von Humphries et al. (TUG 762, 763). Die Präinkubation der hFFAR1-Zellen mit diesen fünf Antagonisten führte in allen Fällen zu einer Inhibierung des GW9508-induzierten Signals bis auf Basalniveau (Abb. 54, vgl. I_{max} -Werte im Anhang B3). Alle fünf Antagonisten zeigten bis zu einer Konzentration von 31,6 μ M keinen agonistischen Effekt am hFFAR1 (Anhang B2).

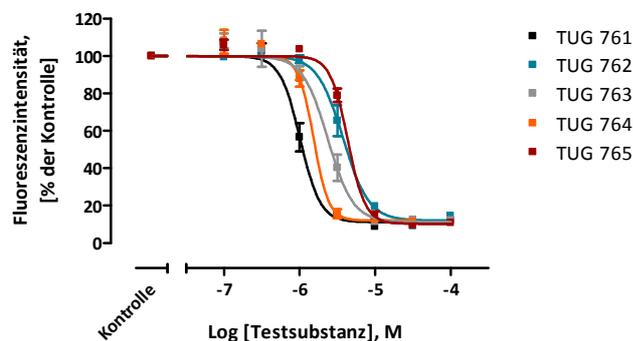


Abbildung 54:

Inhibierung des GW9508 (200 nM)-induzierten Ca^{2+} -Signals durch die hFFAR1-Antagonisten TUG 761 bis 765 an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca^{2+} -Assay. Kontrolle: GW9508 (200 nM)-induziertes Signal. Die Zellen wurden mit dem Antagonist 20 Minuten vor Stimulation mit dem hFFAR1-Agonist (GW9508) präinkubiert. Alle Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. pIC_{50} - und pK_i -Werte der Antagonisten sind in Tab. 13 aufgeführt.

Tab. 13 zeigt die Struktur und die pharmakologischen Daten der Antagonisten. Die apparenten pK_i -Werte wurden anhand der Gleichung von Cheng und Prusoff (Cheng und Prusoff, 1973) aus den IC_{50} -Werten bestimmt. TUG 761 und TUG 764 besitzen einen apparenten pK_i -Wert von 7,01 bzw. 6,83 und sind damit moderat potenter als die beiden Vergleichssubstanzen TUG 762 und TUG 763 von Humphries et al.

4. Ergebnisse

Tabelle 13:

Struktur und pharmakologische Daten der Antagonisten mit 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-1-on-Struktur.

Code	R1	R2	pIC ₅₀ [#] (± SE)	pK _i [§] (± SD)
TUG 761	-O-Ph	-C ₃ H ₇	5,99 (0,02)	7,01 (0,02)
TUG 762 [§]	-O-Ph	-C ₂ H ₅	5,42 (0,04)	6,44 (0,04)
TUG 763 [§]	-O-Ph	-CH ₂ (c-propyl)	5,62 (0,03)	6,64 (0,04)
TUG 764	-C≡C-Ph	-C ₃ H ₇	5,81 (0,06)	6,83 (0,06)
TUG 765	-O-Ph	-CH ₂ C≡CH	5,36 (0,03)	6,38 (0,03)

[§] bekannt von Humphries et al. (Humphries, 2009), [#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen gegen 200 nM GW9508 im Ca²⁺-Assay bei einer Präinkubationszeit von 20 Minuten, [§] der apparente pK_i-Wert wurde bestimmt nach Cheng-Prusoff (Cheng und Prusoff, 1973).

TUG 761 und TUG 764 wurden ferner einer Schild-Analyse unterzogen (Arunlakshana und Schild, 1959), um die Art ihres inhibitorischen Effekts zu ermitteln. Abb. 55 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven von GW9508 jeweils mit Präinkubation der Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen des Antagonisten.

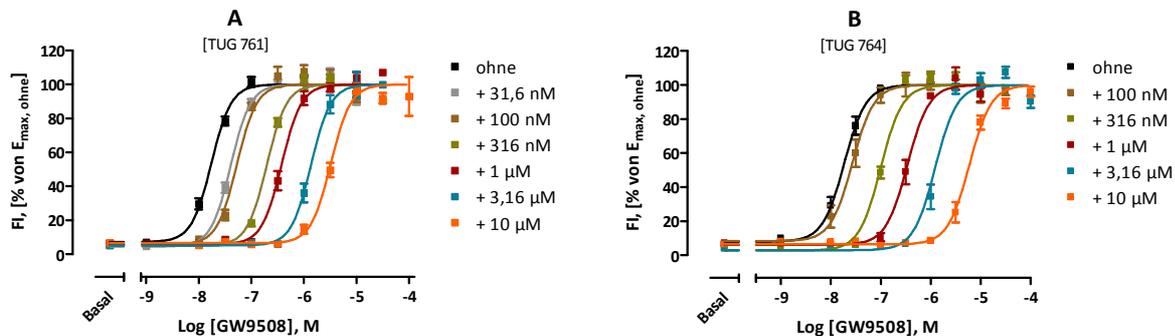


Abbildung 55:

Konzentrations-Effekt-Kurven von GW9508 mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen von TUG 761 (A) bzw. TUG 764 (B), aufgenommen an hFFAR1-1321N1 Zellen im Ca²⁺-Assay. Das obere Plateau aller Kurven wurde auf 100% fixiert, da es sich nicht signifikant von 100% unterschied. Der Hillslope der Kurven unter A wurde auf 2,3 bzw. unter B auf 2,0 fixiert, da sich dieser nicht signifikant vom jeweiligen fixierten Wert unterschied. Alle dargestellten Werte stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. FI = Fluoreszenzintensität. E_{max, ohne} = maximaler Effekt von GW9508 ohne Inhibitor. Wirkstärken als pEC₅₀ ± SE (Konzentration des Inhibitors): (A) 7,76 ± 0,02 (ohne), 7,39 ± 0,02 (31,6 µM), 7,27 ± 0,03 (100 nM), 6,70 ± 0,02 (316 nM), 6,42 ± 0,02 (1 µM), 5,86 ± 0,03 (3,16 µM), 5,49 ± 0,02 (10 µM); (B) 7,73 ± 0,03 (ohne), 7,57 ± 0,05 (100 nM), 7,00 ± 0,03 (316 nM), 6,47 ± 0,03 (1 µM), 5,91 ± 0,04 (3,16 µM), 5,23 ± 0,03 (10 µM).

4. Ergebnisse

Die Wirkstärke von GW9508 wird in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration vermindert (Rechtsverschiebung). Der in Abwesenheit des Inhibitors ermittelte maximale Effekt des Agonisten wird auch in Anwesenheit des Inhibitors erreicht (die oberen Plateaus waren nicht signifikant von 100% verschieden). Diese Beobachtung lässt einen ersten Rückschluss auf eine kompetitive Inhibierung des GW9508-induzierten Effekts durch TUG 761 und TUG 764 zu. Abb. 56 zeigt die Ergebnisse der Schild-Analyse für beide Antagonisten.

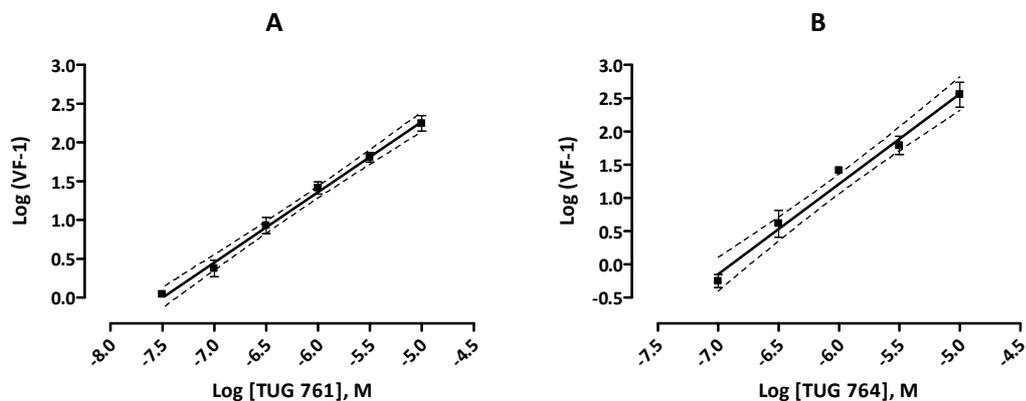


Abbildung 56:

Schild-Plot der hFFAR1-Antagonisten TUG 761 (A) und 764 (B) (Arunlakshana und Schild, 1959). TUG 761: Abszissenschnittpunkt (\pm SD) = $7,50 \pm 0,09$, Steigung (\pm SD) = $0,91 \pm 0,04$, $r^2 = 0,975$; TUG 764: Abszissenschnittpunkt = $6,89 \pm 0,12$, Steigung = $1,36 \pm 0,10$, $r^2 = 0,950$. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Bereich des Col (95%). Alle Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten.

Das Konfidenzintervall (Col) für die Steigung beider Geraden (Col: 0,82 bis 0,99 bei TUG 761; 1,15 bis 1,56 bei TUG 764) schließt den Wert 1 nur knapp nicht mit ein. Diese Bedingung muss beim Vorliegen einer kompetitiven Inhibierung jedoch gegeben sein. Die ermittelten Abszissenschnittpunkte sind daher streng genommen keine pA_2 -Werte und daher nur bedingt zur Interpretation der Art der Inhibierung geeignet. Handelt es sich um kompetitive Antagonisten, entspricht der pA_2 -Wert der Bindungskonstante pK_b des Antagonisten. Dieser pK_b -Wert lässt sich alternativ zur Schild-Analyse mit einer Auftragung nach Lew und Angus bestimmen (Lew und Angus, 1995). Hierbei wird eine nichtlineare Regression zwischen den apparenten pEC_{50} -Werten des Agonisten GW9508 bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen und den entsprechenden Konzentrationen des Inhibitors durchgeführt (Abb. 57).

4. Ergebnisse

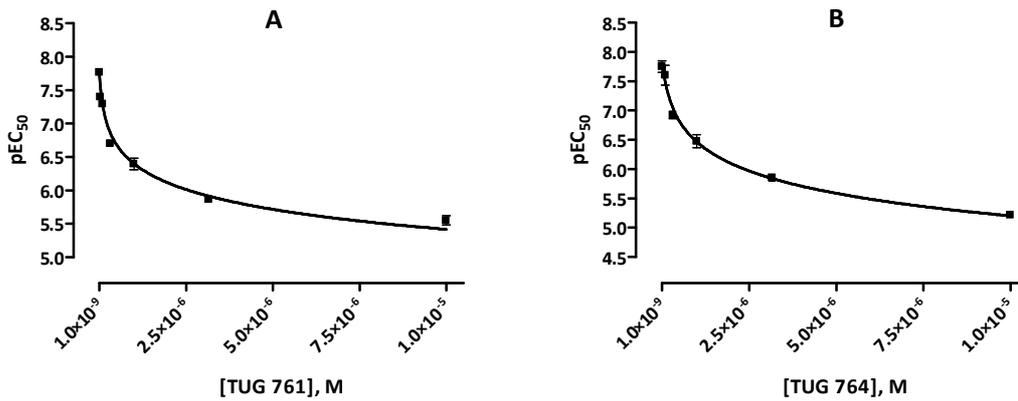


Abbildung 57:

Nicht-lineare Regression nach Lew und Angus zur Bestimmung des pK_b -Werts der hFFAR1-Antagonisten TUG 761 und TUG 764 (Lew und Angus, 1995). $pK_b \pm SE$, r^2 : (A, TUG 761) $7,33 \pm 0,07$, $0,978$ (Steigung nicht signifikant vom Wert 1 verschieden) und (B, TUG 764) $7,01 \pm 0,13$, $0,970$ (Steigung: 1,28; Col: 1,09 bis 1,48). Alle Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten.

Die ermittelten pK_b -Werte nach Lew und Angus liegen für TUG 761 bei 7,33 und für TUG 764 bei 7,01. Die Steigung bei TUG 761 ist nicht signifikant verschieden vom Wert 1, bei TUG 764 schließt das Konfidenzintervall der Steigung den Wert 1 nicht mit ein (1,09 bis 1,48). Der Clark-Plot für TUG 761 und TUG 764 ist in Abb. 58 dargestellt. Die Steigung im Clark-Plot unterscheidet sich bei TUG 761 nicht signifikant vom Wert -1, bei TUG 764 ist die Steigung signifikant verschieden vom Wert 1.

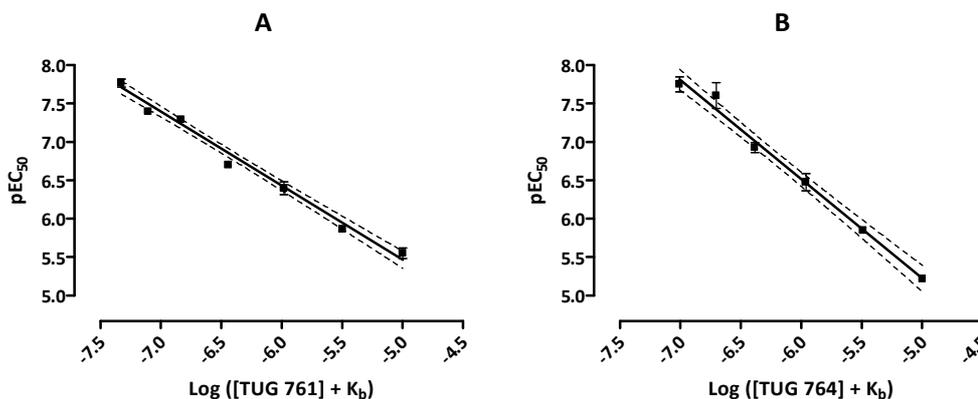


Abbildung 58:

Clark-Plot für die Antagonisten TUG 761 (A) und TUG 764 (B). TUG 761: Steigung $\pm SD$ (Col) = $-0,96 \pm 0,03$ (-1,03 bis -0,89), $r^2 = 0,980$; TUG 764: Steigung $\pm SD$ (Col) = $-1,29 \pm 0,06$ (-1,41 bis -1,17), $r^2 = 0,967$. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Bereich des Col (95%). Alle Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten.

4. Ergebnisse

Somit kann ausgehend von der Auftragung nach Lew und Angus auf eine kompetitive Inhibition durch TUG 761, jedoch nicht für TUG 764, geschlossen werden.

Die Schild-Analyse ergab bei TUG 761 eine Steigung, die den Wert 1 nur knapp nicht mit einschließt, die Auftragung nach Lew und Angus zeigte, dass die Steigung nicht signifikant von 1 verschieden ist. Da es bei der Auftragung nach Lew und Angus im Vergleich zur Schild-Analyse nicht zu einer Überbewertung der EC_{50} -Werte ohne Inhibitor kommt, ist diese bevorzugt zu verwenden. TUG 761 kann demnach als ein kompetitiver Inhibitor des hFFAR1-vermittelten Signals im Ca^{2+} -Assay mit einem pK_i von 7,01 ($\pm 0,02$), einem pA_2 von 7,50 ($\pm 0,09$) und einem pK_b von 7,33 ($\pm 0,07$) bezeichnet werden. Sowohl Schild-Analyse als auch die nicht-lineare Auftragung nach Lew und Angus ergaben bei TUG 764 eine Steigung, die signifikant vom Wert 1 verschieden ist. TUG 764 kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht als kompetitiver Inhibitor bezeichnet werden.

4.2.2.2 Charakterisierung im cAMP-Reporter-Gen-Assay

Die im Ca^{2+} -Assay als kompetitive Antagonisten identifizierten Substanzen TUG 761 und TUG 764 wurden auch über den cAMP-Signalweg charakterisiert. Bei steigender Konzentration der jeweiligen Antagonisten trat sowohl eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve des Agonisten GW9508 als auch eine Reduktion des maximalen Effekts von GW9508 auf (Abb. 59 A und B). Beide Verbindungen zeigen im cAMP-Assay also ebenfalls eine inhibierende Wirkung. Im Agonistmodus bewirken TUG 761 und TUG 764 eine Erniedrigung des Forskolin-induzierten Signals (Abb. 59 C), die ab einer Konzentration von 31,6 μM signifikant verschieden vom Forskolinsignal und mit 30-35% maximal ist. Bezieht man den Lösemittelleffekt auf das Forskolinsignal (Abb. 59 C) mit ein, ist eine maximale Reduktion des Forskolinsignals durch TUG 761 und TUG 764 um 50 - 55% anzunehmen. Eine mögliche Erklärung für die Reduktion des Forskolin-induzierten Signals durch TUG 761 und TUG 764 wäre ein invers-agonistisches Profil dieser Antagonisten. Ein Beweis hierfür konnte jedoch nicht erbracht werden.

4. Ergebnisse

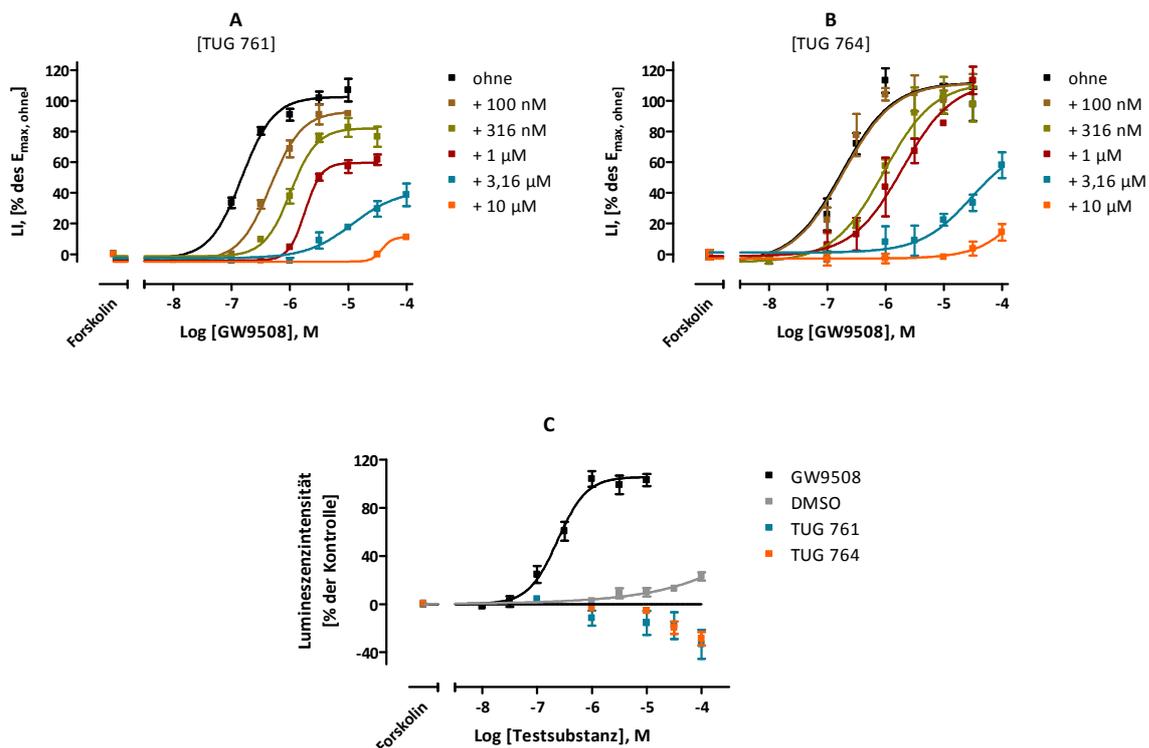


Abbildung 59:

Konzentrations-Effekt-Kurven des hFFAR1-Agonists GW9508, TUG 761 und TUG 764 in Gegenwart von 10 µM Forskolin im cAMP-Assay an hFFAR1-1321N1-Zellen. TUG 761 (A) und TUG 764 (B) wurden 20 Minuten vor der Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von GW9508 (+ 10 µM Forskolin) präinkubiert. LI = Lumineszenzintensität. $E_{\max, \text{ohne}}$ = maximaler Effekt von GW9508 ohne Inhibitor. Wirkstärken als $pEC_{50} \pm SE$ (Konzentration des Inhibitors): (A) $6,83 \pm 0,02$ (ohne), $6,33 \pm 0,05$ (100 nM), $5,99 \pm 0,04$ (316 nM), $5,74 \pm 0,04$ (1 µM), $4,93 \pm 0,23$ (3,16 µM); (B) $6,75 \pm 0,13$ (ohne), $6,73 \pm 0,12$ (100 nM), $6,03 \pm 0,12$ (316 nM), $5,71 \pm 0,15$ (1 µM), $4,52 \pm 0,26$ (3,16 µM). (C) Effekt von TUG 761 und TUG 764 im Vergleich zum Lösemittel (DMSO)- bzw. GW9508-induzierten Effekt in Gegenwart von 10 µM Forskolin. Kontrolle: TUG 20-induzierter Effekt bei 10 µM. Alle Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten (jeweils in Duplikaten bestimmt).

Um die Art der Inhibierung des GW9508-induzierten Signals durch TUG 761 und TUG 764 näher zu bestimmen, wurden die Wirkstärken aus Abb. 59 A und B für eine Schild-Analyse verwendet (Abb. 60 A und B). Eine Fixierung der Konzentrations-Effekt-Kurven von GW9508 in Abhängigkeit von TUG 761 respektive TUG 764 auf einen konstanten E_{\max} wurde hierbei nicht vorgenommen. Daher blieb der Effekt (Reduzierung) der Inhibitoren auf den E_{\max} -Wert der GW9508-Stimulation unberücksichtigt. Ferner wurde auf eine Verwendung der Wirkstärke von GW9508 bei einer Inhibitorkonzentration von 10 µM verzichtet, da diese Wirkstärke aufgrund der Datenlage nicht eindeutig zu bestimmen war.

4. Ergebnisse

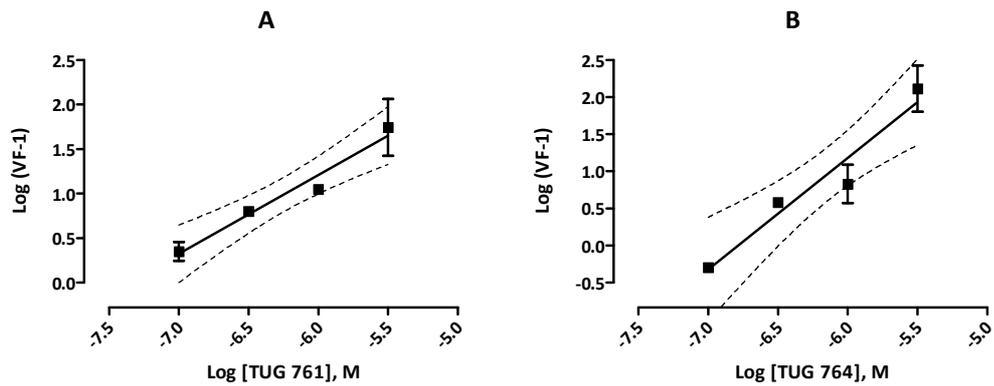


Abbildung 60:

Schild-Plot der hFFAR1-Antagonisten TUG 761 (A) und 764 (B). TUG 761: $pA_2 (\pm SD) = 7,37 \pm 0,31$, Steigung ($\pm SD$) = $0,88 \pm 0,14$, $r^2 = 0,867$; TUG 764: $pA_2 (\pm SD) = 6,79 \pm 0,26$, Steigung = $1,50 \pm 0,27$, $r^2 = 0,858$. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Bereich des CI (95%). Alle Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Duplikaten.

Das Konfidenzintervall der Geradensteigung im Schild-Plot umfasst bei beiden Inhibitoren den Wert 1. Der pA_2 -Wert nimmt die Werte 7,37 für TUG 761 bzw. 6,79 für TUG 764 an. Als Alternative zum Schild-Plot wurde für beide Inhibitoren auch eine Auftragung nach Lew und Angus durchgeführt (Abb. 61). Der ermittelte Wert für die Steigung gemäß dieser nicht-linearen Auftragung ist für beide Inhibitoren ebenfalls nicht signifikant vom Wert 1 verschieden. Der pK_b -Wert nimmt für TUG 761 den Wert 7,18, für TUG 764 den Wert 7,28 an.

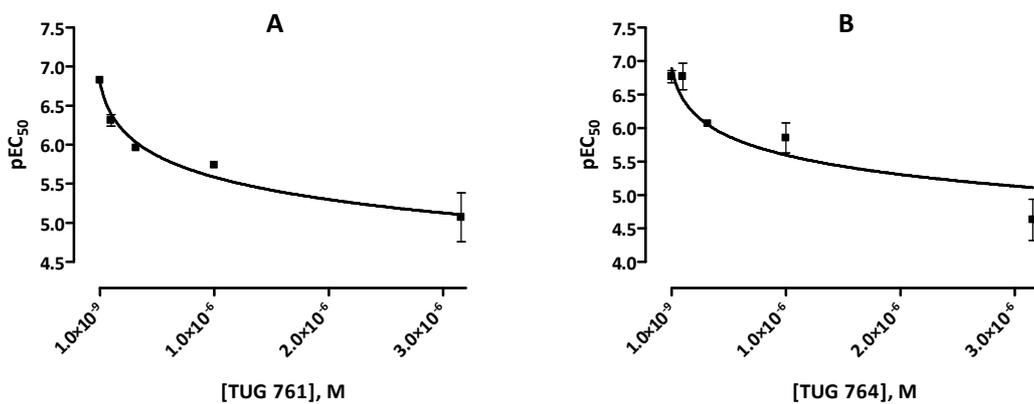


Abbildung 61:

Nicht-lineare Regression nach Lew und Angus zur Bestimmung des pK_b -Werts der hFFAR1-Antagonisten TUG 761 und TUG 764 (Lew und Angus, 1995). $pK_b \pm SE$, r^2 : (A, TUG 761) $7,18 \pm 0,17$, 0,922 (Steigung nicht signifikant vom Wert 1 verschieden) und (B, TUG 764) $7,28 \pm 0,35$, 0,812 (Steigung nicht signifikant vom Wert 1 verschieden). Alle Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Duplikaten.

4. Ergebnisse

Das Konfidenzintervall der Steigung im Clark-Plot (Abb. 62) schließt bei TUG 761 und TUG 764 den Wert 1 mit ein.

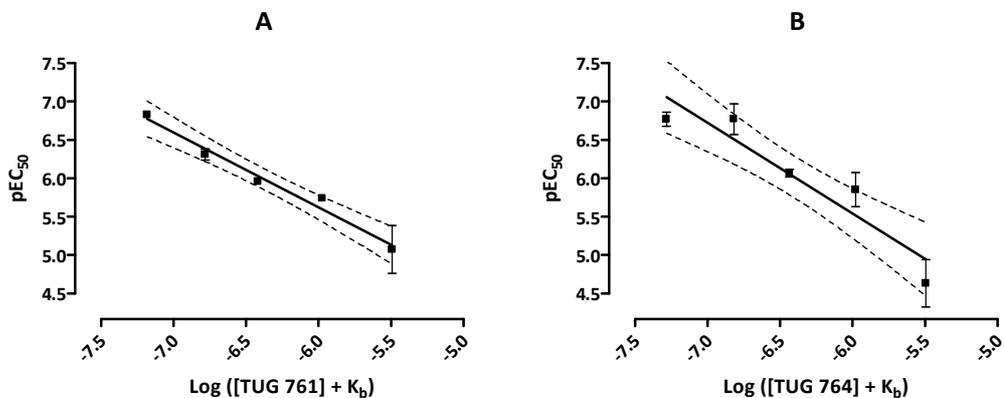


Abbildung 62:

Clark-Plot für die hFFAR1-Antagonisten TUG 761 (A) und 764 (B). TUG 761: Steigung \pm SD (Col) = $-0,98 \pm 0,10$ (-1,21 bis -0,75), $r^2 = 0,923$; TUG 761: Steigung \pm SD (Col) = $-1,18 \pm 0,19$ (-1,62 bis -0,74), $r^2 = 0,830$. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Bereich des Col (95%). Alle Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Duplikaten.

Die beiden hFFAR1-Antagonisten TUG 761 und TUG 764 bewirken im cAMP-Assay eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung und Reduzierung des E_{max} -Werts einer Konzentrations-Effekt-Kurve des Standardagonisten GW9508. Die Schild-Analyse und die Auftragung nach Lew und Angus weisen beiden Antagonisten einen kompetitiven Charakter zu. Der pA_2 - bzw. pK_b -Wert der Antagonisten beträgt $7,37 \pm 0,31$ bzw. $7,18 \pm 0,17$ für TUG 761 und $6,79 \pm 0,26$ bzw. $7,28 \pm 0,35$ für TUG 764. Beide Antagonisten reduzieren das Forskolin-induzierte Signal bis zu etwa 50% bei $100 \mu\text{M}$.

4.3 Molekulares Wirkstoffdesign mit dem 3D-QSAR-Modell (AFMoC)

2007 wurde von Tikhonova et al. ein Homologiemodell des hFFA1-Rezeptors (Tikhonova, 2007) postuliert, das in dieser Arbeit zur Erstellung eines 3D-QSAR-Modells herangezogen werden konnte. Für die Erstellung dieses Modells wurde die AFMoC-Methode (Kap. 1.4 und 3.2.5.4) (Gohlke und Klebe, 2002b) verwendet, die es ermöglicht, strukturelle Rezeptorinformationen in die QSAR zu integrieren (Kap. 1.4). Es wurden hierzu 171 in dieser Arbeit identifizierte hFFAR1-Agonisten und deren im Ca^{2+} -Assay experimentell ermittelte Wirkstärke ($\text{pEC}_{50 \text{ exp}}$) verwendet (Anhang B1 und B2). Diese Verbindungen stellen den Trainingsdatensatz dar. Testsubstanzen, die zur *in vitro*-Testung als racemisches Gemisch vorlagen oder deren chemische Struktur sich nicht in die hFFA1-Rezeptorbindetasche einpassen ließ, blieben im Trainingsdatensatz unberücksichtigt. In dieser AFMoC-Analyse wurde zunächst ein 3D-Gitter über die hFFAR1-Bindetasche (Kap. 3.2.5.3) gespannt, an deren Gitterpunkten Potentiale zwischen den Atomtypen der Rezeptorumgebung und den Sondenatomtypen (SYBYL-Atomtypen, z.B. C.ar für aromatischen Kohlenstoff) berechnet wurden. Somit ergeben sich für jeden Atomtyp so genannten Potentialfelder, welche mit der Rezeptorinformation vorgeprägt sind. Die Verbindungen des Trainingsdatensatzes wurden in die hFFAR1-Bindetasche eingepasst und energieminiert. In einem zweiten Schritt wurden die Potentialfelder mit den energieminierten 3D-Strukturen der Liganden überlagert. Dabei wurde über jedes Atom des Liganden eine abstandsabhängige Gaußfunktion gelegt, deren Halbwertsbreite σ entspricht. Aus den Potentialfeldern und der Gaußfunktion wurde eine Konvolution errechnet, man erhält damit für jeden Liganden Interaktionsfelder (Kap. 1.4). Die Daten dieser Interaktionsfelder wurden mit den $\text{pEC}_{50 \text{ exp}}$ -Werten mit Hilfe einer PLS-Analyse korreliert. Die Ergebnisse dieser PLS-Analyse zeigen sich in Form von Deskriptoren (Komponenten). Bei diesen Komponenten handelt es sich um gewichtete Faktoren, die den Zusammenhang zwischen den Struktureigenschaften und den experimentellen Wirkstärken widerspiegeln. Die Berechnung einer theoretischen Wirkstärke ($\text{pEC}_{50 \text{ pred}}$) eines Liganden durch das AFMoC-Modell setzt sich anschließend aus den einzelnen gewichteten Beiträgen für jedes Ligandatom zusammen. Der Beitrag von Atomtypen, die im Trainingsdatensatz unterrepräsentiert sind, zum AFMoC-Gesamtmodell fällt gering aus. Daher werden in einer angepassten Berechnung der $\text{pEC}_{50 \text{ pred}}$ -Werte die Interaktionsfelder dieser Atomtypen

durch die Potenzialfelder ersetzt. Für die angepasste Berechnung wurde der pEC_{50}^{PLS} berechnet. Wurde die Berechnung nicht angepasst, also ausschließlich die Beiträge der Interaktionsfelder verwendet, ergab sich der pEC_{50}^{total} . Als Ergebnisse der PLS ergeben sich so genannte Stddev*Koeff-Felder, die einen positiven oder negativen Beitrag zur funktionellen Wirkstärke der Liganden für die Anwesenheit der jeweiligen Atomtypen darstellen. Die für eine Validierung des AFMoC-Modells verwendeten hFFAR1-Agonisten und neue Strukturentwürfe (Testdatensätze) wurden ebenfalls in die hFFAR1-Bindetasche eingepasst und energieminiert. Die Berechnung der Wirkstärke dieser Verbindungen erfolgte analog zu jenen des Trainingsdatensatzes.

4.3.1 Validierung des AFMoC-Modells

Für eine Beurteilung der Güte des AFMoC-Modells für die Vorhersage von theoretischen Wirkstärken wurde eine Kreuzvalidierung nach der „Leave-One-Out“(LOO)-Methode durchgeführt. Hierbei wird ein Ligand aus dem Trainingsdatensatz entfernt und ein modifiziertes AFMoC-Modell ohne diesen Liganden erstellt. Anschließend erfolgt die Vorhersage der theoretischen Wirkstärke des herausgenommenen Liganden durch das modifizierte Modell. Werden anstelle eines einzelnen Liganden zehn Liganden entnommen, handelt es sich entsprechend um die „Leave-Ten-Out“(LTO)-Methode. Beide Methoden wurden solange durchgeführt bis der $pEC_{50\ pred}$ -Wert jedes Liganden des Trainingsdatensatzes durch ein modifiziertes Modell vorhergesagt wurde. Die Ergebnisse dieser Kreuzvalidierungen werden mit Hilfe der statistischen Parameter in Tab. 14 und 15 angegeben (vgl. Kap. 3.2.5.5). Tab. 14 zeigt diese Parameter für die Kreuzvalidierung mit der LOO-Methode. Der q^2 -Wert, der das Maß für die Güte der Vorhersage aller Liganden des Trainingsdatensatzes angibt, nimmt einen Wert von 0,61. Die mittlere Abweichung der vorhergesagten von den tatsächlichen Wirkstärken (s_{press}) wird mit 0,48 Log-Einheiten angegeben.

4. Ergebnisse

Tabelle 14:

Statistische Parameter der LOO-Methode mit der vollen Anzahl (**A**) bzw. mit einer verminderten Anzahl an Interaktionsfeldern (**B**) (ohne O.2 und N.am). Die Halbwertsbreite der Gaußfunktion um die Ligandatome (σ) betrug 0,85 Å. Es wurden jeweils sechs Komponenten (Deskriptoren) verwendet.

	A	B
q^2 ^a	0,61 (0,62)	0,61 (0,61)
S_{press} ^{a,b}	0,48 (0,48)	0,49 (0,49)
r^2 ^a	0,80 (0,80)	0,79 (0,79)
S ^{a,b}	0,34 (0,34)	0,36 (0,36)
F ^a	106,5 (110,9)	105,4 (105,8)

<u>verwendete Interaktionsfelder</u>	<u>Beiträge zum Gesamtmodell</u> ^c	
C.ar	0,532	0,532
C.2	0,066	0,071
C.3	0,239	0,239
O.2	0,004	-
O.3	0,028	0,030
N.ar	0,030	0,033
N.am	0,006	-
F	0,040	0,041
Cl	0,036	0,037
Br	0,019	0,019

^a ergibt sich aus den berechneten pEC_{50}^{PLS} -Werten (bzw. aus den berechneten pEC_{50}^{total} -Werten), ^b angegeben in logarithmierten Einheiten, ^c die Summe aller Beiträge ist 1.

Der Korrelationskoeffizient r^2 , ein Maß für die Bestimmtheit der Korrelation zwischen vorhergesagter und tatsächlicher Wirkstärke, ist mit 0,80 als gut zu bewerten.

Tragen Atomtypen in einem Trainingsdatensatz nur geringe Beiträge zur Erklärung der QSAR bei (z.B. O.2 and N.am), können diese für die Berechnung der theoretischen Wirkstärke ausgeschlossen werden. Blieben die Interaktionsfelder mit geringen Beiträgen zur Erklärung unberücksichtigt (Tab. 14 B), wurde die Vorhersagekraft des Modells nicht verbessert. Daher verblieben diese Interaktionsfelder in der AFMoC-Analyse. Tab. 15 zeigt, dass die Güte der Vorhersage nach der LTO-Methode im Vergleich zur LOO-Methode zwar moderat geringer, mit einem q^2 von 0,56 und einem S_{PRESS} von 0,51 jedoch immer noch gut ist.

4. Ergebnisse

Tabelle 15:

Vergleich der statistischer Parameter der LOO- und LTO-Kreuzvalidierungsmethode. Die Halbwertsbreite der Gaußfunktion um die Ligandatome (σ) betrug 0,85 Å. Es wurden jeweils sechs Komponenten (Deskriptoren) verwendet.

	LOO	LTO
Anzahl der Läufe	171	18
q^2 ^a	0,61 (0,62)	0,56 (0,57)
S_{press} ^{a,b}	0,48 (0,48)	0,51 (0,51)

^a ergibt sich aus den berechneten pEC_{50}^{PLS} -Werten (bzw. aus den berechneten pEC_{50}^{total} -Werten), ^b angegeben in logarithmierten Einheiten

Um eine zufällige Korrelation bei der Durchführung der PLS-Methode auszuschließen, wurden die tatsächlichen Wirkstärken des Trainingsdatensatzes gemischt, zufällig auf die Liganden verteilt und ein AFMoC-Modell mit den zufällig verteilten Wirkstärken erstellt. Dieser Vorgang wurde 9-mal wiederholt. Die Ergebnisse der LOO-Kreuzvalidierung dieser 10 Läufe sind in Tab. 16 aufgeführt. Der q^2 dieser Läufe nimmt stets negative Werte an. Damit ist eine zufällige Korrelation der Wirkstärken im Trainingsdatensatz auszuschließen.

Tabelle 16:

Statistischer Parameter der LOO-Methode bei Verwendung zufällig zugeordneter Wirkstärken des Trainingsdatensatzes auf die Liganden des Trainingsdatensatzes.

Lauf	q^2 ^a	Lauf	q^2 ^a
1	-0,32 (-0,26)	6	-0,22 (-0,26)
2	-0,51 (-0,56)	7	-0,47 (-0,49)
3	-0,32 (-0,33)	8	-0,55 (-0,57)
4	-0,48 (-0,50)	9	-0,42 (-0,46)
5	-0,37 (-0,35)	10	-0,25 (-0,33)

^a ergibt sich aus den berechneten pEC_{50}^{PLS} -Werten (bzw. aus den berechneten pEC_{50}^{total} -Werten)

Eine Auftragung der Korrelation zwischen pEC_{50}^{exp} und pEC_{50}^{pred} aus der LOO-Kreuzvalidierung zeigt Abb. 63 für alle Liganden des Trainingsdatensatzes. Die korrelierten Werte verlaufen weitestgehend gleichmäßig verteilt auf beiden Seiten der idealen Korrelation ($pEC_{50}^{\text{pred}} - pEC_{50}^{\text{exp}} = 0$) und erstrecken sich über einen Konzentrationsbereich von 3,5 Log-Einheiten. Einige Liganden, die für die Weiterentwicklung potenter Leitstrukturen wichtig sind, wurden hervorgehoben. Die Abweichung der Aktivitätsvorhersage dieser vier Liganden (GW9508, TUG 469, TUG 501, TUG 770) ist nicht größer als 0,7 Log-Einheiten.

4. Ergebnisse

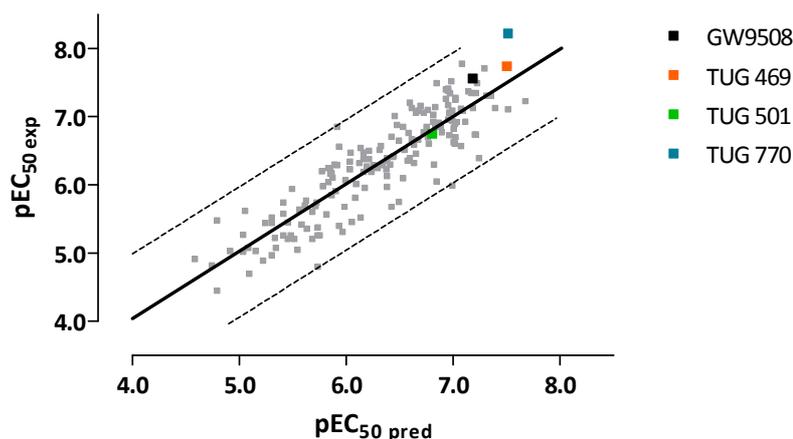


Abbildung 63:

Auftragung der im Ca²⁺-Assay bestimmten Wirkstärke (pEC_{50 exp}) der Liganden des Trainingsdatensatzes gegen die vorhergesagte Wirkstärke (pEC_{50 pred}) aus der LOO-Kreuzvalidierung. Die Ideallinie der Korrelation (durchgezogene Linie) wird von einem Fehlerbereich umfasst, der einer Abweichung von einer Log-Einheit entspricht (gestrichelte Linie).

4.3.2 hFFAR1-inaktive Verbindungen

Ein Test der Vorhersage von Aktivitäten inaktiver Verbindungen am hFFAR1 gibt Aufschluss darüber, wie präzise die Vorhersage im unteren Aktivitätsbereich ist. Hierzu wurden hFFAR1-inaktive Substanzen ausgewählt, die sowohl andersartige (Latanoprost, Biotin) als auch strukturell stark verwandte Verbindungen im Vergleich zu jenen des Trainingsdatensatzes darstellen (Abb. 64). Ferner kann dadurch abgeschätzt werden, wie wahrscheinlich falsch positive Vorhersagen sind. Für die Vorhersagekraft des Modells auf die Aktivitäten im unteren Bereich (pEC₅₀ < 5) wurde ein Schwellenwert bei 4,5 für den pEC₅₀-Wert und ein Grenzbereich von ± 1,0 um den Schwellwert definiert. Der Grenzbereich soll die Vorhersagetoleranz des Modells und die Ungenauigkeit des experimentellen Testsystems beinhalten. Der Schwellenwert gibt die geringste, experimentell bestimmbare Aktivität an. Unterhalb dieser Aktivität sind wegen des Lösemittelleffekts von DMSO und einer schlechten Löslichkeit der Testsubstanzen Bestimmungen nicht möglich.

4. Ergebnisse

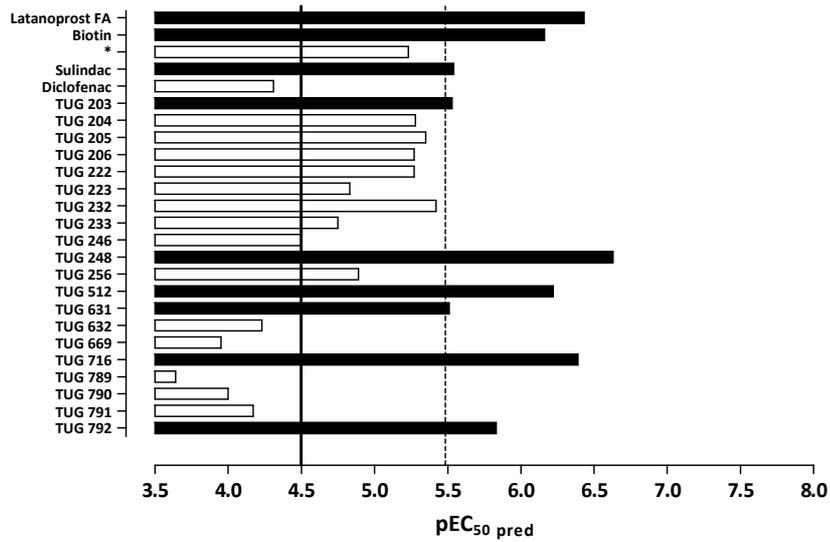


Abbildung 64:

Vorhersage der funktionellen Aktivität (AFMoC-Modell) experimentell als inaktiv getesteter Verbindungen. Alle aufgeführten Verbindungen zeigten bei einer Konzentration von 10 μM im Ca^{2+} -Assay an hFFAR1-1321N1-Zellen keinen Effekt. * N-Carbobenzyloxy-L-Phenylalanin, FA meint freie Säure.

Die zum Trainingsdatensatz strukturell stark unterschiedlichen Substanzen wie Sulindac oder Biotin besitzen als gemeinsames Motiv mit den hFFAR1-Liganden eine Carbonsäure (Abb. 65). Auffällig ist, dass insbesondere für diejenigen Verbindungen, die einen hohen konformativen Freiheitsgrad besitzen (Latanoprost und Biotin), eine gute Einpassung in die hFFAR1-Bindetasche möglich ist und eine Wirkstärke von über 6,0 vorhergesagt wird.

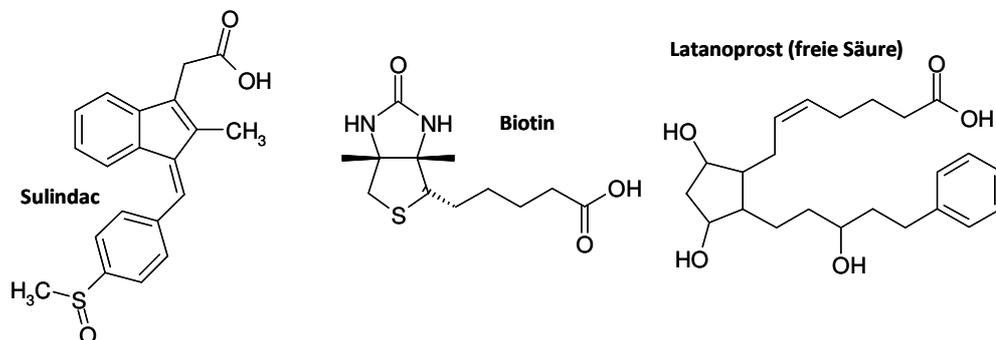


Abbildung 65:

Strukturformeln (und $\text{pEC}_{50 \text{ pred}}$) der hFFAR1-inaktiven Verbindungen Sulindac (5,54), Biotin (6,16) und Latanoprost (6,43).

4. Ergebnisse

Des Weiteren kann anhand des Modells erläutert werden, warum Verbindungen inaktiv sind, was im Folgenden beispielhaft dargestellt ist. Mit Ausnahme von TUG 203, 248, 512, 631, 716 und 792 werden für alle übrigen Verbindungen der TUG-Reihe keine ($pEC_{50} < 4.5$) oder eine sehr geringe Wirkstärke ($pEC_{50} < 5.5$) am hFFAR1 vorhergesagt. 6 von 20 inaktiven TUG-Substanzen werden vom Modell daher auch als inaktiv ($pEC_{50} < 4.5$) erkannt. TUG 203 und TUG 631 besitzen anstelle der Carbonsäure ein Amid, sind daher nicht anionisch und inaktiv am Rezeptor, besitzen allerdings einen $pEC_{50 \text{ pred}}$ von 5,5. Abb. 66 zeigt die hypothetische Lage des Amidanalogons TUG 631 in der hFFAR1-Bindetasche anhand derer sich die geringe vorhergesagte Wirkstärke gut erklären lässt. Das Amid kann wegen einer gegenüber der Carbonsäure TUG 309 geringeren Wasserstoffbrücken-Akzeptorfunktion nicht so tief in die positiv geladene Bindehöhle eintauchen (Strukturen für TUG 631 und TUG 309 befinden sich im Anhang B1). Dies führt zu einer Verschiebung und leichten Krümmung der Tolaneinheit bei TUG 631, womit die Stddev*Koeff-Felder für den aromatischen Kohlenstoff (C.ar) weniger gut ausgefüllt werden. Da der C.ar-Atomtyp den größten Beitrag zum Erklärungsmodell liefert (Tab. 14), ist das der Grund für eine um 1,5 Log-Einheiten niedriger vorhergesagte Wirkstärke von TUG 631 (5,51) im Vergleich zur TUG 309 (7,02).

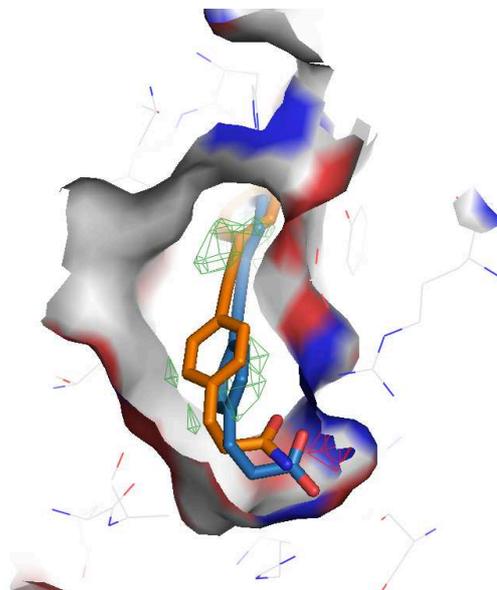


Abbildung 66:

Hypothetische Ausrichtung des inaktiven Amidanalogons TUG 631 (orange) von TUG 309 (blau) in der hFFAR1-Bindetasche. Die rot-gefärbten Bereiche der Oberfläche der Rezeptorbindetasche deuten die Lage eines Sauerstoffs, die blau-gefärbten Bereiche die Lage eines Stickstoffs innerhalb der Aminosäurereste an. Stddev*Koeff-Felder: O.2 (rot), C.ar (grün). TUG 309: $pEC_{50 \text{ pred}} = 7,02$, $pEC_{50 \text{ exp}} = 6,69$; TUG 631: $pEC_{50 \text{ pred}} = 5,51$, $pEC_{50 \text{ exp}} \leq 4,5$.

4. Ergebnisse

TUG 792 ist ein Tetrazolanalogon von TUG 309 und besitzt daher ebenfalls einen anionischen Carbonsäureersatz, ist aber experimentell inaktiv. Die vorhergesagte Wirkstärke liegt bei 5,83. TUG 876 ist ein TUG 792-Analogon mit einem Linker zwischen Tetrazol und Phenylring, der um eine Methyleneinheit gegenüber TUG 792 verkürzt ist (Strukturen für TUG 309, 792 und 876 befinden sich im Anhang B1). TUG 876 besitzt eine experimentell ermittelte Wirkstärke von 5,33 und eine vorhergesagte von 5,99. Abb. 67 erklärt, wie die vorhergesagten Wirkstärken von TUG 792 und TUG 876 zustande kommen und warum TUG 876 experimentell aktiv bzw. TUG 792 inaktiv ist.

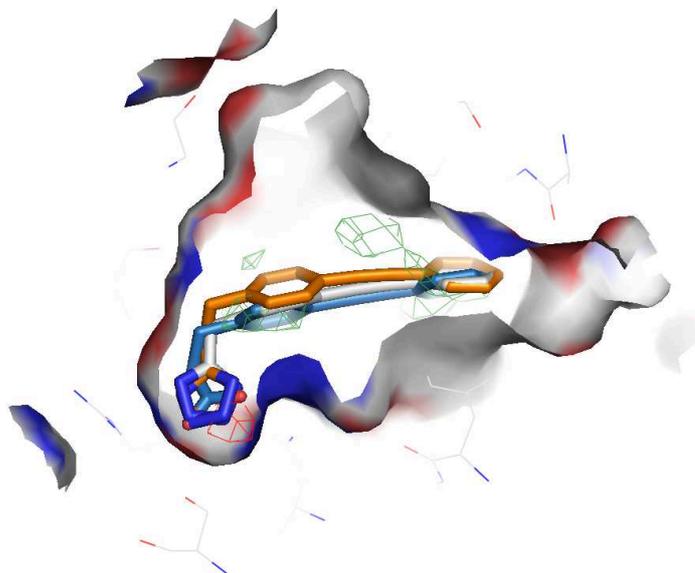


Abbildung 67:

Hypothetische Ausrichtung des inaktiven Tetrazolanalogons TUG 792 (orange) und des aktiven Tetrazolanalogons TUG 876 (grau) im Vergleich zur Carbonsäure TUG 309 (blau) in der hFFAR1-Bindetasche. Rot-gefärbte Bereiche der Rezeptoroberfläche: Lage von Sauerstoffen; Blau-gefärbte Bereiche: Lage von Stickstoffen. Stddev*Koeff-Felder: O.2 (rot), C.ar (grün). TUG 309: $pEC_{50 \text{ pred}} = 7,02$, $pEC_{50 \text{ exp}} = 6,69$; TUG 792: $pEC_{50 \text{ pred}} = 5,83$, $pEC_{50 \text{ exp}} \leq 4,5$; TUG 876: $pEC_{50 \text{ pred}} = 5,99$, $pEC_{50 \text{ exp}} = 5,33$.

Die Tolaneinheit des TUG 792 wird aufgrund des Tetrazolrings verschoben und gekrümmt. Daher lässt sich vermuten, dass eine tatsächliche Bindung von TUG 792 in die Bindetasche erschwert ist und im Experiment keine hFFAR1-Aktivität aufweist. Das verkürzte Tetrazol TUG 876 kann die Lage analog zu TUG 309 einnehmen, was ein Argument für die experimentell gezeigte Aktivität am hFFAR1 liefert. Warum im AFMoC-Modell für beide Tetra-

4. Ergebnisse

zolanaloge eine ähnliche Wirkstärke berechnet wird, liegt zum einen daran, dass das Modell von einer Bindung der inaktiven Verbindung TUG 792 ausgeht und zum anderen, da beide Tetrazole die Bereiche im Stddev*Koeff-Feld (C.ar) ähnlich besetzen. Die Carbonsäure wird vom AFMoC-Modell im Vergleich zu den Tetrazolverbindungen als etwa 10-fach wirkstärker vorhergesagt. Eine Erklärung hierfür bietet das Stddev*Koeff-Feld des sp^2 -hybridisierten Sauerstoffs (O.2). Während die Carboxylgruppe von TUG 309 die O.2-Felder besetzen kann, besitzen die Tetrazole in diesem Bereich keinen solchen Atomtyp.

Die Verbindungsklasse der N-Alkyl-sulfonyl-propionamide (TUG 632, 669 und 789 bis 791; die Strukturen dieser Verbindungsklasse befinden sich im Anhang B1) sind hFFAR1-inaktiv und werden mit pEC_{50} -Werten unter 4,5 auch als inaktiv durch das AFMoC-Modell vorhergesagt (Abb. 64). Warum diese Verbindungen inaktiv sind, wird am Beispiel der Struktur von TUG 790 in Abb. 68 deutlich. Die Sulfonylgruppe lässt sich aufgrund der Alkylierung sterisch nicht in die positive Bindehöhle eingliedern, was eine extreme Verschiebung und Krümmung der Tolaneinheit mit sich bringt. Die Krümmung erschwert vermutlich die Bindung dieser Ligandgruppe deutlich.

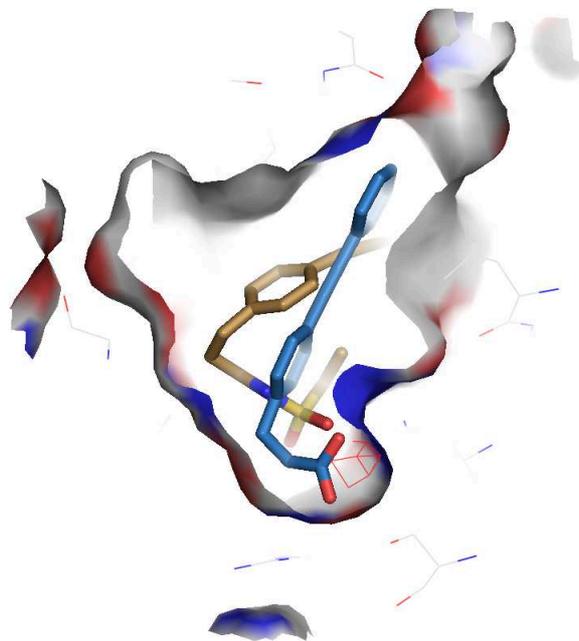


Abbildung 68:

Hypothetische Ausrichtung der inaktiven Gruppe der N-(Alkyl-sulfonyl)-propionamid-Analoga am Beispiel von TUG 790 (beige) im Vergleich zur Lage von TUG 309 (blau) in der hFFAR1-Bindetasche. Rot-gefärbte Bereiche der Rezeptoroberfläche: Lage von Sauerstoffen; Blau-gefärbte Bereiche: Lage von Stickstoffen. Stddev*Koeff-Feld: O.2 (rot). TUG 309: $pEC_{50\text{ pred}} = 7,02$, $pEC_{50\text{ exp}} = 6,69$; TUG 790: $pEC_{50\text{ pred}} = 4,00$, $pEC_{50\text{ exp}} \leq 4,5$.

Das grundsätzliche Problem bei der Vorhersage der Wirkstärke von experimentell inaktiven Verbindungen mit dem AFMoC-Modell ist, dass die Analyse grundsätzlich von der Bindung einer eingepassten Testsubstanz ausgeht. Inaktive Testsubstanzen wurden wie die aktiven hFFAR1-Liganden in die Bindetasche eingepasst und energieminiert. Die Wirkstärke inaktiver Verbindungen errechnet das Modell ausgehend von Einzelbeiträgen, die sich aus der Lage aller Ligandatome in der Bindetasche und den gewichteten Faktoren der PLS ergeben. Die AFMoC-Methode lässt unberücksichtigt, dass inaktive Substanzen wahrscheinlich nicht zu einer Bindung in der Bindetasche des Rezeptors befähigt sind. Neben einer geringen Affinität von inaktiven Verbindungen zur Rezeptorbindetasche können auch alternative Bindungen eine Aktivierung des Rezeptors verhindern. Dieses Kapitel zeigt insofern, dass mit dem AFMoC-Modell quantitative Aussagen ausschließlich bei Liganden möglich sind, die in der Bindetasche binden, aktiv sind, eine gewisse Strukturähnlichkeit zu den Verbindungen des Trainingsdatensatzes besitzen (anionischer Anker, ähnliche strukturelle Ausrichtung des lipophilen Teils) und einen möglichst geringen konformativen Freiheitsgrad besitzen. Unter diesen Voraussetzungen ist eine Vorhersage der Aktivität am Rezeptor erhältlich.

4.3.3 Vorhersage der Wirkstärke von Literatur-hFFAR1-Agonisten

In diesem Kapitel werden Vorhersagen über die Wirkstärke bekannter hFFAR1-Agonisten aus der Literatur (externer Testdatensatz) mit dem AFMoC-Modell gemacht. Alle hier aufgeführten Wirkstärken sind nicht im eigenen zellulären *in vitro*-Testsystem ermittelt worden, sondern stammen aus unterschiedlichen Arbeiten und experimentellen Umständen (Bharate, 2009). Abb. 69 zeigt eine Korrelation dieser experimentellen Wirkstärken mit den vorhergesagten Wirkstärken, die mit Hilfe des AFMoC-Modells berechnet wurden. Die Auswahl der hier gezeigten hFFAR1-Liganden (Bharate, 2009) wurde auf diejenigen Substanzen beschränkt, deren Konfiguration und Wirkstärke eindeutig definiert werden konnte. Die ausgewählten Verbindungen besitzen alle ein ähnliches Pharmakophor wie das der Liganden des Trainingsdatensatzes.

4. Ergebnisse

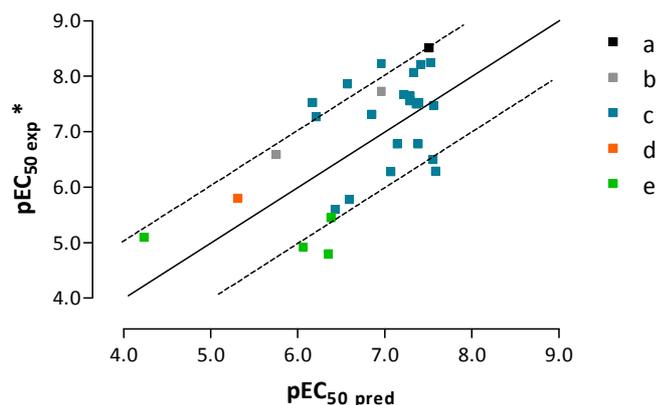


Abbildung 69:

Vorhersage der funktionellen Wirkstärke von bekannten hFFAR1-Agonisten aus der Literatur mit Hilfe des AFMoC-Modells. *Experimentelle Daten stammen aus (Bharate, 2009). Substanzquelle: (a) GlaxoSmithKline, (b) Astellas, (c) Takeda, (d) Merck, (e) National Institutes of Health (NIH).

Bis auf wenige Ausnahmen (6 Substanzen aus der Takeda-Reihe und 2 Substanzen aus der NIH-Gruppe) liegen alle Verbindungen in einem Bereich der Wirkstärke, der sich weniger als eine Log-Einheit von der experimentellen Wirkstärke unterscheidet. Der errechnete q^2 -Wert (Kap. 3.2.5.5) für die Vorhersage dieser Verbindungen liegt bei 0,35 ($s_{\text{PRESS}} = 0,99$). Die Güte der Vorhersage der Wirkstärke dieser 29 Literatur-hFFAR1-Agonisten durch das AFMoC-Modell ist damit weniger gut als für die im folgenden Kapitel beschriebenen Agonisten, die im eigenen Testsystem experimentell charakterisiert wurden.

4.3.4 Vorhersage der Wirkstärke von neuen Verbindungen

Bei den in diesem Kapitel beschriebenen 26 Verbindungen (interner Testdatensatz) handelt es sich um neue Strukturen, deren molekulares Design auf den deskriptiven Struktur-Wirkungsbeziehungen (Kap. 4.2.1.4) der bisher erwähnten TUG-Verbindungen basiert. Sie sind also kein Bestandteil des AFMoC-Modells, wurden aber unter den gleichen experimentellen Bedingungen *in vitro* (Ca^{2+} -Assay) charakterisiert. Die Überprüfung der Güte der Aktivitätsvorhersage solcher Verbindungen durch das AFMoC-Modell ist wichtig, da es sich hier um neue strukturelle Kombinationen der Komponenten aus den im AFMoC-Modell enthaltenen Strukturen handelt. Die neuen Verbindungen sind Analoga von TUG 309 und

4. Ergebnisse

TUG 469 und können gemäß ihrem Substitutionsmuster in vier Gruppen eingeteilt werden (Abb. 70).

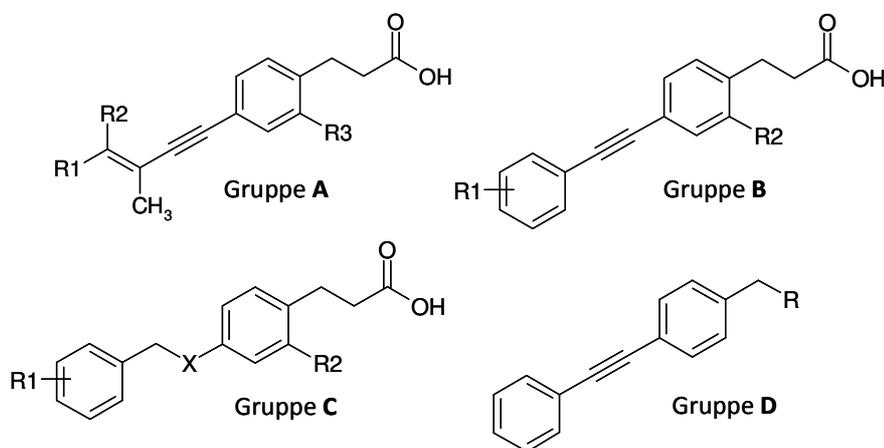


Abbildung 70:

Leitstrukturen und Substitutionsmuster der Gruppen **A-D**. Gruppe **A**: TUG 309-Analoga mit Allylersatz des terminalen Phenylrings analog zu TUG 757 und TUG 758 (TUG 784, 785 und 795), Gruppe **B**: TUG 309-Analoga mit unterschiedlichen Substituenten an Phenylringen (TUG 786-788, 806, 807, 861 und 862), Gruppe **C**: TUG 20-Analoga (TUG 808, 809, 810, 863, 864, 865, 875, 900, 903 und 904), Gruppe **D**: TUG 309-Analoga mit Austausch der Carbonsäuregruppe (TUG 793, 859, 860, 876, 892 und 893).

Abb. 71 zeigt die Korrelation der experimentellen Wirkstärken und der Vorhersage, aufgeteilt nach Gruppe **A** bis **D**. Die Güte der Vorhersage ist für die TUG 309-Derivate mit Vinylersatz (Gruppe **A**) für den terminalen Phenylring erwartungsgemäß gut. Die Allylstruktur und der neue Fluorsubstituent sind bereits im Model genau an dieser Position enthalten (vgl. TUG 735, 757 und 758). Die Aktivitäten aller übrigen TUG 309-Analoga (Gruppe **B** und **D**), die teils dem Model bekannte Substituenten (Halogene, Nitrile, Alkylether) an neuen Positionen und auch neuartige Substituenten (z.B. Difluormethyl-, Oxazolylgruppe) besitzen, werden ausnahmslos ebenfalls gut vorhergesagt. Die Vorhersagekraft für die Aktivität von TUG 20-Analoga (Gruppe **C**) ist sehr präzise.

4. Ergebnisse

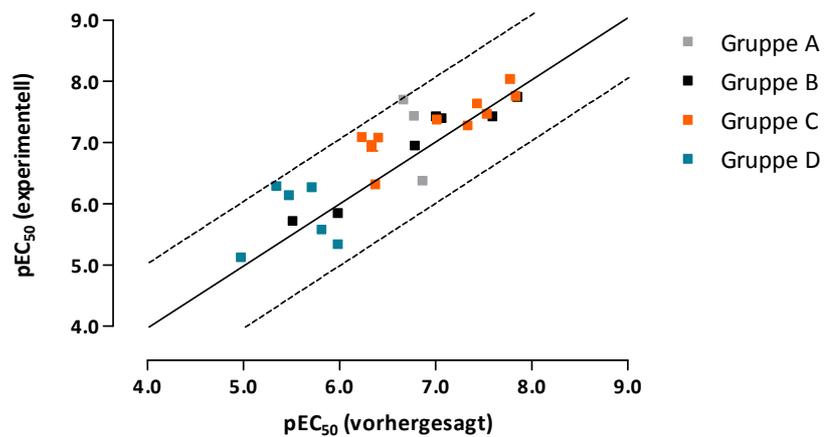


Abbildung 71:

Korrelation der experimentellen und aus der AFMoC-Analyse vorhergesagten Wirkstärke von neuen Verbindungen, die kein Bestandteil des AFMoC-Modells sind.

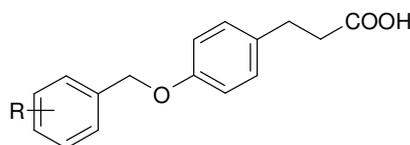
Die Güte der Vorhersage der Verbindungen in diesem Kapitel kann anhand des ermittelten q^2 -Wertes (Kap. 3.2.5.5) abgeschätzt werden. Der q^2 -Wert beträgt 0,66 ($s_{\text{PRESS}} = 0,56$) bei diesem internen Testdatensatz und kann die bereits rein objektiv gute Korrelation (Abb. 71) statistisch belegen. Daher kann davon gegangen werden, dass das AFMoC-Modell für das weitere Design neuer hFFAR1-Liganden gute Vorhersagen erzielt. Eine präzise Vorhersage der Aktivität von Substanzen mit neuartigen Partialstrukturen (Gruppe **D**) ist ebenfalls möglich, was für das Design neuartiger Strukturansätze hilfreich sein kann.

Im Folgenden werden die neuen Verbindungen im Vergleich zur ihren alten Strukturvorbildern eingehender betrachtet. Die Substanzen TUG 808 bis TUG 810 sind Analoga von TUG 20 (Tab. 17). Mit Ausnahme von TUG 810 werden diese als potenter gegenüber TUG 20 vorhergesagt. Alle drei neuen Verbindungen sind experimentell sogar noch potenter als vorhergesagt.

4. Ergebnisse

Tabelle 17:

Strukturvariationen neuer Verbindungen anhand der Leitstruktur TUG 20.



Code	R	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	pEC ₅₀ pred
TUG 20	H	6,37 ± 0,02 [98]	6,23'
TUG 808	2-F	6,95 ± 0,08 [105]	6,34
TUG 809	3-F	7,07 ± 0,07 [108]	6,41
TUG 810	4-Cl	7,08 ± 0,07 [112]	6,24

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20 (10 µM)-induzierten Signals, 'aus LOO-Kreuzvalidierung

Abb. 72 stellt am Beispiel von TUG 809 dar, warum diese vom AFMoC-Modell als potenter angesehen werden. Mit dem Fluorsubstituenten am terminalen Phenylring besetzt TUG 809 das positive Stddev*Koeff-Feld für Fluor, welches Räume aufweist, in denen die Anwesenheit von Fluor die Wirkstärke des Liganden erhöht.

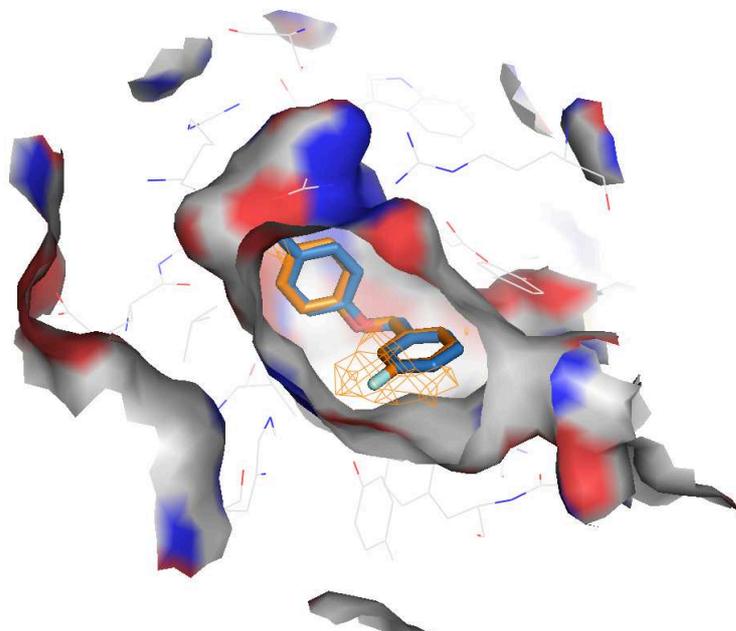


Abbildung 72:

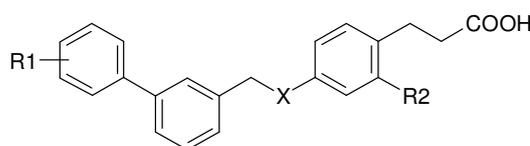
Ausrichtung der neuen Verbindung TUG 809 (orange) sowie der Leitstruktur TUG 20 (blau) in der hFFAR1-Bindetasche. Die rot-gefärbten Bereiche der Oberfläche der Rezeptorbindetasche deuten die Lage eines Sauerstoffs, die blau-gefärbten Bereiche die Lage eines Stickstoffs innerhalb der Aminosäurereste an. Stddev*Koeff-Feld: F (orange). TUG 20: pEC₅₀ pred = 6,23, pEC₅₀ exp = 6,37; TUG 809: pEC₅₀ pred = 6,41, pEC₅₀ exp = 7,07.

4. Ergebnisse

Des Weiteren gibt es unter den neuen Verbindungen Derivate von TUG 423 und TUG 469 (Tab. 18), an denen ein Fluor in ortho-Position zum Propionsäureteil (R2) angebracht wurde. Die experimentelle Wirkstärke von TUG 863 erhöht sich gegenüber TUG 469 um 1,8, von TUG 865 gegenüber TUG 469 um 2,8. Dieser Zugewinn an Wirkstärke ist auch anhand der Vorhersagen durch das AFMoC-Modell erkennbar.

Tabelle 18:

Strukturvariationen neuer Verbindungen anhand der Leitstrukturen TUG 423 und TUG 469.



Code	X	R1	R2	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	pEC ₅₀ pred
TUG 469	NH	2-Me	H	7,78 ± 0,03 [114]	7,65'
TUG 863	NH	2-Me	F	8,03 ± 0,04 [102]	7,78
TUG 423	O	2,6-di-Me	H	7,30 ± 0,05 [105]	7,28'
TUG 865	O	2,6-di-Me	F	7,75 ± 0,02[104]	7,84

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20-induzierten Signals, 'aus LOO-Kreuzvalidierung

Abb. 73 zeigt die in der hFFAR1-Bindetasche ausgerichteten Verbindungen TUG 469 und TUG 863. Die Ausrichtung beider Strukturen ist vergleichbar. Die Position der Carboxylgruppe ist bei beiden Verbindungen gleich. Ferner ist die Besetzung der positiven Stddev*Koeff-Felder für C.ar durch aromatische Kohlenstoffe ähnlich. Der zusätzliche Fluor-substituent besetzt das positive Stddev*Koeff-Felder für Fluor nicht. Aus diesen Gründen ist der geringe Unterschied in den vorhergesagten Wirkstärken (Faktor 1,3) beider Verbindungen nachvollziehbar.

4. Ergebnisse

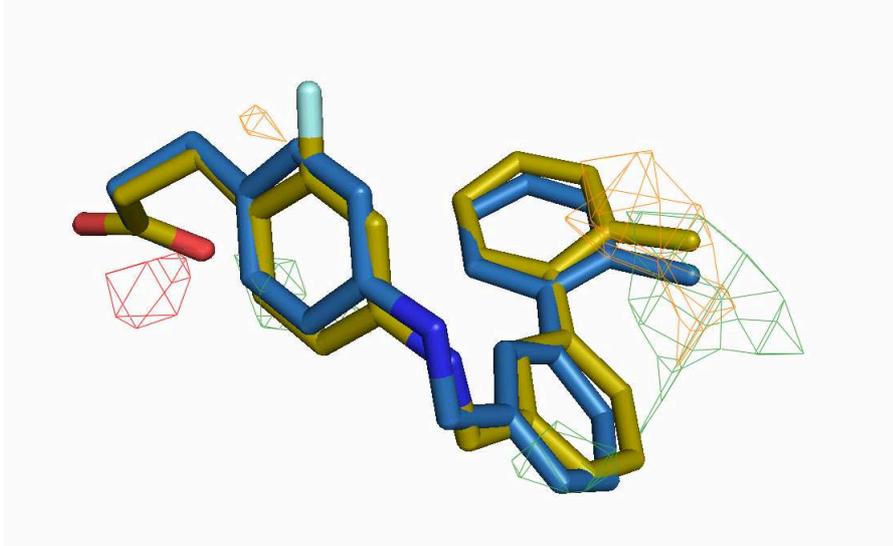
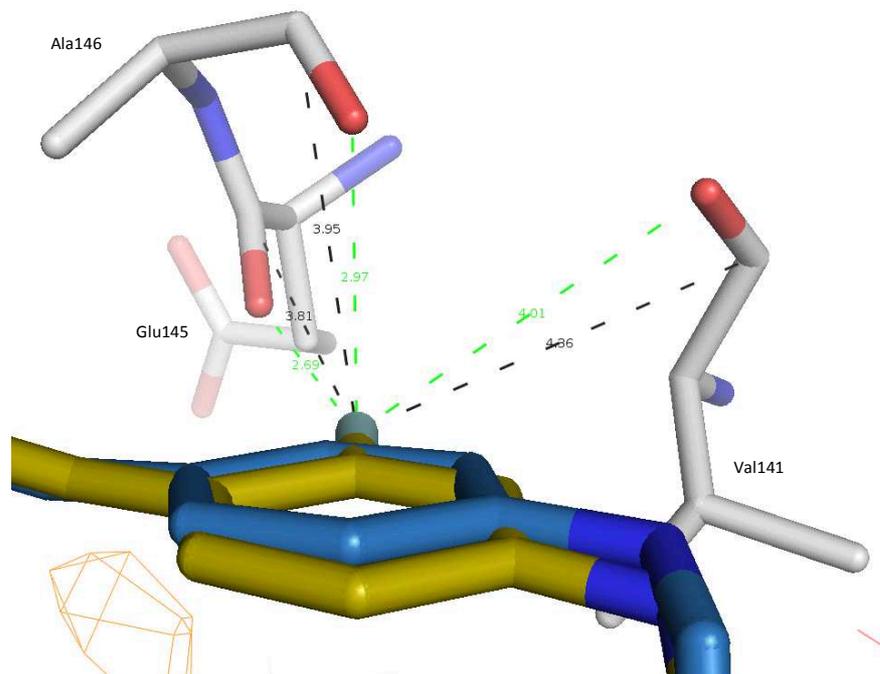


Abbildung 73:

Die neue Verbindung TUG 863 (gelb) sowie die Leitstruktur TUG 469 (blau), ausgerichtet in der hFFAR1-Bindetasche. Positive Stddev*Koeff-Felder: F (orange), C.ar (grün), O.2 (rot). TUG 469: $pEC_{50\text{ pred}} = 7,65$, $pEC_{50\text{ exp}} = 7,78$; TUG 863: $pEC_{50\text{ pred}} = 7,78$, $pEC_{50\text{ exp}} = 8,03$.

Da vier der sechs wirkstärksten in dieser Arbeit charakterisierten hFFAR1-Agonisten das Fluor in ortho-Position zur Propionsäure besitzen, soll nun ein detaillierter Blick auf die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung an dieser Position folgen. Abb. 74 zeigt den Fluorsubstituenten in der Rezeptorumgebung. Das Fluor ist umgeben von drei Aminosäureresten (Val141, Glu145 und Ala146), deren Amid-Sauerstoffe in Richtung Fluoratom des TUG 863 zeigen. Die Abstände der Amid-Sauerstoffe zum Fluor betragen 2,69 (bei Ala146) bis 4,01 Å (bei Val141). Fluor kann keine Wechselwirkungen mit dem Amid-Sauerstoff eingehen. Dennoch sind Konzepte bekannt, welche zeigen, dass Fluor in einer solchen Proteinumgebung durchaus Wechselwirkungen eingehen kann (Kopitz, 2008; Muller, 2007): Fluor kann mit den positiv polarisierten Amid-Kohlenstoffen in Wechselwirkung treten. In mehreren Kristallstrukturen wurden Abstände zwischen Fluor und dem Amid-Kohlenstoff zwischen 3,1 und 3,5 Å gemessen (Muller, 2007). Abb. 74 gibt die Abstände des Fluoratoms von TUG 863 zu den Amid-Kohlenstoffen in der direkten Proteinumgebung an. Diese liegen bei 3,81 (bei Ala146) bis 4,36 Å (bei Val141). Wird die Flexibilität des Proteins berücksichtigt, sind begünstigende Wechselwirkungen für die Bindung denkbar.

**Abbildung 74:**

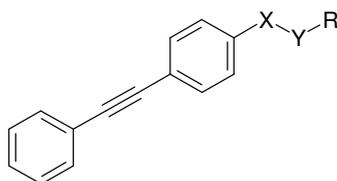
Blick auf den Fluorsubstituenten in ortho-Position zum Propionsäureteil der Verbindung TUG 863 (gelb) und der Rezeptorumgebung (Val141, Glu145, Ala146). Die Vergleichsstruktur ohne Fluor, TUG 469 ist blaue dargestellt. Positive Stddev*Koeff-Feld: F (orange). TUG 469: $pEC_{50 \text{ pred}} = 7,65$, $pEC_{50 \text{ exp}} = 7,78$; TUG 863: $pEC_{50 \text{ pred}} = 7,78$, $pEC_{50 \text{ exp}} = 8,03$. Die Abstände des Fluoratoms (hellblauer Stick) zu den Amid-Sauerstoffen (rote Sticks) sind grün, die zu den Amid-Kohlenstoffen schwarz dargestellt.

Die Verbindungen der Gruppe **D** (Abb. 70) sind Derivate von TUG 309 mit einem Austausch des Propionsäureteils (Tab. 19). Die experimentelle und vorhergesagte Wirksamkeit dieser Derivate ist generell geringer als die der Leitstruktur TUG 309. Das Tetrazolderivat (TUG 792) führt sogar zu einem kompletten Verlust an Aktivität bis $10 \mu\text{M}$. Die Verkürzung des Tetrazolrests um eine Methyleneinheit (TUG 876) bringt eine gewisse Aktivität zurück ($pEC_{50 \text{ exp}} = 5,33$) (Kap. 4.3.2, Abb 67). Ein Thiazolidindionrest (TUG 793) sowie andere sauerstoff- und stickstoffhaltige fünfgliedrige Heterozyklen reduzieren die Wirkstärke am hFFAR1 (Tab. 19).

4. Ergebnisse

Tabelle 19:

Strukturvariationen am Propionsäureteil der Leitstruktur TUG 309.



Code	X	Y	R	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	pEC ₅₀ pred
TUG 309	CH ₂	CH ₂	COOH	6,69 ± 0,03 [105]	7,02'
TUG 892 *	CH ₂	CH ₂	1-Oxazolidindion	6,13 ± 0,03 [96]	5,48
TUG 893	CH ₂	CH ₂	5-(2-Oxo-imidazol-3-on)	5,12 ± 0,03 [96]	4,98
TUG 859	CH ₂	CH ₂	1-(Oxazolidin-3,5-dion-yl)	6,28 ± 0,03 [105]	5,35
TUG 860	CH ₂	CH ₂	Hydroxamsäure	5,57 ± 0,04 [79]	5,82
TUG 792	CH ₂	CH ₂	5-(Tetrazol-yl)	k. A. bis 10 µM	5,83
TUG 876	CH ₂	-	5-(Tetrazol-yl)	5,33 ± 0,03 [75]	5,99
TUG 793 *	CH ₂	-	4-(Thiazolidindion-yl)	6,26 ± 0,03 [98]	5,72

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20-induzierten Signals, k. A. = keine Aktivität, 'aus LOO-Kreuzvalidierung, * Racemat

Abb. 75 zeigt am Beispiel der Hydroxamsäure TUG 860, warum die Aktivität dieser Verbindungen am hFFAR1 geringer ist. Die gegenüber dem Propionsäureteil verlängerte Hydroxamsäure verlagert die Tolaneinheit aus den für C.ar günstigen Stddev*Koeff-Feld.

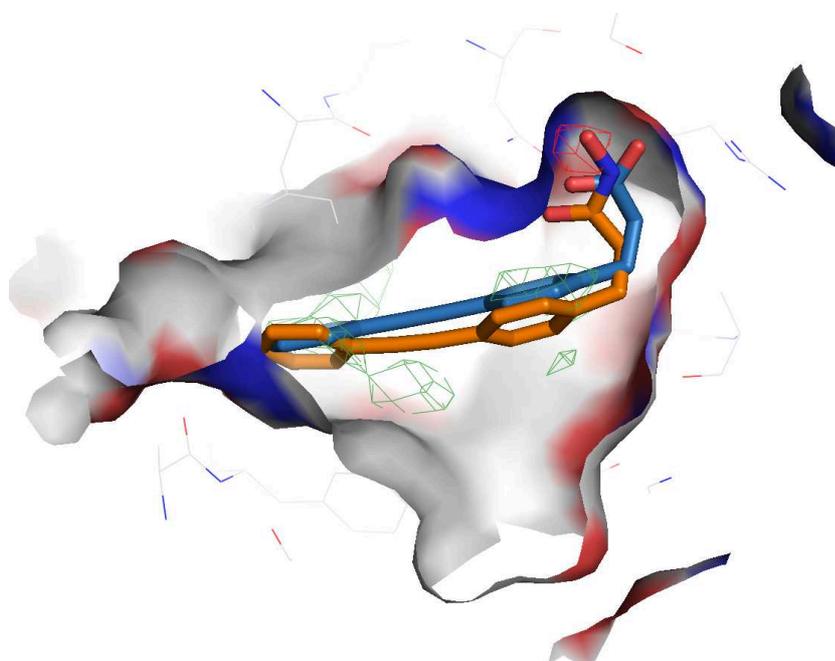


Abbildung 75:

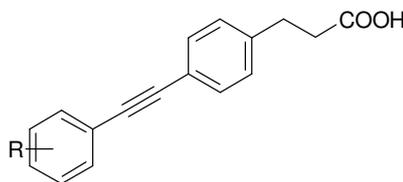
Ausrichtung der Hydroxamsäure TUG 860 (orange) im Vergleich zur Leitstruktur TUG 309 (blau) in der hFFAR1-Bindetasche. Die rot-gefärbten Bereiche der Oberfläche der Rezeptorbindetasche deuten die Lage eines Sauerstoffs, die blau-gefärbten Bereiche die Lage eines Stickstoffs innerhalb der Aminosäurereste an. Stddev*Koeff-Felder: C.ar (grün), O.2 (rot). TUG 309: pEC₅₀ pred = 7,02, pEC₅₀ exp = 6,69; TUG 860: pEC₅₀ pred = 5,82, pEC₅₀ exp = 5,57.

4. Ergebnisse

Weiterhin wurden Verbindungen mit Strukturvariationen am terminalen Phenylring der Leitstruktur TUG 309 charakterisiert (Tab. 20). Die gegenüber TUG 309 weniger potenten Abwandlungen TUG 787 und 788 sowie die potentere TUG 862 werden auch als solche gut vorhergesagt. TUG 786 und 861 zeigen experimentell eine höhere Wirkstärke als TUG 309, die vorhergesagte Wirkstärke ist jedoch für TUG 786 geringer bzw. für TUG 861 ähnlich der der Leitstruktur. Die Gründe für diesen Widerspruch konnten anhand des AFMoC-Modells nicht eindeutig geklärt werden.

Tabelle 20:

Neue Strukturvariationen am terminalen Phenylring der Leitstruktur TUG 309.



Code	R	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	pEC ₅₀ pred
TUG 309	H	6,69 ± 0,03 [105]	7,02 [']
TUG 786	2-CH₂CN, 5-CF₃	6,94 ± 0,03 [94]	6,79
TUG 787	2-OCH ₂ SO ₂ Me	5,84 ± 0,02 [97]	5,99
TUG 788	3-OCH ₂ SO ₂ Me	5,71 ± 0,02 [104]	5,59
TUG 861	2-CH₂OMe	7,39 ± 0,03 [108]	7,07
TUG 862	3-CH₂OMe	7,42 ± 0,04 [99]	7,60

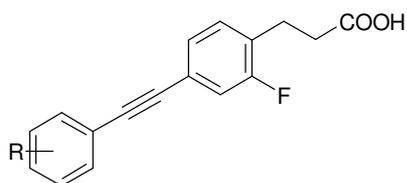
[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20-induzierten Signals, [']aus LOO-Kreuzvalidierung

Zuletzt soll der Blick noch einmal auf die am zentralen Phenylring in ortho-Position mit Fluor substituierten Ethinylverbindungen geworfen werden. Hierzu werden zunächst TUG 806 und 807 mit der Leitstruktur TUG 735 verglichen (Tab. 21). Eine Chlorierung in Position 3 und 5 am terminalen Phenylring ändert die Potenz von TUG 735 nicht signifikant. Ein Fluor an Position 2 sowie eine Difluormethylgruppe in Position 5 des terminalen Phenylrings (TUG 807) führt zu einer Verdopplung der tatsächlichen Wirkstärke gegenüber der Leitstruktur.

4. Ergebnisse

Tabelle 21:

Neue Derivatisierungen am terminalen Phenylring der fluorsubstituierten Leitstruktur TUG 735.



Code	R	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	pEC ₅₀ pred
TUG 735	H	7,48 ± 0,05 [100]	6,85'
TUG 806	3,5-di-Cl	7,42 ± 0,07 [99]	7,01
TUG 807	2-CHF ₂ , 5-F	7,74 ± 0,04 [97]	7,86

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20-induzierten Signals, 'aus LOO-Kreuzvalidierung

Abb. 76 zeigt, warum die mit mehreren Fluoratomen substituierte Verbindung TUG 807 eine höhere Wirkstärke besitzt als TUG 735. Ein Fluoratom der Difluormethylgruppe besetzt das Stddev*Koeff-Feld für Fluor, daher ist die Verbindung auch potenter als TUG 735. TUG 806 ist nicht potenter als TUG 735, da die zusätzlichen Chloratome den günstigen Bereich für Chloratome (Stddev*Koeff-Feld für Chlor) nicht optimal treffen. Das Stddev*Koeff-Feld für C.ar wird ebenso gut besetzt wie durch TUG 735. Eine Chlorierung in para-Position am terminalen Phenylring scheint laut AFMoC-Modell günstiger für eine Steigerung der Potenz zu sein. Diese Verbindung stand jedoch nicht zur Verfügung.

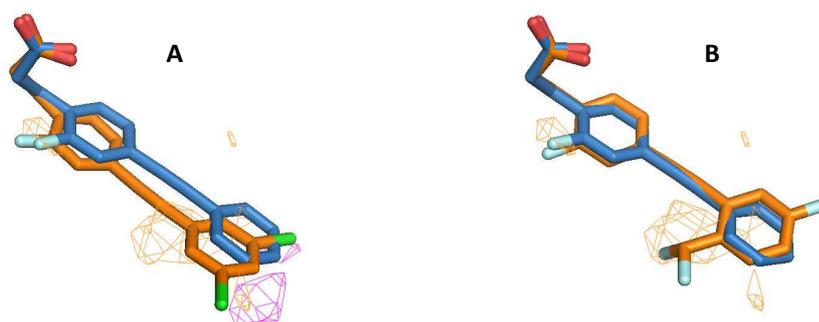


Abbildung 76:

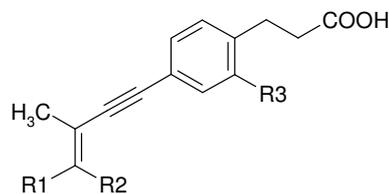
Die neuen Verbindungen TUG 806 (A, orange) und TUG 807 (B, orange) sowie jeweils TUG 735 (blau), ausgerichtet in der hFFAR1-Bindetasche. Stddev*Koeff-Felder: Fluor (orange), Chlor (magenta). TUG 309: pEC₅₀ pred = 7,02, pEC₅₀ exp = 6,69; TUG 806: pEC₅₀ pred = 7,42, pEC₅₀ exp = 7,01; TUG 807: pEC₅₀ pred = 7,74, pEC₅₀ exp = 7,86.

4. Ergebnisse

Des Weiteren wurden neue Verbindungen charakterisiert, die am Ethinyllinker einen Butenylrest tragen. Das Fluoratom in ortho-Stellung zum Propionsäureteil führt zu einer Steigerung der Wirkstärke (TUG 770, TUG 863). Dies ist auch bei den Derivaten von TUG 757 und 758 (Tab. 22) der Fall. Die Potenz dieser cis- bzw. trans-Butenyl-Derivate (TUG 785 und TUG 784) wird durch die genannte Fluor-Substitution um etwa 0,4 Log-Einheiten erhöht. Eine zusätzliche Hydroxygruppe am Butenylrest erniedrigt die Potenz (vgl. TUG 784 und 795). Das AFMoC-Modell sagt für alle in Tab. 22 aufgeführten Substanzen mit Ausnahme von TUG 784 eine ähnliche Wirkstärke voraus. Die Erhöhung der experimentell ermittelten Wirkstärke kann für die Verbindungen TUG 784 und 785 mit der Besetzung des Stddev*Koeff-Feldes durch das Fluoratom erklärt werden. Die generell niedrigere vorhergesagte gegenüber der tatsächlichen Wirkstärke dieser Verbindungsgruppe konnte anhand des AFMoC-Modells nicht eindeutig geklärt werden.

Tabelle 22:

Einfluss des Fluorsubstituenten in ortho-Position der Propionsäure anhand der Derivate von TUG 757 und 758.



Code	R1	R2	R3	pEC ₅₀ ± SEM [#] [E _{max} [§]]	pEC ₅₀ pred
TUG 757	Me	H	H	7,05 ± 0,02 [92]	6,63'
TUG 758	H	Me	H	7,25 ± 0,04 [95]	6,94'
TUG 785	Me	H	F	7,43 ± 0,02 [97]	6,78
TUG 784	H	Me	F	7,69 ± 0,03 [103]	6,67
TUG 795	H	CH ₂ OH	F	6,37 ± 0,06 [105]	6,87

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca²⁺-Assay, [§] in % des TUG 20-induzierten Signals, 'aus LOO-Kreuzvalidierung

4.3.5 Pharmakophormodell und Entwurf neuer Liganden

Die AFMoC-Analyse ermöglicht durch die Anzeige der gewichteten Faktoren, die aus der PLS stammen, eine Einteilung der hFFAR1-Rezeptorbindetasche in Räume, in denen sich die Anwesenheit bestimmter Atomtypen positiv oder negativ auf die Rezeptoraktivierung auswirkt (positive oder negative Stddev*Koeff-Felder). Abb. 77 zeigt die positiven Stddev*Koeff-Felder für alle in diesem Modell verwendeten Atomtypen mit den Leitstrukturen TUG 770 und TUG 469 als Grundlage zum Design neuer hFFAR1-Liganden. Als eine geeignete Position für ein Carbonylsauerstoffatom (O.2) ist der Raum definiert, in der die Säurefunktion der Liganden zu finden ist. Räume für aromatische Kohlenstoffatome (C.ar) befinden vorwiegend in den Bereichen, die denen auch die Phenylringe der gezeigten Leitstrukturen ausgerichtet wurden. Für das Anilin-Stickstoffatom lagen der *DrugScore*-Bewertungsfunktion zur Berechnung der Paarpotentiale keine Kristallinformationen zur Verfügung. Daher können als Näherung für den Anilin-N die Felder für das Amid-N (N.am) verwendet werden. Amid- und Anilin-Stickstoffe besitzen ähnliche elektronische Eigenschaften. Die positiven Stddev*Koeff-Felder für den Amid-N sowie für das Ethersauerstoffatom (O.3) umfassen die Position des Anilin-N-Atoms von TUG 469 bzw. des Phenoether-O-Atoms bei den Analoga von TUG 20. Die Positionierung von tetraedrischen C-Atomen (sp^3 -hybridisiert) beschränkt sich auf die Region um den Ethylenlinker der 3-Phenylpropionsäureeinheit sowie einigen Räumen um den terminalen Phenylring beider großen Substanzklassen (TUG 309- und TUG 469-Analoga). Interessant sind vor allem die aufgeführten Bereiche für Halogene. Erweiterungen mit Fluor, Chlor und Brom sind bei den TUG 469-Analoga denkbar, da diese viele mögliche Positionen für eine Derivatisierung bieten.

Die Stddev*Koeff-Felder der Atomtypen decken die Lage genereller Strukturmerkmale in der Bindetasche der Liganden auf, die für die Rezeptoraktivierung essentiell sind. Da wäre zum einen die Carbonsäurefunktion zu nennen, die eine Schlüsselrolle für die Rezeptoraktivierung einnimmt (Sum, 2009). Ohne einen anionischen Teil ist eine Aktivierung des Rezeptors nicht möglich. Bisher wurden keine FFAR1-Agonisten ohne diese Komponente entdeckt.

4. Ergebnisse

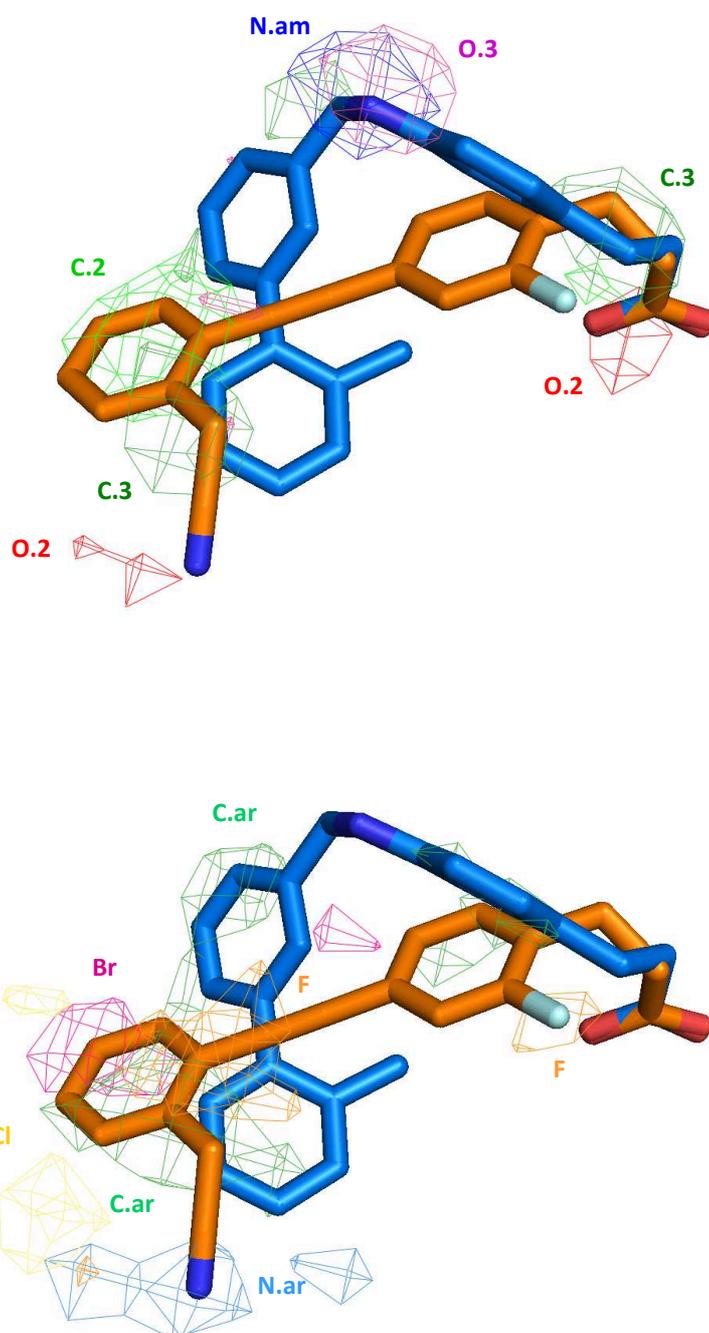


Abbildung 77:

Positive Stddev*Koeff-Felder aller im AFMoC-Modell verwendeter Atomtypen. Die Felder geben Räume an, in welcher die Anwesenheit von Atomen des jeweiligen Atomtyps zu einer Erhöhung der Wirkstärke führt. Dargestellt sind die Verbindungen TUG 770 (orange) und TUG 469 (blau). C-Atome: aromatisch (C.ar), sp^2 -hybridisiert (C.2), sp^3 -hybridisiert (C.3); N-Atome: aromatisch (N.ar), amidisch (N.am); O-Atome: sp^2 -hybridisiert (O.2), sp^3 -hybridisiert (O.3); Halogenatome: Fluor (F), Chlor (Cl), Brom (Br).

Weniger essentiell für die Aktivität der Liganden hingegen sind die günstigen Bereiche für die Position von Amid-N- bzw. Ether-O als Verknüpfung zwischen der Biphenyl- und der 3-

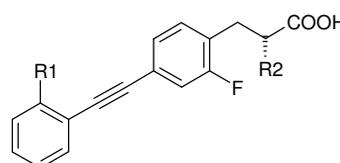
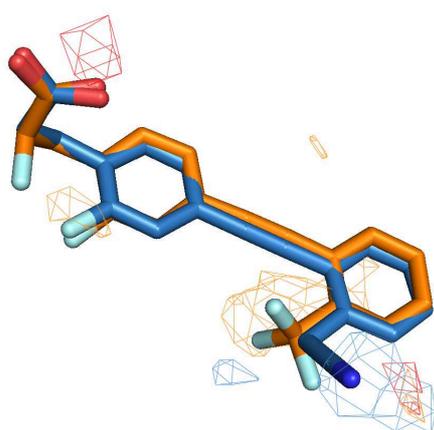
4. Ergebnisse

Phenylpropionsäureeinheit von TUG 469-Analoga. Das Vorhandensein eines N- bzw. O-Atoms in diesem Bereich trägt zwar zur Potenz der Liganden bei, es ist jedoch zweitrangig welches der beiden Atome vorliegt (vgl. Kap. 4.2.1.4.2).

Die Felder schaffen ferner Möglichkeiten für eine zielgerichtete Strukturweiterung von Liganden oder für eine Auswahl der Positionierung diverser Substituenten. So können zum einen Verbindungen mit Ethinylverlinkung (TUG 309 als Leitstruktur) um Eigenschaften der TUG 469-Analoga erweitert werden wie auch umgekehrt. Die Möglichkeiten im Einzelnen werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

4.3.5.1 Tolan-Verbindungen (TUG 770-Analoga)

Ausgangspunkt für das Design neuer Verbindungen der Tolangruppe war der bis dato potenteste Vertreter TUG 770 (Abb. 78) mit einem $pEC_{50 \text{ exp}}$ -Wert von 8,21. Die berechnete Wirkstärke durch das AFMoC-Modell beträgt 7,52. Die vorhergesagte Wirkstärke liegt also 0,7 Log-Einheiten unter der experimentell ermittelten. Abb. 78 zeigt die Struktur und die Aktivitätsvorhersagen für Derivate von TUG 770, die anhand der Felderanalyse entworfen wurden.



Code	R1	R2	$pEC_{50 \text{ pred}}$
TUG 770	CH ₂ CN	H	7,52'
A1	CF ₃	H	7,70
A2	CH ₂ CN	F	7,73
A3	CF ₃	F	7,92

Abbildung 78:

Design neuartiger hFFAR1-Agonisten auf Basis der Felderanalyse im AFMoC. TUG 770 (blau) diente hier als Ausgangspunkt für die neuen Verbindungen (A1-A3). Graphik: Ausrichtung von TUG 770 (blau) und A3 in der hFFAR1-Bindetasche. Positive Stddev*Koeff-Felder: N.ar (blau), F (orange), O.2 (rot). Tabelle: Strukturformeln und vorhergesagte Wirkstärken der neu entworfenen Liganden im Vergleich zu TUG 770.

'aus LOO-Kreuzvalidierung

4. Ergebnisse

Die Tolanverbindungen bieten zwar eine überschaubare Anzahl von Erweiterungsmöglichkeiten. Dennoch sind strukturelle Änderungen möglich, die die Aktivität laut AFMoC-Analyse steigern. Das Einführen von zusätzlichen Fluorsubstituenten erhöht die vorhergesagte Aktivität des Liganden TUG 770. Zum einen steigert der Ersatz des Cyanoests mit einer Trifluormethylgruppe (A1) die Potenz um 0,2 Log-Einheiten. Ferner wird für die Anwesenheit eines Fluoratoms in α -Position zur Carboxylgruppe (A2) laut AFMoC-Analyse ebenfalls eine Steigerung um 0,2 Log-Einheiten erreicht. Bei einer Kombination der beiden Änderungen (A3) steigt die vorhergesagte Aktivität um 0,4 Log-Einheiten. Zwar liegen die Werte für die Aktivität dieser neuen Verbindungen unter der experimentell Ermittelten für TUG 770. Wenn jedoch berücksichtigt wird, dass die Vorhersage für TUG 770 schlechter war als experimentell bestimmt, könnten die neuen Verbindungen A1-A3 eine durchaus hohe Potenz aufweisen.

4.3.5.2 GW9508/TUG 501-Analoga

TUG 501 (Abb. 79) als Ausgangspunkt für das Design neuer hFFAR1-Liganden besitzt zwar mit einem experimentell ermittelten pEC_{50} -Wert von 6,74 keine sonderlich hohe Wirkstärke am hFFAR1, jedoch ergeben sich aufgrund dessen räumlicher Ausrichtung in der Rezeptorbindungstasche (Kap. 4.3.5, Abb. 77) viele Möglichkeiten für eine Strukturweiterung.

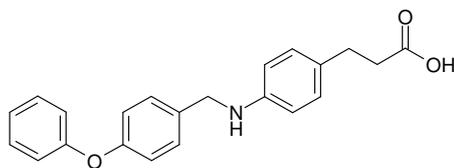


Abbildung 79:

Struktur von TUG 501 als Ausgangspunkt für den Entwurf neuartiger hFFAR1-Liganden.

Die vorhergesagte Aktivität durch das AFMoC-Modell ist mit 6,81 dem *in vitro* ermittelten Wert nahezu gleich. Noch vor der Betrachtung der Stddev*Koeff-Felder ergab bereits ein Blick in die Rezeptorumgebung mögliche strukturelle Erweiterungen (Abb. 80). Der Amidstickstoff des Aminosäurerests von Asn241 kann mit einem Carbonylsauerstoff des Liganden eine Wasserbrückenbindung eingehen. Daher wurden die in diesem Ansatz neu

4. Ergebnisse

entworfenen Verbindungen mit einem Acetylrest am terminalen Phenylring versehen. Ferner könnte sich eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff des Helixrückgrats von Glu145 und einer am Ligand eingeführten Hydroxylgruppe in ortho-Position zum Propionsäureteil ausbilden (Abb. 80). Des Weiteren können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Aminosäurerest von Asn241 bzw. dem Rückgrat von Glu145 mit einer Acetyl- bzw. Hydroxylgruppe am Liganden angenommen werden. Unter Berücksichtigung der positiven Stddev*Koeff-Felder für Fluor (orange) wurden an den Substanzentwürfen ferner noch Fluoratome angebracht, die die positiven Fluorfelder räumlich gut besetzen (Abb. 80).

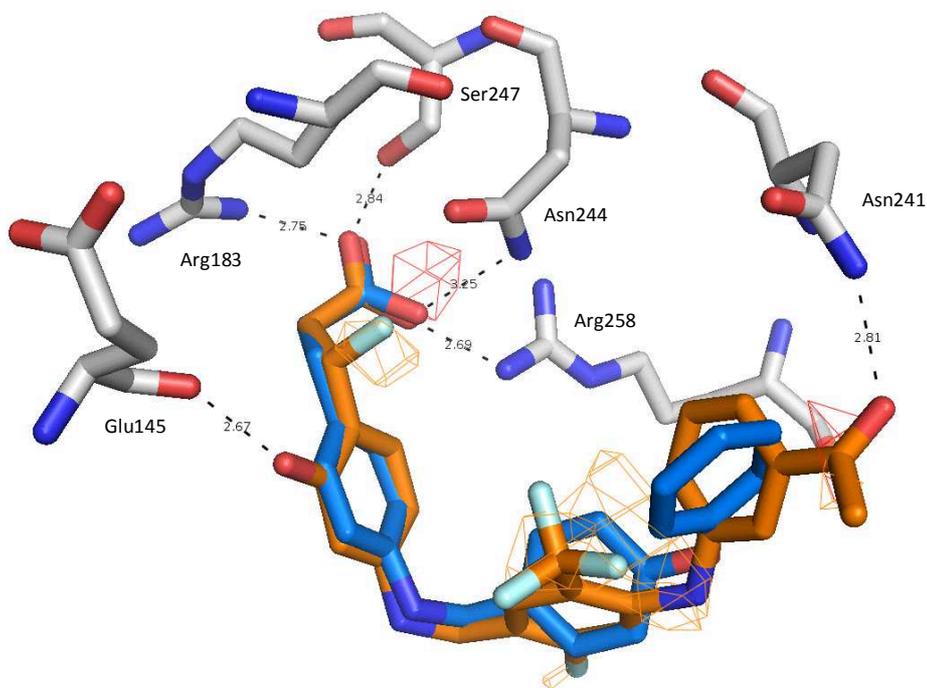


Abbildung 80:

Überlagerung der neu entworfenen Verbindung C2 (orange) und der zugrunde liegenden Leitstruktur TUG 501 (blau), ausgerichtet in der hFFA1-Rezeptorbindetasche. Stddev*Koeff-Feld: Fluor (orange), O.2 (rot). Die gestrichelten Linien weisen die Distanz zwischen den Atomen auf. Atome: Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau).

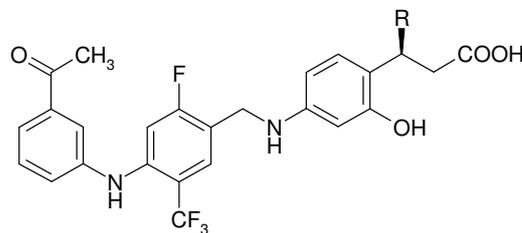
Tab. 23 zeigt die Strukturentwürfe möglicher potenter hFFAR1-Agonisten auf Basis der TUG 501-Grundstruktur. Neben dem meta-ständigen Acetylrest am terminalen Phenylring und der Hydroxygruppe in 2-Stellung des zentralen Phenylrings besitzen diese eine Trifluormethyl- sowie einen Fluor-Substituenten am zentralen Phenylring in 2,5-Stellung. Laut AFMoC-Analyse werden mit diesen Entwürfen $pEC_{50 \text{ pred}}$ -Werte im Bereich von knapp über 8

4. Ergebnisse

möglich. Des Weiteren wurde das bereits bei den TUG 770-Derivaten verwendete Fluor-motiv am Propionsäureteil angebracht, allerdings hier am β -C-Atom. Hierbei steigert primär eine Substitution die Wirkstärke, nicht die Anzahl der angefügten Fluoratome (Tab. 23). Letztlich führen diese strukturellen Abänderungen im Vergleich zur TUG 501 in ihrer Gesamtheit zu einem theoretischen Zugewinn an Wirkstärke von rund 1,2 Log-Einheiten, was einer Steigerung um das 16-fache entspricht.

Tabelle 23:

Neu entworfene Verbindungen als potentielle hFFAR1-Liganden auf Basis der Leitstruktur TUG 501.



Code	R	pEC ₅₀ pred
C1	CH ₃	8,02
C2	F	8,06
C3	CH ₂ F	8,04

4.3.5.3 Biphenyl-Verbindungen (TUG 469-Analoga)

4.3.5.3.1 Entwurf der Verbindungen

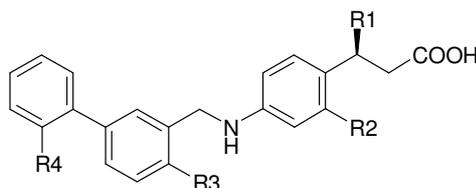
Analoga der Biphenyl-Verbindung TUG 469 sind interessant, da TUG 469 mit einem pEC₅₀_{exp}-Wert von 7,78 eine hohe experimentelle Wirkstärke besitzt und eine Wirkung *in vivo* nachgewiesen werden konnte (Kap. 4.5). Die vorhergesagte Aktivität von TUG 469 liegt laut AFMoC-Analyse bei 7,64. Die Hydroxylierung des Phenylrings in ortho-Position zur Propionsäureeinheit kann zu einer Wechselwirkung mit dem Carbonylsauerstoff der Amidbindung von Glu145 führen. Dieses Motiv ist bereits aus Reihe **C** der entworfenen Verbindungen bekannt (Kap. 4.3.4). Laut AFMoC-Analyse bewirkt dies bereits eine Steigerung der vorhergesagten Wirkstärke von 7,64 (für TUG 469) auf 7,82 (Tab. 24). Neben der zusätzlichen Hydroxygruppe, wurde die Methylgruppe am terminalen Phenylring durch eine Trifluormethylgruppe ersetzt (B2), was zu einer weiteren Erhöhung der vorhergesagten Wirkstärke

4. Ergebnisse

um 0,34 Log-Einheiten führt. Das Anbringen einer Methylgruppe (B3) oder einer weiteren Hydroxygruppe (B4) am zentralen Phenylring ergibt keine weitere Steigerung der Wirkstärke. Lediglich eine Fluorierung in β -Stellung zur Carbonsäure erhöht den vorhergesagten pEC_{50} -Wert um weitere 0,1 Log-Einheiten (B5).

Tabelle 24:

Neu entworfene Verbindungen als potentielle hFFAR1-Liganden auf Basis der Leitstruktur TUG 469.



Code	R1	R2	R3	R4	pEC_{50} pred
TUG 469	H	H	H	CH ₃	7,65'
B1	H	OH	H	CH ₃	7,82
B1b	H	OMe	H	CH ₃	7,02
B2	H	OH	H	CF ₃	8,16
B2b	H	OMe	H	CF ₃	7,34
B3	H	OH	CH ₃	CF ₃	8,15
B4	H	OH	OH	CF ₃	8,08
B5	F	OH	H	CF ₃	8,25

'aus LOO-Kreuzvalidierung

Strukturelle Änderungen von TUG 469 scheinen viel versprechend. Das Phenolmotiv und die Fluorierungen steigern die Wirkstärke des Liganden im Vergleich zu TUG 469 laut AFMoC-Analyse um 0,74 Log-Einheiten, was einer 5,5-fachen Steigerung der Potenz entspricht. Abb. 81 zeigt anhand von B5 wie sich die strukturellen Abänderungen gegenüber TUG 469 auf die Bindung am hFFAR1 auswirken.

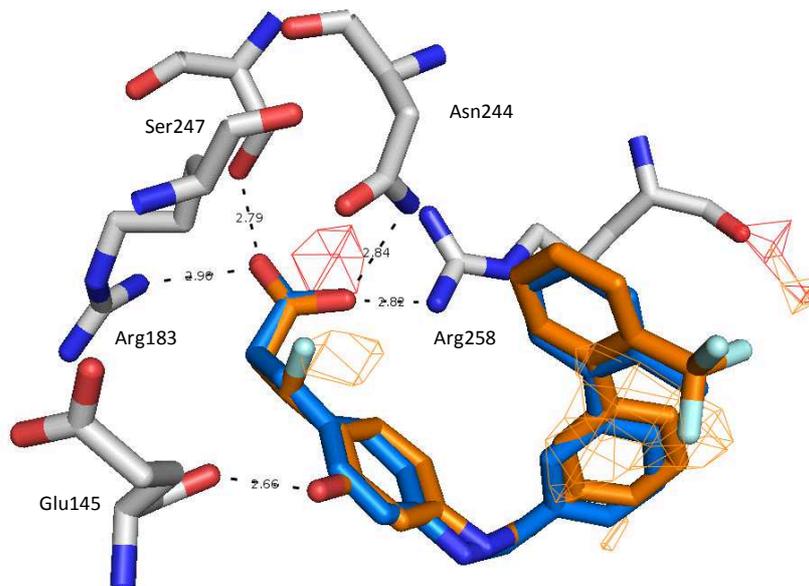


Abbildung 81:

Überlagerung der neu entworfenen Verbindung B5 (orange) und der zugrunde liegenden Leitstruktur TUG 469 (blau), ausgerichtet in der hFFA1-Rezeptorbindetasche. Stdev*Koeff-Feld: Fluor (orange), O.2 (rot). Die gestrichelten Linien weisen die Distanz zwischen den Atomen auf. Atome: Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau).

Die für Fluor günstigen Felder werden bei B5 von der endständigen CF_3 -Gruppe bzw. von Fluor in β -Position der Propionsäure räumlich getroffen. Ferner können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonylsauerstoff des Glu145-Rückgrats und der Hydroxygruppe am Liganden angenommen werden.

4.3.5.3.2 Biologische Prüfung der Vorhersage

Aus Gründen der Synthetisierbarkeit sowie der erbrachten *in vivo*-Aktivität und hohen Selektivität der Leitstruktur TUG 469 (Kap. 4.5 und 4.6) wurde entschieden, strukturelle Abänderungen ausgehend von der TUG 469 vorzunehmen. Die Synthese der Verbindungen B1 und B2 wurde im Arbeitskreis von Prof. T. Ulven (University of Southern Denmark) begonnen. Leider standen bis zur Anfertigung dieser Arbeit nur die jeweiligen Methoxyvorstufen B1b und B2b für eine *in vitro*-Charakterisierung zur Verfügung. Die vorhergesagte Wirkstärke der beiden Endstufen beträgt 7,82 für B1 und 8,16 für B2 ($\text{pEC}_{50 \text{ pred}}$). Dies

4. Ergebnisse

entspricht einem theoretischen Zuwachs an Wirkstärke im Vergleich zur Ausgangsverbindung TUG 469 von durchschnittlich 0,5 Log-Einheiten. B1 und B2 besitzen am Phenylring in ortho-Position zum Propionsäureteil eine zusätzliche Hydroxygruppe, die eine Wasserstoffbrücken-Donorfunktion annehmen kann. Diese Funktion ist bei den Methoxyvorstufen nicht gegeben. Eine Wasserstoffbrücke zu Glu145 kann sich nicht ausbilden (Abb. 82).

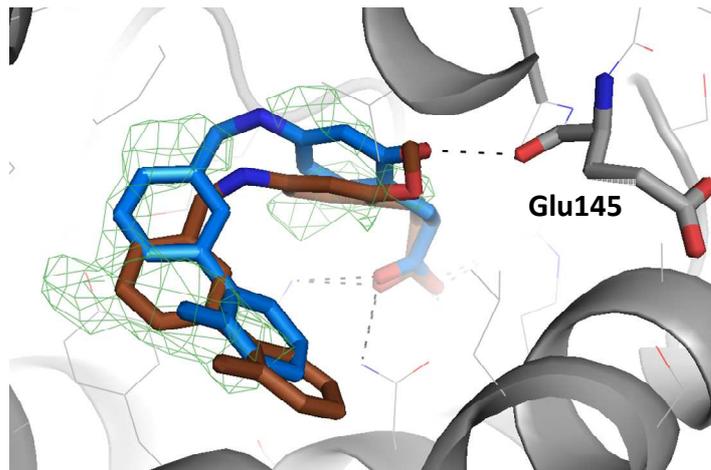


Abbildung 82:

Komplex zweier Liganden (blau: B1; braun: B1b) mit der hFFAR1-Bindetasche. Die gestrichelten Linien deuten ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Liganden und den Aminosäureresten des hFFAR1-Rezeptors an. Positives Stddev*Koeff-Feld: C.ar (grün).

Eine freie Hydroxygruppe wie bei B1 wird bei der Ausrichtung der Verbindung in der Rezeptorbindetasche mit MOLOC wegen der sich ergebenden H-Brücke angezogen, die Methoxygruppe hingegen bleibt hiervon unberührt. Daher weicht die Position der Methoxyvorstufe im Raum von der der Hydroxyendstufe ab (Abb. 82). Die Stddev*Koeff-Felder für C.ar werden von den Phenylringen der Methoxyvorstufe weniger gut besetzt. Die vorhergesagten pEC_{50} -Werte liegen mit 7,02 für B1b und 7,34 für B2b demnach wesentlich niedriger. Es konnte eine gute Übereinstimmung der experimentellen mit den vorhergesagten Wirkstärken der Methoxyvorstufen ermittelt werden. Die Konzentrations-Effekt-Kurven der Methoxyvorstufen B1b und B2b sind in Abb. 83 aufgeführt. Eine Charakterisierung an hFFAR1-1321N1-Zellen ergab einen $pEC_{50\text{ exp}}$ -Wert von 7,37 für B1b und 7,05 für B2b.

4. Ergebnisse

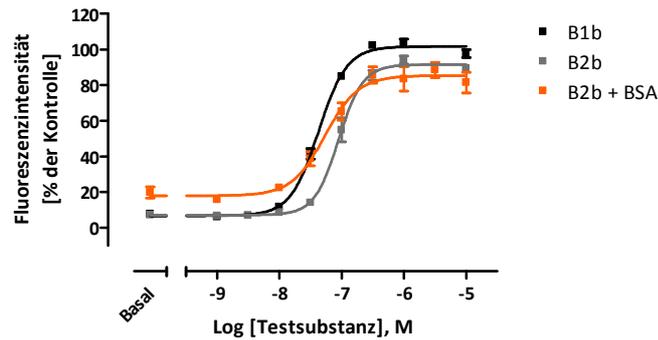


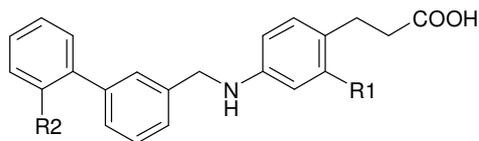
Abbildung 83:

Konzentrations-Effekt-Kurven der Methoxyvorstufen B1b und B2b mit Hilfe des Ca^{2+} -Assays an 1321N1-hFFAR1-Zellen. Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. Kontrolle: TUG 20 (10 μM)-induziertes Signal. Basal: Stimulation mit Assaypuffer. Die verwendete BSA-Konzentration ist 0,05% (w/v). B1b: $\text{pEC}_{50} = 7,37 \pm 0,02$ ($n\text{H} = 1,91 \pm 0,14$; $E_{\text{max}} = 102 \pm 1$); B2b: $\text{pEC}_{50} = 7,05 \pm 0,03$ ($n\text{H} = 2,23 \pm 0,33$; $E_{\text{max}} = 91 \pm 2$). B2b + BSA: $\text{pEC}_{50} = 7,27 \pm 0,07$ ($n\text{H} = 1,62 \pm 0,33$; $E_{\text{max}} = 85 \pm 3$).

Tab. 25 fasst die Struktur-Aktivitätsbeziehungen der beiden Vor- und Endstufen noch einmal zusammen. Die experimentelle Bestätigung der Wirkstärkenvorhersage beider Methoxyvorstufen B1b und B2b ist ein weiterer Nachweis für die Güte der Vorhersage des AFMoC-Modells.

Tabelle 25:

Experimentelle und vorhergesagte Wirkstärke von neu entworfenen hFFAR1-Agonisten der Reihe B.



Code	R1	R2	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SEM}^{\#} [E_{\text{max}}^{\S}]$	$\text{pEC}_{50}^{\text{pred}}$
TUG 469	H	CH_3	$7,78 \pm 0,03$ [114]	7,65 [']
B1	OH	CH_3	-	7,82
B1b	OMe	CH_3	$7,37 \pm 0,02$ [102]	7,02
B2	OH	CF_3	-	8,16
B2b	OMe	CF_3	$7,05 \pm 0,03$ [91]	7,34
B2b	OMe	CF_3	$7,27 \pm 0,07$ [85]*	-

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca^{2+} -Assay, [§] in % des TUG 20-induzierten Signals, * in Gegenwart von 0,05% (w/v) BSA, ['] LOO-Kreuzvalidierung

4.4 Ex vivo-Charakterisierung ausgewählter hFFAR1-Agonisten

Nach einer *in vitro*-Charakterisierung der aktiven hFFAR1-Liganden (Kap. 4.2) mit Hilfe der Calcium-Mobilisierung am rekombinanten Zellsystem wurden der hoch-potente hFFAR1-Agonist TUG 469 mit einem pEC_{50} -Wert von 7,78 sowie der Referenzagonist GW9508 mit einem pEC_{50} von 7,56 ausgewählt, um an der Insulin-sezernierenden Ratten-Insulinoma-Zelllinie (INS-1) weiterführend charakterisiert zu werden. Ziel war es, hierbei zu prüfen, ob TUG 469 unter physiologischen Bedingungen in der Lage ist, den FFAR1 zu stimulieren. INS-1-Zellen exprimieren den FFAR1 nativ. Demzufolge musste damit gerechnet werden, dass die Effekte von TUG 469 an den INS-1-Zellen geringer ausfallen als am rekombinanten 1321N1-Zellsystem. Die Wirkstärke von TUG 469 am Ratten-FFAR1 ist bisher nicht ermittelt worden. Möglicherweise unterscheidet sich zudem die Affinität von TUG 469 am Ratten-FFAR1 von der am humanen FFAR1. Aus Untersuchungen von Negoro et al. zu dem hFFAR1-Agonisten TAK-875, einer dem TUG 469 strukturell sehr ähnlichen Verbindung, ist bekannt, dass dessen Wirkstärke am Ratten-FFAR1 gegenüber der humanen Form etwa halb so hoch ist (Negoro, 2010). Für die *ex vivo*-Charakterisierung von TUG 469 wurden zunächst funktionelle Studien mit dem Ca^{2+} -Assay an INS-1-Zellen durchgeführt. Ferner wurden TUG 469 und GW9508 mit einer Zellimpedanzmessung an INS-1-Zellen untersucht. Zuletzt wurde der Insulinsekretions-Assay zum Nachweis eines insulinotropen Effekts von TUG 469 herangezogen.

4.4.1 Funktionelle Studien

4.4.1.1 Ca^{2+} -Assay

An den INS-1E-Zellen konnten keine Effekte von FFAR1-Liganden mit den bisher verwendeten Assays (Ca^{2+} - und cAMP) beobachtet werden. Abwandlung des bestehenden Ca^{2+} -Assays mit Ersatz von OG gegen den ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 erlaubte die Ermittlung eines Signals für hohe TUG 469-Konzentrationen. Hierbei wurden folgende Abänderungen zu den üblichen Messbedingungen gemacht: 1. Inkubationszeit für die ausplattierten INS-1-Zellen betrug 48 anstelle der 24 Stunden bei 1321N1-Zellen, 2. Fura-2 wurde in dergleichen Konzentration wie Oregon Green® verwendet. Die Anregung des

4. Ergebnisse

Farbstoffs fand alternierend bei 320 und 390 nm statt. Für die Signalauswertung wurde ein Verhältnis der Emissionswerte bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge gebildet. Abb. 84 zeigt das Ergebnis für den Effekt von TUG 469 auf die $[Ca^{2+}]_i$ in den INS-1-Zellen. 10 μ M TUG 469 zeigt keinen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Erst 50 μ M TUG 469 führt zu einem signifikanten Anstieg, gegenüber Basalniveau und DMSO. Weitere hFFAR1-Agonisten, wie Linolsäure und GW9508, und andere Wirkstoffe (wie ATP, UDP und Histamin) erzeugten keine signifikanten Ca^{2+} -Effekte an den INS-1-Zellen.

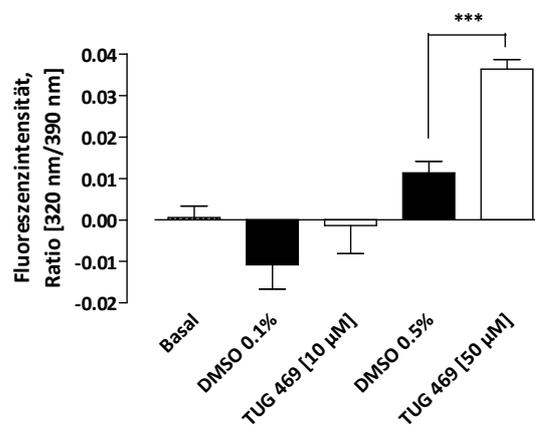


Abbildung 84:

Effekt von TUG 469 auf das Ca^{2+} -Signal in INS-1-Zellen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 im Ca^{2+} -Assay. Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. *** signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$ für zweiseitigen ungepaarten T-Test). Basal meint Stimulation mit Assaypuffer.

Da sich der in Abb. 84 dargestellte Effekt in INS-1 nur bei der Testsubstanz TUG 469 und nur bei der hohen Konzentration von 50 μ M zeigte, konnte hiermit keine ausreichende Charakterisierung der Testverbindung an den INS-1-Zellen erfolgen. Als Alternative hierzu wurde eine Zellimpedanzmessung durchgeführt.

4.4.1.2 Impedanz-Messung

Abb. 85 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven von TUG 469 und GW9508 an hFFAR1-überexprimierenden 1321N1-Zellen (A) sowie an INS-1-Zellen (B) gemessen mit Hilfe der Zellimpedanz. In beiden Zellsystemen zeigt TUG 469 gegenüber GW9508 eine höhere Wirkstärke bei vergleichbarem E_{max} . Mit pEC_{50} -Werten von 7,17 für TUG 469 und 6,69 für GW9508 am

4. Ergebnisse

rekombinanten hFFAR1-Zellsystem liegen die pEC_{50} -Werte der Zellimpedanzmessung im Bereich der pEC_{50} Werte des cAMP-Assays. Die Wirkstärken bei der Zellimpedanzmessung an den INS-1-Zellen sind für GW9508 11-fach und für TUG 469 etwa 5-fach geringer gegenüber jenen am rekombinanten Zellsystem. Ferner auffällig ist, dass an den rekombinanten Zellen maximale Cell-Index (CI)-Werte (Kap. 3.2.2.2.3), ein Maß für die Änderung des zellinduzierten Widerstands, von 1,0, an den INS-1-Zellen von nur 0,15 erreicht werden. Da INS-1-Zellen den FFAR1 der Ratte nativ exprimieren, liegen die Wirkstärken und E_{max} -Werte erwartungsgemäß niedriger. Die Wirkstärke von TUG 469 ist an INS-1 etwa 7-fach höher als die von GW9508.

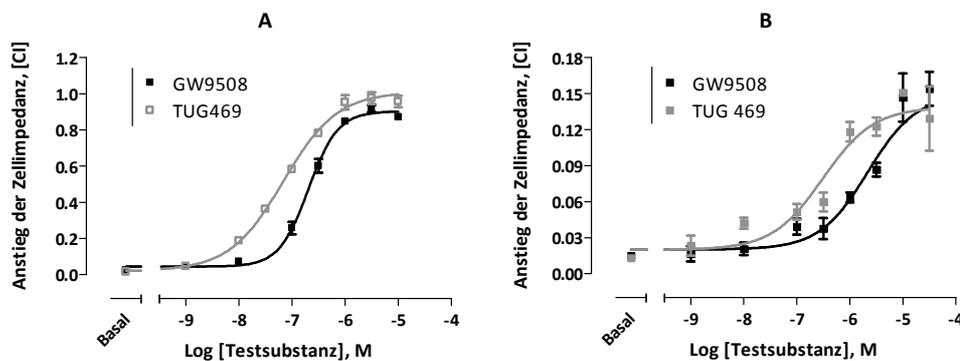


Abbildung 85:

Konzentrations-Effekt-Kurven zur Charakterisierung der Aktivität von GW9508 und TUG 469 an 1321N1-hFFAR1-Zellen (A) bzw. INS-1-Zellen (B) mit Hilfe der Impedanzmessung. Alle Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Duplikaten. CI: Basal-normierter Cell Index. (A) TUG 469: $pEC_{50} = 7,17 \pm 0,04$ ($nH = 0,85 \pm 0,07$; $E_{max} = 1,01 \pm 0,02$); GW9508: $pEC_{50} = 6,69 \pm 0,03$ ($nH = 1,57 \pm 0,14$; $E_{max} = 0,90 \pm 0,01$). (B) TUG 469: $pEC_{50} = 6,51 \pm 0,16$ ($nH = 0,91 \pm 0,26$; $E_{max} = 0,14 \pm 0,01$); GW9508: $pEC_{50} = 5,66 \pm 0,18$ ($nH = 0,95 \pm 0,26$; $E_{max} = 0,15 \pm 0,02$).

4.4.2 Insulinsekretion an INS-1-Zellen

TUG 469 wurde in einem Insulinsekretions-Assay an Ratten-INS-1-Zellen getestet. Aus der Literatur ist bekannt, dass FFAR1-Agonisten ihren Effekt auf die Insulinsekretion nur bei hohen Glucosekonzentrationen zeigen (Christiansen, 2010; Christiansen, 2008). Daher fand die Stimulation der Zellen bei einer Glucosekonzentration von 16,7 mM (300 mg/dl) statt. Abb. 86 zeigt den Effekt von TUG 469, GW9508 und Forskolin auf die Insulinsekretion an INS-1E-Zellen.

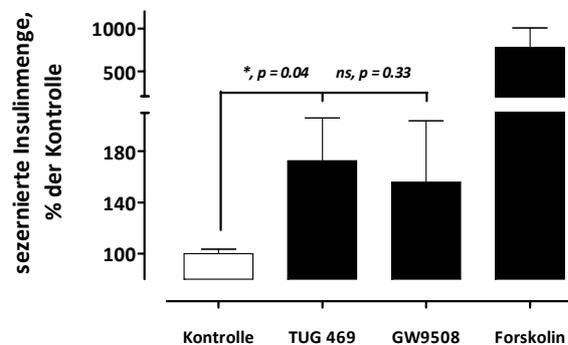


Abbildung 86:

Effekt von je 5 μ M TUG 469, GW9508 und Forskolin auf die Insulinsekretion an INS-1E-Zellen in Gegenwart von 16,7 mM (300 mg/dl) Glucose. Die Stimulationszeit betrug 30 Minuten. Daten stammen aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten je in Duplikaten. Kontrolle: Stimulation mit Assaypuffer inkl. 0,05% DMSO und 16,7 mM Glucose. * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$ für zweiseitigen ungepaarten T-Test), *ns* nicht signifikant.

TUG 469 führt zu einer signifikanten Erhöhung der glucoseinduzierten Insulinsekretion um etwa 70% gemessen an der Kontrolle. Die eingesetzte Konzentration der beiden Testsubstanzen von 5 μ M wurde aufgrund der Ergebnisse der Impedanzmessung ausgewählt. Bei einer Konzentration von 5 μ M erreicht TUG 469 in der Impedanzmessung bereits den E_{max} , GW9508 hingegen nur 70% des E_{max} (vgl. Abb. 85 B / Kap. 4.4.1.2). Die Forskolin-induzierte Erhöhung der Insulinsekretion dient als Positivkontrolle der Insulinsekretion.

4.5 In vivo-Charakterisierung des hFFAR1-Agonisten TUG 469

TUG 469 ist eine der potentesten in dieser Arbeit beschriebenen hFFAR1-Liganden ($EC_{50} = 17 \text{ nM}$). Nur TUG 770 und 863 sind mit 6 bzw. 9 nM noch potenter. Zum Zeitpunkt des Tests im Tiermodell war TUG 469 allerdings die potenteste charakterisierte Verbindung. TUG 469 ist an rekombinanten Zellen im Ca^{2+} -Assay gegenüber dem Referenzagonisten GW9508 ($EC_{50} = 28 \text{ nM}$) etwa 40%, im cAMP-Assay etwa 66% potenter (EC_{50} : TUG 469 = 81 nM, GW9508 = 240 nM). Ferner war sowohl Wirkstärke als auch E_{max} von TUG 469 an den INS-1-Zellen bei der Zellimpedanzmessung gegenüber GW9508 größer. TUG 469 ist außerdem im Vergleich zu GW9508 und TUG 770 deutlich selektiver für den hFFAR1 verglichen mit dem GPR120 (Kap. 4.6.2). Aus diesen Gründen wurde entschieden, TUG 469 in einer Tierstudie an Mäusen auf eine Verbesserung der Glucosetoleranz zu untersuchen.

4.5.1 Tierstudie an normalen Mäusen

Zunächst wurden normalgewichtige Mäuse des Stamms C57/BL-6 verwendet. Abb. 87 zeigt den Verlauf der Blutglucosekonzentration während eines Glucosetoleranz-Tests (GTT), bei dem neben einer NaCl-Lösung und Vehikel-Lösung (0,9% NaCl-Lösung + 0,5% Tween®20) als Kontrollen TUG 469 in einer Dosis von 1 bzw. 5 mg/kg Körpergewicht verabreicht wurden.

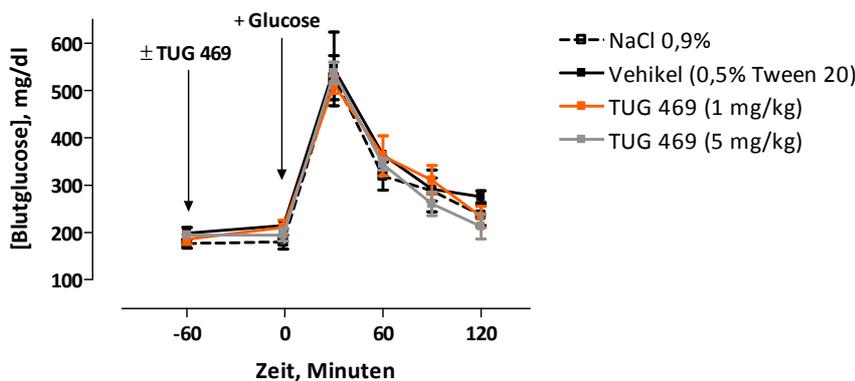


Abbildung 87:

Verlauf der Blutglucosekonzentration während des intraperitonealen Glucosetoleranz-Tests an C57/BL-6 Mäusen. 0,9% (w/v) NaCl, Vehikel-Kontrolle und TUG 469 wurden intraperitoneal 1 Stunde vor Glucosegabe verabreicht (-60 Minuten). 2,5 g Glucose / kg Körpergewicht wurde zum Zeitpunkt 0 Minuten intraperitoneal verabreicht. Alle Daten stellen Mittelwerte und SEM von drei Mäusen im Alter von 140-160 Tagen da.

Die Versuchstiere sind 6 Std. vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt worden. Die Nüchtern-Glucosewerte liegen bei den C57/BL-6-Mäusen bei rund 200 mg/dl. Eine Stunde nach intraperitonealer Gabe der Testlösungen bleiben diese relativ konstant. 30 Minuten nach Glucosegabe (2,5 g/kg) steigen die Glucosewerte auf 500-550 mg/dl an und fallen nach weiteren 1,5 Stunden annähernd auf die Nüchternwerte vor Glucosegabe zurück. Sowohl die Gabe des Vehikels als auch TUG 469 in beiden Dosierungen führen zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Erniedrigung der Glucosekonzentration. Eine systemische Wirkung der Testsubstanz TUG 469 ist in C57/BL-6-Mäusen nicht zu beobachten.

4.5.2 Tierstudie an diabetogenen Mäusen

In einem zweiten Experiment wurden genetisch zur Fettleibigkeit und Diabetes neigende New Zealand Obese (NZO)-Mäuse verwendet (Mirhashemi, 2011). Hier konnte eine systemische Wirkung für TUG 469 bei einer Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht nachgewiesen werden.

Abb. 88 zeigt die gemittelten Werte der Blutglucosekonzentration bei einem intraperitonealen GTT an NZO-Mäusen. Die Mäuse wurden 6 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt. Die Blutglucosekonzentration der mit der Vehikel-Kontrolle behandelten Mäuse steigt nach Gabe von 2,5 g Glucose pro kg Körpergewicht zum Zeitpunkt 0 min von etwa 280 auf etwa 600 mg/dl innerhalb von 60 Minuten. Mit TUG 469 behandelte Mäuse weisen im Schnitt einen Anstieg von etwa 180 auf etwa 420 mg/dl innerhalb von 60 Minuten auf. Der mittlere Anstieg der Blutglucosekonzentration ist daher bei den TUG 469-behandelten Mäusen um 80 mg/dl geringer.

4. Ergebnisse

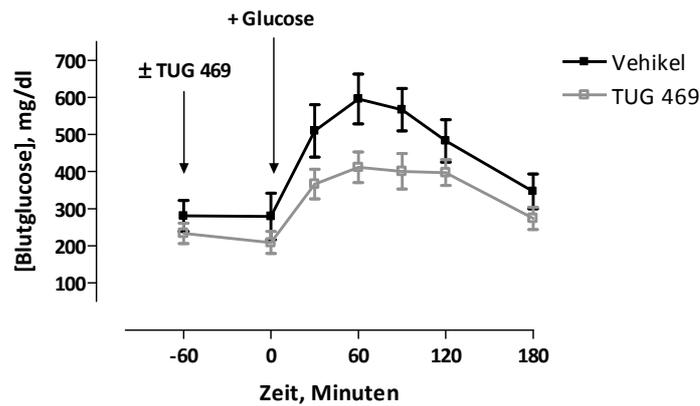


Abbildung 88:

Verlauf der Blutglucosekonzentration während des intraperitonealen Glucosetoleranz-Tests (GTT) an NZO-Mäusen. Vehikel-Kontrolle und TUG 469 (5 mg/kg Körpergewicht) wurden intraperitoneal eine Stunde vor Glucosegabe verabreicht (-60 Minuten). 2,5 g Glucose / kg Körpergewicht wurde zum Zeitpunkt 0 Minuten intraperitoneal verabreicht. Alle Daten stellen Mittelwerte und SEM von mindestens 7 Mäusen im Alter von 180-220 Tagen da.

Da sich die Ausgangswerte für Glucose bei beiden Gruppen leicht unterschieden (Abb. 88), wurden die Blutglucosekonzentrationen im Verlauf des Tests um den Ausgangswert bei -60 Minuten reduziert (Abb. 89 und 90). Der Glucosewert zum Zeitpunkt der Gabe von TUG 469 bzw. Vehikel-Kontrolle bei -60 Minuten nehmen daher den Referenzwert 0 ein. Abb. 89 zeigt zunächst den Verlauf aller Einzelkurven der 16 Mäuse. Deutlich erkennbar ist, dass die hohen Glucosespitzen in den ersten 90 Minuten nach Glucosegabe unter Gabe von TUG 469 verringert sind. Lediglich ein mit TUG 469 behandeltes Versuchstier wies einen stark erhöhten Glucosewert bei 90 Minuten auf (vgl. auch Abb. 89 bzw. 91 B).

4. Ergebnisse

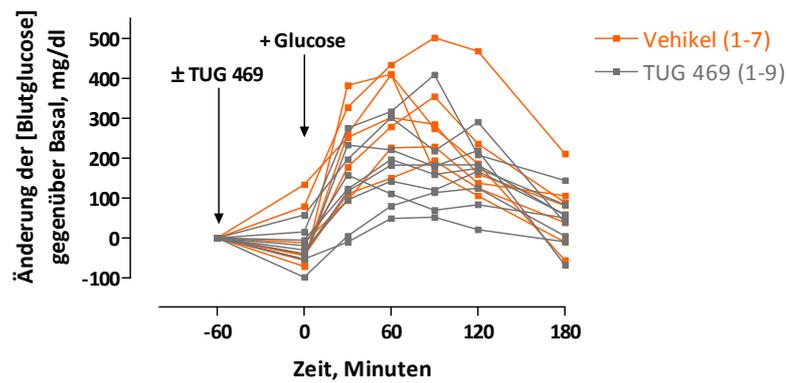


Abbildung 89:

Absoluter Anstieg der Blutglucosekonzentration für jedes einzelne Versuchstier während des intraperitonealen Glucosetoleranz-Tests an NZO-Mäusen. Alle Werte wurden anhand der Basalwerte bei -60 Minuten genormt. Vehikel-Kontrolle bzw. TUG 469 (5 mg/kg Körpergewicht) wurde intraperitoneal 1 Stunde vor Glucosegabe verabreicht (-60 Minuten). Die Gabe von 2,5 g Glucose / kg Körpergewicht erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Alle Daten sind Einzelwerte oder Mittelwerte, wenn eine Mehrfachbestimmung der Blutglucosekonzentration pro Versuchstier und Zeitpunkt erfolgte.

Abb. 90 zeigt die Blutzucker-Mittelwerte der TUG-behandelten vs. Kontroll-Mäuse. Diese unterscheiden sich bei 60 und 90 Minuten signifikant voneinander (Abb. 91 A). Vor 60 und nach 90 Minuten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten für Vehikel- und Substanzgabe beobachtet werden.

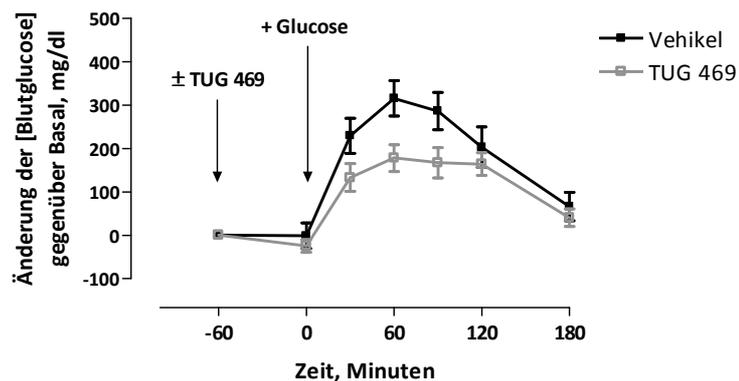


Abbildung 90:

Absoluter Anstieg der Blutglucosekonzentration während des intraperitonealen Glucosetoleranz-Tests an NZO-Mäusen. Alle Werte wurden anhand der Basalwerte bei -60 Minuten normiert. Vehikel-Kontrolle bzw. TUG 469 (5 mg/kg Körpergewicht) wurde intraperitoneal 1 Stunde vor Glucosegabe verabreicht (-60 Minuten). Die Gabe von 2,5 g Glucose / kg Körpergewicht erfolgte zum Zeitpunkt 0 min. Alle Daten stellen Mittelwerte und SEM von mindestens 7 Mäusen im Alter von 180-220 Tagen da.

4. Ergebnisse

Ferner sind die Mittelwerte der Blutglucosekonzentration der TUG 469-behandelten Gruppe gegenüber der Vehikelkontrolle zum Zeitpunkt 0 Minuten leicht erniedrigt, aber nicht signifikant verschieden. Abb. 91 A zeigt im Detail, dass Mittelwerte der Blutglucosekonzentrationen der beiden Gruppen (TUG 469 vs. Vehikel) 60 und 90 Minuten nach Glucosegabe signifikant verschieden voneinander sind. Abb. 91 B zeigt den Anstieg der Blutglucosekonzentration für die einzelnen Versuchstiere 60 und 90 Minuten nach Glucosegabe. Schließlich wurde noch die Fläche unter der Blutglucosekonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) (Abb. 89) bestimmt und die Ergebnisse in Abb. 92 dargestellt. Die Mittelwerte der AUC zwischen TUG 469-behandelter und Vehikel-Gruppe ist signifikant verschieden.

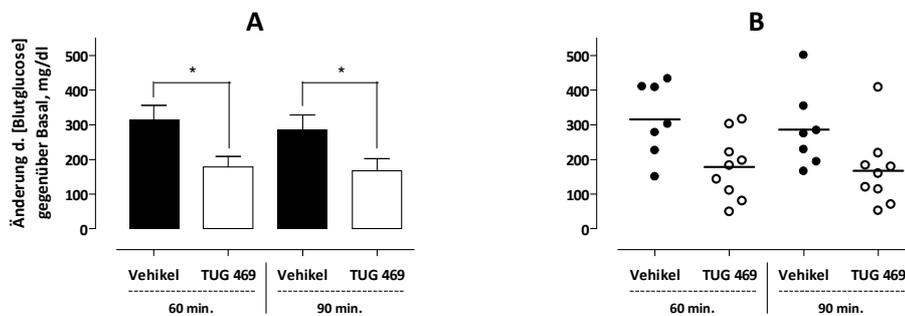


Abbildung 91:

Änderung der Blutglucosekonzentration 60 und 90 Minuten nach Glucosegabe gegenüber dem Basalniveau bei -60 Minuten bei intraperitonealem GTT an NZO-Mäusen. (A) Als Mittelwerte \pm SEM. * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$ für zweiseitigen ungepaarten T-Test). (B) Einzelwerte aller Versuchstiere und Mittelwerte (Linien).

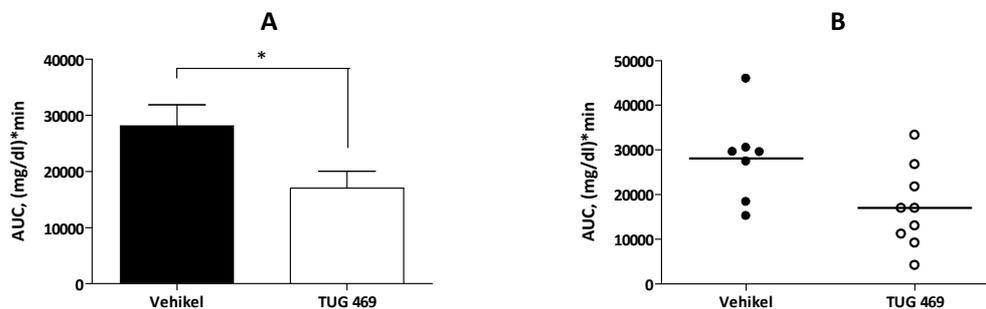


Abbildung 92:

Fläche unter der Blutglucosekonzentrations-Zeit-Kurve aus Abb. 89 von 0 bis 120 Minuten. Der Blutglucosewert bei 0 Minuten wurde als Basislinie zur Bestimmung der Fläche herangezogen. (A) Mittelwerte \pm SEM. * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$ für zweiseitigen ungepaarten T-Test). (B) Einzelwerte aller Versuchstiere und Mittelwerte (Linien).

4. Ergebnisse

Abb. 93 zeigt den Verlauf der Blutglucosekonzentration mit je einer Maus pro Gruppe, die stark erhöhte Nüchtern-Glucosewerte aufwiesen (Werte > 350 mg/dl). Zwar handelt es sich hier um eine Einzelmessung, es lässt sich dennoch erahnen, wie sich eine Gabe der Testsubstanz TUG 469 bei stark glucoseintoleranten bzw. insulinresistenten Versuchstieren auswirkt. Der Anstieg der Glucosekonzentration nach Glucosegabe ist bei der TUG 469-behandelten Maus moderat, fällt bei der Vehikel-behandelten Maus aber massiver aus. Sehr ausgeprägt zeigt sich auch ein Unterschied bei 0 Minuten, also 1 Std. nach TUG 469-Gabe. Das TUG 469-behandelte Versuchstier zeigt einen niedrigeren, das Versuchstier der Vehikelkontrolle einen stark erhöhten Blutglucosewert gegenüber dem Basalwert.

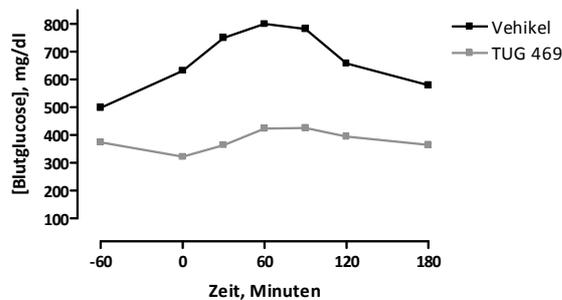


Abbildung 93:

Verlauf der Blutglucosekonzentration bei intraperitonealem GTT an zwei ausgewählten Mäusen mit stark erhöhten Nüchtern-Blutglucosewerten. Vehikel-Kontrolle und TUG 469 (5 mg/kg Körpergewicht) wurden bei -60 min intraperitoneal verabreicht, also 1 h vor Glucosegabe.

4.6 Selektivitäten der hFFAR1-Agonisten

4.6.1 Überexprimierende FlpIn-Zelllinien

Zur Generierung einer GOI („*gene of interest*“)-überexprimierenden Zelllinie ist in dieser Arbeit das FlpIn-Kassetten-System® (Invitrogen) in einer 1312N1-FlpIn-Host-Zelllinie verwendet worden. Was dieses System zu einem geeigneten Transfektionssystem macht, ist die Tatsache, dass bei der Verwendung ein und derselben FlpIn-Host-Zelllinie für die Transfektion verschiedener Gene ein isogenes Testsystem vorliegt. Dies sorgt dafür, dass sich - wenn überhaupt - nur geringe Expressionsunterschiede zwischen den in die FlpIn-Kassette eingesetzten Genen zeigen sollten. Liganden können daher auf Selektivität an Zellklonen untersucht werden, die verschiedene Proteine in ähnlicher Stärke exprimieren. Im Kapitel 3.2.4.1 wurde beschrieben, wie die Transfektion des hFFAR1 und hGPR120 in die 1321N1-FlpIn-C2-Host-Zelllinie durchgeführt wurde. Das FlpIn-System wurde in dieser Arbeit für die Bestimmung der Selektivität ausgewählter hFFAR1-Agonisten am hFFAR1 und hGPR120 verwendet. Die Charakterisierung der hFFAR1-Liganden erfolgte an der hFFAR1-1321N1-Zelllinie von Euroscreen (Kap. 4.2).

4.6.1.1 Humaner FFA1-Rezeptor

Abb. 94 A zeigt die Ergebnisse der Charakterisierung der selektierten Zellklone B und D anhand zweier FFAR1-Agonisten mit Hilfe des Ca^{2+} -Assays. Der aus der Literatur bekannte FFAR1-Agonist GW9508 zeigt an beiden hFFAR1-überexprimierenden Zellklonen B und D eine vergleichbare Wirkstärke und E_{max} . Der intern verwendete Standardagonist TUG 20 besitzt am Zellklone B gegenüber D eine um 0,26 Log-Einheiten höhere Wirkstärke. Im Vergleich zur im Vortest der FFAR1-Liganden verwendeten hFFAR1-überexprimierenden 1321N1-Zelllinie von Euroscreen ist bei der Charakterisierung der FlpIn-hFFAR1-Zelllinie ein Verlust der Wirkstärke von TUG 20 und GW9508 um etwa eine Log-Einheit zu beobachten (Vortest: TUG 20 mit $\text{pEC}_{50} = 6,38$; GW9508 mit $\text{pEC}_{50} = 7,56$) (vgl. Kap. 4.2.1.1). Mit einem pEC_{50} -Wert von 6,63 (hFFAR1 Klon B) bzw. 6,72 (hFFAR1 Klon D) stimmt die Wirkstärke von GW9508 gegenüber dem Literaturwert von 6,65 (Tikhonova, 2007) exakt überein. Eine Kontrollinjektion des Lösungsmittels DMSO ergab keinen signifikanten Unterschied im Fluoreszenzsignal gegenüber dem Basalniveau bis zu einer Konzentration von 0,316 %

4. Ergebnisse

(entspricht 31,6 μM der Testsubstanz) (Abb. 94 A). Bei einer Kontrollmessung an dem Leervektor (LV)-transfizierten Zellklon B (Abb. 94 B) konnte nach Injektion der beiden FFAR1-Agonisten keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität bis zu einer Substanzkonzentration von 31,6 μM beobachtet werden. Dies zeigt, dass es sich bei den gemessenen Signalen an den hFFAR1-überexprimierenden Zellklonen B und D um hFFAR1-vermittelte Signale handelt.

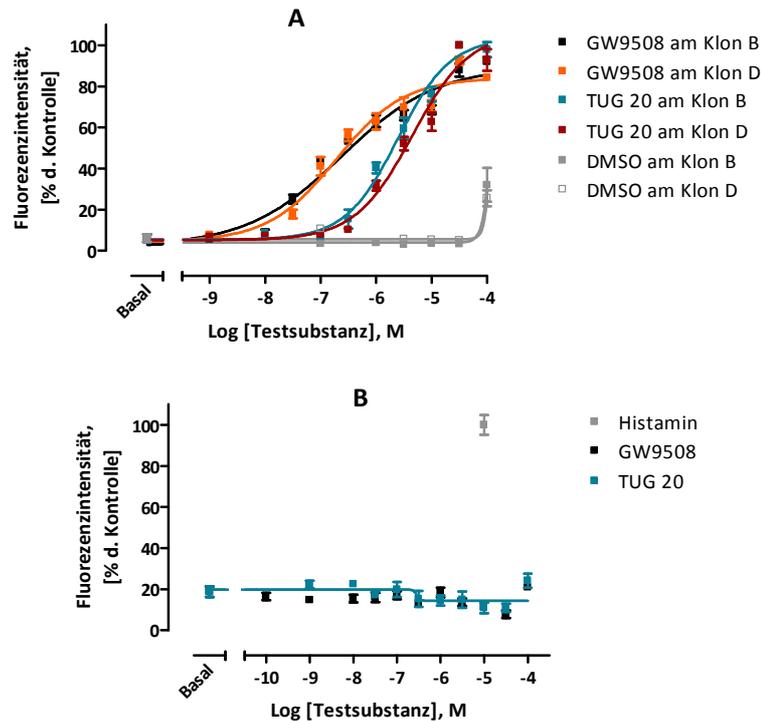


Abbildung 94:

Konzentrations-Effekt-Kurven zur Charakterisierung der hFFAR1-überexprimierenden 1321N1-FlpIn-Zellklone B und D (A) und des Leervektor (LV)-transfizierten 1321N1-FlpIn-Zellklons B (B) mit Hilfe des Ca^{2+} -Assays. Alle Daten stammen aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. (A) Kontrolle: TUG 20 (31,6 μM)-induziertes Signal. (B) Kontrolle: Histamin (10 μM)-induziertes Signal. (A) GW9508 mit $\text{pEC}_{50} = 6,63 \pm 0,11$ ($n\text{H} = 0,51 \pm 0,06$; $E_{\text{max}} = 90 \pm 4$) für Klon B, $\text{pEC}_{50} = 6,72 \pm 0,09$ ($n\text{H} = 0,71 \pm 0,09$; $E_{\text{max}} = 84 \pm 3$) für Klon D; TUG 20 mit $\text{pEC}_{50} = 5,61 \pm 0,07$ ($n\text{H} = 0,92 \pm 0,12$; $E_{\text{max}} = 104 \pm 4$) für Klon B, $\text{pEC}_{50} = 5,35 \pm 0,09$ ($n\text{H} = 0,84 \pm 0,11$; $E_{\text{max}} = 107 \pm 6$) für Klon D. E_{max} : max. Effekt in Prozent zum max. TUG 20-induzierten Effekt; $n\text{H}$ = Hillslope. Basal: Stimulation mit Assaypuffer.

Des Weiteren wurden die hFFAR1-FlpIn-Zellklone B und D mit einem cAMP-Assay charakterisiert. Abb. 95 A zeigt die ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven für TUG 20 und GW9508. Das Signal, das beide Testsubstanzen hier erzeugen, ist wie bei der Euroscreen-Zelllinie Forskolin-abhängig (vgl. Kap. 4.1.1.2). Die Potenzen von GW9508 und TUG 20 unterscheiden sich an den Zellklonen B und D nicht signifikant. Der pEC_{50} -Wert von GW9508 von im Mittel 7,2 liegt 0,6 Log-Einheiten höher als im 1321N1-hFFAR1-Zellsystem von Euro-

4. Ergebnisse

screen aus dem Vortest (Vortest: $pEC_{50} = 6,62$) (vgl. Kap. 4.2.1.2). TUG 20 zeigt eine mit den Daten aus dem Vortest vergleichbare Wirkstärke ($pEC_{50} = 5,8$ im FlpIn-Zellsystem, $pEC_{50} = 5,56$ im Zellsystem von Euroscreen). Ein Anstieg der Lumineszenz nach Injektion des Lösemittels DMSO war erst ab einer Konzentration von 0,1 % (entspricht $10 \mu\text{M}$ der Testsubstanz) zu beobachten. Der maximale Lösemittel-induzierte Effekt betrug 20% des TUG 20 ($10 \mu\text{M}$)-induzierten Signals. Die ermittelten Effekte sind also bis zu einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ rein substanzvermittelt. Abb. 95 B zeigt die von TUG 20 und GW9508 erzeugten absoluten Lumineszenzsignale an den LV-transfizierten 1321N1-FlpIn-Zellen im Vergleich zu jenen an den hFFAR1-FlpIn-Zellen (Klon D). Es traten keine signifikanten Signale auf. Demzufolge sind die Effekte, die im cAMP-Assay an den hFFAR1-exprimierenden Zelllinien durch die Stimulation mit TUG 20 und GW9508 generiert wurden, eindeutig hFFAR1-vermittelt.

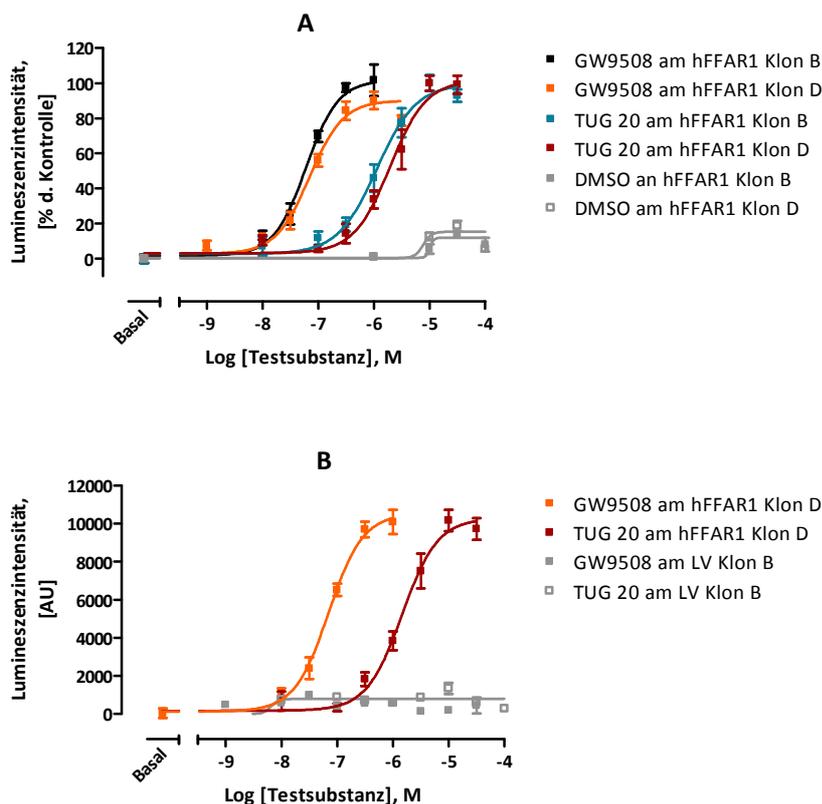


Abbildung 95:

Konzentrations-Effekt-Kurven zur Charakterisierung der hFFAR1-überexprimierenden 1321N1-FlpIn-Zellklone B und D (A) und ein Vergleich der Effekte von TUG 20 und GW9508 an dem hFFAR1-1321N1-FlpIn-Zellklon D und LV-1321N1-FlpIn-Zellklon B (B) unter Verwendung des cAMP-Assays. Alle Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. (A) Kontrolle: TUG 20 ($31,6 \mu\text{M}$)-induziertes Signal. GW9508 mit $pEC_{50} = 7,72 \pm 0,07$ ($nH = 1,50 \pm 0,30$; $E_{\text{max}} = 102 \pm 5$) für Klon B, $pEC_{50} = 7,16 \pm 0,06$ ($nH = 1,43 \pm 0,24$; $E_{\text{max}} = 90 \pm 3$) für Klon D; TUG 20 mit $pEC_{50} = 5,94 \pm 0,08$ ($nH = 1,23 \pm 0,27$; $E_{\text{max}} = 100 \pm 5$) für Klon B, $pEC_{50} = 5,71 \pm 0,08$ ($nH = 1,34 \pm 0,31$; $E_{\text{max}} = 102 \pm 8$) für Klon D; E_{max} : max. Effekt in Prozent zum max. TUG 20-induzierten Effekt. Basal: Stimulation mit Assaypuffer.

4. Ergebnisse

Tab. 26 fasst die pharmakologischen Daten der hFFAR1-Agonisten TUG 20 und GW9508 an den rekombinanten Zellsystemen inklusive der von Euroscreen zur Verfügung gestellten hFFAR1-Zelllinie zusammen.

Tabelle 26:

Aktivitäten von hFFAR1-Agonisten im Ca^{2+} - und cAMP-Assay an zwei 1321N1-hFFAR1-FlpIn-Klonen sowie an 1321N1-hFFAR1-Zellen von Euroscreen [$n \geq 2$].

Ca²⁺-Assay	pEC ₅₀ ± SEM [E _{max} [#] ; nH]			
	LV Klon B	hFFAR1 Klon B	hFFAR1 Klon D	Euroscreen
TUG 20	< 4 [-;-]	5,61 ± 0,07 [104; 0,9]	5,35 ± 0,09 [107; 0,8]	6,37 ± 0,02 [98; 1,8]
GW9508	< 4 [-;-]	6,63 ± 0,11 [90; 0,5]	6,72 ± 0,09 [84; 0,7]	7,56 ± 0,03 [110; 1,6]
cAMP-Assay	LV Klon B	hFFAR1 Klon B	hFFAR1 Klon D	Euroscreen
TUG 20	< 4 [-;-]	5,95 ± 0,08 [100; 1,2]	5,72 ± 0,09 [100; 1,3]	5,54 ± 0,04 [124; 1,2]
GW9508	< 4 [-;-]	7,22 ± 0,07 [102; 1,5]	7,16 ± 0,06 [90; 1,4]	6,62 ± 0,06 [110; 1,5]

[#] max. Effekt in Prozent des max. TUG 20-induzierten Effekt

Im Vergleich zur Zelllinie von Euroscreen fallen die Aktivitäten beider hFFAR1-Agonisten im Ca^{2+} -Assay um etwa eine Log-Einheit geringer aus. Im cAMP-Assay sind sie um 0,2-0,6 Log-Einheiten höher. Für alle weiteren Untersuchungen, die mit dem FlpIn-Zellsystem gemacht wurden (Tests zur Selektivität von Liganden), wurde aufgrund der höheren Potenz der hFFAR1-Agonisten stets der hFFAR1-überexprimierende FlpIn-Zellklon B verwendet.

4.6.1.2 Humaner GPR120-Rezeptor

Zum Zeitpunkt der Etablierung der hGPR120-überexprimierenden 1321N1-FlpIn-Zelllinie waren keine selektiven und hochpotenten GPR120-Agonisten verfügbar. Demzufolge wurden die Substanzen GW9508 und Linolsäure, welche auch als GPR120-Agonisten mit einer Aktivität im mikromolaren Konzentrationsbereich beschrieben sind (Briscoe, 2006), zur Stimulation der Zellen verwendet. Abb. 96 zeigt die ermittelten Potenzen der beiden Agonisten am hGPR120-überexprimierenden Zellklon B im Vergleich zum Leervektor (LV)-transfizierten Zellklon B.

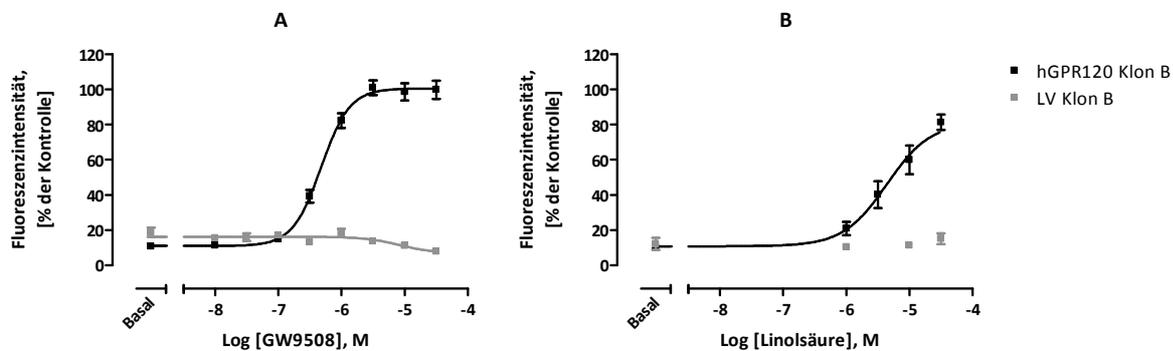


Abbildung 96:

Konzentrations-Effekt-Kurven von GW9508 und Linolsäure am hGPR120-überexprimierenden 1321N1-FlpIn-Zellklon sowie am Leervektor (LV)-1321N1-FlpIn-Klon im Ca^{2+} -Assay. Alle Daten stammen aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. Kontrolle: Histamin (10 μM)-induziertes Signal für hGPR120 Klon, Histamin (10 μM)-induziertes Signal für LV-Klon. Basal: Stimulation mit Assaypuffer. (A) GW9508 mit $\text{pEC}_{50} = 6,32 \pm 0,04$ ($n\text{H} = 1,92 \pm 0,26$; $E_{\text{max}} = 101 \pm 2$); (B) Linolsäure mit $\text{pEC}_{50} = 5,36 \pm 0,18$ ($n\text{H} = 1,26 \pm 0,53$; $E_{\text{max}} = 81 \pm 12$). E_{max} = maximaler Effekt in Prozent des maximalen Histamin-induzierten Effekts; $n\text{H}$ = Hillslope.

Der FFAR1-Agonist GW9508 zeigt mit einem pEC_{50} -Wert von 6,32 am hGPR120 eine um 0,83-Log-Einheiten geringere Potenz als am hFFAR1 (vgl. Kap. 4.6.2). Die Aktivität des nativen Liganden Linolsäure ist an beiden Rezeptoren vergleichbar (pEC_{50} : 5,37 für hFFAR1; 5,36 für hGPR120) (siehe Kap. 4.6.2). Eine Kontrollmessung am LV-transfizierten Zellklon zeigt keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität bis zu einer Substanzkonzentration von 31,6 μM . Dies lässt den Schluss zu, dass die erhaltenen Signale durch den hGPR120 vermittelt werden.

4.6.2 Selektivität der hFFAR1-Liganden zwischen hFFAR1 und hGPR120

Um die maximalen Effekte bei der Calcium-Mobilisierung zwischen den Zellklonen hFFAR1 und hGPR120 vergleichen zu können, wurden diese zunächst mit Histamin stimuliert. Abb. 97 A zeigt, dass die absoluten Signalhöhen im Ca^{2+} -Assay bei allen Zellklonen sowie dem Wildtyp vergleichbar und nicht signifikant verschieden voneinander sind. Die Wirkstärke von Histamin an hFFAR1- und LV-transfizierten Zellen ist vergleichbar (Abb. 97 B). An den hGPR120-exprimierenden Zellen ist diese hingegen etwa 5-fach niedriger im Vergleich.

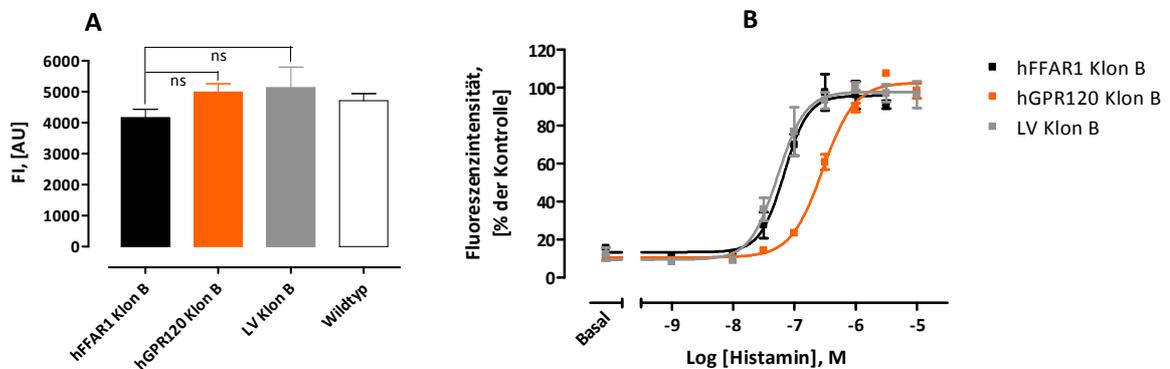


Abbildung 97:

(A) Vergleich der absoluten Histamin ($10 \mu\text{M}$)-induzierten Signalhöhe an 1321N1-FlpIn-Zellklonen [ns: nicht-signifikant ungepaarter zweiseitiger T-Test]. (B) Konzentrations-Effekt-Kurven von Histamin zur Charakterisierung der hFFAR1- bzw. hGPR120-1321N1-FlpIn-Zellklone im Ca^{2+} -Assay. Kontrolle: Histamin ($10 \mu\text{M}$)-induziertes Signal. Basal: Stimulation mit Assaypuffer. hFFAR1: $\text{pEC}_{50} = 7,17 \pm 0,06$ ($n\text{H} = 2,21 \pm 0,52$; $E_{\text{max}} = 96 \pm 3$); hGPR120: $\text{pEC}_{50} = 6,54 \pm 0,03$ ($n\text{H} = 1,65 \pm 0,18$; $E_{\text{max}} = 103 \pm 2$); LV: $\text{pEC}_{50} = 7,27 \pm 0,07$ ($n\text{H} = 1,91 \pm 0,44$; $E_{\text{max}} = 98 \pm 3$). Alle Daten stammen aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten mit Triplikaten.

Ferner wurde die Selektivität zweier Referenzliganden (GW9508 und Linolsäure) ermittelt, um diese mit Daten aus der Literatur vergleichen zu können. Abb. 98 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven von GW9508 und Linolsäure an beiden Freien-Fettsäure-Rezeptoren. Die Wirkhöhe von GW9508 erreicht das Niveau des maximalen Histamin-induzierten Effekts an beiden Rezeptoren. Linolsäure erreicht einen maximalen Effekt von 60% am hFFAR1 und 71% am hGPR120 bezogen auf das Histaminsignal. GW9508 zeigt eine um etwa 7-fach höhere Aktivität am hFFAR1 gegenüber hGPR120. 2006 wurde von Briscoe et al. ebenfalls beobachtet, dass GW9508 selektiver für den FFAR1 ist. Allerdings geben Briscoe et al. pEC_{50} -Werte für GW9508 am hFFAR1 von 7,32 und am GPR120 von 5,46 an, was einer fast 100-

4. Ergebnisse

fach höheren Aktivität am FFAR1 gegenüber GPR120 entspricht (Briscoe, 2006). Die bei Briscoe et al. beschriebenen Aktivitäten der Linolsäure mit einem pEC_{50} von 5,65 für FFAR1 respektive 5,89 für GPR120 sind geringfügig höher als die eigenen ermittelten Werte. Das Verhältnis zwischen FFAR1- und GPR120-Aktivität stimmt gut überein.

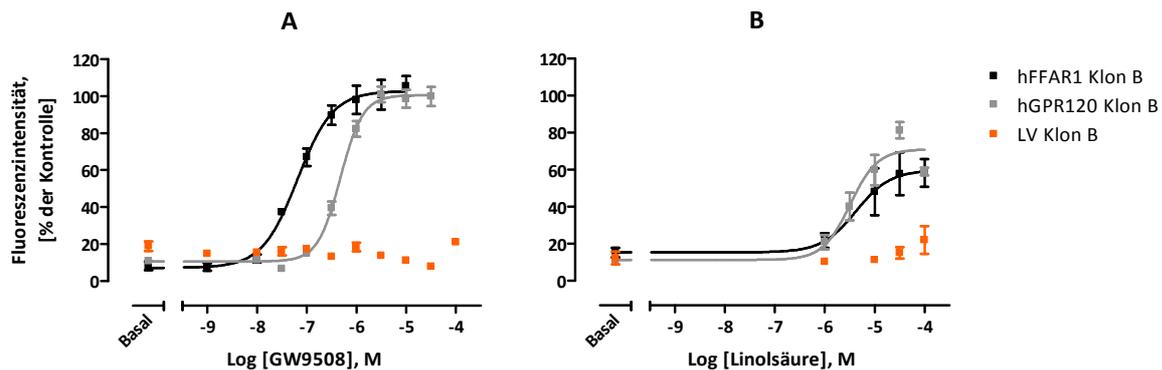


Abbildung 98:

Konzentrations-Effekt-Kurven von GW9508 und Linolsäure an hFFAR1-, hGPR120- sowie LV-transfizierten 1321N1-FIpln-Zelllinien im Ca^{2+} -Assay. Kontrolle: Histamin (10 μ M)-induziertes Signal. Basal: Stimulation mit Assaypuffer. **(A)** hFFAR1: $pEC_{50} = 7,18 \pm 0,06$ ($nH = 1,22 \pm 0,20$; $E_{max} = 102 \pm 3$); hGPR120: $pEC_{50} = 6,32 \pm 0,04$ ($nH = 1,91 \pm 0,26$; $E_{max} = 101 \pm 2$); **(B)** hFFAR1: $pEC_{50} = 5,37 \pm 0,44$ ($nH = 1,26 \pm 1,10$; $E_{max} = 60 \pm 10$); hGPR120: $pEC_{50} = 5,49 \pm 0,13$ ($nH = 1,58 \pm 0,62$; $E_{max} = 71 \pm 5$). Alle Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplikaten.

Dann wurden die Selektivitäten von TUG 469 und TUG 770 ermittelt. Abb. 99 zeigt die Aktivität von TUG 469 und 770 an beiden Freie-Fettsäure-Rezeptoren. Trotz einer ähnlichen Aktivität beider Substanzen am hFFAR1, unterscheidet sich die Aktivität am hGPR120 um das 10-fache. TUG 469 ist ein selektiverer Agonist für den hFFAR1 als TUG 770. Ferner erreicht die Stimulation des hFFAR1 mit TUG 469 und 770 eine mit dem Histamineffekt vergleichbare Wirkhöhe. Während TUG 770 am hGPR120 ein Vollagonist darstellt, besitzt TUG 469 nur einen maximalen Effekt von 72%. TUG 469 zeigt somit tendenziell eher eine partialagonistische Wirkung am GPR120.

4. Ergebnisse

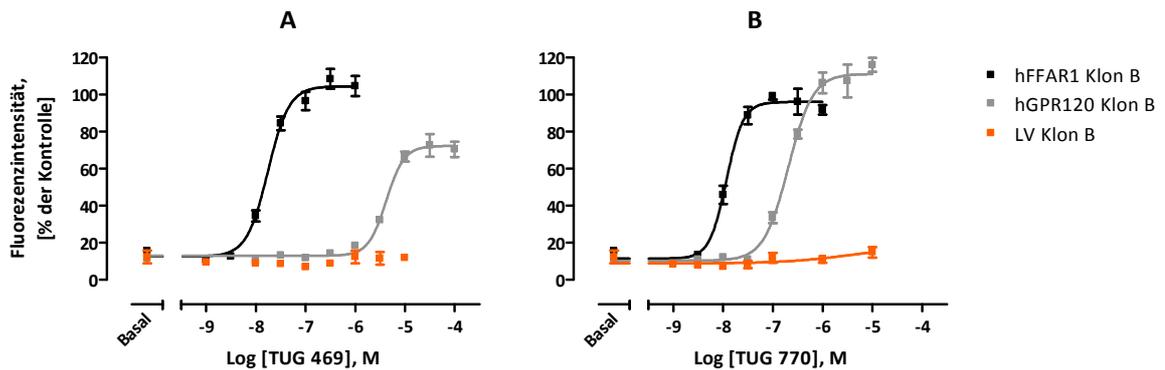


Abbildung 99:

Konzentrations-Effekt-Kurven von TUG 469 und TUG 770 an hFFAR1-, hGPR120- sowie LV-transfizierten 1321N1-FlpIn-Zelllinien im Ca^{2+} -Assay. Kontrolle: Histamin ($10 \mu\text{M}$)-induziertes Signal. Basal: Stimulation mit Assaypuffer. Alle Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Triplicaten. **(A)** hFFAR1: $p\text{EC}_{50} = 7,76 \pm 0,04$ ($n\text{H} = 2,04 \pm 0,31$; $E_{\text{max}} = 105 \pm 3$); hGPR120: $p\text{EC}_{50} = 5,38 \pm 0,04$ ($n\text{H} = 2,41 \pm 0,52$; $E_{\text{max}} = 72 \pm 2$); **(B)** hFFAR1: $p\text{EC}_{50} = 7,93 \pm 0,03$ ($n\text{H} = 2,55 \pm 0,49$; $E_{\text{max}} = 96 \pm 2$); hGPR120: $p\text{EC}_{50} = 6,69 \pm 0,04$ ($n\text{H} = 1,77 \pm 0,25$; $E_{\text{max}} = 111 \pm 3$).

Die Aktivitäten der Liganden am hFFAR1 und hGPR120 und deren Selektivitätsindices (SI) sind in Tab. 27 aufgeführt. Unter den in dieser Arbeit auf ihre Selektivität getesteten hFFAR1-Liganden besitzt TUG 469 die höchste Selektivität am hFFAR1 ($\text{SI} = 239$). Diese ist mehr als 10-fach höher als die Selektivität der Verbindung TUG 770.

Tabelle 27:

Aktivitäten und Selektivitätsindices ($\text{SI} = \text{EC}_{50} \text{ am hGPR120} / \text{EC}_{50} \text{ am hFFAR1}$) von FFAR1-Agonisten an hFFAR1- bzw. hGPR120-1321N1-FlpIn(C2)-Zellen im Ca^{2+} -Assay.

	$p\text{EC}_{50} \pm \text{SEM} [E_{\text{max}}^{\#}; n\text{H}]$			
	Linolsäure	GW9508	TUG 469	TUG 770
hFFAR1	$5,37 \pm 0,44$ [60; 1,3]	$7,19 \pm 0,06$ [102; 1,2]	$7,76 \pm 0,04$ [105; 2,0]	$7,93 \pm 0,03$ [96; 2,6]
hGPR120	$5,49 \pm 0,13$ [71; 1,6]	$6,32 \pm 0,04$ [101; 1,9]	$5,38 \pm 0,04$ [72; 2,4]	$6,69 \pm 0,04$ [111; 1,8]
SI	0,8	7,3	239	17,6

[#] max. Effekt in % des maximalen Histamin-induzierten Effekt

Da TUG 469 von den hier untersuchten hFFAR1-Liganden die höchste Selektivität und zudem einen tendenziell partialagonistischen Charakter am hGPR120 zeigte, wurde die Verbindung als Kandidat für die *in vivo*-Tierstudie ausgewählt (Kap. 4.5).

5. Diskussion

Bislang sind für den humanen FFA1-Rezeptor einige Serien potenter Agonisten bekannt, deren Wirkstärke sich teilweise bis in den einstelligen nanomolaren Konzentrationsbereich erstreckt (Bharate, 2009; Garrido, 2006; Sasaki, 2011). Zwei Kandidaten befinden sich in klinischen Studien (TAK-875, AMG837) (Lin, 2011; Naik, 2011). Antagonisten des hFFAR1 sind nur wenige bekannt (Bharate, 2009; Hu, 2009; Humphries, 2009). Ihre Wirkstärke reicht nur in den mikromolaren Konzentrationsbereich. Die Stimulation des hFFAR1 bewirkt eine Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion (GSIS) aus pankreatischen β -Zellen. Der FFAR1 stellt damit ein interessantes Zielprotein zur Entwicklung neuer Arzneistoffe für die Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) dar.

5.1 Identifizierung und Charakterisierung von hFFAR1-Liganden

In dieser Arbeit wurden über 450 Verbindungen auf Aktivität an rekombinanten hFFAR1-überexprimierenden Zellen mit Hilfe eines funktionellen Ca^{2+} -Assays getestet. Die Verbindungen stammen zum größten Teil aus der Arbeitsgruppe von Prof. Trond Ulven (University of Southern Denmark). Bei dem Vortest auf hFFAR1-Aktivität konnten 238 Agonisten und 5 Antagonisten identifiziert werden. Von allen 238 Agonisten wurden Konzentrations-Effekt-Kurven bestimmt. Hierbei diente die Wirkhöhe (E_{max}) als Parameter zur Unterscheidung zwischen Voll- und Partialagonist, der pEC_{50} -Wert als Maß für die Wirkstärke des Agonisten am hFFAR1. Dass es sich bei den agonistinduzierten Signalen am rekombinanten Zellsystem um unspezifische Effekte handelt, konnte anhand einer Kontrollstimulation des Zellwildtyps für ausgewählte Leitstrukturen der Agonisten ausgeschlossen werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass der hFFAR1 im verwendeten rekombinanten Zellsystem einer $G_{\alpha\text{q}}$ - und $G_{\alpha\text{s}}$ -Kopplung unterliegt (Kap. 4.1.1). Die $G_{\alpha\text{q}}$ -Kopplung des hFFAR1 wurde bereits mehrfach beschrieben, die $G_{\alpha\text{s}}$ -Kopplung nur einmal (Feng, 2006; Kebede, 2009). Des Weiteren wurde auch von einer $G_{\alpha\text{i}}$ -Kopplung berichtet, die im hier verwendeten Zellsystem nicht beobachtet wurde (Schröder, 2010).

Die fünf identifizierten Antagonisten (TUG 761-765) wurden anhand von Konzentrations-Inhibitions-Kurven eines agonistinduzierten Signals näher charakterisiert. Aus den ermit-

telten IC_{50} -Werten der Antagonisten wurde unter Berücksichtigung der Agonistkonzentration und des EC_{50} -Wertes des Agonisten nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (Cheng und Prusoff, 1973) der pK_i -Wert bestimmt. Alle fünf Antagonisten konnten das agonistinduzierte Signal bis auf Basalniveau inhibieren. TUG 761 und TUG 764 sind mit einem pK_i -Wert von 7,01 bzw. 6,83 die potentesten Antagonisten. Sie sind nicht wirkstärker als bereits andere veröffentlichte hFFAR1-Antagonisten (Bharate, 2009; Hu, 2009; Humphries, 2009). Strukturell handelt es sich bei diesen Antagonisten um 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-1-on-Analoga. TUG 761, 764 und 765 sind neue und TUG 762 und 763 bereits beschriebene Derivate (Humphries, 2009). In Ergänzung zu den Arbeiten von Humphries et al. konnte in dieser Arbeit ferner gezeigt werden, dass es sich bei TUG 761 und 764, und wegen der strukturellen Ähnlichkeit damit vermutlich auch bei den übrigen Analoga, um kompetitive Antagonisten des hFFAR1-Rezeptors handelt. TUG 761 und 764 blockieren den durch GW9508, einem bekannten hFFAR1-Agonisten, induzierten Effekt sowohl im Ca^{2+} - als auch im cAMP-Reporter-Gen-Assay. Hierbei wurde eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von GW9508 beobachtet. Ferner wurde eine Schild- und Clark-Analyse durchgeführt, die den kompetitiven Charakter der beiden Antagonisten bestätigten (Kap. 4.2.2). Die Auswertung nach Lew und Angus ergab im Ca^{2+} -Assay einen pK_b -Wert für TUG 761 von $7,33 \pm 0,07$ und für TUG 764 von $7,01 \pm 0,13$.

5.2 Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Agonisten (2D-Struktur)

Aus der Vielzahl identifizierter hFFAR1-Agonisten (238) und deren pharmakologischen Daten wurden deskriptive Struktur-Aktivitätsbeziehungen (SAR) abgeleitet. Strukturell handelt es sich bei der überwiegenden Mehrzahl der Agonisten um Derivate der in para-Stellung substituierten 3-Phenylpropionsäure. Diese Grundstruktur war bereits 2006 von Garrido et al. beschrieben worden (Garrido, 2006). Anhand der Substitution in para-Stellung des Phenylrings wurden die Agonisten in zwei Klassen eingeteilt, Ethinyl-verlinkte Substituenten (TUG 309-Analoga) und Benzyloxy- bzw. Benzylaminyl-Substituenten (TUG 20- bzw. TUG 495-Analoga) (Abb. 100, 101 und 102).

Abb. 100 zeigt die SAR der Ethinyl-verlinkten Substanzklasse um Leitstruktur TUG 309. Eine Fixierung des Propionsäureteils durch die Darstellung racemischer 2,3-Cyclopropyl-Analoga

5. Diskussion

brachte keinen Vorteil für die Wirkstärke der Liganden. Phenoxyessigsäurederivate und der Austausch des zentralen Phenylrings durch Pyridin erniedrigen die Wirkstärke am hFFAR1. Die Fluorierung des zentralen Phenylrings bewirkt eine Erhöhung der Potenz, insbesondere in ortho-Position. Eine Verlängerung des Ethinyllinkers um ein bzw. zwei Methyleneinheiten schwächt die Wirkstärke der TUG 309-Analoga. Was die Substitution des terminalen Phenylrings betrifft, so bewirken vor allem eine Methylierung oder Methoxylierung in Position 2 bzw. 3 sowie ein Cyanoest an Position 2 eine Steigerung der Potenz. Eine Halogenierung ist bei den vorliegenden Derivaten lediglich mit Brom und in Position 2 vorteilhaft, die übrigen Halogenderivate zeigen keine signifikant gesteigerte Wirkstärke gegenüber TUG 309. Eine Hydroxygruppe und ein zusätzlicher Phenylrest erniedrigen die Wirkstärke. TUG 488, 770 und 771 sind als die potentesten Verbindungen aus dieser Reihe hervorgegangen (Abb. 103).

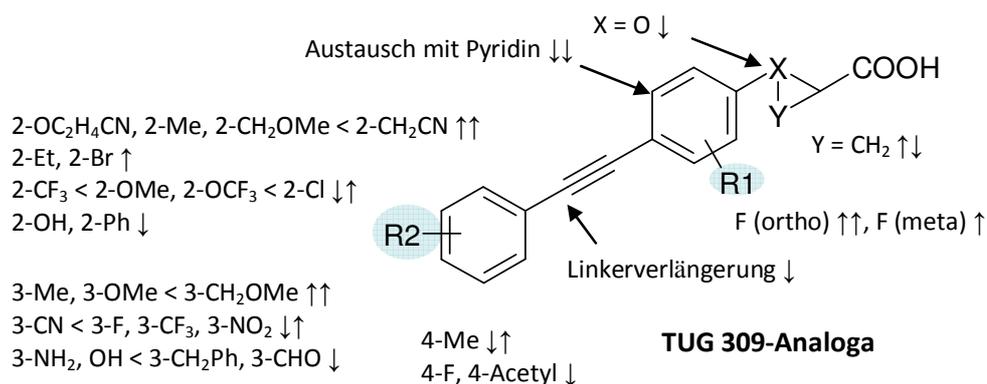


Abbildung 100:

Schematische Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Ethinyl-verlinkten Substanzklasse um Leitstruktur TUG 309 (R1-2 = H, X = CH₂, Y = keine Verknüpfung).

Die Leitstruktur TUG 20 ist auch aus der Wirkstoffentwicklung des potenten und selektiven hFFAR1-Agonisten TAK-875 der Firma Takeda bekannt (Sasaki, 2011). Analoga von TUG 20 weisen nach einer Iodierung in meta-Position am Phenylring des Propionsäureteils eine erniedrigte Wirkstärke auf (Abb. 101). Die Fluorierung in ortho-Position des Propionsäureteils steigert die Potenz, was bereits von Sasaki et al. beschrieben wurde (Sasaki, 2011). Eine Substitution des terminalen Phenylrings mit Fluor in Position 2 bzw. mit Chlor in Position 4 oder eine Disubstitution mit Fluor bzw. einer Trifluormethylgruppe führt zu höheren Wirk-

stärken. In Position 3 kann eine Halogenierung mit Fluor, Chlor oder Brom eine Erhöhung der Potenz vermitteln, Iod schwächt die Wirkstärke ab. Die Strukturverweiterung mit einem Phenylring an Position 3 ist vor allem über einen Oxylinker wirkungsverstärkend. Als die potentesten Verbindungen dieser Reihe haben sich TUG 726 und 727 herausgestellt (Abb. 103).

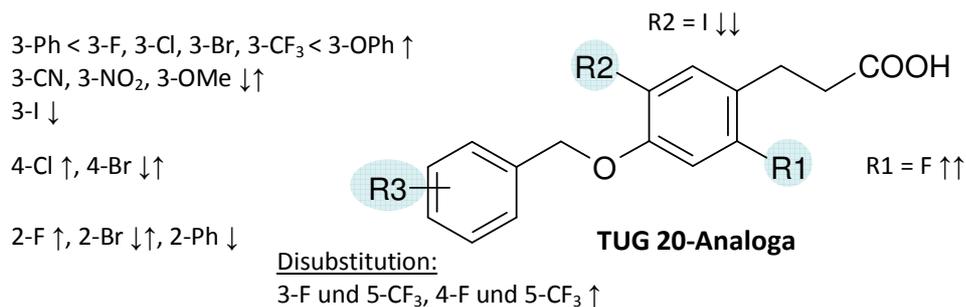


Abbildung 101:

Schematische Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Analoga um Leitstruktur TUG 20 (R1-3 = H).

Das Fluormotiv am zentralen Phenylring führt auch bei den TUG 495-Analoga zu einer Erhöhung der Wirkstärke (Abb. 102). Eine terminale Substitution in Position 3 mit Brom, Trifluormethyl- oder einem Phenyl- bzw. Phenoxyrest führt teilweise zu einer Verzehnfachung der Potenz. Bei der phenoxy-substituierten Verbindung handelt es sich hierbei um die bekannte Verbindung GW9508 (Garrido, 2006). Wegen der gesteigerten Wirkstärke am hFFAR1 wurde die an Position 3 phenylsubstituierte Verbindung weiter modifiziert. Hierbei führte eine Methylierung in Position 2 am zusätzlich angefügten Phenylring zu einer weiteren Steigerung der Wirkstärke. Damit sind die Verbindungen TUG 469 und TUG 863 die potentesten aller getesteten TUG 495-Analoga (Abb. 103).

5. Diskussion

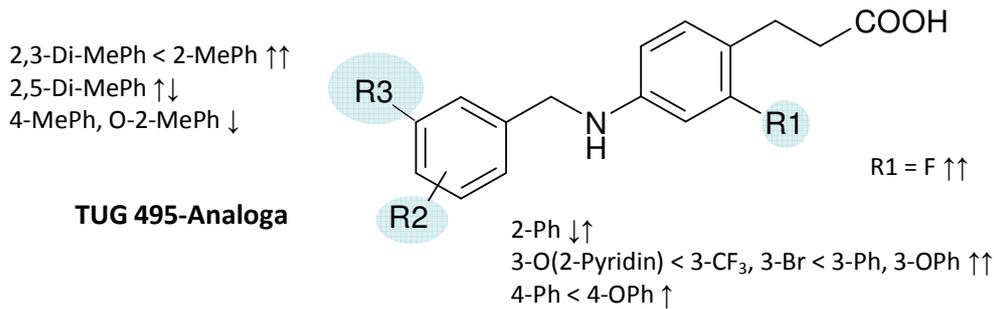


Abbildung 102:

Schematische Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Analoga um Leitstruktur TUG 495 (R1-3 = H).

Abb. 103 stellt die potentesten Vertreter der beschriebenen Verbindungsreihen sowie den bekannten hFFAR1-Agonisten GW9508 mit deren pharmakologischen Wirkstärken zusammen. Die beiden Benzyloxyverbindungen TUG 726 und TUG 727 sind nur geringfügig weniger potent als GW9508.

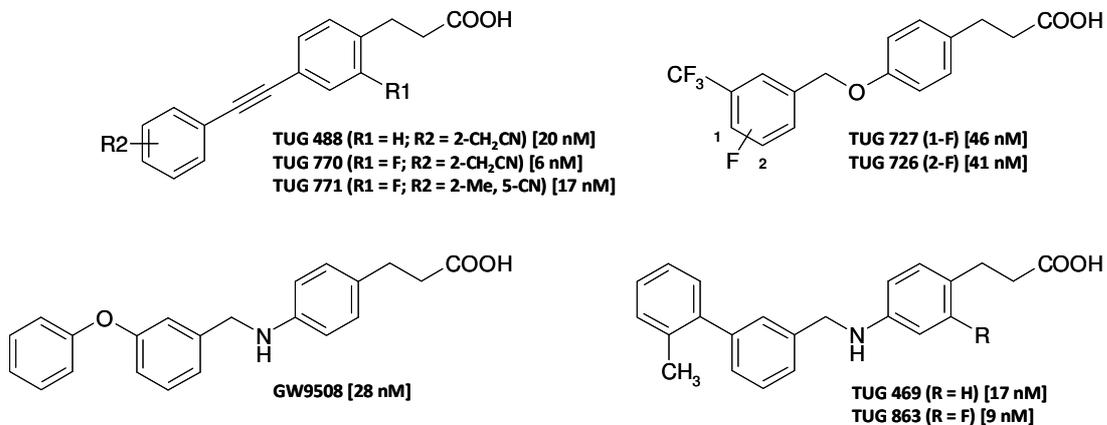


Abbildung 103:

Die potentesten Vertreter aus allen untersuchten Verbindungsreihen im Vergleich zum hFFAR1-Referenzagonisten GW9508 (Garrido, 2006). Die Werte in eckigen Klammern sind EC₅₀-Werte aus der Charakterisierung am rekombinanten 1321N1-hFFAR1-Zellsystem im Ca²⁺-Assay.

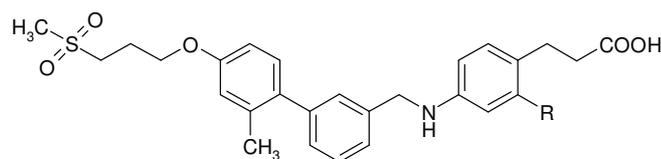
Die Ethinyl-verlinkten Verbindungen TUG 488, 770 und 771 sowie die Biphenyle TUG 469 und TUG 863 sind gegenüber GW9508 potenter. TUG 770 und TUG 863 sind die beiden potentesten aller hier untersuchten Verbindungen. Auch im Vergleich zu den beschriebenen hoch potenten Liganden AMG837 (EC₅₀ = 14 nM), TAK-875 (EC₅₀ = 14 nM) und anderen *in vitro* getesteten hFFAR1-Agonisten (EC₅₀ = 3-6 nM) können diese beiden als die

potentesten hFFAR1-Agonisten *in vitro* angesehen werden (Bharate, 2009; Lin, 2011; Sasaki, 2011).

Ein in der Literatur beschriebener zusätzlicher (Methyl-sulfonyl)-n-propylether-Substituent in Position 4 des terminalen Phenylrings von TUG 469 führt zu keiner Änderung der Potenz am hFFAR1 (vgl. TUG 469 mit TUG 866 bzw. TUG 863 und TUG 905) (Abb. 103 und Tab. 28). Negoro et al. entwarfen diesen Substituenten, da sie zusätzliche Wechselwirkungen des Liganden mit dem Rezeptor und damit eine erhöhte Wirkstärke vermuteten (Negoro, 2010). Eine Erhöhung der Wirkstärke kann anhand der hier vorliegenden experimentellen Daten nicht bestätigt werden.

Tabelle 28:

Derivate der Leitstruktur TUG 469 und TUG 863 mit dem (Methyl-sulfonyl)-n-propyl-Substituenten des potenten hFFAR1-Agonisten TAK-875* (pEC_{50} : $7,59 \pm 0,04$; E_{max} : 91%)[#].



Code	$pEC_{50} \pm SEM$ [#] [E_{max} [§]]	R
TUG 866	$7,76 \pm 0,06$ [98]	H
TUG 905	$8,04 \pm 0,02$ [102]	F

[#] ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen im Ca^{2+} -Assay, [§] in % des TUG 20-induzierten Signals, * Racemat

5.3 3D-QSAR und das Design neuer hFFAR1-Liganden

Die Strukturen und experimentell ermittelten Wirkstärken der ersten 194 identifizierten hFFAR1-Agonisten sind die Grundlage zur Erstellung einer 3D-QSAR-Analyse gewesen. Der Substanzdatensatz wurde um alle racemischen Verbindungen sowie Strukturen, die sich nicht ohne eine ersichtliche Überdehnung von energetisch stabilen Bindungswinkeln in die hFFAR1-Bindetasche einpassen ließen, reduziert, sodass letztlich 171 Strukturen in der Analyse Verwendung fanden (Trainingsdatensatz). Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Bhatt et al. beschäftigt sich ebenfalls mit der Erstellung eines Vorhersagemodells für die Aktivität am hFFAR1 unter Verwendung der CoMSIA-Methode mit 48 Verbindungen (Bhatt,

2011). Hierbei wurden Positionen und Räume innerhalb der hFFA1-Rezeptorbindetasche definiert, in denen das Vorliegen bestimmter Atomtypen bzw. physikochemischer Eigenschaften die Rezeptoraktivität von Liganden erhöhen oder erniedrigen kann (Mapping). So wurde in diesem Modell die stark positiv geladene Region um die Aminosäurereste Asn244 und Arg183 bzw. Arg258 und Ser247, die für die anionischen Liganden des hFFAR1 als Anker fungieren, bestätigt, die bereits von Sum et al. bekannt war (Lu, 2010; Sum, 2009).

Die im Rahmen dieser Arbeit erstellte 3D-QSAR-Studie ist jedoch aufgrund der rund 3-fach höheren Anzahl verwendeter Liganden und der höheren Strukturdiversität der Liganden umfassender. Die hFFA1-Rezeptorbindetasche wurde zunächst von einem Gitter umfasst und alle Gitterpunkte von Sonden diverser Atomtypen abgefahren. Das ermittelte Paarpotential zwischen jeder Sonde an jedem Gitterpunkt zu den jeweiligen umliegenden Atomtypen der Proteinumgebung prägt das Gitter auf diese Weise mit der strukturellen Rezeptorinformation vor. In einem zweiten Schritt wurden die in der Bindetasche ausgerichteten 171 Liganden in das vorgeprägte Gitter eingebracht und wiederum Paarpotentiale zwischen den atomaren Sonden an den Gitterpunkten und den Atomen der Liganden berechnet. Diese Vielzahl an Strukturinformation wurde über eine PLS auf Deskriptoren reduziert, die den Zusammenhang zwischen der Ligandstruktur im Protein und der experimentellen Wirkstärke gut wiedergeben können. Anhand dieser Deskriptoren ließen sich abschließend Konturkarten erstellen, welche anzeigen für welchen Atomtyp eine bestimmte Position eine hohe Wirkstärke voraussagt. Die Güte der Vorhersage des 3D-QSAR-Modells ist mit einem q^2 -Wert von 0,61 ($s_{\text{PRESS}} = 0,48$) bzw. 0,56 (0,51) für eine Trainingsdatensatz-interne „Leave-One-Out“- bzw. „Leave-Ten-Out“-Kreuzvalidierung als sehr gut zu bezeichnen (Kap. 4.3.1). Die Vorhersage einer geringen Potenz für in die Bindetasche eingepasste, aber experimentell als hFFAR1-inaktiv identifizierte Verbindungen ist ebenfalls möglich, was eine Auswahl von aktiven und wenig aktiven (inaktiven) Substanzen ermöglicht (Kap. 4.3.2). Ferner konnte die Wirkstärke am hFFAR1 von 26 in dieser Arbeit experimentell untersuchten Verbindungen, welche nicht Bestandteil des Trainingsdatensatzes sind und den Verbindungen des Trainingsdatensatzes strukturell ähneln, von dem Modell mit hoher Güte ($q^2 = 0,66$) vorausgesagt und anhand der Konturkarten gut erklärt werden (Kap. 4.3.4). Eine gute Wirkstärkenvorhersage für 29 hFFAR1-Agonisten, die von anderen Gruppen biologisch charakterisiert wurden, war mit dem Modell nur bedingt möglich ($q^2 = 0,35$) (Kap. 4.3.3).

Vorteilhaft bei der Verwendung der AFMoC-Methode ist die Möglichkeit, die Konturkarten und zudem mögliche, noch nicht berücksichtigte Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein mit einzubeziehen, um maßgeschneiderte potentere Liganden zu entwerfen. Die CoMSIA-Studie von Bhatt et al. ist über die Erklärung der Struktur-Aktivitätsbeziehungen der verwendeten FFAR1-Liganden nicht hinaus gegangen (Bhatt, 2011). Der Entwurf neuer hFFAR1-Agonisten ging in der vorliegenden Arbeit von den potenten Strukturen TUG 501, TUG 469 und TUG 770 aus und soll in Abb. 104 anhand der Verbindung A3, B5 und C2 dargestellt werden. Das Einführen eines Fluor- oder fluortragenden Substituenten am α - bzw. β -C-Atom der Propionsäure verspricht laut AFMoC-Modell eine erhöhte Wirkstärke (Verbindung A3, B5, C2). Fluorsubstituenten können laut AFMoC-Analyse auch noch an anderen Positionen zu einer Steigerung der Wirkstärke führen (Verbindung A3, B5, C2). Eine Hydroxygruppe in ortho-Stellung zur Propionsäure und eine Acetylgruppe am terminalen Phenylring der TUG 501-Analoga erscheinen ebenfalls favorisiert durch mögliche Wasserstoffbrückenbindungen (Verbindung B5 und C2). Diese genannten strukturellen Abänderungen sind von keinem hFFAR1-Agonisten bekannt und stellen somit neuartige Konzepte dar, wie die Wirkstärke von hFFAR1-Agonisten weiter erhöht werden kann.

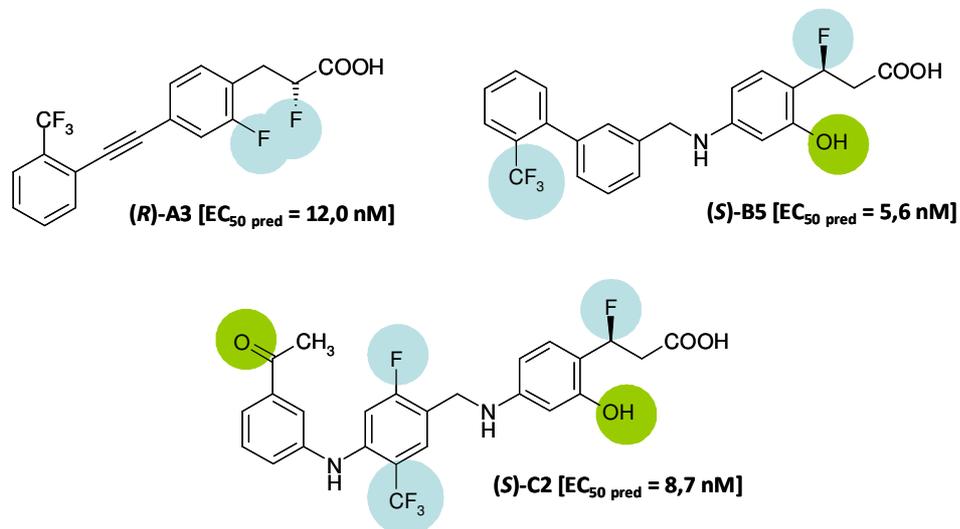


Abbildung 104:

Strukturen ausgewählter Verbindungen, die in dieser Arbeit anhand der AFMoC-Analyse entworfen wurden. Die $EC_{50 \text{ pred}}$ -Werte wurden durch das AFMoC-Modell vorhergesagt.

Bis zur Anfertigung dieser Arbeit konnten zwei Methoxyvorstufen der neu entworfenen Verbindungen B1 und B2 aus der Reihe der TUG 469-Derivate (Kap. 4.3.5.3) experimentell charakterisiert werden. Die experimentelle Wirkstärke unterschied sich von der durch das Modell vorhergesagten nicht ($pEC_{50}^{pred} = pEC_{50}^{exp} \pm 0,35$).

Die Einführung von fluorhaltigen Substituenten in β -Position zur Carbonsäure ist aufgrund von Untersuchungen von Sasaki et al. nicht nur aus Gründen einer gesteigerten Wirkstärke interessant (Sasaki, 2011). Sasaki et al. untersuchten Struktur-Wirkungsbeziehungen von 3-Phenylpropionsäure-Derivaten, die eine starke Ähnlichkeit mit den in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen aufweisen, und kommen zu dem Schluss, dass Propionsäure-Derivate im Organismus einem schnellen Abbau in Form von β -Oxidation unterliegen. Es wurden Metabolite eines α - und β -unsubstituierten Propionsäure-Derivats 4p aufgeführt, die den Verdacht der β -Oxidation erhärten (Abb. 105) (Sasaki, 2011). Eine Substitution in α - und β -Position der Carbonsäure mit Fluor- bzw. Methylgruppen (Verbindung 4m und 4o) würde nach Sasaki et al. eine metabolische Stabilität erzeugen. Die Substitution bei 4m und 4o führt jedoch zu einer Erniedrigung der Wirkstärke am hFFAR1.

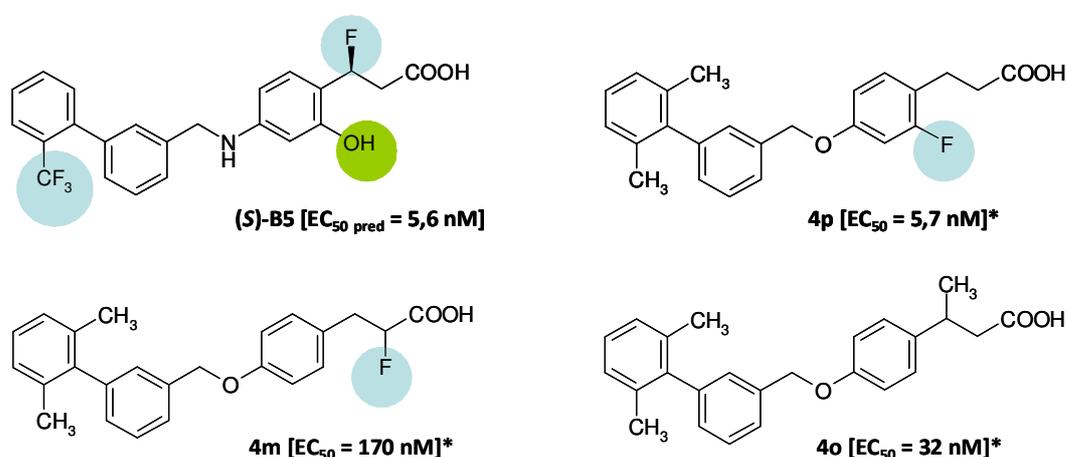


Abbildung 105:

Strukturabwandlungen des potenten, jedoch metabolisch instabilen hFFAR1-Agonisten **4p** aus der Arbeit von Sasaki et al. im Vergleich zu der in dieser Arbeit entworfenen Verbindung **B5**. EC_{50}^{pred} -Werte wurden durch das AFMoC-Modell vorhergesagt. * Daten stammen von Sasaki et al. (Sasaki, 2011).

Offen ließen Sasaki et al., ob eine Fluorierung der β -Position einen Einfluss auf die Wirkung am FFAR1 hat. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen die Vermutung nahe, dass eine

Fluorierung der β -Position zu einer erhöhten Wirkstärke am hFFAR1 führt (Verbindung B5). Die Fluorierung der β -Position könnte also verbesserte pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften ergeben. Sollte sich die hohe Aktivität der neu entworfenen hFFAR1-Agonisten bewahrheiten, stellen diese viel versprechende Verbindungen für präklinische Studien zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 dar.

5.4 Auswahl eines Kandidaten und weiterführende in vitro- und ex vivo-Charakterisierung

Zum Zeitpunkt der TUG 469-Studie mit NZO Mäusen (Kap. 4.5) war TUG 469 die potenteste im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Substanz. TUG 770 und 863 waren noch nicht charakterisiert. TUG 469 ist in beiden funktionellen Testsystemen (Ca^{2+} , cAMP) im Vergleich zu GW9508 potenter (Tab. 29) und gehört damit auch zu den bis dato potentesten hFFAR1-Agonisten (Bharate, 2009; Christiansen, 2010; Lin, 2011; Sasaki, 2011). Vor dem Einsatz dieser Verbindung in einer Tierstudie wurde zunächst überprüft, ob TUG 469 an pankreatischen β -Zellen der Ratte (INS-1) einen physiologischen Effekt auslösen kann. GW9508 diente als Referenz.

TUG 469 und GW9508 wurden mit Hilfe der Zellimpedanz an der physiologischen INS-1-Zelllinie und an den rekombinanten hFFAR1-Zellen vermessen. Tab. 29 fasst die hierbei ermittelten Wirkstärken beider Verbindungen an beiden Zellsystemen bei der Messung der Zellimpedanz zusammen (Daten aus Abb. 45, 47 und 85). Die Wirkstärken beider Verbindungen am rekombinanten hFFAR1-Zellsystem stimmen mit jenen aus dem cAMP-Assay gut überein. TUG 469 ist im Vergleich zu GW9508 sowohl im cAMP-Assay als auch bei der Zellimpedanzmessung 3-fach potenter.

Tabelle 29:

Aktivitäten von GW9508 und TUG 469 als EC_{50} in nM [E_{max}] in allen verwendeten funktionellen Testsystemen und Zellen.

	GW9508	TUG 469	Ratio ^Δ
Ca^{2+} -Assay (rekombinant*)	28 [103 [§]]	17 [114 [§]]	1,6
cAMP-Assay (rekombinant*)	240 [106 [§]]	81 [97 [§]]	3,0
Zellimpedanz (rekombinant*)	204 [0,90 [‡]]	68 [1,01 [‡]]	3,0
Zellimpedanz (physiologisch [#])	2190 [0,15 [‡]]	309 [0,14 [‡]]	7,1

* 1321N1-hFFAR1-Zellen, [#] pankreatische INS-1-Zellen der Ratte, [§] in % des TUG 20 (10 μM)-induzierten Effekts, [‡] in Cl,

^Δ EC_{50} (GW9508) / EC_{50} (TUG 469)

Ferner zeigt TUG 469 gegenüber GW9508 eine relativ höhere Wirkstärke in der Impedanzmessung an INS-1-Zellen verglichen mit cAMP- oder Impedanzmessungen an rekombinanten Zellen (7,1-fach) (Tab. 29). Eine Untersuchung der beiden Verbindungen an INS-1E-Zellen mit einer alternativen Messmethode durch die Arbeitsgruppe von Prof. E. Kostenis (Universität Bonn) zeigte eine 2,5-fach höhere Wirkstärke und eine gesteigerte Wirkhöhe von TUG 469 im Vergleich zu GW9508 (Christiansen, 2010). TUG 469 besitzt damit in allen verwendeten Testsystemen gegenüber GW9508 eine höhere Wirkstärke.

Beide Verbindungen besitzen an den INS-1-Zellen bei der Zellimpedanzmessung verglichen mit den Werten an den rekombinanten Zellen einen 5- bzw. 10-fach höheren EC_{50} -Wert. Die Höhe des maximalen Effekts an INS-1 beträgt etwa 15%, gemessen am maximalen Effekt an den rekombinanten Zellen. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich das geringere Expressionsmaß des Rezeptors an der nativen INS-1-Zelllinie. Dass Unterschiede in der Aminosäuresequenz des Rezeptors zwischen Ratte und Mensch einen solch großen Einfluss auf die Affinität eines FFAR1-Liganden haben ist unwahrscheinlich. Dies legt ein Vergleich der Proteinsequenz zwischen der humanen und Rattenform von Tikhonova et al. nahe (Tikhonova, 2007). Was die Aminosäurereste betrifft, die bei der Bindung des Liganden in der Rezeptorbindetasche eine Rolle spielen, fällt auf, dass sich die Nagelform von der humanen lediglich bei der Aminosäure an Position 5.42 unterscheidet. Das Leucin in der humanen Form ist bei Nagern durch ein Phenylalanin ausgetauscht (Anhang C). Hierbei handelt es sich um einen konservativen Austausch, der für die Bindung des Liganden unter Umständen keine großen Folgen hat. Negoro et al. geben für die bei ihnen Compound 1 (4p in Abb. 105) genannte Substanz eine halb so hohe Affinität am Rattenrezeptor gegenüber der humanen Form an (Negoro, 2010). Lin et al. berichten für den hFFAR1-Agonisten AMG837 von der gleichen Wirkstärke am Ratten- und humanen Rezeptor (Lin, 2011). Tan et al. berichten bei drei hFFAR1-aktiven Thiazolidindion-Analoga von einer höheren Wirkstärke an der Rattenform (Tan, 2008). Demzufolge scheint es zwischen Ratten- und humaner Rezeptorform auch funktionell keine signifikanten Unterschiede zu geben.

Der Effekt von TUG 469 an den INS-1-Zellen geht über ein bloßes Signal in der Zellimpedanz hinaus. Es konnte gezeigt werden, dass 5 μ M TUG 469 zu einer signifikant erhöhten Menge sezernierten Insulins nach einer 30-minütigen Stimulation bei einer Glucosekonzentration von 16,7 mM (300 mg/dl) führt (Kap. 4.4.2). Die gewählte Konzentration für TUG 469 ent-

spricht dem 16-fachen des EC_{50} -Werts, ermittelt im Zellimpedanzexperiment an den INS-1-Zellen. Daher kann von einer maximalen Stimulation des Rezeptors ausgegangen werden. 5 μ M GW9508 führt im Mittel ebenfalls zu einer Steigerung der Insulinsekretion. Der glucoseabhängige Effekt von TUG 469 auf die Insulinsekretion an INS-1-Zellen wurde auch in der Arbeitsgruppe von S. Ullrich (Universität Tübingen) bestätigt. In Gegenwart von 12 mM Glucose wurde eine Insulinsekretion beobachtet, bei 2,8 mM war kein Effekt zu erkennen (Christiansen, 2010).

Diese Ergebnisse zeigen, dass TUG 469 an pankreatischen INS-1-Zellen Effekte hervorrufen, die zu einer glucoseabhängigen Steigerung der Insulinsekretion führt. Eine FFAR1-Vermittlung dieses Effekts ist anzunehmen (Zellimpedanzmessung).

Liganden des hFFA1-Rezeptors sind sehr lipophil. Eine hohe Plasmaproteinbindung ist daher wahrscheinlich. Tab. 30 zeigt die ermittelte Wirkstärke von TUG 469 in Gegenwart von Serumalbumin. Physiologische Plasmaalbuminkonzentrationen liegen bei 3-5%. Eine Erhöhung der effektiven Konzentration von TUG 469 um das 26-fache in Gegenwart von 2,5% BSA (Tab. 30) lassen vermuten, dass unter physiologischen Bedingungen die 30-40-fache Konzentration an TUG 469 nötig ist, um den gleichen Effekt zu erzielen. Dies entspricht also einer Konzentration von 2-5 μ M für eine maximale Rezeptoraktivierung. Für die *in vivo*-Studie an Mäusen wurde daher eine effektive Dosis von 5 mg TUG 469 pro kg Körpergewicht abgeschätzt.

Tabelle 30:

Wirkstärke von TUG 469 in Gegenwart von bovinem Serumalbumin* (Kap. 4.1.2.1).

BSA [%, w/v]	EC_{50} [nM]
0	9
0,05	15
0,5	45
2,5	239

* ermittelt an 1321N1-hFFAR1-Zellen mit Ca^{2+} -Assay

Ein weiteres Argument für den Einsatz von TUG 469 in der *in vivo*-Studie sind die Ergebnisse aus den Selektivitätsuntersuchungen bezüglich des GPR120 (Kap. 4.6.2), die TUG 469 als

5. Diskussion

hoch-selektiven hFFAR1-Agonisten im Vergleich zu anderen Liganden ausweisen. Der GPR120 wird im Menschen und der Maus unter anderem in Zellen des Intestinaltrakts exprimiert und führt dort zu einer Ausschüttung von GLP-1, was wiederum eine gesteigerte Insulinsekretion aus den β -Zellen bewirkt (Hara, 2011). Die Stimulation des GPR120 und FFAR1 zieht daher den gleichen systemischen Effekt nach sich. Der GPR120 zeigt weiterhin einen inhibitorischen Effekt auf die Induktion inflammatorischer Prozesse und kann damit der Entwicklung einer Insulinresistenz entgegenwirken (Hara, 2011; Oh, 2010; Sun, 2010). Ein FFAR1-Agonist, der eine duale Stimulation des FFAR1 und GPR120 bewirkt, könnte also therapeutische Vorteile haben. Um jedoch nachzuweisen, dass der Insulin-sezernierende Effekt FFAR1-vermittelt ist, sind potente und hoch-selektive Liganden unabdingbar. Im Vergleich zu GW9508 bzw. TUG 770 zeigt TUG 469 eine rund 30-fach respektive 14-fach höhere Selektivität für den hFFAR1 gegenüber dem GPR120.

Tabelle 31:

Aktivitäten[§] und Selektivitätsindices (SI)* von potenten FFAR1-Agonisten am hFFAR1- bzw. hGPR120.

	EC ₅₀ in nM [E _{max} [#]]		
	GW9508	TUG 469	TUG 770
hFFAR1	65 [102]	17 [105]	12 [96]
hGPR120	479 [101]	4170 [72]	204 [111]
	SI = 7,3	SI = 239	SI = 17,6

[§] an 1321N1-FlpIn-Zellen im Ca²⁺-Assay, * SI = EC₅₀ (hGPR120) / EC₅₀ (hFFAR1), [#] in % des max. Histamin-induzierten Effekts

Ein Nachweis einer selektiven Vermittlung des systemischen Effekts durch den FFAR1 ist daher unter den hier verfügbaren Verbindungen mit TUG 469 am besten zu erreichen. Bei einer Konzentration eines potenten FFAR1-Agonisten von 2-5 μ M für den Nachweis des systemischen *in vivo*-Effekts würden GW9508 und TUG 770 bereits eine Vollstimulation des GPR120 bewirken, TUG 469 nicht. Letztlich bekräftigen alle in diesem Kapitel genannten Aspekte die Entscheidung für den Einsatz von TUG 469 in der *in vivo*-Tierstudie.

5.5 In vivo-Tierstudie

Der Nachweis eines systemischen Effekts insulinotroper Arzneistoffe erfolgt in der Regel über eine Bestimmung der Glucosetoleranz (GT) *in vivo*, welche eine Änderung der Insulinausschüttung indirekt sichtbar macht. Eine zusätzliche Bestimmung der Insulinkonzentration im Plasma ist wünschenswert, aber nicht primär erforderlich. Da bei einer zusätzlichen Bestimmung des Insulins im Plasma mehr Versuchstiere nötig gewesen wären, wurde hierauf in dieser Studie verzichtet. Aus den in dieser Arbeit identifizierten hFFAR1-Agonisten wurde anhand der in Kap. 5.4 aufgeführten Gründe TUG 469 ausgewählt. TUG 469 ist mit einem EC₅₀-Wert von 17 nM hoch-potent und hFFAR1-selektiv (Kap. 4.2.1.1 und 4.6.2). Aufgrund der Ergebnisse aus der *ex vivo*-Untersuchung, des Effekts von Serumalbumin (Kap. 4.1.2.1) und einem Vergleich mit den verabreichten Dosen anderer hFFAR1-Agonisten in *in vivo*-Studien wurde eine Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht (entspricht 1,5 µM unter Annahme einer homogenen Verteilung im Organismus) angesetzt (Tan, 2008; Tsujihata, 2010). Die Verbindung wurde zunächst normalgewichtigen C57BL/6-Mäusen intraperitoneal eine Stunde vor Glucosegabe verabreicht. TUG 469 zeigte keinen Effekt auf die GT in diesem Tiermodell. Als ein geeignetes Modell erwies sich die NZO-Maus, die genetisch bedingt zu Adipositas neigt (Buchmann, 2007; Mirhashemi, 2011). Hier hatte die Gabe der Testsubstanz eine signifikante Reduzierung der Plasmaglukosewerte zwischen 60-90 Minuten nach Glucosegabe zur Folge. Die Fläche unter der Glucosekonzentrations-Zeit-Kurve bis 120 Minuten nach Glucosegabe war bei der Gruppe der Versuchstiere mit verabreichter Testsubstanz signifikant niedriger als die Fläche unter der Vehikelkontrollkurve.

TUG 469 verbessert demzufolge die GT adipöser Versuchstiere und zeigt bei normalgewichtigen Versuchstieren keinen Effekt. Dieser Befund konnte auch für die Verbindung TAK-875 nachgewiesen werden und bestärkt damit die Hypothese, dass bei einer Applikation von hFFAR1-Agonisten generell keine hypoglykämischen Zustände zu erwarten sind (Tsujihata, 2010). Der Nachweis eines positiven Effekts von FFAR1-Agonisten auf die GT ist bereits mehrfach erbracht worden (Doshi, 2009; Tan, 2008; Tsujihata, 2010). TAK-875 bewirkt an diabetischen Ratten eine erhöhte Insulinsekretion und eine signifikante Verbesserung der GT bei 1-10 mg/kg peroraler Gabe (Negoro, 2010; Tsujihata, 2010). Die systemische Wirkung von TAK-875 ist damit mit dem Effekt der TUG 469 weitestgehend ver-

5. Diskussion

gleichbar. TUG 469 reiht sich mit diesem Ergebnis also in die Gruppe von hFFAR1-Agonisten ein, die eine Verbesserung der GT *in vivo* bewirken.

Ein möglicher Nachteil von TUG 469 ist eine schnelle Metabolisierung im Organismus. Sasaki et al. haben für eine Verbindung (**6i**), die TUG 469 sehr ähnelt, zwei Metabolite beschrieben, die aufgrund einer β -Oxidation in der Ratte entstehen und damit ein schlechtes pharmakokinetisches Profil (hohe Clearance, niedriger C_{\max} -Wert) ergeben (Abb. 106) (Sasaki, 2011).

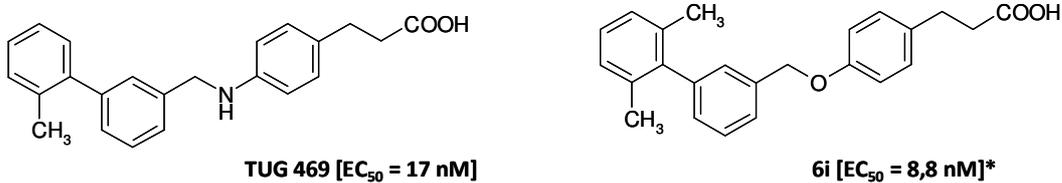


Abbildung 106:

Strukturen von **TUG 469** und **6i** von Sasaki et al. Die Verbindung 6i unterliegt einer Metabolisierung in der Ratte und besitzt ein schlechtes pharmakokinetisches Profil. * Wert stammt von Sasaki et al. (Sasaki, 2011).

Aus der Überlegung heraus, die pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern, ist TAK-875 entstanden (Negoro, 2010). Für TUG 469, die rein strukturell ebenfalls einer β -Oxidation unterliegen kann, konnten in dieser Arbeit keine Nachweise in diese Richtung erbracht werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die aus der 3D-QSAR hervorgegangenen und in der β -Position der Carbonsäure mit Fluor substituierten Verbindungen ein geringeres Maß an metabolischem Abbau zeigen werden.

6. Zusammenfassung

Der G-Protein-gekoppelte Freie-Fettsäure-Rezeptor 1 (FFAR1, früher GPR40) gilt als ein interessantes Zielprotein für die Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung des Typ 2-Diabetes mellitus. Eine Aktivierung des FFAR1 führt zu einer Steigerung der Insulinsekretion aus pankreatischen β -Zellen. Zwei potente FFAR1-Agonisten TAK-875 (TAKEDA) und AMG837 (AMGEN) befinden sich in der klinischen Prüfung. Ziele dieser Arbeit waren 1) die Identifizierung und pharmakologische Charakterisierung neuer hFFAR1-Liganden, 2) die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) unter Einbeziehung der Ligandbindungstasche, 3) das Design verbesserter Liganden basierend auf dem QSAR-Modell, sowie 4) die *ex vivo* und *in vivo* Untersuchung von TUG 469, dem bis dahin potentesten in dieser Arbeit identifizierten FFAR1-Agonisten an β -Zellen der Ratte sowie an NZO-Mäusen im Glucosetoleranz-Test. Insgesamt wurden über 450 mögliche hFFAR1-Liganden aus der Arbeitsgruppe von Prof. Ulven (University of Southern Denmark) am rekombinanten Zellsystem funktionell untersucht. Hiervon konnten 238 als hFFAR1-Agonisten und 3 als neue kompetitive hFFAR1-Antagonisten identifiziert und charakterisiert werden. Aus der Wirkstärke und den physikochemischen Eigenschaften von 171 hFFAR1-Agonisten wurden mit Hilfe von AFMoC deskriptive SAR abgeleitet. Das Modell stellte sich nach einer datensatzinternen Prüfung („Leave-One-Out“-Kreuzvalidierung, $q^2 = 0,61$) sowie einer Prüfung mit einem unabhängigen Testdatensatz (26 Verbindungen, $q^2 = 0,66$) als valide heraus und ermöglicht das zielgerichtete Design neuartiger hFFAR1-Agonisten. Zwei dieser Strukturentwürfe wurden von Prof. Ulven synthetisiert und in dieser Arbeit *in vitro* charakterisiert. Die Vorhersage der Wirkstärke für beide Substanzen war korrekt ($pEC_{50}^{pred} = pEC_{50}^{exp} \pm 0,35$). Das AFMoC-Modell erweist sich als valide Methode zum Design neuer und potenter hFFAR1-Agonisten. TUG 469 (EC_{50} an hFFAR1: 17 nM) wurde an β -Zellen der Ratte (*ex vivo*) und in einer Studie an diabetogenen NZO-Mäusen untersucht. In den β -Zellen der Ratte konnte eine gesteigerte Insulinsekretion nachgewiesen werden. Bei NZO-Mäusen verbesserte sich unter TUG 469 die Glucosetoleranz. Zusammengefasst hat diese Arbeit TUG 469 als Kandidaten für weiterführende präklinische Studien ermittelt. Das AFMoC-Modell ermöglicht die Optimierung pharmakodynamischer Eigenschaften von hFFAR1-Liganden. Eine Synthese weiterer in dieser Arbeit vorgeschlagener Strukturen scheint viel versprechend.

7. Abstract

The G-protein coupled free fatty acid receptor 1 (FFAR1, formerly known as GPR40) is thought to be an attractive drug target for the treatment of type-2 diabetes mellitus. The activation of FFAR1 enhances insulin secretion from pancreatic β -cells. Two FFAR1 agonists, TAK-875 (TAKEDA) and AMG837 (AMGEN), are currently under investigation in clinical trials.

The aims of this thesis were 1) identification and pharmacological characterisation of novel hFFAR1 ligands, 2) analysis of structure-activity-relationships (SAR) in consideration of the ligand binding pocket, 3) design of further improved ligands based on the QSAR-model, and 4) an *ex vivo* study at pancreatic rat β -cells and *in vivo* study in NZO-mice of TUG 469, the most potent FFAR1 agonist at that time.

More than 450 potential hFFAR1 ligands synthesized in the working group of Prof. Ulven (University of Southern Denmark) were explored in functional assays at recombinantly expressed hFFAR1. Hereof 238 hFFAR1 agonists and 3 novel competitive hFFAR1 antagonists were identified and characterized. Based on the potencies and physicochemical properties of 171 hFFAR1 agonists, descriptive SAR were analysed using AFMoC. The QSAR model was validated by an internal cross validation with the trainings set of ligands („Leave-One-Out“, $q^2 = 0.61$) as well as a further test using an independent test set (26 compounds, $q^2 = 0.66$). The model showed a valid predictive power and allows site-directed design of novel hFFAR1 agonists. Two QSAR-derived compounds were synthesized by Prof. Ulven and characterized in this study. The predicted potencies of these compounds were quite accurate ($pEC_{50}^{pred} = pEC_{50}^{exp} \pm 0.35$). The AFMoC model turned out to be a valid method for the design of novel and potent hFFAR1 agonists. TUG 469 (EC_{50} at hFFAR1: 17 nM) was further investigated in rat β -cells (*ex vivo*) and diabetogenic NZO-mice. TUG 469 treatment increased secretion of insulin in rat β -cells and improved glucose tolerance in NZO-mice. In addition, TUG 469 is more selective for hFFAR1 than GPR120.

In sum, this work ascertained TUG 469 as a candidate for further preclinical studies. The AFMoC model is a useful tool to optimize pharmacodynamic properties of hFFAR1 ligands. Synthesizing further QSAR-derived compounds seems promising.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:.....	2
Abbildung 2:.....	3
Abbildung 3:.....	4
Abbildung 4:.....	7
Abbildung 5:.....	7
Abbildung 6:.....	9
Abbildung 7:.....	11
Abbildung 8:.....	12
Abbildung 9:.....	17
Abbildung 10:.....	22
Abbildung 11:.....	35
Abbildung 12:.....	37
Abbildung 13:.....	38
Abbildung 14:.....	41
Abbildung 15:.....	43
Abbildung 16:.....	44
Abbildung 17:.....	45
Abbildung 18:.....	46
Abbildung 19:.....	47
Abbildung 20:.....	48
Abbildung 21:.....	49
Abbildung 22:.....	51
Abbildung 23:.....	52
Abbildung 24:.....	53
Abbildung 25:.....	54
Abbildung 26:.....	60
Abbildung 27:.....	63
Abbildung 28:.....	65
Abbildung 29:.....	66
Abbildung 30:.....	71
Abbildung 31:.....	72
Abbildung 32:.....	73

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 33:.....	74
Abbildung 34:.....	75
Abbildung 35:.....	76
Abbildung 36:.....	77
Abbildung 37:.....	78
Abbildung 38:.....	79
Abbildung 39:.....	79
Abbildung 40:.....	80
Abbildung 41:.....	81
Abbildung 42:.....	82
Abbildung 43:.....	82
Abbildung 44:.....	84
Abbildung 45:.....	85
Abbildung 46:.....	86
Abbildung 47:.....	87
Abbildung 48:.....	87
Abbildung 49:.....	88
Abbildung 50:.....	89
Abbildung 51:.....	90
Abbildung 52:.....	93
Abbildung 53:.....	95
Abbildung 54:.....	99
Abbildung 55:.....	100
Abbildung 56:.....	101
Abbildung 57:.....	102
Abbildung 58:.....	102
Abbildung 59:.....	104
Abbildung 60:.....	105
Abbildung 61:.....	105
Abbildung 62:.....	106
Abbildung 63:.....	111
Abbildung 64:.....	112
Abbildung 65:.....	112

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 66:.....	113
Abbildung 67:.....	114
Abbildung 68:.....	115
Abbildung 69:.....	117
Abbildung 70:.....	118
Abbildung 71:.....	119
Abbildung 72:.....	120
Abbildung 73:.....	122
Abbildung 74:.....	123
Abbildung 75:.....	124
Abbildung 76:.....	126
Abbildung 77:.....	129
Abbildung 78:.....	130
Abbildung 79:.....	131
Abbildung 80:.....	132
Abbildung 81:.....	135
Abbildung 82:.....	136
Abbildung 83:.....	137
Abbildung 84:.....	139
Abbildung 85:.....	140
Abbildung 86:.....	141
Abbildung 87:.....	142
Abbildung 88:.....	144
Abbildung 89:.....	145
Abbildung 90:.....	145
Abbildung 91:.....	146
Abbildung 92:.....	146
Abbildung 93:.....	147
Abbildung 94:.....	149
Abbildung 95:.....	150
Abbildung 96:.....	152
Abbildung 97:.....	153
Abbildung 98:.....	154

Abbildung 99:.....	155
Abbildung 100:.....	158
Abbildung 101:.....	159
Abbildung 102:.....	160
Abbildung 103:.....	160
Abbildung 104:.....	163
Abbildung 105:.....	164
Abbildung 106:.....	170

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	58
Tabelle 2:	59
Tabelle 3:	61
Tabelle 4:	62
Tabelle 5:	66
Tabelle 6 :	90
Tabelle 7:	91
Tabelle 8:	92
Tabelle 9:	93
Tabelle 10:	94
Tabelle 11:	97
Tabelle 12:	98
Tabelle 13:	100
Tabelle 14:	109
Tabelle 15:	110
Tabelle 16:	110
Tabelle 17:	120
Tabelle 18:	121
Tabelle 19:	124
Tabelle 20:	125
Tabelle 21:	126
Tabelle 22:	127
Tabelle 23:	133
Tabelle 24:	134
Tabelle 25:	137
Tabelle 26:	151
Tabelle 27:	155
Tabelle 28:	161
Tabelle 29:	165
Tabelle 30:	167
Tabelle 31:	168

10. Literaturverzeichnis

Agarwal A, Pearson PP, Taylor EW, et al. 3-Dimensional Quantitative Structure-Activity-Relationships of 5-Ht Receptor-Binding Data for Tetrahydropyridinylindole Derivatives - a Comparison of the Hansch and Comfa Methods. *J Med Chem.* 1993;36(25):4006-14.

Alquier T, Poitout V. GPR40: Good Cop, Bad Cop? *Diabetes.* 2009;58(5):1035-6.

AMBER. AmberTools. AMBER Software Administrator; 2011 [updated 22. November 2011]; Available from: <http://ambermd.org/>.

Arunlakshana O, Schild HO. Some Quantitative Uses of Drug Antagonists. *Brit J Pharm Chemoth.* 1959;14(1):48-58.

Asfari M, Janjic D, Meda P, et al. Establishment of 2-Mercaptoethanol-Dependent Differentiated Insulin-Secreting Cell-Lines. *Endocrinology.* 1992;130(1):167-78.

Baneres JL, Popot JL, Mouillac B. New advances in production and functional folding of G-protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol.* 2011;29(7):314-22.

BASF. Pluronic® F127 Block Copolymer Surfactant. BASF Corporation; 2004; Available from: www.performance.basf-corp.com.

Berridge MV, Tan AS. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (Mtt) - Subcellular-Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron-Transport in Mtt Reduction. *Arch Biochem Biophys.* 1993;303(2):474-82.

Bharate SB, Nemmani KVS, Vishwakarma RA. Progress in the discovery and development of small-molecule modulators of G-protein-coupled receptor 40 (GPR40/FFA1/FFAR1): an emerging target for type 2 diabetes. *Expert Opin Ther Pat.* 2009;19(2):237-64.

Bharate SB, Rodge A, Joshi RK, et al. Discovery of diacylphloroglucinols as a new class of GPR40 (FFAR1) agonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(24):6357-61.

Bhatt A, Patel PD, Patel MR, et al. CoMSIA Study on Substituted Aryl Alkanoic Acid Analogs as GPR40 Agonists. *Chem Biol Drug Des.* 2011;77(5):361-72.

Bjarnadottir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, et al. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics.* 2006;88(3):263-73.

Boneva NB, Kikuchi M, Minabe Y, et al. Implication of Fatty Acid-Binding Proteins (FABP) and G Protein-Coupled Receptor 40 (GPR40) in Adult Neurogenesis. *J Pharmacol Sci.* 2011;116(2):163-72.

Bostrom J, Greenwood JR, Gottfries J. Assessing the performance of OMEGA with respect to retrieving bioactive conformations. *J Mol Graph Model.* 2003;21(5):449-62.

Briscoe CP, Peat AJ, McKeown SC, et al. Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. *Brit J Pharmacol.* 2006;148(5):619-28.

Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(13):11303-11.

Buchmann J, Meyer C, Neschen S, et al. Ablation of the cholesterol transporter adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 reduces adipose cell size and protects against diet-induced obesity. *Endocrinology.* 2007;148(4):1561-73.

10. Literaturverzeichnis

- Burns RN, Moniri NH. Agonism with the omega-3 fatty acids alpha-linolenic acid and docosahexaenoic acid mediates phosphorylation of both the short and long isoforms of the human GPR120 receptor. *Biochem Bioph Res Co.* 2010;396(4):1030-5.
- Chen JJ, Foloppe N. Drug-like Bioactive Structures and Conformational Coverage with the LigPrep/ConfGen Suite: Comparison to Programs MOE and Catalyst. *J Chem Inf Model.* 2010;50(5):822-39.
- Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between Inhibition Constant (K_1) and Concentration of Inhibitor Which Causes 50 Per Cent Inhibition (I_{50}) of an Enzymatic-Reaction. *Biochem Pharmacol.* 1973;22(23):3099-108.
- Christiansen E, Due-Hansen ME, Urban C, et al. Structure-Activity Study of Dihydrocinnamic Acids and Discovery of the Potent FFA1 (GPR40) Agonist TUG-469. *Acs Med Chem Lett.* 2010;1(7):345-9.
- Christiansen E, Urban C, Grundmann M, et al. Identification of a Potent and Selective Free Fatty Acid Receptor 1 (FFA1/GPR40) Agonist with Favorable Physicochemical and in Vitro ADME Properties. *J Med Chem.* 2011;54(19):6691-703.
- Christiansen E, Urban C, Merten N, et al. Discovery of Potent and Selective Agonists for the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFA(1)/GPR40), a Potential Target for the Treatment of Type II Diabetes. *J Med Chem.* 2008;51(22):7061-4.
- Clark DP, Pazdernik NJ. *Molekulare Biotechnologie-Grundlagen und Anwendung.* Spektrum Akademischer Verlag; 2009. p. 60.
- Cohen CJ, and McCarthy, R. T. Nimodipine block of calcium channels in rat anterior pituitary cells. *J Physiol (London)* 1987;387:195-225.
- Cox MA, Jackson J, Stanton M, et al. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroentero.* 2009;15(44):5549-57.
- Cramer RD, Patterson DE, Bunce JD. Comparative Molecular-Field Analysis (Comfa) .1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J Am Chem Soc.* 1988;110(18):5959-67.
- Dewet JR, Wood KV, Deluca M, et al. Firefly Luciferase Gene - Structure and Expression in Mammalian-Cells. *Mol Cell Biol.* 1987;7(2):725-37.
- Donath MY. Inflammation as a Sensor of Metabolic Stress in Obesity and Type 2 Diabetes. *Endocrinology.* 2011;152(11):4005-6.
- Doshi LS, Brahma MK, Sayyed SG, et al. Acute administration of GPR40 receptor agonist potentiates glucose-stimulated insulin secretion in vivo in the rat. *Metabolism.* 2009;58(3):333-43.
- Dunworth WP, Caron KM. G Protein-Coupled Receptors as Potential Drug Targets for Lymphangiogenesis and Lymphatic Vascular Diseases. *Arterioscl Throm Vas.* 2009;29(5):650-6.
- Edfalk S, Steneberg P, Edlund H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes.* 2008;57(9):2280-7.
- Fatakia SN, Costanzi S, Chow CC. Computing Highly Correlated Positions Using Mutual Information and Graph Theory for G Protein-Coupled Receptors. *Plos One.* 2009;4(3).
- Feng DD, Luo ZQ, Roh SG, et al. Reduction in voltage-gated K^+ currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology.* 2006;147(2):674-82.
- Ferrannini E, Balkau B, Coppack SW, et al. Insulin resistance, insulin response, and obesity as indicators of metabolic risk. *J Clin Endocr Metab.* 2007;92(8):2885-92.
- Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. Mtt Colorimetric Assay for Testing Macrophage Cytotoxic Activity Invitro. *J Immunol Methods.* 1990;131(2):165-72.

10. Literaturverzeichnis

- FIZ. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nucleinsäuren. FIZ CHEMIE Fachinformationszentrum Chemie GmbH; 2008; Available from: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/gentechnik/prak_dna_isolierung.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden/reinheit_ns/reinheit_ns.vscml.html.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, et al. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*. 2003;63(6):1256-72.
- Fujita T, Matsuoka T, Honda T, et al. A GPR40 Agonist GW9508 Suppresses CCL5, CCL17, and CXCL10 Induction in Keratinocytes and Attenuates Cutaneous Immune Inflammation. *J Invest Dermatol*. 2011;131(8):1660-7.
- Fujiwara K, Maekawa F, Yada T. Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca²⁺ signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca²⁺ channel and link to insulin release. *Am J Physiol-Endoc M*. 2005;289(4):E670-E7.
- Garrido DM, Corbett DF, Dwornik KA, et al. Synthesis and activity of small molecule GPR40 agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(7):1840-5.
- Gerber PR, Muller K. Mab, a Generally Applicable Molecular-Force Field for Structure Modeling in Medicinal Chemistry. *J Comput Aid Mol Des*. 1995;9(3):251-68.
- Gohlke H, Klebe G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew Chem Int Edit*. 2002a;41(15):2645-76.
- Gohlke H, Klebe G. DrugScore meets CoMFA: adaptation of fields for molecular comparison (AFMoC) or how to tailor knowledge-based pair-potentials to a particular protein. *J Med Chem*. 2002b;45(19):4153-70.
- Gras D, Chanez P, Urbach V, et al. Thiazolidinediones induce proliferation of human bronchial epithelial cells through the GPR40 receptor. *Am J Physiol-Lung C*. 2009;296(6):L970-L8.
- Gromada J. The free fatty acid receptor GPR40 generates excitement in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2006;147(2):672-3.
- Hamacher A. In vitro-Analyse der Affinität und Selektivität von Dopamin- und 5-HT_{2A}-Rezeptorliganden [Inaugural-Dissertation]: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; 2007.
- Hara T, Hirasawa A, Ichimura A, et al. Free Fatty Acid Receptors FFAR1 and GPR120 as Novel Therapeutic Targets for Metabolic Disorders. *J Pharm Sci-U.S.* 2011;100(9):3594-601.
- Hardy S, St-Onge GG, Joly E, et al. Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(14):13285-91.
- Hirasawa A, Hara T, Katsuma S, et al. Free fatty acid receptors and drug discovery. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(10):1847-51.
- Hu H, He LY, Gong Z, et al. A novel class of antagonists for the FFAs receptor GPR40. *Biochem Bioph Res Co*. 2009;390(3):557-63.
- Humphries PS, Benbow JW, Bonin PD, et al. Synthesis and SAR of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-ones as novel G-protein-coupled receptor 40 (GPR40) antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(9):2400-3.
- IDF. IDF Diabetes Atlas: International Diabetes Federation; 2009. Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas/>.

10. Literaturverzeichnis

- Insel PAS, A Murray, F. Zhang, L. Yokouchi, H. Katakia, T. Kwon, O. Dimucci, D. Wilderman, A. GPCR expression in tissues and cells: Are the optimal receptors being used as drug targets? *Brit J Pharmacol.* 2011.
- Invitrogen. Flp-In System - For Generating Stable Mammalian Expression Cell Lines by Flp Recombinase-Mediated Integration. *Invitrogen Life Technologies*; 2002; C 021402:[K6010-01]. Available from: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K601001>.
- Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 2003;422(6928):173-6.
- Janjic D, Maechler P, Sekine N, et al. Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(6):639-48.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006;444(7121):840-6.
- Kanaide H, Kobayashi S, Nishimura J, et al. Quin2 Microfluorometry and Effects of Verapamil and Diltiazem on Calcium Release from Rat Aorta Smooth-Muscle Cells in Primary Culture. *Circ Res.* 1988;63(1):16-26.
- Kassack MU, Hofgen B, Lehmann J, et al. Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J Biomol Screen.* 2002;7(3):233-46.
- Kebede MA, Alquier T, Latour MG, et al. Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? *Diabetes Obes Metab.* 2009;11:10-20.
- Kenakin TP. The Schild Regression in the Process of Receptor Classification. *Can J Physiol Pharm.* 1982;60(3):249-65.
- Kerner W, Bruckel J. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes mellitus. *Diabetol Stoffwechs.* 2010;5:S109-S12.
- Kim W, Egan JM. The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. *Pharmacol Rev.* 2008;60(4):470-512.
- Klebe G. *Wirkstoffdesign - Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
- Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Bba-Biomembranes.* 2007;1768(4):794-807.
- Kopitz H, Zivkovic A, Engels JW, et al. Determinants of the Unexpected Stability of RNA Fluorobenzene Self Pairs. *Chembiochem.* 2008;9(16):2619-22.
- Kratz FE, B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J Control Release.* 2011.
- Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *New Engl J Med.* 2007;356(15):1517-26.
- Latour MG, Alquier T, Oseid E, et al. GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes.* 2007;56(4):1087-94.
- Lew MJ, Angus JA. Analysis of Competitive Agonist-Antagonist Interactions by Nonlinear-Regression. *Trends in pharmacological sciences.* 1995;16(10):328-37.
- Lin DCH, Zhang J, Zhuang R, et al. AMG 837: A Novel GPR40/FFA1 Agonist that Enhances Insulin Secretion and Lowers Glucose Levels in Rodents. *Plos One.* 2011;6(11).
- Lu SY, Jiang YJ, Lv J, et al. Molecular docking and molecular dynamics simulation studies of GPR40 receptor-agonist interactions. *J Mol Graph Model.* 2010;28(8):766-74.

10. Literaturverzeichnis

- Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* 2002;115(3):455-65.
- Ma D, Tao B, Warashina S, et al. Expression of Free Fatty Acid Receptor GPR40 in the Central Nervous System of Adult Monkeys. *J Nutrigenet Nutrige.* 2008;1(1-2):86-.
- Ma DX, Zhang MM, Larsen CP, et al. DHA promotes the neuronal differentiation of rat neural stem cells transfected with GPR40 gene. *Brain Res.* 2010;1330:1-8.
- Maghami P, Ranjbar B, Hosseinkhani S, et al. Relationship between stability and bioluminescence color of firefly luciferase. *Photoch Photobio Sci.* 2010;9(3):376-83.
- Meis S. Molekulare und funktionelle Charakterisierung des P2Y11-Rezeptors sowie pharmakologische Evaluierung neuer Agonisten und Antagonisten [Inaugural-Dissertation]. Duesseldorf: Heinrich-Heine Universität Düsseldorf; 2008.
- Merglen A, Theander S, Rubi B, et al. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology.* 2004;145(2):667-78.
- Milligan G, Stoddart LA, Smith NJ. Agonism and allosterism: the pharmacology of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3. *Brit J Pharmacol.* 2009;158(1):146-53.
- Mirhashemi F, Scherneck S, Kluth O, et al. Diet Dependence of Diabetes in the New Zealand Obese (NZO) Mouse: Total Fat, But not Fat Quality or Sucrose Accelerates and Aggravates Diabetes. *Exp Clin Endocr Diab.* 2011;119(3):167-71.
- Miyauchi S, Hirasawa A, Ichimura A, et al. New Frontiers in Gut Nutrient Sensor Research: Free Fatty Acid Sensing in the Gastrointestinal Tract. *J Pharmacol Sci.* 2010;112(1):19-24.
- Morris MJ, Chen H. Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. *Int J Obesity.* 2009;33(1):115-22.
- Morrison H, Jona J, Walker SD, et al. Development of a Suitable Salt Form for a GPR40 Receptor Agonist. *Org Process Res Dev.* 2011;15(1):104-11.
- Muller K, Faeh C, Diederich F. Fluorine in pharmaceuticals: Looking beyond intuition. *Science.* 2007;317(5846):1881-6.
- Muoio DM, Newgard CB. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2008;9(3):193-205.
- Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, et al. Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice (vol 58, pg 1067, 2009). *Diabetes.* 2009;58(7):1721-.
- Naik H, Vakilynejad, M., Wu, J., Viswanathan, P., Dote, N., Higuchi, T., Leifke, E. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamic Properties of the GPR40 Agonist TAK-875: Results From a Double-Blind, Placebo-Controlled Single Oral Dose Rising Study in Healthy Volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2011.
- Negoro N, Sasaki S, Mikami S, et al. Discovery of TAK-875: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable GPR40 Agonist. *Acs Med Chem Lett.* 2010;1(6):290-4.
- NIH. Glucose Tolerance Test. U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health; 2010 [updated 23.05.2010]; Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003466.htm>.
- Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell.* 2010;142(5):687-98.

10. Literaturverzeichnis

- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85-97.
- Parks J, Cistola, DP., Small, DM., Hamilton, JA. Interactions of the Carboxyl Group of Oleic Acid with Bovine Serum Albumin: A ¹³C NMR Study. *The Journal of biological chemistry.* 1983;258(15):9262-9.
- Perola E, Charifson PS. Conformational analysis of drug-like molecules bound to proteins: An extensive study of ligand reorganization upon binding. *J Med Chem.* 2004;47(10):2499-510.
- PyMOL. PYMOL - A USER-SPONSORED molecular visualization system on an OPEN-SOURCE foundation. Schrodinger; 2011 [12. Januar 2011]; Available from: <http://www.pymol.org/>.
- Rayasam GV, Tulasi VK, Davis JA, et al. Fatty acid receptors as new therapeutic targets for diabetes. *Expert Opin Ther Tar.* 2007;11(5):661-71.
- Roche. xCELLigence Technology. Roche Diagnostics 2011; Available from: http://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/index.jsp?id=xcept_010000.
- Rush TS, Grant JA, Mosyak L, et al. A shape-based 3-D scaffold hopping method and its application to a bacterial protein-protein interaction. *J Med Chem.* 2005;48(5):1489-95.
- Sasaki S, Kitamura S, Negoro N, et al. Design, Synthesis, and Biological Activity of Potent and Orally Available G Protein-Coupled Receptor 40 Agonists. *J Med Chem.* 2011;54(5):1365-78.
- Sawzdargo M, George SR, Nguyen T, et al. A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Bioph Res Co.* 1997;239(2):543-7.
- Schmidt J, Smith NJ, Christiansen E, et al. Selective Orthosteric Free Fatty Acid Receptor 2 (FFA2) Agonists IDENTIFICATION OF THE STRUCTURAL AND CHEMICAL REQUIREMENTS FOR SELECTIVE ACTIVATION OF FFA2 VERSUS FFA3. *Journal of Biological Chemistry.* 2011;286(12):10628-40.
- Schnell S, Schaefer M, Schofl C. Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;263(1-2):173-80.
- Schröder R, Janssen N, Schmidt J, et al. Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. *Nat Biotechnol.* 2010;28(9):943-50.
- Schwaller B. Nervensystem. Division d'Histologie de l'Université de Fribourg; 2005 [updated 5. April 2005]; Available from: http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/allg/popup_allg/astrozyt.php.
- Shapiro H, Shachar S, Sekler I, et al. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Bioph Res Co.* 2005;335(1):97-104.
- Shimomura O, Goto T, Johnson FH. Source of Oxygen in Co₂ Produced in Bioluminescent Oxidation of Firefly Luciferin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74(7):2799-802.
- Standfuss J, Edwards PC, D'Antona A, et al. The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature.* 2011;471(7340):656-60.
- Steinhilber D, Schubert-Zsilavec M, Roth H. Medizinische Chemie - Tagrets/Arznei-stoffe/Chemische Biologie. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2010.
- Steneberg R, Rubins N, Bartoov-Shifman R, et al. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab.* 2005;1(4):245-58.
- STFC. Chemical Database Service STFC Daresbury Laboratory; 2008 [updated 22. Juni 2008]; Available from: http://cds.dl.ac.uk/cds/interface_and_utilities/babel.html.

-
- Sum CS, Tikhonova IG, Costanzi S, et al. Two Arginine-Glutamate Ionic Locks Near the Extracellular Surface of FFAR1 Gate Receptor Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(6):3529-36.
- Sum CS, Tikhonova IG, Neumann S, et al. Identification of residues important for agonist recognition and activation in GPR40. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(40):29248-55.
- Sun Q, Hirasawa A, Hara T, et al. Structure-Activity Relationships of GPR120 Agonists Based on a Docking Simulation. *Molecular pharmacology*. 2010;78(5):804-10.
- Suzuki T, Igari SI, Hirasawa A, et al. Identification of G protein-coupled receptor 120-selective agonists derived from PPAR gamma agonists. *J Med Chem*. 2008;51(23):7640-4.
- Swaminath G, Jaeckel P, Guo Q, et al. Mutational analysis of G-protein coupled receptor-FFA2. *Biochem Bioph Res Co*. 2011;405(1):122-7.
- Tan CP, Feng Y, Zhou YP, et al. Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. *Diabetes*. 2008;57(8):2211-9.
- Tikhonova IG, Sum CS, Neumann S, et al. Bidirectional, iterative approach to the structural delineation of the functional "Chemoprint" in GPR40 for agonist recognition. *J Med Chem*. 2007;50(13):2981-9.
- Tocci G, Paneni F, Palano F, et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, Angiotensin II Receptor Blockers and Diabetes: A Meta-Analysis of Placebo-Controlled Clinical Trials. *Am J Hypertens*. 2011;24(5):582-90.
- Tsujihata Y, Ito R, Suzuki M, et al. TAK-875, a Novel, Orally Available GPR40 Agonist, Augments Glucose-Dependent Insulin Secretion and Improves Both Postprandial and Fasting Hyperglycemia in Type 2 Diabetic Rats. *Diabetes*. 2010;59:A165-A.
- Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 3rd edition ed: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.
- Wang L, Zhao YF, Gui BS, et al. Acute stimulation of glucagon secretion by linoleic acid results from GPR40 activation and $[Ca^{2+}]_i$ increase in pancreatic islet alpha-cells. *J Endocrinol*. 2011;210(2):173-9.
- Wu PW, Yang LY, Shen XM. The relationship between GPR40 and lipotoxicity of the pancreatic beta-cells as well as the effect of pioglitazone. *Biochem Bioph Res Co*. 2010;403(1):36-9.
- Xiong YM, Miyamoto N, Shibata K, et al. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(4):1045-50.
- Yang M, Chisholm JW, Soelaiman S, et al. Sulfonylureas uncouple glucose-dependence for GPR40-mediated enhancement of insulin secretion from INS-1E cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;315(1-2):308-13.
- Zhao YF, Pei JM, Chen C. Activation of ATP-sensitive potassium channels in rat pancreatic beta-cells by linoleic acid through both intracellular metabolites and membrane receptor signalling pathway. *J Endocrinol*. 2008;198(3):533-40.

11. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
A_x	Absorption bei der Wellenlänge x in nm
AC	Adenylatzyklase
ADP / ATP	Adenosin-di(/ tri)-phosphat
AFMoC	“Adaption of fields for molecular comparison”-QSAR-Methode
AK	Antikörper
AU	„Arbitrary Units“ (willkürliche Einheiten)
AUC	Fläche unter der Kurve
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare (bei DNA)
Ca^{2+}/Mg^{2+}	Calcium-/Magnesiumionen
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
C57BL-6	Mausstamm
CI	Cell Index (Zellimpedanzmessung)
C_{max}	maximale Plasmakonzentration
CI	Konfidenzintervall
CoMFA	“Comparative molecular field analysis”-QSAR-Methode
CoMSIA	“Comparative molecular similarity index analysis”-QSAR-Methode
CREB	cAMP-Response Element-bindende Protein
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
EC_{50} [p EC_{50}]	Wirkkonzentration bei 50 % E_{max} [negativ dekad. Logarithmus von EC_{50}]
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
E_{max}	Maximaler (Agonist-induzierter) Effekt bzw. Wirkhöhe
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FFA(R)	Freie Fettsäure (Rezeptor)
FI	Fluoreszenzintensität

11. Abkürzungsverzeichnis

GDP/GTP	Guanosin-di (/ tri)-phosphat
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GOI	Gen von Interesse
G	G-
GSIS	Glucosestimulierte Insulinsekretion
GTT	Glucosetoleranz-Test
HbA1c	Glycosyliertes adultes Hämoglobin A1
HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor 4 receptor α
IC ₅₀ [pIC ₅₀]	Wirkkonzentration bei 50 % Inhibition [neg. dekad. Logarithmus von IC ₅₀]
IDF	International Diabetes Federation
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
I _{max}	Max. (Antagonist-induzierte) Inhibierung des Agonist-induzierten Effekts
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
K _b	Bindungskonstante
K _i	Inhibitionskonstante
LA	Linolsäure
LI	Lumineszenzintensität
LOO	„Leave-One-Out“-Kreuzvalidierungsmethode
LTO	„Leave-Ten-Out“-Kreuzvalidierungsmethode
LV	Leervektor (unmodifiziertes pcDNA5/FRT-Plasmid)
nH	Hillslope (Steigung einer sigmoidal verlaufenden Kurve am Wendepunkt)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NZO	New Zealand Obese (Mausstamm)
OG	Oregon Green® 488 BAPTA-1
PDX1	Pancreatic and doudenal homeobox 1
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB / PKC	Proteinkinase B / C

11. Abkürzungsverzeichnis

PLC	Phospholipase C
PLS	„Partial least squares“-Methode
PPAR γ	Peroxisome proliferation activating Receptor γ
q^2	Güte der Korrelation zwischen $pEC_{50 \text{ exp}}$ und $pEC_{50 \text{ pred}}$
QSAR	Quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehung
r^2	Bestimmtheitsmaß
rpm	Umdrehungszahl pro Minute
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SE(M)	Standardfehler (des Mittelwerts)
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
UV	Ultraviolett
vs.	versus
WT	Wildtyp

Anhänge

A1) cDNA-Sequenzen

cDNA (humaner FFAR1):

```

1 atggacctgc cccgcagct ctcttcggc ctctatgtgg ccgctttgc gctgggcttc
61 ccgctcaacg tcttggecat ccgaggcgcg acggcccacg cccggctccg tctcaaccct
121 agcctgggtc acgcctgaa cctgggctgc tccgacctgc tgctgacagt ctctctgccc
181 ctgaaggcgg tggaggcgct agcctccggg gcctggcctc tgccggcctc gctgtgcccc
241 gtcttcggcg tggcccactt ctcccactc tatgccggcg ggggcttcct gccgcacctg
301 agtgcaggcc gctacctggg agcagccttc cccttgggct accaagcctt cgggaggccg
361 tgctattcct ggggggtgtg cgcggccatc tgggacctcg tctgtgtca cctgggtctg
421 gtctttgggt tggaggctcc aggaggctgg ctggaccaca gcaacacctc cctgggcatc
481 aacacaccgg tcaacggctc tccggtctgc ctggaggcct gggaccggc ctctgcggc
541 ccggcccgct tcagcctctc tctcctgctc tttttctgc ccttggccat cacagccttc
601 tgctacgtgg gctgcctccg ggcactggcc cactccggcc tgacgcacag gcggaagctg
661 cgggcccctt ggttggcccg cggggccctc ctacagctgc tgctctgctg aggacctac
721 aacgcctcca acgtggccag cttcctgtac cccaatctag gaggctcctg gcggaagctg
781 gggctcatca cgggtgcctg gactgtggtg cttaatccgc tggtagccgg ttacttggga
841 aggggtcctg gcctgaagac agtgtgtgcg gcaagaacgc aagggggcaa gtcccagaag
901 taa

```

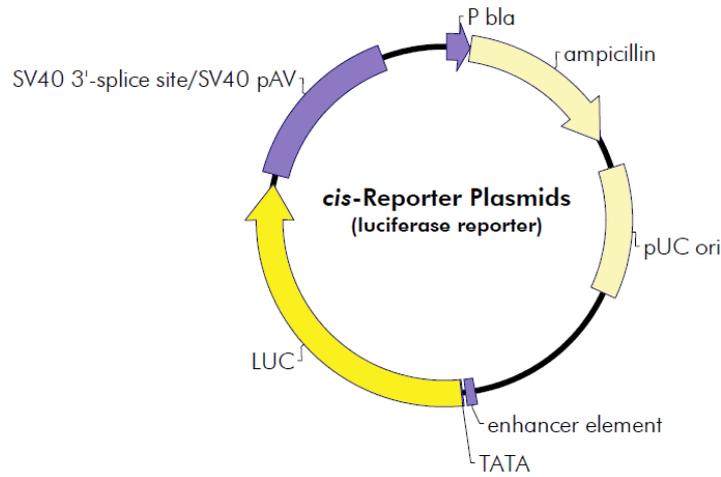
cDNA (humaner GPR120):

```

1 atgtcccctg aatgcgcgcg ggcagcgggc gacgcgcctc tgcgcagcct ggagcaagcc
61 aaccgcaccg gctttccctt cttctccgac gtcaagggcg accaccggct ggtgctggcc
121 gcggtggaga caaccgtgct ggtgctcatc tttgcagtgt cgctgctggg caacgtgtgc
181 gcctgggtgc tggtagcgcg ccgacgacgc cgcggcggga ctgctgctt ggtactcaac
241 ctcttctgcg cggacctgct cttcatcagc gctatccctc tggtagctggc cgtgcgctgg
301 actgaggcct ggctgctggg ccccgttgcc tgccacctgc tcttctacgt gatgacctg
361 agcggcagcg tcaccatcct cacgctggcc gcggtcagcc tggagcgcct ggtgtgcatc
421 gtgcacctgc agcgcggcgt gcggggtcct gggcggcggg cgcgggcagt gctgctggcg
481 ctcatctggg gctattcggc ggtcgcgcct ctgctctctc ggtcttctt ccgagctgct
541 ccgcaacggc tccccggcgc cgaccaggaa atttcgattt gcacactgat ttggcccacc
601 attcctggag agatctcgtg ggatgtctct tttgttactt tgaacttctt ggtgccagga
661 ctggtcattg tgatcagtta ctccaaaatt ttacagatca caaaggcatc aaggaagagg
721 ctacgggtaa gcctggccta ctcggagagc caccagatcc gcgtgtccca gcaggacttc
781 cggctcttcc gcaccctctt cctcctcatg gtctccttct tcatcatgtg gagccccatc
841 atcatcacca tctcctctat cctgatccag aacttcaagc aagacctggt catctggccg
901 tccctcttct tctgggtggt ggccttcaca tttgctaatt cagccctaaa cccatcctc
961 tacaacatga cactgtgcag gaatgagtgg aagaaaattt tttgctgctt ctggttccca
1021 gaaaagggag ccattttaac agacacatct gtcaaaagaa atgacttgtc gattatttct
1081 ggctaa

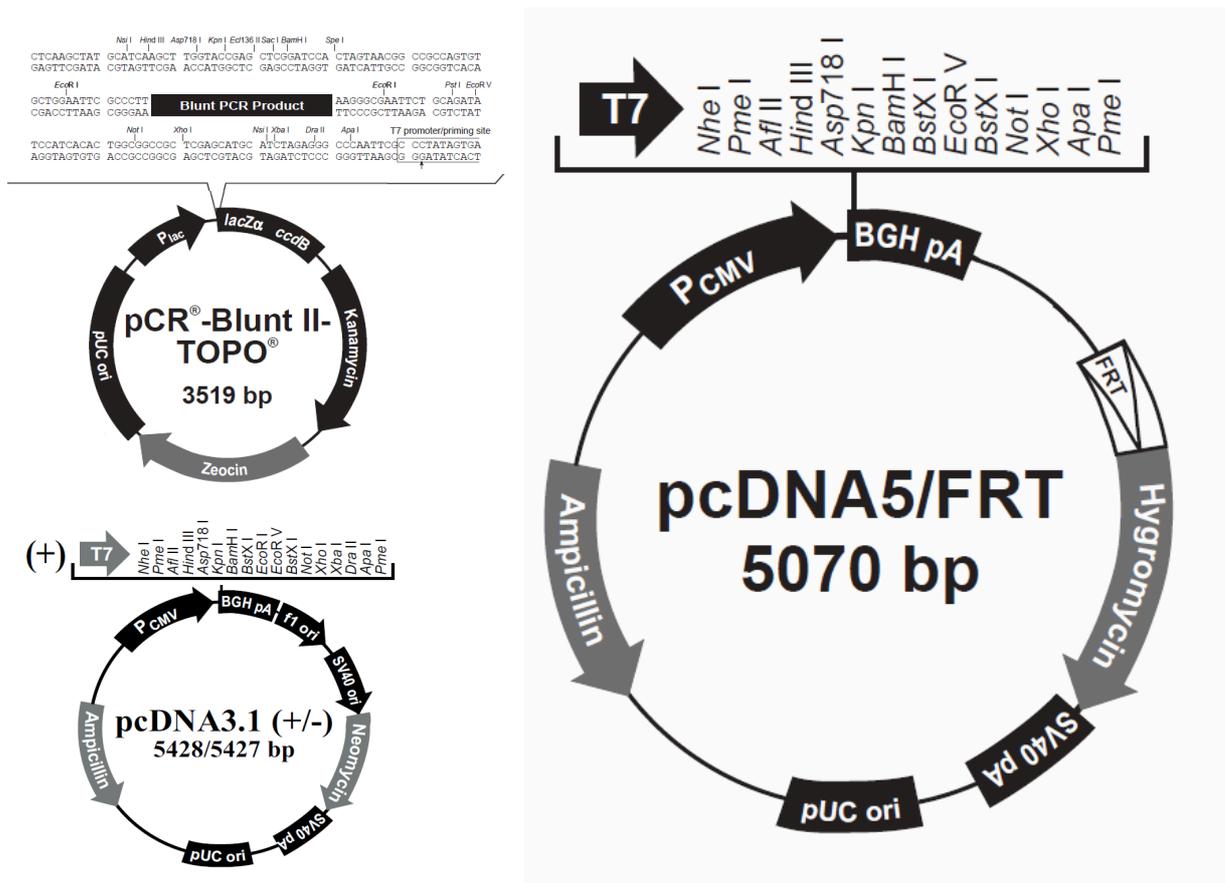
```

A2) Vektorkarte (transiente Transfektion)



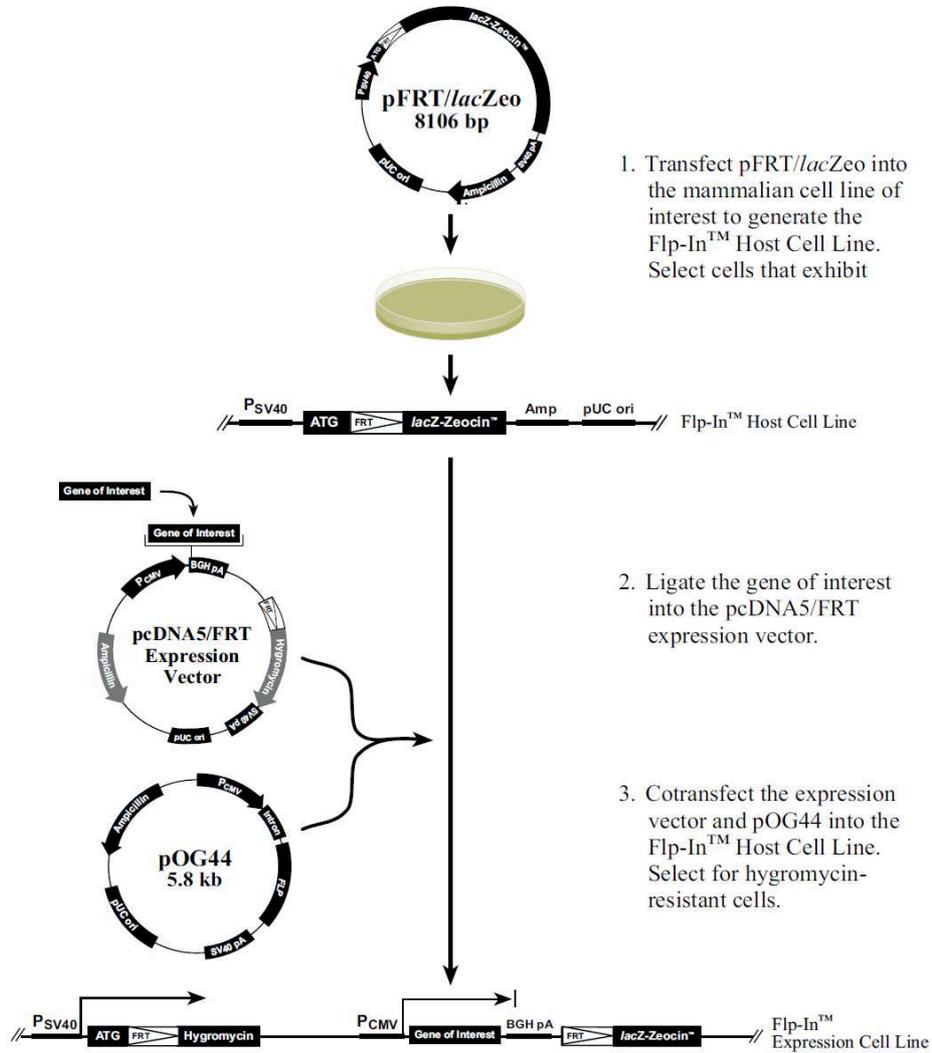
Vektorkarte des pCRE-luc Plasmids zur transienten Transfektion in cAMP-Reportergen-Assay.

A3) Vektorkarten (stabile Transfektion)



Karten der verwendeten Ursprungsvektoren der beiden Inserts hFFAR1 bzw. hGPR120 (links) und des pcDNA5/FRT-Transfektionsvektors (rechts). Die Namen und Basenlänge der Vektoren sind jeweils angeben. Abbildungen stammen aus den jeweiligen Handbüchern des Herstellers (Invitrogen, 2002).

A4) Einbau der GOI in FlpIn-Host-Zelllinie



Schematische Darstellung der Entwicklung einer FlpIn-Host-Zelllinie und des Einbaus von GOI (hFFAR1- und hGPR120) in diese Host-Zelllinie. Die Abbildung wurde dem Handbuch FlpIn™ System (Version C) von Invitrogen entnommen und modifiziert (Invitrogen, 2002).

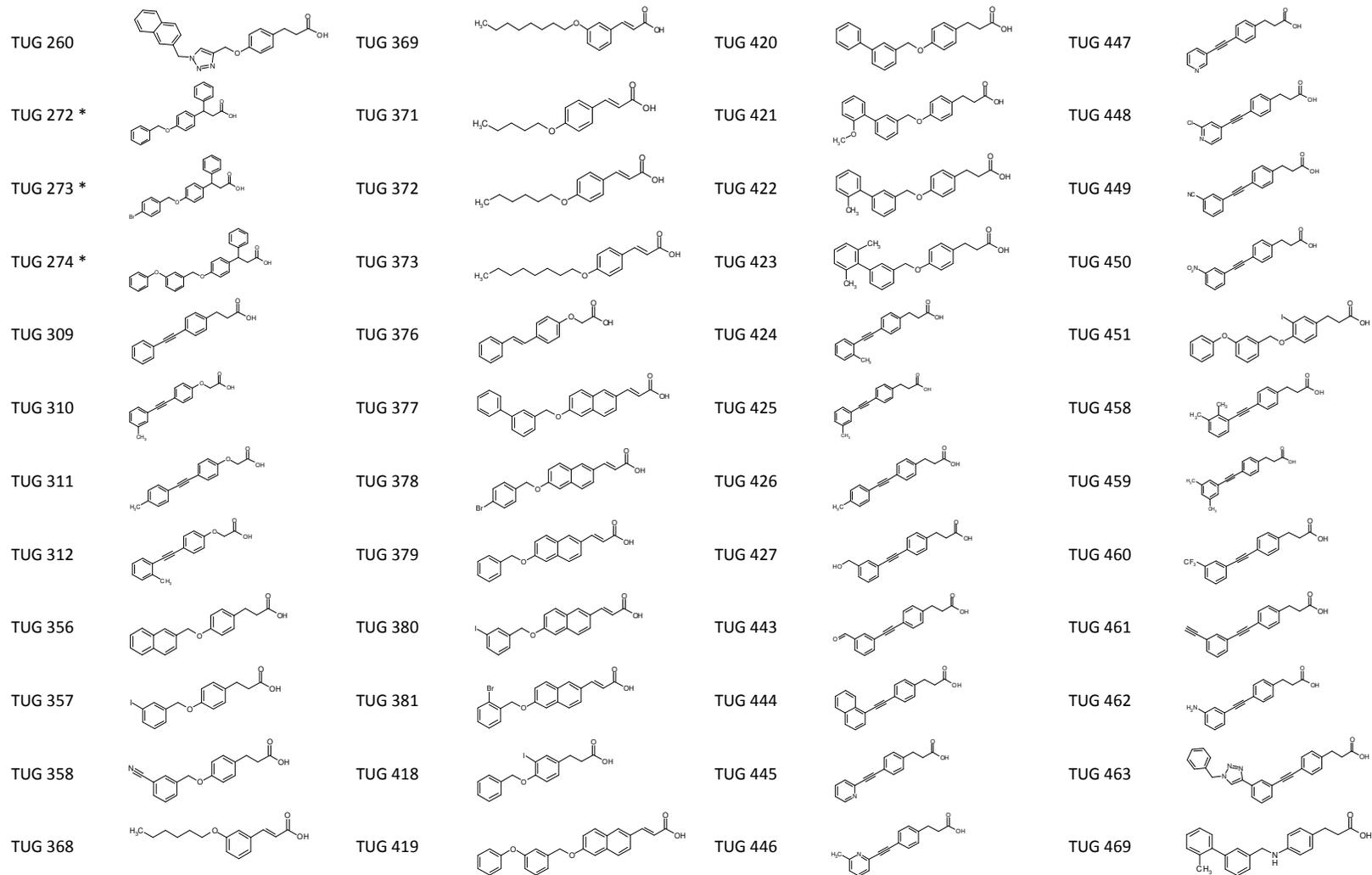
B1) Strukturformeln

Linolsäure		TUG 20		TUG 185		TUG 223	
Cpd 10A		TUG 21		TUG 186		TUG 230	
GW9508		TUG 25		TUG 187		TUG 232	
Ciglitazon *		TUG 26		TUG 203		TUG 233	
Troglitazon *		TUG 27		TUG 204		TUG 242	
Rosiglitazon *		TUG 28		TUG 205		TUG 244	
MCC-555 *		TUG 29		TUG 206		TUG 245	
TAK-875 *		TUG 178		TUG 207		TUG 246	
TUG 11		TUG 179		TUG 208		TUG 247	
TUG 14		TUG 182		TUG 221		TUG 248	
TUG 19		TUG 184		TUG 222		TUG 256	

bekannte hFFAR1-Agonisten, TUG 11 bis TUG 256

*Racemat

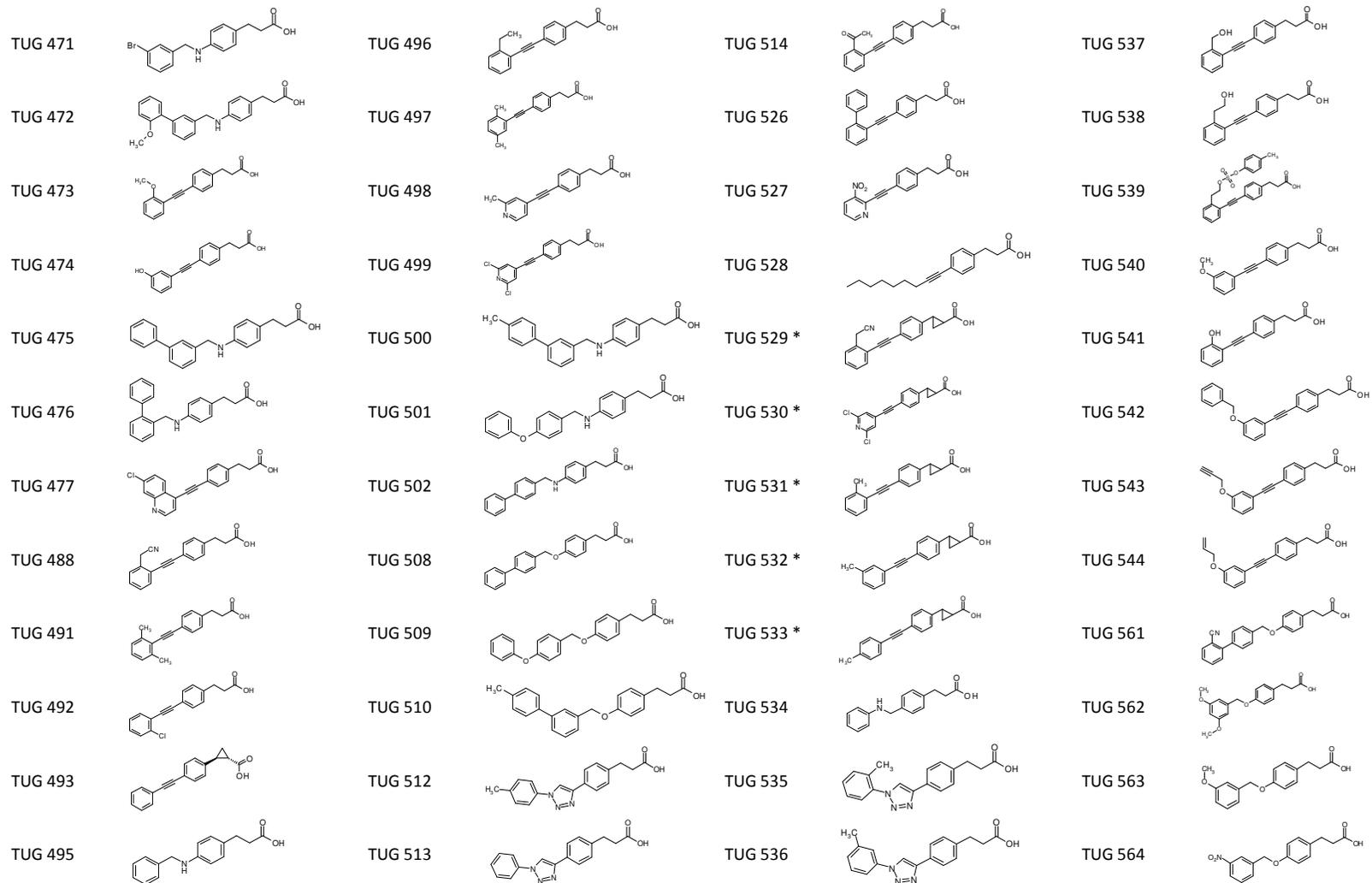
Anhänge



TUG 260 bis TUG 469

*Racemat

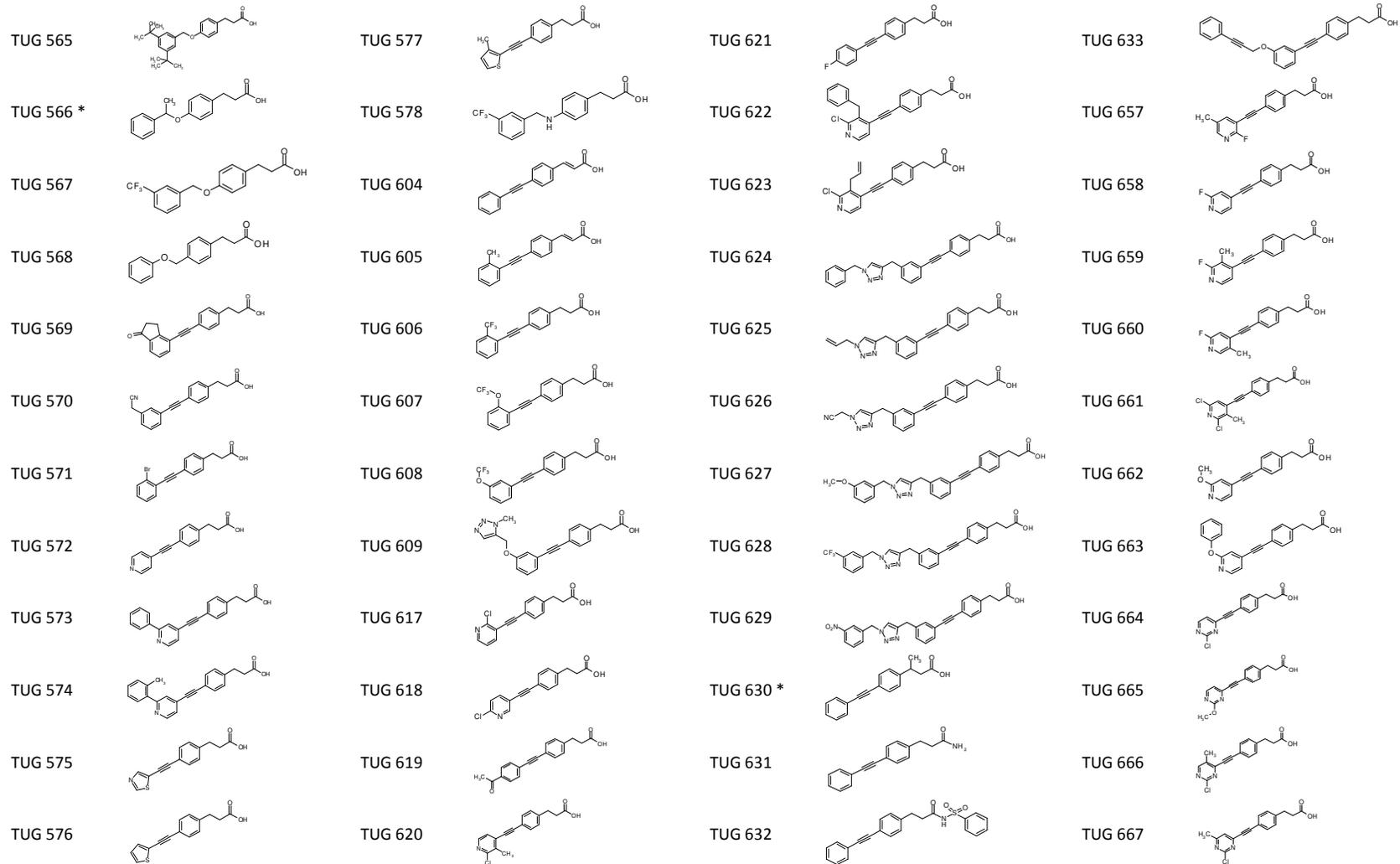
Anhänge



TUG 471 bis TUG 564

*Racemat

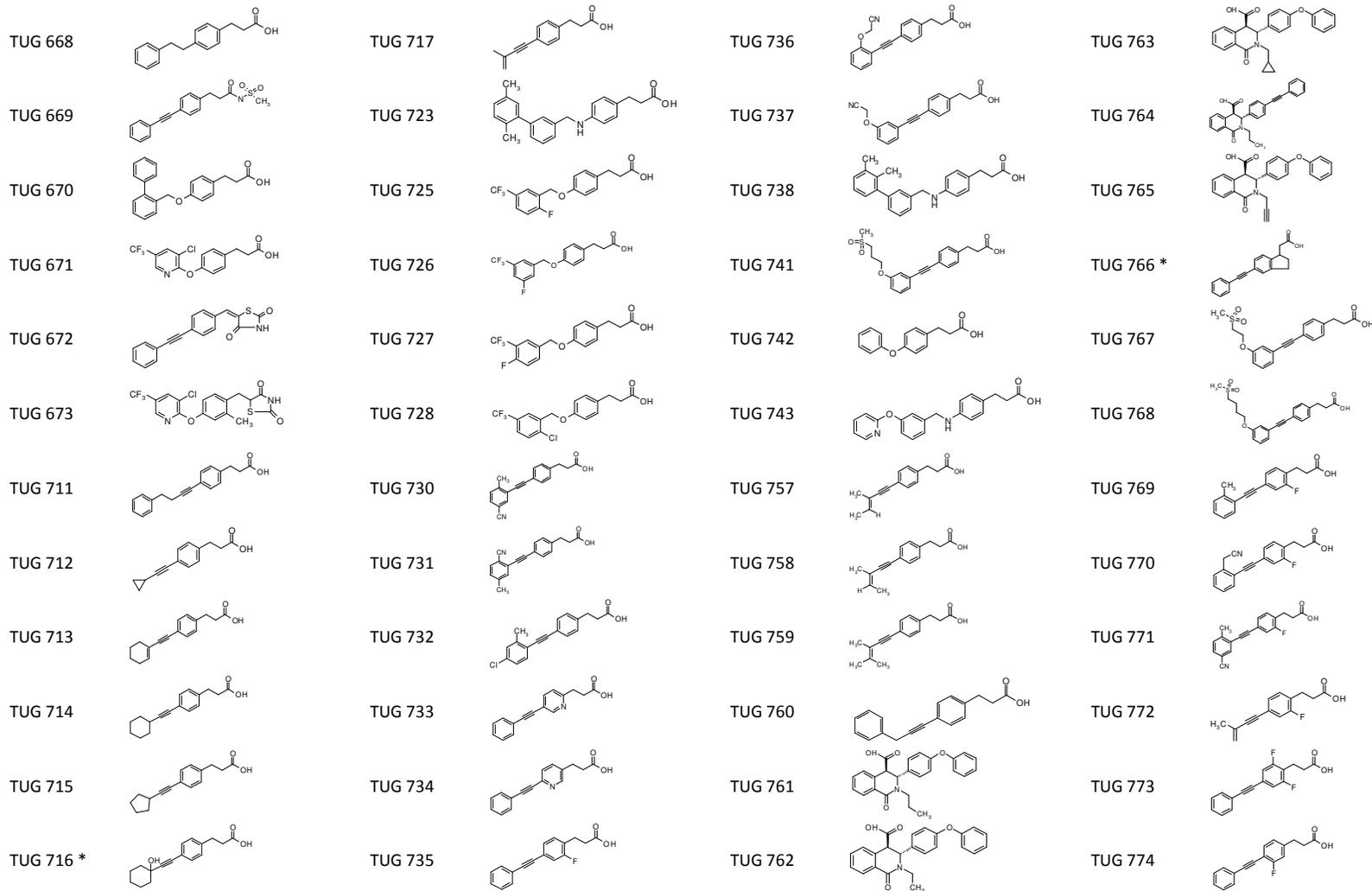
Anhänge



TUG 565 bis TUG 667

*Racemat

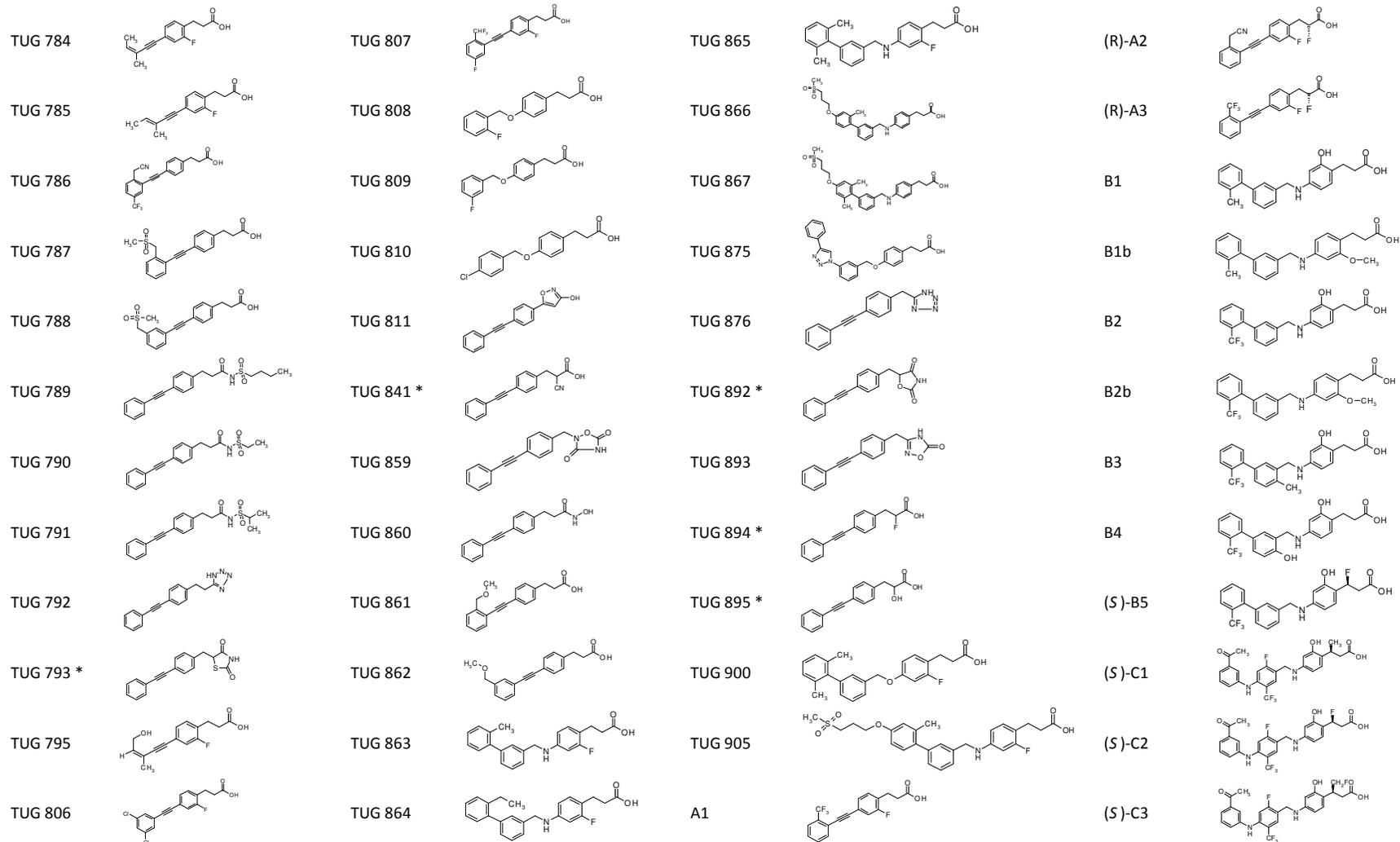
Anhänge



TUG 668 bis TUG 774

*Racemat

Anhänge



TUG 784 bis TUG 905, neuartige Strukturentwürfe (A1-C3)

*Racemat

Anhänge

B2) Pharmakologische und prediktive Daten (hFFAR1-Agonisten)

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀
Linolsäure	5,35	0,04	81	3	2,00	0,33	4,65	0,05	84	5	2,24	0,43	5,62 '
Cpd 10A	7,20	0,03	111	2	2,11	0,20	6,62	0,06	118	5	1,56	0,30	-
GW9508	7,56	0,04	110	2	1,56	0,18	6,62	0,05	106	4	1,55	0,26	7,15 '
Ciglitazon	5,10	0,03	80	2	2,42	0,43	-	-	-	-	-	-	-
Troglitazon	6,01	0,02	87	2	2,86	0,54	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-
Rosiglitazon	5,25	0,03	98	3	1,91	0,22	5,55	0,07	85	4	1,94	0,59	-
MCC-555	bis 3,16 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAK-875 **	7,59	0,04	91	2	2,72	0,65	-	-	-	-	-	-	-
TUG 11	bis 31,6 µM kein Effekt				-	-	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-
TUG 14	5,90	0,04	104	2	1,47	0,17	5,40	0,10	55	4	1,27	0,33	5,92 '
TUG 19	5,07	0,04	87	3	1,93	0,30	4,70	0,20	34	7	1,37	0,63	5,08 '
TUG 20	6,37	0,02	98	1	1,77	0,11	5,54	0,04	124	3	1,20	0,10	6,23 '
TUG 21	6,26	0,03	98	2	1,88	0,19	5,48	0,08	124	8	1,45	0,28	6,20 '
TUG 25	5,43	0,03	97	2	2,20	0,35	5,13	0,05	104	4	1,92	0,39	5,43 '
TUG 26 *	5,25	0,16	83	8	0,87	0,24	5,19	0,18	61	8	0,91	0,29	5,27 '
TUG 27 *	4,44	0,04	98	12	3,22	2,81	bis 10 µM kein Effekt				-	-	4,78 '
TUG 28*	5,01	0,08	87	5	1,29	0,26	5,39	0,14	47	6	3,00	2,70	5,02 '
TUG 29 */***	5,20	0,24	75	10	0,96	0,48	4,90	0,05	85	5	1,53	0,24	5,44 '
TUG 178	6,16	0,06	79	2	1,70	0,35	5,56	0,04	115	4	2,81	0,79	5,87 '
TUG 179	6,64	0,04	100	2	1,78	0,22	6,13	0,05	117	4	3,11	0,85	6,40 '
TUG 182	6,35	0,04	99	2	1,57	0,21	5,54	0,09	44	3	1,81	0,68	6,41 '
TUG 184	5,47	0,07	89	4	1,24	0,19	4,78	0,08	99	9	1,88	0,48	4,77 '
TUG 185	5,43	0,03	102	3	2,37	0,48	4,54	0,06	111	9	1,97	0,49	5,31 '
TUG 186	5,93	0,03	108	2	2,35	0,41	4,98	0,04	98	5	2,66	1,06	5,49 '
TUG 187	7,24	0,03	98	1	2,33	0,30	5,71	0,10	149	8	1,00	0,20	7,01 '
TUG 203	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	5,53 ''
TUG 204	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	5,28 ''
TUG 205	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	5,35 ''

* in Gegenwart von 0,01% (w/v) Pluronic F-127, ** in Gegenwart von 0,05% (w/v) BSA (fettsäurefrei), *** im verlängerten Messmodus ermittelt, LOO-Vorhersage (Trainingsdatensatz) ', AFMoC-Vorhersage (Testdatensatz) ''

Anhänge

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten	
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	
TUG 206	bis 10 µM kein Effekt						-	-	-	-	-	-	-	5,27 "
TUG 207	4,81	0,05	78	5	1,93	0,55	5,28	0,06	113	5	2,46	0,53	4,79 '	
TUG 208	bis 31,6 µM kein Effekt						5,10	0,07	82	5	2,22	0,73	-	
TUG 221	7,05	0,02	99	1	2,29	0,27	5,76	0,07	139	6	1,11	0,17	6,71 '	
TUG 222	bis 10 µM kein Effekt						-	-	-	-	-	-	-	5,27 "
TUG 223	bis 10 µM kein Effekt						-	-	-	-	-	-	-	4,83 "
TUG 230	bis 31,6 µM kein Effekt						bis 100 µM kein Effekt						-	
TUG 232	bis 10 µM kein Effekt						-	-	-	-	-	-	-	5,42 "
TUG 233	bis 10 µM kein Effekt						-	-	-	-	-	-	-	4,75 "
TUG 242	bis 31,6 µM kein Effekt						bis 100 µM kein Effekt						-	
TUG 244	5,25	0,03	86	2	1,97	0,25	5,00	0,09	72	6	1,56	0,45	5,75 '	
TUG 245	bis 10 µM kein Effekt						bis 10 µM kein Effekt						-	
TUG 246	bis 10 µM kein Effekt						-	-	-	-	-	-	-	4,50 "
TUG 247	5,61	0,07	92	4	0,96	0,15	5,21	0,06	65	4	2,99	0,70	5,07 '	
TUG 248	bis 10 µM kein Effekt						-	-	-	-	-	-	-	6,63 "
TUG 256	bis 10 µM kein Effekt						-	-	-	-	-	-	-	4,89 "
TUG 260	5,32	0,03	95	2	2,51	0,30	4,95	0,05	71	4	3,00	1,58	-	
TUG 272	6,74	0,03	122	3	1,49	0,14	6,47	0,07	81	3	1,78	0,50	-	
TUG 273	6,64	0,03	118	3	2,04	0,22	6,57	0,06	109	5	2,26	0,76	-	
TUG 274	6,25	0,02	118	2	3,43	0,30	6,16	0,07	112	5	3,00	1,08	-	
TUG 309	6,69	0,03	105	1	2,44	0,22	6,32	0,05	117	3	1,52	0,21	7,02 '	
TUG 310	6,29	0,03	113	2	1,87	0,19	6,25	0,09	63	3	2,06	0,56	5,91 '	
TUG 311	bis 3,16 µM kein Effekt						bis 100 µM kein Effekt						-	
TUG 312	5,45	0,02	93	1	3,09	0,57	5,08	0,14	29	4	3,00	3,54	6,07 '	
TUG 356	6,22	0,04	97	2	1,74	0,22	5,47	0,05	135	5	1,84	0,39	6,27 '	
TUG 357	6,22	0,05	103	3	1,84	0,05	5,82	0,07	123	5	1,56	0,33	6,03 '	
TUG 358	6,28	0,02	102	2	2,20	0,16	5,50	0,07	132	6	1,11	0,19	6,26 '	
TUG 368	5,07	0,05	82	3	-	-	4,59	0,04	99	5	2,38	0,49	5,39 '	
TUG 369	5,57	0,04	79	2	2,89	0,86	5,13	0,07	106	6	2,08	0,57	5,41 '	
TUG 371	5,76	0,06	79	3	1,32	0,24	5,32	0,05	135	5	2,98	0,64	5,67 '	

LOO-Vorhersage (Trainingsdatensatz) ', AFMoC-Vorhersage (Testdatensatz) "

Anhänge

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀
TUG 372	6,19	0,05	86	2	1,63	0,24	5,64	0,05	141	5	1,55	0,26	5,83'
TUG 373	5,63	0,09	83	4	1,03	0,19	5,20	0,06	144	6	3,00	0,68	5,58'
TUG 376 ***	bis 10 µM kein Effekt				-	-	bis 31,6 µM kein Effekt				-	-	-
TUG 377 ***	bis 10 µM kein Effekt				-	-	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-
TUG 378 ***	bis 10 µM kein Effekt				-	-	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-
TUG 379	5,68	0,11	70	5	0,88	0,19	5,38	0,13	129	12	1,40	0,53	5,73'
TUG 380	5,80	0,11	58	4	1,03	0,28	5,43	0,06	122	5	1,42	0,26	-
TUG 381	6,18	0,12	62	3	1,01	0,26	5,25	0,08	123	7	2,21	0,65	6,22'
TUG 418	4,90	0,02	81	2	2,52	0,33	5,11	0,07	105	7	2,73	1,15	4,60'
TUG 419 ***	5,25	0,07	105	5	1,85	0,40	4,57	0,04	125	8	2,46	0,65	5,41'
TUG 420	6,88	0,05	103	3	1,67	0,32	5,77	0,08	127	6	1,04	0,17	6,99'
TUG 421	6,92	0,04	105	2	2,01	0,36	6,17	0,07	141	6	1,62	0,33	7,11'
TUG 422	7,30	0,05	112	2	1,76	0,27	6,48	0,08	138	5	0,94	0,15	7,53'
TUG 423	7,30	0,05	102	2	3,36	0,69	6,59	0,07	130	5	1,01	0,15	7,28'
TUG 424	7,34	0,07	102	3	1,88	0,47	6,67	0,07	91	3	0,94	0,12	7,19'
TUG 425	7,13	0,05	97	3	2,21	0,48	6,54	0,08	106	5	1,06	0,19	6,84'
TUG 426	6,55	0,04	109	3	1,62	0,20	6,38	0,08	131	6	1,64	0,41	5,88'
TUG 427	5,80	0,06	101	5	1,62	0,32	5,08	0,24	66	10	0,80	0,24	6,01'
TUG 443	6,45	0,04	95	4	2,47	0,64	5,07	0,05	89	5	2,02	0,45	6,67'
TUG 444	7,20	0,08	107	4	1,20	0,24	6,30	0,06	119	4	1,33	0,21	6,59'
TUG 445	4,88	0,04	98	4	2,30	0,37	4,62	0,11	102	14	1,58	0,43	5,20'
TUG 446	5,21	0,04	108	4	1,98	0,31	4,72	0,06	172	11	1,94	0,37	5,28'
TUG 447	5,20	0,02	96	1	2,58	0,20	4,84	0,09	74	7	1,79	0,55	5,48'
TUG 448	6,53	0,02	93	2	2,98	0,79	5,76	0,08	153	7	1,12	0,20	6,16'
TUG 449	6,60	0,02	100	2	1,89	0,17	6,10	0,08	133	6	1,20	0,23	6,79'
TUG 450	7,00	0,04	95	2	1,74	0,26	6,17	0,07	152	6	0,98	0,14	6,47'
TUG 451	5,02	0,01	81	1	4,15	1,59	4,65	0,06	129	9	2,21	0,51	4,89'
TUG 458	6,93	0,04	107	2	1,83	0,26	6,85	0,05	100	3	1,39	0,22	7,00'
TUG 459	7,08	0,03	102	2	2,60	0,50	6,81	0,09	106	4	1,21	0,28	6,60'
TUG 460	6,95	0,04	101	2	1,52	0,18	6,75	0,08	117	5	1,26	0,28	6,97'

*** im verlängerten Messmodus ermittelt, LOO-Vorhersage (Trainingsdatensatz)'

Anhänge

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀
TUG 461	6,76	0,03	101	1	1,42	0,14	6,34	0,06	172	5	0,90	0,10	6,74 '
TUG 462	5,98	0,02	97	1	2,17	0,25	5,37	0,05	151	5	2,00	0,43	7,01 '
TUG 463	5,72	0,07	92	4	1,42	0,30	5,76	0,05	116	4	1,56	0,25	-
TUG 469	7,78	0,03	114	2	1,55	0,14	7,09	0,03	97	2	1,33	0,11	7,65 '
TUG 471	6,76	0,04	110	2	1,42	0,14	5,83	0,03	100	2	1,41	0,12	6,88 '
TUG 472	7,16	0,03	109	2	1,89	0,19	6,48	0,05	72	2	1,34	0,18	6,98 '
TUG 473	6,66	0,03	99	2	1,75	0,21	5,74	0,07	98	3	1,43	0,29	6,62 '
TUG 474	6,35	0,04	103	2	1,55	0,18	5,67	0,08	84	4	1,21	0,24	6,57 '
TUG 475	7,27	0,02	101	1	1,87	0,14	6,44	0,07	104	5	1,42	0,29	7,00 '
TUG 476	5,97	0,02	97	2	2,05	0,24	5,29	0,06	89	4	2,25	0,53	5,84 '
TUG 477	7,10	0,07	125	3	1,03	0,16	7,03	0,07	82	3	1,30	0,30	7,53 '
TUG 488	7,70	0,04	103	2	1,60	0,21	6,70	0,06	121	3	0,79	0,08	7,31 '
TUG 491	6,38	0,03	103	2	2,08	0,22	5,96	0,04	69	3	3,07	1,43	7,26 '
TUG 492	6,82	0,04	107	2	1,43	0,16	6,25	0,08	44	3	1,73	0,43	7,00 '
TUG 493	6,80	0,03	108	2	1,83	0,21	6,74	0,07	88	3	1,69	0,38	-
TUG 495	6,12	0,03	89	2	2,38	0,37	5,35	0,05	130	6	1,57	0,23	6,39 '
TUG 496	7,05	0,03	101	2	2,25	0,42	6,92	0,05	111	4	2,65	0,91	6,97 '
TUG 497	6,91	0,06	102	3	1,57	0,30	6,31	0,11	149	10	1,00	0,25	7,03 '
TUG 498	5,95	0,03	102	3	2,26	0,44	5,50	0,08	113	6	1,28	0,25	6,14 '
TUG 499	7,37	0,03	103	2	1,61	0,17	7,20	0,08	115	5	1,65	0,42	6,97 '
TUG 500	6,90	0,04	92	2	2,05	0,34	6,33	0,04	96	3	1,89	0,28	6,88 '
TUG 501	6,74	0,03	100	2	1,80	0,21	5,88	0,09	137	8	1,06	0,20	6,82 '
TUG 502	6,38	0,02	92	2	2,30	0,25	5,67	0,08	99	8	1,14	0,20	6,39 '
TUG 508 **	6,04	0,05	87	2	1,57	0,25	-	-	-	-	-	-	6,9 '
TUG 509	6,69	0,03	98	2	2,23	0,24	5,79	0,05	161	4	1,52	0,24	6,81 '
TUG 510	6,31	0,03	86	2	2,97	0,40	5,31	0,11	69	4	3,93	1,95	6,62 '
TUG 512	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	6,22 "
TUG 513	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUG 514	6,73	0,04	101	2	1,99	0,25	6,40	0,11	146	9	1,34	0,41	7,22 '

** in Gegenwart von 0,05% (w/v) BSA (fettsäurefrei), LOO-Vorhersage (Trainingsdatensatz) ', AFMoC-Vorhersage (Testdatensatz) "

Anhänge

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀
TUG 526	6,00	0,02	91	2	2,74	0,61	-	-	-	-	-	-	6,03'
TUG 527	4,96	0,04	87	4	2,50	0,68	-	-	-	-	-	-	5,28'
TUG 528	5,84	0,04	84	2	1,95	0,28	-	-	-	-	-	-	5,89'
TUG 529	7,45	0,03	99	1	2,76	0,51	7,27	0,08	106	4	1,37	0,30	-
TUG 530	7,37	0,03	96	1	1,85	0,20	7,39	0,07	83	3	3,00	1,30	-
TUG 531	6,86	0,02	99	1	2,52	0,20	-	-	-	-	-	-	-
TUG 532	7,03	0,02	102	1	2,68	0,51	6,91	0,06	93	3	1,43	0,24	-
TUG 533	6,51	0,02	107	1	2,11	0,19	-	-	-	-	-	-	-
TUG 534	4,67	0,01	101	1	2,56	0,14	-	-	-	-	-	-	-
TUG 535	4,71	0,03	105	4	2,19	0,26	-	-	-	-	-	-	-
TUG 536	4,63	0,03	102	4	2,42	0,38	-	-	-	-	-	-	-
TUG 537	6,24	0,02	111	1	2,18	0,20	-	-	-	-	-	-	5,86'
TUG 538	5,69	0,02	106	1	2,47	0,17	-	-	-	-	-	-	5,62'
TUG 539	6,50	0,02	109	2	2,33	0,31	-	-	-	-	-	-	6,29'
TUG 540	7,15	0,03	101	1	1,84	0,20	6,99	0,09	59	3	0,97	0,17	6,69'
TUG 541	4,79	0,07	83	5	1,49	0,28	-	-	-	-	-	-	5,69'
TUG 542	6,28	0,03	93	2	1,93	0,19	-	-	-	-	-	-	-
TUG 543	7,12	0,02	98	1	2,45	0,32	6,49	0,09	159	7	0,91	0,15	6,61'
TUG 544	6,84	0,03	100	2	1,73	0,20	-	-	-	-	-	-	6,53'
TUG 561	6,56	0,03	98	2	2,44	0,40	-	-	-	-	-	-	6,35'
TUG 562	6,24	0,03	98	2	1,92	0,22	-	-	-	-	-	-	5,84'
TUG 563	6,40	0,04	95	2	1,81	0,24	-	-	-	-	-	-	6,46'
TUG 564	6,24	0,03	99	2	2,41	0,27	-	-	-	-	-	-	6,30'
TUG 565	5,51	0,02	108	3	4,00	2,42	-	-	-	-	-	-	5,25'
TUG 566	5,48	0,02	106	3	3,00	0,76	-	-	-	-	-	-	-
TUG 567	7,11	0,04	99	2	2,39	0,46	5,75	0,10	99	7	0,92	0,17	7,06'
TUG 568	5,20	0,03	88	2	2,74	0,31	4,68	0,05	105	6	2,43	0,43	5,70'
TUG 569	4,67	0,04	81	4	2,67	0,43	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-
TUG 570	6,72	0,04	98	2	2,05	0,26	6,07	0,09	108	6	1,48	0,40	6,97'
TUG 571	7,08	0,06	99	3	1,82	0,41	6,62	0,23	57	7	0,79	0,28	6,99'

LOO-Vorhersage (Trainingsdatensatz) ¹

Anhänge

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀
TUG 572	5,39	0,07	96	5	1,61	0,37	5,19	0,09	133	9	1,30	0,26	5,91'
TUG 573	6,73	0,03	97	1	1,86	0,19	6,86	0,08	96	5	3,47	1,65	-
TUG 574	5,97	0,04	92	2	2,23	0,47	5,72	0,33	86	15	0,61	0,18	-
TUG 575	5,41	0,03	99	2	1,89	0,21	5,21	0,13	137	13	1,31	0,45	5,57'
TUG 576	6,60	0,05	97	3	1,69	0,32	6,62	0,15	108	8	0,94	0,31	6,96'
TUG 577	7,12	0,04	100	2	2,19	0,39	6,80	0,10	94	5	1,25	0,34	7,36'
TUG 578	6,73	0,05	96	3	1,76	0,32	5,87	0,09	97	6	1,57	0,44	7,18'
TUG 604	4,69	0,10	113	12	1,30	0,26	5,35	0,10	125	9	1,45	0,41	5,12'
TUG 605	5,26	0,04	92	3	1,61	0,20	-	-	-	-	-	-	5,06'
TUG 606	6,47	0,02	98	1	2,71	0,45	5,90	0,09	68	5	1,86	0,66	6,15'
TUG 607	6,65	0,03	106	2	2,98	0,41	6,36	0,12	55	5	3,00	1,87	6,68'
TUG 608	6,00	0,04	100	3	2,75	1,10	6,34	0,05	108	3	3,33	0,86	-
TUG 608 **	7,02	0,04	103	2	1,85	0,32	7,12	0,08	97	5	2,03	0,75	6,81'
TUG 609	5,68	0,04	115	3	1,90	0,29	-	-	-	-	-	-	-
TUG 617	6,22	0,04	91	2	2,21	0,29	-	-	-	-	-	-	6,39'
TUG 618	6,15	0,02	98	1	2,99	0,31	-	-	-	-	-	-	5,84'
TUG 619	6,10	0,02	100	1	2,87	0,40	-	-	-	-	-	-	-
TUG 620	6,87	0,05	101	2	1,32	0,16	6,71	0,10	115	6	1,02	0,21	6,50'
TUG 621	6,28	0,05	96	3	3,18	0,67	-	-	-	-	-	-	5,87'
TUG 622	6,10	0,05	101	3	1,64	0,28	-	-	-	-	-	-	5,91'
TUG 623	6,50	0,04	97	2	2,29	0,54	-	-	-	-	-	-	6,57'
TUG 624	6,03	0,04	100	3	2,26	0,49	-	-	-	-	-	-	5,82'
TUG 625	6,06	0,03	100	2	1,78	0,23	-	-	-	-	-	-	5,98'
TUG 626	5,67	0,02	105	2	2,05	0,15	-	-	-	-	-	-	5,96'
TUG 627	5,96	0,04	96	3	1,72	0,26	-	-	-	-	-	-	6,37'
TUG 628	5,25	0,03	100	3	2,92	0,36	-	-	-	-	-	-	5,69'
TUG 629	5,73	0,07	102	4	1,22	0,20	-	-	-	-	-	-	5,71'
TUG 630	6,70	0,03	103	2	2,35	0,29	6,44	0,04	137	3	1,32	0,14	-
TUG 631	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	5,51''
TUG 632 ***	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	4,23''

** in Gegenwart von 0,05% (w/v) BSA (fettsäurefrei) , *** im verlängerten Messmodus ermittelt, LOO-Vorhersage (Trainingsdatensatz) ', AFMoC-Vorhersage (Testdatensatz) ''

Anhänge

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀
TUG 633	5,84	0,06	102	4	1,19	0,18	-	-	-	-	-	-	-
TUG 657	6,18	0,03	98	2	1,65	0,17	-	-	-	-	-	-	6,10'
TUG 658	6,29	0,04	98	2	1,46	0,18	-	-	-	-	-	-	6,43'
TUG 659	6,92	0,04	101	2	1,23	0,11	-	-	-	-	-	-	6,83'
TUG 660	6,75	0,05	99	2	1,11	0,14	-	-	-	-	-	-	6,59'
TUG 661	7,36	0,04	91	1	1,42	0,14	-	-	-	-	-	-	7,16'
TUG 662	6,28	0,04	98	2	1,36	0,14	-	-	-	-	-	-	6,34'
TUG 663	6,32	0,04	94	2	1,95	0,28	-	-	-	-	-	-	-
TUG 664	5,04	0,03	131	3	1,65	0,14	-	-	-	-	-	-	5,59'
TUG 665	5,02	0,02	109	2	2,30	0,26	-	-	-	-	-	-	5,03'
TUG 666	5,37	0,03	121	3	1,29	0,11	-	-	-	-	-	-	5,78'
TUG 667	5,56	0,04	110	3	1,45	0,15	-	-	-	-	-	-	5,85'
TUG 668	5,44	0,04	116	4	2,07	0,37	-	-	-	-	-	-	5,50'
TUG 669 ****	bis 10 µM kein Effekt					-	-	-	-	-	-	-	3,95''
TUG 670	5,73	0,04	97	2	2,12	0,28	-	-	-	-	-	-	5,41'
TUG 671	6,49	0,05	112	3	2,20	0,60	-	-	-	-	-	-	6,22'
TUG 672	bis 31,6 µM kein Effekt					-	-	-	-	-	-	-	-
TUG 673	6,75	0,04	103	2	2,03	0,26	-	-	-	-	-	-	-
TUG 711	5,74	0,07	128	5	0,94	0,12	-	-	-	-	-	-	6,48'
TUG 712	5,30	0,03	128	3	1,31	0,11	-	-	-	-	-	-	5,96'
TUG 713	6,70	0,05	100	2	1,31	0,17	-	-	-	-	-	-	6,48'
TUG 714	6,29	0,06	98	3	1,49	0,25	-	-	-	-	-	-	6,91'
TUG 715	6,31	0,04	94	2	2,15	0,32	-	-	-	-	-	-	6,07'
TUG 716	bis 10 µM kein Effekt					-	-	-	-	-	-	-	-
TUG 717	6,38	0,02	108	1	2,02	0,17	-	-	-	-	-	-	6,58'
TUG 723	7,22	0,05	98	2	1,65	0,24	6,21	0,10	75	6	2,41	0,94	7,22'
TUG 725	7,12	0,02	104	1	2,54	0,29	-	-	-	-	-	-	7,18'
TUG 726	7,39	0,03	103	2	2,07	0,27	-	-	-	-	-	-	6,92'
TUG 727	7,34	0,02	103	1	1,90	0,14	-	-	-	-	-	-	7,21'
TUG 728	6,62	0,02	96	1	1,99	0,17	-	-	-	-	-	-	7,00'

**** Testsubstanzlösung in Polypropylen-Mikrotiterplatte vorgelegt, LOO-Vorhersage (Trainingsdatensatz) ', AFMoC-Vorhersage (Testdatensatz) ''

Anhänge

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀
TUG 730	7,40	0,03	105	2	1,98	0,21	-	-	-	-	-	-	6,96'
TUG 731	6,33	0,02	103	1	2,29	0,21	-	-	-	-	-	-	5,96'
TUG 732	6,86	0,02	103	1	2,18	0,19	-	-	-	-	-	-	-
TUG 733	5,67	0,03	92	2	1,73	0,16	-	-	-	-	-	-	6,44'
TUG 734	5,60	0,03	99	2	2,06	0,25	-	-	-	-	-	-	5,65'
TUG 735	7,48	0,05	100	2	2,18	0,45	-	-	-	-	-	-	6,85'
TUG 736	7,33	0,03	105	2	1,91	0,21	-	-	-	-	-	-	6,99'
TUG 737	6,58	0,03	105	2	1,85	0,24	-	-	-	-	-	-	6,63'
TUG 738	7,51	0,03	107	2	1,99	0,31	-	-	-	-	-	-	7,38'
TUG 741	6,09	0,03	100	2	2,09	0,32	-	-	-	-	-	-	6,53'
TUG 742	5,51	0,07	102	5	1,34	0,25	-	-	-	-	-	-	6,16'
TUG 743	6,56	0,03	102	2	2,13	0,36	-	-	-	-	-	-	7,06'
TUG 757	7,05	0,02	92	1	2,20	0,27	-	-	-	-	-	-	6,63'
TUG 758	7,25	0,04	95	2	2,26	0,36	-	-	-	-	-	-	6,94'
TUG 759	7,08	0,03	105	2	2,44	0,46	-	-	-	-	-	-	7,11'
TUG 760	6,41	0,03	103	2	2,44	0,37	-	-	-	-	-	-	6,49'
TUG 761	bis 31,6 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUG 762	bis 100 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUG 763	bis 100 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUG 764	bis 31,6 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUG 765	bis 31,6 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUG 766	6,46	0,04	99	2	1,75	0,21	-	-	-	-	-	-	6,02'
TUG 767	6,84	0,03	102	2	2,33	0,33	-	-	-	-	-	-	6,83'
TUG 768	6,37	0,03	106	2	2,39	0,29	-	-	-	-	-	-	6,15'
TUG 769	7,48	0,03	107	2	2,33	0,36	-	-	-	-	-	-	7,24'
TUG 770	8,21	0,02	112	1	2,35	0,17	7,41	0,06	109	3	0,94	0,10	7,52'
TUG 771	7,77	0,03	104	2	1,86	0,22	-	-	-	-	-	-	7,10'
TUG 772	7,09	0,04	106	2	2,06	0,38	-	-	-	-	-	-	6,80'
TUG 773	6,85	0,02	108	1	1,95	0,14	-	-	-	-	-	-	6,88'
TUG 774	6,84	0,02	100	1	2,07	0,20	-	-	-	-	-	-	6,76'

LOO-Vorhersage (Trainingsdatensatz) ¹

Anhänge

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀
TUG 784	7,69	0,03	103	2	2,11	0,25	-	-	-	-	-	-	6,67 "
TUG 785	7,43	0,02	97	1	2,29	0,29	-	-	-	-	-	-	6,78 "
TUG 786	6,94	0,03	94	2	2,33	0,36	-	-	-	-	-	-	6,79 "
TUG 787	5,84	0,02	97	2	2,15	0,19	-	-	-	-	-	-	5,99 "
TUG 788	5,71	0,02	104	2	1,93	0,14	-	-	-	-	-	-	5,52 "
TUG 789 ***	bis 1 µM kein Effekt				2,78	0,29	-	-	-	-	-	-	3,64 "
TUG 790 ***	bis 10 µM kein Effekt				2,23	0,13	-	-	-	-	-	-	4,00 "
TUG 791 ***	bis 10 µM kein Effekt				2,57	0,25	-	-	-	-	-	-	4,17 "
TUG 792	bis 10 µM kein Effekt				-	-	-	-	-	-	-	-	5,83 "
TUG 793	6,26	0,03	98	2	1,94	0,19	-	-	-	-	-	-	5,72 "
TUG 795	6,37	0,06	105	4	1,34	0,22	-	-	-	-	-	-	6,87 "
TUG 806	7,42	0,07	99	3	1,58	0,33	-	-	-	-	-	-	7,45 "
TUG 807	7,74	0,04	97	2	1,59	0,20	-	-	-	-	-	-	7,85 "
TUG 808	6,95	0,08	105	6	1,23	0,30	-	-	-	-	-	-	6,34 "
TUG 809	7,07	0,07	108	5	1,35	0,27	-	-	-	-	-	-	6,41 "
TUG 810	7,08	0,07	112	4	1,16	0,20	-	-	-	-	-	-	6,24 "
TUG 811	5,80	0,10	94	6	1,04	0,10	-	-	-	-	-	-	-
TUG 841	6,04	0,05	67	2	1,72	0,30	-	-	-	-	-	-	-
TUG 859	6,28	0,03	105	2	2,10	0,22	-	-	-	-	-	-	5,35 "
TUG 860	5,57	0,04	79	2	1,67	0,24	-	-	-	-	-	-	5,82 "
TUG 861	7,39	0,03	108	2	1,97	0,21	-	-	-	-	-	-	7,07 "
TUG 862	7,42	0,04	99	2	2,52	0,47	-	-	-	-	-	-	7,60 "
TUG 863	8,03	0,04	102	2	1,98	0,37	-	-	-	-	-	-	7,78 "
TUG 864	7,63	0,02	101	1	2,49	0,25	-	-	-	-	-	-	7,44 "
TUG 865	7,75	0,02	104	1	2,06	0,17	-	-	-	-	-	-	7,84 "
TUG 866	7,46	0,06	105	5	1,41	0,26	-	-	-	-	-	-	-
TUG 866 **	7,76	0,03	98	2	2,62	0,30	-	-	-	-	-	-	-
TUG 867	7,52	0,03	110	3	2,46	0,60	-	-	-	-	-	-	-
TUG 867 **	7,83	0,04	92	2	4,00	0,74	-	-	-	-	-	-	-
TUG 875	6,31	0,05	78	2	1,59	0,26	-	-	-	-	-	-	6,38 "

** in Gegenwart von 0,05% (w/v) BSA (fettsäurefrei), *** im verlängerten Messmodus ermittelt, AFMoC-Vorhersage (Testdatensatz) "

Anhänge

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀
TUG-876	5,33	0,03	75	2	2,24	0,23	-	-	-	-	-	-	5,99 "
TUG 892	6,13	0,03	96	2	1,96	0,24	-	-	-	-	-	-	5,48 "
TUG 893	5,12	0,03	96	3	1,35	0,11	-	-	-	-	-	-	4,98 "
TUG 894	6,60	0,05	93	3	1,64	0,28	-	-	-	-	-	-	
TUG 895	5,14	0,03	46	1	3,41	0,60	-	-	-	-	-	-	
TUG 900	7,46	0,04	99	2	2,13	0,41	-	-	-	-	-	-	7,54 "
TUG 905	8,04	0,02	102	1	2,57	0,44	-	-	-	-	-	-	-
TUG 905 **	7,99	0,03	100	2	2,30	0,38	-	-	-	-	-	-	-

** in Gegenwart von 0,05% (w/v) BSA (fettsäurefrei), AFMoC-Vorhersage (Testdatensatz) "

Entwürfe neuartiger hFFAR1-Agonisten

Code	Calcium-Daten (experimentell)						cAMP-Daten (experimentell)						prediktive Daten
	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	± SEM	% E _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,70 ""
(S)-A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,73 ""
(S)-A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,92 ""
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,82 ""
B1b	7,37	0,02	102	1	1,91	0,14	-	-	-	-	-	-	7,02 ""
B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,16 ""
B2b	7,05	0,03	91	2	2,23	0,33	-	-	-	-	-	-	7,34 ""
B2b **	7,27	0,07	85	3	1,62	0,33	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,15 ""
B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,08 ""
(R)-B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,25 ""
(R)-C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,02 ""
(R)-C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,06 ""
(R)-C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,04 ""

** in Gegenwart von 0,05% (w/v) BSA (fettsäurefrei), AFMoC-Vorhersage (Entwürfe) ""

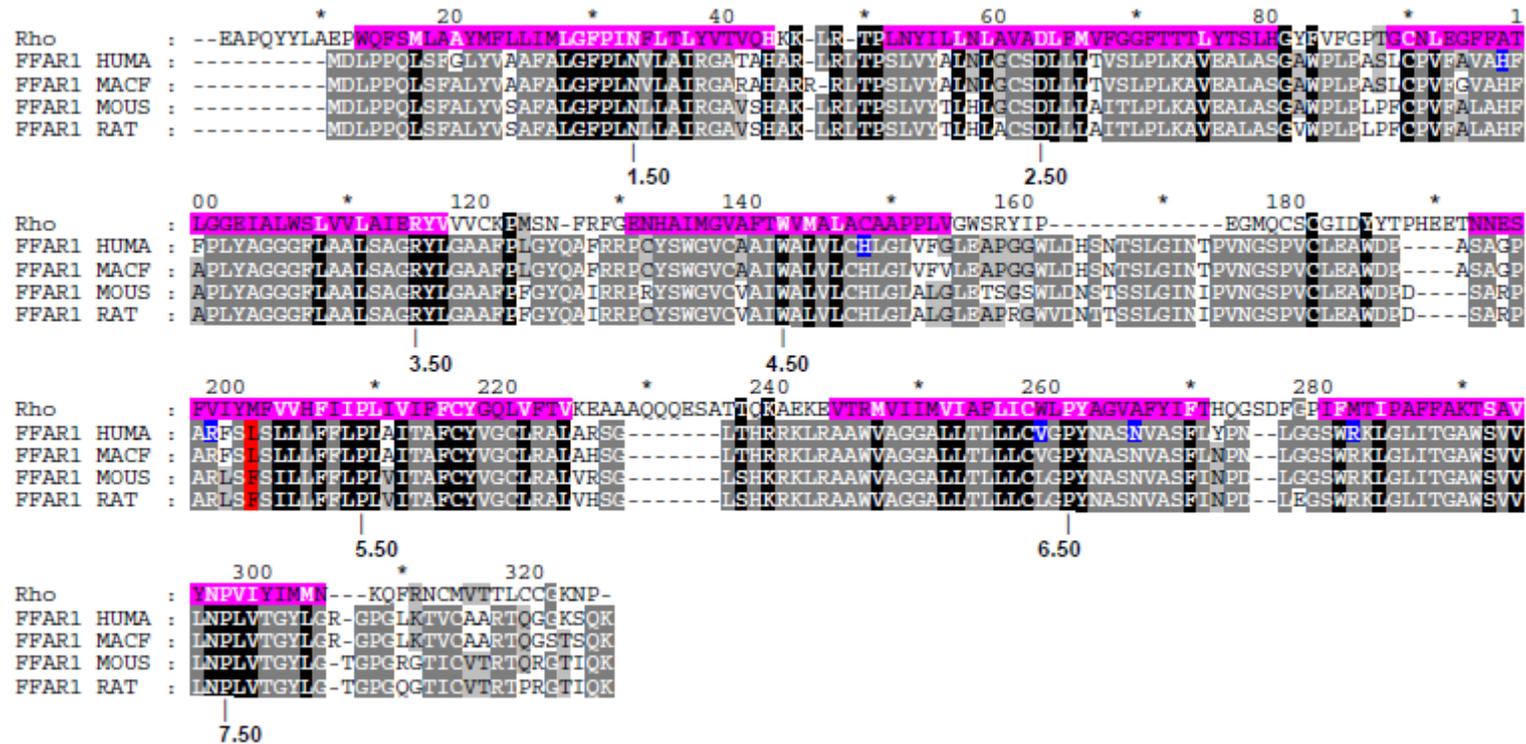
B3) Pharmakologische Daten (hFFAR1-Antagonisten)

Code	Calcium-Daten (experimentell) *						cAMP-Daten (experimentell) *						prediktive Daten	
	pIC ₅₀	± SEM	% I _{max}	± SEM	nH	± SEM	pIC ₅₀	± SEM	% I _{max}	± SEM	nH	± SEM	pEC ₅₀	
TUG 631	bis 10 µM kein Effekt						-	-	-	-	-	-	-	-
TUG 632	5,55	0,06	90	4	-1,77	0,39	bis 31,6 µM kein Effekt						-	
TUG 669	5,62	0,07	88	4	-1,67	0,39	-	-	-	-	-	-	-	
TUG 672	5,79	0,14	84	7	-0,99	0,28	-	-	-	-	-	-	-	
TUG 716	bis 31,6 µM kein Effekt						-	-	-	-	-	-	-	
TUG 761	5,99	0,02	89	2	-3,27	1,33	-	-	-	-	-	-	-	
TUG 762	5,42	0,04	88	3	-2,55	0,55	-	-	-	-	-	-	-	
TUG 763	5,62	0,03	89	2	-2,61	0,45	-	-	-	-	-	-	-	
TUG 764	5,81	0,06	88	3	-4,34	1,20	-	-	-	-	-	-	-	
TUG 765	5,36	0,03	90	2	-3,74	0,66	-	-	-	-	-	-	-	

* Antagonistmodus (2,5 µM TUG 20 bzw. 200 nM TUG 209)

C) Sequenzanalyse

Alignment of the sequences of GPR40 from four different species and bovine rhodopsin.



The transmembrane regions are shown in pink; the residues experimentally mutated in this paper are shown in blue; the residues nonconserved among the GPR40 from different species and located in the binding pocket are shown in red.

Quelle: Supporting Information (Tikhonova, 2007)

D) Curriculum vitae

geboren am 02.09.1979 in Gelnhausen

Schulbildung

06/1999	Allgemeine Hochschulreife
1990 - 1999	Franz-Ludwig-von-Erthal Gymnasium (Lohr a.M.)
1986 - 1990	Grundschule (Frammersbach)

Wissenschaftlicher Werdegang

10/2007 - 01/2012	Promotionsstudium unter Betreuung von Prof. Dr. M. U. Kassack am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/2006 - 03/2007	Qualifizierungsjahr für eine Zulassung zur Promotion, Institut für Pharmazeutische Chemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
08/2005	Abschluss als Dipl.-Chemiker (FH)
09/2001 - 08/2005	Chemiestudium an der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg (Rheinbach)

Beruflicher Werdegang

seit 10/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Düsseldorf
04/2007 - 09/2007	Lehrtätigkeit am Bildungszentrum Internationaler Bund, Köln
03/2005 - 12/2005	Praktikum bei der Novartis Pharma AG (Basel, Schweiz)
09/2003 - 02/2004	Praxissemester bei der Merck KGaA (Darmstadt)

Stipendien

10/2007 - 09/2009	Dr. Hilmer-Promotionsstipendium (Stiferverband für die Deutsche Wissenschaft)
04/2006 - 03/2007	Qualifizierungsstipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK677 „Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“ (Deutsche Forschungsgemeinschaft)

E1) Eigene Veröffentlichungen

Lesmüller-Posterpreis, Design and Pharmacological Characterization of Novel FFAR1-Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus, ÖDPhG- und DPhG-Jahrestagung, Universität Innsbruck, 2011

Posterpräsentation, Design and Pharmacological Characterization of Novel FFAR1-Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus, 6th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2011

Posterpräsentation, Biological Testing of Potential Ligands at the Fatty Acid Receptor GPR40 and Selectivity Tests at P2Y-Receptors, Internationales Symposium des Graduiertenkollegs GRK677, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2006

Christiansen E, Due-Hansen ME, **Urban C**, Grundmann M, Schröder R, Kostenis E, et al. Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1/GPR40) Agonists: Mesityloxy Appendage Lowers Lipophilicity and Improves ADME Properties. 2012; submitted

Zippel N, Limbach CA, Ratajskia N, **Urban C**, Luparello C, Pansky A, et al. Purinergic Receptors Influence the Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells and Development*. 2012;21(6):884-900.

Christiansen E, **Urban C**, Grundmann M, Due-Hansen ME, Hagesaether E, Schmidt J, Pardo L, et al. Identification of a potent and selective FFA1/GPR40 agonist with favorable physicochemical and *in vitro* ADME properties. *J Med Chem*. 2011;54(19):6691-703.

Christiansen E, Due-Hansen ME, **Urban C**, Merten N, Pfeleiderer M, Karlsen KK, et al. Structure-Activity Study of Dihydrocinnamic Acids and Discovery of the Potent FFA1 (GPR40) Agonist TUG-469. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1(7):345-9.

Tacke R, Nguyen B, Burschka C, Lippert WP, Hamacher A, **Urban C**, Kassack MU. Sila-Trifluperidol, a Silicon Analogue of the Dopamine (D2) Receptor Antagonist Trifluperidol: Synthesis and Pharmacological Characterization. *Organometallics*. 2010;29:1652-60.

Christiansen E, **Urban C**, Merten N, Liebscher K, Karlsen KK, Hamacher A, et al. Discovery of Potent and Selective Agonists for the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFA1/GPR40), a Potential Target for the Treatment of Type II Diabetes. *J Med Chem*. 2008;51:7061-4.

E2) Eigene Veröffentlichungen in Vorbereitung

Urban C, Christiansen E, Due-Hansen M, Hamacher A, Ulven T, Gohlke H, Kassack MU. 3D-QSAR-Model (AFMoC) for Prediction of Agonistic Potency at the G Protein Coupled Receptor hFFAR1 (Free Fatty Acid Receptor 1).

Urban C, Partke HJ, Christiansen E, Schinner S, Roden M, Hamacher A, Gohlke H, Ulven T, Kassack MU. Pharmacological Characterization of the Potent Free Fatty Acid Receptor (FFA1/GPR40) Agonist TUG-469.

F) Danksagung

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater Prof. M.U. Kassack für die Überlassung des Themas, der hervorragenden Betreuung während der Arbeit, sowie der Übernahme des Erstgutachtens. Deine Mitwirkung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Hrn. Prof. H. Gohlke für seine Mitwirkung im Modellierungsteil dieser Arbeit, den hilfreichen Anmerkungen zur Arbeit und der Anfertigung des Zweitgutachtens bedanken.

E. Christiansen, M. Due-Hansen und Prof. T. Ulven (University of Southern Denmark) danke ich für Ihre äußerst ergiebige Synthesearbeit.

Ferner gilt mein Dank Dr. S. Schinner (Universitätsklinikum Düsseldorf), in dessen Arbeitsgruppe ich die Radioimmunoassays durchführen durfte, sowie Prof. M. Roden für die Genehmigung der Tierstudie und Dr. H.-J. Partke für seine sehr engagierte Mitwirkung bei der Planung und Durchführung dieser Studie im Deutschen Diabetes Zentrum in Düsseldorf.

Weiter danke ich herzlich all meinen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis von Prof. Kassack für die nette Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung, insbesondere Fr. Dr. A. Hamacher und Fr. Dr. S. Böhm (geb. Meis) für die Anleitung zu Beginn und die fachliche Unterstützung während der Arbeit. M. Matyja, S. Eberle und D. Eßer danke ich für die gemeinsame Zeit!

Dem Arbeitskreis von Prof. H. Gohlke für Ihre Hilfe bei der Anfertigung der computergestützten Arbeiten, insbesondere D. Krüger, A. Metz und C. Pfleger, gilt weiterer Dank.

Fr. Dr. S. Ullrich (Universität Tübingen) danke ich für den Erhalt der INS-1E-Zelllinie, der Firma Euroscreen für die 1321N1-Wildtyp und -hFFAR1-Zellen, sowie Fr. Prof. E. Kostenis und Fr. Dr. N. Merten (Universität Bonn) für die Überlassung des pcDNA3.1(+)/hFFAR1-Plasmids.

Für die finanzielle Unterstützung während der Promotionszeit möchte ich mich herzlich bei der Dr. Hilmer-Stiftung und dem Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Fr. Prof. U. Bartz für Ihre stete Unterstützung seit meiner Studienzzeit.

Zu guter Letzt gilt ein großer Dank meiner ganzen Familie, meinen Freunden und meiner Lebensgefährtin Katrin für den Rückhalt und das offene Ohr in den letzten Jahren. Ihr habt mir den oft nötigen Abstand zur Promotionsarbeit geschaffen. Vielen lieben Dank Euch allen!