

GTFCh-Reisestipendium zur TIAFT Conference 2025

Sind die Resultate von Struktur-Aktivitäts-Beziehungs-Studien vergleichbar? Eine Analyse von öffentlich verfügbaren CB₁-Affinitätsdaten

Katharina Elisabeth Grafinger^{1,*}, Wolfgang Weinmann¹, Felix Hamann², Verena Schöning²

¹Institut für Rechtsmedizin Bern, Forensische Toxikologie und Chemie, Universität Bern, Murtenstrasse 26 Bern, Schweiz

²Institut für Klinische Pharmakologie und Chemie, Inselspital Universitätsspital Bern, Bern

*Korrespondierende Autorin: Katharina.Grafinger@irm.unibe.ch

1. Hintergrund und Ziel

In der forensischen Toxikologie werden verschiedene Parameter verwendet, um toxikologische Effekte von neuen psychoaktiven Substanzen (NPS) abzuschätzen. Dazu gehören die Rezeptorbindungsaffinität sowie -aktivität. Rezeptor-Bindungsaffinität beschreibt die Wechselwirkung zwischen einem Molekül und einem spezifischen Rezeptor. Eine hohe Affinität entspricht dabei einer starken und stabilen Bindung. Quantitativ wird diese Eigenschaft häufig durch die Hemmkonstante K_i beschrieben. Sie ist ein Maß für die Gleichgewichtsaffinität eines Liganden zu seinem Rezeptor. Der K_i -Wert gibt die Konzentration eines Inhibitors an, bei der unter Gleichgewichtsbedingungen die Bindung eines Referenzliganden um 50 % reduziert ist. [1] Niedrige K_i -Werte weisen auf eine hohe Bindungsaffinität hin, hohe K_i -Werte auf eine geringere; für den negativ logarithmisch transformierten pK_i -Wert trifft dies genau umgekehrt zu.

Typischerweise wird die Rezeptorbindungsaffinität mit kompetitiver Radioliganden-Bindungsassays bestimmt. [2] Dabei konkurriert eine Testsubstanz mit einer radioaktiven Referenzsubstanz (Radioligand) um die Rezeptorbindung und die Menge an gebundener Referenzsubstanz wird gemessen. Je tiefer das Signal der Referenzsubstanz, desto mehr Testsubstanz konnte an den Rezeptor binden, beziehungsweise desto niedriger ist der K_i -Wert. Bei der Durchführung solcher Assays können zahlreiche experimentelle Parameter variiert werden, z. B. Radioligand, Inkubationszeit oder Temperatur. Häufig ist jedoch unklar, in welchem Ausmaß diese Variationen die gemessenen K_i -Werte beeinflussen.[3] Dies erschwert die direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse von unterschiedlichen Assays. Obwohl NPS auf verschiedene Rezeptoren wirken können, sind in der forensischen Toxikologie bestimmte Rezeptoren relevanter als andere. So gibt es zwei Cannabinoid Rezeptoren (CB₁ und CB₂), jedoch werden psychoaktive Effekte über den CB₁-Rezeptor reguliert. [4] Daher wurde der Fokus in dieser Studie auf den CB₁-Rezeptor gelegt.

Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, welche Assay-Parameter einen Einfluss auf die gemessene CB₁-Rezeptoraffinität haben. Dazu wurden Daten von Molekülen, welche an CB₁ binden, verwendet. Die untersuchten Assay-Parameter waren der Radioligand, die Rezeptorspezies, der Zellmembrantyp, die Radioligandenkonzentration, Inkubationszeit und -temperatur.

2. Methoden

Öffentlich verfügbare CB₁- K_i -Werte wurden von Pubchem [5] heruntergeladen und jeder Eintrag mit der Originalliteratur abgeglichen. Die Einträge wurden um folgende Assay-Parameter

ergänzt: Assay Name, zugesetzte Substanz, Zellmembrantyp, Rezeptorspezies, Radioligand, Radioligandenkonzentration, Puffer, Inkubationszeit und Inkubationstemperatur. Nach der Datenreinigung wurden Substanzen mit Replikateinträgen identifiziert (mind. 6 Replikate) und der Datensatz negativ logarithmisch transformiert von K_i zu pK_i , um eine Annäherung an eine Normalverteilung der Daten zu gewährleisten. Anschließend wurden ein lineares Mischmodell [6], sowie eine OLS-basierte (Methode der kleinsten Quadrate) Varianzanalyse (ANOVA) mit geschätzten Randmittelwerten (Estimated Marginal Means, EMMs) erstellt. Die Datenaufbereitung und die statistische Analyse wurden in der Programmiersprache Python (3.9.23) durchgeführt. Verwendete Pakete umfassten unter anderem NumPy [7], Pandas [8], SciPy [9], Seaborn [10], Matplotlib [11].

3. Resultate und Diskussion

Der finale Datensatz enthielt 271 Einträge von zehn Substanzen: Rimonabant ($n = 79$), WIN-55,212 ($n = 65$), CP-55,940 ($n = 35$), Anandamid ($n = 31$), Δ^9 -THC ($n = 29$), JWH-018 ($n = 11$), SR144528 ($n = 9$), Δ^8 -THC ($n = 9$), CHEMBL381689 ($n = 7$) und JWH-133 ($n = 6$).

Der am häufigsten verwendete Radioligand war [3 H]CP-55940 ($n = 210$). Insgesamt wurden die meisten Daten für den humanen CB_1 -Rezeptor erhoben ($n = 187$), gefolgt von Ratte ($n = 61$) und Maus ($n = 21$). Die Inkubationszeit variierte zwischen 15 und 360 Minuten, die Inkubationstemperatur zwischen 4 und 200 °C.

Negative Schätzwerte (β) sind mit niedrigeren pK_i -Werten assoziiert, während positive Schätzwerte (β) im Vergleich zu den jeweiligen vordefinierten Referenzniveaus (Häufigkeit im Datensatz) mit höheren pK_i -Werten einhergehen (Abb. 1). Unter den Fixeffekten war die Verwendung der Zellmembrantypen Chem-1 ($\beta = 1,402 \pm 0,49$, $p = 0,004$) und Insekten-SF9 ($\beta = 0,54 \pm 0,19$, $p = 0,005$) im Vergleich zu HEK (human embryonic kidney)-Membranen (Referenzniveau) mit signifikant höheren pK_i -Werten verbunden.

Die Inkubationszeit wies einen marginal positiven Trend auf ($\beta \approx 0,002 \text{ min}^{-1}$, $p \approx 0,068$), was auf einen schwachen Zusammenhang zwischen längerer Inkubationszeit und höherer apparenter Affinität hindeutet. Unter "apparenter Affinität" versteht man den aus dem konkreten Bindungsassay gemessenen Wert, der neben der intrinsischen Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung auch durch Assay-Parameter und Modellannahmen geprägt ist. Hingegen zeigten die Rezeptorspezies, die Inkubationstemperatur sowie die Radioligandenkonzentration keinen signifikanten Einfluss auf den pK_i -Wert.

Die blockweise Varianzanalyse auf Basis des OLS/ANOVA-Modells mit geschätzten EMMs zeigt deutliche Unterschiede in der erklärten Varianz der pK_i -Werte zwischen den untersuchten Effektblöcken (Abb. 2). Der Zellmembrantyp stellte den mit Abstand stärksten Einflussfaktor dar und erklärte einen substantiellen Anteil der Gesamtvarianz (partielles $\eta^2 \approx 0,06$), wobei der zugehörige Drop-one-Block-F-Test hochsignifikant ($p < 0,001$) ausfiel. Dies unterstreicht die zentrale Bedeutung der verwendeten biologischen Matrix für die gemessene apparente Affinität. Der Assay-Parameter Radioligand zeigte eine relativ große Effektstärke, verfehlte jedoch statistische Signifikanz ($p = 0,079$) und ist daher als Trend zu interpretieren. Das spricht für einen möglichen, aber nicht durchgängig nachweisbaren Einfluss der Radioligandenauswahl. Hingegen trugen die zusammengefassten numerischen Parameter sowie die Rezeptorspezies nur in geringem Maße zur Varianzaufklärung bei und zeigten keine signifikanten Effekte.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse die Befunde des linearen gemischten Modells. Sie verdeutlichen, dass vor allem methodische Parameter, insbesondere der Zellmembrantyp und, in geringerem Umfang, der Radioligand, maßgeblich einen Einfluss auf die pK_i -Werte haben. Unsere Resultate zeigen, dass andere experimentelle Variablen eine untergeordnete Rolle spielen.

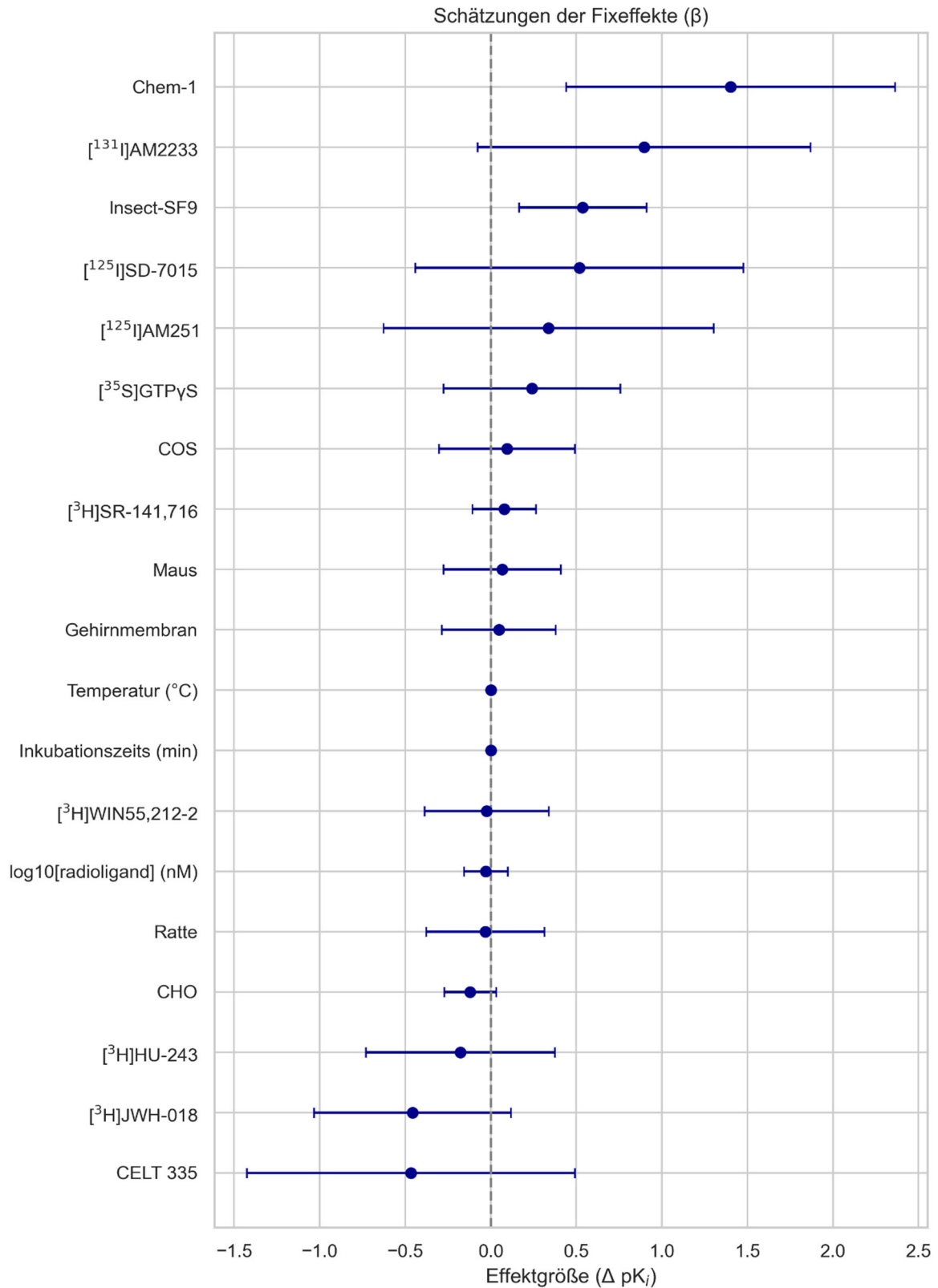


Abb. 1. Schätzungen der Fixeffekte (β) aus dem pK_i -linearen Mischmodell, jeweils mit 95%-Konfidenzintervall. HEK-Zellmembranen, humane Rezeptorspezies und [³H]CP-55940 dienen als jeweilige Referenzniveaus. Positive Schätzwerte weisen im Vergleich zur Referenz auf höhere pK_i -Werte (stärkere apparente Bindung) hin.

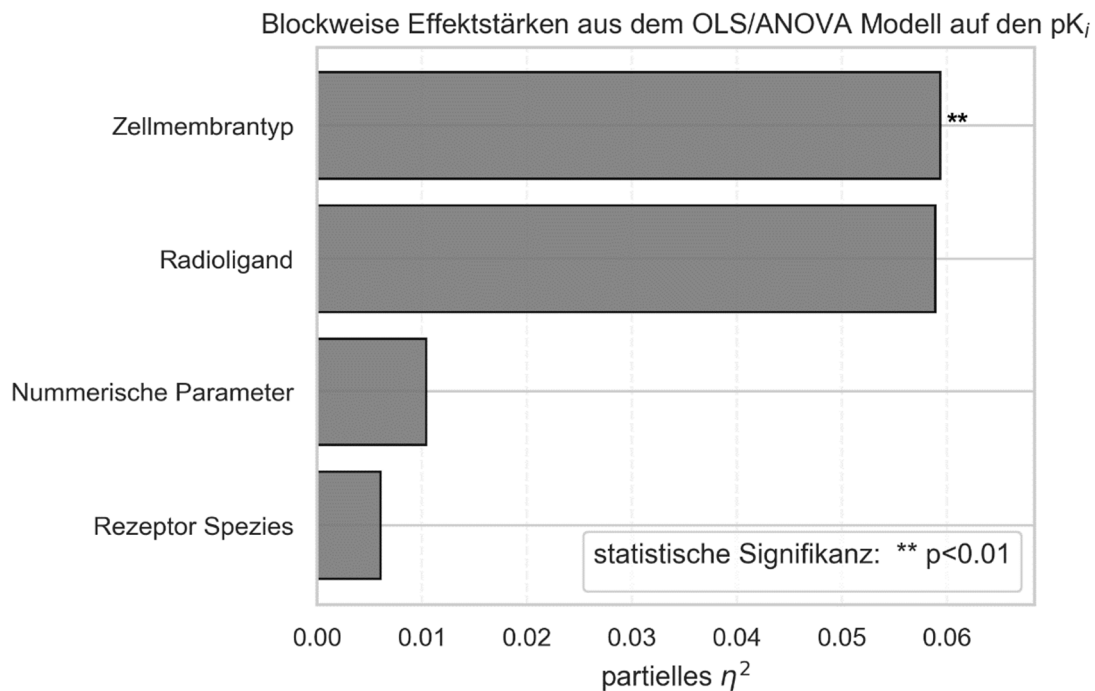


Abb. 2. Blockweise Effektstärken (partielles η^2) aus dem OLS/ANOVA-Modell auf Basis des pK_i -Datensatzes. p-Werte aus Drop-one-Block-F-Tests sind annotiert.

4. Schlussfolgerung und Ausblick

Unsere statistische Analyse zeigt, dass der Zellmembrantyp einen Einfluss auf den K_i -Wert haben kann. Insbesondere für die Zellmembranen Chem-1 und Insekten-SF9 wurden statistisch signifikante Unterschiede beobachtet. Obwohl der Rezeptorspezies anekdotisch häufig eine Einflussnahme zugeschrieben wird, konnten wir dies in unserer Studie nicht beobachten. Wir erklären dies durch die hohe Aminosäuresequenz-Identität von jeweils etwa 97 % zwischen dem humanen und dem murinen beziehungsweise dem Ratten-Rezeptortyp. [12]

Unsere Befunde unterstreichen, dass Assay-Parameter einen messbaren Einfluss auf pK_i -Werte haben. Für direkte Vergleiche und Interpretation von Ergebnissen verschiedener Studien ist es daher vorteilhaft, möglichst denselben Assay bzw. vergleichbare Bedingungen zu verwenden oder entsprechende Unterschiede statistisch zu adressieren.

5. Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds (SNF) im Rahmen eines Projektförderungsgrants (Projektnummer 1000358) gefördert. Katharina Elisabeth Grafinger dankt der GTFCh für die finanzielle Unterstützung in Form eines Reisestipendiums zum Besuch der TIAFT Conference 2025.

6. Referenzen

- [1] Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 1973;22(23):3099-3108.
- [2] Hofner G, Wanner KT. Competitive binding assays made easy with a native marker and mass spectrometric quantification. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003;42(42):5235-5237.

- [3] Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Radioligand Binding Assays and Their Analysis. In: Davenport AP, ed. Receptor Binding Techniques. Totowa, NJ: Humana Press; 2012:31-77.
- [4] Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 1997;74(2):129-180.
- [5] NCBI. PubChem. 2023; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed October 2024.
- [6] Harrison XA, Donaldson L, Correa-Cano ME, et al. A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ.* 2018;6:e4794.
- [7] Harris CR, Millman KJ, van der Walt SJ, et al. Array programming with NumPy. *Nature.* 2020;585(7825):357-362.
- [8] McKinney W. pandas: a foundational Python library for data analysis and statistics. *Python for high performance and scientific computing.* 2011;14(9):1-9.
- [9] Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods.* 2020;17(3):261-272.
- [10] Waskom ML. Seaborn: statistical data visualization. *Journal of open source software.* 2021;6(60):3021.
- [11] Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering.* 2007;9(3):90-95.
- [12] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346(6284):561-564.