

**Modulation neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren
durch den Monoterpenalkohol (-)Menthol**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Michael Wilhelm

aus Schmalkalden

Bonn 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dieter Swandulla

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 12.01. 2010

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2010

1. Abkürzungen	1
2. Zusammenfassung	1
3. Einleitung	3
3.1 Menthol - Eigenschaften und Wirkungen	3
3.2 Liganden-gesteuerte Ionenkanäle	4
3.3 Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren	6
3.3.1 Lokalisation und Funktion.....	8
3.3.2 Aktivierungs- und Desensibilisierungsmechanismus	9
3.3.3 Rezeptormodulation	10
3.4 Trigeminale Neurone als Untersuchungssystem	13
3.5 Zielsetzung der Arbeit	14
4. Material und Methoden	15
4.1 Primärkultur	15
4.2 Kultivierung von HEK tsA201 Zellen	16
4.3 Verwendete Lösungen	16
4.4 Expression nikotinischer Rezeptoren in myelinisierten und nicht-myelinisierten Fasern trigeminaler Neurone	18
4.5 Elektrophysiologie	20
4.5.1 Patch-Clamp-Aufnahmen	20
4.5.2 Applikation von Testlösungen mit einem Druckapplikationssystem	22
4.5.3 Applikationsprotokoll bei dem Menthol erst nach Beginn der Agonist-Applikation eingewaschen wird (siehe Ergebnisse 5.2.1).....	23
4.5.4 Anwendung eines Blockers muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren.....	24
4.5.5 Geschwindigkeit des Druckapplikationssystems.....	25
4.5.6 Auswertung der Patch-Clamp-Daten	28
5. Ergebnisse	31
5.1 Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) in trigeminalen Neuronen	31
5.1.1 Elektrophysiologische Eigenschaften Agonist-induzierter Ströme	31
5.1.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Agonisten Nikotin, Acetylcholin und Epibatidin	38
5.2 Mentholwirkung auf Ströme durch nikotinische Acetylcholinrezeptoren	39
5.2.1 Abhängigkeit der Mentholwirkung von Zeitpunkt und Dauer der Applikation	39
5.2.2 Abhängigkeit der Mentholwirkung von der Konzentration.....	42
5.2.3 Wirkung von Menthol auf Ströme durch einzelne nAChRs.....	45
5.2.4 Mentholwirkung auf heterolog exprimierte nAChRs in HEK-Zellen	48
6. Diskussion	51
6.1 Vorkommen und Charakteristika verschiedener neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptor-Subtypen in trigeminalen Neuronen	51
6.1.1 Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetik Agonist-induzierter Ströme	51

Inhaltsverzeichnis

6.1.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von nikotinischen Acetylcholinrezeptor-Agonisten in trigeminalen Neuronen	53
6.2 Menthol moduliert neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren	54
6.2.1 Menthol interagiert bevorzugt mit dem Kanalprotein im „Geschlossen“- Konformationszustand.....	54
6.2.2 Menthol inhibiert den nAChR über eine negative allosterische Modulation	55
6.2.3 Menthol besitzt vielfältige Wirkungen im Nervensystem	56
7. Literaturverzeichnis.....	59
8. Anhang.....	69
8.1 Materialien und Hersteller	69
8.2 Danksagung	73

1. Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin
α -BgTx	α -Bungarotoxin
Å	Angström
ACh	Acetylcholin
ACSF	Artifizielle Zerebral-Spinal-Flüssigkeit
ANOVA	Varianzanalyse
Cys	L-Cystein
DRG/DRGs	Hinterwurzelganglion/Plural
EGTA	Glycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'Tetraessigsäure
FBS	fötale Kälberserum
GABA	γ -Aminobuttersäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
mAChR	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
nAChR/nAChRs	nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor/Pluralform
NKA	nicht-kompetitiver Antagonist
PLL	Poly-L-Lysin
TEA-OH	Tetraethylammonium-Hydroxid
τ_{Aktiv}	Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung
τ_{Des}	Geschwindigkeitskonstante der schnellen Desensibilisierung
TRPM8	Transient Receptor Potential Melastatin 8-Rezeptor
TTX	Tetrodotoxin
V_{H}	Haltepotential
ZNS	Zentralnervensystem

2. Zusammenfassung

Menthol ist Inhaltsstoff verschiedener Mentha-Arten und wird häufig als Zusatzstoff in Nahrungs- und Genussmitteln, aber auch zu medizinischen Zwecken verwendet. Neben seinen kühlenden (Eccles, 1994; Reid and Flonta, 2001) und lokalanästhetischen Wirkungen (Galeotti et al., 2001), die über das periphere Nervensystem vermittelt werden, hat Menthol auch Effekte auf das Zentralnervensystem (ZNS). Dazu gehören seine sedierende, narkotische sowie analgetische (anästhetische) Wirkung (Galeotti et al., 2002), wobei die beiden ersten Effekte auf eine positive allosterische Modulation von GABA_A- und Glycinrezeptoren durch Menthol zurückgeführt werden (Hall et al., 2004; Watt et al., 2008).

Dagegen ist über die analgetische Wirkung von Menthol wenig bekannt. Da neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) bei der nozizeptiven Reizverarbeitung eine wichtige Rolle spielen, könnten sie ein möglicher Angriffspunkt für Menthol sein.

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie die Funktion von nativen und rekombinanten nAChRs durch (-)Menthol beeinflusst wird. Dazu wurden Ströme durch nAChRs mit Hilfe schneller Agonist-Applikation in trigeminalen Neuronen der Ratte sowie in HEK tsA201 Zellen induziert und mittels der Patch-Clamp-Technik analysiert.

Biophysikalische und pharmakologische Untersuchungen mit den drei Agonisten Acetylcholin (ACh), (-)Nikotin und (\pm)Epibatidin ergaben, dass in trigeminalen Neuronen unterschiedliche nAChR-Subtypen vorkommen. Hauptsächlich wurden neben dem α_7 -nAChR-Subtyp $\alpha_4\beta_2$ - und $\alpha_3\beta_4$ -nAChR-Subtypen identifiziert.

Diese Ergebnisse bestätigen und erweitern frühere molekularbiologische Befunde von Flores (Flores et al., 1996), die belegen, dass trigeminale Neurone nAChR-Proteine der Subtypen $\alpha_4\beta_2$ und $\alpha_3\beta_4$ exprimieren.

Die durch Agonisten induzierten Ströme wurden durch Menthol in ihrer Amplitude konzentrationsabhängig reduziert, wobei die Kinetik der Ströme (Aktivierung und Desensibilisierung) unbeeinflusst blieb. Für Nikotin (75 μ M) betrug der IC₅₀-Wert für die Hemmung durch Menthol in trigeminalen Neuronen 111 μ M.

An stabil in HEK tsA201 Zellen exprimierten humanen $\alpha_4\beta_2$ -nAChRs wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Nikotin mit und ohne Menthol erstellt. In Anwesenheit von Menthol

war der EC_{50} -Wert für Nikotin nicht signifikant verändert, während die Nikotin-induzierten Stromantworten im getesteten Konzentrationsbereich signifikant verringert waren.

Weiterhin wurden Nikotin-induzierte Ströme durch einzelne Rezeptorkanäle in trigeminalen Neuronen analysiert. In Anwesenheit von Menthol war die Offenwahrscheinlichkeit einzelner nAChRs dadurch verringert, dass die Kanaloffenzeit verkürzt und die Geschlossenzeit verlängert war. Demnach veränderte Menthol die Schaltkinetik von nAChRs. In Anwesenheit von Menthol wurden weder eine Verminderung der Einzelkanalamplitude noch eine Veränderung der Flicker-Häufigkeit des Einzelkanals beobachtet.

Zusammenfassend kann aus unseren Ergebnissen geschlossen werden, dass Menthol als negativer allosterischer Modulator am nAChR-Protein wirkt, der im Sinne eines nicht-kompetitiven Antagonisten (NKA) vorwiegend am geschlossenen Rezeptor, außerhalb der Pore bindet und die Wirkstärke des Agonisten verringert.

3. Einleitung

3.1 Menthol - Eigenschaften und Wirkungen

Menthol ist ein monozyklischer Monoterpenalkohol und kommt als Hauptbestandteil im ätherischen Öl verschiedener Minzarten (z.B. *Mentha x piperita*) vor. Es besitzt drei asymmetrische Kohlenstoffatome. Von den acht resultierenden Stereoisomeren haben die beiden Enantiomere (-)- und (+)-Menthol die höchste thermodynamische Stabilität, wobei das Levo- oder (-)-Menthol (Abb. 1) in der Natur am häufigsten vorkommt und zumeist die pharmakologisch wirksamere Form darstellt. (-)-Menthol hat einen charakteristischen minzigen und erfrischenden Geschmack und Geruch und erzeugt eine kühlende Empfindung auf Haut und Schleimhäuten (Eccles, 2000).

(-)-Menthol wird als Zusatzstoff in Kosmetika, Nahrungs- und Genussmitteln, aber auch als Wirkstoff in Arzneimitteln verwendet.

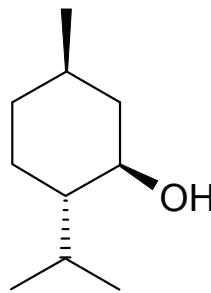


Abbildung 1: Strukturformel von (-)-Menthol

Wenn es topisch appliziert wird, besitzt Menthol kühlende (Hensel and Zotterman, 1951), lokalanästhetische (Galeotti et al., 2001) sowie juckreizstillende (Bromm et al., 1995) Eigenschaften. Der kühlende Effekt mentholhaltiger Zubereitungen auf Haut und Schleimhäuten erklärt sich durch eine Aktivierung von TRPM8-Rezeptoren, welche auf den Faserendigungen sensorischer Neurone lokalisiert sind (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002; Reid et al., 2002).

Der lokalanästhetische Effekt wird darauf zurückgeführt, dass Menthol nach Hautpenetration mit Rezeptorproteinen interagiert, welche auf Nervenfasern, deren Endigungen, oder Muskelfasern lokalisiert sind. Verursacht wird dieser Effekt höchstwahrscheinlich durch die

Blockade spannungsabhängiger neuronaler und muskulärer Natriumkanäle (Haeseler et al., 2002).

Bei systemischer Applikation hat Menthol verschiedene Effekte auf das ZNS. Hauptsächlich auf Tierversuchen basierend wurden analgetische (anästhetische), sedative, sowie narkotische Wirkungen beschrieben (Galeotti et al., 2002; Watt et al., 2008).

Obwohl Menthol bei der Behandlung von Schmerzen in der Phytotherapie schon sehr lange eingesetzt wird, ist über die Mechanismen, welche der Mentholwirkung zugrunde liegen, wenig bekannt (Wright, 1870; Green and McAuliffe, 2000; Davies et al., 2002; Behrendt et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Menthol Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle blockiert, die u.a. bei der Reizentstehung und -weiterleitung im nozizeptiven System wichtig sind (Swandulla et al., 1987; Haeseler et al., 2002). Weiterhin wurde beschrieben, dass (-)Menthol selektiv κ -Opioidrezeptoren aktiviert (Galeotti et al., 2002) und dass hauptsächlich (+)Menthol positiv modulierend auf GABA_A - und Glycin-Rezeptoren wirkt (Hall et al., 2004). Durch letztere Wirkung kann die inhibitorische synaptische Transmission im ZNS verstärkt werden, was die sedierenden und narkotischen Effekte von Menthol erklärt (Watt et al., 2008).

Die antinozizeptive Wirkung von Menthol lässt sich allerdings nicht über eine Interaktion mit GABA_A -Rezeptoren erklären. Andererseits spielen nAChRs, die ebenfalls zu den Ligandengesteuerten Ionenkanälen gehören, bei der nozizeptiven Reizverarbeitung eine wichtige Rolle und werden auch im Zusammenhang mit den anästhetischen Wirkungen verschiedener Pharmaka diskutiert (Flood et al., 1997). Daher erschien es uns von Interesse zu untersuchen, ob Menthol ebenfalls auf neuronale nAChRs wirkt.

3.2 Liganden-gesteuerte Ionenkanäle

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle spielen in der schnellen Signalübertragung (im Millisekundenbereich) an chemischen Synapsen eine zentrale Rolle. Die Vielzahl der bisher bekannten Liganden-gesteuerten Rezeptoren lässt sich aufgrund der jeweils homologen Struktur in drei verschiedene Superfamilien zusammenfassen: 1. Cys-loop-Rezeptoren 2. ionotrope Glutamat-Rezeptoren 3. ATP-Rezeptoren. Zur Superfamilie der Cys-loop-Rezeptoren, die sich durch eine Cys-Cys-Schleife in der ausgedehnten N-terminalen extrazellulären Region auszeichnen, gehören neben nAChRs (muskuläre und neuronale Typen) auch Serotonin (5-HT_3)-, Glycin- und γ -Aminobuttersäure (GABA_A und GABA_C)-Rezeptoren (Lester et al., 2004; Price et al.,

2007). Man unterscheidet exzitatorische Rezeptoren (nAChRs und 5-HT₃-Rezeptoren), die Kationen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) leiten, von inhibitorischen Rezeptoren (Glycin-, GABA_{A/C}-Rezeptoren), welche Anionen (Cl⁻) leiten.

Cys-loop-Ionenkanäle sind Pentamere, d.h. sie bestehen aus fünf nicht miteinander verbundenen Untereinheiten, welche konzentrisch um eine Pore angeordnet sind. Die Untereinheiten aller Cys-loop-Kanäle besitzen vier transmembranäre Segmente (M1-M4), eine große extrazelluläre N-terminale Domäne (ca. 220 Aminosäuren lang), sowie eine große intrazelluläre Schleife zwischen M3 und M4. Die M2-Segmente jeder Untereinheit begrenzen zusammen die zentrale Pore (Abb. 2). Die Ligand-Bindungsstellen sind an den Übergängen zwischen benachbarten Untereinheiten im N-terminalen Bereich lokalisiert.

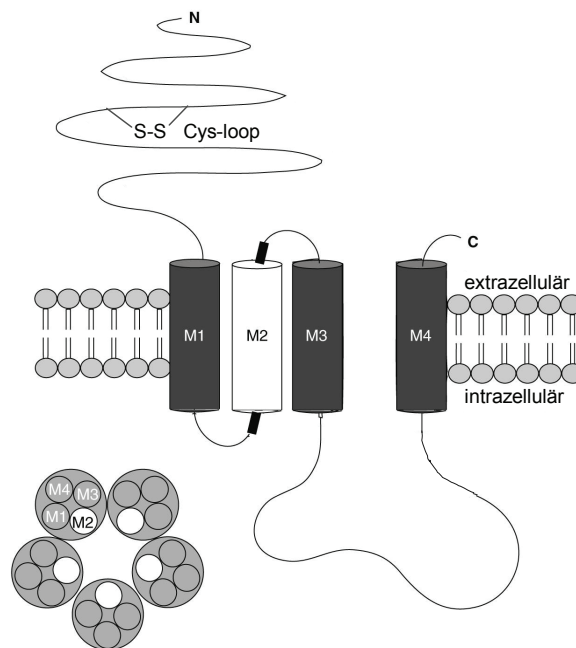


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur einer Cys-loop-Rezeptor-Untereinheit, modifiziert (Thompson and Lummis, 2007).

Innerhalb des N-terminalen Bereiches befindet sich die für diese Superfamilie charakteristische Cysteinschleife (Cys-loop). Ein Querschnitt des transmembranären Bereiches ist im linken unteren Teil dargestellt. Die fünf M2-Segmente der assoziierten Untereinheiten formen die zentrale, Ionen-leitende Pore.

Liganden-gesteuerten Ionenkanäle bezeichnet man auch als ionotrope Rezeptoren. Sie vereinen Kanalkomplex und Ligand-Bindungsstellen im selben Makromolekül und sind von den metabotropen Rezeptoren abzugrenzen. Bei letzteren wird die Signaltransduktion über ein G-Protein vermittelt, welches wiederum mit unterschiedlichen Effektorproteinen (z.B. Adenylatzyklase, Ionenkanäle) interagiert. Daher erfolgt die Signalweiterleitung bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren langsamer (Sekunden-Bereich) als bei den Liganden-gesteuerten Ionenkanälen.

Innerhalb der Acetylcholinrezeptoren lassen sich die nAChRs (ionotrop) von den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (metabotrop) unterscheiden (Kandel et al., 2000).

3.3 Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren

nAChRs können aufgrund ihrer Struktur und Lokalisation in muskuläre und neuronale Rezeptoren unterteilt werden. Der muskuläre nAChR kommt in Skelettmuskeln (neuromuskuläre Endplatte) von Wirbeltieren oder elektrischen Organen verschiedener Fische vor. Neuronale nAChRs findet man hauptsächlich im peripheren Nervensystem sowie im ZNS, sie sind aber auch in nichtneuronalen Strukturen, wie z.B. Epithelzellen und Zellen des Immunsystems vorhanden (Steinlein and Bertrand, 2008).

nAChRs sind sogenannte Pentamere, also aus insgesamt fünf Untereinheiten zusammengesetzt, wobei 17 verschiedene Untereinheiten (α_1 - α_{10} , β_1 - β_4 , γ , δ , ϵ) durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Die α_1 -, β_1 -, γ -, δ -, und ϵ -Untereinheiten kommen ausschließlich in muskulären nAChRs vor. In neuronalen nAChRs findet man eine Vielzahl von pentameren Kombinationen, die als Homo- oder Heteromere exprimiert werden (Plazas et al., 2005; Dani and Bertrand, 2007). Homopentamere weisen fünf identische ACh-Bindungsstellen auf, während Heteropentamere jeweils zwei Bindungsstellen besitzen, die je nach Zusammensetzung der Untereinheiten nicht identisch sein müssen (Corringer et al., 2000; Le Novere et al., 2002).

Einer der wichtigsten Liganden, der zur Aufklärung der Struktur von nAChRs beigetragen hat, ist das α -Bungarotoxin (α -BgTx), das im Gift der Natter *Bungarus multicinctus* vorkommt. Während der muskuläre nAChR irreversibel durch α -BgTx blockiert wird, bindet α -BgTx mit unterschiedlicher Affinität reversibel an neuronale nAChRs. Dies erlaubt die pharmakologische Unterscheidung von zwei nAChR-Klassen:

- a) α -BgTx-sensitive Subtypen, welche sich entweder aus α_7 -, α_8 - oder α_9 -Homopentameren zusammensetzen, oder die Heterodimere sind, welche aus α_7/α_8 - bzw. α_9/α_{10} -Untereinheiten bestehen.
- b) Heteropentamere, welche α -BgTx nur mit geringer Affinität binden und α_2 - α_6 kombiniert mit β_2 - β_4 -Untereinheiten enthalten.

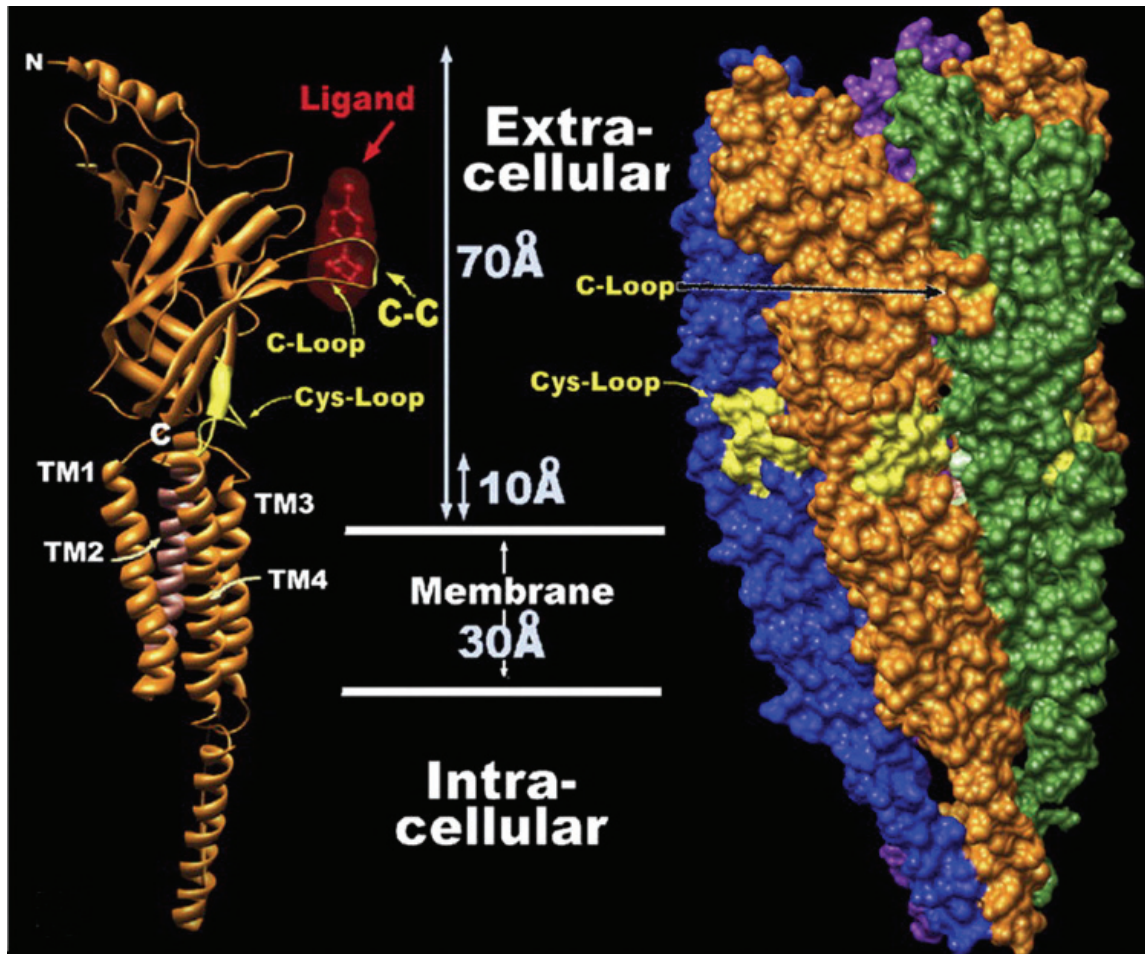


Abbildung 3: Dreidimensionale Rekonstruktion des muskulären nAChR (Torpedo) basierend auf dessen elektronenmikroskopischer Struktur (Unwin, 2005) modifiziert durch (Albuquerque et al., 2009).

Im linken Bildteil ist die Sekundärstruktur einer α -Untereinheit gezeigt. Die extrazelluläre Domäne weist hauptsächlich β -Faltblattstruktur auf, während alle transmembranären Segmente eine α -Helixstruktur besitzen. Die transmembranären Segmente ragen etwa 10 Å über die Membran hinaus. Die große intrazelluläre Schleife bildet ebenfalls eine α -Helix. Eine α -Untereinheit ist dadurch gekennzeichnet, dass sie eine C-loop enthält, welche ein Cysteinpaaar beinhaltet. Dieses ragt aus dem extrazellulären β -Faltblattkern heraus und umschließt den Agonisten. Im rechten Bildteil ist der vollständige Rezeptorkomplex gezeigt. Der Rezeptor hat eine zapfenförmige Struktur und ragt mit leichtem Winkel etwa 70 Å aus der Zellmembran.

3.3.1 Lokalisation und Funktion

Neuronale nAChRs werden hauptsächlich im ZNS und peripheren Ganglien exprimiert und sind Bestandteil des cholinergen Systems, welches mit einer Vielzahl von Projektionen nahezu jeden Bereich des ZNS innerviert (Woolf, 1991; Dani and Bertrand, 2007). Als cholinerges Neurotransmitter-System wird die chemisch-synaptische Informationsübertragung durch den Neurotransmitter Acetylcholin bezeichnet (Aktories et al., 2005).

Neuronale nAChRs sind an unterschiedlichen physiologischen Funktionen beteiligt, wie z.B. Herz-Kreislauf-Regulation, Nozizeption und synaptische Plastizität (Everitt and Robbins, 1997; Picciotto et al., 2000; Dani, 2001; Tassonyi et al., 2002).

Diese Rezeptoren sind sowohl prä-, post- als auch nichtsynaptisch lokalisiert (Lena et al., 1993; Descarries et al., 1997; Zarei et al., 1999; Dani, 2001). Präsynaptisch modulieren nAChRs die Freisetzung von Neurotransmittern wie z.B. GABA, ACh, Dopamin (Exley and Cragg, 2008), Serotonin, Noradrenalin oder Glutamat (Dani, 2001). Allerdings ist dabei die Rolle verschiedener präsynaptisch und präterminal lokalisierter nAChRs zurzeit noch nicht vollständig geklärt. Postsynaptisch vermitteln nAChRs einen Teil der schnellen exzitatorischen Neurotransmission (Sher et al., 2004; Jensen et al., 2005).

Aufgrund ihrer Ca^{2+} -Permeabilität, welche für die verschiedenen nAChR-Subtypen unterschiedlich ist (Adams and Nutter, 1992; Castro and Albuquerque, 1995), haben sie Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration. Calcium ist ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff, der verschiedene Signalkaskaden regulieren kann. NACHRs können über eine Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowohl prä- als auch postsynaptische Prozesse beeinflussen, die für die synaptische Transmission im ZNS und deren Plastizität bedeutsam sind (Broide and Leslie, 1999; Mansvelder and McGehee, 2000). NACHRs sind für verschiedene komplexe Funktionen des ZNS relevant, wie z.B. Wahrnehmung und Gedächtnis, spielen aber auch pathophysiologisch z.B. bei der Suchtentstehung eine wichtige Rolle (Dajas-Bailador and Wonnacott, 2004).

Weiterhin werden nAChRs im Zusammenhang mit neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen wie Epilepsie, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Schizophrenie diskutiert (Paterson and Nordberg, 2000; Dani and Bertrand, 2007) (siehe auch Diskussion).

3.3.2 Aktivierungs- und Desensibilisierungsmechanismus

Modelle für den Mechanismus der Aktivierung unterschiedlicher nAChRs wurden ausgehend vom muskulären nAChR entwickelt und gelten prinzipiell auch für neuronale nAChRs. Zunächst wurden drei verschiedene funktionelle Zustände beschrieben (Katz and Thesleff, 1957).

Im Ruhezustand (R_a - R_b) (siehe Abbildung 4) sind die Bindungsstellen nicht besetzt und der Ionenkanal ist geschlossen. Einen aktivierten (offenen) Zustand erreicht der Rezeptor mit großer Wahrscheinlichkeit nach Agonist-Bindung (AR_a - R_b^* , R_a - AR_b^* , A_2R^*). Die Öffnung eines Kanals hält für ca. 1-10 ms an, während dieser Zeit leitet der Kanal Natrium-, Kalium- und/oder Calciumionen. Erreicht der Rezeptor den desensibilisierten Zustand (A_2D), dann ist er geschlossen und nicht aktivierbar. Die Desensibilisierung stellt sich nach Agonistexposition ein. Je nachdem wie schnell der Kanal in diesen Zustand gelangt, unterscheidet man schnelle (Millisekunden-Bereich) und langsame Desensibilisierung (Sekunden bis Minuten) (Sakmann et al., 1980; Hamill and Sakmann, 1981). Das Schema zeigt allerdings nicht, dass Desensibilisierung auch stattfindet, ohne dass der Kanal vorher aktiviert wurde (Katz and Thesleff, 1957; Paradiso and Steinbach, 2003). Wie schnell der Rezeptor aus dem Zustand der Desensibilisierung wieder zurück in den offenen Zustand gelangt (Rate der Erholung von der Desensibilisierung), wird von der Geschwindigkeitskonstante α_D bestimmt. Die Rezeptoren befinden sich in einem ständigen Wechsel zwischen den oben genannten Zuständen, und die Geschwindigkeitskonstanten dieser Zustandsänderungen sind vom vorhandenen Subtyp, dem verwendeten Agonisten, sowie dessen Konzentration abhängig.

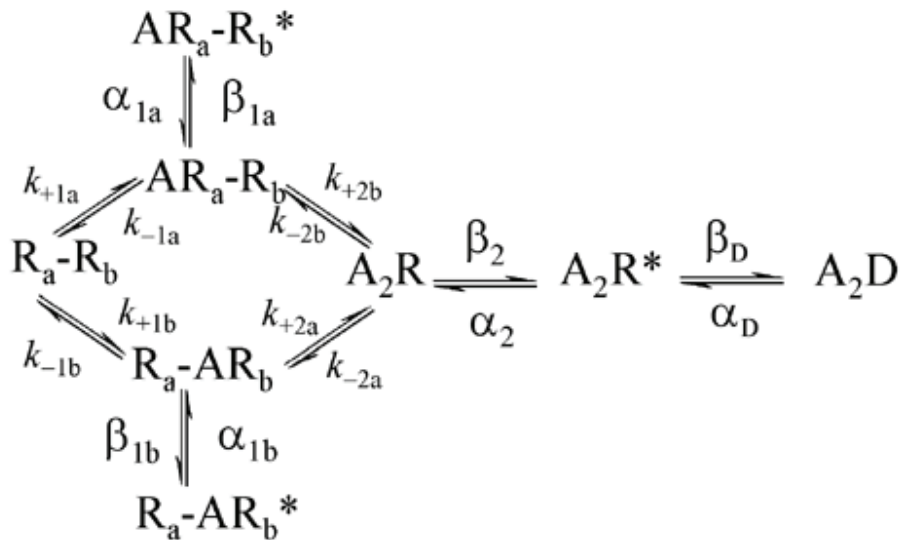


Abbildung 4: Modell für den Aktivierungs- und Desensibilisierungsmechanismus eines nAChR mit zwei ACh-Bindungsstellen.

Der Agonist bindet an die beiden Bindungsstellen am geschlossenen Rezeptor (R) mit den Assoziationskonstanten k_{+1} , k_{+2} , und löst sich von den Bindungsstellen mit den Dissoziationskonstanten k_{-1} und k_{-2} . Nach Bindung der Liganden kann der Rezeptor in den offenen Zustand übergehen (A_2R^*). Beim Übergang vom offenen in den desensibilisierten Zustand (β_D) und umgekehrt (α_D) bleiben die beiden Agonistmoleküle gebunden (Hatton et al., 2003).

R: geschlossener aktivierbarer Rezeptor; A: Agonist; R*: aktivierter Rezeptor; D: desensibilisierter Rezeptor; Ratenkonstanten: β (für Öffnen) bzw. α (für Schließen). Die tiefgestellten Indizes 1 und 2 beziehen sich auf die Anzahl der gebundenen Agonist-Moleküle, a und b beziehen sich auf die beiden Agonist-Bindungsstellen im Rezeptor.

3.3.3 Rezeptormodulation

Die Funktion von nAChRs kann vielfältig moduliert werden. Die entsprechenden Modulatoren können an verschiedenen Stellen des Kanalproteins angreifen und Eigenschaften des Ionenkanals wie z.B. Leitfähigkeit, Offenzeit, Desensibilisierungs-Geschwindigkeit oder Ionenselektivität verändern.

Dabei kann die Modulation durch Interaktion eines Liganden mit der orthosterischen Bindungsstelle oder mit einer allosterischen Bindungsstelle am Kanalprotein erfolgen. Ein klassisches Beispiel für die Wechselwirkung eines Liganden mit der orthosterischen

Bindungsstelle ist α -BgTx, das als kompetitiver Antagonist wirkt.

Die Bindung von Liganden an allosterischen Bindungsstellen kann die Rezeptorfunktion sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Ein Beispiel für einen Liganden, der negativ modulatorisch wirkt, ist Mecamylamin. Diese Substanz ist ein sogenannter nicht-kompetitiver Antagonist (NKA) und hemmt den Rezeptor. Solche Substanzen regulieren die Rezeptorfunktion, indem sie zu Konformationsänderungen des Rezeptorproteins führen und so die Wirkung des Agonisten abschwächen (Lüllmann et al., 2006; May et al., 2007).

Es konnten für verschiedene nAChRs drei bevorzugte Bindungsstellen für nicht-kompetitive Hemmstoffe lokalisiert werden (Arias, 1998). Porenblocker, zu denen einige Lokalanästhetika gehören, dringen in den aktivierten nAChR ein und treten im zentralen Lumen mit Aminosäuren der M2-Region in Wechselwirkung (Neher and Steinbach, 1978; Hucho, 1986; Giraudat et al., 1987). Infolgedessen wird die Kanalpore sterisch durch die gebundene Substanz blockiert. Auch dissoziative Anästhetika wie z.B. Ketamin oder verschiedene Antidepressiva können Porenblocker nAChRs sein (Arias et al., 2006). Für Steroide wie z.B. Progesteron wurde an heteromeren nAChRs ein negativer allosterischer Effekt nachgewiesen, der vermutlich durch eine Bindung im extrazellulären Bereich des Rezeptorproteins zustande kommt (Valera et al., 1992; Arias, 1998; Arias et al., 2006) (Abb. 5). Darüber hinaus gibt es Modulatoren, welche die Funktion des nAChR positiv beeinflussen können, wie z.B. extrazelluläres Calcium (Mulle et al., 1992; Vernino et al., 1992) oder bestimmte Zelloberflächenproteine (Miwa et al., 1999; Darvas et al., 2009).

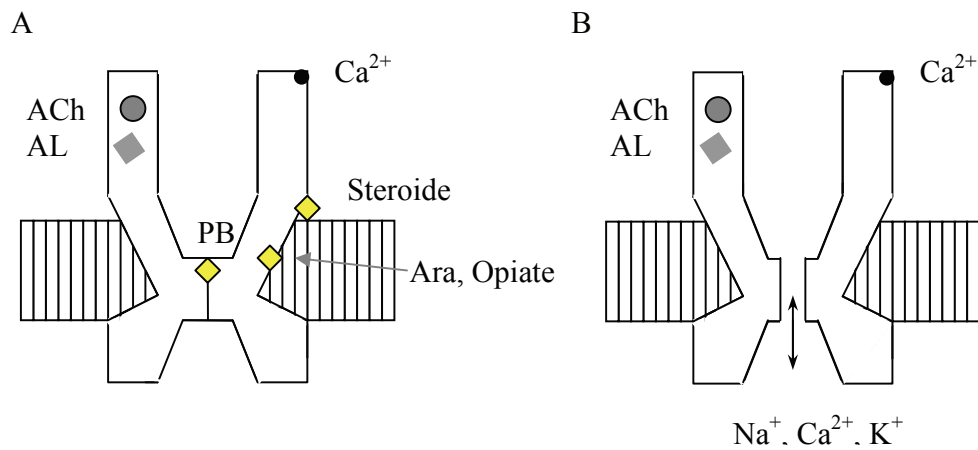


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Regulation eines nAChR durch verschiedene allosterische Modulatoren.

Der nAChR ist ein Liganden-gesteuerter unspezifischer Kationenkanal. Er hat Bindungsstellen für Agonisten wie Acetylcholin (ACh), allosterische Liganden (AL), Porenblocker (PB), Steroide und Opiate oder Arachidonsäure (Ara), sowie extrazelluläre Calciumionen. Abbildung verändert nach (Galzi and Changeux, 1995).

A) zeigt den Kanal im geschlossenen und B) im geöffneten Zustand.

3.4 Trigemurale Neurone als Untersuchungssystem

Neurone aus dem trigeminalen Ganglion exprimieren eine Vielzahl von gut charakterisierten Liganden- und Spannungs-gesteuerten Ionenkanälen darunter auch verschiedene nAChR-Subtypen (siehe 6.1). Wir verwendeten bei unseren Untersuchungen trigeminale Neurone, da sie leicht zu präparieren sind und sehr gut für kürzere Zeit kultiviert werden können. Trigemurale Neurone besitzen den Vorteil, dass die zu untersuchenden Rezeptoren in einer natürlichen Umgebung exprimiert werden. Dies erlaubt die Analyse von Regulationsprozessen wie z.B. Wechselwirkungen mit anderen zellspezifischen Proteinen. Im Gegensatz dazu bietet die heterologe Expression von definierten nAChR-Subtypen in einer humanen Zelllinie definierte Untersuchungsbedingungen für nur einen Rezeptortyp. Dieses System wurde für pharmakologische Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Menthol auf $\alpha_4\beta_2$ -nAChRs herangezogen.

3.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es herauszufinden, wie die Funktion neuronaler nAChRs durch Menthol beeinflusst wird. Zu diesem Zweck sollten native nAChRs in akut dissoziierten trigeminalen Neuronen der Ratte sowie rekombinante nAChRs in HEK tsA201 Zellen untersucht werden. Dabei sollten die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften von Ganzzellströmen sowie die biophysikalischen Eigenschaften von Einzelkanalströmen durch nAChRs mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik und schneller Substanzapplikation untersucht werden.

Ströme durch nAChRs, die mit Hilfe der Agonisten Acetylcholin, (\pm)Epibatidin und (-)Nikotin in trigeminalen Neuronen induziert wurden, sollten analysiert werden. Aus den biophysikalischen Eigenschaften (Kinetik) der Ströme und den ermittelten pharmakologischen Kenngrößen (EC_{50} -Werte) wurden Aussagen über die Zusammensetzung der nAChRs in trigeminalen Neuronen getroffen.

Die Wirkung von Menthol auf Acetylcholin- bzw. (-)Nikotin-induzierte Ionenströme durch nAChRs sollte genauer untersucht werden. Es sollte bestimmt werden, wie Menthol die Funktion von nAChRs moduliert und über welchen Wirkmechanismus Menthol mit dem nAChR interagiert.

4. Material und Methoden

4.1 Primärkultur

Zur Gewinnung der trigeminalen Neurone wurden 23 ± 5 Tage alte Wistarratten mit Ether narkotisiert, dekapitiert und die trigeminalen Ganglien herauspräpariert. Dazu wurde die Kopfhaut über dem Os occipitale (Hinterhauptsbein), Os parietale (Scheitelbein) und Os frontale (Stirnbein) mit Schere und Pinzette entfernt. Durch Spülung mit eiskalter ACSF wurden Haare und äußere Blutreste entfernt. Mit einem spitzen Skalpell wurde die Schädeldecke in der Mitte der Sutura lambdoidea (Lambda-Naht) durchstoßen, und vom Einstich beginnend mit einer Schere entlang der Sutura lambdoidea und der Sutura sagittalis (Pfeilnaht) der Schädel aufgeschnitten. Die Ossa parietalia (Scheitelbeine), ein Teil der Ossa frontalia (Stirnbeine) und das Os occipitale (Hinterhauptsbein) wurden mit einer gebogenen Pinzette entfernt. Mit einem Skalpell wurde ein coronaler Schnitt durch die Riechkolben (Bulbi olfactorii) gemacht, und das Gehirn von diesem Schnitt ausgehend mit einem Spatel nach hinten geklappt. Der Schädel wurde mit ACSF gespült und mit Kanülen am mit Sylgard 184 (Dow Corning) beschichteten Gefäßboden fixiert. Die trigeminalen Ganglien wurden mit einer Augenschere frei präpariert, so dass jeweils ca. 0,2 cm vom ophthalmis, maxillaris und mandibularis Zweig erhalten blieben. Die Ganglien wurden in eiskalter ACSF (siehe 4.3) gewaschen und mit einer Augenschere in kleine Stücke zerkleinert.

Nach Zugabe von Collagenase 1A (Sigma, Endkonzentration: 0,7 mg/ml), Trypsin (Roche; Endkonzentration: 0,3 mg/ml), DNase I (Roche, Endkonzentration: 0,01 mg/ml) erfolgte der enzymatische Verdau 20 ± 5 min unter Schütteln bei $T = 33^{\circ}\text{C}$ und Begasung mit Carbogen (95% Sauerstoff/5% Kohlendioxid). Die verdauten Gewebestücke wurden in DMEM/F12 (1:1) Medium [enthält Zusätze 10% FBS, Penicillin (100 Einheiten/ml), Streptomycin (100 µg/ml)] (alles Invitrogen) gewaschen und mit feuerpolierten Glaspipetten mechanisch dissoziiert. Die erhaltene Suspension wurde über einen Filter (Porendurchmesser = 100 µm) gegeben und 5 min bei $160 \times g$ zentrifugiert.

Das entstandene Pellet wurde durch Resuspension in DMEM/F12 gewaschen und 4 min bei $160 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM/F12 resuspendiert und die neuronalen Zellen auf runde, mit PLL beschichtete Deckgläschen (PLL 0,01%, Sigma) zu 40 µl je

Gläschen ausplattiert (je 4 Gläschen befanden sich in einer 35 mm Gewebeskulturschale). Die Schalen wurden im Brutschrank in einer feuchten 5% CO₂-Atmosphäre bei 37 °C aufbewahrt und 30 min nach Ausplattierung mit 2 ml DMEM/F12 Medium pro Schale aufgefüllt. Die Zellen wurden 60 min bis 24h nach dem Ausplattieren untersucht.

4.2 Kultivierung von HEK tsA201 Zellen

Bei der verwendeten Säugerzelllinie handelt es sich um HEK tsA201 Zellen, welche den humanen $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Subtyp stabil exprimieren (Nelson et al., 2003). Diese Zelllinie wurde uns von Prof. Dr. Jon Lindstrom (Department of Neuroscience, University of Pennsylvania Medical School, Philadelphia, Pennsylvania) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden als Monolayerkulturen in Zellkulturschalen bei 37°C unter 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium verwendeten wir DMEM/F12 (1:1) [enthält Zusätze 10% FBS, Penicillin (100 Einheiten/ml), Streptomycin (100 µg/ml), sowie als Selektionsantibiotika Zeocin (0,5 mg/ml) und Geneticin/G418 (0,6 mg/ml)] (alles Invitrogen). Bei ca. 80-90%iger Konfluenz erfolgte eine Subkultivierung der Zellen (1:10). Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm von Trypsin (0,05%)-EDTA(0,02%)-Lösung (jeweils m/V) überschichtet und ca. 3 - 5 min bei 37°C bis zum Ablösen inkubiert. Durch Zugabe Serum-haltigen Mediums wurde der Trypsinierungsprozess unmittelbar danach gestoppt. Noch vorhandene Zellverbände wurden durch wiederholtes Pipettieren aufgelöst, nachfolgend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (4 min/180*g), in 2 ml frischem Medium resuspendiert und mit einer Dichte von ca. 150000/ml in ein neues Kulturgefäß ausgesät.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) unter Verwendung von Trypanblau.

4.3 Verwendete Lösungen

Es wurden die folgenden Lösungen und Medien verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Substanzen von Sigma bezogen. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen werden in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

Material und Methoden

	MMR	IS-1	ACSF	PBS	SC-1	SC-2
NaCl	145	10	124	137	5,4	5,4
KCl	2,5	130	2,5	2,7	142	110
HEPES	10	10			10	10
NaHCO ₃			26			
KH ₂ PO ₄				0,9		
NaH ₂ PO ₄			1	6,4		
EGTA		10				
TEA-OH						20
MgCl ₂	1,3	5			1,7	
MgSO ₄			1,3			
CaCl ₂	2	0,5	2		1,8	1,8
CdCl ₂						1
Glucose	20		10			
4-AP						10
TTX						0,0005

Tabelle 1: Zusammensetzung interner und externer Lösungen

Die Konzentrationen sind jeweils in mmol/l angegeben. Der pH-Wert aller Lösungen betrug 7.3 bis 7.4, MMR und PBS wurden mit NaOH, IS-1 und SC-1 mit KOH und SC-2 mit HCl eingestellt. Die pH-Anpassung der ACSF erfolgte durch Carbogen-Begasung

MMR extrazelluläre Lösung

IS-1 intrazelluläre Lösung

ACSF artifizielle Zerebral-Spinal-Flüssigkeit

PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung

SC-1 externe Lösung 1 für Einzelkanalableitungen

SC-2 externe Lösung 2 für Einzelkanalableitungen (enthält Blocker für Natrium-[TTX], Kalium- [4-AP, TEA-OH], Calcium-Kanäle [CdCl₂])

4.4 Expression nikotinischer Rezeptoren in myelinisierten und nicht-myelinisierten Fasern trigeminaler Neurone

Die sensiblen Fasern des Trigeminale Systems leiten ihre Information im Wesentlichen über zwei Fasertypen zum ZNS, den nicht myelinisierten C-Fasern sowie den myelinisierten A δ -Fasern. Welchen Einfluss nAChRs auf die Informationstransduktion in sensiblen Fasern haben, ist noch weitgehend unbekannt. Die Größe der Zellsomata der trigeminalen Neurone korreliert mit dem jeweiligen Fasertyp.

Eine Einteilung trigeminaler Neurone nach Somagröße wird in der Weise vorgenommen, wie es bereits für DRG-Neurone beschrieben wurde (Harper and Lawson, 1985; Liu et al., 1993). So sind die Zellsomata von C-Fasern meist kleiner als 28 μm im Durchmesser (Meyer, 2006), während myelinisierte A-Fasern mit mittelgroßen und großen Zellsomata (Zelldurchmesser 28 bis 60 μm) verbunden sind. Eine Methode, die Expression nikotinischer Rezeptoren den entsprechenden Fasertypen zuzuordnen, ist es, nach einer Korrelation zwischen der Zellgröße und dem Strom durch nAChRs zu suchen. Da Zelloberfläche und Zellkapazität mit der Zellgröße korrelieren, kann man aus der bei Ganzzelleableitung ermittelten Zellkapazität (C_{slow}) direkt die Zellgröße (Durchmesser) nach folgender Formel ableiten.

$$d = 2 \sqrt{\frac{C_{\text{slow}}}{0.04\pi}} \quad d = \text{Zelldurchmesser}$$

Für die Untersuchung der Größenverteilung (siehe Histogramm Abb. 6) wurden Zellen aus Tieren im Alter von 18 bis 28 Tagen gewonnen. Das Histogramm zeigt die Größenverteilung der Zellen ($n = 444$), die mit einem nAChR-Agonisten auf Aktivierbarkeit nikotinischer Ströme getestet wurden. Die dabei verwendeten Konzentrationen betragen ACh (100 μM), Nikotin (75 μM), Epibatidin (100 nM), was etwa der jeweils bestimmten EC_{80} -Konzentration entspricht. Eine Alterseinschränkung wurde vorgenommen, da die Zellgröße erst mit dem Erreichen des adulten Stadiums konstant bleibt.

Abb. 6 zeigt die Zellen, welche positiv auf einen nikotinischen Agonisten reagierten in Korrelation mit dem Zelldurchmesser. Die Gesamtpopulation der untersuchten Zellen wurde in zwei Größenklassen aufgeteilt, Zellen mit Durchmesser $< 28 \mu\text{m}$ bzw. $\geq 28 \mu\text{m}$, die den C-

bzw. den A δ -Fasertyp repräsentieren. In der Population der Zellen mit Durchmesser < 28 μm zeigten 79,0% eine Agonist-induzierte Antwort, wohingegen 96,3% der Zellen mit Durchmesser \geq 28 μm positiv auf einen Agonisten reagierten.

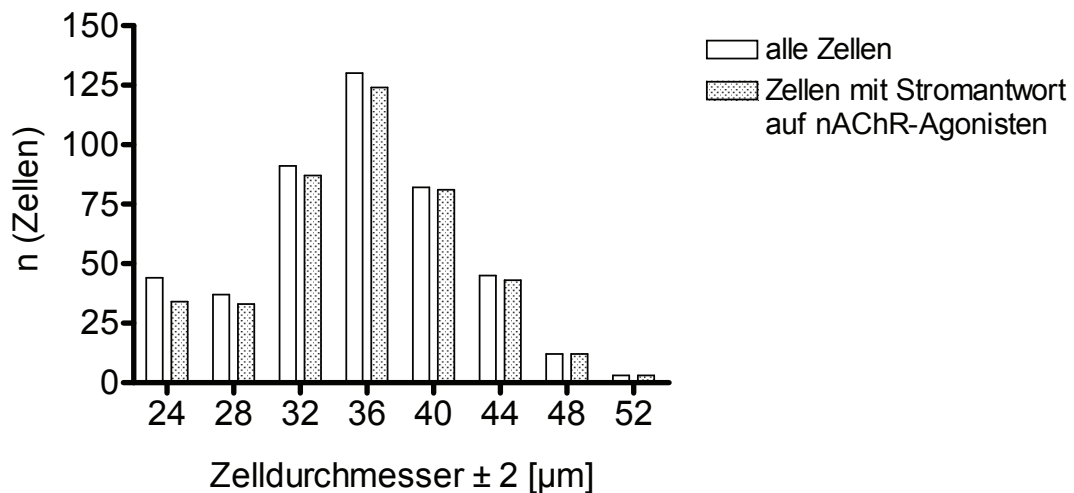


Abbildung 6: Das Auftreten Agonist-induzierter Ströme durch nAChRs ist unabhängig von der Größe der untersuchten trigeminalen Neurone.

Dargestellt ist die Größenverteilung aller untersuchten trigeminalen Neurone (offene Balken) sowie der Anteil der Neurone, in denen Ströme durch nAChRs registriert wurden (gefüllte Balken).

Wir konnten das Vorkommen nAChRs in trigeminalen Neuronen mit Somata aller Größen nachweisen. In unseren Experimenten reagierten kleine Zellen (Durchmesser < 28 μm) im Vergleich zu großen/mittelgroßen Zellen mit geringerer Häufigkeit auf nikotinsche Agonisten. Diese Tendenz zeigte sich auch in einer anderen Studie (Liu and Simon, 1996), unterscheidet sich aber von einer früheren Studie an trigeminalen Neuronen (Liu et al., 1993), bei der lediglich in mittelgroßen (Durchmesser zwischen 28 und 39 μm) und großen Zellsomata Ströme durch nAChRs beobachtet werden konnten. Mögliche Ursache für diese Diskrepanz ist die geringe Agonist-Konzentration, die in der letztgenannten Studie verwendet wurde. Trigeminalen Afferenzen sind zum Teil Schmerzfasern und/oder vermitteln Informationen von Chemo-, Thermo- sowie Mechanorezeptoren. Die trigeminalen Afferenzen beinhalten

neben polymodalen C- und A δ -Fasern (Perl, 1968; Bessou and Perl, 1969) auch eine Gruppe von A δ -Fasern, die nur rein chemische Reize vermitteln (LaMotte et al., 1988; Bryant, 1995).

4.5 Elektrophysiologie

4.5.1 Patch-Clamp-Aufnahmen

4.5.1.1 Ganzzell-Ableitungen (whole cell) - einige Grundlagen

Mit Hilfe der Ganzzell-Ableitung kann das Öffnungsverhalten von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen während der Applikation eines Rezeptoragonisten untersucht werden. Der resultierende Ionenstrom (Ganzzell- oder makroskopischer Strom = I_{\max}) ist das Produkt aus der Gesamtzahl funktioneller Kanäle (N), der Wahrscheinlichkeit, dass ein solcher Kanal geöffnet ist (P_o), und dem Ionenstrom durch jeden einzelnen Kanal (i) (Sakmann B., 1995).

$$I_{\max} = N \times P_o \times i$$

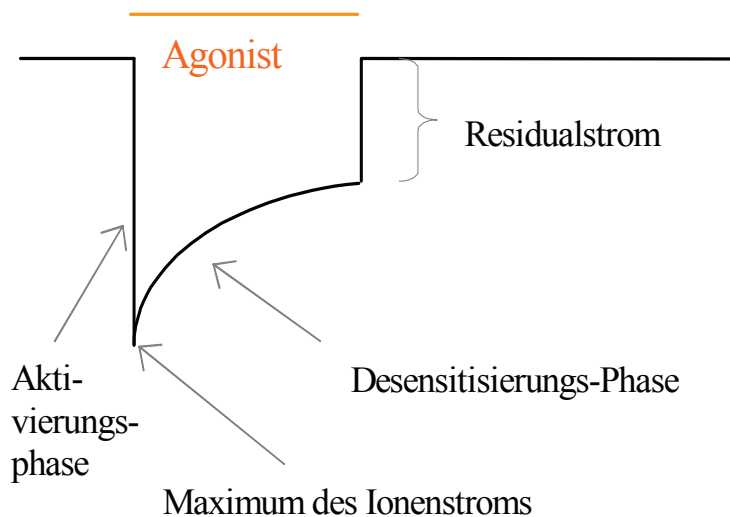


Abbildung 7: Vereinfachte schematische Darstellung des Ganzzellstromes durch nAChRs nach Aktivierung durch einen Agonisten.

Die Applikation eines nAChR-Agonisten löst nach Besetzung der ersten bzw. ersten und zweiten Bindungsstelle der nAChRs deren Aktivierung (Öffnung) und somit die Aktivierung

des Ionenstroms aus. Das Maximum des Ionenstromes wird erreicht, wenn die meisten nAChRs an beiden Bindungsstellen mit Agonistmolekülen besetzt sind, also die Konzentration A_2R^* maximal ist (siehe Abb. 4). Der resultierende Strom durch die Kanäle wird nahe dem Ruhemembranpotential (physiologische Ionen-Zusammensetzung vorausgesetzt) hauptsächlich von Natriumionen getragen. Die aktivierten Kanäle gehen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit in den desensitisierten Zustand A_2D über, die beiden Agonist-Moleküle bleiben zwar währenddessen gebunden, der Kanal ist jedoch nicht mehr leitend. In dieser Desensitierungs-Phase kommt es zu einer sichtbaren Verringerung der Stromamplitude. Der am Ende der Agonist-Applikation verbleibende Residualstrom lässt sich auf Kanäle zurückführen, die zu diesem Zeitpunkt nicht desensitisiert sind.

4.5.1.2 Ganzzell-Ableitungen -Methodik

Die Ableitungen wurden mit einem EPC 9 Patch-Clamp-Verstärker gemacht und mit dem Programm Pulse (HEKA Elektronik) aufgezeichnet. Die Aufnahmen wurden mit 1 oder 10 kHz gefiltert (Bessel 4 Pol), und mit dem integrierten AD/DA Wandler ITC16 (HEKA Elektronik) bei einer Aufnahmerate von 1, 10, oder 50 kHz digitalisiert und auf der Festplatte gespeichert.

Die Patchpipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (Kimble Products) mit einem programmierbaren horizontalen Puller (Zeitz-Instrumente) gefertigt und poliert, mit interner Lösung (IS-1) befüllt und hatten in der Badlösung (MMR) einen Widerstand von 1,7 bis 3,9 M Ω . Die Ganzzelleableitungen wurden (falls nicht anders angegeben) bei einem Haltepotential von $V_H = -90$ mV durchgeführt. Dadurch wird eine Aktivierung Spannungs-gesteuerter Natrium- und Calcium-Kanäle verhindert.

4.5.1.3 Ableitung von Einzelkanälen - einige Grundlagen

Der Strom, der durch einen einzelnen Kanal fließt, wird durch die treibenden Kräfte (V_{EMF}) der einzelnen Ionen bestimmt. Gemäß dem Ohmschen Gesetz $I = V/R$ kann der Einzelkanalstrom i über die Formel $i = V_{EMF} * g$ berechnet werden (g = Einzelkanal-Leitfähigkeit), wobei $V_{EMF} = V_{MP} - V_{Rev}$ (V_{MP} : Membranpotential, V_{Rev} : Umkehrpotential der entsprechenden Ionenart). Zu den eindeutigen Unterscheidungsmerkmalen jedes Ionenkanaltyps gehört eine Kombination aus Einzelkanal-Stromamplitude und eine charakteristische mittlerer Offen-/Ge-

schlossenzeit-Verteilung. Die Offenzeit oder Offenverweildauer ist die Zeitspanne zwischen dem Öffnen des Kanals und seinem nächsten Schließen. Die Geschlossenzeit ist demzufolge die Phase zwischen Schließen und dem nächsten Öffnen. Als Ereignis bezeichnet man den Übergang vom geschlossenen in den offenen oder vom offenen in den geschlossenen Zustand. Die Offenwahrscheinlichkeit P_0 beschreibt den Rezeptor im Gleichgewicht zwischen offenem und geschlossenem Zustand und ist ein Maß dafür, ob ein Ionenkanal unter gegebenen Bedingungen offen sein wird.

4.5.1.4 Ableitung von Einzelkanälen - Methodik

Als Verstärker wurde ein EPC 9 (HEKA Elektronik) verwendet. Die Daten wurden mit 10 kHz (Bessel 4 Pol) gefiltert, mit dem integrierten AD/DA Wandler ITC16 (HEKA Elektronik) bei 30 kHz digitalisiert, und auf Festplatte gespeichert. Die Patchpipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (Kimble Products) mit einem programmierbaren horizontalen Puller (Zeitz-Instrumente) gefertigt. Zur Verringerung der Elektrodenkapazität wurden die Pipettenspitzen mit Sylgard 184 (Dow Corning) beschichtet und anschließend an einer Microforge (Luigs & Neumann) poliert. Der Pipettenwiderstand betrug 2,0 bis 4,5 M Ω . Die Pipettenlösung enthielt SC-1 (SC-2) mit Nikotin (75 μ M) oder Nikotin (75 μ M) + Menthol (100 μ M). Als Externe Lösung wurde SC-1 (SC-2) verwendet. Das Haltepotential (V_H) betrug -70 mV. Um die Eigenschaften der nAChRs isoliert zu charakterisieren, enthielt die Pipettenlösung bei einer weiteren Reihe von Experimenten zusätzlich TTX, CdCl₂, TEA-OH und 4-AP zur Blockade Spannungs-gesteuerter Na⁺-, Ca²⁺- und K⁺-Kanäle (SC-2).

4.5.2 Applikation von Testlösungen mit einem Druckapplikationssystem

Während der Ganzzell-Ableitungen wurden Ströme durch nAChRs mit Acetylcholin (3 bis 500 μ M), Epibatidin (5 - 300 nM), Nikotin (1.5 - 200 μ M) ausgelöst. Die Applikation erfolgte mit einem Druckapplikationssystem ALA-VM8 (ALA Scientific Instruments), betrieben bei einem Luftdruck von 40-50 kPa. Nähere Informationen liefert auch dieser Link: http://www.alascience.com/products/index.php?main_page=index&cPath=1. Die 8 + 1 Magnetventile (Lee Products) wurden über den Pulsgenerator im Pulse-Programm kontrolliert, wobei über das zusätzliche Ventil (+1), welches vor bzw. nach dem Testpuls ständig geöffnet

war, die Absaugung bzw. das Ausspülen der überschüssigen Testlösung erfolgt. Die zu applizierenden Lösungen befanden sich während des Experiments in einem der 8 (+1) Reservoirs, bzw. in dem vom jeweiligen Reservoir abführenden Schlauch. Agonist-induzierte Ströme wurden ca. alle 3 min über 500 ms bis 1 s lange, Pulse-Programm-gesteuerte Applikationen ausgelöst. Die unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen wurden in randomisierter Reihenfolge appliziert. Ein mindestens 3-minütiges Warte-Intervall zwischen den Applikationen stellte sicher, dass der Anteil der Rezeptoren, die sich in der Phase der Desensibilisierung befanden, minimal gehalten wurde. Die Applikationsdauer betrug für Acetylcholin 1 s, nach jeweils einem MMR-Vorpuls von 500 ms, für Epibatidin 1 s nach einem 1 s MMR-Vorpuls und einem Auswaschen mit MMR (5 s), für Nikotin 1 s nach einem MMR-Vorpuls von 150 ms und einem Auswaschen mit MMR (3850 ms).

Menthol (2- 1000 μ M) wurde im Test für 10 s + 150 ms vorappliziert und direkt daran anschließend für 500 ms mit dem Agonisten koappliziert. Die Substanzapplikation erfolgt über eine 8 in 1 Quarzglas-Kapillare mit einer Spitze von 100 μ m Innendurchmesser, die während des Experiments via Mikromanipulator (Luigs & Neumann) dicht an die zu untersuchenden Zelle gebracht wurde. Somit wurde erreicht, dass die Zelle während der Substanzapplikation völlig von der zu untersuchenden Lösung umspült wird. Das Druckapplikationssystem ermöglichte es uns, im ms-Bereich genau zu applizieren (Geschwindigkeit siehe 4.5.5). Die zu applizierenden Agonist/Modulator-Lösungen wurden täglich aus entsprechenden Stammlösungen frisch hergestellt.

4.5.3 Applikationsprotokoll bei dem Menthol erst nach Beginn der Agonist-Applikation eingewaschen wird (siehe Ergebnisse 5.2.1)

Das Protokoll bestand aus einer 800 ms lang dauernden ACh-Applikation, welche sich aus drei Abschnitten zusammensetzte (Abb. 8).

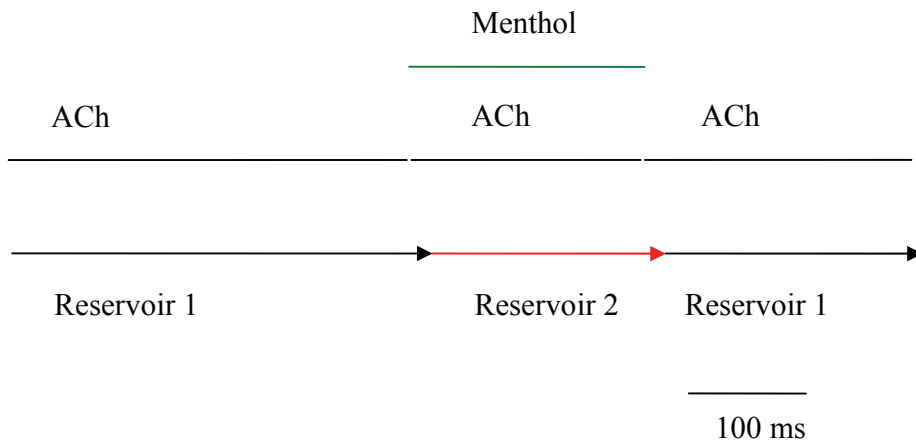


Abbildung 8: Schematisierte Darstellung des Applikationsprotokolls zur Untersuchung des Wirkmechanismus von Menthol auf nAChRs.

Die Reservoire (1, 2) des Perfusionssystems enthielten die jeweils oberhalb der Balken angegebenen Lösungen. Reservoir 3 (nicht gezeigt) war mit derselben Lösung wie Reservoir 1 gefüllt und diente als Kontrolle im Vergleich zu Reservoir 2.

Für 400 ms wurde nur ACh appliziert, dann folgte für 200 ms ein Gemisch von ACh-Menthol, danach schloss sich erneut eine 200 ms dauernde ACh-Applikation an. Dazu erfolgte ein Wechsel zwischen Lösungen aus zwei Reservoiren: Reservoir 1 enthielt ACh, Reservoir 2 enthielt das ACh/Menthol-Gemisch. Die beim Vollziehen des Lösungswechsels (Reservoir 1, Reservoir 2, Reservoir 1) ausgelösten, durch Druckänderung bedingten Änderungen der Amplitude wurden evaluiert. Dazu wurde ein weiteres Reservoir (Reservoir 3), welches dieselbe Lösung wie Reservoir 1 enthielt, verwendet und ein Lösungswechsel zwischen Reservoir 1 und Reservoir 3 vorgenommen (Kontrolle). Ein solcher Evaluationslauf erfolgte vor jedem Experiment. Die während der meisten Kontrollapplikationen beobachteten Änderungen der Stromamplitude sind möglicherweise auf geringe Unterschiede im Durchsatz der verwendeten Ventile zurückzuführen, sodass die gewünschte Konzentration der Testsubstanz an der Zelle bereits etwas früher oder auch erst später erreicht wurde.

4.5.4 Anwendung eines Blockers muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren

In Kontrolleexperimenten testeten wir den Einfluss einer auf mAChRs saturierend wirkenden Konzentration von Atropin (0,5 μ M) auf Nikotin-induzierte Stromantworten. Dazu wurden die

Zellen für 10 s mit Atropin vorinkubiert. In Gegenwart von Atropin beobachteten wir eine Reduktion des Nikotin-induzierten Stromes um $17,1 \pm 6,8\%$ ($n = 5$). Da mAChRs in trigeminalen Neuronen bisher nicht nachgewiesen werden konnten (Lazarov, 2002), handelt es sich bei der beobachteten Inhibition der Nikotin-induzierten Ströme um einen unspezifischen Effekt des Atropins. Daher wurde auf die gleichzeitige Anwesenheit eines Blockers mAChRs (Atropin) während der Experimente verzichtet.

4.5.5 Geschwindigkeit des Druckapplikationssystems

Als Grundvoraussetzung, um die biophysikalischen Eigenschaften schnell aktivierender Liganden-gesteuerten Ionenkanäle charakterisieren zu können, sollte das Applikationssystem im Idealfall die Transmitterübertragung an der Synapse imitieren. Dort findet eine Konzentrationsänderung am Rezeptor in $< 500 \mu\text{s}$ statt. Für das verwendete Perfusionssystem ALA-VM8 wurde daher die maximale Geschwindigkeit des Lösungsaustauschs bestimmt. Je nachdem, wie schnell der Agonist an den Ionenkanal gebracht/von der Rezeptorumgebung entfernt werden kann, umso präziser können die individuellen Eigenschaften des untersuchten Rezeptors (Kinetik der Aktivierung/Desensitisierung) studiert werden. Voraussetzung für einen schnellen Lösungsaustausch ist die optimale Positionierung der Zelle gegenüber dem Auslass der Perfusion. Für die Tests wurde die Anordnung vereinfacht, indem die Zelle durch die offene Patchpipettenspitze simuliert wurde. Die Geschwindigkeit des Lösungsaustausches an der offenen Pipettenspitze wurde in der Ganzzell-Konfiguration als Stromänderung des Liquid-Junction-Potentials bestimmt. Die verwendete interne Lösung war 150 mM KCl und das abwechselnde Einwaschen zweier Lösungen mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen imitierte das Einwaschen des Agonisten (Abb. 9).

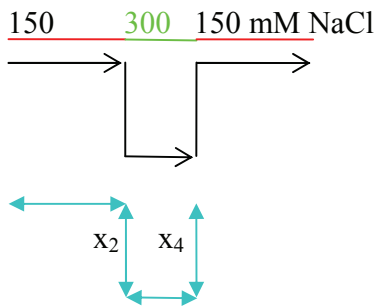


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Applikationsprotokolls zur Bestimmung der Geschwindigkeit eines Lösungswechsels.

Um die Geschwindigkeit des Lösungswechsels durch das Applikationssystem zu bestimmen, wurden Testlösungen unterschiedlicher Konzentration vor der Öffnung einer Ableitelektrode appliziert. Die Geschwindigkeit wird aus der Änderung des Eingangswiderstands der Ableitelektrode ermittelt. Die vertikalen Pfeile illustrieren die Zeitbereiche (x_2 , x_4), in denen ein Lösungswechsel stattfand und entsprechen den kinetischen Parametern (10-90% bzw. 90-10% Zeit).

Der Unterschied der Pipettenpotentiale (Liquid-Junction-Potentials) zwischen Lösung 1 (150 mM NaCl) = 4,4 mV und Lösung 2 (300 mM NaCl) = -2,7 mV ($T = 25^\circ\text{C}$, Ag/AgCl Referenzelektrode) ermöglichte uns die Detektion einer Stromänderung (Spannungsklemme). Abb. 10 zeigt repräsentative Stromspuren für eine 500 ms dauernde Applikation. Die Kinetik des Lösungsaustauschs wurde aus dem Stromanstieg 10-90% für Beginn und 90-10% für das Ende des Testpulses ermittelt. Die minimalen/maximalen Zeiten beim Anschalten des Testpulses waren 11/55 ms, der Mittelwert (x_2) betrug $28,4 \pm 16,1$ ms, die für das Abschalten 51/145 ms, mit einem Mittelwert (x_4) von $93,8 \pm 34,6$ ms (jeweils $n = 7$). Die unterschiedlichen Werte für die Geschwindigkeit der Anstiegs- und Abfallzeit sind durch die Apparatur bedingt. Ursache ist die Geometrie der Applikationspipette, deren Anfang aus 8 Quarzkapillaröffnungen besteht, die in den gemeinsamen Perfusionskanal (Spitze von 100 μm Innendurchmesser) münden (für weitere Details siehe: <http://www.alascience.com>). Theoretisch sollte mit diesem Aufbau der Lösungsaustausch sowie die Schalteigenschaften der verwendeten Steuerventile für alle Kanäle gleich schnell vonstatten gehen, allerdings beobachteten wir die oben beschriebenen Variationen in der Schalttechnik. Die ermittelten Werte zeigen, dass mit dem eingesetzten Applikationssystem kinetische Eigenschaften von Liganden-gesteuerten Rezeptoren im Zeitbereich >50 ms sicher charakterisiert werden können.

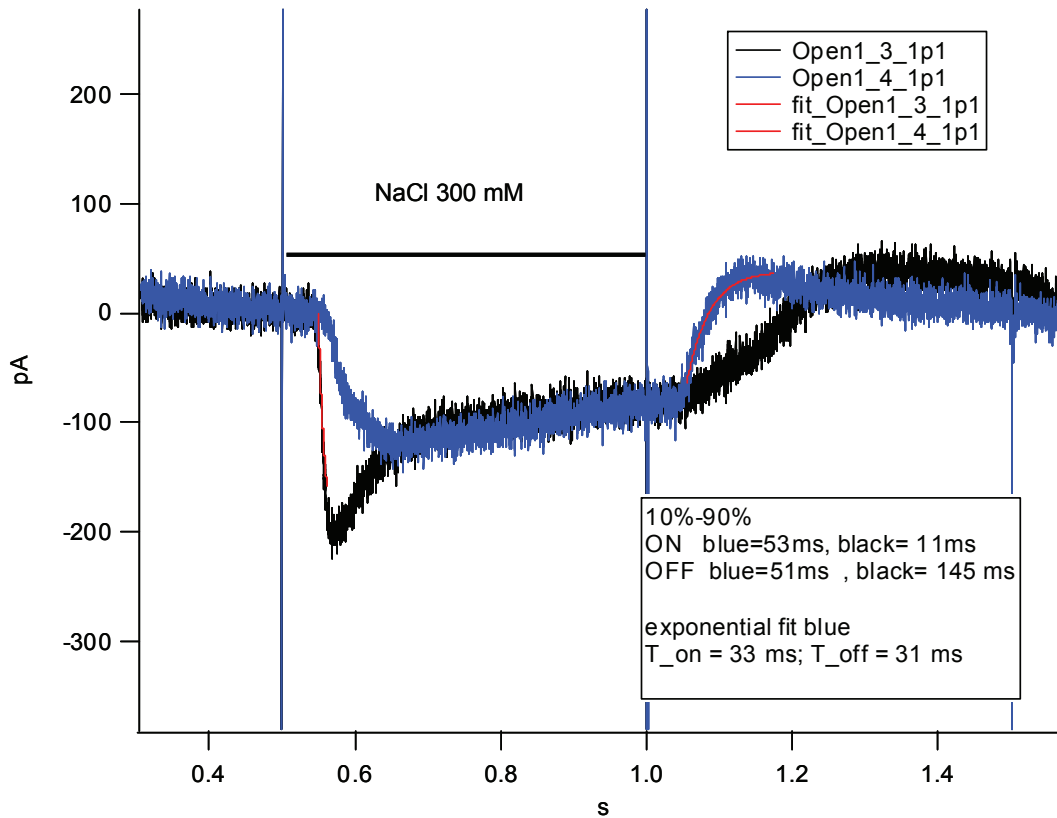


Abbildung 10: Experimentelle Bestimmung der Geschwindigkeit des Lösungswechsels.

Änderungen des Pipettenstromes resultieren während des Lösungswechsels (Applikation von NaCl 300 mM) in der Umgebung der Pipettenspitze. Die Stromspuren zeigen die kinetischen Eigenschaften des Applikationssystems für die schnellste bzw. langsamste ON-/OFF-Applikationsphase.

4.5.6 Auswertung der Patch-Clamp-Daten

4.5.6.1 Auswertung der Daten whole cell-Modus

4.5.6.1.1 Auswertung der Stromamplituden

Die Analyse der makroskopischen Ströme wurde sowohl mit der Pulse und PulseFit Software (HEKA Elektronik) als auch mit GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) vorgenommen. Mit Pulse und PulseFit wurden die Stromamplituden gemessen.

Zum Erstellen von Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden die Stromamplituden im GraphPad Prism auf die zellindividuelle Maximalantwort (größte im jeweiligen Experiment aufgetretene Amplitude, 100%) normalisiert und gegen den dekadischen Logarithmus der Agonist-/Mentholkonzentration aufgetragen (Einheit M). Es handelt sich in diesem Zusammenhang also um gepoolten Daten, denn es war nicht möglich, für jede individuelle Zelle eine komplette Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu erstellen, was darin begründet liegt, dass die Zellen im whole cell-Modus keine lang genug anhaltende Stabilität aufwiesen. Beim Erstellen der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Menthol diente die Amplitude der Zell-individuellen Nikotin-Kontrolle in Abwesenheit von Menthol als Maximalantwort. Mit GraphPad Prism wurde über eine nichtlineare Anpassung (variabler Anstieg) mit Hilfe der Hill-Gleichung der EC_{50} -/ IC_{50} -Wert, sowie der Hillkoeffizient berechnet.

$$y = \frac{y_{\max}}{\left[1 + \left(\frac{EC_{50}}{x}\right)^n\right]} \quad \text{oder} \quad y = y_{\max} - \frac{y_{\max}}{\left[1 + \left(\frac{IC_{50}}{x}\right)^n\right]}$$

y = normalisierte Antwort bei einer bestimmten Agonist/Antagonist-Konzentration

y_{\max} = Maximalantwort

x = bestimmte Agonist/Antagonist-Konzentration

EC_{50} , IC_{50} = x-Wert, der eine halbmaximale Antwort erzielt, gleichzeitig Wendepunkt der sigmoidalen Hill-Kurve

n = hier Hillkoeffizient

Zu jedem EC_{50} -Wert wurde auch der jeweilige negative dekadische Logarithmus des EC_{50} -Wertes (pEC_{50}) angegeben (analog IC_{50}/pIC_{50}).

4.5.6.1.2 Auswertung der Stromkinetik

Für die Analyse der Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetik wurden PulseFit (Sweep Fit) und GraphPad Prism verwendet. Die Zeitkonstanten wurden unter Annahme eines exponentiellen Verlaufs bestimmt. Die dabei verwendete Funktion bezogen auf die Desensibilisierung lautet:

$$y = A + y_0 \times e^{\left(\frac{-x}{\tau_{\text{Des}}}\right)}$$

A = Konstante

y_0 = Reststrom [pA] bei Beginn des Auswaschens

τ_{Des} = Zeitkonstante der Desensibilisierung [ms]

x = Zeit [ms]

Die ermittelten τ_{Des} -Werte wurden als Funktion der Agonist-Konzentration im GraphPad Prism aufgetragen, wobei die erhaltenen Zeitkonstanten auf die jeweils maximalen und minimalen Werte normalisiert wurden.

4.5.6.2 Auswertung der Einzelkanal-Ableitungen (single cell-Modus)

Zunächst wurden Abschnitte korrigiert, in denen Nullpunktverschiebungen der Grundlinie aufgetreten waren. Bereiche mit hoher Hintergrundaktivität (Aktivität anderer Ionenkanäle) oder Abschnitte mit multipler Kanalaktivität wurden nicht analysiert. Mit der QuB Software (www.qub.buffalo.edu) wurden Einzelkanal-Öffnungen (Ereignisse) automatisch detektiert und ausgewertet. Zur Detektion der Ereignisse wurde der Schwellenwert für die Öffnungszeit auf 0,08 ms festgesetzt (Colquhoun, 1995). Wir untersuchten die Gating-Charakteristika der nAChRs, indem wir die Öffnungen innerhalb von sogenannten Bursts analysierten. Ein Burst besteht aus einer Folge von hintereinander stattfindendem Öffnen und Schließen eines Kanals. Das Ende eines Bursts resultiert, wenn eine Kanalschließung eine bestimmte kritische Zeitdauer überschreitet, τ_{krit} betrug hier 30 ms. Nacheinander wurden gezielt Abschnitte analysiert, in denen mehr als fünf Ereignisse (Kanalöffnungen) enthalten waren. Offen- und Geschlossenzeit-Histogramme wurden erstellt, indem auf der Abszisse die logarithmierte Zeitdauer und auf der Ordinate die Quadratwurzel der Anzahl der beobachteten Ereignisse aufgetragen

wurden. Anschließend wurde die größte Wahrscheinlichkeit (Sigworth and Sine, 1987) mit TAC Fit (Bruxton) ermittelt, indem eine Summen-Exponentialfunktion durch das Histogramm gelegt und deren Parameter bestimmt wurden.

Die Einzelkanal-Leitfähigkeit (slope conductance) wurde bestimmt, indem unterschiedliche Haltepotentiale ($V_H = -90\text{mV}/-70\text{mV}/-50\text{mV}/-30\text{mV}$) angelegt, und die resultierenden Ströme aufgezeichnet und anschließend gegen die Spannung aufgetragen wurden (Daten nicht gezeigt). Der Anstieg $\frac{\Delta I}{\Delta U}$ einer Regressionsgeraden, die durch Öffnungsminima gezogen wird, entspricht der slope conductance, und der Schnittpunkt dieser Geraden mit der x-Achse entspricht dem Umkehrpotential (Daten nicht gezeigt).

5. Ergebnisse

5.1 Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) in trigeminalen Neuronen

5.1.1 Elektrophysiologische Eigenschaften Agonist-induzierter Ströme

Abb. 11 zeigt Beispiele von Strömen durch nAChRs verschiedener trigeminaler Neurone, die durch den Agonisten Nikotin (75 μ M) ausgelöst wurden. Es ist zu erkennen, dass der zeitliche Verlauf der Ströme während der 500 ms andauernden Applikation des Agonisten von Zelle zu Zelle stark variabel war. Mit dem für neuronale nAChRs nichtselektiven Antagonisten Mecamylamin (10 μ M) konnten diese Ströme fast vollständig blockiert werden $74,2 \pm 10,5\%$ ($n = 6$).

Die in Abb. 11 illustrierten Beispiele sind Grenzfälle für die zeitlichen Strömverläufe, wie sie jeweils nur in einigen Zellen zu beobachten waren. Die Kinetik der Aktivierung bzw. Desensibilisierung wurde unter Annahme eines monoexponentiellen Verlaufs bestimmt (siehe Material und Methoden 4.5.6.1.2).

Es wurden Ströme registriert, die sehr schnell aktivierten ($\tau_{\text{Aktiv}} = 15 - 41$ ms) und nach 500 ms bereits zu etwa 88% desensibilisiert waren (siehe Abb. 11 obere Stromspur). Einige Zellen wiesen auch Ströme auf, welche langsam aktivierten ($\tau_{\text{Aktiv}} > 50$ ms) und während der 500 ms andauernden Applikation auf maximal 40% ihrer Amplitude desensibilisierten. (siehe dazu Abb. 11 mittlere Stromspur). Weiterhin wurden Ströme registriert, die noch langsamer aktivierten ($\tau_{\text{Aktiv}} = 121 \pm 54$ ms) und innerhalb der 500 ms andauernden Applikation gar nicht oder auf maximal 5% ihrer Amplitude desensibilisierten (siehe Abb. 11, untere Stromspur).

Die in Abb. 11 gezeigten Grenzfälle der zeitlichen Stromverläufe sind vermutlich auf den homopentameren α_7 -nAChR-Subtyp (obere Stromspur), auf β_4 -enthaltende nAChR-Subtypen ($\alpha_3\beta_4$ oder $\alpha_4\beta_4$, untere Stromspur), oder auf $\alpha_4\beta_2$ - sowie $\alpha_3\beta_4$ -nAChR-Subtypen zurückzuführen. Am häufigsten wurden Ströme registriert, deren Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetik zwischen den beiden zuletzt beschriebenen Fällen lag (siehe auch Abb. 19). Bei einigen Zellen wurden Ströme beobachtet, welche ebenfalls innerhalb der 500 ms langen Nikotin-Applikation auf 5 bis 40% ihrer Amplitude desensibilisierten, jedoch zusätzlich eine

sehr schnell aktivierende Komponente aufwiesen. Diese Ströme registrierten wir in Zellen, welche vermutlich sowohl einen hohen Anteil des homopentameren α_7 -nAChR-Subtyps als auch die beschriebenen heteromeren nAChR-Subtypen exprimierten. Aufgrund der komplexen und variablen Desensitisierungskinetik wurde auf eine detaillierte Analyse der kinetischen Parameter verzichtet und nur der Grad der Desensitisierung in % der Maximalamplitude am Ende der Applikation bestimmt.

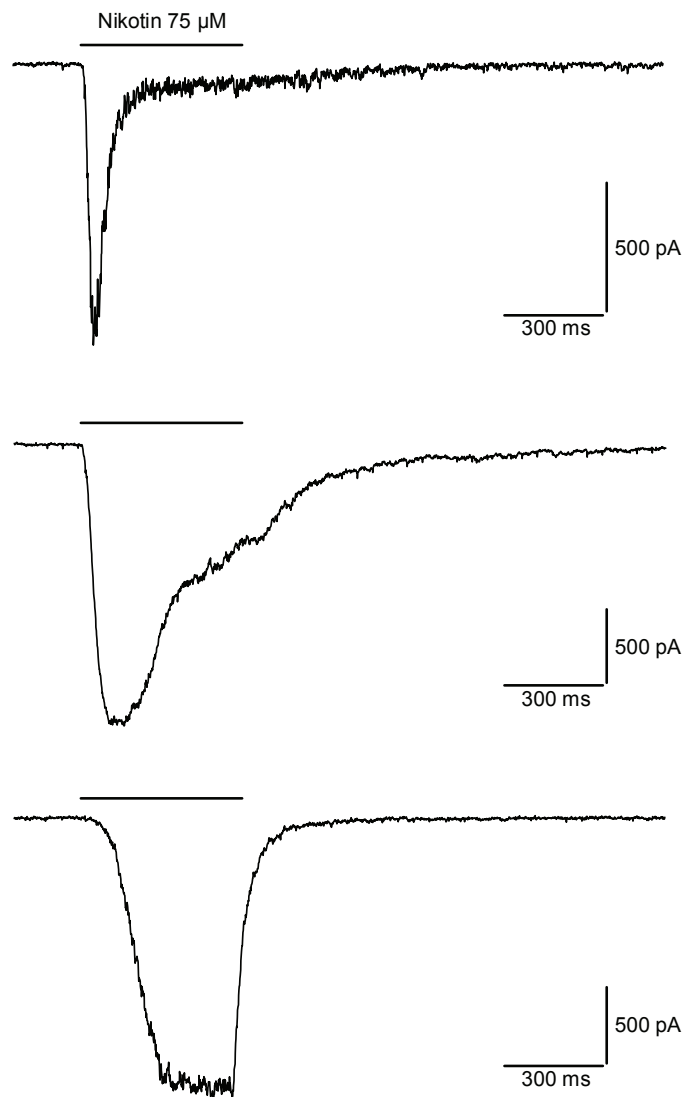


Abbildung 11: Variationen der Kinetik (-)Nikotin-induzierter Ströme in trigeminalen Neuronen.

Originalableitungen von drei Stromantworten durch nAChRs nach Applikation von (-)Nikotin ($75 \mu\text{M}$, horizontaler Balken). Die Ströme wurden von drei unterschiedlichen Zellen registriert. Sie repräsentieren das schnelle bzw. langsame kinetische Muster der Stromantworten (obere und untere Stromspur), wie es in dieser Form nur in wenigen Zellen beobachtet werden konnte. Die mittlere Stromspur repräsentiert ein weiteres kinetisches Muster mit langsamer Aktivierung sowie deutlich ausgeprägter Desensitisierung ($\approx 40\%$) innerhalb der 500 ms andauernden Nikotin-Applikation. Die Balken über den Stromspuren repräsentieren die Dauer der Nikotin-Applikation, $V_H = -90 \text{ mV}$.

Abb. 12 zeigt Nikotin-induzierte Stromantworten, die durch Applikation unterschiedlicher Nikotin-Konzentrationen induziert wurden. Die Amplituden der Nikotin-induzierten Ströme wurden mit Erhöhung der Konzentration größer. Sowohl Aktivierungs- als auch Desensitisierungskinetik dieser Ströme waren ebenfalls konzentrationsabhängig.

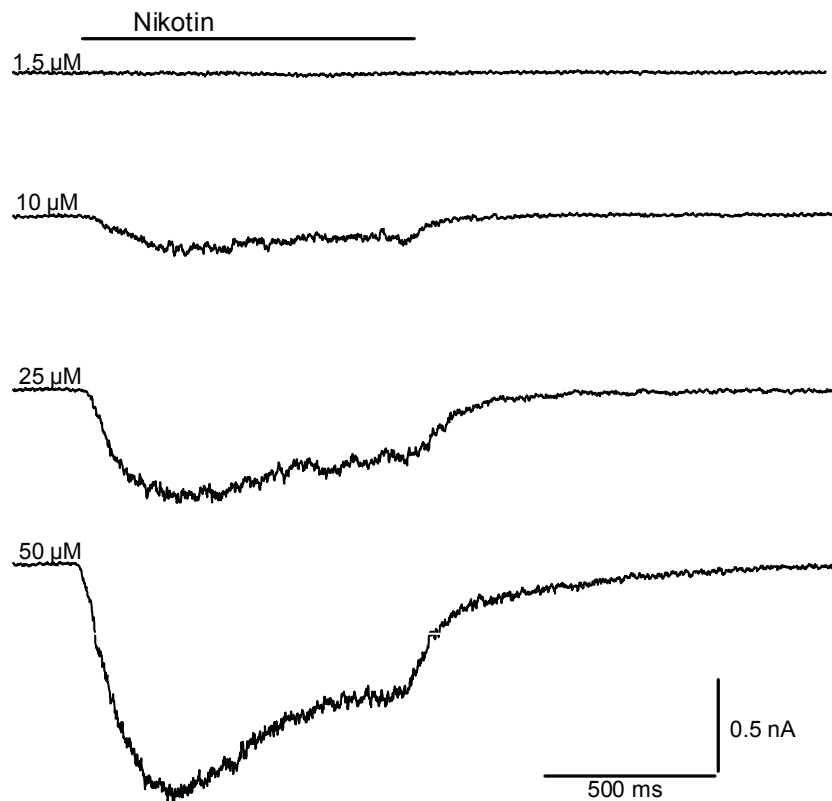


Abbildung 12: Gesamtzellströme durch nAChRs eines trigeminalen Neurons.

Die Stromantworten wurden während der Applikation von (-)Nikotin unterschiedlicher Konzentration (1,5 - 50 µM) aufgezeichnet. Der horizontale Balken kennzeichnet die Dauer der Applikation. Das Haltepotential betrug -90 mV.

So wurde die Zeitkonstante der Aktivierung (τ_{Aktiv}) mit zunehmender Konzentration (1,5 bis 200 µM) kleiner und der Strom zeigte eine stärkere Desensitisierung.

Es verkürzte sich z.B. die Zeitkonstante der Aktivierung (τ_{Aktiv}) von $211,1 \pm 103,6$ ms ($n = 8$) auf $48,5 \pm 10,0$ ms ($n = 4$), wenn die Nikotinkonzentration von 10 µM auf 200 µM erhöht wurde. Der im Vergleich zur Maximalamplitude des Gesamtstroms gemessene Anteil der Desensitisierung lag bei $17,7 \pm 14,2\%$ (10 µM Nikotin; $n = 6$) und erhöhte sich auf

$33,6 \pm 9,3\%$ (200 μM Nikotin; $n = 4$).

Wurde ACh (3 bis 500 μM) anstelle von Nikotin verwendet, waren die Zeitverläufe der Ströme mit denen vergleichbar, welche durch Nikotin in entsprechender effektiver Konzentration ausgelöst wurden (Abb. 13).

Die Amplitude und sowohl Aktivierungs- als auch Desensitisierungskinetik der durch ACh induzierten Stromantworten waren ebenfalls konzentrationsabhängig. Mit zunehmender ACh-Konzentration (3 – 500 μM) wurde die Zeitkonstante der Aktivierung (τ_{Aktiv}) kleiner und der an der Maximalamplitude des Gesamtstroms gemessene Anteil der Desensitisierung nahm zu.

So betrug z.B. bei einer ACh-Konzentration von 30 μM $\tau_{\text{Aktiv}} = 195,4 \pm 85,6$ ms ($n = 4$) und verkürzte sich bei einer ACh-Konzentration von 300 μM auf $81,5 \pm 39,9$ ms ($n = 10$). Der im Vergleich zur Maximalamplitude des Gesamtstroms gemessene Anteil der Desensitisierung lag bei $7,0 \pm 6,1\%$ (30 μM ACh; $n = 4$) und erhöhte sich auf $27,1 \pm 13,1\%$ (300 μM ACh; $n = 5$).

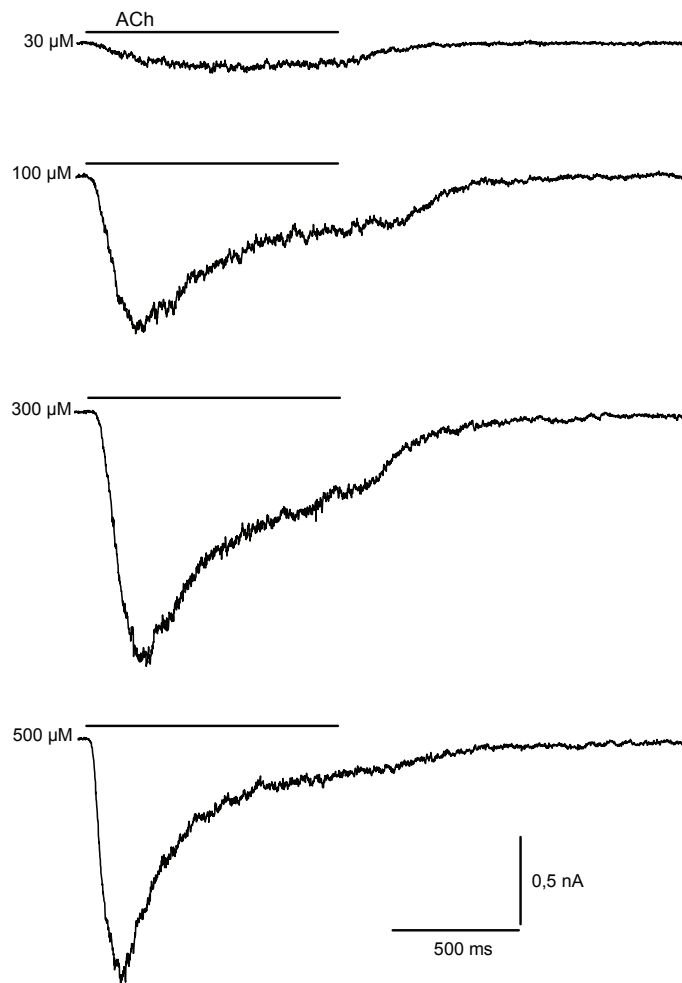


Abbildung 13: Gesamtzellströme durch nAChRs eines trigeminalen Neurons.

Die Stromantworten wurden während der Applikation von Acetylcholin unterschiedlicher Konzentration (30 - 500 μM) aufgezeichnet. Der horizontale Balken kennzeichnet die Dauer der Applikation. Das Haltepotential betrug -90 mV.

Abb. 14 illustriert Stromantworten, welche durch (±)Epibatidin (5 bis 200 nM), einen im Vergleich zu Nikotin und ACh potenteren nAChR-Agonisten (Alkondon and Albuquerque, 1995; Gerzanich et al., 1995), induziert wurden.

Aktivierung und Desensibilisierung der Epibatidin-induzierten Ströme waren im Vergleich zu ACh- und Nikotin-induzierten Strömen deutlich verlangsamt. Die Amplituden sowie die Kinetik der Epibatidin-induzierten Ströme waren wie im Falle von Nikotin und ACh

konzentrationsabhängig. Bei einer Epibatidinkonzentration von 30 nM betrug τ_{Aktiv} $338,1 \pm 80,2$ ms ($n = 15$) und verkürzte sich bei einer Konzentrationen von 300 nM auf $105,4 \pm 59,9$ ms ($n = 11$). Für den Hauptteil der Zellen (44 von $n = 54$) konnte während der 1 s andauernden Applikation keine Desensitisierung ermittelt werden.

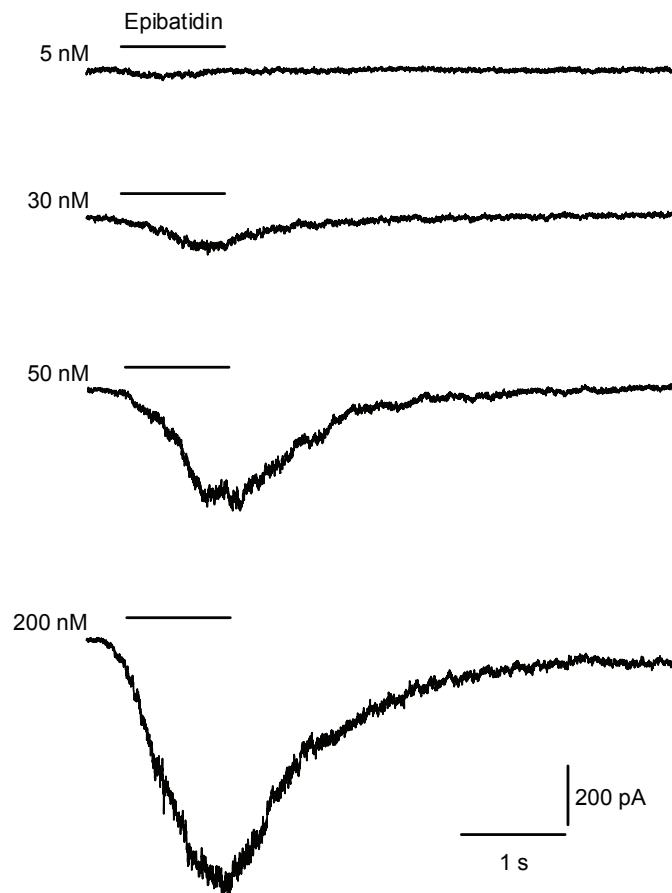


Abbildung 14: Gesamtzellströme durch nAChRs eines trigeminalen Neurons.

Die Stromantworten wurden während der Applikation von (\pm)Epibatidin unterschiedlicher Konzentration (5 - 200 nM) aufgezeichnet. Der horizontale Balken kennzeichnet die Dauer der Applikation. Das Haltepotential betrug -90 mV.

5.1.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Agonisten Nikotin, Acetylcholin und Epibatidin

Wie in den Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Abb. 15 gezeigt ist, hatte Epibatidin an nAChRs die höchste Potenz ($EC_{50} = 63,6 \text{ nM}$, $pEC_{50} = 7,20 \pm 0,16$). Für Nikotin wurde ein $EC_{50} = 40,1 \text{ } \mu\text{M}$, $pEC_{50} = 4,40 \pm 0,04$ bestimmt. ACh wies die geringste Potenz auf ($EC_{50} = 75,7 \text{ } \mu\text{M}$, $pEC_{50} = 4,12 \pm 0,05$).

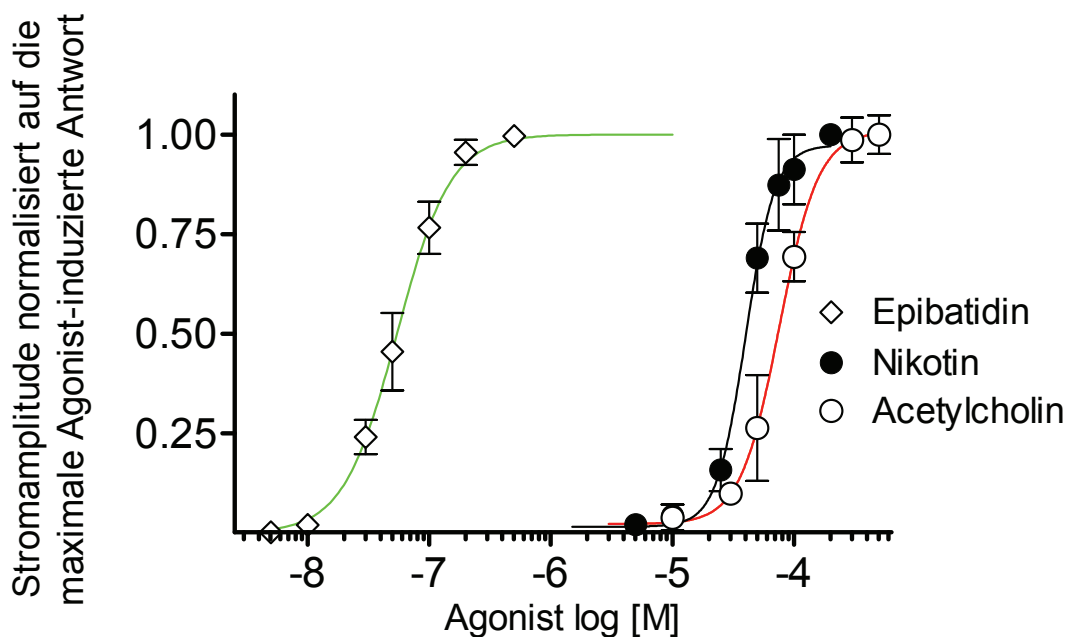


Abbildung 15: Konzentrations-Effekt-Kurven für nAChRs in trigeminalen Neuronen mit den Agonisten (\pm)Epibatidin, (-)Nikotin, Acetylcholin.

Die Datenpunkte (Mittelwert \pm Standardabweichung) wurden aus den Stromamplituden der Agonist-induzierten Antworten einzelner Zellen erstellt. Als 100% Bezugswerte dienten die im jeweiligen Experiment auftretenden maximalen Stromantworten. Jede Testkonzentration wurde an $n = 3-16$ Zellen untersucht. Die EC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten wurden ermittelt, indem dem jeweiligen Datensatz eine logistische Funktion angepasst wurde (siehe 4.5.6.1.1). EC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten für (\pm)Epibatidin, (-)Nikotin und ACh sind 63.6 nM , 1.6 ; $40.1 \text{ } \mu\text{M}$, 3.6 ; $75.7 \text{ } \mu\text{M}$, 2.7 .

5.2 Mentholwirkung auf Ströme durch nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Um zu untersuchen, welche Wirkung Menthol auf Ströme durch nAChRs hat, wurde Menthol zusammen mit dem Agonisten auf trigeminale Neurone appliziert (Koapplikation). Abb. 16 zeigt durch ACh induzierte Stromantworten ($100 \mu\text{M}$) vor, während und nach der Koapplikation. Menthol ($100 \mu\text{M}$) reduzierte diese Ströme (Reduktion um $37,1 \pm 20,4\%$ $n = 3$). Dieser Effekt war nach 3 min Auswaschen von Menthol zu $\approx 90\%$ reversibel. Der Zeitverlauf der Ströme war durch Menthol unbeeinflusst.

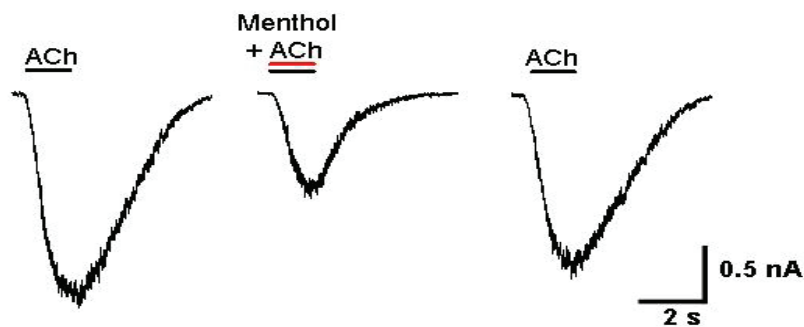


Abbildung 16: Der in einem trigeminalen Neuron auftretende Acetylcholin-induzierte Strom ($100 \mu\text{M}$) wird durch Koapplikation von ACh mit Menthol ($100 \mu\text{M}$) reduziert.

Originalableitungen von Stromantworten durch nAChRs unter Kontrollbedingungen (ACh) oder bei Koapplikation von ACh/Menthol (mittlere Stromspur). Die Ströme wurden in einem Zeitintervall von jeweils 180 s ausgelöst. Die horizontalen Balken zeigen die Dauer der ACh- (schwarzer Balken) sowie der Menthol-Applikation (roter Balken) an.

$V_H = -90 \text{ mV}$

5.2.1 Abhängigkeit der Mentholwirkung von Zeitpunkt und Dauer der Applikation

Um herauszufinden, ob die Mentholwirkung vom Zeitpunkt der Applikation abhängig ist, verwendeten wir verschiedene Applikationsprotokolle. Dabei wurde Menthol zusätzlich zur oben beschriebenen Koapplikation entweder vor der Agonist-Applikation, oder später während der Agonist-Applikation eingewaschen (siehe Methoden 4.5.3).

Abb. 17 veranschaulicht den Effekt von Menthol, wenn es erst 400 ms nach Beginn der

Ergebnisse

Agonist-Applikation (in diesem Falle ACh 100 μ M) für 200 ms eingewaschen wurde. Die Amplitudenreduktion durch Menthol betrug bei dieser ACh-Konzentration $6,3 \pm 4,0\%$ ($n = 6$). Demgegenüber erhöhte sich die Amplitudenreduktion durch Menthol bei einer ACh-Konzentration von 200 μ M auf $10,1 \pm 5,1\%$ ($n = 14$).

Die bei diesem Experiment beobachtete Amplitudenreduktion ist deutlich geringer, als sie bei der Koapplikation von ACh und Menthol beobachtet wurde (siehe Abb. 16).

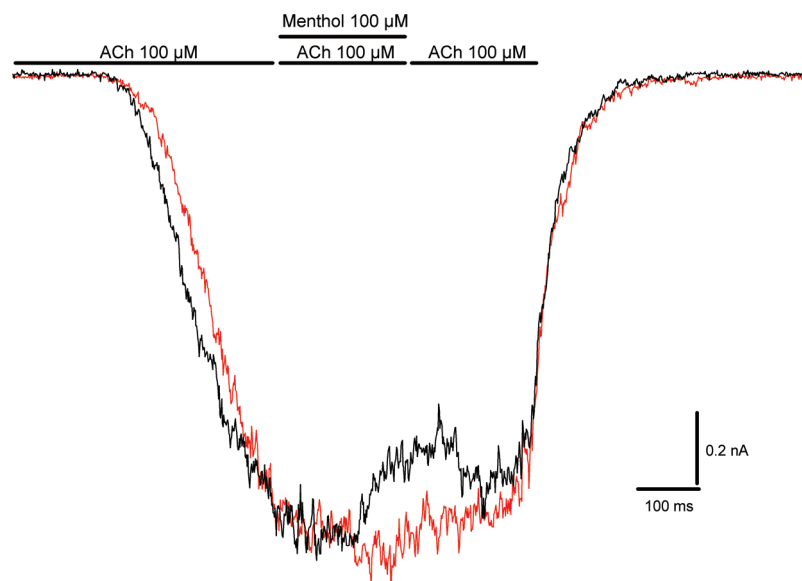


Abbildung 17: Menthol führt bei kurzem Einwaschen während der Agonist-Applikation zu einer schwachen Hemmung der Ströme durch nAChRs im Vergleich zur Koapplikation.

Stromantworten durch nAChRs unter Kontrollbedingungen (ACh 100 μ M, rote Spur) oder mit kurzer (200 ms) Koapplikation von ACh/Menthol (schwarze Spur). Die kurze Koapplikation mit Menthol führte zu einer reversiblen Verringerung des Agonist-induzierten Einwärtsstromes.

Im Vergleich zur Koapplikation war die Mentholwirkung deutlich größer, wenn Menthol bereits 10 s vor dem Agonisten appliziert wurde. Wenn ACh (100 μ M) mit Menthol (100 μ M) koappliziert wurde, ergab sich eine Amplitudenreduktion der Stromantworten um $37,1 \pm 20,4\%$, wohingegen die zusätzliche 10 s Präinkubation mit Menthol die ACh-induzierte Antwort um $66,1 \pm 8,2\%$ reduzierte (beides $n = 3$, t-Test, $p > 0,05$; Daten nicht gezeigt).

Ähnliche Effekte wurden mit Nikotin als Agonist beobachtet. So ergab sich für die Koapplikation von Menthol (100 μ M) und Nikotin (75 μ M) eine Reduktion der Stromantwort um $31,6 \pm 8,0\%$ ($n = 4$), und mit 10 s Präinkubation erhöhte sich die Reduktion der Nikotin-induzierten Antwort auf $52,3 \pm 8,0\%$ ($p < 0,05$; ANOVA, $n = 4$).

Eine weitere Verlängerung der Menthol-Vorinkubation von 10 s auf 180 s führte zu keiner signifikanten Verstärkung der Inhibition des Nikotin-induzierten Stromes ($41,8 \pm 6,6\%$; $p > 0,5$; ANOVA; $n = 3$)

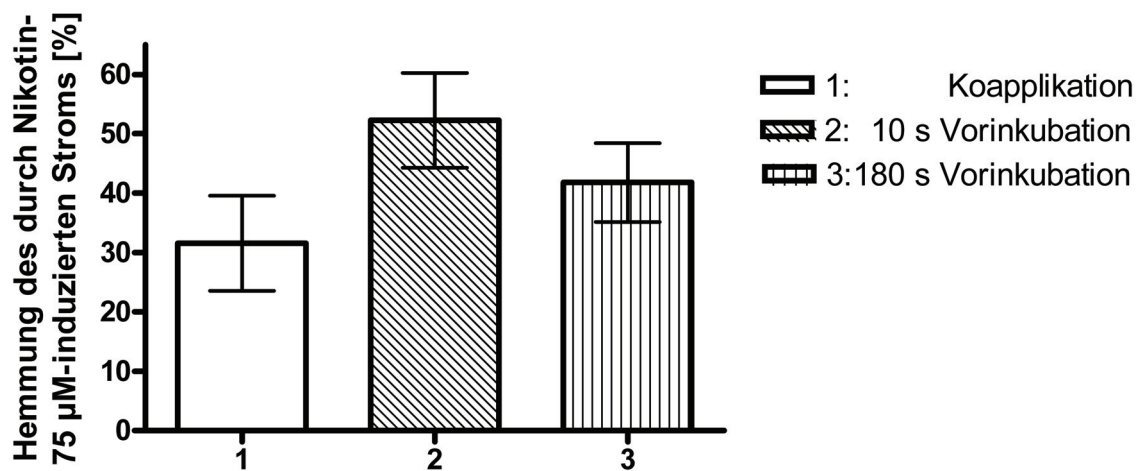


Abbildung 18: Vorinkubation mit Menthol (100 μ M) erhöht im Vergleich zur Koapplikation die Hemmung des Nikotin-induzierten Stromes (75 μ M) durch Menthol (100 μ M) in trigeminalen Neuronen.

Eine 10 s Vorinkubation mit Menthol führte im Vergleich zur Koapplikation von Menthol/Nikotin (offener Balken) zu einer signifikant erhöhten Inhibition der Nikotin-induzierten Stromantwort ($p = 0,016$, ANOVA). Die Verlängerung der Menthol-Vorinkubation von 10 s auf 180 s führte zu keiner signifikanten Verstärkung der Inhibition des Stromes durch nAChRs ($p > 0,05$; ANOVA).

5.2.2 Abhängigkeit der Mentholwirkung von der Konzentration

Die Inhibition der Nikotin-induzierten Ströme durch Menthol wurde für den Menthol-Konzentrationsbereich 2 bis 1000 μM untersucht. Um die größte Wirkung zu erreichen, wurde Menthol 10 s vor der Koapplikation mit Nikotin (75 μM) eingewaschen. Abb. 19 zeigt die Inhibition der Nikotin-induzierten Ströme durch Menthol für drei verschiedene Mentholkonzentrationen. Die Applikation von Menthol löste in 85% der untersuchten trigeminalen Neuronen selbst Einwärtsströme aus ($n = 86$; bei 25°C; Abb.19 A, rote obere Stromspuren), welche vermutlich auf die Aktivierung von TRPM8-Rezeptoren zurückzuführen sind (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Diese Ströme hatten keinen Einfluss auf Nikotin-induzierte Ströme. Es bestand keine Korrelation zwischen der Größe des Menthol-induzierten Einwärtsstromes und der durch Menthol vermittelten Inhibition.

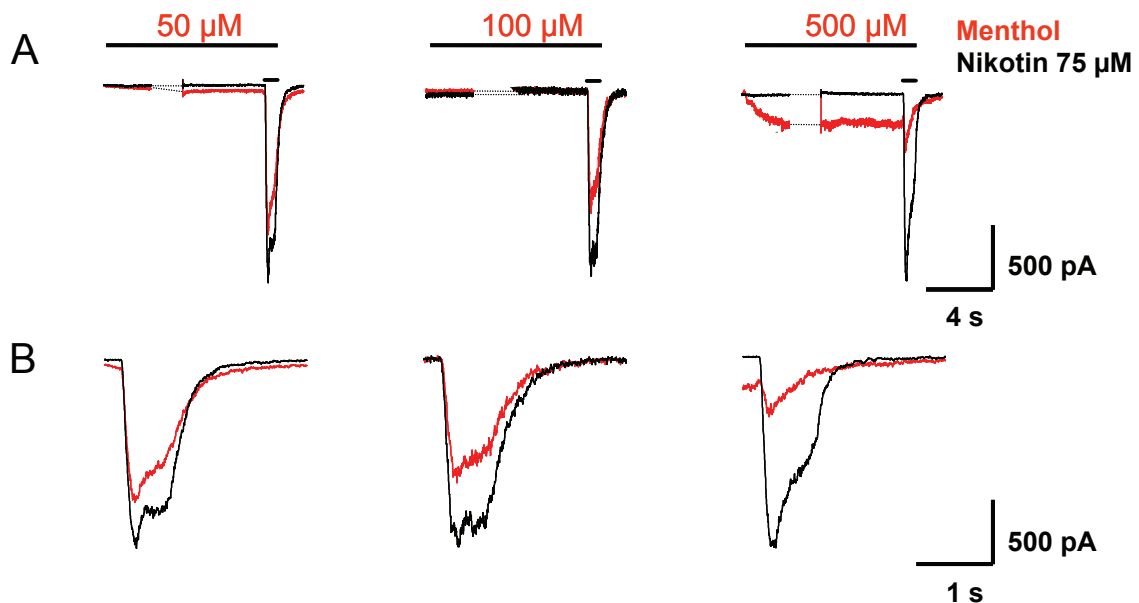


Abbildung 19: (-)Menthol hemmt konzentrationsabhängig (-)Nikotin-induzierte Ströme in trigeminalen Neuronen.

A: Originalableitungen von Stromantworten durch nAChRs. Nach einer 10 s Präinkubation mit MMR (Kontrolle) bzw. Menthol (Test) erfolgte die Applikation von Nikotin (Kontrolle) bzw. die Koapplikation von Menthol/Nikotin (Test). Schwarze Stromspuren sind Kontrollapplikationen, rote Stromspuren sind Testapplikationen.

Die verwendeten (-)Menthol-Konzentrationen sind über jeder Bildspur angezeigt. (-)Menthol verursachte während der Applikation Einwärtsströme (siehe rote Stromspuren).

Die Stromänderungen bei Messung des Membranwiderstands während der Präinkubation (gepunktete Linie) wurden zur übersichtlicheren Darstellung entfernt.

B: Die letzten 3 s der Aufnahmen wurden noch einmal auf einer breiteren Zeitskala dargestellt.

Abb. 20 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Mentholwirkung auf Nikotin-induzierte Ströme. Den Datenpunkten wurde eine Hill-Funktion angepasst. Es ergab sich für Menthol ein IC_{50} -Wert von $111,2 \mu\text{M}$ ($pIC_{50} = 3,95 \pm 0,13$) und ein Hillkoeffizient von $-1,1$. Diese Ergebnisse lassen auf die Präsenz einer saturierbaren Bindungsstelle für Menthol am nAChR schließen.

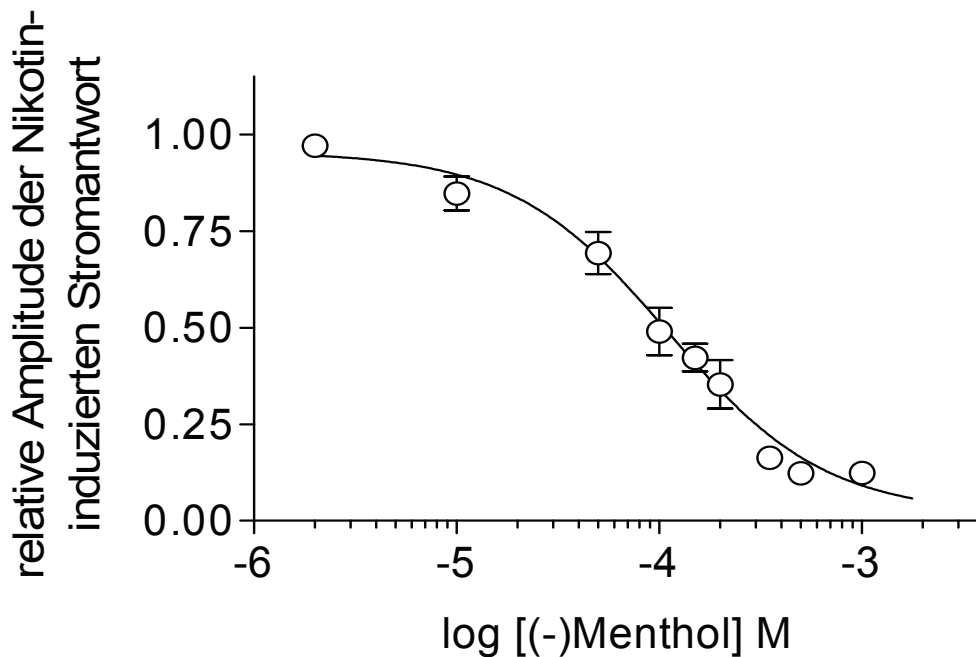


Abbildung 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurve für (-)-Menthol an trigeminalen Neuronen unter Verwendung des Agonisten Nikotin.

Die Datenpunkte (Mittelwert \pm Standardfehler) entsprechen den residualen Antworten (Stromamplituden) einzelner Zellen auf Nikotin ($75 \mu\text{M}$) bei Vor- und Koapplikation von Menthol in unterschiedlicher Konzentration. Als 100% Bezugswerte (Kontrollen) dienten die im jeweiligen Experiment mit Nikotin ($75 \mu\text{M}$) erhaltenen Stromantworten. IC_{50} -Wert und Hillkoeffizient wurden durch Anpassung einer logistischen Funktion an die Daten ermittelt (siehe 4.5.6.1.1). IC_{50} -Wert und Hillkoeffizient betragen $111,2 \mu\text{M}$ und $-1,1$. Jede Mentholkonzentration wurde an jeweils ($n = 3-13$) Zellen getestet.

5.2.3 Wirkung von Menthol auf Ströme durch einzelne nAChRs

Um weitere Information über den Wirkmechanismus von Menthol auf nAChRs zu erhalten wurden Einzelkanalströme in der cell-attached-Konfiguration in trigeminalen Neuronen analysiert. Diese Methode erlaubt es im Gegensatz zur Ganzzelleableitung, detaillierte Information über die Leitfähigkeit und das Schaltverhalten einzelner nAChRs zu erhalten.

In Abb. 21 sind Ableitungen von Strömen durch jeweils einen einzelnen nAChR dargestellt. Diese wurden durch Nikotin (75 μM ; oberer Stromspur) oder durch Menthol/Nikotin (100/75 μM ; untere Stromspur) ausgelöst, welche jeweils Bestandteil der Pipettenlösung waren. Nikotin führte zu kurzen, wiederholten Kanalöffnungen („Bursts“), welchen längere Pausen folgten. Dieses charakteristische „Burst“-Verhalten der nAChRs wurde bereits 1978 von Neher und Steinbach beschrieben (Neher and Steinbach, 1978). In der Gegenwart von Menthol (100 μM) veränderte sich das Schaltverhalten des nAChR. Die Anzahl der Kanalöffnungen im gleichen Zeitintervall war deutlich reduziert und die Pausen zwischen den Kanalöffnungen waren deutlich verlängert. Der Einzelkanalstrom in Gegenwart von Menthol/Nikotin war signifikant erhöht ($p < 0.001$) und hatte eine Amplitude von -7.25 ± 0.86 pA ($n = 3982$) im Vergleich zu -6.83 ± 0.91 pA ($n = 5541$) unter Kontrollbedingungen (Nikotin allein). Da diese Messungen nur bei einem Membranpotential ($V_H = -70$ mV) durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Änderung der Einzelkanalamplitude auf einen spannungsabhängigen Effekt von Menthol am nAChR zurückzuführen ist. Die Analyse des Schaltverhaltens des nAChR ergab, dass Menthol sowohl Offen- als auch Geschlossenzeiten der aktivierten nAChRs beeinflusst. Die Offen- und Geschlossenzeit-Histogramme aus jeweils drei Versuchen sind in Abb. 22 illustriert.

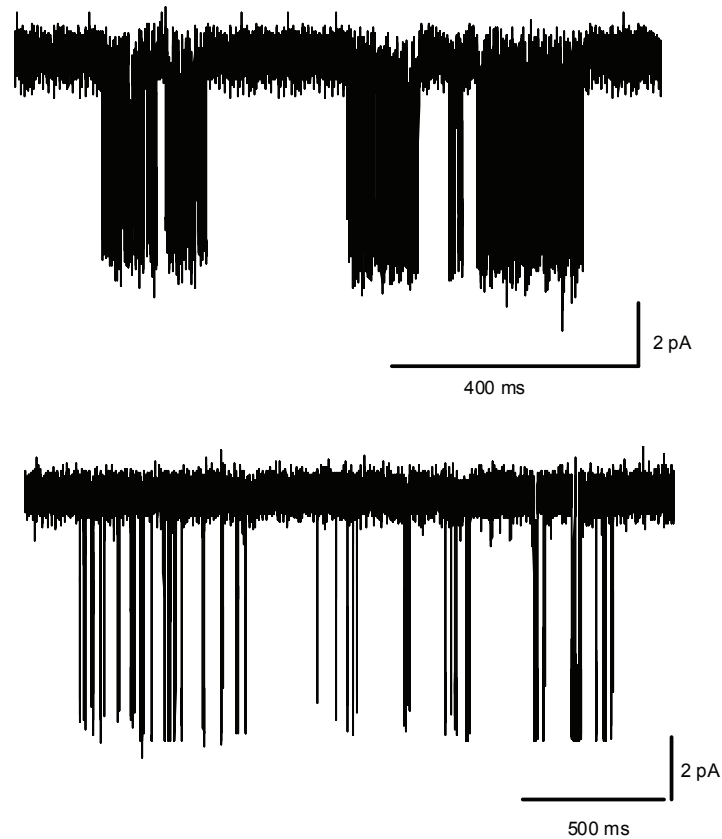


Abbildung 21: Einzelkanalströme von nAChRs in Anwesenheit von Nikotin ($75 \mu\text{M}$, oberer Teil) bzw. Nikotin ($75 \mu\text{M}$)/Menthol ($100 \mu\text{M}$; unterer Teil).

Die Aktivierung des nAChR tritt in Clustern von schnellen Einzelkanalöffnungen (Bursts) auf, unterbrochen werden diese Bursts durch länger anhaltende Pausen. In Anwesenheit von Nikotin ($75 \mu\text{M}$)/Menthol ($100 \mu\text{M}$) war die Aktivität des nAChRs sichtbar unterbrochen. Die Stromspuren wurden für die Darstellung mit 3 kHz gefiltert. Das Haltepotential betrug -70 mV .

In der Gegenwart von Menthol kommt es zu einer Verkürzung der Öffnungsdauer der nAChRs, was als Linksverschiebung des Offenzeit-Histogramms in Abb. 22 (linke Seite) sichtbar ist. Die mittlere Zeitkonstante für die Kanalöffnungen betrug $0,58 \text{ ms}$ für Nikotin und $0,22 \text{ ms}$ für Menthol/Nikotin.

Des Weiteren kommt es zu einer Verlängerung der Geschlossenzeiten in der Gegenwart von Menthol. Dies stellt sich in Abb. 22 (rechte Seite) als Rechtsverschiebung des Geschlossen-

zeit-Histogramms sowie durch eine Zunahme längerer Geschlossenzeiten als zweiter Gipfel in der Verteilung dar. In Gegenwart von Nikotin beträgt die mittlere Zeitkonstante für die Kanalgeschlossenzeit 0,42 ms (91,3%) sowie 64,9 ms (8,6%). In Gegenwart von Menthol war die mittlere Zeitkonstante für die Kanalgeschlossenzeit deutlich verlängert, und betrug 1,44 ms (54,1%), 19,5 ms (21,9%) sowie 295,3 ms (14,9%).

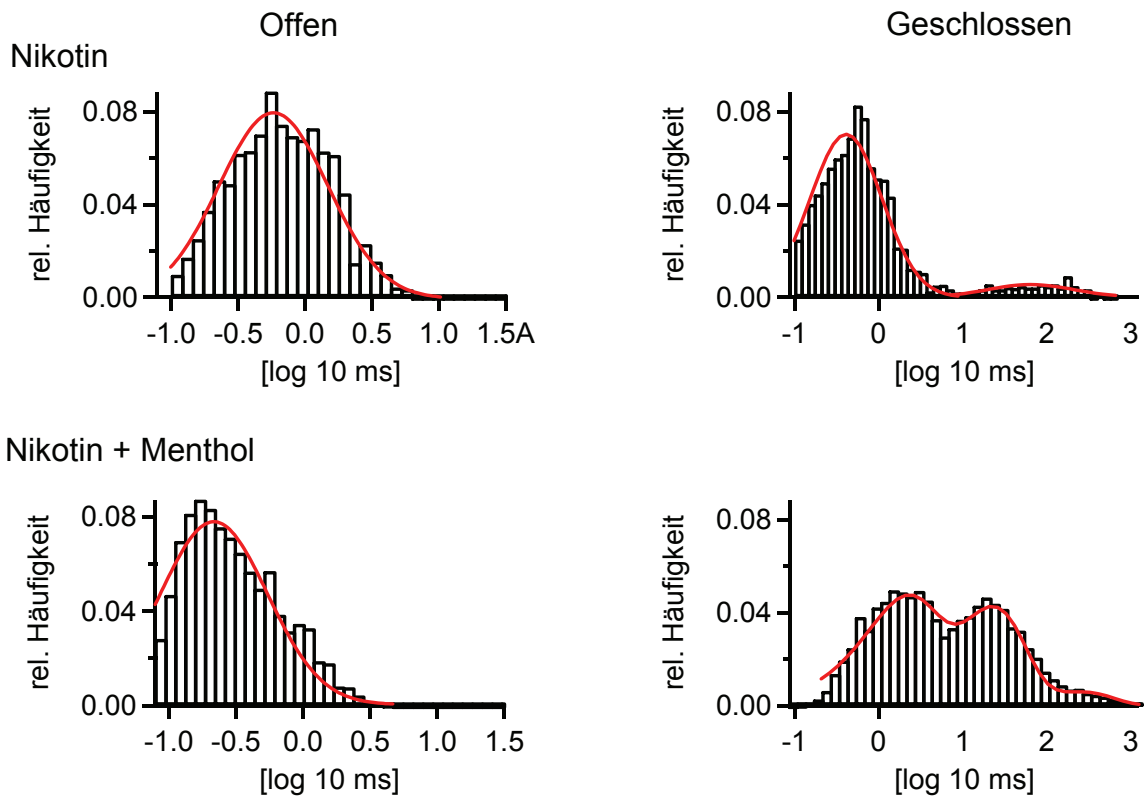


Abbildung 22: Menthol verringert die Offenzeit und verlängert die Geschlossenzeit von nAChRs in trigeminalen Neuronen.

Offen- und Geschlossenzeit-Histogramme wurden erstellt aus den Einzelkanaldaten in Anwesenheit von (-)Nikotin (75 μ M; obere Reihe) bzw. (-)Nikotin (75 μ M)/(-)Menthol (100 μ M; untere Reihe).

Die rote durchgezogene Kurve stellt die den Daten angepasste Wahrscheinlichkeits-Dichte Funktion dar.

5.2.4 Mentholwirkung auf heterolog exprimierte nAChRs in HEK-Zellen

Zur weiteren Analyse des Wirkmechanismus verwendeten wir HEK tsA201 Zellen, welche einen einzelnen Rezeptortyp, nämlich den humanen $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Subtyp, stabil exprimieren. Zunächst wurde für (-)Nikotin eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt. Der ermittelte EC_{50} -Wert betrug $25,5 \mu\text{M}$, ($pEC_{50} = 4,59 \pm 0,11$). Der Hillkoeffizient lag bei $1,2 \pm 0,4$. Jede gemessene Stromantwort wurde auf die im jeweiligen Experiment mit Nikotin ($75 \mu\text{M}$) erhaltene Stromantwort (entspricht Kontrolle) normalisiert. Der Maximaleffekt ($E_{\text{max}} = 117,3 \pm 16,7\%$) wurde bei einer Nikotinkonzentration von $300 \mu\text{M}$ erreicht.

Im Gegensatz zu der an nativen nAChRs in trigeminalen Neuronen ermittelten Nikotin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb. 15) wies die Konzentrations-Wirkungs-Kurve an $\alpha_4\beta_2$ -nAChRs in HEK-Zellen in dem von uns untersuchten unteren Konzentrationsbereich ein Plateau auf und erreichte nicht die Nulllinie. Die Stromantworten im Konzentrationsbereich von $0,3$ bis $1 \mu\text{M}$ erreichten $18 - 35\%$ der Kontrollantwort. Die Ursache für diesen Kurvenverlauf ist höchstwahrscheinlich das Vorkommen einer zweiten, weniger häufig auftretenden Population von nAChRs mit anderer Stöchiometrie und höherer Agonist-Sensitivität (Nelson et al., 2003).

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für (-)Nikotin) wurde auch in Anwesenheit von (-)Menthol ($120 \mu\text{M}$) erstellt. Bei diesen Versuchen wurde Menthol für 10 s vorinkubiert und anschließend mit der jeweils zu untersuchenden Nikotinkonzentration koappliziert. In Anwesenheit von Menthol war die Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach unten verschoben, wobei die Stromamplituden im gesamten Kurvenbereich signifikant verringert waren. Der Maximaleffekt (E_{max}) war in Anwesenheit von Menthol hochsignifikant verringert ($76,8 \pm 16,4\%$ im Vergleich zur Kontrolle; $p = 0,0029$, ungepaarter t-Test). In Gegenwart von Menthol ($120 \mu\text{M}$) betrug der EC_{50} -Wert $46,9 \mu\text{M}$ ($pEC_{50} = 4,33 \pm 0,14$). Der Hillkoeffizient lag bei $1,2 \pm 0,4$.

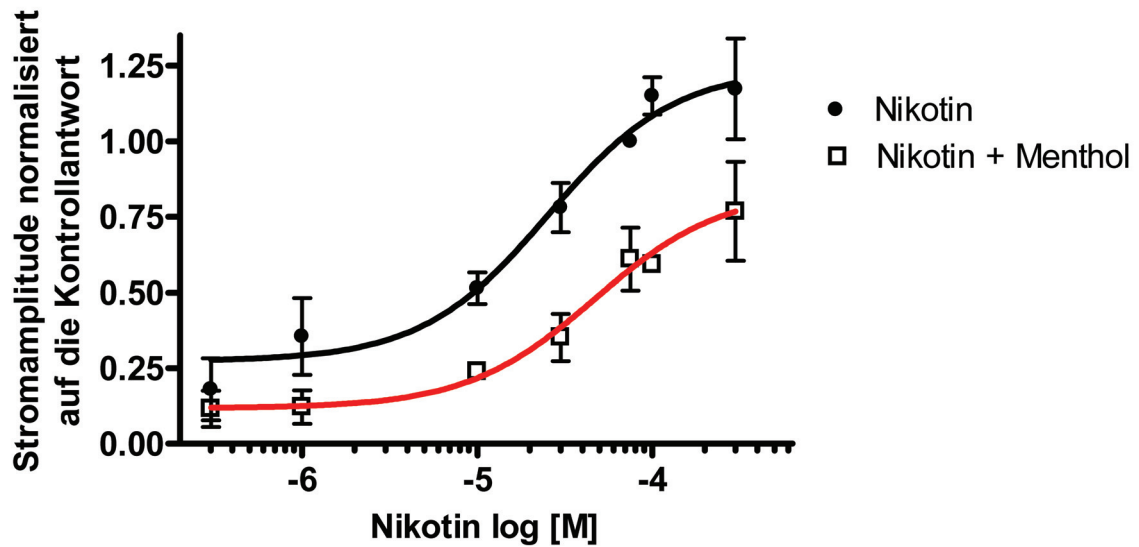


Abbildung 23: Konzentrations-Effekt-Kurven an HEK tsA201 Zellen für (-)Nikotin (schwarze Kurve) sowie für (-)Nikotin bei gleichzeitiger Anwesenheit von (-)Menthol (120 μM) (rote Kurve).

Die Datenpunkte (Mittelwert \pm Standardabweichung) wurden aus den Stromamplituden der Nikotin-induzierten Antworten einzelner Zellen erstellt. Als 100% Bezugswerte dienten die im jeweiligen Experiment mit Nikotin (75 μM) erhaltenen Stromantworten (Kontrollantwort). Jede Nikotinkonzentration wurde an $n = 3$ bis 6 Zellen untersucht. EC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten wurden ermittelt, indem dem jeweiligen Datensatz eine logistische Funktion angepasst wurde (siehe 4.5.6.1.1). Die EC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten für (-)Nikotin und (-)Nikotin in Anwesenheit von (-)Menthol (120 μM) sind 25.5 μM , 1.2; 46.9 μM , 1.2.

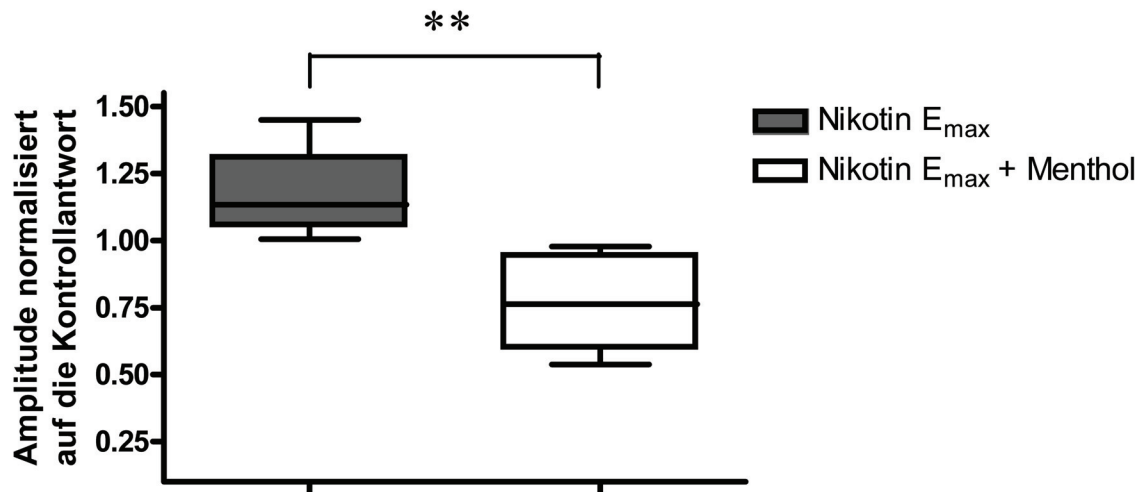


Abbildung 24: Wirkung von (-)Menthol (120 μM) auf den Nikotin-induzierten Strom (300 μM) in unterschiedlichen HEK tsA201 Zellen.

Eine Nikotinkonzentration von 300 μM führt in diesen Zellen zur Erzielung eines Maximaleffektes ($E_{\text{max}} = 117,3 \pm 16,7\%$). 10 s Vorinkubation der Zellen mit Menthol bewirkt bei anschließender Koapplikation von Nikotin 300 μM und Menthol eine hochsignifikante Inhibition der Nikotin-induzierten Stromantwort ($76,8 \pm 16,4\%$) gegenüber einer Applikation von Nikotin 300 μM ($p = 0,0029$, ungepaarter t -Test). Alle Amplituden wurden auf die im jeweiligen Experiment bestimmte Nikotin-(75 μM)-Antwort (100%) (Kontrollantwort) normalisiert.

6. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass (-)Menthol die Funktion von nAChRs beeinflusst, indem es diese negativ moduliert. Unsere Daten deuten darauf hin, dass Menthol als allosterischer (nicht-kompetitiver) Antagonist (NKA) wirkt und die Wirkstärke des Agonisten verringert.

6.1 Vorkommen und Charakteristika verschiedener neuronaler nikotinscher Acetylcholinrezeptor-Subtypen in trigeminalen Neuronen

In molekularbiologischen Untersuchungen wurden bereits verschiedene nAChR-Subtypen in trigeminalen Neurone nachgewiesen (Flores et al., 1996; Liu et al., 1998; Alimohammadi and Silver, 2000; Keiger and Walker, 2000). Auf mRNA-Ebene konnte das Vorhandensein von 7 α - und 3 β -Untereinheiten (α_{2-7} , α_9 , β_{2-4}) gezeigt werden (Wada et al., 1989; Liu et al., 1998; Keiger and Walker, 2000) und auf Protein-Ebene wurden $\alpha_3\beta_4$ -, $\alpha_4\beta_2$ -, α_7 - sowie mit α_5 -assoziierte Subtypen nachgewiesen. Quantitativen Analysen zufolge kommt der $\alpha_3\beta_4$ -Subtyp in Somata trigeminaler Neurone ca. 2,5 mal häufiger vor als der $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp (Flores et al., 1996). Auf biophysikalischer und pharmakologischer Ebene sind nAChRs in diesen Zellen bisher nur ansatzweise charakterisiert.

6.1.1 Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetik Agonist-induzierter Ströme

Die Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetik der von uns gemessenen Ströme durch nAChRs in trigeminalen Neuronen, war von der Zusammensetzung der Rezeptorpopulation aus den unterschiedlichen Subtypen abhängig. Dies hat zur Folge, dass für die Mehrzahl der Zellen die Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetik eines einzelnen Subtyps nicht bestimmt werden kann. Allerdings konnten wir auch wenige Zellen beobachten, die höchstwahrscheinlich nur einen bestimmten nAChR-Subtyp exprimierten (siehe Abb. 11). Die kinetischen Eigenschaften der Ströme, welche in diesen Zellen beobachtet wurden, stimmten mit denen überein, die für α_7 -, $\alpha_4\beta_2$ - oder $\alpha_3\beta_4$ - Subtypen in rekombinanten oder nativen Systemen

charakterisiert wurden (siehe Tabelle 2) sowie (Alkondon and Albuquerque, 1993; Ishihara et al., 1995; Frazier et al., 1998; Kawai and Berg, 2001).

Aufgrund unserer Beobachtungen konnten wir davon ausgehen, dass in den meisten Zellen eine Rezeptorpopulation exprimiert wurde, die überwiegend aus einer Mischung von $\alpha_4\beta_2$ - und $\alpha_3\beta_4$ - Subtypen bestand, wobei das Mischungsverhältnis von Zelle zu Zelle variierte.

Agonist	Konzentration [μ M]	Anteil Desensitisierung [%] *	nAChRs (Spezies)	Referenz Nr.
eigene Studie				
Nikotin	10	18	Ratte	
	100	27		
	200	34		
ACh	30	7		
	100	26		
	300	27		
$\alpha_3\beta_4$ -nAChR-Subtyp				
Nikotin	50	47	Ratte	1)
	100	30		1)
ACh	200	72		2)
	300	63	Mensch	3)
$\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Subtyp				
Nikotin	10	57	Ratte	6)
	100	98		6)
ACh	30	47-80	Mensch	4), 5)
	100	52-70	Ratte	6), 7)
	300	70	Mensch	5)

Tabelle 2: Prozentualer Anteil der Desensitisierung von Strömen durch nAChRs, welche im nativen System, oder in HEK-Zelllinien heterolog exprimiert werden.

* Der prozentuale Anteil der Desensitisierung wurde nach einer 500 ms andauernden Agonist-Applikation ermittelt. Referenznummern: 1) (Zhang et al., 1999); 2) (Wong et al., 1995); 3) (Nelson et al., 2001); 4) (Chavez-Noriega et al., 2000); 5) (Buisson and Bertrand, 2001); 6) (Paradiso and Steinbach, 2003); 7) (Sabey et al., 1999)

6.1.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von nikotinischen Acetylcholinrezeptor-Agonisten in trigeminalen Neuronen

Um eine pharmakologische Charakterisierung der in trigeminalen Neuronen vorkommenden nAChRs durchzuführen, wurden die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Agonisten erstellt. Ein Vergleich der für diese Agonisten gewonnenen EC₅₀-Werte mit denen, die für einzelne Rezeptorsubtypen in rekombinanten Systemen gemessen wurden (siehe Tabelle 3), deutet zusammen mit den biophysikalischen Eigenschaften darauf hin, dass in trigeminalen Neuronen $\alpha_4\beta_2$ - und $\alpha_3\beta_4$ -nAChR-Subtypen exprimiert werden. Unsere Befunde am rekombinant exprimierten $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Subtyp bestätigten für Nikotin die Ergebnisse, die in den trigeminalen Neuronen gewonnen wurden. Die nachfolgende Tabelle listet die für verschiedene nAChR-Subtypen in der Literatur beschriebenen EC₅₀-Werte auf.

Methode	Acetylcholin	(-)Nikotin	(±)Epibatidin	Spezies	Referenz Nr.
eigene Studie					
Patch-Clamp	75,7	40,1	0,06	Ratte	
$\alpha_3\beta_4$ -nAChR-Subtyp					
Patch-Clamp		22*		Ratte	1)
⁸⁶ Rb ⁺ -Efflux	110-114	28-31	0,06	Ratte	2), 3)
$\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Subtyp					
Patch-Clamp	44-50	4,9-14*	0,003-0,068	Ratte	4), 5)
Patch-Clamp	3-100	1,6-3,5	0,043	Mensch	6), 7)
⁸⁶ Rb ⁺ -Efflux	44	4	0,017	Mensch	8)

Tabelle 3: EC₅₀-Werte [μ M] für verschiedene Agonisten nAChRs.

Die Bestimmung erfolgte mittels unterschiedlicher Methoden. Die Literaturdaten beziehen sich auf nAChR-Subtypen, welche in einer Säugerzelllinie exprimiert sind, bei den verwendeten Agonisten handelte es sich (falls es nicht anders angegeben ist) um (-)Nikotin und (±)Epibatidin, oder es war in der entsprechenden Arbeit nicht spezifiziert, welches Enantiomer verwendet wurde*. Referenznummern: 1) (Zhang et al., 1999); 2) (Xiao et al., 1998); 3) (Meyer et al., 2001); 4) (Paradiso and Steinbach, 2003); 5) (Buisson et al., 2000); 6) (Buisson et al., 1996); 7) (Chavez-Noriega et al., 2000): hier wurde (+)Epibatidin verwendet; 8) (Gopalakrishnan et al., 1996)

6.2 Menthol moduliert neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren

6.2.1 Menthol interagiert bevorzugt mit dem Kanalprotein im „Geschlossen“-Konformationszustand

Die von uns beobachtete inhibitorische Wirkung, die Menthol auf Ströme durch nAChRs hat, war von der Zeitdauer abhängig in der Menthol mit dem Rezeptorprotein interagieren konnte. So erhöhte sich die Inhibition des ACh-induzierten Stromes im Vergleich zur Koapplikation von durchschnittlich 37% auf 66%, wenn Menthol bereits 10 s vor dem Agonisten appliziert wurde. Im Gegensatz dazu verringerte sich die Inhibition der Stromamplitude auf 6%, wenn Menthol erst nach Beginn der Agonist-Applikation (hier 400 ms) appliziert wurde, also wenn sich das Kanalprotein schon in der „Offen“-Konformation befand. Eine Erhöhung der ACh-Konzentration von 100 auf 200 μM hatte keinen Einfluss auf die Reduktion der Stromamplitude durch Menthol. Die unter diesen Bedingungen beobachtete geringere Inhibition ist höchstwahrscheinlich nicht auf eine Verringerung der Interaktionszeit zwischen Menthol und dem Kanalprotein zurückzuführen, da die Inhibition bereits nach 60% der Menthol-Applikationszeit (hier 200 ms) eine Saturierung zeigte (siehe Abb. 17). Allerdings ist es ebenfalls möglich, dass die Interaktion zwischen Menthol und dem Kanalprotein in der „Offen“-Konformation ein langsamer Prozess ist, den wir mit dem hier verwendeten Ansatz nicht erfassen konnten. Da die meisten nAChRs bereits 1 bis 2 Sekunden nach Aktivierung durch den Agonisten zu über 90% desensitisiert sind, ist es nahezu unmöglich, den Prozess der Menthol-vermittelten Inhibition von dem der Rezeptor-Desensitisierung zu unterscheiden. Unsere Befunde deuten darauf hin, dass die Bindungsstelle für Menthol am leichtesten zu erreichen ist, wenn sich das Kanalprotein in der „Geschlossen“-Konformation befindet. Die mit dem Übergang von „Geschlossen“ zu „Offen“ verbundene Konformationsänderung des Proteinkomplexes führt sehr wahrscheinlich zu einer Verlagerung der Mentholbindungsstelle und bewirkt so eine Verringerung der Mentholwirkung auf den Proteinkomplex.

6.2.2 Menthol inhibiert den nAChR über eine negative allosterische Modulation

Um zwischen einem kompetitiven und einem allosterischen Mechanismus der Menthol-induzierten Inhibition der nAChRs zu unterscheiden, untersuchten wir die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Nikotin am humanen $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Subtyp. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wirkung von Menthol am humanen $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Subtyp auf einen nicht-kompetitiven Antagonismus zurückzuführen ist. So zeigten die EC_{50} -Werte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Nikotin bzw. Nikotin + Menthol (120 μ M) keine signifikanten Unterschiede, während die Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Anwesenheit von Menthol eine signifikante Reduktion der Stromamplituden im gesamten Kurvenbereich zeigte.

Unsere Befunde am nativen nAChR in trigeminalen Neuronen untermauern die Annahme eines nicht-kompetitiven Antagonismus. Im Falle einer kompetitiven Inhibition durch Menthol würde man eine Verlangsamung der Aktivierungskinetik der Ganzzellströme erwarten, was in unseren Experimenten nicht zu beobachten war (siehe Abb. 16, Abb. 19B).

Es lassen sich grundsätzlich zwei verschiedene Mechanismen unterscheiden über die nicht-kompetitive Inhibitoren wirken können. Menthol könnte zum einen ein Porenblocker sein, also eine Bindungsstelle im Lumen des Rezeptors haben und sterisch den Ionenfluss blockieren. Andererseits könnte es an eine allosterische Bindungsstelle außerhalb der Kanalpore binden, dann hätte die Bindung von Menthol einen Konformationswechsel des Kanalproteins zur Folge, sodass die Schalteigenschaften des Ionenkanals verändert werden. Weitere Folgen einer Inhibition durch einen allosterischen Modulator können eine Stabilisierung nicht-leitender Kanalzustände (Ruhe- oder desensitisierten Zustand) oder eine Beschleunigung des Zeitverlaufs der Desensibilisierung sein (Arias et al., 2006).

Wesentliche Erkenntnisse über den Wirkmechanismus ergaben sich aus den Einzelkanalmessungen in trigeminalen Neuronen. In Gegenwart von Menthol beobachteten wir eine geringfügige Erhöhung der Einzelkanalamplitude der Nikotin-induzierten Ströme, während die Offenwahrscheinlichkeit dieser Kanäle verringert war, was auf eine Verkürzung der Kanaloffenzeit sowie eine Verlängerung der Geschlossenzeit zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu würde man im Falle einer Porenblockade eine Verringerung der Einzelkanalamplitude, bzw. eine drastische Verkürzung der Kanaloffenzeit (Flickerblock) erwarten (Hille, 1992), wie es z.B. für schnell agierende Porenblocker am nAChR (z.B. das Lidocainderivat

QX-222) beschrieben wurde (Neher and Steinbach, 1978). Zusätzlich wäre im Falle eines Offenkanalblockes, aufgrund des schnellen Kanalöffnens/-schließens, ein Anstieg in der Varianz der Ganzzelleableitungen zu beobachten.

Die Veränderung der Kanaloffenzeit (kürzer) sowie der Geschlossenzeit (länger) deuten darauf hin, dass die inhibitorische Wirkung von Menthol auf das Rezeptorprotein über seinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Konformationsänderung zustande kommt. Insbesondere zeigt sich im Geschlossenzeit-Histogramm in Gegenwart von Menthol (Abb. 22, unten rechts) eine Verschiebung der Geschlossenzeiten zu größeren Werten, sowie die Ausbildung einer neuen dritten Geschlossenzeit-Komponente mit einer sehr langsamen Zeitkonstante (295 ms). Es kann ausgeschlossen werden, dass Menthol über einen unspezifischen Effekt wirkt, der sich durch eine Veränderung der Membranfluidität in Gegenwart dieser lipophilen Substanz (Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P = 3,1$) (Simon and Sostman, 1991) ergeben könnte. Wie oben gezeigt wirkt Menthol direkt am Rezeptorprotein und hat dadurch Effekte auf Einzelkanal-Parameter wie Kanaloffenzeit oder Amplitude. Damit unterscheidet sich Menthol in seiner Wirkung von Substanzen, wie z.B. den Phospholipiden, welche auf nAChRs indirekt über eine Veränderung der Membranfluidität wirken und die genannten Effekte nicht aufweisen (Braun and Haydon, 1991).

6.2.3 Menthol besitzt vielfältige Wirkungen im Nervensystem

Wie bereits oben erwähnt, ist Menthol als lipophile Substanz in der Lage, die Fluidität biologischer Membranen zu verändern und damit die Funktion von Membranproteinen zu modulieren (unspezifische Wirkung). Menthol besitzt aber auch ein breites Spektrum von spezifischen Wirkungen auf integrale Membranproteine, sogenannte Ionenkanäle, die durch Spannungsänderungen über der Membran oder durch Transmittermoleküle (Liganden) aktiviert werden (siehe Einleitung). So wirkt Menthol z.B. unspezifisch auf spannungsgesteuerte Natrium-, Kalium- oder Calcium-Kanäle, was zu einer Verminderung des Ionenstromes durch diese Ionenkanäle führt (Swandulla et al., 1986; Haeseler et al., 2002). Neben dieser unspezifischen Wirkung von Menthol wurden auch spezifische Wirkungen auf bestimmte (L- oder N-Typ) spannungsaktivierte Calcium-Kanäle beschrieben, die zu einer starken Zunahme der Ca^{2+} -induzierten Inaktivierung dieser Kanäle führen, und so den Einstrom von Ca^{2+} ins

Zellinnere begrenzen (Swandulla et al., 1987). Der Mechanismus, der dieser Mentholwirkung zugrunde liegt, ist nicht vollständig aufgeklärt, beinhaltet jedoch eine spezifische Bindungsstelle für Menthol am Kanalprotein. Die physiologische/pathophysiologische Bedeutung dieser Mentholwirkung ist bisher nicht eindeutig belegt worden, wird jedoch im Zusammenhang mit gewissen Formen des Migränekopfschmerzes diskutiert, die durch die Gabe von Calciumkanalmodulatoren beeinflusst werden können (Hering et al., 2000).

Spezifische modulatorische Wirkungen von Menthol konnten insbesondere auf die Funktion von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen (Rezeptoren) gezeigt werden. (+)Menthol wirkt z.B. als positiver Modulator an GABA_A- und Glycin-Rezeptoren (Hall et al., 2004). Die allosterische Bindungsstelle, die hierbei von Menthol besetzt wird, ist zugleich Bindungsstelle für weitere pharmakologisch aktive Substanzen, wie z.B. das Narkotikum Propofol (Watt et al., 2008). Über diesen Modulationsmechanismus können narkotische und sedative Effekte von systemisch verabreichtem Menthol erklärt werden.

Ein weiteres Mitglied der Cys-loop-Rezeptoren, das als Archetypus für diese Liganden-gesteuerten Ionenkanäle gelten kann, ist der nAChR, der sowohl in seinen muskulären als auch neuronalen Formen Zielstruktur für eine Vielzahl von Modulatoren ist. So wurden eine Reihe von negativen und positiven Modulatoren beschrieben (Buisson and Bertrand, 1998; Pereira et al., 2002). Nicht-kompetitive Antagonisten (NKAs), die die Funktion von nAChRs inhibieren, sind z.B. Barbiturate, (dissoziative) Anästhetika, Antidepressiva, Neurosteroide. Die Mechanismen, welche diesen Modulationsprozessen zugrunde liegen, sind hochkomplex. So können NKAs durch mehr als einen Mechanismus und an unterschiedlichen Stelle am selben Rezeptorprotein wirken (Arias and Bhumireddy, 2005; Arias et al., 2006). Die Lokalisation der Bindungsstelle für ein bestimmtes Molekül hängt dabei vom Konformationszustand des Rezeptors ab. Die Konsequenzen, die sich für die Funktionen von nAChRs aus der Wirkung von NKAs ergeben sind, vielfältig. So kann z.B. über präsynaptische nAChRs nicht nur die Ausschüttung von ACh, sondern auch die anderer Neurotransmitter wie Glutamat, GABA, Noradrenalin sowie Dopamin beeinflusst werden (Dani, 2001; Exley and Cragg, 2008). Über die Modulation postsynaptischer nAChRs kann die cholinerge synaptische Transmission kurzfristig vermindert werden, während langfristige metabotrope Effekte über eine Verminderung des postsynaptischen Calciumeinstromes durch nAChRs vermittelt werden. Auf diese Weise wird die neuronale Informationsverarbeitung im ZNS sehr

differenziert durch das Zusammenspiel einer Reihe von unabhängigen Prozessen beeinflusst. Physiologische und pathophysiologische Vorgänge die durch NKAs moduliert werden, reichen von der nozizeptiven Reizverarbeitung bis hin zur Nikotinsucht, Neurodegeneration (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson), neuronalen Überempfindlichkeit (Epilepsie) sowie fehlregulierter Transmitterausschüttung (Depression, Schizophrenie), (siehe Übersichtsartikel von Taly et al., 2009).

Ohne Menthol als NKA von nAChRs eine potentielle Nutzbarmachung bei der Therapie hochkomplexer pathophysiologischer Störungen des Nervensystems absprechen zu wollen, wäre es jedoch vorstellbar, dass Menthol als negativer Modulator von nAChRs bei auf den ersten Blick „einfachen“ physiologischen Prozessen, wie der nozizeptiven Reizverarbeitung, eine größere Rolle spielt, als ihm bisher zugesprochen wird. NACHRs kommen nicht nur an peripheren Endigungen von sogenannten Schmerzfasern vor (Alimohammadi and Silver, 2000; Carstens et al., 2000), sondern sind auch für die nozizeptive Verarbeitung im ZNS wichtig (Genzen and McGehee, 2003; Cordero-Erausquin et al., 2004; Rashid et al., 2006). In Tierversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass Menthol bei systemischer Applikation eine analgetische Wirkung hervorruft (Galeotti et al., 2002). Auf der von uns beschriebenen Mentholwirkung als NKA von nAChRs aufbauend, könnten weitere Studien zur Bindungsstelle von Menthol am Rezeptorprotein und der analgetischen Wirkung von Mentholderivaten klinisch-pharmakologisch relevante Ergebnisse für die Schmerztherapie erbringen.

7. Literaturverzeichnis

- Adams DJ, Nutter TJ (1992) Calcium permeability and modulation of nicotinic acetylcholine receptor-channels in rat parasympathetic neurons. *J Physiol Paris* 86:67-76.
- Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2005) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Edition: Urban & Fischer.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89:73-120.
- Alimohammadi H, Silver WL (2000) Evidence for nicotinic acetylcholine receptors on nasal trigeminal nerve endings of the rat. *Chem Senses* 25:61-66.
- Alkondon M, Albuquerque EX (1993) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1455-1473.
- Alkondon M, Albuquerque EX (1995) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. III. Agonist actions of the novel alkaloid epibatidine and analysis of type II current. *J Pharmacol Exp Ther* 274:771-782.
- Arias HR (1998) Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1376:173-220.
- Arias HR, Bhumireddy P (2005) Anesthetics as chemical tools to study the structure and function of nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Protein Pept Sci* 6:451-472.
- Arias HR, Bhumireddy P, Bouzat C (2006) Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1254-1276.
- Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R (2004) Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* 141:737-745.
- Bessou P, Perl ER (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 32:1025-1043.
- Braun MS, Haydon DA (1991) The effects of short-chain phospholipids on the acetylcholine-activated ion channel. *Pflugers Arch* 418:62-67.

- Broide RS, Leslie FM (1999) The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol* 20:1-16.
- Bromm B, Scharein E, Darsow U, Ring J (1995) Effects of menthol and cold on histamine-induced itch and skin reactions in man. *Neurosci Lett* 187:157-160.
- Bryant BP (1995) Peripheral trigeminal neural processes involved in repellency. In: USDA National Wildlife Research Center Symposia. University of Nebraska Lincoln.
- Buisson B, Bertrand D (1998) Allosteric modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol Paris* 92:89-100.
- Buisson B, Bertrand D (2001) Chronic exposure to nicotine upregulates the human $(\alpha)4((\beta)2$ nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurosci* 21:1819-1829.
- Buisson B, Vallejo YF, Green WN, Bertrand D (2000) The unusual nature of epibatidine responses at the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* 39:2561-2569.
- Buisson B, Gopalakrishnan M, Arneric SP, Sullivan JP, Bertrand D (1996) Human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor in HEK 293 cells: A patch-clamp study. *J Neurosci* 16:7880-7891.
- Carstens E, Simons CT, Dessirier JM, Carstens MI, Jinks SL (2000) Role of neuronal nicotinic-acetylcholine receptors in the activation of neurons in trigeminal subnucleus caudalis by nicotine delivered to the oral mucosa. *Exp Brain Res* 132:375-383.
- Castro NG, Albuquerque EX (1995) α -Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophys J* 68:516-524.
- Chavez-Noriega LE, Gillespie A, Stauderman KA, Crona JH, Claeps BO, Elliott KJ, Reid RT, Rao TS, Velicelebi G, Harpold MM, Johnson EC, Corey-Naeve J (2000) Characterization of the recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 4\beta 2$ stably expressed in HEK293 cells. *Neuropharmacology* 39:2543-2560.
- Colquhoun DS, F.J. (1995) *Fitting and Statistical Analysis of Single Channel Records*, 2 Edition. New York, London: Plenum Press.
- Cordero-Erausquin M, Pons S, Faure P, Changeux JP (2004) Nicotine differentially activates inhibitory and excitatory neurons in the dorsal spinal cord. *Pain* 109:308-318.
- Corringer PJ, Le Novere N, Changeux JP (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:431-458.

- Dajas-Bailador F, Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25:317-324.
- Dani JA (2001) Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49:166-174.
- Dani JA, Bertrand D (2007) Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:699-729.
- Darvas M, Morsch M, Racz I, Ahmadi S, Swandulla D, Zimmer A (2009) Modulation of the Ca²⁺ conductance of nicotinic acetylcholine receptors by Lypd6. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:670-681.
- Davies SJ, Harding LM, Baranowski AP (2002) A novel treatment of postherpetic neuralgia using peppermint oil. *Clin J Pain* 18:200-202.
- Descarries L, Gisiger V, Steriade M (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* 53:603-625.
- Eccles R (2000) Role of cold receptors and menthol in thirst, the drive to breathe and arousal. *Appetite* 34:29-35.
- Everitt BJ, Robbins TW (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 48:649-684.
- Exley R, Cragg SJ (2008) Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S283-297.
- Flood P, Ramirez-Latorre J, Role L (1997) Alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system are inhibited by isoflurane and propofol, but alpha 7-type nicotinic acetylcholine receptors are unaffected. *Anesthesiology* 86:859-865.
- Flores CM, DeCamp RM, Kilo S, Rogers SW, Hargreaves KM (1996) Neuronal nicotinic receptor expression in sensory neurons of the rat trigeminal ganglion: demonstration of alpha3beta4, a novel subtype in the mammalian nervous system. *J Neurosci* 16:7892-7901.
- Frazier CJ, Buhler AV, Weiner JL, Dunwiddie TV (1998) Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J Neurosci* 18:8228-8235.
- Galeotti N, Di Cesare Mannelli L, Mazzanti G, Bartolini A, Ghelardini C (2002) Menthol: a natural analgesic compound. *Neurosci Lett* 322:145-148.

- Galeotti N, Ghelardini C, Mannelli L, Mazzanti G, Baghiroli L, Bartolini A (2001) Local anaesthetic activity of (+)- and (-)-menthol. *Planta Med* 67:174-176.
- Galzi JL, Changeux JP (1995) Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* 34:563-582.
- Genzen JR, McGehee DS (2003) Short- and long-term enhancement of excitatory transmission in the spinal cord dorsal horn by nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6807-6812.
- Gerzanich V, Peng X, Wang F, Wells G, Anand R, Fletcher S, Lindstrom J (1995) Comparative pharmacology of epibatidine: a potent agonist for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 48:774-782.
- Giraudat J, Dennis M, Heidmann T, Haumont PY, Lederer F, Changeux JP (1987) Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: [3H]chlorpromazine labels homologous residues in the beta and delta chains. *Biochemistry* 26:2410-2418.
- Gopalakrishnan M, Monteggia LM, Anderson DJ, Molinari EJ, Piattoni-Kaplan M, Donnelly-Roberts D, Arneric SP, Sullivan JP (1996) Stable expression, pharmacologic properties and regulation of the human neuronal nicotinic acetylcholine alpha 4 beta 2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 276:289-297.
- Green BG, McAuliffe BL (2000) Menthol desensitization of capsaicin irritation. Evidence of a short-term anti-nociceptive effect. *Physiol Behav* 68:631-639.
- Haeseler G, Maue D, Grosskreutz J, Bufler J, Nentwig B, Piepenbrock S, Dengler R, Leuwer M (2002) Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. *Eur J Anaesthesiol* 19:571-579.
- Hall AC, Turcotte CM, Betts BA, Yeung WY, Agyeman AS, Burk LA (2004) Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. *Eur J Pharmacol* 506:9-16.
- Hamill OP, Sakmann B (1981) Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature* 294:462-464.
- Harper AA, Lawson SN (1985) Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 359:31-46.

- Hatton CJ, Shelley C, Brydson M, Beeson D, Colquhoun D (2003) Properties of the human muscle nicotinic receptor, and of the slow-channel myasthenic syndrome mutant epsilonL221F, inferred from maximum likelihood fits. *J Physiol* 547:729-760.
- Hensel H, Zotterman Y (1951) The effect of menthol on the thermoreceptors. *Acta Physiol Scand* 24:27-34.
- Hering S, Berjukow S, Sokolov S, Marksteiner R, Weiss RG, Kraus R, Timin EN (2000) Molecular determinants of inactivation in voltage-gated Ca²⁺ channels. *J Physiol* 528 Pt 2:237-249.
- Hille B (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2 Edition. Washington: Sinauer Associates INC.
- Hucho F (1986) The nicotinic acetylcholine receptor and its ion channel. *Eur J Biochem* 158:211-226.
- Ishihara K, Alkondon M, Montes JG, Albuquerque EX (1995) Nicotinic responses in acutely dissociated rat hippocampal neurons and the selective blockade of fast-desensitizing nicotinic currents by lead. *J Pharmacol Exp Ther* 273:1471-1482.
- Jensen AA, Frolund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P (2005) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem* 48:4705-4745.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science*. New York, Bogotá, Lisbon, New Delhi, Sydney, Toronto: McGraw-Hill Companies.
- Katz B, Thesleff S (1957) A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 138:63-80.
- Kawai H, Berg DK (2001) Nicotinic acetylcholine receptors containing alpha 7 subunits on rat cortical neurons do not undergo long-lasting inactivation even when up-regulated by chronic nicotine exposure. *J Neurochem* 78:1367-1378.
- Keiger CJ, Walker JC (2000) Individual variation in the expression profiles of nicotinic receptors in the olfactory bulb and trigeminal ganglion and identification of alpha2, alpha6, alpha9, and beta3 transcripts. *Biochem Pharmacol* 59:233-240.
- LaMotte RH, Simone DA, Baumann TK, Shain CN, Alreja M (1988) Hypothesis for novel classes of chemoreceptors mediating chemogenic pain and itch. Amsterdam: Elsevier.

- Lazarov NE (2002) Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol* 66:19-59.
- Le Novere N, Corringer PJ, Changeux JP (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53:447-456.
- Lena C, Changeux JP, Mulle C (1993) Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J Neurosci* 13:2680-2688.
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA (2004) Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* 27:329-336.
- Liu L, Simon SA (1996) Capsaicin and nicotine both activate a subset of rat trigeminal ganglion neurons. *Am J Physiol* 270:C1807-1814.
- Liu L, Pugh W, Ma H, Simon SA (1993) Identification of acetylcholine receptors in adult rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Res* 617:37-42.
- Liu L, Chang GQ, Jiao YQ, Simon SA (1998) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Brain Res* 809:238-245.
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L (2006) *Pharmakologie und Toxikologie*, 16 Edition. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Mansvelder HD, McGehee DS (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27:349-357.
- May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A (2007) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:1-51.
- McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52-58.
- Meyer EL, Xiao Y, Kellar KJ (2001) Agonist regulation of rat alpha 3 beta 4 nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 60:568-576.
- Miwa JM, Ibanez-Tallon I, Crabtree GW, Sanchez R, Sali A, Role LW, Heintz N (1999) lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron* 23:105-114.

- Mulle C, Lena C, Changeux JP (1992) Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron* 8:937-945.
- Neher E, Steinbach JH (1978) Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J Physiol* 277:153-176.
- Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y, Lindstrom J (2003) Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 63:332-341.
- Nelson ME, Wang F, Kuryatov A, Choi CH, Gerzanich V, Lindstrom J (2001) Functional properties of human nicotinic AChRs expressed by IMR-32 neuroblastoma cells resemble those of alpha3beta4 AChRs expressed in permanently transfected HEK cells. *J Gen Physiol* 118:563-582.
- Paradiso KG, Steinbach JH (2003) Nicotine is highly effective at producing desensitization of rat alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors. *J Physiol* 553:857-871.
- Paterson D, Nordberg A (2000) Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* 61:75-111.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108:705-715.
- Pereira EF, Hilmas C, Santos MD, Alkondon M, Maelicke A, Albuquerque EX (2002) Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53:479-500.
- Perl ER (1968) Myelinated afferent fibres innervating the primate skin and their response to noxious stimuli. *J Physiol* 197:593-615.
- Picciotto MR, Caldarone BJ, King SL, Zachariou V (2000) Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology* 22:451-465.
- Plazas PV, Katz E, Gomez-Casati ME, Bouzat C, Elgoyhen AB (2005) Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci* 25:10905-10912.
- Price KL, Millen KS, Lummis SC (2007) Transducing agonist binding to channel gating involves different interactions in 5-HT3 and GABAC receptors. *J Biol Chem* 282:25623-25630.
- Rashid MH, Furue H, Yoshimura M, Ueda H (2006) Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord in mice. *Pain* 125:125-135.

- Reid G, Babes A, Pluteanu F (2002) A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. *J Physiol* 545:595-614.
- Sabey K, Paradiso K, Zhang J, Steinbach JH (1999) Ligand binding and activation of rat nicotinic $\alpha 4\beta 2$ receptors stably expressed in HEK293 cells. *Mol Pharmacol* 55:58-66.
- Sakmann B, Patlak J, Neher E (1980) Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature* 286:71-73.
- Sakmann B. NE (1995) *Single-Channel Recording*, 2nd Edition. New York: Plenum Press.
- Sher E, Chen Y, Sharples TJ, Broad LM, Benedetti G, Zwart R, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, De Filippi G (2004) Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. *Curr Top Med Chem* 4:283-297.
- Sigworth FJ, Sine SM (1987) Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys J* 52:1047-1054.
- Simon SA, Sostman AL (1991) Electrophysiological responses to non-electrolytes in lingual nerve of rat and in lingual epithelia of dog. *Arch Oral Biol* 36:805-813.
- Steinlein OK, Bertrand D (2008) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from the genetic analysis to neurological diseases. *Biochem Pharmacol* 76:1175-1183.
- Swandulla D, Schafer K, Lux HD (1986) Calcium channel current inactivation is selectively modulated by menthol. *Neurosci Lett* 68:23-28.
- Swandulla D, Carbone E, Schafer K, Lux HD (1987) Effect of menthol on two types of Ca currents in cultured sensory neurons of vertebrates. *Pflugers Arch* 409:52-59.
- Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP (2009) Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 8:733-750.
- Tassonyi E, Charpantier E, Muller D, Dumont L, Bertrand D (2002) The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain Res Bull* 57:133-150.
- Thompson AJ, Lummis SC (2007) The 5-HT₃ receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 11:527-540.
- Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* 346:967-989.

- Valera S, Ballivet M, Bertrand D (1992) Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9949-9953.
- Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, Dani JA (1992) Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 8:127-134.
- Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW (1989) Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 284:314-335.
- Watt EE, Betts BA, Kotey FO, Humbert DJ, Griffith TN, Kelly EW, Veneskey KC, Gill N, Rowan KC, Jenkins A, Hall AC (2008) Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABA(A) receptor with the intravenous agent, propofol. *Eur J Pharmacol* 590:120-126.
- Wong ET, Holstad SG, Mennerick SJ, Hong SE, Zorumski CF, Isenberg KE (1995) Pharmacological and physiological properties of a putative ganglionic nicotinic receptor, alpha 3 beta 4, expressed in transfected eucaryotic cells. *Brain Res Mol Brain Res* 28:101-109.
- Woolf NJ (1991) Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* 37:475-524.
- Wright A (1870) Oil of peppermint as a local anaesthetic. *Lancet* 2464:726.
- Xiao Y, Meyer EL, Thompson JM, Surin A, Wroblewski J, Kellar KJ (1998) Rat alpha3/beta4 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor stably expressed in a transfected cell line: pharmacology of ligand binding and function. *Mol Pharmacol* 54:322-333.
- Zarei MM, Radcliffe KA, Chen D, Patrick JW, Dani JA (1999) Distributions of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta2 subunits on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 88:755-764.
- Zhang J, Xiao Y, Abdrakhmanova G, Wang W, Cleemann L, Kellar KJ, Morad M (1999) Activation and Ca²⁺ permeation of stably transfected alpha3/beta4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 55:970-981.

8. Anhang

8.1 Materialien und Hersteller

Chemikalien	Hersteller
Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
(±)Epibatidindihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
D-(+)-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kalilauge 1N	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	KMF Laborchemie Handels GmbH Lohmar
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
(-)Menthol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge 1N	KMF Laborchemie Handels GmbH Lohmar
(-)Nikotinhydrogentartrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PBS Puffertabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Salzsäure 1N	Merck KGaA, Darmstadt
Sylgard 184	Dow Corning Co., Midland, MI, USA
Medien und Zusätze	Hersteller
Collagenase IA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Fetal Bovine Serum (FBS) / fötales	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Geneticin/G-418	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Streptomycin, Penicillin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypsin-EDTA (0,05%/0,02% in PBS)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zeocin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Materialien und Hersteller

Andere Materialien	Hersteller
Deckgläser rund 6 mm	Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
konische Röhrchen (Polypropylen) 15, 50	Becton, Dickinson and Co., NJ, USA
Eppendorf Röhrchen 0,5/1,5/2,0 ml	Eppendorf AG. Hamburg, Deutschland
Swinnex 47 mm Filterhalter (100µM-Nylon)	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Handschuhe	Kimberly-Clark Co., GA, USA
Pipetten 10-1000 µl	Eppendorf AG. Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10, 200, 500 µl	Eppendorf AG. Hamburg, Deutschland
Pipette Boy	Integra Biosciences AG, Chur, Schweiz
Serologische Pipetten 10, 20 ml	Sarstedt AG und Co., NJ, USA
Zellkulturschalen 35x10 mm, 25 cm ²	Becton, Dickinson and Co., NJ, USA
Geräte	
	Hersteller
Axiovert 40C Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
HERACell CO ₂ Inkubator	Kendro Laboratory Products GmbH
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr-Holding GmbH
Laminar flow Werkbank	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Megafuge 1.0R Zentrifuge	Kendro Laboratory Products GmbH
MGW M20 Wasserbad	Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königshofen, Deutschland
Komponenten der Patch-Clamp-Anlage	
	Hersteller
Axiovert 135 Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Borosilikat-Glas Kapillaren KIMAX-51®	Kimble Products, New Jersey, USA
Computer: Power Mac G4	Apple Computer Inc., CA, USA
DMZ- Universal-Pipettenpuller	Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH, Augsburg, Deutschland
Elektrodenhalter	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland
EPC 9 Patch-Clamp-Verstärker	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht
ITC-16 AD/DA interface	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht

Materialien und Hersteller

Faraday- Käfig	maßgefertigt
Fast Pressure-Applikationssystem (DAD-VM-8SP Superfusion System)	ALA Scientific Instruments, NY, USA
HBO 100 W Fluoreszenz Lampe	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Head-stage (probe) (Vorverstärker)	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht
Mikromanipulator LN	Luigs und Neumann GmbH, Ratingen
TDS 2012 Oszilloskop	Tektronix Inc., OR, Beaverton, USA
Perfusionspumpe Minipuls 2	Gilson Villiers le Bel, Frankreich
Silber/Silberchlorid Elektrode	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht
Vibrationsgeschützter Tisch	Technical Manufacturing Co., MA, USA
Zellkammer	maßgefertigt
Software	
Hersteller	
GraphPad Prism 3.03/4 Software	GraphPad Software Inc., San Diego, CA., USA
IGOR 4.09 Pro	Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA
Pulse + PulseFit	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht
TAC X 4.1.3. + TACFit X 4.1.3	Bruxton Corporation, Seattle, WA, USA

8.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dieter Swandulla danke ich für die Bereitstellung eines interessanten Themas. Seine konstruktiven Vorschläge und sein Wohlwollen trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Michael Hans für seine ausgezeichnete Betreuung, vor allem seine Geduld bei der Vermittlung elektrophysiologischer Fertigkeiten und der kontinuierlichen Motivation.

Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr danke ich herzlich für die Übernahme der Betreuung dieser externen Doktorarbeit.

Allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts und dabei insbesondere Marco Morsch, PD Dr. rer. nat. Seifollah Ahmadi, Christa Oleff, Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer und Hanne Bock sowie Joachim Sternberg und Margit Zweyer danke ich an dieser Stelle für die hervorragende und stets angenehme Zusammenarbeit.

Prof. Dr. rer. nat. Gerd Bendas und Prof. Dr. rer. nat. Horst Bleckmann danke ich hiermit herzlich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Auch den Mitarbeitern der Feinmechanik- sowie der Elektronikwerkstatt danke ich für die technische Unterstützung.

Birgit Wilhelm danke ich für die Hilfe bei der Textkorrektur.