

**Kinetische und pharmakologische Charakterisierung der molekularen
Effekte von n-Alkanolen auf humane 5-HT_{3A} Rezeptoren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

Anne-Marie Amélie Marguerite Decker
aus Luxemburg (Großherzogtum Luxemburg)

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Bernd W. Urban
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Christian Steinhäuser

Tag der Mündlichen Prüfung: 22. Juli 2011

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor Professor Dr. med. A. Hoeft

1 Inhaltsverzeichnis

2	Abkürzungsverzeichnis	5
3	Einleitung	7
3.1	Serotonin	7
3.2	Der 5-HT ₃ -Rezeptor: Typen, Aufbau und Lokalisation	8
3.3	Anästhetische Bedeutung ligandengesteuerter Ionenkanäle und ihrer pharmakologischen Eigenschaften	11
3.4	Problemstellung	13
4	Material und Methodik	17
4.1	Stabile Transfektion	17
4.2	Zellkultur	17
4.3	Elektrophysiologie: „Patch-clamp“ („voltage clamp“)	18
4.4	Superfusionssysteme	20
4.5	Fehlerquellen der Messapparatur	21
4.6	Lösungsapplikationen	22
4.7	Datenanalyse	26
4.7.1	Software	26
4.7.2	Analyse der Stromspuren	27
4.7.3	Statistik	30
4.8	Verwendete Substanzen	31
4.9	Herstellung der Lösungen	32
5	Ergebnisse	33
5.1	Ethanol	33
5.2	n-Butanol	40
5.3	n-Hexanol	49
5.4	n-Octanol	54
5.5	n-Decanol	59
5.6	n-Dodecanol	65
5.7	n-Tetradecanol	70
6	Diskussion	74
6.1	Methodische Fragen	74

6.2 Vergleich der verschiedenen n-Alkanole.....	75
6.3 Vergleich der (molekularen bis systemischen) Potenzen von n-Alkanolen	81
6.4 Komponenten der Wirkung von n-Alkanolen auf 5-HT _{3A} -Rezeptoren-vermittelte Ströme	83
6.5 Bedeutung der molekularen Größe der n-Alkanole hinsichtlich Funktion und Potenzverlust	84
6.6 Vergleich der n-Alkanole mit Propofol und Phenolderivaten	87
7 Zusammenfassung	91
8 Literaturverzeichnis	93
9 Danksagung.....	101
10 Lebenslauf	102

2 Abkürzungsverzeichnis

cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
ECS	extrazelluläre Lösung (<i>extracellular solution</i>)
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
GTP	Guanosintriphosphat
GΩ	Gigaohm
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen 293 (<i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration 50 %
ICS	intrazelluläre Lösung (<i>intracellular solution</i>)
kHz	Kilohertz
M	molar
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
-+	„minus-plus“ (Offen-Kanal-Applikation)
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
NCB 20 Zellen	Neuroblastom Zellen
nM	nanomolar
pA	Picoampère
PNS	peripheres Nervensystem
PONV	postoperative Übelkeit und Erbrechen (<i>postoperative nausea and vomiting</i>)
++	„plus-plus“ (Äquilibrium-Applikation)
s	Sekunde
μg	Mikrogramm
μM	mikromolar
τ _{off}	Desensibilisierungszeitkonstante
τ _{on}	Aktivierungszeitkonstante
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HT _{3A} -Rezeptor	5-Hydroxytryptamin _{3A} -Rezeptor
τ _{fast}	schnelle Zeitkonstante

τ_{slow}

langsame Zeitkonstante

ZNS

zentrales Nervensystem

3 Einleitung

3.1 Serotonin

Serotonin oder 5-Hydroxytryptamin ist ein biogenes Amin, das als Mediator und Neurotransmitter wirkt und Vorläufer von Melatonin ist. Die Biosynthese von Serotonin erfolgt aus Tryptophan durch Hydroxylierung und anschließende Decarboxylierung. Durch die Monoaminoxidase und die Aldehydoxidase wird Serotonin zu 5-Hydroxyindolessigsäure abgebaut und mit dem Harn ausgeschieden.

Serotonin hat als Neuromodulator und Neurotransmitter zahlreiche wichtige physiologische Funktionen sowohl im ZNS als auch im PNS und ist an vielfachen pathologischen Prozessen beteiligt. Als exzitatorischer Neurotransmitter beeinflusst Serotonin auch Systeme wie die Epinephrin- und Dopaminausschüttung im ZNS (Israili, 2001).

Von den ungefähr 10 mg Serotonin, welche im gesunden menschlichen Körper vorhanden sind, befinden sich 90 Prozent in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes. Die restlichen 10 Prozent verteilen sich im ZNS (vor allem in den Raphekernen) und in den Blutplättchen, hier vor allem in den Thrombozyten und in den Granula der basophilen Granulozyten (Gupta et al., 1995). Dabei übernehmen die enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes ungefähr 80 Prozent der Serotoninsynthese (Minami et al., 1996).

Serotonin vermittelt seine Wirkung über die untereinander sehr heterogenen 5-HT-Rezeptoren, von denen man 22 Subtypen unterscheidet, die sich in insgesamt 7 Familien einteilen lassen (5-HT1-7).

Serotonin führt zu einer Beeinflussung des Gefäßtonus der Arteriolen und führt je nach dem betroffenen Gewebe zu einer Arterioldilatation (Skelettmuskulatur) oder einer Arteriolenkonstriktion (Lunge und Niere). Am Herzen wirkt 5-HT positiv inotrop und chronotrop. An der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes, der Bronchien und in geringem Masse des Uterus führt Serotonin zu einer Tonisierung und Detonisierung.

Die Wirkungen im ZNS sind sehr komplex und Serotonin nimmt unter anderem Einfluss auf die Stimmung, den Schlaf-Wach-Rhythmus, die Nahrungsaufnahme, die Schmerzwahrnehmung und die Körpertemperatur (Pschyrembel, 2002).

Ein Mangel an Serotonin wird als Ursache der Entstehung von Depressionen diskutiert. Emesis, eine häufige Nebenwirkung nach Chemotherapie oder postoperativ, ist ebenfalls auf die Serotonin-Wirkungen zurückzuführen.

3.2 Der 5-HT₃-Rezeptor: Typen, Aufbau und Lokalisation

Der 5-HT₃-Rezeptor gehört zur Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle und unterscheidet sich somit von den anderen Serotoninrezeptoren (5-HT₁₋₇), welche alle G-Protein gesteuert sind und als metabotrope Rezeptoren bezeichnet werden (Derkach et al., 1989; Kilpatrick et al., 1990).

Ligandengesteuerte Ionenkanäle werden direkt durch den Liganden, das heißt durch Bindung des Transmittermoleküls, geöffnet. Bei metabotropen Rezeptoren hingegen stellt das Rezeptorprotein selbst keinen Ionenkanal dar, und die Transmitterbindung führt erst über eine Kaskade chemischer Prozesse (GTP vermittelt) zur Öffnung benachbarter Ionenkanäle.

Zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle gehören neben dem 5-HT₃-Rezeptor beispielsweise auch der inhibitorische GABA_A-Rezeptor, der Glycin-Rezeptor oder der nikotinische Acetylcholinrezeptor, wobei letzterer der Struktur des 5-HT₃-Rezeptors am ähnlichsten zu sein scheint (Reeves und Lummis, 2002). Der 5-HT₃-Rezeptor und der Acetylcholin-Rezeptor gehören desweiteren beide zur Familie der Cys-loop-Rezeptoren, welche in ihrer extrazellulären Domäne zwei Cysteine besitzen, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind und so eine Schleife bilden.

Der 5-HT₃-Rezeptor besteht aus fünf Untereinheiten, welche in ihrer Mitte eine zentrale ionenleitende Pore bilden (Abb. 1). Jede dieser fünf Untereinheiten ist aufgebaut aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne. Die Bindungsstelle für Agonisten und kompetitive Antagonisten befindet sich an der extrazellulären Domäne, welche somit eine therapeutische Zielangriffsstelle darstellt.

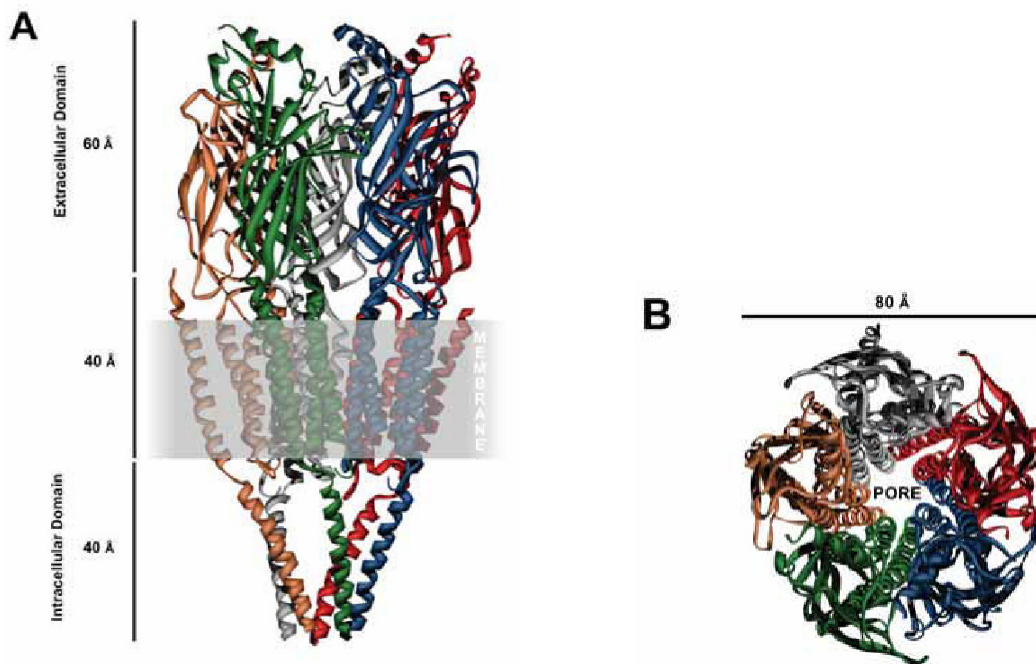


Abbildung 1: Homologes Modell des 5-HT₃ Rezeptors basierend auf einem kryoelektronischen Bild (4Å Auflösung) des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors (aus Thompson und Lummis, 2007). Die Figur A zeigt den Rezeptor von der Seite betrachtet, der graue Bereich stellt die Membran dar. Von dem intrazellulären Teil ist bisher nur bekannt, dass jede der Untereinheiten eine α -Helix enthält. Im intrazellulären Anteil werden die Kanalleitfähigkeit und Modulation reguliert. Der transmembranäre Teil besteht aus vier α -Helices (M1-M4) und einem kurzen C-Terminus. Die M2-Einheit enthält wichtige Strukturen, welche unter anderem die Ionenselektivität und die Kanalöffnung regulieren. Der extrazelluläre Teil enthält die Agonistenbindungsstelle sowie das N-terminale und C-terminale Ende der Peptidketten. Figur B zeigt den Rezeptor von oben betrachtet. Man erkennt die ionenleitende Pore.

Die zentrale Pore ist hauptsächlich permeabel für Natrium- und Kaliumionen. Kommt es zu einer Bindung des Neurotransmitters Serotonin an den 5-HT₃-Rezeptor, so öffnet sich der Ionenkanal, und es kommt zu einem schnell aktivierenden und wieder de-sensitivierenden Einwärtsstrom, welcher zu einer exzitatorischen Nervenantwort führt (Derkach et al., 1989; Maricq et al., 1991). Einzelne 5-HT₃-Rezeptoren (homopentamere Form) sind ferner für Kalziumionen und kleine organische Kationen permeabel (Yang, 1990).

Bisher sind die Gene für fünf Formen (A-E) der Untereinheiten des 5-HT₃-Rezeptors bekannt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem 5-HT_{3A}-Rezeptor gearbeitet. Dabei handelt es sich um die einzige funktionstüchtige homopentamere Form. Alle heteropentameren Formen sind nur funktionstüchtig, wenn sie mit 5-HT_{3A}-Untereinheiten kombiniert sind (Davies et al., 1999). Bei den heteropentameren Formen handelt es sich überwiegend um eine Kombination aus 5-HT_{3A} und 5-HT_{3B} Unterein-

heiten. Die heteropentamere Form unterscheidet sich vom homopentameren Typ des weiteren durch zum Teil unterschiedliche elektrische und pharmakologische Eigenschaften (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999). Gene für die C-E Untereinheiten wurden zwar beschrieben, aber bisher ist es noch nicht gelungen, diese funktionell näher zu charakterisieren (Niesler et al., 2003).

5-HT₃-Rezeptoren befinden sich sowohl im ZNS als auch im PNS. Die Aktivierung dieser Rezeptoren im PNS lässt eine Beteiligung an diversen sympathischen, parasympathischen und sensorischen Funktionen vermuten (Jackson und Yakel, 1995; Morales und Wang, 2002; Tecott et al., 1993). Peripher befinden sich die 5-HT₃ Rezeptoren besonders im Gastrointestinaltrakt, was auch ihre Beteiligung an der Emesis erklärt. Hier findet man sie sowohl in den myenterischen Plexus als auch in der Kolon-schleimhaut, wo sie die Motilität und Peristaltik des Darmes regulieren (Galligan, 2002; Sakurai-Yamashita et al., 1999; Gershon, 1991). Desweiteren befinden sie sich im Urogenitaltrakt und in den kardialen vagalen Afferenzen (Saxena und Villalon, 1991).

Im ZNS ist der 5-HT₃-Rezeptor unter anderem an den Mechanismen der kognitiven Leistung, Angst und Emesis beteiligt. In besonders hoher Dichte befindet er sich in den Kernen des unteren Hirnstamms, vor allem in den Regionen, welche am Würgereflex beteiligt sind, wie der Area postrema oder dem Nucleus tractus solitarius (Miquel et al., 2002), und daher die Beteiligung an der Emesis erklären. Im dorsalen motorischen Kern des Nervus vagus ist er ebenfalls vorzufinden. In geringerer Dichte befindet er sich im Kortex, Teilen des limbischen Systems (Hippocampus, Amygdala und Septum), der Area subcorticalis (Nucleus accumbens und Hypothalamus) und im Rückenmark (Barnes et al., 1990; Ohuoha et al., 1994; Parker et al., 1996; Reynolds et al., 1989).

Die Aktivierung des 5-HT₃-Rezeptors verstärkt die Ausschüttung anderer wichtiger Neurotransmitter wie Dopamin, GABA, Cholezystokinin, Substanz P und Acetylcholin.

Der Rezeptor befindet sich sowohl in der prä- wie auch in der postsynaptischen Nerven-
endigung (Katsurabayashi et al., 2003; Nayak et al., 1999).

3.3 Anästhetische Bedeutung ligandengesteuerter Ionenkanäle und ihrer pharmakologischen Eigenschaften

Obwohl wenig Einigkeit darüber herrscht, wo und wie Allgemeinanästhetika wirken, wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Studien durchgeführt, welche potenzielle Angriffsstellen dieser Wirksubstanzen im ZNS untersuchten. Das Hauptinteresse fokussierte dabei auf Nervenmembranen und spezieller noch, auf neuronale Ionenkanäle und deren regulierende Mechanismen.

Es stellte sich heraus, dass Anästhetika, welche in narkotisierenden Konzentrationen appliziert wurden, mehr Effekte an ligandengesteuerten als an spannungsgesteuerten Ionenkanälen ausübten (Franks und Lieb, 1994). Ferner waren Anästhetika in der Lage, die Funktion der ligandengesteuerten Ionenkanäle zu verändern (Franks und Lieb, 1994). Daraufhin folgten viele Studien an Rezeptoren dieser Familie, einschließlich des 5-HT₃-Rezeptors.

Die Einführung der „Patch-Clamp“ Methode machte es möglich, anhand von Veränderungen des induzierten Stromes die Beeinflussung der Rezeptorfunktion durch Anästhetika zu untersuchen.

Die Kombination der „Patch-Clamp“ Methode mit einem schnellen Lösungssystem (Brett et al., 1986), erlaubte eine höhere Auflösung der Messungen (Barann et al., 1997). So konnte beispielsweise die Messung von Kanaleffekten wie der Deaktivierung ligandenaktivierter Kanäle untersucht werden. An „excised outside-out Patchen“ konnte auch die Kanalblockade in einer viel feineren Zeitskala als beispielsweise bei den Oozyten (Yakel et al., 1993) oder „Whole-cell“-Experimenten (Jenkins et al., 1996) aufgelöst und registriert werden. Die Rate des Lösungsaustausches war dabei mindestens 10 Mal größer als die schnellste registrierte Aktivierungszeit, was eine Unterscheidung der Kinetik des Stromeffektes von der Kinetik des Lösungsaustausches erlaubte (Barann et al., 1997).

Man unterscheidet bei ligandengesteuerten Ionenkanälen zwischen mindestens drei empirischen Zuständen: geschlossen erregbar, offen und geschlossen nicht erregbar. Verschiedene andere Rezeptor-Zustände werden diskutiert (Mott et al., 2001).

Die Größe des Ionenstroms hängt sowohl von der Anzahl der sich öffnenden Kanäle als auch von der Dauer des geöffneten Zustandes dieser Kanäle ab. Am 5-HT₃-Rezeptor aus N1E-115 Zellen war die induzierte Stromantwort bei einer 5-HT Konzentration von 30 µM quasi maximal. Wurde die Konzentration von 5-HT vermindert, so konnte eine Verlangsamung der Kinetiken der Aktivierung und der Desensibilisierung beobachtet werden (Barann et al., 1997; Jenkins et al., 1996). In Doppelpulsexperimenten fand man heraus, dass erst ab einem Zeitintervall zwischen zwei 5-HT Impulsen von über 45 s die Agonistenapplikation wieder eine maximale Stromantwort auslösen konnte (Barann et al., 1997).

Zelllinien, die humane 5-HT₃-Rezeptoren in ausreichender Dichte exprimierten, waren zu jenem Zeitpunkt noch nicht verfügbar. Demzufolge wurde versucht, humane 5-HT_{3A}-Rezeptoren in HEK 293 Zellen zu exprimieren, um diese dann mit den bereits untersuchten nativen 5-HT₃-Rezeptoren zu vergleichen. Die homopentamere Form (5-HT_{3A}-Rezeptor) war dabei aufgrund ihrer pseudosymmetrischen Stöchiometrie ein hilfreiches Modell, um die Wirkung von anästhetischen Substanzen am Rezeptor zu untersuchen.

Wie sich herausstellte, ähnelten sich die nativen 5-HT₃-Rezeptoren in N1E-115 Zellen und die stabil transfizierten 5-HT_{3A}-Rezeptoren in HEK 293 Zellen, was ihre pharmakologischen Eigenschaften anbelangte (Barann, 2000). Die respektiven 5-HT Konzentrations-Wirkungskurven wiesen ähnliche EC₅₀-Werte und Steilheiten auf. Die Erholung von der (30 µM) 5-HT-induzierten Desensibilisierung war auch beim 5-HT_{3A}-Rezeptor nach 45 s komplett. Die Desensibilisierungskinetik hingegen war beim 5-HT_{3A}-Rezeptor etwa doppelt so schnell (160 ± 30 ms versus 260 ± 25 ms). Auch die Aktivierungszeitkonstanten waren bei beiden Typen ähnlich (Barann, 2000). Die durch 30 µM 5-HT induzierten Ströme zeigten beim 5-HT_{3A}-Rezeptor durchschnittlich eine Amplitude von -110 pA bei -100 mV (Barann et al., 2000).

Die Kombination der „Patch-Clamp“ Methode mit einem schnellen Lösungsapplikationssystem ermöglichte somit die Untersuchung des humanen 5-HT_{3A}-Rezeptors sowie dessen Beeinflussung durch Anästhetika und anästhetika-ähnliche Substanzen. Sie erlaubte damit, eventuell Hinweise auf einige der Anästhesie zugrundeliegenden Mechanismen zu erlangen.

3.4 Problemstellung

Lange bevor vor 160 Jahren die Allgemeinnarkose mittels Diethyl-Ether eingeführt wurde, dienten über Jahrhunderte hinweg Alkohole der Schmerzbekämpfung während chirurgischer Eingriffe. Desweiteren verwendete man in der Anästhesie erfolgreich den Alkoholen verwandte Substanzen wie andere Ether oder auch Alkane. Dennoch wurden Alkohole in der Allgemeinanästhesie nie umfangreich benutzt. Betrachtet man die Strukturformel von Alkoholen, welche aus einer hydrophoben Kette und einer polaren Hydroxylgruppe bestehen, ist deren Struktur vergleichbar mit den Phenolen, welche ebenfalls aus einer hydrophoben und einer polaren Gruppe bestehen. Schaut man sich nun das wohl heute meist benutzte intravenöse Anästhetikum Propofol an, so handelt es sich dabei um ein Phenolderivat.

Vorangegangene Studien mit Propofol und strukturverwandten Phenolderivaten am 5-HT_{3A}-Rezeptor zeigten, dass Propofol die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals weniger potent verändert hatte als andere intravenöse Anästhetika und eher die Eigenschaften eines Inhalationsanästhetikums aufwies.

Dennoch zeigten „Patch-clamp“ Experimente an „excised outside-out Patchen“ mit Propofol und strukturverwandten Phenolderivaten komplexe Wirkungen am 5-HT_{3A}-Rezeptor, welche sowohl die Amplituden als auch die Kinetiken der 5-HT-induzierten Ströme betrafen. Während alle gemessenen Substanzen inhibierende Eigenschaften aufwiesen, zeigte sich ein Verlust (sogenannter Cutoff Effekt (Mullins, 1954)) des potenzierenden Effektes zwischen den kürzeren Phenolderivaten und Propofol (Barann et al., 2008). Die phenolische Hydroxylgruppe, hydrophobe Interaktionen und sterische Restriktionen erwiesen sich dabei an den beobachteten Effekten maßgeblich beteiligt.

Um diese Wirkmechanismen näher zu untersuchen, wurden in der folgenden Dissertation Mitglieder aus der homologen Reihe der einwertigen, primären, linearen, unverzweigten Alkohole (n-Alkanole) am 5-HT_{3A}-Rezeptor in „excised outside-out Patches“ untersucht. Die n-Alkanole sind mit Propofol und ähnlichen Phenolderivaten strukturverwandt, da sie ebenfalls aus einer hydrophoben Domäne und einer polaren Hydroxylgruppe bestehen. Strukturell gesehen sind sie jedoch einfacher aufgebaut.

Insgesamt wurden sieben n-Alkanole gemessen, begonnen mit Ethanol, dem sukzessive jeweils zwei Kohlenstoffatome hinzugefügt wurden. Vergrößert man die Kettenlänge des n-Alkanols, so verändern sich dessen physikochemischen Eigenschaften. Bei länger-kettigen n-Alkanolen verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen hydrophoben und polaren Interaktionen zugunsten der hydrophoben Eigenschaften, ohne dass sich dabei die Struktur des n-Alkanols verändert.

Im Gegensatz zu den n-Alkanolen wird die polare Hydroxylgruppe bei den alkylierten Phenolen, wie 2-Isopropylphenol oder Propofol, jeweils von einer oder von zwei Isopropylgruppen umgeben. Eventuell wird so die Erreichbarkeit der Hydroxylgruppe im Vergleich zu den n-Alkanolen beeinträchtigt.

Um Gewissheit darüber zu erlangen, ob die vereinfachte Struktur der n-Alkanole auch in weniger komplexen Effekten auf den 5-HT induzierten Strom resultiert, wurden in der folgenden Arbeit die durch n-Alkanole und Phenolderivate sowie Propofol induzierten 5-HT Ströme miteinander verglichen. Dabei ging es weniger darum die Wirkungen jedes n-Alkanols am 5-HT_{3A}-Rezeptor zu detailliert zu untersuchen, als vielmehr darum, das Verhalten aller untersuchten n-Alkanole in der Gesamtschau untereinander und später mit verwandten Substanzen wie den Phenolderivaten zu vergleichen. Desweiteren wurde versucht herauszufinden, ob veränderte elektrophysiologische Eigenschaften auf bestimmte physikochemische funktionelle Gruppen dieser Moleküle zurückgeführt werden können.

Die beobachteten strompotenzierenden Eigenschaften der Phenolderivate schienen bei Propofol wegen des größeren molekularen Volumens und/oder sterischen Interaktionen

zu fehlen oder unmöglich geworden zu sein (Barann et al., 2008). Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, bieten sich n-Alkanole an, da auch hier ein Verlust des strompotenzierenden Effektes ab einer Kettenlänge um 6 Kohlenstoffatome nachgewiesen wurde (Stevens et al., 2005b; Jenkins et al., 1996).

Während in Gegenwart von Propofol, welches 12 Kohlenstoffatome besitzt, die 5-HT₃-Rezeptor-Ströme immer noch inhibiert wurden, wurde für die n-Alkanole ein Cutoff Effekt der Inhibierung über einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen (n-Tetradecanol) beschrieben (Jenkins et al., 1996). Der Cutoff des potenzierenden Effektes ereignete sich also bei kürzerer Kettenlänge als der Cutoff der Inhibierung (Jenkins et al., 1996; Stevens et al., 2005b).

In der Vergangenheit wurde der Cutoff Effekt oftmals darauf zurückgeführt, dass die Substanzen entweder den Wirkort nicht mehr erreichten (Pringle et al., 1981; Rodriguez et al., 1988) oder die Bindungstasche eine limitierte Größe besaß, in die die Substanzen ab einer gewissen Kettenlänge nicht mehr hineinpassten. Um diese Problematik besser verstehen oder zumindest näher analysieren zu können, wurden Methoden verwendet, die erlaubten, sowohl die Stromkinetiken als auch die Effekte der zu untersuchenden Substanzen auf die Stromkinetik im Millisekundenbereich aufzulösen.

Es wurden folglich „excised outside-out Patche“ in Kombination mit einem schnellen Lösungsaustauschsystem benutzt, was die Anzahl der als Senke für hydrophobe Substanzen dienenden Membranen zwischen Rezeptor und Applikationssystem minimierte (Rodriguez et al., 1988). Als Prototyp von ligandengesteuerten Ionenkanälen wurden 5-HT_{3A}-Rezeptoren benutzt. Diese Experimentkonfiguration erlaubte die kinetische Unterscheidung verschiedener anästhetischer Wirkungen sowie die Untersuchung der Effekte der n-Alkanole auf die Stromkinetiken.

Die Ziele dieser Experimente waren:

1. Identifizierung der einzelnen Komponenten der Wirkung von n-Alkanolen auf 5-HT_{3A}-Rezeptoren-vermittelte Ströme

2. Untersuchung der Bedeutung der molekularen Größe der n-Alkanole hinsichtlich Funktion und Potenzverlust
3. Vergleich der Wirkungen von n-Alkanolen mit strukturverwandten Phenolderivaten einschließlich Propofol am 5-HT_{3A}-Rezeptor.

4 Material und Methodik

4.1 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird ein fremdes Gen fest ins Genom einer Zelllinie integriert, um somit eine dauerhafte Expression dieses Gens zu erreichen. Die Transfektion sowie die Überprüfung der erfolgreichen Transfektion erfolgte durch Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie (AG Bönisch/Brüss) der Universität Bonn.

Mit Hilfe der modifizierten Calcium-Phosphat-Methode (Chen und Okayama, 1987), welche ein einfaches Aufnehmen der DNA in die Zelle gewährleistete, wurden 20 % konfluente HEK 293 Zellen durch den pCDNA3 (invitrogen) Vektor unter Kontrolle des humanen Zytomegalievirus Promotors stabil mit der h5-HT_{3A} cDNA transfiziert.

Zwei Tage nach der stabilen Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von Geneticin (800 µg/ml) selektioniert. Das Medium wurde regelmäßig alle 2 Tage gewechselt. Nachdem einzelne Zellkolonien entstanden waren, wurden diese mit Hilfe von Klonzylindern (Sigma) herausgetrennt. Anschließend wurden diese Kolonien in 24-fachen Kulturplatten (Falcon) kultiviert, bis sie konfluerten. Die Überprüfung der erfolgreichen Expression des humanen 5-HT_{3A}-Rezeptors gelang schließlich, indem bei jeder Transfektion 20-40 Kolonien mit [¹⁴C] Guanidinium influiert wurden und die Bindung des selektiven 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten ([³H]GR 65630) [3-(5-methyl-1H-imidazol-4-yl)-1(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1-propanone] erfolgte, oder durch spezielle [³H]5-HT Aufnahmeexperimente. Schließlich wurden die Kolonien mit der besten Expression für die weiteren Experimente verwendet.

Die von uns benutzte Zelllinie HEK 293 war einfach zu kultivieren und leicht zu transfizieren.

4.2 Zellkultur

Die HEK 293 Zellen wurden in DMEM nutrient mix F12 (1:1; v/v) Medium, welches 10 % durch Hitze inaktiviertes fetales Kälberserum, Penicillin (100 I.U./ml), Streptomycin (100 µg/ml), Geneticin (0,75 mg/ml) und Glutamin (292 µg/ml) enthielt, bei 37° ange-

feuchteter (5 % CO₂) Luft in einem speziellen Brutschrank (Typ BB16, Fa Heraeus, Deutschland) kultiviert. Sieben bis elf Tage vor einem Patch-Clamp-Experiment wurden die Zellen in Petrischalen (Nunc, 35 mm Durchmesser) subkultiviert. Ein Teil der Zellen wurde für eine neue Zellkulturflasche verwendet. Die verwendete Zellcharge wurde in regelmäßigen Abständen (ungefähr alle 3 Monate) verworfen und ersetzt. Hierfür wurden neue HEK 293 Zellen, welche bei –80 °C in 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufbewahrt waren, aufgetaut und nach Reinigung in eine neue Zellkulturflasche gebracht. Anschließend erfolgte der gleiche wie oben beschriebene Vorgang.

4.3 Elektrophysiologie: „Patch-clamp“ („voltage clamp“)

Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakman entwickelt, um einzelne Ionenkanäle in biologischen Membranen zu untersuchen (Hamill et al., 1981). Diese Methode erlaubte die Ableitung von transmembranären Strömen einzelner Zellen und Gewebe. Man konnte dabei entweder die Ströme durch die gesamte Zellmembran messen (Cell-attached-Konfiguration oder Whole-cell-Konfiguration) oder, wie Bert Sakman und Owen Hamill später herausfanden, durch Zurückziehen der Pipette ein Membranstück aus der Zelle herausreißen und dann nur die in dieser Membran vorhandenen Kanäle zellfrei messen („inside-out“-Konfiguration oder „outside-out“-Konfiguration, (Numberger und Draguhn, 1996)).

Für die Experimente dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der „outside-out“-Konfiguration gearbeitet. Dabei schloss sich das herausgezogene Membranstück über der Pipettenmündung zu einer Art Halbvesikel. Die Außenseite der Zellmembran war hierbei der Badlösung zugewandt. Diese Methode eignete sich sehr gut für die Untersuchung von ligandengesteuerten Ionenkanälen, da Substanzen leicht von außen auf den „Patch“ appliziert werden konnten (Numberger und Draguhn, 1996).

Um ein Experiment durchzuführen, benötigte man Pipetten mit einem Widerstand von 2-6 MΩ. Diese wurden hergestellt, indem man aus einer Borosilikat-Glaskapillare (Kwik-FilTM, World Precision Instruments, USA) mit Hilfe eines Pipettenziehgerätes (List L/M-3P-A) zwei gleichlange Pipetten gewann. Die Pipettenspitzen wurden in der „Mikroforge“

(L/M-CPZ 101, List-Medical–Elektronik, Darmstadt) poliert und kurz vor dem Experiment von hinten (back filling) mit einer Spritze, deren Plastikspitze über dem Bunsenbrenner zu einer feinen Kapillare ausgezogen worden war, mit Elektrolytlösung gefüllt. Die Zusammensetzung der Elektrolytlösung entsprach der der intrazellulären Flüssigkeit. Zwischenzeitlich bewahrte man die noch unbenutzten polierten Pipetten maximal einige Stunden in einer Schachtel auf, wo sie gleichzeitig vor Verschmutzung geschützt waren. Vor Beginn des Experimentes wurde das Zellkulturschälchen mit einer dem extrazellulären Medium angepassten Lösung, welche zusätzlich Glucose enthielt, gefüllt (Badlösung) und unter das Mikroskop (inverses Mikroskop) gestellt.

In das Lumen der gefüllten Pipette wurde anschließend eine Silberchloridelektrode platziert, welche mit dem mechanischen Manipulator verbunden war. Eine weitere Elektrode wurde in der Badlösung fixiert.

Nun wurde die Pipette mit Hilfe des Manipulators in die Badlösung getaucht und unter Mikroskopkontrolle vorsichtig einer ausgewählten Zelle angenähert. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurde die Pipettenspitze an die Zelloberfläche geführt, bis sie diese berührte. Durch leichtes Ansaugen der Zellmembran mit Hilfe einer Vakuumspritze konnte der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Membran so stark erhöht werden, dass ein sogenannter „Seal“ entstand. Es handelte sich hierbei um einen Widerstand im Bereich mehrerer GΩ. Dieser hohe Widerstand ermöglichte eine erhebliche Reduktion des elektrischen Hintergrundrauschens und der „Leckströme“ (Numberger und Draguhn, 1996). Mittels weiterem Unterdruck wurde die Zelle aufgerissen. Durch vorsichtiges Zurückziehen der Pipette wurde das der Pipette anliegende Membranstück aus der Zelle herausgerissen, welches sich dann spontan verschloss. Dabei wurde das Innere der Pipette mit der intrazellulären Membranfläche in Kontakt gebracht, und die äußere Membranfläche war der Badlösung zugekehrt.

Die ursprüngliche Haltespannung von 0 mV wurde kurz vor der Serotonin-Applikation über die Pipettenelektrode auf -100 mV hyperpolarisiert. Da mit Hilfe eines Vorverstärkers die Spannung konstant gehalten wurde und sich nicht ändern konnte, kam es bei einer Öffnung der Kanäle und damit Abfall des Widerstandes zu einem kompensatorischen Strom, der dem Stromfluss durch die Ionenkanäle entsprach ($U = R \times I$,

U= Haltespannung, R= Widerstand, I= Strom). Ein computergesteuerter Verstärker erfasste das Signal, die analogen Daten wurden bei 1 kHz gefiltert (entweder Frequency Devices, MA, USA oder LPBF-48DG, NPI Electronic, Tamm, Deutschland) und anschließend digitalisiert (Digidata 1200, Axon, Kalifornien, USA). Die Aufnahme­frequenz betrug 2 kHz. Anschließend wurde die Haltespannung wieder auf 0 mV gestellt. Unter diesen Bedingungen wurde die Stabilität der „Patche“ und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse optimiert.

4.4 Superfusionssysteme

Da es sich bei der Analyse von ligandengesteuerten Ionenkanälen wie dem 5-HT_{3A}-Rezeptor zum Teil um sehr schnelle Prozesse handelte, benötigte man ein Applikationssystem, welches den Lösungswechsel in kürzerer Zeit vornahm als die Zeitkonstante der schnellsten Veränderung, die man untersuchen wollte (Numberger und Draguhn, 1996). Mit dem für diese Arbeit verwendeten Lösungsapplikationssystem (RSC 200, Biologic, Frankreich) war es möglich, einen Lösungswechsel innerhalb von ~2 ms zu erreichen.

Die Lösungen wurden über einen drehbaren Superfusionskopf in die Petrischale appliziert. Am Superfusionskopf waren 5-9 Glaskapillaren nebeneinander fixiert, welche jeweils über einen Teflon[®]-Schlauch mit einem Glasreservoir verbunden waren. Es wurden Teflon[®]-Schläuche benutzt, weil diese inert gegenüber den meisten chemischen Substanzen waren und somit einen Substanzverlust reduzierten (Barann et al., 2000).

Die Glasreservoirs wurden mit den zu applizierenden Lösungen befüllt. Zwischen Teflon[®]-Schlauch und Glasreservoir befand sich ein im Krankenhaus gebräuchliches Infusionsbesteck, welches über die Tropfkammer eine Kontrolle des effektiven Substanzflusses ermöglichte. Weiterhin wurde zwischen den Schlauch des Infusionsbesteckes und den Teflon[®]-Schlauch ein ~3 cm langer Silikon-Quetschschlauch geschaltet. Dieser wurde in das Ventil des Superfusionssystems (RSC 200, Biologic, Frankreich) eingeklemmt. Das gesamte Superfusionssystem hatte eine Länge von ~1-1,5 m.

Nun wurde der „Patch“ in der Petrischale vor das Glasröhrchen positioniert, welches mit dem Glasreservoir mit der anfänglich gewünschten zu applizierenden Substanz verbunden war. Mittels der Messsystem-gesteuerten Quetschventile konnte nun schnell zwischen den einzelnen Lösungen gewechselt werden, wobei sich der Superfusionskopf auf Kommando des Computers innerhalb von ~32 ms drehte.

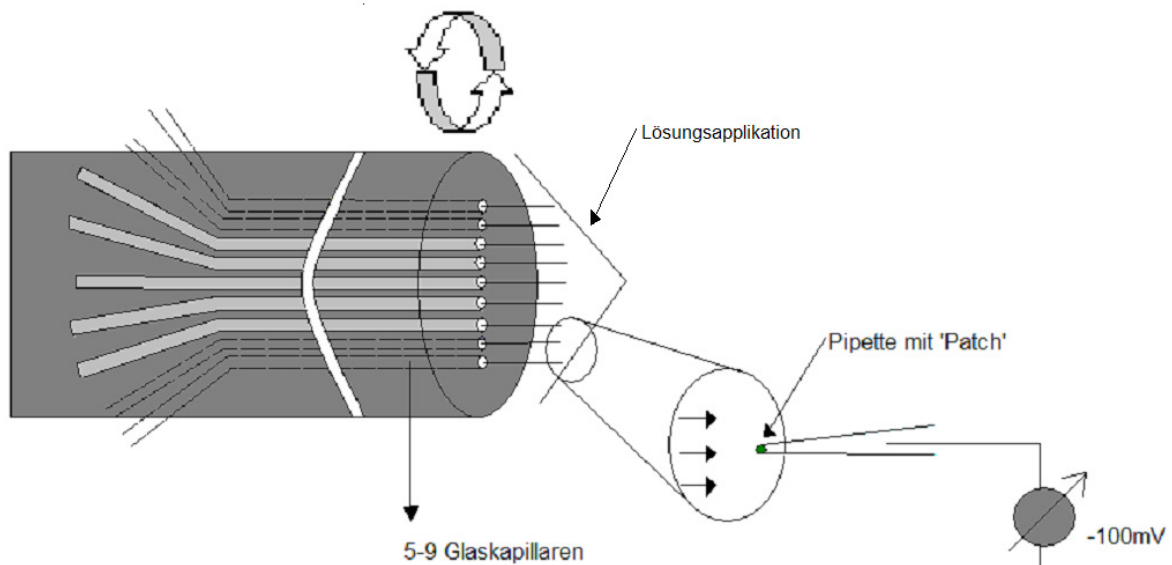


Abbildung 2: Illustration des rotierbaren Superfusionskopfes. Aus den 5-9 Glaskapillaren am Superfusionskopf wird alternativ Substanz auf den sich an der Pipettenspitze befindlichen „Patch“ appliziert. Es liegt eine Haltespannung von -100 mV an.

4.5 Fehlerquellen der Messapparatur

Untersuchungen, in denen die sonst mit n-Alkanol befüllten Glasreservoirs stattdessen mit der gleichen ECS bzw. ECS + 5-HT wie die Kontrollreservoirs befüllt waren (Negativkontrollen) zeigten, dass die Abweichungen der durch die respektiven 5-HT Lösungen ausgelösten Ströme in Bezug auf ihre Amplituden im Mittel weniger als 5 % abwichen (Witten, 2010). Mögliche systematische Fehler könnten bedingt sein durch:

- Verunreinigung des Schlauchsystems,
- Weichmacher oder andere Substanzen, welche sich in den Schläuchen befanden und sich gegebenenfalls lösen konnten,

sowie c) Auftreten von Kanalverlust-Ereignissen, welche nicht immer kontinuierlich auftraten und somit zu Auswertungsfehlern führen konnten.

Um diese Fehlerquellen weitestgehend zu vermeiden, wurde das gesamte Lösungsapplikationssystem täglich gespült und das Schlauchsystem in regelmäßigen Abständen komplett gewechselt. Die Glasreservoirs wurden dabei mitsamt des Infusionsbesteckes bei jeder neuen Substanz ausgewechselt.

Andere in diesen Experimenten aufgefallene mögliche Fehlerquellen bei der Aufzeichnung der Ströme bestanden dann, wenn:

d) der Patch trotz bestmöglicher Einstellung vor den Glaskapillaren des Superfusionskopfes nicht optimal von den Lösungen getroffen wurde,

e) Blasen sich innerhalb der zum Superfusionskopf führenden Teflon[®]-Schläuche befanden,

oder f) die Lösungen in den Glasreservoirs während eines Experimentes leer gelaufen waren.

Im Gegensatz zu den Fehlerquellen in a), b) und c), welche nicht immer sofort bei der Betrachtung der Stromspuren auffielen, führten die Fehlerquellen in d), e) und f) jeweils zu so prägnanten Fehlern in den Stromaufzeichnungen, dass der Fehler sofort auffiel, behoben und die Messung wiederholt werden konnte.

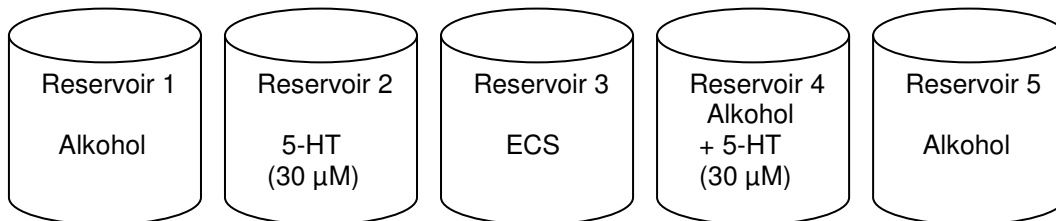
Im Hinblick auf den dennoch bestehenden bis zu fünfprozentigen systematischen Fehler der Messungen mussten insbesondere sehr geringe Substanzeffekte vorsichtig gedeutet werden und diese durch geeignete Kontrollen (z.B. Vertauschen der mit Substanz bzw. ECS befüllten Glasreservoirs) überprüft werden.

4.6 Lösungsapplikationen

Zu Beginn wurden die Experimente mit fünf Glasreservoirs durchgeführt (5-Wege-System). Je nach Verteilung der Lösungen in diesen fünf Glasreservoirs konnten verschiedene Lösungsapplikationsprotokolle durchgeführt werden. Die Protokolle wurden

auf einem Computer, der an das Superfusionssystem angeschlossen war, mithilfe des Programmes RSC 200 (Biologic, Frankreich) geschrieben und gesteuert.

Anhand folgender Anordnung der Lösungen wurden zwei verschiedene Applikationsarten durchgeführt (++) und (-+):



1) Äquilibrium-Applikation (++): Die Substanz wurde 60 s vor der 5-HT Gabe präappliziert und während der 5-HT-Gabe weiter gegeben.

2) Offen-Kanal-Applikation (-+): Die Substanz wurde ausschließlich während der 5-HT-Gabe appliziert

Der Agonist 5-HT wurde in einer Konzentration von 30 μ M gewählt, da so ein nahezu maximaler und reproduzierbarer Strom gemessen werden konnte. Während des Experimentes wurden dreimal hintereinander abwechselnd Kontrolle (Applikation von 30 μ M 5-HT) und Messung mit Substanz durchgeführt. Zwischen jeder Messung wurde der „Patch“ 60 s mit ECS-Lösung ausgewaschen. Nach diesem Zeitintervall war die Desensibilisierung der Rezeptoren vollkommen aufgehoben und diese wiederum aktivierbar.

Bei der Anordnung der Lösungen in den Glasreservoirs wurde darauf geachtet, dass zwischen dem Auswasch bzw. der Substanzapplikation (60 s lang vor der 5-HT-Gabe) und der 5-HT-Applikation bei der Messung, keine Glaskapillare am Superfusionskopf übersprungen werden musste.

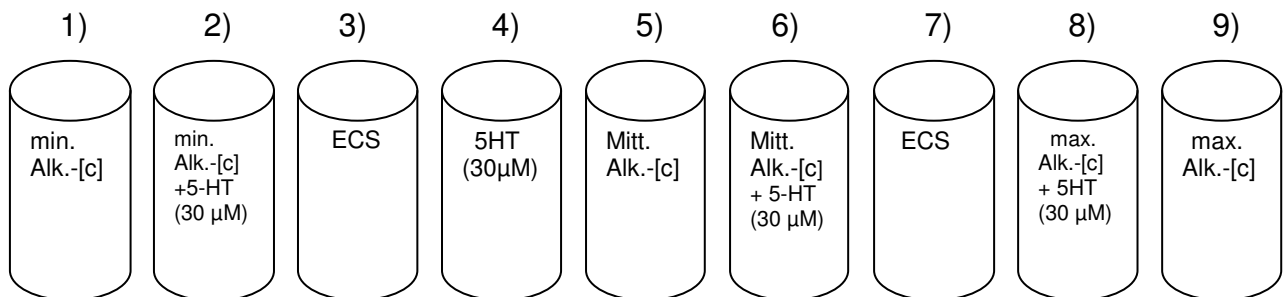
Der Nachteil des 5-Wege-Systems bestand darin, dass es damit nicht möglich war, verschiedene Konzentrationen einer Substanz und mehrere Applikationsarten an einem „Patch“ zu untersuchen.

Somit kam es zur Entwicklung einer neuen Anordnung der Glasreservoirs. Die Zahl der Glasreservoirs und somit der Glasröhrchen am Superfusionskopf wurde von fünf auf neun erweitert. Dieses 9-Wege-System erlaubte die Applikation von drei verschiedenen Substanzkonzentrationen in zwei Applikationsmodi an einem Patch, was die Anzahl der zur statistischen Signifikanz benötigten Experimente reduzierte.

Als Applikationsformen wurde auch in diesen Experimenten Offen-Kanal und Äquilibrium gewählt.

Die Anordnung gestaltete sich folgendermaßen:

Reservoir:



min. Alk.-[c]= niedrigste n-Alkanol Konzentration

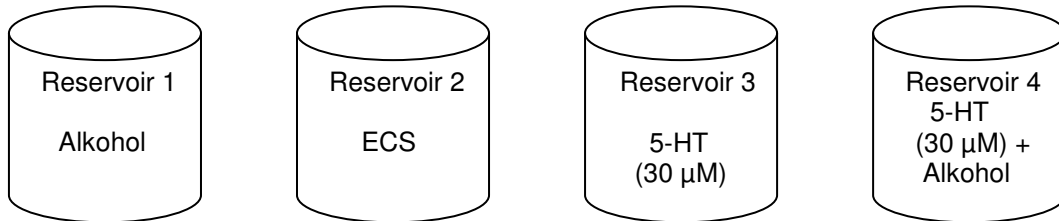
mitt. Alk.-[c]= mittlere n-Alkanol Konzentration

max. Alk.-[c]= höchste n-Alkanol Konzentration

Das experimentelle Protokoll entsprach folgender Sequenz: Kontrolle, niedrigste n-Alkanol Konzentration, Kontrolle, mittlere n-Alkanol Konzentration, Kontrolle, höchste n-Alkanol Konzentration, Kontrolle, niedrigste n-Alkanol Konzentration... und die Sequenz wurde solange wiederholt, wie der „Patch“ überdauerte. Dabei wurde jeweils mit der niedrigsten n-Alkanol Konzentration begonnen. Wie bei den vorherigen Experimenten wurde zwischen den 5-HT-Gaben bzw. den Substanzgaben 60 s lang mit ECS gespült.

Da n-Hexanol und n-Octanol zuerst untersucht wurden, wurden diese Substanzen noch ausschließlich mit dem 5-Wege-System gemessen. n-Decanol wurde zuerst mit dem 5-Wege-System und nach Einführung des neuen Messsystems (9-Wege-System) vergleichend auch mit diesem System gemessen.

Für die Einwaschexperimente war eine weitere Anordnungsänderung der Lösungen nötig. Hier genügten 4 Glasreservoirs, welche folgendermaßen befüllt wurden:



Bei den Einwaschexperimenten wurde als Substanzkonzentration vorzugsweise die durch vorherige Experimente ermittelte Äquilibrium-IC₅₀-Konzentration gewählt. Das heißt die Konzentration, bei der eine Hemmung der Stromamplitude um 50 % erreicht wurde.

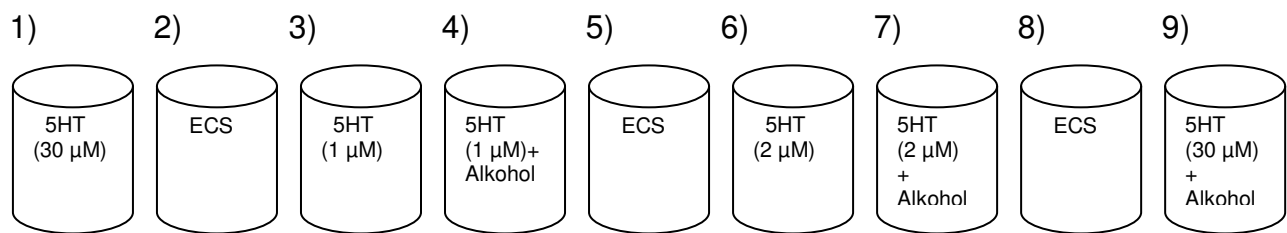
Die Einwaschexperimente wurden ähnlich wie ein Äquilibrium-Experiment durchgeführt. Während die Substanz im Äquilibriummodus 60 s präappliziert und anschließend während der 5-HT-Gabe weitergegeben wurde, wurde im Einwaschexperiment das übliche Präapplikationszeitintervall (60 s) vor der 5-HT Gabe variiert. Die Präapplikationszeiten für die Einwaschexperimente betragen 32 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 1 s, 3 s, 10 s, 30 s, 60 s, 90 s und 270 s. Bei den für 5-HT₃-Rezeptoren typischen Aktivierungszeitkonstanten (siehe Abbildungslegende zu Abb. 3) dauerte es weitere 20 ms, bis der „peak“ (Abb. 3) des 5-HT induzierten Stromes erreicht wurde und in denen der 5-HT₃ Rezeptor zusammen mit 5-HT weiter der Substanz ausgesetzt war. Somit betrug bei Präapplikation die kürzeste Substanzapplikationsdauer bis zum Erreichen des „peak“ 52 ms. In der Offen-Kanal-Applikation wurde die Substanz erst zusammen mit 5-HT gegeben, so dass sie typischerweise 20 ms auf den Kanal einwirken konnten, bevor der „peak“ des Stromes erreicht war.

Wurde für den Substanzeinwasch ein Präapplikationszeitintervall von mehr als 1 min gewählt, so wurde das Zeitintervall des Substanzauswasches ebenfalls an die gewählte Dauer angepasst. Die Einwaschexperimente dienten der Ermittlung des Zeitverlaufes der Effekte einer Substanz am Rezeptor bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes. Von daher wurden Zeitintervalle der Einwaschdauer von sehr kurz (52 ms) bis sehr lange (270 s) gewählt. Bei der Durchführung der Experimente war es nicht

immer möglich alle Zeitintervalle am selben „Patch“ zu messen. Deshalb wurde bei der Messung darauf geachtet dass jeweils kurze und lange Einwaschzeiten alternierend am gleichen „Patch“ gemessen wurden.

Um die Substanz bei verschiedenen 5-HT Konzentrationen applizieren zu können, wurde folgende Lösungsanordnung gewählt:

Reservoir:



In dieser Anordnung wurde folgendes Protokoll verwendet: Zuerst wurde eine 30 μM 5-HT Kontrolle gemessen, darauf folgte eine 1 μM 5-HT Kontrolle. Dann wurde die 1 μM Serotoninlösung zusammen mit dem n-Alkanol appliziert. Anschließend folgte eine 2 μM Kontrolle der sich eine 2 μM Serotoninapplikation zusammen mit dem n-Alkanol anschloss. Abschließend folgte eine n-Alkanol-Applikation zusammen mit 30 μM 5-HT. Zwischen jeder Strommessung wurde 60 s mit extrazellulärer Lösung ausgewaschen. Diese Folge konnte beliebig oft an einem „Patch“ wiederholt werden. Sämtliche n-Alkanol-Applikationen erfolgten im Offen-Kanal-Modus. Der Vorteil dieser Lösungsanordnung war erneut die Möglichkeit, mehrere 5-HT Konzentrationen an einem einzigen „Patch“ messen zu können.

4.7 Datenanalyse

4.7.1 Software

Die Stromspuren wurden mittels des Programmes Pclamp 6 (Axon) digitalisiert und als Dateien auf der Computerfestplatte gespeichert.

Die Stromspuren wurden mithilfe des Programmes Clampfit 8 (Axon) ausgewertet und analysiert. Anschließend wurden die ausgewerteten Daten mit Hilfe des Programmes

GraphPad Prism 5 in Graphiken eingefügt und dann eventuell weiter analysiert (beispielsweise Fitten der erstellten Kurven).

4.7.2 Analyse der Stromspuren

Mithilfe des Clampfit Programmes wurden die Originalstromspuren folgendermaßen analysiert: Zuerst erfolgte die Angleichung aller Stromspuren, indem alle Basislinien auf 0 pA angeglichen wurden und somit der sogenannte „Leakstrom“ heraus gerechnet wurde.

Bei Experimenten, welche mit dem 5-Wege-System durchgeführt wurden, wurden anschließend die drei Kontroll- und die drei Substanzspuren gemittelt. Bei der Analyse der Einwaschexperimente wurde dieses Verfahren ebenfalls angewendet. Ein eventueller Rundown-Effekt durch den Kanalverlust konnte so kompensiert werden ($\tau_{\text{Rundown}} = 550 \pm 230$ s, $n = 6$ „Patche“, wobei jeder „Patch“ mindestens drei Zeitkonstanten überdauerte). Falls ein solcher Rundown-Effekt zu beobachten war, wurde darauf geachtet dass nur Experimente und Stromspuren verwendet und gemittelt wurden bei denen der Kanalverlust möglichst gering und kontinuierlich war.

Bei der gemittelten Stromspur konnte dann die maximale Stromamplitude nach Digitalisierung mithilfe eines Positionsmarkers in pA abgelesen werden (Abb. 4).

Da bei Experimenten mit dem 9-Wege-System mehrere Konzentrationen gleichzeitig gemessen wurden, so die Experimente deutlich länger dauerten und deshalb auch der Rundown Effekt zum Teil nicht vermeidbar war, wurden hier jeweils nur die Kontrolle vor und der Auswasch nach der jeweiligen Substanzkonzentration gemittelt.

Anschließend konnten die Stromspuren durch eine biexponentielle Funktion der Zeit (t) mit dem Verfahren von Chebychev (GraphPad Prism 5) gefittet (Abb. 4) und der Wert der Aktivierungs- (τ_{on}) und der Desensibilisierungskonstante (τ_{off}) (Abb. 3 und 4) bestimmt werden:

$$I(t) = I_{on} \cdot e^{-t/\tau_{on}} + I_{off} \cdot e^{-t/\tau_{off}} + I_{rest}$$

wobei I der Gesamtstrom zur Zeit t , I_{on} eine Komponente des Aktivierungsstromes unter Berücksichtigung, dass die Kurvenanpassung nicht zum Zeitpunkt $t = 0$ sondern etwas später stattfindet (siehe Abb. 4), τ_{on} die Aktivierungszeitkonstante, I_{off} der Desensibilisierungsstrom, τ_{off} die Desensibilisierungszeitkonstante und I_{rest} der Reststrom sind.

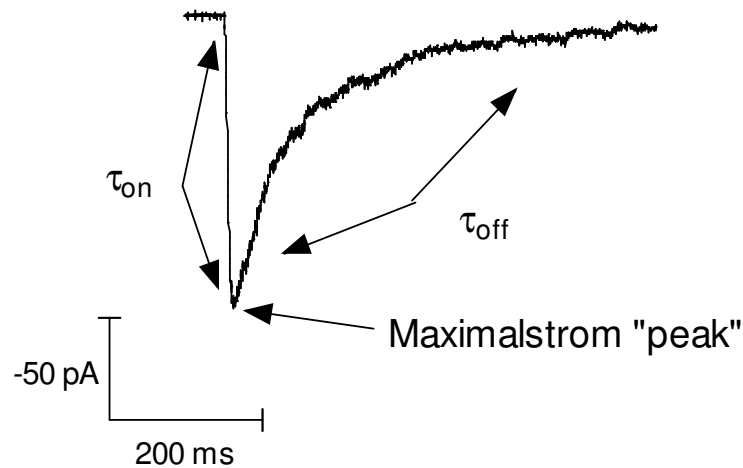


Abbildung 3: 5-HT ($30 \mu\text{M}$) induzierter Einwärtsstrom. Mithilfe von Clampfit ließ sich der Maximalstrom („peak“) in pA ablesen. Durch Applikation einer biexponentiellen Funktion lassen sich die Aktivierungszeitkonstante (τ_{on} , Mittelwert für τ_{on} der 5-HT Kontrollströme: $9,92 \pm 9,2 \text{ ms}$, 371 Messungen an 111 „Patches“) und die Desensibilisierungszeitkonstante (τ_{off} , Mittelwert für τ_{off} der 5-HT Kontrollströme: $107 \pm 87 \text{ ms}$, 371 Messungen an 111 „Patches“) bestimmen.

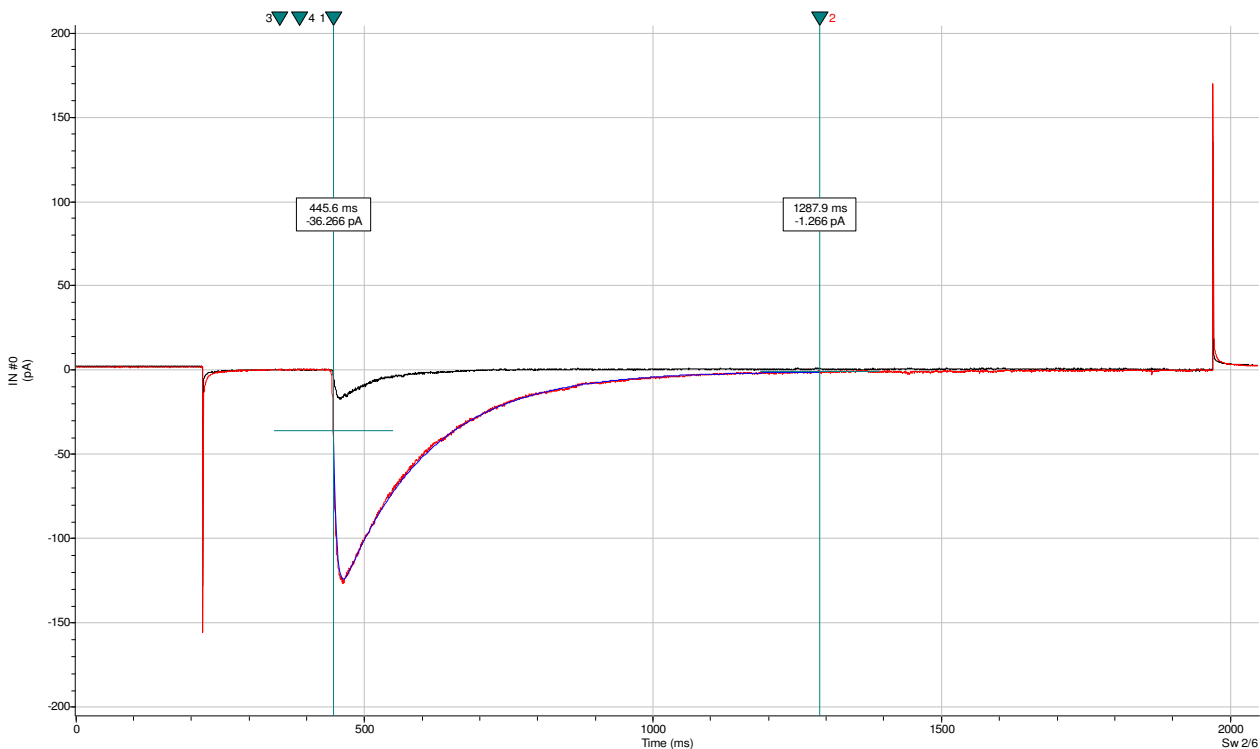


Abbildung 4: Zwei exemplarische 5-HT ($30 \mu\text{M}$) induzierte Stromspuren, einmal mit (schwarze Stromamplitude) und einmal ohne Substanzapplikation (rote Stromspur). Nach Positionierung der Positionsmarken 1 und 2 wurde die Stromkurve dazwischen mit einer biexponentiellen Funktion angepasst und daraus die Aktivierungs- (τ_{on}) und Desensibilisierungszeitkonstante (τ_{off}) bestimmt (blaue Kurve). Dabei wurde die Positionsmarke 1 auf den Zeitpunkt gesetzt, an dem die Aktivierung des Stromes ungefähr 30 % erreicht hatte (in dieser Abbildung beispielsweise bei $-36,3 \text{ pA}$), während die Positionsmarke 2 so gesetzt wurde, dass zu diesem Zeitpunkt die Desensibilisierung deutlich abgeschlossen war. Dabei wurde jede Stromkurve separat gefittet. Mithilfe einer der Positionsmarken konnte anschließend auch der Maximalstrom abgelesen werden.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden in GraphPad Prism 5 Software importiert und dort in Graphen verarbeitet. Die gemessenen Einwärtsströme (pA) und Zeitkonstanten (ms) in Gegenwart der Testsubstanz wurden in Prozent der Mittelwerte der jeweiligen Kontroll- und Auswaschströme (ohne Testsubstanz) aufgetragen.

Die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für den nach Substanzgabe verbliebenen Reststrom wurde durch Anwendung der Hill-Gleichung gefittet:

$$i = [1 / (1 + c^n / IC_{50}^n)]$$

(i ist der Spitzenstrom in Gegenwart der Testsubstanz als Fraktion des Kontrollstromspitzenstroms, c ist die Substanzkonzentration, n ist der Hill-Koeffizient, und IC_{50} ist die Substanzkonzentration die den Effekt um 50 % reduziert.

Aus den gefitteten Konzentrations-Wirkungskurven konnten per Inter- oder Extrapolation die IC_{50} -Werte mit den jeweiligen 95 % Konfidenzintervallen abgeleitet werden.

Die Einwaschkurven wurden mithilfe folgender biexponentieller Funktion der Zeit (t) gefittet:

$$I(t) = I_{\infty} + F_{fast} * (1 - I_{\infty}) * \exp(-t / \tau_{fast}) + (1 - F_{fast}) * (1 - I_{\infty}) * \exp(-t / \tau_{slow}),$$

bei welcher der Strom folgendermaßen normiert wurde: $I(t=0) = 1$;

$I_{\infty} = I(t = \infty)$ und F_{fast} ist der Anteil der schnellen Komponente am totalen Effekt.

In der folgenden Arbeit wurden die Einwaschkurven auf zwei verschiedene Arten gefittet:

- freier Fit: die Parameter I_{∞} , F_{fast} , τ_{fast} und τ_{slow} konnten für jeden n-Alkanol frei variieren;
- verbundener Fit: die Werte von τ_{fast} und τ_{slow} variierten für alle n-Alkanole gleichzeitig, so dass sich ein allen n-Alkanolen gemeinsamer Wert für τ_{fast} und ein allen n-Alkanolen gemeinsamer Wert für τ_{slow} ergab. Die Parameter I_{∞} und F_{fast} konnten für alle n-Alkanole frei variieren.

4.7.3 Statistik

In Microsoft Excel wurden Mittelwerte \pm Standardabweichung berechnet und die Differenzen zwischen einzelnen Datenpunkten mithilfe des Student t-Testes auf Signifikanz geprüft. Das gewählte Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Die statistischen Ergebnisse sind im folgenden Text jeweils als Mittelwerte \pm Standardabweichung in Prozent der Kontrollen angegeben.

Die IC_{50} -Werte und die Hill-Koeffizienten für die Konzentrations-Wirkungskurven wurden mittels Kurvenanpassung in GraphPad Prism 5 berechnet und sind mit ihrem 95 % Konfidenzintervall angegeben (siehe Tabelle 2). Die Fitparameter der Einwaschkurven wurden ebenfalls durch GraphPad Prism 5 ermittelt und sind zusammen mit ihren 95 % Konfidenzintervallen und den R^2 -Werten (quantifiziert die Güte des Fits) angegeben.

Alle graphischen Resultate wurden in GraphPad Prism 5 als Mittelwerte \pm Standardabweichung angezeigt. In den einzelnen Graphen wurden Datenpunkte, welche statistisch signifikant verschieden von den respektiven Kontrollen waren, durch (*) markiert.

4.8 Verwendete Substanzen

Die Experimente wurden mit folgenden Substanzen durchgeführt:

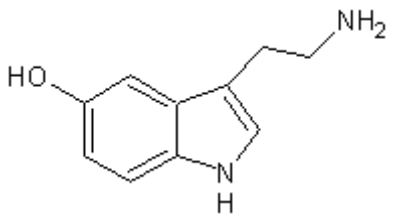
Substanz	Strukturformel	Hersteller
Ethanol	CH_3-CH_2-OH	Merck (Darmstadt, Germany)
n-Butanol	$CH_3-(CH_2)_3-OH$	Merck (Darmstadt, Germany)
n-Hexanol	$CH_3-(CH_2)_5-OH$	Merck (Darmstadt, Germany)
n-Octanol	$CH_3-(CH_2)_7-OH$	Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland)
n-Decanol	$CH_3-(CH_2)_9-OH$	Sigma-Aldrich (München, Germany)
n-Dodecanol	$CH_3-(CH_2)_{11}-OH$	Sigma-Aldrich (München, Germany)
n-Tetradecanol	$CH_3-(CH_2)_{13}-OH$	Sigma-Aldrich (München, Germany)
5-HT		Sigma-Aldrich (München, Germany)

Tabelle 1: Verwendete Substanzen, angegeben ist der Name, die Strukturformel und der Hersteller der jeweiligen Substanz.

4.9 Herstellung der Lösungen

Die 5-HT Lösungen wurden jeden Tag frisch aus einer 25 mM Stammlösung (bei -20°C gelagert) und ECS hergestellt.

ECS, das sowohl zum Lösen der Substanzen als auch als Badlösung für die Zellen genutzt wurde, bestand aus (mM): NaCl 150; KCl 5,6; CaCl_2 1,8; MgCl_2 1; HEPES 10; pH 7,45. Der Badlösung wurde als Nährstoff für die Zellen noch zusätzlich Glucose (20 mM) hinzugefügt.

ICS, welches in die Pipetten gefüllt wurde, setzte sich folgendermaßen zusammen (mM): KCl 140; EGTA 10; MgCl_2 5; HEPES 10; pH 7,45.

Da Ethanol, n-Butanol, n-Hexanol und n-Octanol gut löslich sind, wurden diese Substanzen direkt in ECS gelöst. Wenn n-Decanol auf diese Weise hergestellt wurde, musste die Lösung mindestens 48 Stunden rühren, um sicherzustellen, dass n-Decanol vollständig gelöst war. n-Decanol wurde ebenfalls mithilfe einer 10 mM Ethanolstamm- lösung hergestellt. Beide Herstellungsweisen der n-Decanol- lösung resultierten in IC_{50} - Werten für die Strominibierung welche nicht signifikant unterschiedlich waren. Die n-Dodecanol- und die n-Tetradecanol- lösung wurden ausschließlich aus Ethanolstamm- lösungen (10mM) hergestellt, welche am Vortag des Experimentes angefertigt wurden. Die maximal resultierende Ethanol Konzentration in den Substanzlösungen war so gering, dass kein Effekt auf die 5-HT_{3A}-Rezeptoren bestand (4,25 mM Ethanol für die n-Decanol-Lösungen und 1,7 mM Ethanol für die n-Dodecanol- und n-Tetradecanol- Lösungen).

5 Ergebnisse

5.1 Ethanol

Sämtliche Experimente mit Ethanol wurden mit dem 9-Wege-System durchgeführt. Bei „Patchen“, in denen 5-HT vorher einen Einwärtsstrom auslöste, führte die Applikation von Ethanol sowohl in der Offen-Kanal-Applikation (-+) als auch in der Äquilibrium-Applikation (++) zu einer Inhibierung der gemessenen Stromamplitude im Vergleich zum 30 μM 5-HT-induzierten Kontrollstrom (Abb. 5 und 6). Wegen Überlagerungen einiger Substanzspuren mit den Kontrollspuren, wird in den folgenden Originalspuren jeweils nur die 1M Ethanol Konzentration illustriert.

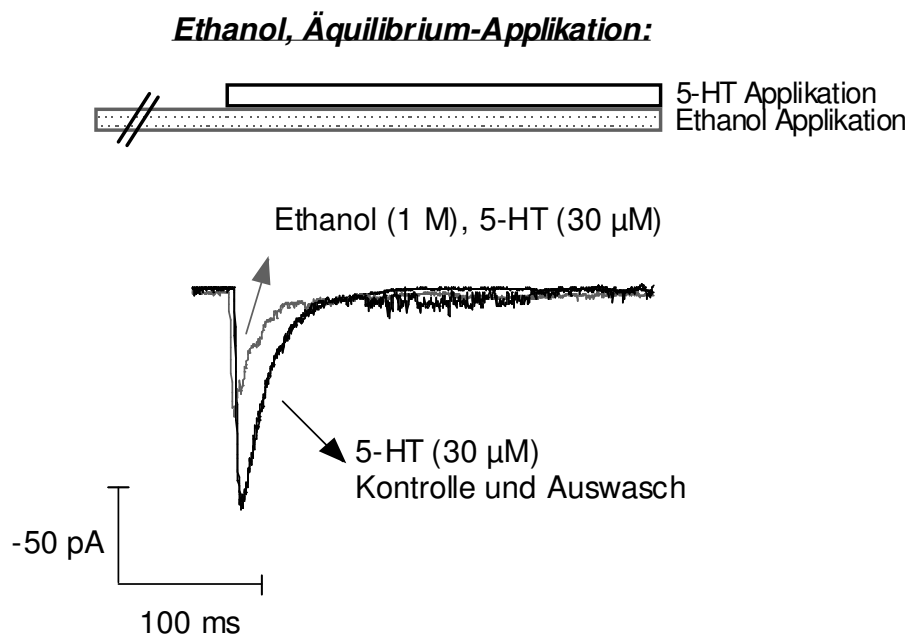


Abbildung 5: Originalstromspur an einem „Patch“. Die schwarzen Stromspuren stellen die 5-HT (30 μM)-induzierte Kontrolle vor und nach Auswasch der Applikation von 1 M Ethanol dar. Die graue Stromspur entspricht der Stromantwort einer 1 M Ethanolösung in Äquilibrium-Applikation (++) welche gegenüber der Kontrollstromspur eine verminderte Stromamplitude aufweist.

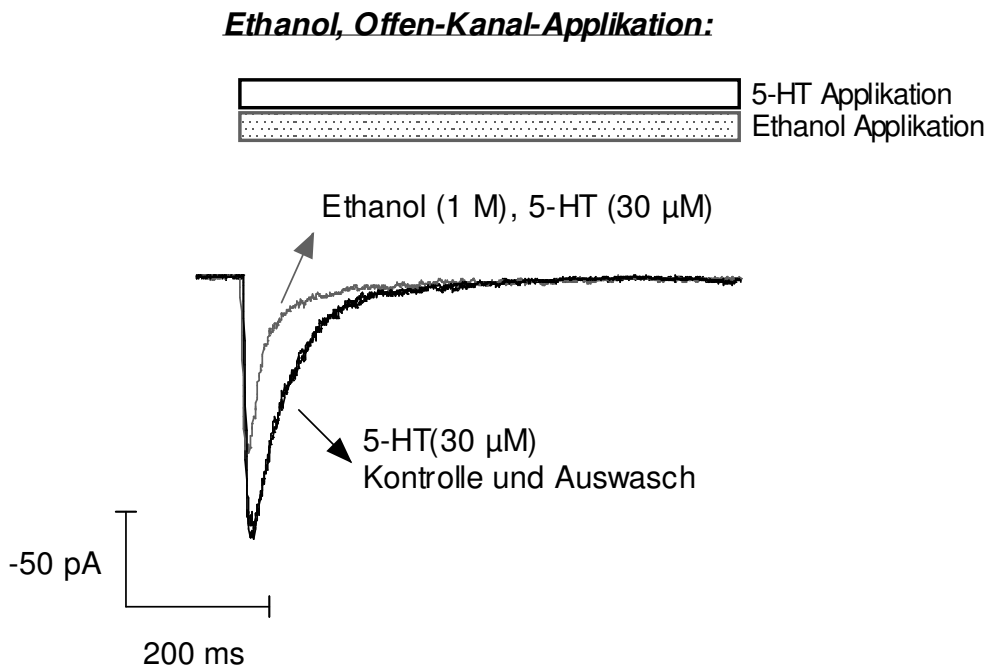


Abbildung 6: Originalstromspur an einem „Patch“. Ethanol wurde im Offen-Kanal-Modus appliziert. Hier fiel die Reduktion der Stromamplitude im Vergleich zur Äquilibrium-Applikation bei gleicher Ethanol Konzentration geringer aus.

Anhand der Messungen mit Lösungen unterschiedlicher Ethanol Konzentrationen konnten anschließend Konzentrations-Wirkungsbeziehungen des Effektes auf die Stromamplitude erstellt werden (Abb. 7).

Erst bei der höchsten Ethanol Konzentration (1 M) kam es zu einer signifikanten Unterdrückung des „Peakstroms“ sowohl im Äquilibrium als auch im Offen-Kanal-Modus. In der Äquilibrium-Applikation wurde die Stromamplitude durch diese Ethanol Konzentration mit einem Mittelwert von $54,2 \pm 3,4$ % der Kontrollen und in der Offen-Kanal-Applikation mit $68,8 \pm 5,6$ % der Kontrollen signifikant unterdrückt. Dabei war der inhibierende Effekt auf die Stromamplitude in der Äquilibrium-Applikation signifikant stärker ausgeprägt.

Aus der gefitteten Konzentrations-Wirkungskurve ließ sich für beide Applikationsformen per Inter- (Äquilibrium-Applikation) beziehungsweise Extrapolation (Offen-Kanal-Applikation) ein IC_{50} -Wert berechnen, das heißt diejenige n-Alkanol Konzentration bei der die Stromantwort um 50 % gegenüber der Kontrolle vermindert war (siehe auch Tabelle 2).

In der Äquilibrium-Applikation betrug der IC_{50} -Wert $1 \pm 0,25$ M (± 95 % Konfidenzintervall), in der Offen-Kanal-Applikation $1,7 \pm 0,64$ M (± 95 % Konfidenzintervall).

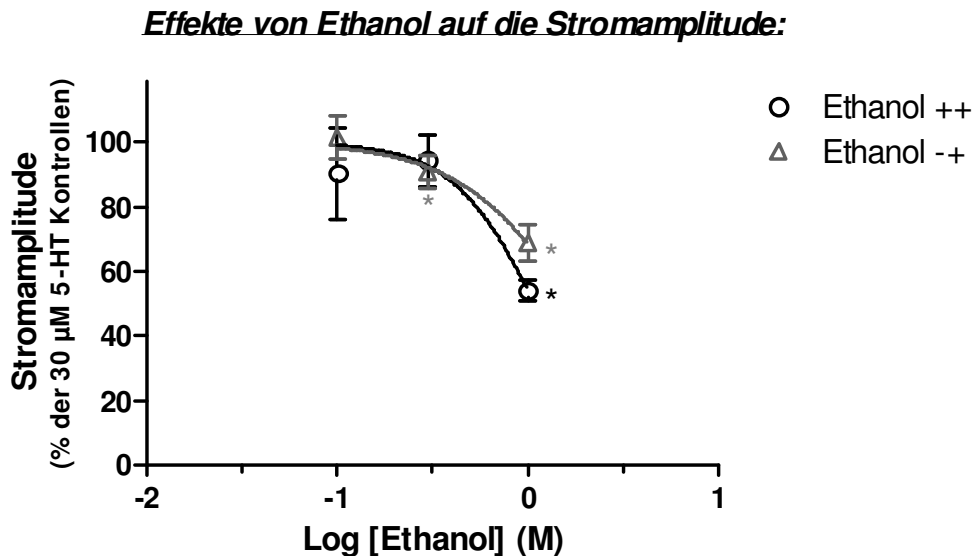


Abbildung 7: Dargestellt sind die Effekte von Ethanol auf die Stromamplitude 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme ($n=5-6$ „Patche“ pro Datenpunkt) bei drei verschiedenen Ethanol Konzentrationen ($0,1$ M; $0,3$ M; 1 M), in den Applikationsmodi Äquilibrium (++) und Offen-Kanal (-+). Der Effekt durch Ethanol war sehr schnell vorhanden, da sich das Ausmaß der Inhibition der Stromamplitude nach 60 s Ethanol-Exposition (++) nicht mehr viel gegenüber der sehr kurzen Exposition (~ 20 ms, -+) veränderte.
*) Werte sind statistisch signifikant verschieden von den respektiven Kontrollen

Mögliche Veränderungen der Stromkinetiken durch Ethanol wurden ebenfalls untersucht:

Die Desensibilisierungskonstante (τ_{off}) wurde in der Äquilibrium-Applikation durch jede Ethanol Konzentration signifikant beschleunigt (Abb. 8). Die Desensibilisierungszeitkonstante des ($30 \mu\text{M}$) 5-HT-induzierten Stromes betrug in Anwesenheit von 100 mM Ethanol beispielsweise $55,8 \pm 13,4$ % der Kontrollen (Abb. 8). In der Offen-Kanal-Applikation konnte lediglich bei den Ethanol Konzentrationen 100 mM und 1 M eine signifikante Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstante nachgewiesen werden.

Eine vergleichbare Beschleunigung der Aktivierungszeitkonstante konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 9).

Effekte von Ethanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante " τ_{off} ":

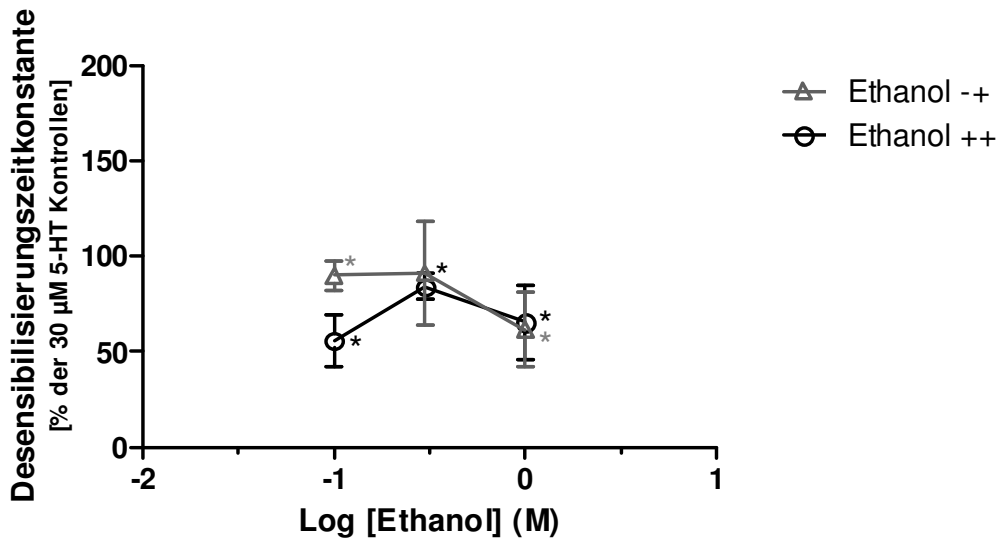


Abbildung 8: Effekte von Ethanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme ($n=4-5$ Patche pro Datenpunkt). Darstellung der Desensibilisierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrollen in Bezug auf die Ethanol Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Desensibilisierungszeitkonstante des $30 \mu\text{M}$ 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von Ethanol durch die Desensibilisierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne Ethanol geteilt (Mittelwert für τ_{off} der Kontrollströme: $36,8 \pm 20,9$ ms; 32 Messungen an 6 „Patchen“).

Effekte von Ethanol auf die Aktivierungszeitkonstante " τ_{on} ":

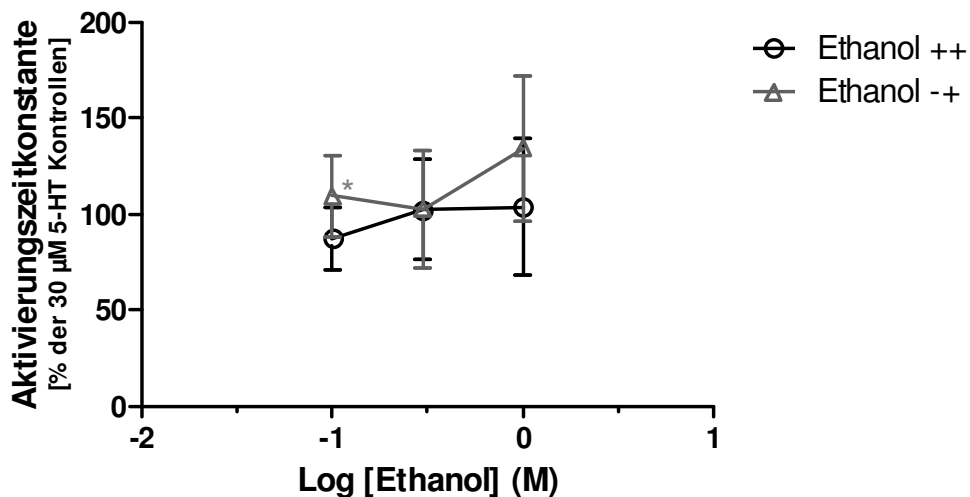


Abbildung 9: Effekte von Ethanol auf die Aktivierungszeitkonstante 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme ($n=4-5$). Darstellung der Aktivierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrollen in Bezug auf die Ethanol Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Aktivierungszeitkonstante des $30 \mu\text{M}$ 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von Ethanol durch die Aktivierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne Ethanol geteilt (Mittelwert für τ_{on} der Kontrollströme: $4,9 \pm 4,2$; 33 Messungen an 6 „Patchen“). Zwei Applikationsformen (++) und (-+) sind dargestellt.

Bei allen zuvor durchgeführten Experimenten wurde eine Serotoninkonzentration von 30 μM gewählt. In der Literatur wurde in „Whole-cell“ Experimenten an NCB 20 Zellen eine Potenzierung der Stromamplitude bei niedriger 5-HT Konzentration durch Ethanol beschrieben (Lovinger und White, 1991; Lovinger, 1991; Zhou und Lovinger, 1996).

Um nun herauszufinden, ob eine solche Potenzierung durch Ethanol auch bei „excised Patchen“ nachzuweisen war, wurden folgende 5-HT Konzentrationen gewählt: 1 μM , 2 μM und 30 μM . Als Ethanol Konzentration wurden 300 mM gewählt, um den eventuellen potenzierenden Effekt nicht durch eine überwiegende Inhibierung zu verdecken, und Ethanol wurde jeweils nur gleichzeitig mit dem 5-HT-Impuls appliziert (Offen-Kanal).

Originalspuren, Offen-Kanal Applikation, verschiedene 5-HT Konzentrationen:

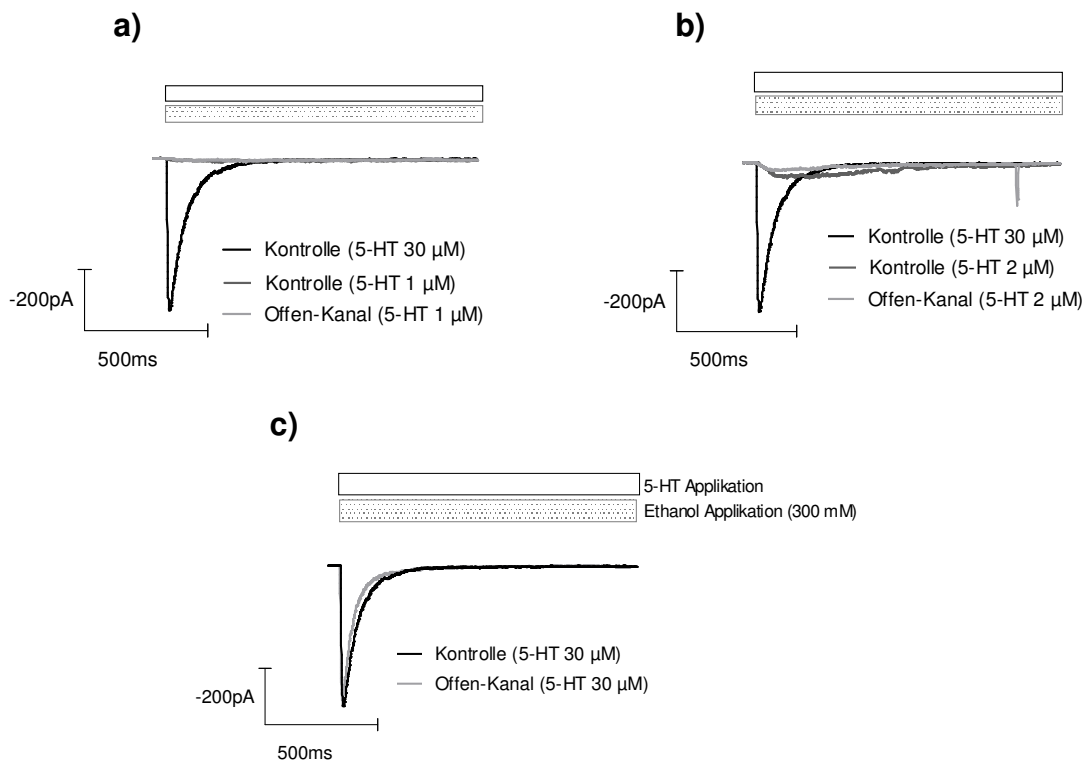


Abbildung 10: Originalstromspuren an einem „Patch“. Die schwarze Stromspur stellt jeweils die 30 μM 5-HT induzierte Kontrolle dar. In dunkelgrau ist jeweils die 5-HT Kontrolle mit veränderter Konzentration dargestellt (1 oder 2 μM). Die hellgraue Spur entspricht 5-HT (1 μM , 2 μM oder 30 μM) zusammen mit 300 mM Ethanol (Offen-Kanal). In a) zeigte sich nur ein sehr geringer (1 μM) 5-HT-induzierter Kontrollstrom (dunkelgrau) der durch Ethanol kaum verändert wurde (hellgraue Spur). In b) ließ sich eine Reduktion des 2 μM 5-HT induzierten Kontrollstromes durch Ethanol feststellen. In c) sah man eine leichte Reduktion des 30 μM 5-HT induzierten Peakstromes durch Ethanol. Wegen der Übersichtlichkeit wurden die Stromspuren auf a), b) und c) aufgeteilt, jedoch stammen alle Spuren aus einem Experiment am selben „Patch“.

Es waren bei allen drei 5-HT Konzentrationen ausschließlich inhibierende Effekte durch Ethanol auf die Stromamplitude zu beobachten (Abb. 10).

Zudem war aufgefallen, dass die 5-HT Kontrollströme, welche durch niedrige 5-HT Konzentrationen induziert waren (1 μM und 2 μM), deutlich langsamere Kinetiken hatten verglichen mit den 30 μM induzierten Strömen, was konsistent mit früheren Beobachtungen war (Barann et al., 1997).

Die erhobenen Daten konnten auf zwei verschiedene Arten dargestellt werden. Einmal bezog man die durch Ethanol und 5-HT induzierte Stromantwort auf die jeweilige 5-HT Kontrolle (Abb. 11), die andere Möglichkeit bestand darin jede Stromantwort auf die jeweilige 30 μM Kontrolle zu beziehen (Abb. 12). Folgendes wird anhand von Abbildungen verdeutlicht:

5-HT abhängige Stromamplitudenreduktion durch Ethanol:

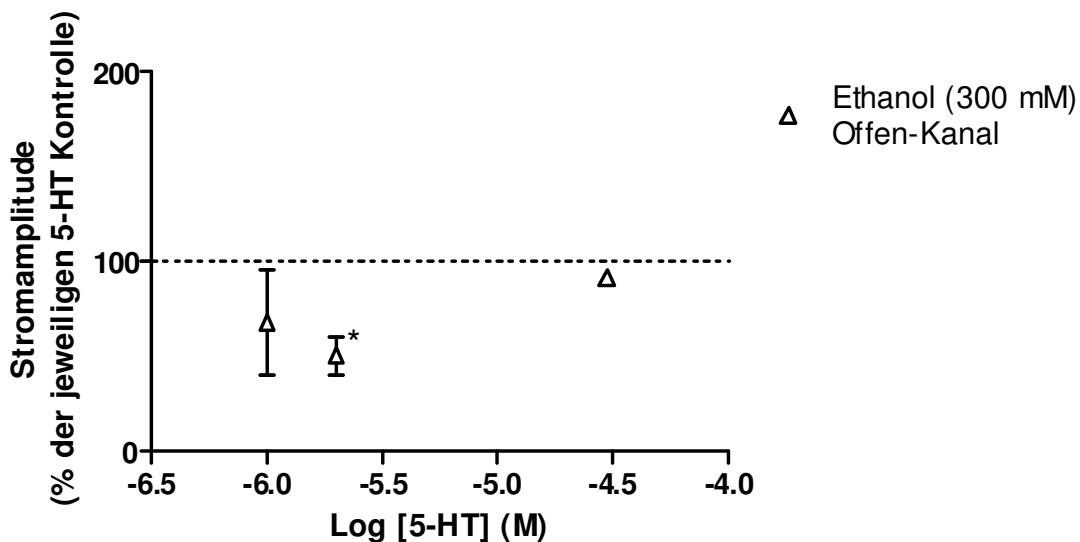


Abbildung 11: Effekte von Ethanol auf die Stromamplitude bei verschiedenen 5-HT Konzentrationen in Offen-Kanal-Applikation ($n= 3-5$). Aufgetragen ist die maximale Stromamplitude in % der jeweiligen 5-HT Kontrollen. Verglichen wurden dabei die Stromamplituden von Strömen, welche durch die gleiche 5-HT Konzentration induziert wurden, einmal mit und einmal ohne Ethanol. Die Kontrollen bildeten die Ströme ohne Ethanol. Die gewählte Ethanol-Konzentration betrug 300 mM. In diesem Experiment konnte lediglich bei der 2 μM 5-HT Konzentration eine signifikante Inhibierung des Maximalstromes durch Ethanol festgestellt werden. Es bestand kein Hinweis auf eine Potenzierung der induzierten Stromantwort durch Ethanol.

Die erste Darstellungsweise diente dem Vergleich der verschiedenen Effekte von Ethanol bei verschiedenen 5-HT Konzentrationen (Abb. 11). Die Unterdrückung der Stromamplitude war bei der 2 μM 5-HT Konzentration durch Ethanol in der Offen-Kanal-Applikation signifikant, die Stromamplitude betrug hier $50,6 \pm 9,9$ % der Kontrollen. Die

1 μM 5-HT induzierte Stromspur sowie die 30 μM 5-HT induzierte Stromspur wurde durch Ethanol nicht statistisch signifikant verändert.

Die in der Literatur in „Whole-cell“ Experimenten an NCB 20 Zellen festgestellte Potenzierung der Stromamplitude bei niedriger 5-HT Konzentration durch Ethanol konnte demnach am „excised patch“ anhand der durchgeführten Experimente nicht nachgewiesen werden.

Die folgende zweite Darstellungsweise erlaubte es, den Effekt von Ethanol auf die Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT zu beurteilen und somit zusätzlich Hinweise auf eine eventuelle Kompetitivität zwischen 5-HT und Ethanol zu bekommen (Abb. 12). Falls Kompetitivität zwischen Ethanol und 5-HT bestand, so war der kompetitive Effekt bestenfalls gering, und somit wurde auf die Messung weiterer 5-HT Konzentrationen verzichtet.

Veränderung der Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT durch Ethanol:

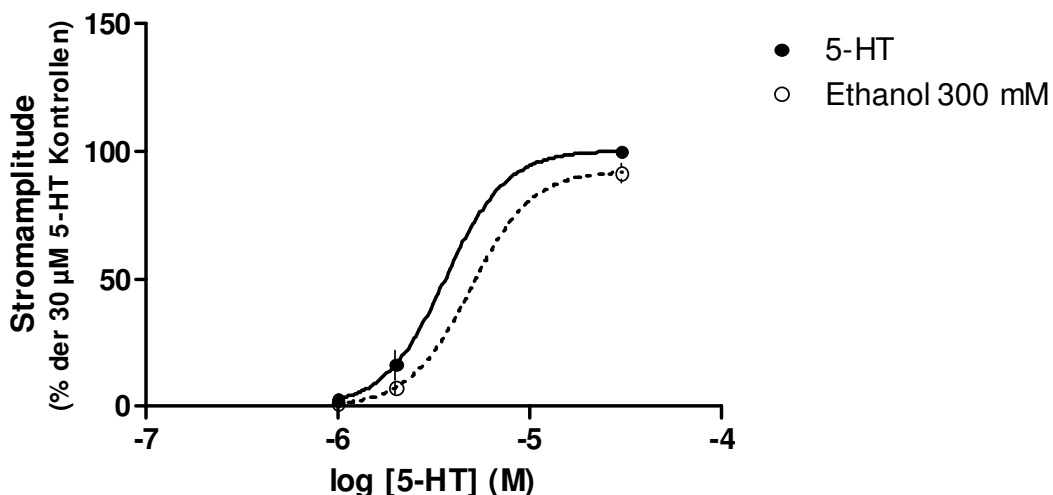


Abbildung 12: Effekt von Ethanol auf die Stromamplitude bei verschiedenen 5-HT Konzentrationen in Offen-Kanal-Applikation ($n=3-5$). In dieser Darstellung wurden alle Werte auf den Wert bei 30 μM 5-HT ohne Ethanol bezogen (100 %). Der Hill Koeffizient der beiden Kurven wurde für beide Datensätze gleichzeitig angepasst, so dass er variieren konnte, aber für beide Kurven gleich sein musste. Es ergab sich dabei ein Hill-Koeffizient von $2,2 (\pm 1,9)$ für beide Kurven. Der IC_{50} -Wert für die Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT betrug $3,7 \cdot 10^{-6} (\pm 1,7 \cdot 10^{-6})$ und für die durch Ethanol veränderte Kurve $4,9 \cdot 10^{-6} (\pm 3,6 \cdot 10^{-6})$. Obwohl eine Erhöhung der n -Zahl eventuell zu einer statistischen Signifikanz führen könnte, wurde auf weitere Messungen verzichtet, da sich hier bereits abzeichnete, dass die Verschiebung der 5-HT Konzentrations-Wirkungskurve durch Ethanol bestenfalls gering ausfallen würde.

5.2 n-Butanol

N-Butanol zeigte in den untersuchten Applikationsmodi Äquilibrium und Offen-Kanal ausschließlich inhibierende Effekte auf den (30 μM) 5-HT-induzierten Strom, welche in beiden Applikationsformen mit steigender n-Alkanol Konzentration zunahmen (Abb. 13 und 14).

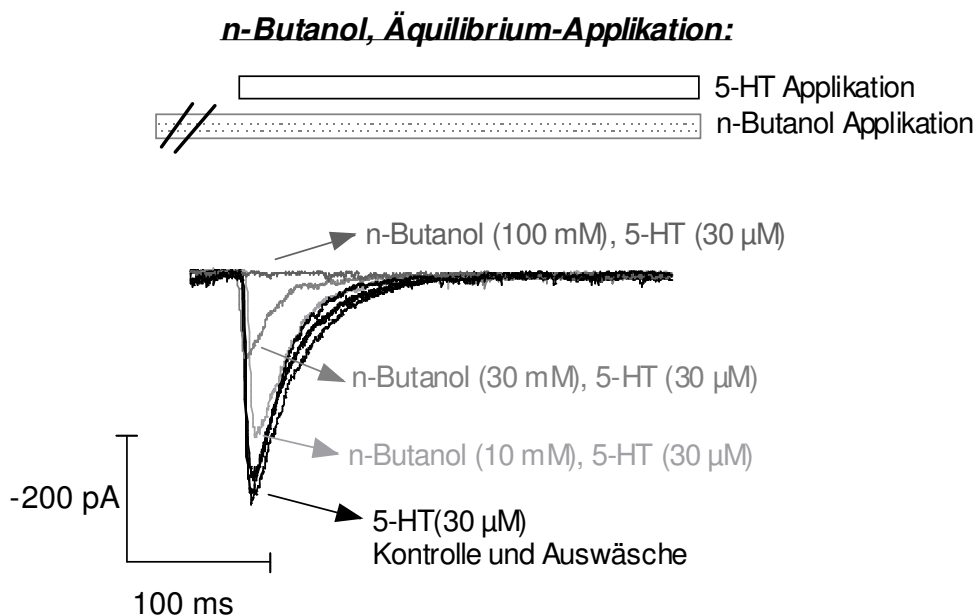


Abbildung 13: Originalstromspuren an einem „Patch“. Die schwarzen Stromspuren stellen die 30 μM 5-HT induzierten Ströme vor und nach Auswasch der Applikation von n-Butanol dar. Die grauen Stromspuren entsprechen den Stromantworten von 3 verschiedenen n-Butanol-Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration (10 mM, 30 mM, 100 mM) in der Äquilibrium-Applikation. Das Applikationssystem mit neun Glasreservoirs ermöglichte die Messung von drei verschiedenen n-Butanol Konzentrationen an einem einzigen „Patch“. Mit steigender n-Butanol Konzentration konnte eine zunehmende Hemmung der Stromamplitude gegenüber den 5-HT (30 μM) Kontrollen beobachtet werden. Diese Hemmung war maximal bei einer n-Butanol Konzentration von 100 mM und führte hier zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der Stromantwort.

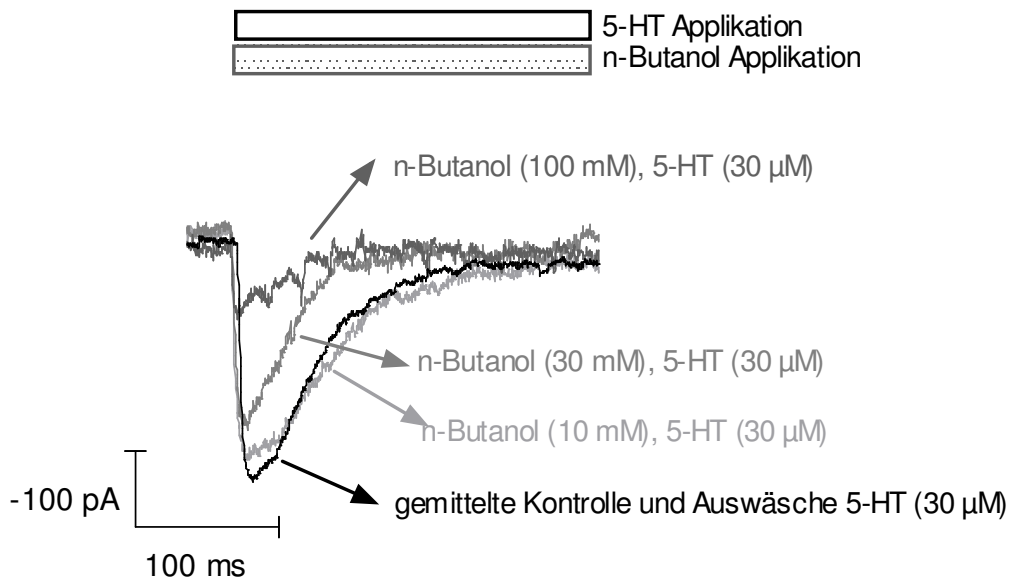
***n*-Butanol, Offen-Kanal-Applikation:**

Abbildung 14: Originalstromspuren eines in Offen-Kanal-Applikation durchgeführten Experimentes an einem „Patch“. Mit steigender *n*-Butanol Konzentration (graue Stromspuren) kam es zu einer zunehmenden Reduktion des Peakstromes gegenüber der 5-HT (30 μM)-induzierten Kontrolle (schwarze Stromspur). Kontrolle und Auswaschspuren von 5-HT (30 μM) wurden wegen Überlagerungen mit den Substanzspuren gemittelt.

Nach der Analyse der Originalstromspuren wurden auch für *n*-Butanol Konzentrations-Wirkungsbeziehungen in Bezug auf die Stromamplitude in den Applikationsformen Äquilibrium und Offen-Kanal erstellt (Abb. 15).

Während sich in der Äquilibrium-Applikation bei hoher *n*-Butanol Konzentration (100 mM) mit einer Maximalamplitude von $9,9 \pm 9,2$ % der Kontrollen eine signifikante, nahezu vollständige Hemmung der Stromantwort nachweisen ließ, führte dieselbe *n*-Butanol-Konzentration in Offen-Kanal-Applikation zu einer deutlich geringeren aber dennoch signifikanten Hemmung des Kontrollstromes auf $43,4 \pm 19,4$ % der Kontrollen. Noch deutlicher als bei den Experimenten mit Ethanol war die Inhibierung auch bei *n*-Butanol bei der höchsten gemessenen Konzentration bei langer *n*-Alkanol-Exposition (Äquilibrium-Applikation, 60 s) signifikant stärker ausgeprägt als bei kurzer *n*-Alkanol-Exposition (Offen-Kanal-Applikation, ~20 ms).

Per Interpolation der gefitteten Kurve ergab sich in der Äquilibrium-Applikation ein IC_{50} -Wert von 30 ± 7.8 mM und in der Offen-Kanal-Applikation ein Wert von 88 ± 18 mM für

n-Butanol (siehe auch Tabelle 2). Es stellte sich also heraus, dass im Gegensatz zu den Experimenten mit Ethanol die Äquilibrium-Applikation für n-Butanol bereits ungefähr dreimal potenter war als die Offen-Kanal-Applikation (Tabelle 2).

Effekte von n-Butanol auf die Stromamplitude (peak):

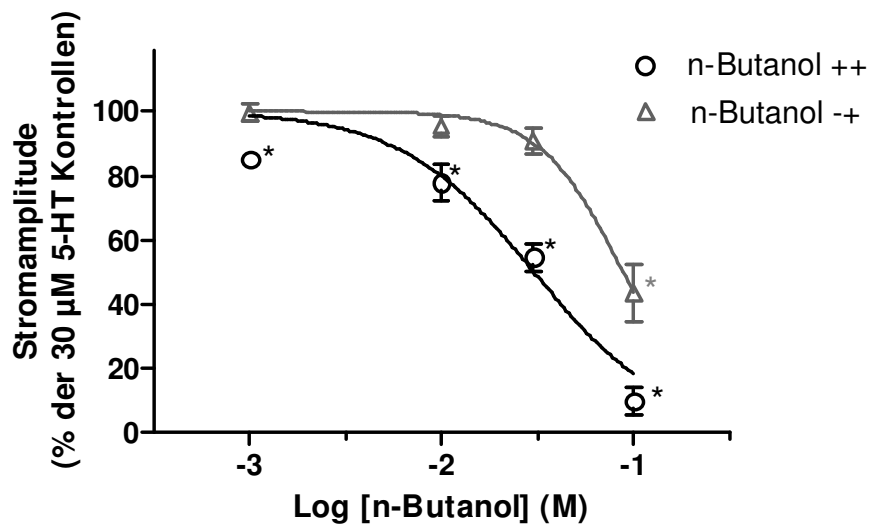


Abbildung 15: Dargestellt sind die Effekte von n-Butanol auf die Stromamplitude 5-HT (30 µM)-induzierter Ströme bei vier verschiedenen n-Butanol Konzentrationen (1 mM; 10 mM; 30 mM; 100 mM). Dargestellt sind Äquilibrium- und Offen-Kanal-Modus. In der Offen-Kanal-Applikation konnte erst bei der höchsten n-Butanol Konzentration eine signifikante Unterdrückung des Maximalstromes erreicht werden. Demgegenüber ließ sich im Äquilibriumexperiment bereits bei niedrigen Konzentrationen eine Unterdrückung des „peak“ observieren, welche mit den höheren n-Butanol Konzentrationen ebenfalls anstieg und bei 100 mM n-Butanollösung schließlich zu einer mehr als 90-prozentigen Hemmung führte (n= 4-7).

Effekte von n-Butanol auf die Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetiken:

Die Applikation von höheren Konzentrationen n-Butanol führte zu beschleunigenden Effekten auf die Desensibilisierungskinetik (Abb. 16).

Die Aktivierungszeitkonstante wurde in der Äquilibrium-Applikation konzentrationsabhängig beschleunigt. In der Offen-Kanal-Applikation konnte erst bei der höchsten n-Butanol Konzentration (100 mM) eine signifikante Beschleunigung der Aktivierungszeitkonstante festgestellt werden (Abb. 17).

Effekte von *n*-Butanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante " τ_{off} ":

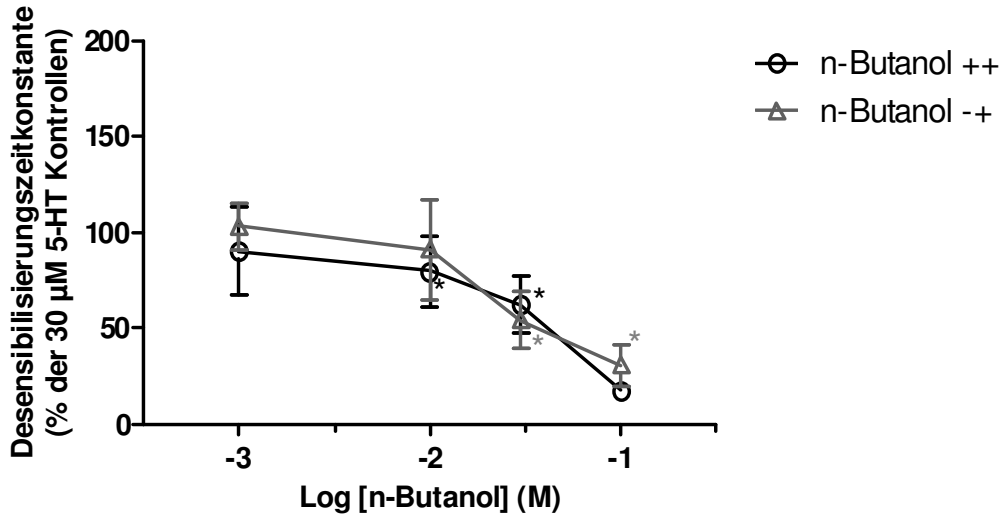


Abbildung 16: Effekte von *n*-Butanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme ($n = 4-10$ „Patche“ pro Datenpunkt; für 100 mM Butanol $n = 1$ in der ++ Applikation und $n = 3$ in der +- Applikation). Darstellung der Desensibilisierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrollen in Bezug auf die *n*-Butanol Konzentration. Dabei wurde für jeden Patch die Desensibilisierungszeitkonstante des $30 \mu\text{M}$ 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von *n*-Butanol durch die Desensibilisierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne *n*-Butanol geteilt (Mittelwert für τ_{off} der Kontrollströme: $70,5 \pm 70 \text{ ms}$; 62 Messungen an 20 „Patchen“). Sowohl im Äquilibrium- wie auch im Offen-Kanal-Modus zeigte sich bei den höheren *n*-Butanol Konzentrationen eine signifikante Beschleunigung der Desensibilisierung (beachte: für 100 mM in der ++ Applikation existiert nur ein Wert).

Effekte von *n*-Butanol auf die Aktivierungszeitkonstante " τ_{on} ":

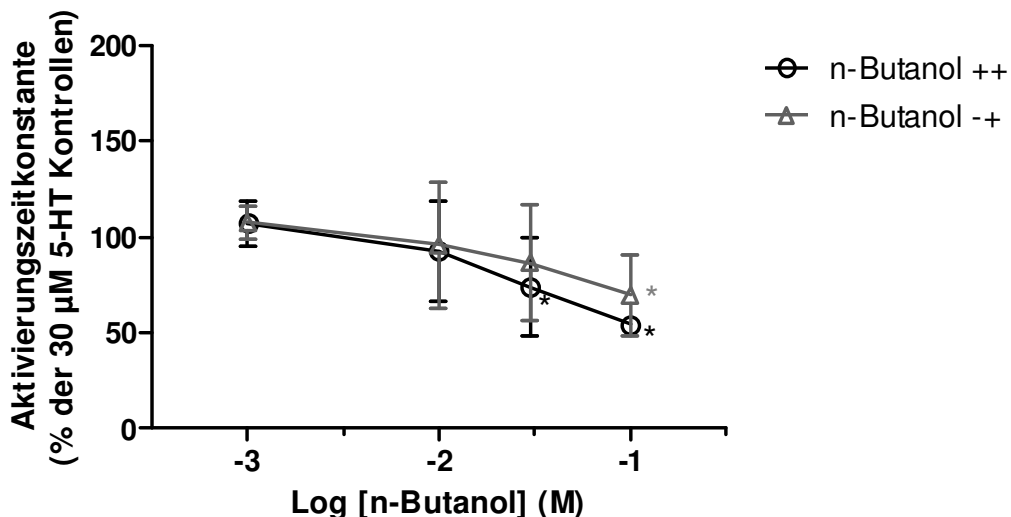


Abbildung 17: Effekte von *n*-Butanol auf die Aktivierungszeitkonstante 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme ($n = 4-10$; für 100 mM Butanol $n = 2-4$). Darstellung der Aktivierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrollen in Bezug auf die *n*-Butanol Konzentration. Dabei wurde für jeden Patch die Aktivierungszeitkonstante des $30 \mu\text{M}$ 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von Butanol durch die Aktivierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne Butanol geteilt (Mittelwert für τ_{on} der Kontrollströme: $7,14 \pm 5,41 \text{ ms}$; 62 Messungen an 20 „Patchen“).

Einwaschexperimente: schnelle und langsame n-Butanol-Effekte

In den zuvor durchgeführten Experimenten stellte sich bereits heraus, dass der inhibierende Effekt von n-Butanol stärker wurde, je länger die Substanz appliziert wurde. So war in der Äquilibrium-Applikation, wo n-Butanol 60 s lang vor dem 5-HT Impuls appliziert wurde, eine stärkere Inhibierung durch n-Butanol zu verzeichnen, als wenn die Substanz nur ungefähr 20 ms appliziert wurde (Offen-Kanal). Zur Klärung des Zeitverlaufes der n-Butanol-Effekte am Rezeptor, insbesondere in Bezug auf den Verlauf der Stärke der Inhibierung, wurden Einwaschexperimente mit n-Butanol durchgeführt. Diese Experimente wurden ähnlich wie ein Äquilibrium-Experiment durchgeführt, wobei die sonst übliche 60 s Substanzpräapplikation vor dem 5-HT Puls nun variiert wurde. Folgende Präapplikationszeiten wurden gewählt: 32 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 1 s, 3 s, 10 s, 30 s, 60 s, 90 s und 270 s. Als n-Butanol Konzentration (45 mM) wurde dabei eine Konzentration nahe dem IC_{50} -Wert der Äquilibrium-Applikation gewählt. Diese Konzentration rief eine Inhibierung hervor, die groß genug war, um die Unterscheidung möglicher differenter Komponenten der Inhibierung durch n-Butanol zu erlauben und einen späteren Vergleich mit den anderen n-Alkanolen zu ermöglichen.

Obwohl versucht wurde, möglichst viele verschiedene Zeitintervalle an einem „Patch“ zu messen, war dies aufgrund der begrenzten „Haltedauer“ der „Patche“ nicht immer möglich. Zur graphischen Darstellung wurden dann die Daten mehrerer „Patche“ für jedes Zeitintervall gemittelt, und es resultierte eine Kurve mit einer biphasischen Inhibierung. Der biexponentielle Fit (siehe Methodenteil 4.7.2, freier Fit und Abb. 18) ergab einen schnellen inhibierenden Effekt im Millisekundenbereich ($\tau_{fast} = 16$ ms) und einen langsamen inhibierenden Effekt im Sekundenbereich ($\tau_{slow} = 4,1$ s; Abb. 18 und Tabelle 3). Freie Parameter waren neben den beiden Zeitkonstanten, die Amplitude des schnellen Effektes und der Wert für das Plateau (i.e. der Reststrom nachdem der Einwasch vollständig war).

Veranschaulichung an der folgenden Abbildung:

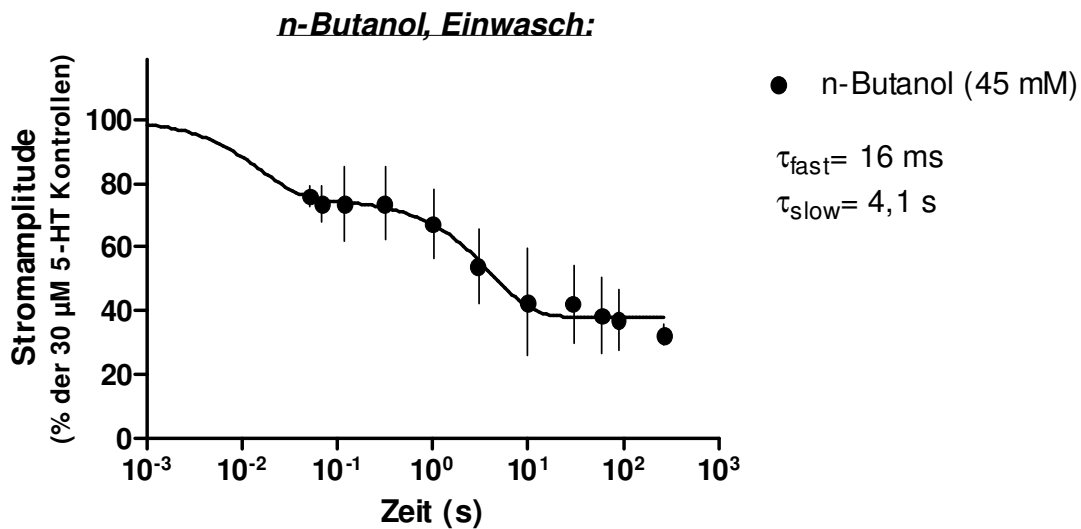


Abbildung 18: Effekte von *n*-Butanol bei verschiedenen Einwaschzeiten ($n = 3-6$). Dargestellt ist der relative Peakstrom bei jeweiliger *n*-Butanol Einwaschdauer als Prozent des 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Kontrollstromes, der für Rundown (mit Zeitkonstante typischerweise im Zehn-Minutenbereich) korrigiert wurde (siehe Methodenteil 4.7.2). Als applizierte *n*-Butanol Konzentration wurden 45 mM (nahe IC_{50} -Wert der Äquilibrium-Applikation) gewählt. Wurden die Daten biexponentiell gefittet zeigte sich ein schneller Prozess im Millisekundenbereich ($\tau_{fast} = 16 \text{ ms}$) im Sinne einer leichten Stromamplitudenreduktion gegenüber dem Kontrollstrom, sowie ein zweiter Effekt im Sekundenbereich ($\tau_{slow} = 4,1 \text{ s}$) mit einer noch stärkeren Inhibierung der Stromamplitude (Plateau-Reststrom: $38 \pm 4,5 \%$ ($\pm 95 \%$ Konfidenzintervall)).

Genau wie für Ethanol wurde auch für *n*-Butanol eine Stromamplituden-potenzierende Wirkung am 5-HT_3 - und am 5-HT_{3A} -Rezeptor in Experimenten mit „Whole-cells“ bei niedriger 5-HT Konzentration beschrieben (Jenkins et al., 1996; Stevens et al., 2005b). Es galt zu prüfen, ob diese Potenzierung durch *n*-Butanol auch bei „excised outside-out Patches“ beobachtet werden könnte. Als *n*-Butanol Konzentration wurden 20 mM gewählt und *n*-Butanol wurde jeweils im Offen-Kanal-Modus appliziert. Die gewählten 5-HT Konzentrationen waren auch hier $1 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$ und $30 \mu\text{M}$. Auch für *n*-Butanol wurde keine zu hohe Konzentration gewählt, da in den Einwaschexperimenten aufgefallen war, dass auch bei *n*-Butanol der inhibierende Effekt stark ausgeprägt war.

Folgende Effekte wurden gesehen:

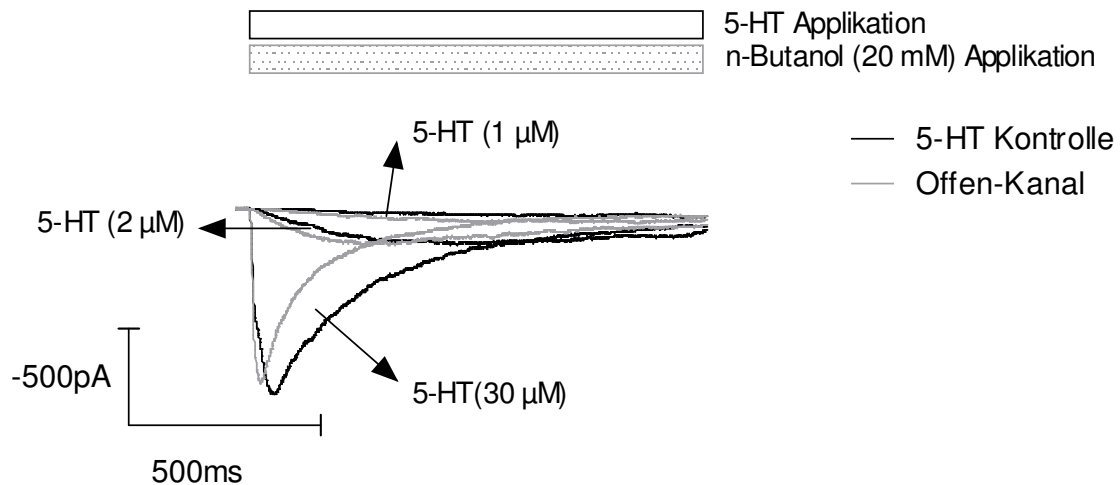


Abbildung 19: Originalstromspuren an einem „Patch“. Die schwarzen Stromspuren stellen jeweils die 5-HT induzierten Kontrollen für 1 μM , 2 μM und 30 μM dar. Die grauen Spuren stellen die durch 20 mM n-Butanol veränderten Stromantworten in Off-Kanal-Applikation dar. Bei der Applikation von n-Butanol mit 1 μM 5-HT war eine Potenzierung des Peakstromes gegenüber der 5-HT (1 μM) Kontrolle zu erkennen. Bei der Applikation von n-Butanol zusammen mit 2 μM 5-HT war lediglich eine schnellere Aktivierung und Desensibilisierung, jedoch keine Potenzierung des Peakstromes zu erkennen.

Die Kinetiken der durch niedrige 5-HT Konzentrationen induzierten Ströme waren auch hier deutlich verlangsamt (Abb. 19). Während die durch 30 μM 5-HT induzierten Ströme durch 20 mM n-Butanol inhibiert wurden, konnten bei 1 μM und 2 μM 5-HT induzierten Strömen in der Präsenz von n-Butanol potenzierende Effekte auf die Stromamplituden beobachtet werden (Abb. 19 und 20).

In Abbildung 19, wo n-Butanol zusammen mit der 1 μM 5-HT-Lösung appliziert wurde (im Off-Kanal-Modus), bestand eine erkennbare Potenzierung des Peakstromes gegenüber dem 5-HT (1 μM)-induzierten Kontrollstrom. Dieser Effekt war bei der Off-Kanal-Applikation von n-Butanol und 5-HT (2 μM) nicht so klar. Hier ließ sich bei der durch 5-HT (2 μM) induzierten Stromspur lediglich eine Beschleunigung der Aktivierung und Desensibilisierung durch n-Butanol beobachten, welche zu einer Verschiebung des „peak“ nach links führten.

Veränderte sich jedoch an einem „Patch“ die Kinetik des Stromes (diese wird typischerweise schneller, je länger der „Patch“ existiert), so konnte eine Potenzierung der (2 μM) 5-HT-induzierten Stromspur durch n-Butanol beobachtet werden (Abb. 20). Die Abbildung 20 zeigt ein weiteres Experiment am selben „Patch“ wie in Abbildung 19,

welches 16 Minuten später aufgenommen wurde, und in der die Amplitudenpotenzierung durch n-Butanol sowohl für die 1 μM als auch für die 2 μM 5-HT-induzierte Stromspur zu erkennen war. Die zuvor beobachtete Beschleunigung der Desensibilisierung der 2 μM 5-HT-induzierten Stromspur durch n-Butanol schien bei der späteren Aufnahme geringer (Abb. 20).

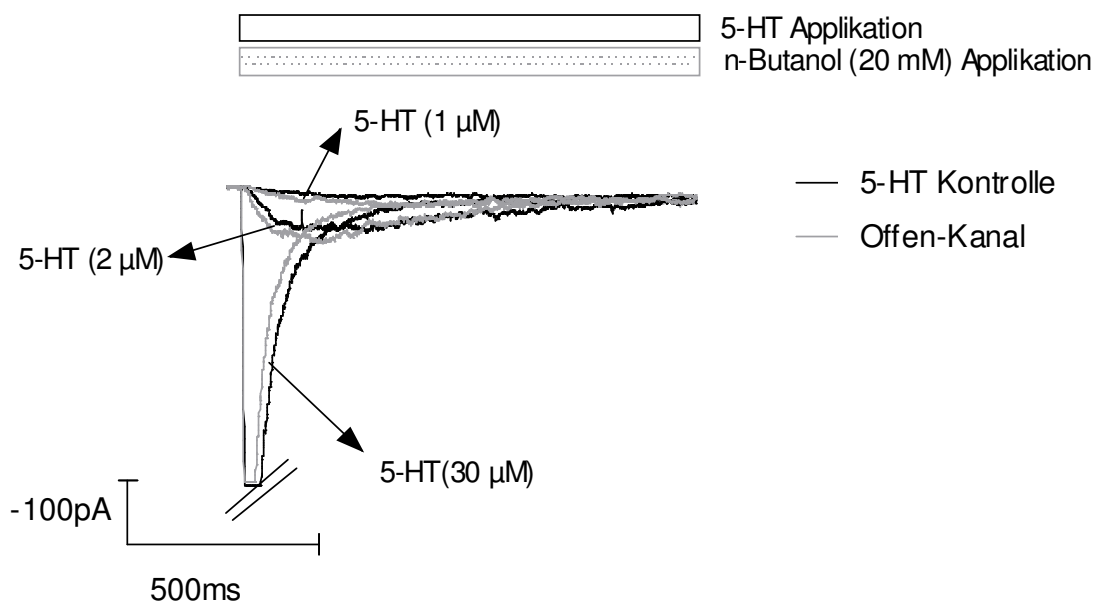


Abbildung 20: Originalstromspuren an einem „Patch“. Die schwarzen Stromspuren stellen jeweils die 5-HT induzierten Kontrollen für 1 μM , 2 μM und 30 μM dar. Die grauen Spuren stellen die durch 20 mM n-Butanol veränderten Ströme in Offen-Kanal-Applikation dar. Bei der Offen-Kanal-Applikation von n-Butanol mit 1 μM 5-HT war immer noch eine Potenzierung des Peakstromes gegenüber der 5-HT (1 μM) Kontrolle zu erkennen. Bei der Offen-Kanal-Applikation von n-Butanol zusammen mit 5-HT (2 μM) zeigte sich nun auch hier eine Potenzierung des Peakstromes. Um die 1 μM und 2 μM 5-HT induzierten Ströme auswerten zu können, mussten sämtliche Stromspuren im Clampfit Programm vergrößert aufgezeichnet werden, was allerdings dazu führte, dass die 30 μM induzierten Ströme abgeschnitten wurden (doppelter Querstrich).

Ob ein potenzierender Effekt der Stromamplitude durch n-Butanol zu verzeichnen war, schien also von der (sich mit der Zeit verändernden) Kinetik des induzierten Kontrollstromes abzuhängen (Abb. 19 und 20).

Selbst wenn Potenzierung durch n-Butanol beobachtet wurde, so war der Effekt dennoch klein und somit in unserem Versuchsansatz von geringer Bedeutung. Von daher wurden keine weiteren Experimente durchgeführt.

Bei der Analyse der Originalspuren wurden zuerst die durch n-Butanol und 5-HT induzierten Stromantworten auf die jeweilige 5-HT Kontrolle bezogen (Abb. 21). Wenn Effekte auf die Stromamplitude ohne Berücksichtigung der offenbaren Zeitabhängigkeit der Messung über mehrere „Patches“ gemittelt wurden, konnte keine statistisch signifikante Potenzierung nachgewiesen werden (Abb. 21). Eine größere Zahl von langlebigen „Patches“ wäre notwendig, um eine signifikante, von der Lebensdauer des „Patches“ abhängige Potenzierung nachweisen zu können. Diese Messungen schienen bei der Geringfügigkeit des Effektes zu diesem Zeitpunkt nicht sinnvoll.

Bei einer 5-HT Konzentration von 30 μM zeigte sich in keinem Experiment ein potenzierender Effekt durch n-Butanol, konsistent mit den zuvor durchgeführten Experimenten (siehe Abb. 15).

5-HT abhängiger Effekt von n-Butanol auf die Stromamplitude:

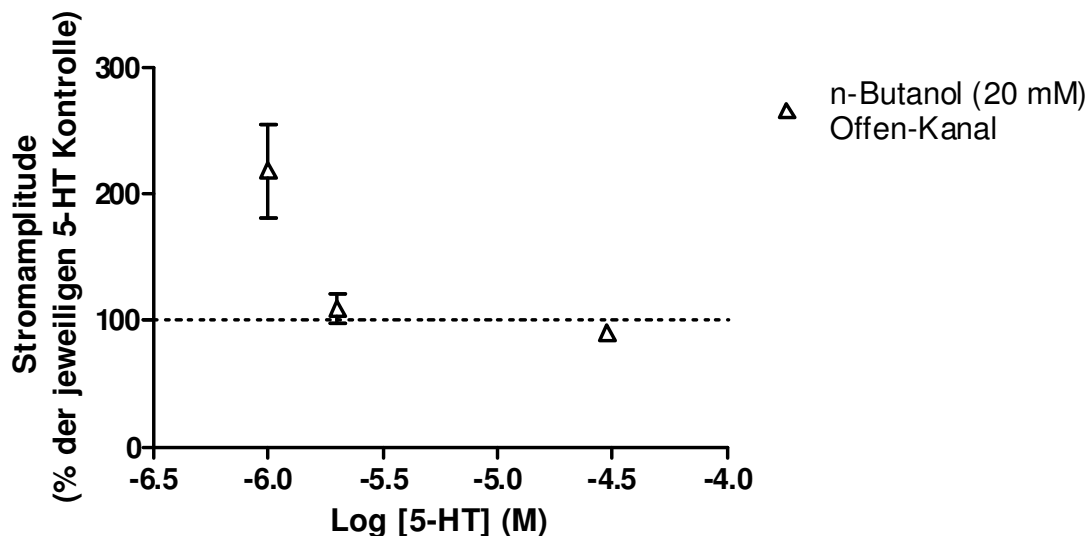


Abbildung 21: Effekte von n-Butanol auf die Stromamplitude bei verschiedenen 5-HT Konzentrationen in Offen-Kanal-Applikation ($n=2-3$). Aufgetragen ist die maximale Stromamplitude in % der jeweiligen 5-HT Kontrollen. Verglichen wurden dabei die Stromamplituden von Strömen, welche durch die gleiche 5-HT Konzentration induziert wurden, einmal mit und einmal ohne n-Butanol. Die Kontrollen bildeten dabei die Ströme ohne n-Butanol. Die gewählte n-Butanol Konzentration betrug 20 mM. Experimente welche am selben „Patch“ durchgeführt wurden, sind als gemittelte Werte dargestellt. Dabei wurde die Stromamplitude durch n-Butanol im Mittel nicht signifikant gegenüber den respektiven Kontrollen verändert.

Danach wurde die Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT mit der Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT und 20 mM n-Butanol verglichen, was eine Einschätzung von

Kompetitivität zwischen n-Butanol und 5-HT zuließ (Abb. 22). Wie bei Ethanol deutete sich keine nennenswerte Kompetitivität zwischen n-Butanol und 5-HT an, weshalb auf weitere Messungen verzichtet wurde.

Verschiebung der Konzentrations- Wirkungskurve von 5-HT durch n-Butanol

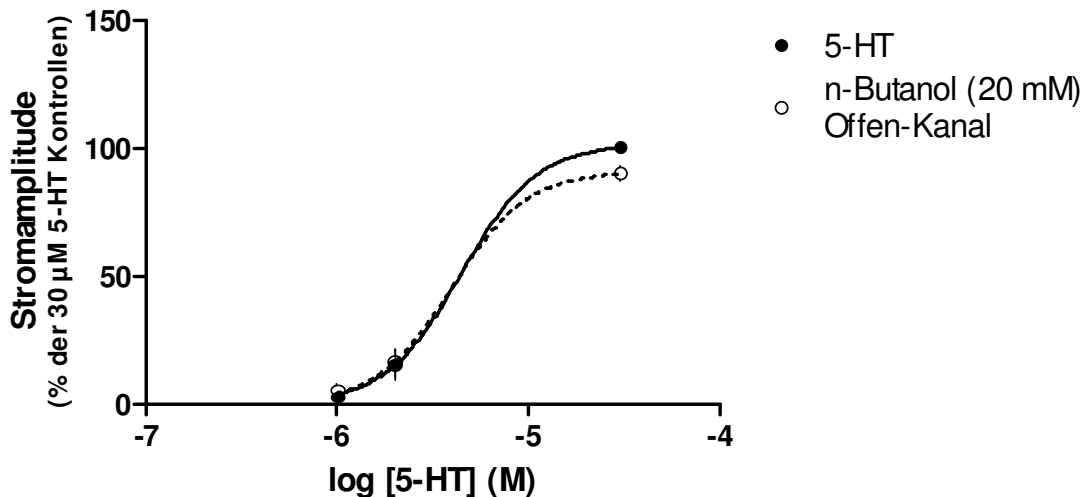


Abbildung 22: Effekte von n-Butanol auf die Stromamplitude bei verschiedenen 5-HT Konzentrationen ($n=2-3$). In dieser Darstellung wurden alle Werte auf den Wert der $30\ \mu\text{M}$ 5-HT Kontrolle ohne n-Butanol bezogen (100 %). Der Hill Koeffizient der beiden Kurven wurde für beide Datensätze gleichzeitig angepasst, so dass er variieren konnte, aber für beide Kurven gleich sein musste. Es ergab sich dabei ein Hill-Koeffizient von $2,2 (\pm 2,0)$ für beide Kurven. Der IC_{50} -Wert für die Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT betrug $4,4 \cdot 10^{-6} (\pm 4,3 \cdot 10^{-6})$ und für die durch Ethanol veränderte Kurve $3,9 \cdot 10^{-6} (\pm 3,3 \cdot 10^{-6})$. Die Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT wurde durch n-Butanol bestenfalls minimal verschoben.

5.3 n-Hexanol

Da n-Hexanol die zeitlich erste gemessene Substanz darstellte, wurden die Experimente ausschließlich am 5-Wege-System durchgeführt. Es wurden auch hier beide Applikationsmodi Äquilibrium und Offen-Kanal gemessen.

Genau wie die beiden zuvor untersuchten n-Alkanole, führte auch n-Hexanol in beiden Applikationsarten zu einer Unterdrückung des Stromes gegenüber dem 5-HT ($30\ \mu\text{M}$)-induzierten Kontrollstrom (Abb. 23 und 24).

***n*-Hexanol, Äquilibrium-Applikation:**

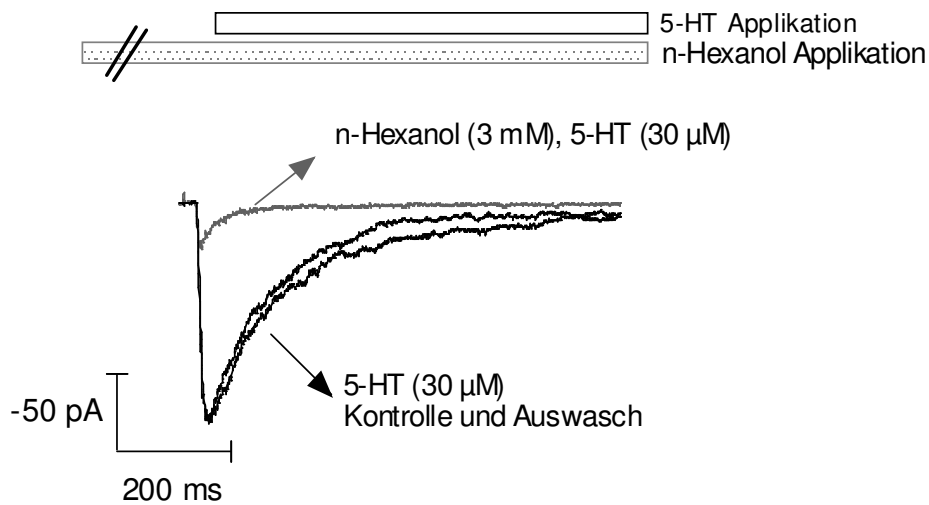


Abbildung 23: Originalstromspur an einem „Patch“. Der Maximalstrom wurde durch *n*-Hexanol in der Äquilibrium-Applikation (graue Stromspur) stark gegenüber den 30 μM 5-HT induzierten Kontrollströmen (schwarze Stromspuren) inhibiert.

***n*-Hexanol, Offen-Kanal-Applikation:**

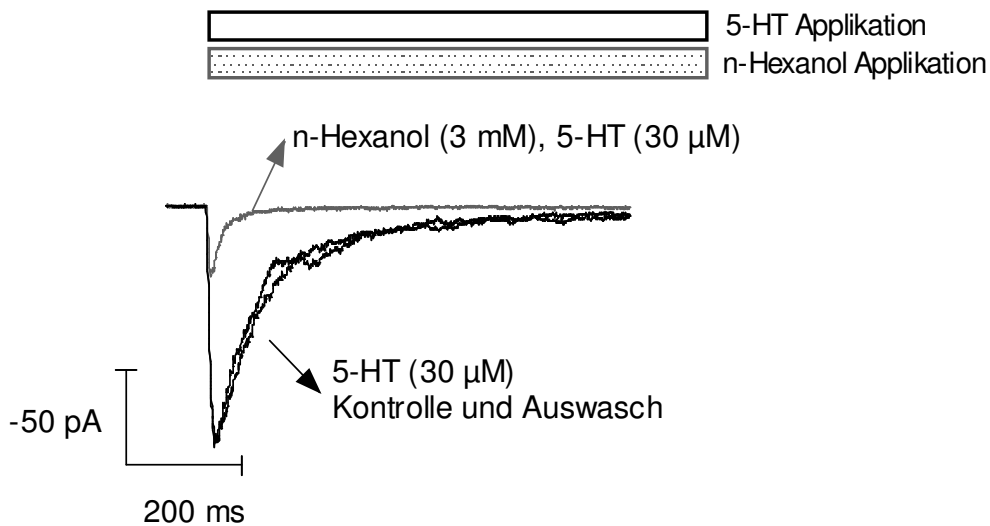


Abbildung 24: Originalstromspur an einem „Patch“. Auch in der Offen-Kanal-Applikation kam es durch *n*-Hexanol zu einer starken Unterdrückung der Stromamplitude gegenüber den Kontrollstromspuren.

Anschließend wurden Konzentrations-Wirkungskurven angefertigt (Abb. 25).

Die in Gegenwart von *n*-Hexanol (3 mM) in der Äquilibrium-Applikation induzierte Stromspur betrug $9,6 \pm 11,6$ % der Kontrollen und zeigte eine signifikante Reduktion der

Stromamplitude durch n-Hexanol gegenüber dem Kontrollstrom (Abb.25). In der Offen-Kanal-Applikation betrug der induzierte Maximalstrom nur $29,1 \pm 4,0$ % der 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Kontrollstromspuren und wurde auch hier durch 3 mM n-Hexanol signifikant reduziert. Die Inhibierung der Stromantwort bei langer n-Alkanol-Exposition (Äquilibrium-Applikation) zeigte auch bei n-Hexanol für die höchste gemessene Konzentration (3 mM) den stärksten inhibierenden Effekt und war signifikant verschieden von der Offen-Kanal-Applikation.

Per Interpolation der gefitteten Daten konnte ein IC_{50} -Wert von $1,5 \pm 0,2$ mM für die Äquilibrium-Applikation und ein Wert von $1,7 \pm 0,2$ mM für die Offen-Kanal-Applikation bestimmt werden (siehe auch Tabelle 2).

Im Gegensatz zu n-Butanol zeigte sich sowohl für die Äquilibrium als auch für die Offen-Kanal-Applikation ein ähnlicher IC_{50} -Wert womit n-Hexanol eher mit Ethanol als mit n-Butanol vergleichbar war (Tabelle 2).

Effekte von n-Hexanol auf die Stromamplitude:

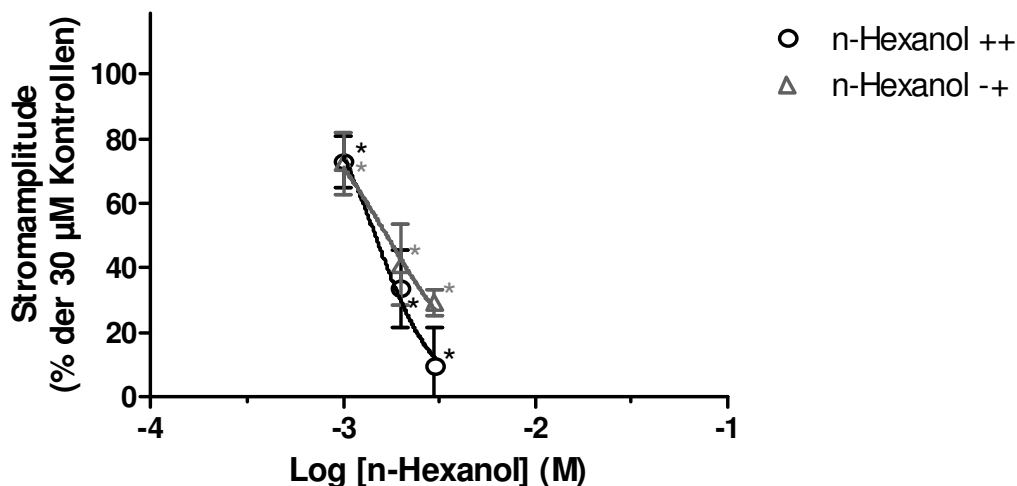


Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungskurven für die Effekte von n-Hexanol auf die Stromamplitude 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme in zwei Applikationsarten, Äquilibrium und Offen-Kanal. Dargestellt ist die Stromamplitude in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Hexanol Konzentration. In beiden Applikationsarten kam es bei steigender n-Alkanol Konzentration zu einer zunehmenden Unterdrückung des „Peakstromes“ ($n = 4-9$).

Bei der Analyse der Effekte von n-Hexanol auf die Stromkinetiken zeigte sich in allen Experimenten eine signifikante Beschleunigung der Aktivierungszeitkonstante durch

n-Hexanol (Abb. 27). Bei einer n-Hexanol Konzentration von 2 mM beispielsweise betrug die Aktivierungszeitkonstante in der Äquilibrium Applikation $24,8 \pm 6,9$ % der Kontrollen und in der Offen-Kanal-Applikation $32,8 \pm 13,3$ % der Kontrollen.

Auch die Desensibilisierungszeitkonstante wurde in beiden Applikationsarten konzentrationsabhängig durch n-Hexanol beschleunigt (Abb. 26).

Effekte von n-Hexanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante " τ_{off} ":

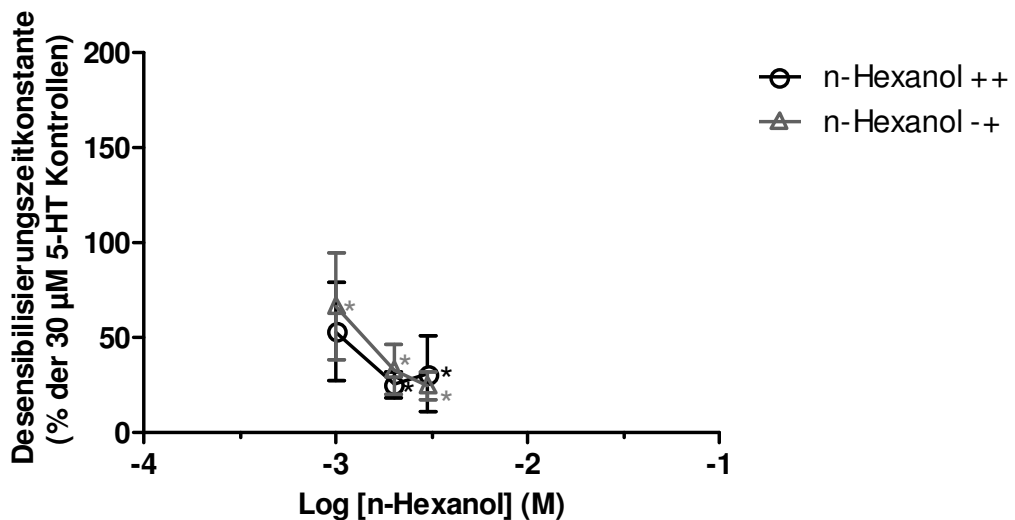


Abbildung 26: Effekt von n-Hexanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme ($n= 3-8$). Dargestellt ist die Desensibilisierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Hexanol-Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Desensibilisierungszeitkonstante des $30 \mu\text{M}$ 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von n-Hexanol durch die Desensibilisierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne n-Hexanol geteilt (Mittelwert für τ_{off} der Kontrollströme: 152 ± 102 ms; 97 Messungen an 28 „Patchen“). Es zeigte sich mit Ausnahme der Äquilibrium-Applikation von 1 mM n-Hexanol in allen Experimenten eine signifikante Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstante durch n-Hexanol.

Effekte von n-Hexanol auf die Aktivierungskonstante " τ_{on} ":

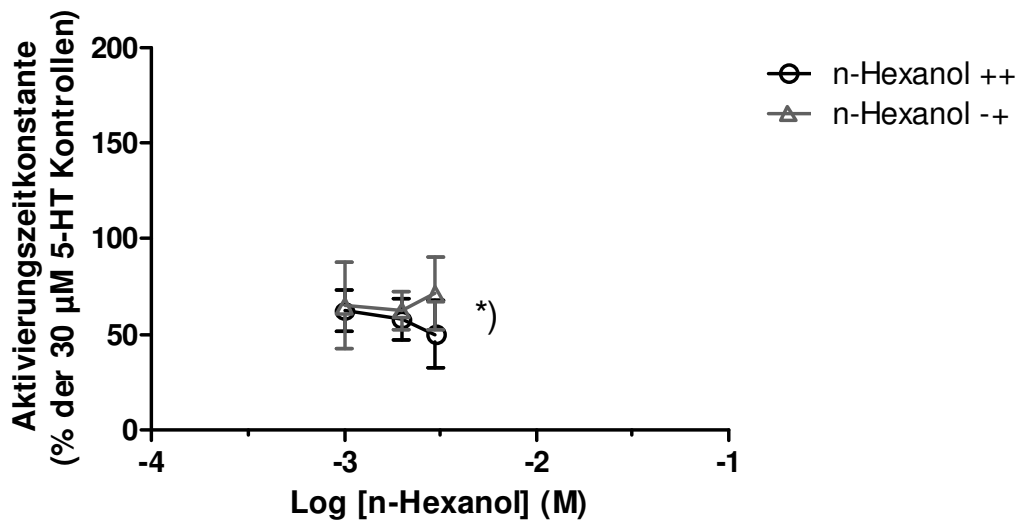


Abbildung 27: Effekt von n-Hexanol auf die Aktivierungszeitkonstante 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme ($n = 3-8$). Dargestellt ist die Aktivierung in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Hexanol-Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Aktivierungszeitkonstante des $30 \mu\text{M}$ 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von n-Hexanol durch die Aktivierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne n-Hexanol geteilt (Mittelwert für τ_{on} der Kontrollströme: $12,2 \pm 10,9 \text{ ms}$; 94 Messungen an 28 „Patches“). In beiden Applikationsformen kam es zu einer signifikanten Beschleunigung der Aktivierung.

*) alle gezeigten Konzentrations-Datenpunkte beider Applikationsarten waren statistisch signifikant verschieden von den respektiven Kontrollen.

Einwaschexperimente: schnelle und langsame Effekte von n-Hexanol

Die Durchführung der Einwaschexperimente mit n-Hexanol entsprach der für n-Butanol (siehe auch Methodenteil). Als n-Hexanol Konzentration wurde mit $1,5 \text{ mM}$ der IC_{50} -Wert der Äquilibrium-Applikation gewählt. Auch hier ergaben die Daten der gemittelten „Patche“ einen biphasischen Effekt (Abb. 28). Allerdings folgte im Gegensatz zu n-Butanol der schnellen Inhibierung der ($30 \mu\text{M}$ 5-HT-induzierten) Stromamplitude eine partielle Erholung des Peakstromes.

Dieser potenzierende Effekt war bei der Analyse der Originalströme bei jedem „Patch“, in dem die jeweiligen Einwaschzeiten (Einwaschzeiten $> 1 \text{ s}$) gemessen wurden, zu sehen. Durch biexponentielles Fitten der Kurve entstand folgendes Bild:

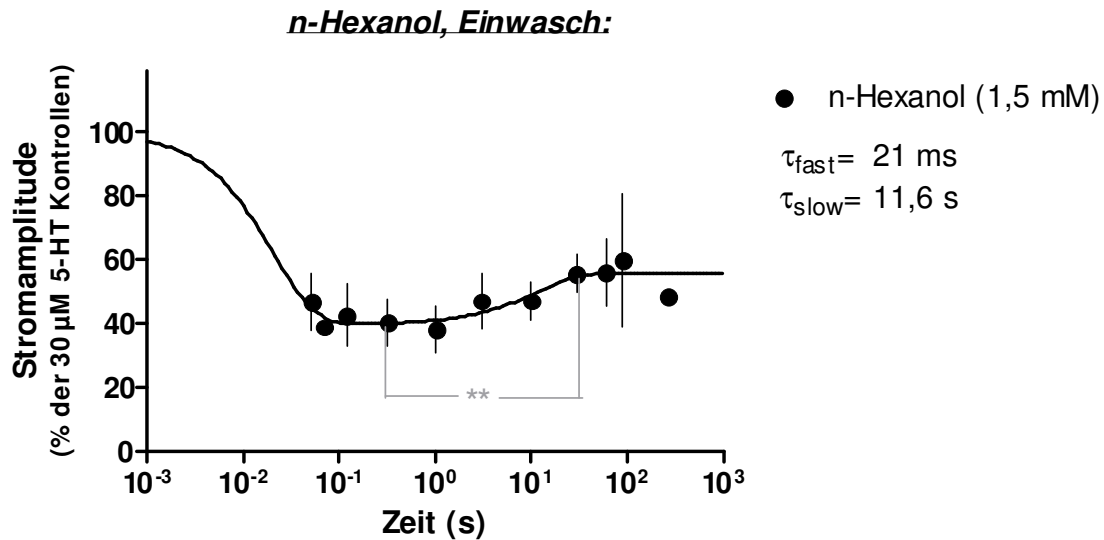


Abbildung 28: Effekte von *n*-Hexanol bei verschiedenen Einwaschzeiten ($n = 2-3$). Dargestellt ist der relative Peakstrom bei jeweiliger *n*-Hexanol Einwaschdauer als Prozent des 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Kontrollstromes, der für Rundown (mit Zeitkonstante typischerweise im Zehn-Minutenbereich) korrigiert wurde (siehe Methodenteil 4.7.2). Als applizierte *n*-Hexanol Konzentration wurde $1,5 \text{ mM}$ (IC_{50} -Wert der Äquilibrium-Applikation) gewählt. Wurden die Daten biexponentiell gefittet, konnte ein schneller Effekt im Millisekundenbereich im Sinne einer ausgeprägten Stromamplitudenreduktion des 5-HT-induzierten Stromes, sowie ein zweiter Effekt im Sekundenbereich, welcher einer Potenzierung entsprach die zu einer partiellen Erholung des Peakstromes führte, beobachtet werden (Plateau-Reststrom: $56 \pm 6 \%$ ($\pm 95 \%$ Konfidenzintervall)).

** : die Mittelwerte des Peakstromes für die Einwaschdauer 320 ms ($37,2 \pm 5,1$) und 3 s ($55,7 \pm 5,8$) waren statistisch signifikant verschieden voneinander.

Auch für *n*-Hexanol wurden nach biexponentiellem Fitten (freier Fit, siehe Methodenteil 4.7.2) der Einwaschdaten zwei Zeitkonstanten (τ_{fast} und τ_{slow}) bestimmt. Die variierenden Parameter waren dieselben wie bei *n*-Butanol. Die schnelle Zeitkonstante der Inhibierung betrug 21 ms und die Zeitkonstante für den potenzierenden Effekt $11,6 \text{ s}$ (siehe auch Tabelle 3).

5.4 *n*-Octanol

Die Experimente mit *n*-Octanol wurden mit dem 5-Wege-System durchgeführt. *n*-Octanol führte in den durchgeführten Experimenten ausschließlich zu inhibierenden Effekten auf den 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Strom (Abb. 29 und 30).

Zur Veranschaulichung der Effekte von *n*-Octanol folgen Originalspuren aus Experimenten mit einer $100 \mu\text{M}$ *n*-Octanol-Lösung.

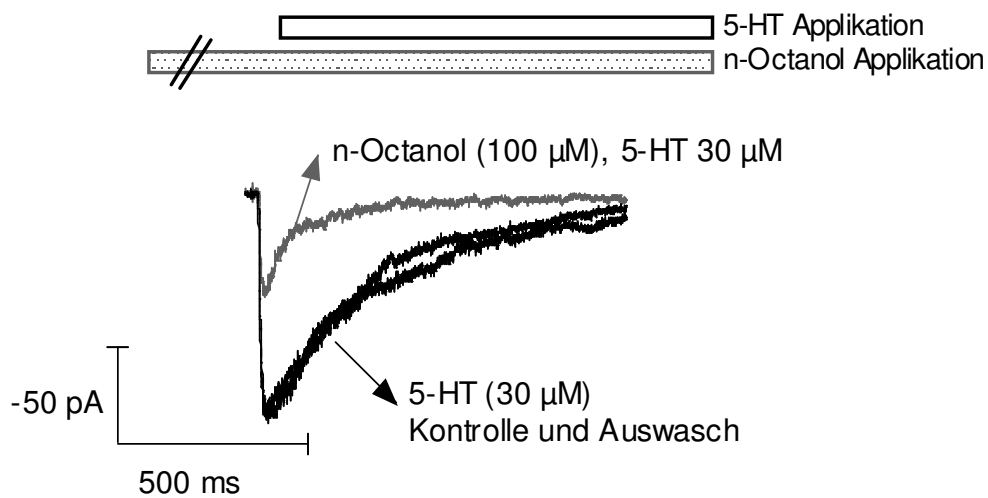
n-Octanol, Äquilibrium-Applikation:

Abbildung 29: Originalstromspur an einem „Patch“. Der Maximalstrom wurde durch *n-Octanol* (graue Stromspur) gegenüber dem Kontrollstrom ($30\ \mu\text{M}$ 5-HT) vermindert. Desweiteren konnte eine Beschleunigung der Desensibilisierung des Stromes durch *n-Octanol* beobachtet werden, welche sich durch einen steileren Verlauf der Stromkurve im Anschluss an den Peakstrom darstellte.

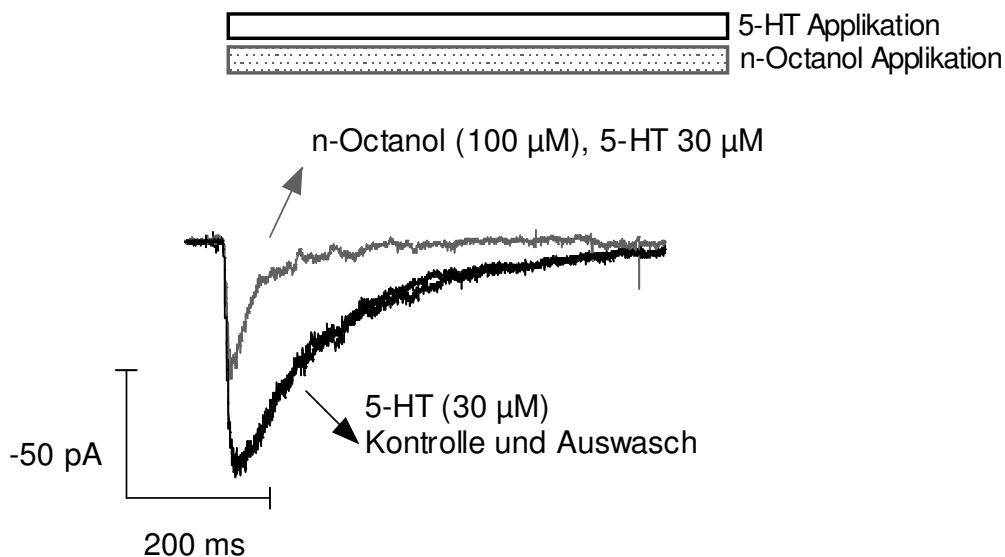
n-Octanol, Offen-Kanal-Applikation:

Abbildung 30: Originalstromspur an einem „Patch“. Auch in der Offen-Kanal-Applikation wurde die Stromantwort durch *n-Octanol* gegenüber den Kontrollströmen ($30\ \mu\text{M}$ 5-HT, schwarze Stromspuren) inhibiert. Auch in dieser Applikation konnte durch *n-Octanol* eine Beschleunigung der Desensibilisierung des Stromes beobachtet werden.

Effekte von n-Octanol auf die Stromamplitude:

Zur Erstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve in Bezug auf die Stromamplitude, wurden sukzessive n-Octanol Konzentrationen von 30 μM , 100 μM und 300 μM gemessen.

In der Äquilibrium-Applikation führte n-Octanol mit steigender Konzentration zu einer zunehmenden Inhibierung des 5-HT (30 μM)-induzierten Stromes. Bei der Applikation von 100 μM n-Octanol konnte beispielsweise ein Maximalstrom von $41,5 \pm 3,7$ % der Kontrollen festgestellt werden (Abb. 31).

Auch in der Offen-Kanal-Applikation bestand eine ausgeprägte und signifikante Unterdrückung des Peakstromes durch alle untersuchten n-Octanollösungen im Vergleich zum 5-HT (30 μM) Kontrollstrom. So betrug der Maximalstrom bei Applikation von 100 μM n-Octanol nur noch $52,2 \pm 9,5$ % der Kontrollen (Abb. 31).

Nach Erstellen der Konzentrations-Wirkungskurven konnten per Interpolation der gefitteten Kurven IC_{50} -Werte für beide Applikationen abgeleitet werden (Abb. 31). Es ergab sich in der Äquilibrium-Applikation ein Wert von 70 ± 13 μM und in der Offen-Kanal-Applikation ein Wert von 140 ± 62 μM (siehe auch Tabelle 2).

Effekte von n-Octanol auf die Stromamplitude:

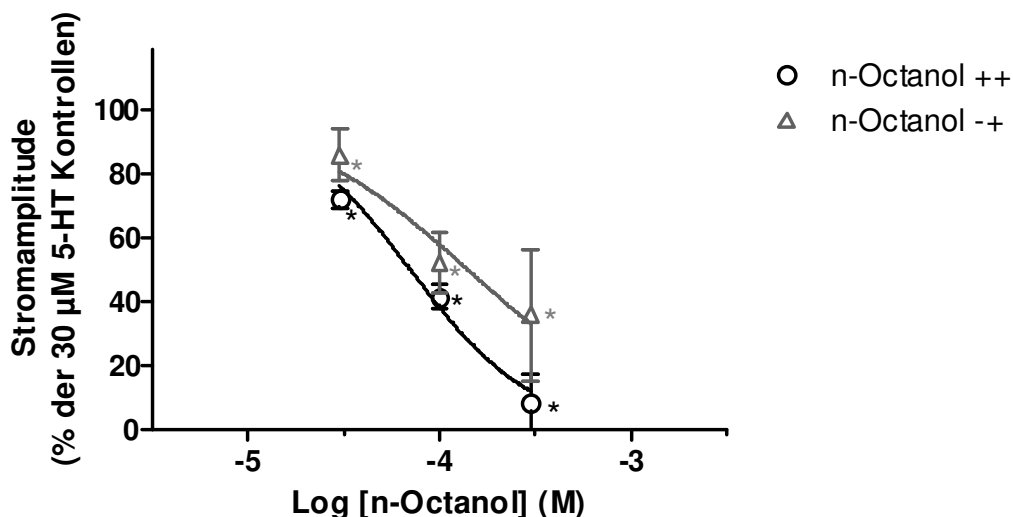


Abbildung 31: Effekte von n-Octanol auf die Amplitude 5-HT (30 μM)-induzierter Ströme. Dargestellt ist die Stromamplitude in % der 30 μM 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Octanol Konzentration. Die gewählten n-Octanol-Konzentrationen waren 30 μM , 100 μM und 300 μM ($n = 3-6$).

Effekte von n-Octanol auf die Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetiken:

Die Desensibilisierung des Stromes wurde in beiden Applikationsformen durch alle untersuchten n-Octanol Konzentrationen beschleunigt (Abb. 32).

Die Aktivierung wurde durch n-Octanol in der Offen-Kanal-Applikation konzentrationsabhängig beschleunigt (Abb. 33). Die durch 300 μ M n-Octanol veränderte Aktivierungszeitkonstante betrug in dieser Applikation $41,9 \pm 15,1$ % der Kontrollen.

Effekte von n-Octanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante " τ_{off} ":

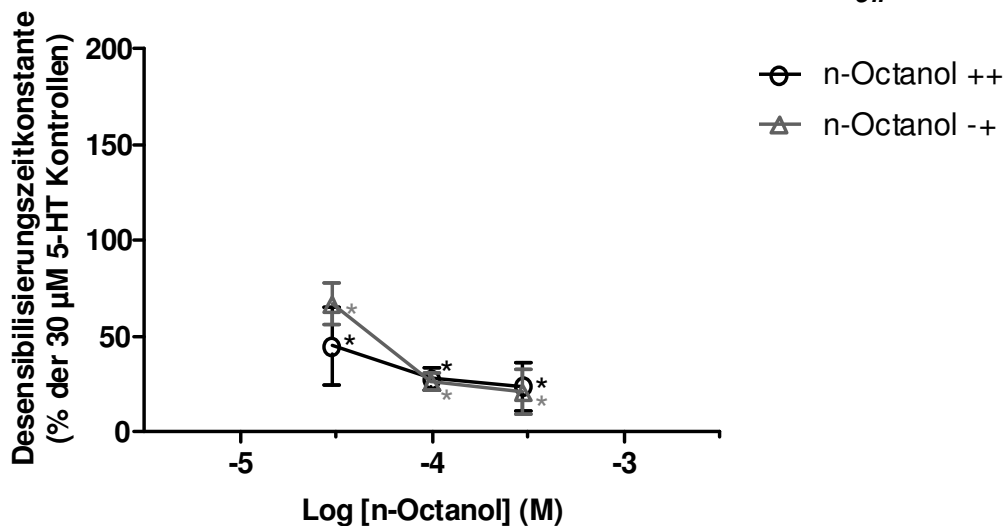


Abbildung 32: Effekt von n-Octanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante 5-HT (30μ M)-induzierter Ströme ($n= 2-6$). Dargestellt ist die Desensibilisierung in % der 30μ M 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Octanol-Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Desensibilisierungszeitkonstante des 30μ M 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von n-Octanol durch die Desensibilisierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne n-Octanol geteilt (Mittelwert für τ_{off} der Kontrollströme: 133 ± 82 ms; 62 Messungen an 18 „Patches“). In beiden Applikationsformen kam es konzentrationsabhängig zu einer Beschleunigung der Desensibilisierung.

Effekte von n-Octanol auf die Aktivierungskonstante " τ_{on} ":

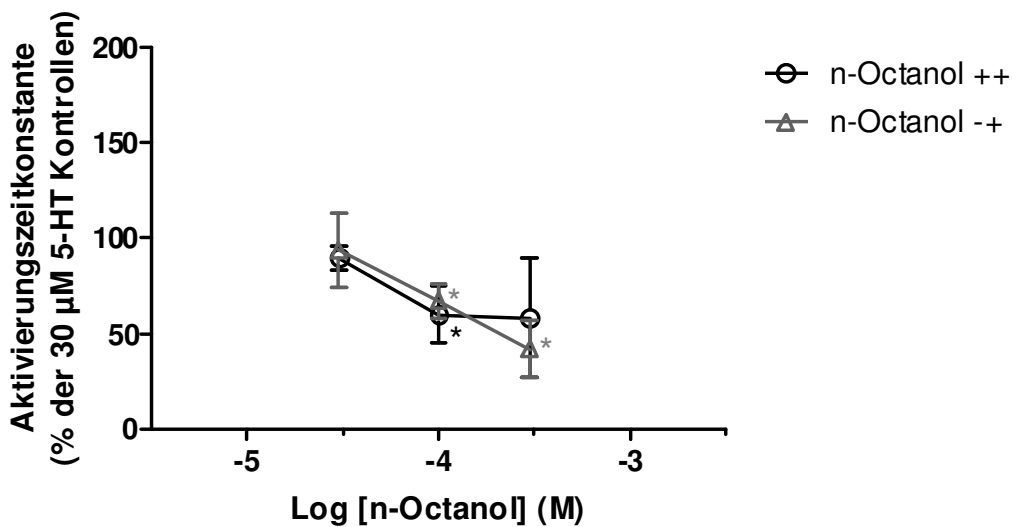


Abbildung 33: Effekte von n-Octanol auf die Aktivierungszeitkonstante 5-HT (30 μ M)-induzierter Ströme ($n= 3-6$). Dargestellt ist die Aktivierungszeitkonstante in % der 30 μ M 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Octanol Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Aktivierungszeitkonstante des 30 μ M 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von n-Octanol durch die Aktivierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne n-Octanol geteilt (Mittelwert für τ_{on} der Kontrollströme: $12,5 \pm 11$ ms; 61 Messungen an 18 „Patches“).

Einwaschexperimente: schnelle und langsame Effekte von n-Octanol

Die Einwaschexperimente mit n-Octanol wurden gleichermaßen wie die für die zuvor untersuchten n-Alkanole durchgeführt. Als n-Octanol Konzentration wurden 70 μ M (IC_{50} -Wert der Äquilibrium-Applikation) gewählt. Es zeigte sich ein biphasisch inhibierender Effekt (Abb. 34). Nach der initialen schnellen Inhibierung nahm diese bei längerer Einwaschdauer (mehrere Sekunden) bis zum Erreichen des Plateaus nur noch leicht zu. Eine potenzierende Komponente wie bei n-Hexanol konnte nicht beobachtet werden.

Nachdem die gemittelten „Patche“ biexponentiell gefittet wurden, resultierte eine schnelle Zeitkonstante (τ_{fast}) von 5 ms und eine langsame Zeitkonstante (τ_{slow}) von 0,48 s (siehe auch Tabelle 3). Die Fitbedingungen waren die gleichen wie bei den zuvor untersuchten n-Alkanolen (siehe freier Fit, Methodenteil).

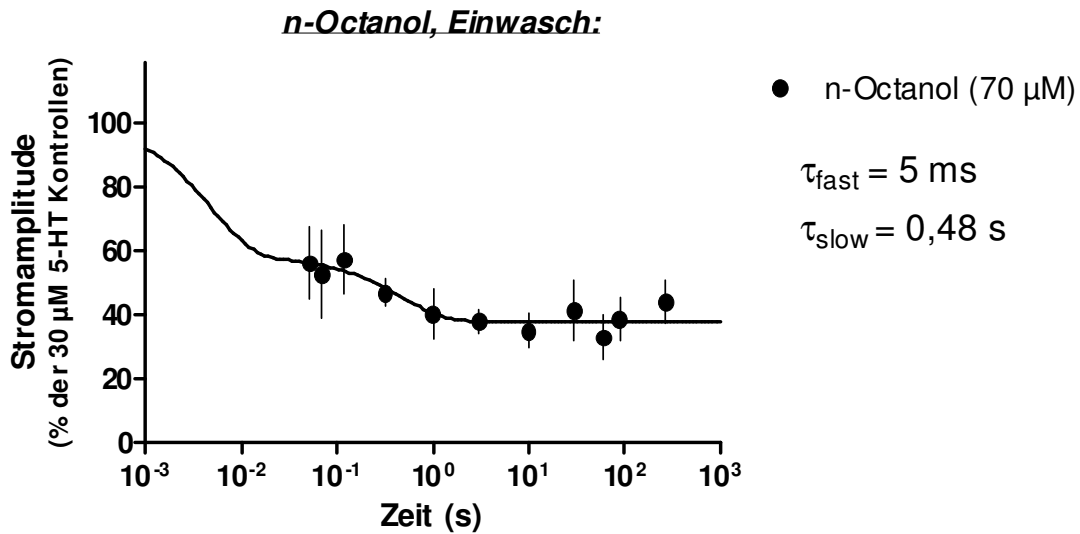


Abbildung 34: Effekte von *n*-Octanol bei verschiedenen Einwaschzeiten ($n = 3-4$). Dargestellt ist der relative Peakstrom bei jeweiliger *n*-Octanol Einwaschdauer als Prozent des 5-HT (30 µM)-induzierten Kontrollstromes, der für Rundown (mit Zeitkonstante typischerweise im Zehn-Minutenbereich) korrigiert wurde (siehe Methodenteil 4.7.2). *N*-Octanol wurde in einer Konzentration von 70 µM (IC_{50} -Wert, Äquilibrium) appliziert. Die resultierende Kurve zeigte einen biphasischen Effekt (Plateau-Reststrom: $38 \pm 4 \%$ ($\pm 95 \%$ Konfidenzintervall)).

5.5 *n*-Decanol

Während den Messungen mit *n*-Decanol kam es zur Einführung des 9-Wege-Systems. Von daher wurden die Experimente mit *n*-Decanol sowohl mit dem 5-Wege-System als auch mit dem 9-Wege-System durchgeführt.

Mit dem 5-Wege-System wurde eine 3 µM *n*-Decanol Konzentration gemessen. Anschließend wurde auf das 9-Wege-System gewechselt, und es folgten die Messungen mit 0,3 µM, 1 µM und erneut 3 µM *n*-Decanol. Diese *n*-Decanol Konzentrationen wurden zur Sicherheit des vollständigen Lösens der Substanz (mit dem Auge keine Trübung der Lösung mehr erkennbar) mindestens 48 h gerührt.

Für die Einwaschexperimente wurden die *n*-Decanollösungen aus einer 10 mM Ethanolstammlösung hergestellt (siehe Methodenteil). Beide Herstellungsweisen der *n*-Decanolösung resultierten in IC_{50} -Werten für die Strominhibierung, welche nicht signifikant

unterschiedlich waren. Ebenfalls stimmten die Messungen für 3 μM n-Decanol bei beiden Lösungsansätzen (5- und 9-Wege-System) überein.

Effekte von n-Decanol auf die Stromamplitude:

Auch n-Decanol zeigte konzentrationsabhängig zunehmende inhibierende Effekte auf den 5-HT (30 μM)-induzierten Strom (Abb. 35 und 36). Folgendes wird illustriert anhand von Originalstromspuren welche am 9-Wege-System gemessen wurden.

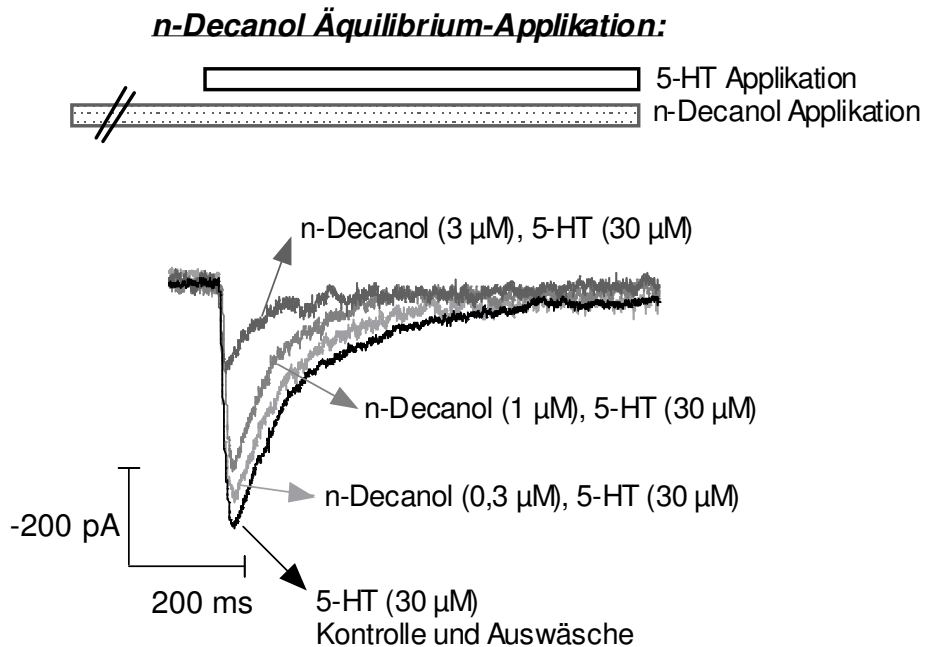


Abbildung 35: Originalstromspuren eines in Äquilibrium-Applikation durchgeführten Experimentes an einem „Patch“. Mit steigender n-Decanol Konzentration kam es zu einer zunehmenden Reduktion des Peakstromes gegenüber dem (30 μM) 5-HT-induzierten Kontrollstrom. Kontrolle und Auswaschspuren von 5-HT (30 μM) wurden wegen Überlagerungen mit den Substanzspuren als gemittelte Stromspur gezeigt.

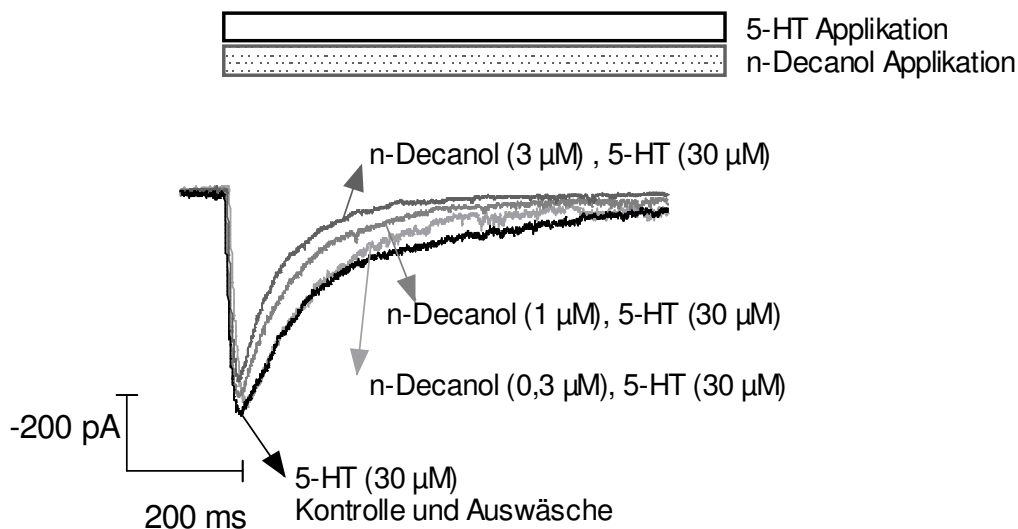
n-Decanol, Offen-Kanal-Applikation:

Abbildung 36: Originalstromspuren eines in Offen-Kanal-Applikation durchgeführten Experimentes an einem „Patch“. Mit steigender n-Decanol-Konzentration kam es zu einer nur noch schwach zunehmenden Reduktion des Peakstromes gegenüber dem 5-HT (30 μM)-induzierten Kontrollstrom. Kontrolle und Auswaschspuren von 5-HT (30 μM) sind als gemittelte Stromspur dargestellt.

Auch bei n-Decanol wurden Konzentrations-Wirkungskurven des Effektes auf die Stromamplitude erstellt (Abb. 37). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängig zunehmende Inhibierung der Stromantwort für die Äquilibrium und die Offen-Kanal-Applikation.

In der Äquilibrium-Applikation führte die niedrigste n-Decanol Konzentration (0,3 μM) nicht zu einer signifikanten Veränderung der Stromamplitude. Die mittlere n-Decanol Konzentration führte mit einem Mittelwert der Stromamplitude von $80,2 \pm 9,0$ % der Kontrollen zu einer signifikanten Hemmung gegenüber dem 5-HT Kontrollstrom. Für die 3 μM n-Decanollösung war die stärkste Stromamplitudenreduktion zu verzeichnen, wobei die Amplitude nur noch $47,5 \pm 9,6$ % der Kontrollen betrug (Abb. 37).

In der Offen-Kanal-Applikation war die Stromamplitudenhemmung durch n-Decanol insgesamt nur noch gering. Die niedrige n-Decanol-Konzentration (0,3 μM) führte auch in dieser Applikation nicht zu einem signifikanten Stromamplitudeneffekt. Die 1 μM - und

3 μM n-Decanolösungen erzeugten jeweils eine leichte signifikante Stromamplitudenreduktion ($90,15 \pm 2,85 \%$ und $84,89 \pm 7,28 \%$ der Kontrollen, Abb. 37).

Per Inter- (Äquilibrium-Applikation), beziehungsweise in der Offen-Kanal-Applikation Extrapolation der gefitteten n-Decanol Daten, ergaben sich folgende IC_{50} -Konzentrationen: $2,5 \pm 0,40 \mu\text{M}$ für die Äquilibrium-Applikation und $21 \pm 0,7 \mu\text{M}$ für die Offen-Kanal-Applikation (Abb. 37 und Tabelle 2).

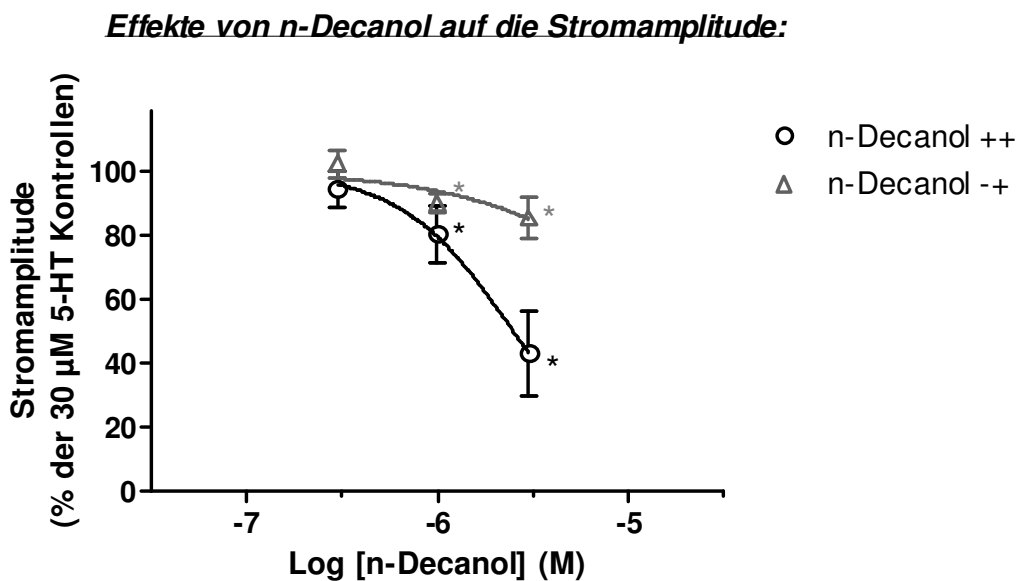


Abbildung 37: Effekte von n-Decanol auf die Amplitude 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme. Dargestellt ist die Stromamplitude in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Decanol Konzentration ($n = 4-10$).

Effekte von n-Decanol auf die Stromkinetiken:

n-Decanol führte in der Äquilibrium-Applikation zu einer konzentrationsabhängigen signifikanten Beschleunigung der Desensibilisierung (Abb. 38) In der Offen-Kanal-Applikation konnte erst durch die höchste n-Decanol Konzentration eine signifikante Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstante festgestellt werden.

Die Aktivierungszeitkonstante wurde jeweils nur bei der höchsten n-Decanol Konzentration ($3 \mu\text{M}$) signifikant beschleunigt (Abb. 39).

Effekte von n-Decanol auf die Desensibilisierungskonstante " τ_{off} ":

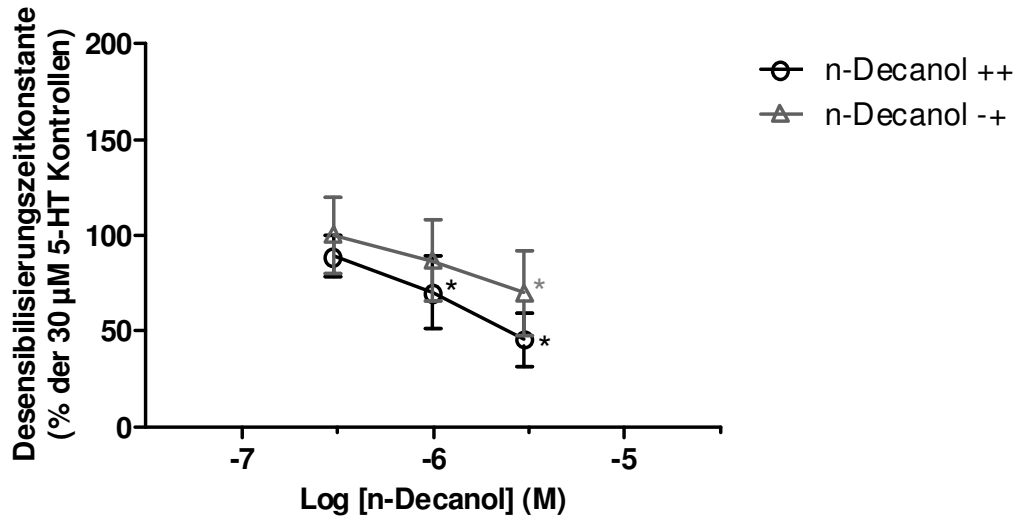


Abbildung 38: Effekt von n-Decanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante 5-HT (30 μ M)-induzierter Ströme ($n = 4-10$). Dargestellt ist die Desensibilisierungszeitkonstante in % der 30 μ M 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Decanol Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Desensibilisierungszeitkonstante des 30 μ M 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von n-Decanol durch die Desensibilisierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne n-Decanol geteilt (Mittelwert für τ_{off} der Kontrollströme: $112,7 \pm 75$ ms; 50 Messungen an 20 „Patches“).

Effekte von n-Decanol auf die Aktivierungskonstante " τ_{on} ":

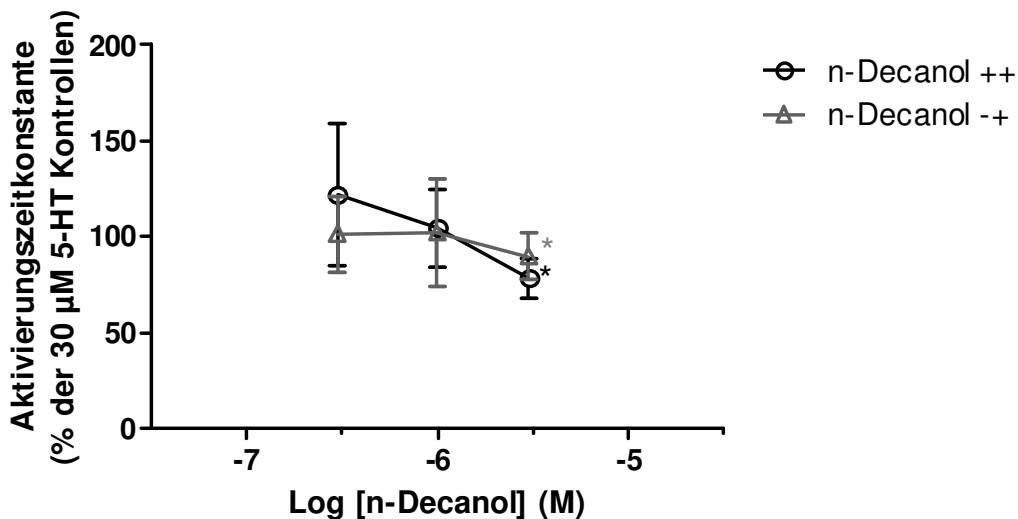


Abbildung 39: Effekte von n-Decanol auf die Aktivierungszeitkonstante 5-HT (30 μ M)-induzierter Ströme ($n = 4-10$). Dargestellt ist die Aktivierungszeitkonstante in % der 30 μ M 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Decanol Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Aktivierungszeitkonstante des 30 μ M 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von n-Decanol durch die Aktivierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne n-Decanol geteilt (Mittelwert für τ_{on} der Kontrollströme: $11,57 \pm 12$ ms; 50 Messungen an 20 „Patches“). Lediglich bei der 3 μ M Decanollösung kam es in der Äquilibrium- und Offen-Kanal-Applikation zu einer geringen aber signifikanten Beschleunigung der Aktivierungszeitkonstante.

Einwaschexperimente: schnelle und langsame Effekte von n-Decanol

Auch mit n-Decanol wurden Einwaschexperimente durchgeführt. Als n-Decanol-Konzentration wurden $2,5 \mu\text{M}$ (IC_{50} -Wert der Äquilibrium-Applikation) gewählt. Die initiale schnelle Inhibierung war schwächer ausgeprägt als bei n-Hexanol und n-Octanol, konsistent mit dem geringeren Effekt, welcher in der Offen-Kanal-Applikation gesehen wurde (Abb. 36 und 37). Bei längerer Einwaschdauer kam es dann bis zum Erreichen des Plateaus zu einer entsprechend stärkeren Hemmung des Peakstromes gegenüber der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrolle.

Nach biexponentiellem Fitten (freier Fit) der gemittelten Daten ergab sich folgendes Bild:

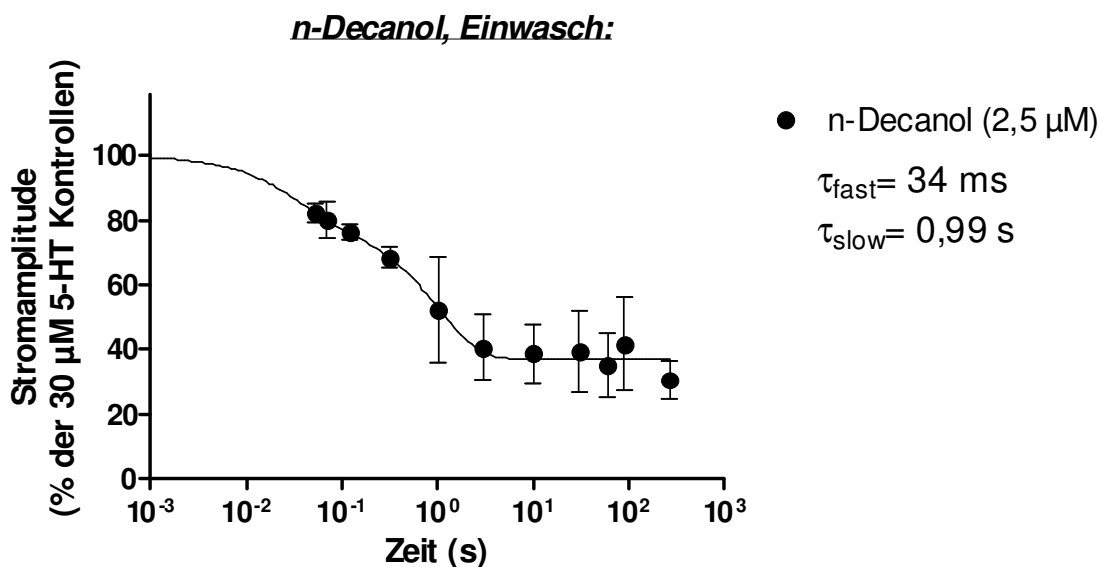


Abbildung 40: Effekte von n-Decanol bei verschiedenen Einwaschzeiten ($n = 2-4$). Dargestellt ist der relative Peakstrom bei jeweiliger n-Decanol Einwaschdauer als Prozent des 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Kontrollstromes, der für Rundown (mit Zeitkonstante typischerweise im Zehn-Minutenbereich) korrigiert wurde (siehe Methodenteil 4.7.2). Als applizierte n-Decanol-Konzentration wurden $2,5 \mu\text{M}$ (IC_{50}) gewählt. Durch den biexponentiellen Fit konnte ein biphasisch inhibierender Effekt festgestellt werden. (Plateau-Reststrom: $37 \pm 5 \%$ ($\pm 95 \%$ Konfidenzintervall)).

Nach biexponentiellem Fitten (Fitbedingungen entsprechen denen der zuvor untersuchten n-Alkanole) der erhobenen Daten resultierten zwei Zeitkonstanten der Strominhibierung, eine schnelle τ_{fast} von 34 ms und eine langsame τ_{slow} von 0,99 s (siehe auch Tabelle 3).

5.6 n-Dodecanol

Die n-Dodecanolmessungen gestalteten sich aufgrund der erhöhten Lipophilie etwas schwieriger, so mussten sämtliche n-Dodecanollösungen mithilfe einer Ethanolstamm- lösung angefertigt werden. Diese Ethanolstamm- lösung wurde jeweils am Vorabend des Experimentes angefertigt (siehe Methodenteil). Anschließend wurden am selben Tag aus dieser Ethanolstamm- lösung die n-Dodecanollösungen hergestellt und über Nacht unter Lichtschutz rühren gelassen. Am Tag des Experimentes wurde jeweils kontrolliert ob sich die Substanz vollständig gelöst hatte (mit dem Auge keine Trübung der Lösung mehr erkennbar).

Die Experimente mit n-Dodecanol wurden mit dem 9-Wege-System durchgeführt. Folgende n-Dodecanollösungen wurden gemessen: 0,1 μM , 0,3 μM und 1 μM (Abb. 41 und 42).

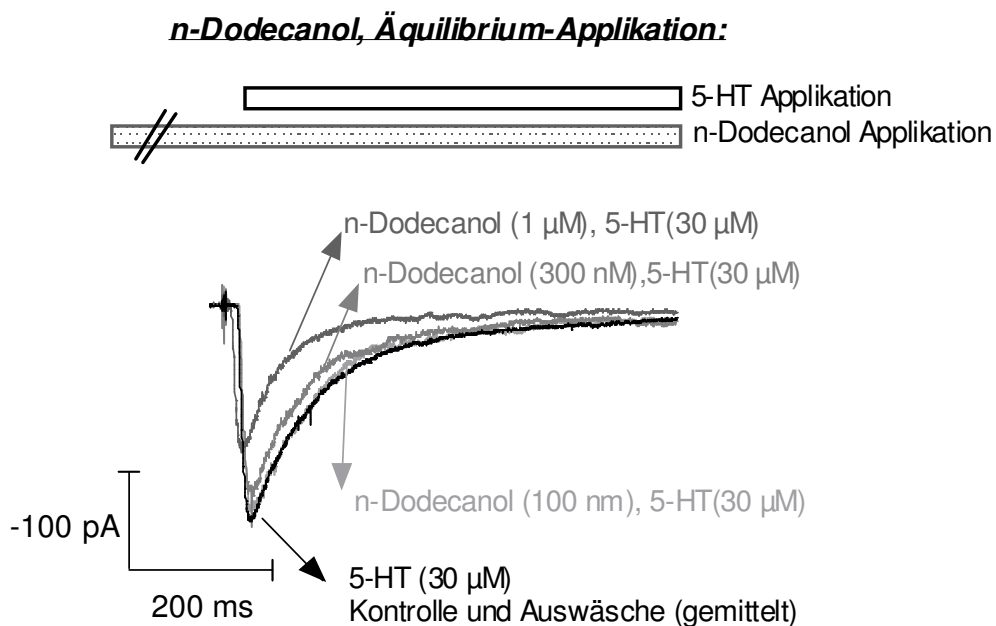


Abbildung 41: Originalstromspuren eines in Äquilibrium-Applikation durchgeführten Experimentes an einem „Patch“. Mit steigender n-Dodecanol-Konzentration kam es zu einer zunehmenden Reduktion des Peakstromes gegenüber dem 5-HT (30 μM)-induzierten Kontrollstrom. Kontrolle und Auswaschspuren von 5-HT (30 μM) wurden wegen Überlagerungen mit den Substanzspuren gemittelt.

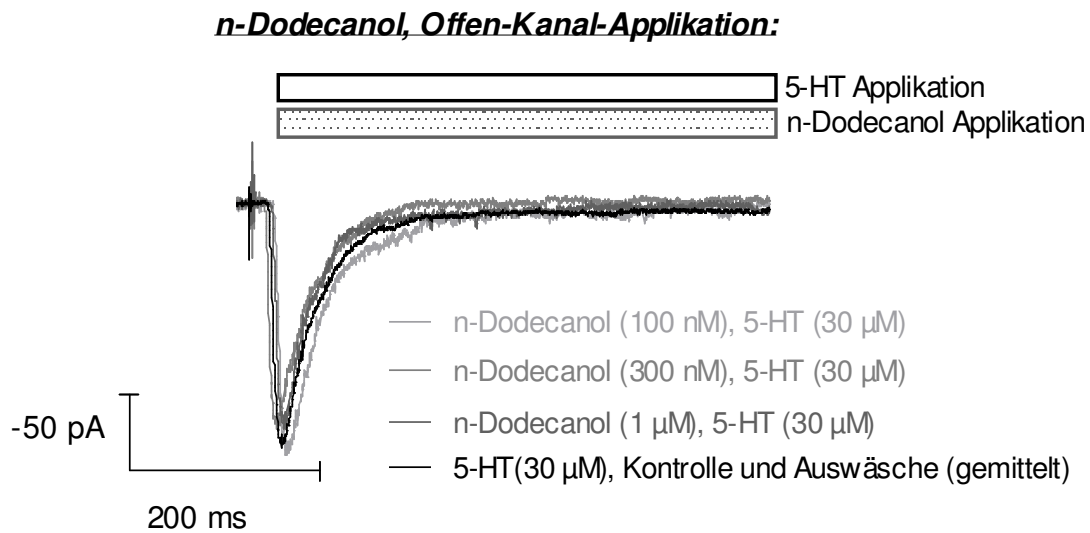


Abbildung 42: Originalstromspuren eines in Offen-Kanal-Applikation durchgeführten Experimentes an einem „Patch“. Mit steigender *n*-Dodecanol Konzentration kam es hier nur noch zu einer sehr leichten Unterdrückung des Peakstromes gegenüber dem 5-HT (30 µM) Kontrollstrom. Kontrolle und Auswaschspuren von 5-HT (30 µM) sind gemittelt dargestellt.

Nach der Analyse der Originalstromspuren wurden Konzentrations-Wirkungskurven für die Äquilibrium und Offen-Kanal-Applikation erstellt (Abb. 43).

In der Offen-Kanal-Applikation kam es zu keinem signifikanten Effekt durch *n*-Dodecanol auf die 30 µM 5-HT-induzierten Kontrollströme. In der Äquilibrium-Applikation hingegen war der inhibierende Effekt durch *n*-Dodecanol bei allen gemessenen Konzentrationen signifikant. Bei der höchsten gemessenen Substanzkonzentration (1 µM) konnte noch eine 50-prozentige Inhibierung ($IC_{50} = 0,8 \pm 0,3 \mu M$, Abb.43 und Tabelle 2) der 5-HT induzierten Kontrollströme erreicht werden.

Effekte von n-Dodecanol auf die Stromamplitude:

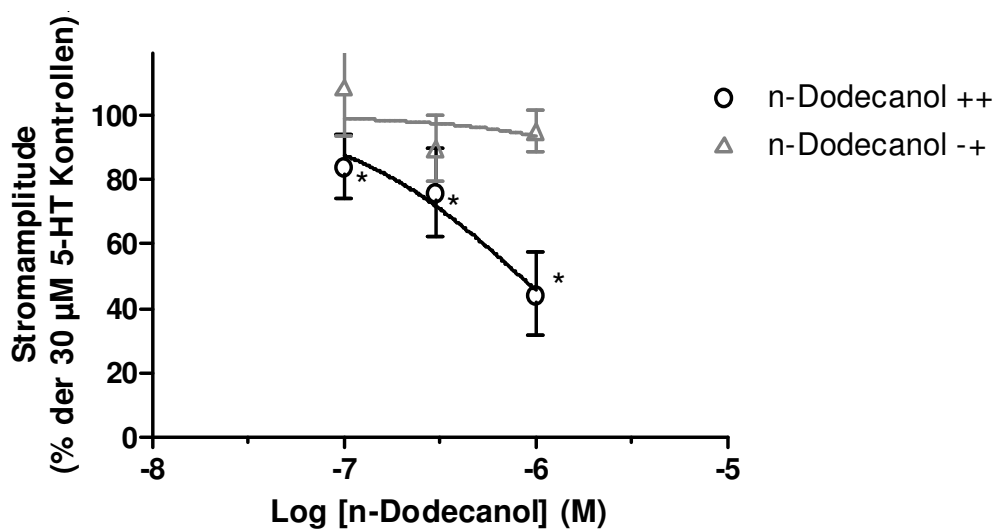


Abbildung 43: Effekte von n-Dodecanol auf die Amplitude 5-HT (30 µM)-induzierter Ströme. Dargestellt ist die Stromamplitude in % der 30 µM 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Dodecanol Konzentration. In der Äquilibrium-Applikation kam es mit steigender Konzentration zu einer zunehmenden Unterdrückung des Maximalstromes gegenüber der 5-HT (30 µM)-induzierten Kontrollen. In der Offen-Kanal Applikation hingegen war keine signifikante Veränderung der 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme durch n-Dodecanol zu verzeichnen (n= 5-6).

Effekte von n-Dodecanol auf die Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetiken:

n-Dodecanol führte sowohl im Äquilibrium- als auch im Offen-Kanal-Modus lediglich in hoher Konzentration (1µM) appliziert, zu einer signifikanten Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstante (Abb. 44). Dabei wurde die Desensibilisierungszeitkonstante in der Äquilibrium-Applikation durch 1 µm n-Dodecanol mit $47,0 \pm 15,8$ % der Kontrollen signifikant stärker beschleunigt als in der Offen-Kanal-Applikation ($76,1 \pm 14,8$ %).

Effekte von n-Dodecanol auf die Desensibilisierungskonstante " τ_{off} ":

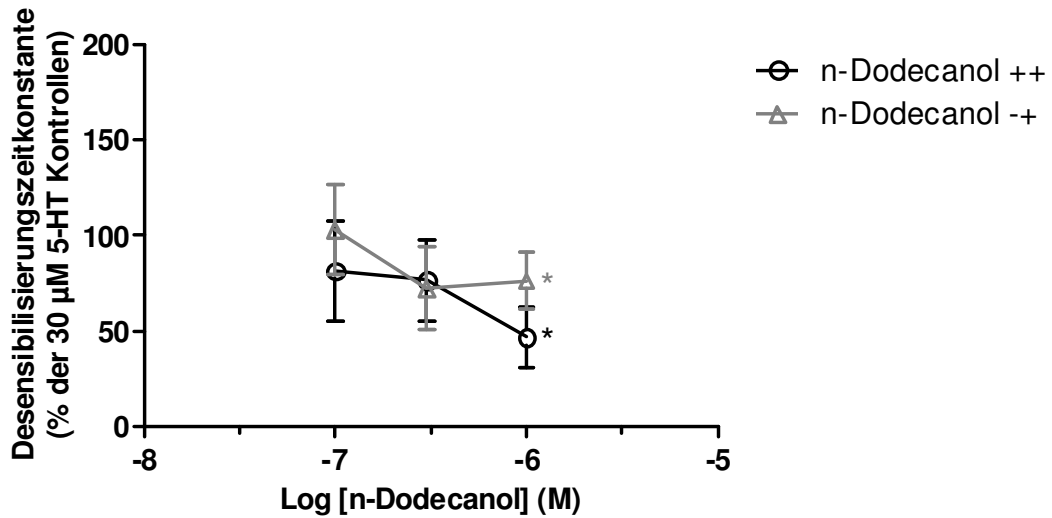


Abbildung 44: Effekt von n-Dodecanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme. Dargestellt ist die Desensibilisierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Dodecanol Konzentration in zwei verschiedenen Applikationsformen (Äquilibrium und Offen-Kanal) ($n=4-6$). Dabei wurde für jeden „Patch“ die Desensibilisierungszeitkonstante des $30 \mu\text{M}$ 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von n-Dodecanol durch die Desensibilisierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne n-Dodecanol geteilt (Mittelwert für τ_{off} der Kontrollströme: $68,66 \pm 62,33$ ms; 30 Messungen an 11 „Patches“).

Effekte von n-Dodecanol auf die Aktivierungskonstante " τ_{on} ":

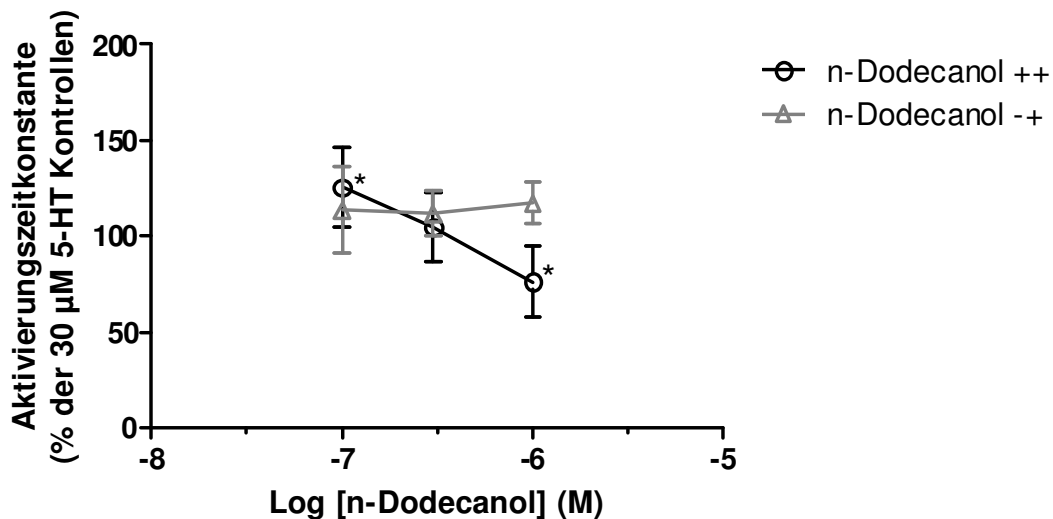


Abbildung 45: Effekte von n-Dodecanol auf die Aktivierungszeitkonstante 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme ($n=4-6$). Dargestellt ist die Aktivierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Dodecanol Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Aktivierungszeitkonstante des $30 \mu\text{M}$ 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von n-Dodecanol durch die Aktivierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne n-Dodecanol geteilt (Mittelwert für τ_{on} der Kontrollströme: $6,6 \pm 9,41$ ms; 31 Messungen an 11 „Patches“).

Einwaschexperimente: schnelle und langsame Effekte von n-Dodecanol

Als n-Dodecanol-Konzentration wurde für die Einwaschexperimente $0,5 \mu\text{M}$ (nahe dem IC_{50} -Wert der Äquilibrium-Applikation) gewählt. Beim graphischen Auftragen und Fitten der n-Dodecanoldaten ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den n-Decanol Einwaschexperimenten.

Die gemittelten Daten der „Patche“ zeigten nach graphischer Auftragung einen Effekt der sich biexponentiell fitten ließ (freier Fit, siehe Methodenteil) und in Abbildung 46 illustriert ist.

Der Fit der Einwaschdaten von n-Dodecanol führte auch hier zur Ermittlung von zwei Zeitkonstanten. Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten n-Alkanolen war die schnelle Zeitkonstante für n-Dodecanol mit $0,83 \text{ s}$ langsamer geworden (gleiche Fitbedingungen wie bei den zuvor untersuchten n-Alkanolen, siehe auch Tabelle 3). Die langsame Zeitkonstante für n-Dodecanol betrug $4,8 \text{ s}$. Allerdings konnte ein Fit mit nur einer Zeitkonstante nicht ausgeschlossen werden.

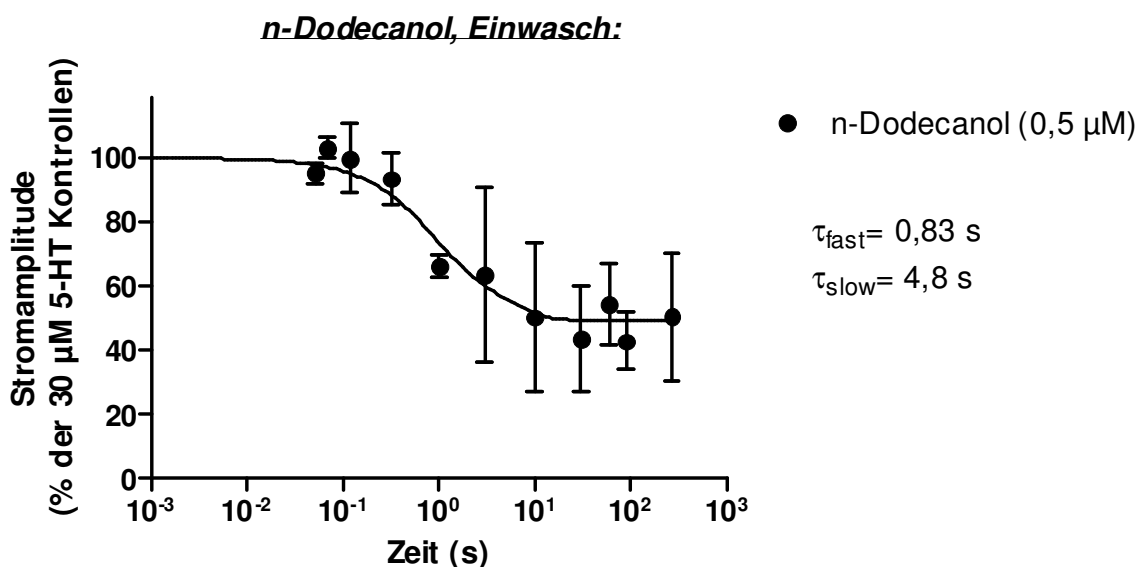


Abbildung 46: Effekte von n-Dodecanol bei verschiedenen Einwaschzeiten ($n = 3-8$). Dargestellt ist der relative Peakstrom bei jeweiliger n-Dodecanol Einwaschdauer als Prozent des 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Kontrollstromes, der für Rundown (mit Zeitkonstante typischerweise im Zehn-Minutenbereich) korrigiert wurde (siehe Methodenteil 4.7.2). Die n-Dodecanol Konzentration betrug $0,5 \mu\text{M}$ (nahe dem IC_{50} -Wert der Äquilibrium-Applikation). Durch biexponentielles Fitten der Daten konnte ein schneller inhibierender Effekt mit einer Zeitkonstante von $0,83 \text{ s}$ sowie ein langsamer Effekt mit einer Zeitkonstante von $4,8 \text{ s}$ beobachtet werden (Plateau-Reststrom: $49 \pm 6,5 \%$ ($\pm 95 \%$ Konfidenzintervall)).

5.7 n-Tetradecanol

Wie bei n-Dodecanol wurde auch die n-Tetradecanollösung mithilfe einer Ethanolstammlösung hergestellt, da eine direkte Lösung von n-Tetradecanol in ECS aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit ($0,89 \mu\text{M}$) von n-Tetradecanol nicht möglich war (siehe Methodenteil). Die Konzentration von n-Tetradecanol in der Ethanolstammlösung betrug 10 mM . Aus dieser Stammlösung wurden anschließend drei Lösungen für die Experimente hergestellt.

Die n-Tetradecanollösungen hatten folgende Substanzkonzentrationen: $0,1 \mu\text{M}$, $0,3 \mu\text{M}$ und $0,9 \mu\text{M}$ (gesättigte Lösung).

In den Abbildungen 47 und 48 wurde die Veränderung der 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Stromspuren durch n-Tetradecanol dargestellt.

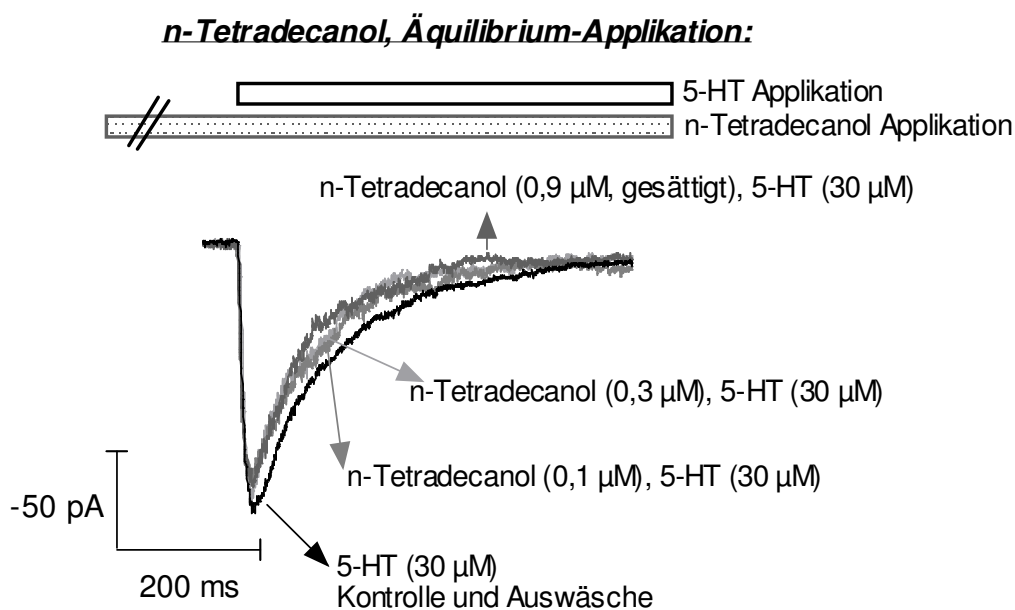


Abbildung 47: Originalstromspuren eines in Äquilibrium-Applikation durchgeführten Experimentes an einem „Patch“. Mit steigender n-Tetradecanol-Konzentration konnte nur eine sehr schwach zunehmende Reduktion des Peakstromes gegenüber dem 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierten Kontrollstrom beobachtet werden.

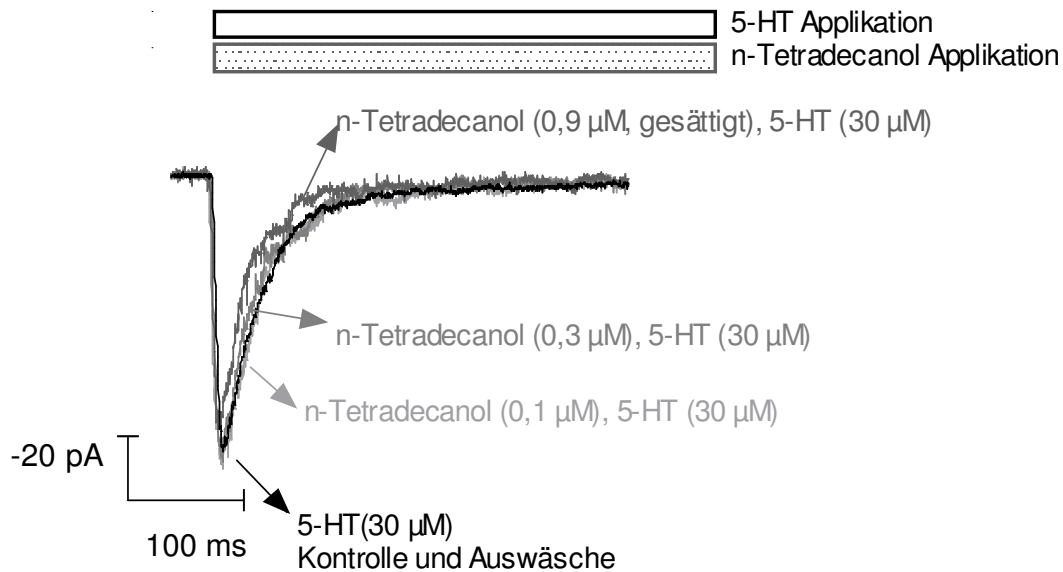
***n*-Tetradecanol, Offen-Kanal-Applikation:**

Abbildung 48: Originalstromspuren eines in Offen-Kanal-Applikation durchgeführten Experimentes an einem „Patch“. Die Stromspuren, welche zu den beiden niedrigen *n*-Tetradecanol-Konzentrationen gehören, ließen sich kaum von der 5-HT 30 μM Kontrolle unterscheiden. Hier war kaum eine Beeinflussung im Sinne einer Amplitudenreduktion durch *n*-Tetradecanol sichtbar.

Effekt von *n*-Tetradecanol auf die Stromamplitude:

Es wurden Konzentrations-Wirkungskurven für den Effekt von *n*-Tetradecanol auf die Stromamplitude in den Äquilibrium- und Offen-Kanal-Modi erstellt (Abb. 49). Wie bereits an den Originalspuren beobachtet werden konnte, war der inhibierende Effekt von *n*-Tetradecanol bei den gemessenen Konzentrationen gering. In der Äquilibrium-Applikation kam es bei allen gemessenen *n*-Tetradecanol-Konzentrationen zu einer geringen aber signifikanten Stromamplitudenreduktion. Die Stromamplitude wurde durch 0,9 μM *n*-Tetradecanol in dieser Applikation auf $81,0 \pm 14,2$ % der Kontrollen reduziert.

In der Offen-Kanal-Applikation zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt auf die Stromamplitude durch *n*-Tetradecanol.

Eine Bestimmung des IC_{50} -Wertes war aufgrund der limitierten Wasserlöslichkeit (0,89 μM) von *n*-Tetradecanol in keiner der untersuchten Applikationsarten möglich.

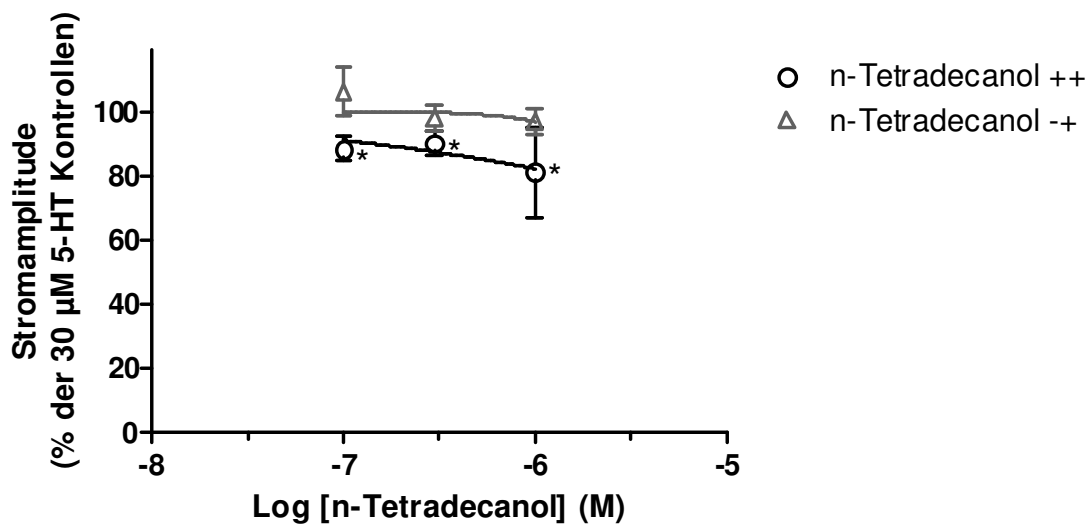
Effekte von n-Tetradecanol auf die Stromamplitude:

Abbildung 49: Effekte von n-Tetradecanol auf die Amplitude 5-HT (30 μ M)-induzierter Ströme ($n=5-7$). Dargestellt ist die Stromamplitude in % der 30 μ M 5-HT Kontrolle in Bezug auf die n-Tetradecanol Konzentration. Nur in der Äquilibrium-Applikation kam es zu einer statistisch signifikanten Unterdrückung des Maximalstromes gegenüber der 5-HT (30 μ M)-induzierten Kontrolle durch n-Tetradecanol.

Effekte von n-Tetradecanol auf die Stromkinetiken:

In Bezug auf den Effekt von n-Tetradecanol auf die Aktivierung und Desensibilisierung des 30 μ M 5-HT-induzierten Stromes ließ sich kein eindeutiger Trend nachweisen (Abb. 50 und 51).

Effekte von *n*-Tetradecanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante " τ_{off} ":

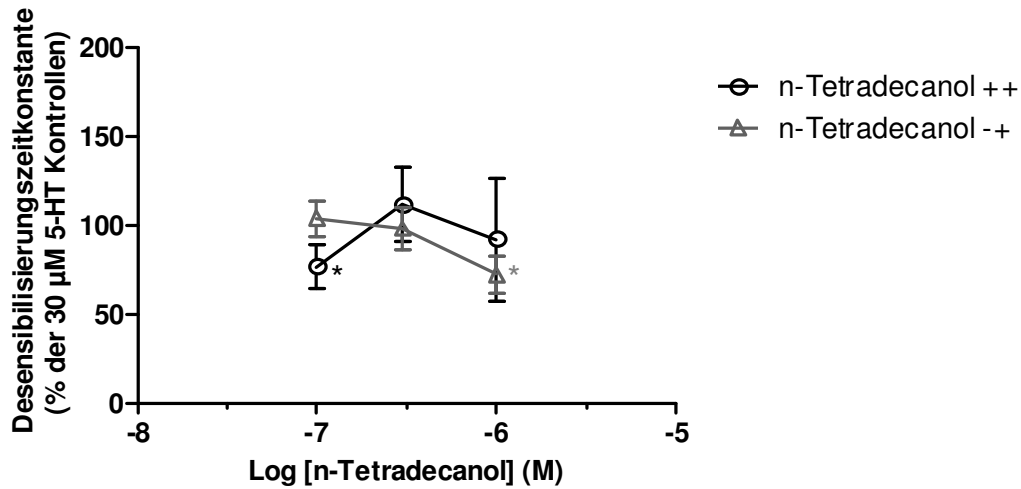


Abbildung 50: Effekt von *n*-Tetradecanol auf die Desensibilisierungszeitkonstante 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme ($n = 5-7$). Dargestellt ist die Desensibilisierung in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrolle in Bezug auf die *n*-Tetradecanol Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Desensibilisierungszeitkonstante des $30 \mu\text{M}$ 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von *n*-Tetradecanol durch die Desensibilisierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne *n*-Tetradecanol geteilt (Mittelwert für τ_{off} der Kontrollströme: $83,98 \pm 54,02 \text{ ms}$; 35 Messungen an 8 „Patchen“).

Effekte von *n*-Tetradecanol auf die Aktivierungszeitkonstante " τ_{on} ":

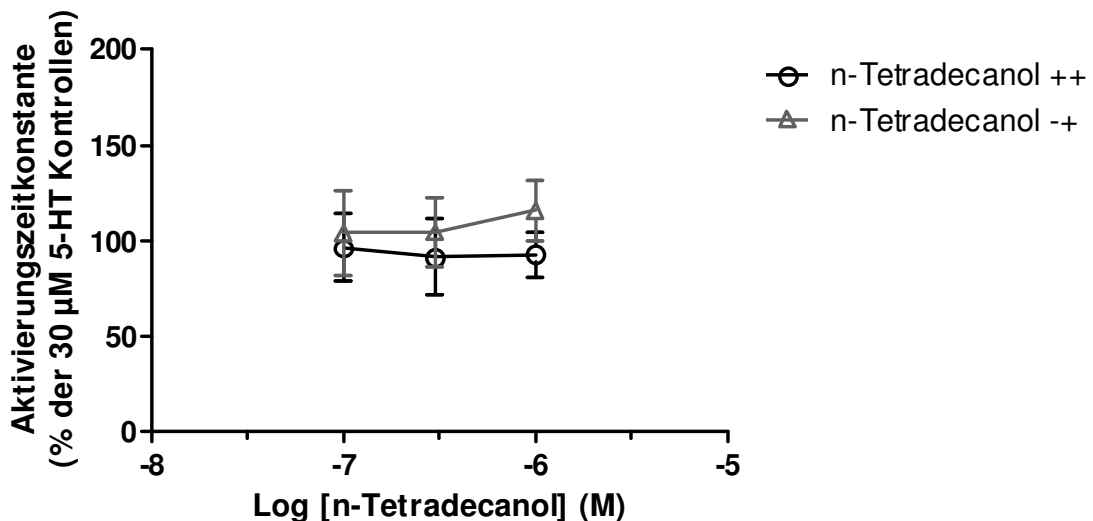


Abbildung 51: Effekte von *n*-Tetradecanol auf die Aktivierungszeitkonstante 5-HT ($30 \mu\text{M}$)-induzierter Ströme ($n = 5-7$). Dargestellt ist die Aktivierungszeitkonstante in % der $30 \mu\text{M}$ 5-HT Kontrolle in Bezug auf die *n*-Tetradecanol Konzentration. Dabei wurde für jeden „Patch“ die Aktivierungszeitkonstante des $30 \mu\text{M}$ 5-HT induzierten Stromes in Gegenwart von *n*-Tetradecanol durch die Aktivierungszeitkonstante des Kontrollstromes ohne *n*-Tetradecanol geteilt (Mittelwert für τ_{on} der Kontrollströme: $8,67 \pm 3,35 \text{ ms}$; 35 Messungen an 8 „Patchen“). Es bestand keine signifikante Veränderung der Aktivierungszeitkonstante durch *n*-Tetradecanol.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von n-Alkanolen auf humane 5-HT_{3A}-Rezeptoren mittels der „Patch-clamp“ Methode in Kombination mit einem schnellen Lösungsaustauschsystem untersucht. Nach Charakterisierung dieser Effekte, insbesondere hinsichtlich der Beeinflussung der Stromamplituden und Stromkinetiken, wurden die Wirkungen der n-Alkanole mit denen zuvor am 5-HT_{3A}-Rezeptor untersuchter Substanzen wie dem Propofol und Phenolderivaten verglichen.

6.1 Methodische Fragen

Aus stabil transfizierten HEK 293 Zellen, welche humane 5-HT_{3A}-Rezeptoren exprimierten, wurden „outside-out Patche“ entnommen. Der Vorteil der transfizierten Zellen bestand darin, dass die Rezeptoren in besonders hoher Dichte vorlagen und so die Stromamplituden, welche durch 30 μ M 5-HT induziert wurden, deutlich größer waren als bei anderen Präparationen (Barann et al., 1997), was die Evaluierung der beobachteten Effekte erleichterte.

In „outside-out Patchen“ sind die Ionenkanäle in ihrer Umgebung komplett isoliert von Zytosol und störenden umliegenden Zellen oder Membranen, welche es den Testsubstanzen erschweren könnten, an den zu untersuchenden Wirkort zu gelangen.

Zusätzlich erlaubte das Lösungsapplikationssystem einen Lösungsaustausch innerhalb weniger Millisekunden (\sim 2 ms), was eine Beobachtung und Unterscheidung schneller und langsamer Effekte ermöglichte. Die durch 30 μ M 5-HT induzierten Ströme zeigten die erwarteten Aktivierungs- und Desensibilisierungszeitkonstanten (Barann et al., 2008). Das Membranhaltepotenzial wurde während der Durchführung der Experimente kontinuierlich auf -100 mV gehalten, was einer Depolarisierung und Beteiligung eventuell vorhandener spannungsabhängiger Kanäle entgegenwirkte.

6.2 Vergleich der verschiedenen n-Alkanole

Die Applikation von n-Alkanolen auf „excised outside-out Patche“ welche 5-HT_{3A}-Rezeptoren enthielten, führte insgesamt zu einer Inhibierung der 5-HT (30 µM) induzierten Ströme, verglichen mit den respektiven Kontrollströmen.

In den meisten Experimenten wurde 30 µM als 5-HT Konzentration gewählt, da diese Konzentration eine nahezu maximale Stromantwort hervorruft. Desweiteren diene diese Konzentration als Referenz für die Einschätzung der Qualität der „Patche“ und erlaubte einen Vergleich der Experimente mit zahlreichen anderen Anästhetika und anästhetika-ähnlichen Substanzen, welche bereits am 5-HT_{3A}-Rezeptor untersucht worden waren.

Schaute man sich die Originalspuren der n-Alkanole in den verschiedenen Applikationsformen an, so konnte erkannt werden, dass die Stromantwort durch eine 60 s Exposition (Äquilibrium-Applikation) jedes n-Alkanols stärker inhibiert wurde, als wenn der „Patch“ dem n-Alkanol nur ungefähr 20 ms (Offen-Kanal) ausgesetzt war. Der inhibierende Effekt durch die kurze Applikation von n-Alkanol (Offen-Kanal) wurde ab n-Hexanol kontinuierlich schwächer, so dass bei n-Alkanolen, welche längerkettiger als n-Decanol waren, kein signifikanter inhibierender Effekt mehr auf die Stromamplitude zu beobachten war.

Durch diese unterschiedlichen Effekte auf die Inhibierung, je nach Dauer der n-Alkanol-Exposition, schien es nun sinnvoll, die Inhibierung der Stromamplitude durch n-Alkanole detaillierter zu analysieren. Dabei wurde versucht herauszufinden, wie lange das n-Alkanol appliziert werden musste, bis der volle Effekt erreicht war. Aus diesem Grund wurden Einwaschexperimente durchgeführt, bei denen die n-Alkanole in unterschiedlich langen Zeitintervallen (zusätzlich zu 20 ms und 60 s) appliziert wurden. Um die Effekte sinnvoll miteinander vergleichen zu können, wurden bei allen Einwaschexperimenten equipotente n-Alkanol Konzentrationen gewählt (IC₅₀-Wert oder Konzentration nahe dem IC₅₀-Wert der Äquilibrium-Applikation). Bei diesen Konzentrationen war der inhibierende Effekt des n-Alkanols groß genug und ermöglichte somit auch zu erkennen, ob die Inhibierung sich eventuell aus mehr als einer Komponente zusammensetzte. Zur Er-

mittlung der IC_{50} -Werte (Tabelle 2) wurden Konzentrations-Wirkungsbeziehungen des Effektes der n-Alkanole auf die Stromamplitude erstellt. Auf die Messung kompletter Konzentrations-Wirkungskurven wurde verzichtet. Vielmehr wurden die Konzentrationen so gewählt, dass sie den IC_{50} -Wert der Äquilibrium-Applikation einklammerten, da dieser als Referenzkonzentration für die Einwaschexperimente dienen sollte.

Alkanol	$IC_{50}^{\text{Äquilibrium}}$ (M)	n_H	$IC_{50}^{\text{Offen-Kanal}}$ (M)	n_H
Ethanol	1,1 ($\pm 0,2$)	-2,0 ($\pm 1,1$)	1,7 ($\pm 0,6$)	-1,4 ($\pm 0,6$)
n-Butanol	$3,0 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 7,8 \cdot 10^{-3}$)	-1,2 ($\pm 0,4$)	$8,8 \cdot 10^{-2}$ ($\pm 1,8 \cdot 10^{-2}$)	-2,1 ($\pm 0,8$)
n-Hexanol	$1,5 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 2,0 \cdot 10^{-4}$)	-2,8 ($\pm 0,8$)	$1,7 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 2,3 \cdot 10^{-4}$)	-1,7 ($\pm 0,6$)
n-Octanol	$7,0 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 1,3 \cdot 10^{-5}$)	-1,4 ($\pm 0,3$)	$1,4 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 6,2 \cdot 10^{-5}$)	-0,9 ($\pm 0,5$)
n-Decanol	$2,5 \cdot 10^{-6}$ ($\pm 4,2 \cdot 10^{-7}$)	-1,5 ($\pm 0,5$)	$2,2 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 7,9 \cdot 10^{-5}$) [$> 3 \cdot 10^{-6}$]	-0,9 ($\pm 0,8$)
n-Dodecanol	$8,3 \cdot 10^{-7}$ ($\pm 3,4 \cdot 10^{-7}$)	-0,9 ($\pm 0,4$)	[$> 1 \cdot 10^{-6}$]	/
n-Tetradecanol	[$> 0,89 \cdot 10^{-6}$]	/	[$> 0,89 \cdot 10^{-6}$]	/

Tabelle 2: IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten n_H (± 95 % Konfidenzintervalle), welche durch Fitten der Konzentrations-Wirkungskurven der einzelnen n-Alkanole anhand von Hill Gleichungen errechnet wurden. Die Werte in eckigen Klammern bezeichnen jeweils die höchste gemessene n-Alkanol-Konzentration, bei der der Effekt noch nicht 50 % war.

Bei der Betrachtung der Konzentrations-Wirkungskurven konnte kein monoton verlaufender kettenlängenabhängiger Trend erkannt werden. Während die Konzentrations-Wirkungskurven der Äquilibrium und der Offen-Kanal-Applikation von Ethanol und n-Hexanol noch nahezu überlagert waren, separierten sie sich mehr, je länger der n-Alkanol wurde (Ausnahme n-Butanol, siehe unten).

Neben dem Effekt von n-Alkanolen auf die Stromamplitude konnte bei der „excised outside-out“ Konfiguration auch der Effekt von n-Alkanolen auf die Stromkinetiken untersucht werden. Die Zeitkonstanten der Aktivierung und Desensibilisierung der 30 μM 5-HT-induzierten Ströme lagen im erwarteten Bereich für „excised Patche“ (Barann et al., 2008). Sowohl die Aktivierung als auch die Desensibilisierung des Stromes wurden durch n-Alkanole nicht verlangsamt, sondern bei höheren Konzentrationen beschleunigt. Bei den anschließenden Einwaschexperimenten, in denen die Inhibierung der 5-HT induzierten Ströme durch n-Alkanole näher analysiert werden sollte, zeigten sich biphasische Effekte, welche biexponentiell gefittet werden konnten (freier Fit, siehe Methodenteil). In allen Experimenten zeigte sich eine schnellere und eine langsamere inhibierende Phase (Tabelle 3). Nur n-Hexanol stellte eine Ausnahme dar. Hier wurde anstelle einer langsamen inhibierenden Phase eine potenzierende Phase gesehen, welche auf die schnelle Inhibierung folgte und zu einer partiellen Erholung des Peakstromes führte.

n-Alkanol	[μM]	τ_{fast} (ms)	F_{fast} (%)	τ_{slow} (s)	F_{slow} (%)	Plateau (%)	R^2
Butanol	45 300	16 (3.1 - ∞)	40 (29 - 52)	4.1 (2.2 - 24.5)	60	38 (34 - 43)	0.74
Hexanol	1 500	21 (11 - 260)	137 (115 - 158)	11.6 (4.1 - ∞)	-37	56 (50 - 62)	0.38
Octanol	70	5 (0.004 - ∞)	67 (47 - 88)	0.48 (0.17 - ∞)	33	38 (34 - 42)	0.51
Decanol	2.5	34 (10 - ∞)	31 (6 - 56)	0.99 (0.56 - 4.69)	69	37 (32 - 42)	0.83
Dodecanol	0.5	830 (210 - ∞)	64 (0 - 100)	4.8 (0.72 - ∞)	36	49 (43 - 56)	0.72

Tabelle 3: Resultierende Zeitkonstanten aus dem freien biexponentiellen Fit (siehe Methodenteil) der Einwaschdaten. Die n-Alkanol Konzentration wurde gleich oder nahe dem IC_{50} -Wert gewählt. Freie Fitparameter waren, neben den zwei Zeitkonstanten, die Amplitude des schnellen Effektes (Prozent des totalen Effektes) und der Wert des Plateaus (i.e. Reststrom nachdem der Einwasch vollständig ist). Die Amplitude des langsamen Effektes von n-Hexanol ist wegen der bestehenden Potenzierung negativ. Die Amplituden des langsamen und schnellen Effektes addieren sich zum totalen Effekt (100 %). Weiterhin sind die 95 % Konfidenzintervalle für die Fitparameter sowie die Werte für R^2 angegeben.

Bei allen n-Alkanolen (Ausnahme n-Dodecanol) war die schnelle Inhibierung schneller als das kürzeste Zeitintervall der n-Alkanol-Applikation (52 ms), das in dieser Applikationsform gemessen werden konnte.

Unter Berücksichtigung der Streuungen der ermittelten Zeitkonstanten (siehe Konfidenzintervalle Tabelle 3) konnte weder für die schnelle noch für die langsame Zeitkonstante ein stark von der Kettenlänge des n-Alkanols abhängiger Trend erkannt werden. So konnte auch nicht ausgeschlossen werden, dass sowohl die schnelle Zeitkonstante als auch die langsame Zeitkonstante (mit einem Wert verschieden von dem der schnellen Zeitkonstante) für alle n-Alkanole gleich sein könnten.

Um zu testen ob die erhobenen Daten mit einer solchen Hypothese übereinstimmten, wurden die Einwaschkurven erneut gefittet, diesmal simultan für alle n-Alkanole (siehe Abschnitt 4.7.2, „verbundener Fit“). Hier konnten τ_{fast} und τ_{slow} für alle n-Alkanole gleichzeitig variieren, wobei sich ein allen n-Alkanolen gemeinsamer Wert für τ_{fast} , und ein allen n-Alkanolen gemeinsamer Wert für τ_{slow} ergeben musste (Tabelle 4). Die anderen Parameter konnten für jedes n-Alkanol frei variieren. Wie in Abbildung 52 gezeigt wird, ließen sich die Einwaschdaten jedes n-Alkanols mit diesen verbundenen Zeitkonstanten trotz eingeschränkter Fitvariabilität (nur noch zwei von vier Fitparametern konnten frei variieren, siehe Methodenteil) sehr gut fitten (Abb. 52 f und gestrichelte Linien Abb. 52 a-e) und unterschieden sich eher wenig von den freien Fits (Abbildung 52, durchgezogenen Linien a-e). Dabei ergab sich für die Fits mit verbundenen Zeitkonstanten nur ein gering schlechterer Wert für R^2 verglichen mit den freien Fits (Tabelle 3 und 4). Allerdings waren die Konfidenzintervalle der beiden Zeitkonstanten τ_{slow} und τ_{fast} nun eng genug geworden um anzugeben dass diese sich signifikant um einen Faktor 50 voneinander unterschieden. Desweiteren lagen bis auf n-Dodecanol alle schnellen Zeitkonstanten aus Tabelle 3 innerhalb des Konfidenzintervalles der schnellen Zeitkonstante aus Tabelle 4. Ähnlich lagen auch die langsamen Zeitkonstanten aus Tabelle 3 mit Ausnahme von n-Hexanol, entweder im oder nahe am Konfidenzintervall dieser Zeitkonstante in Tabelle 4.

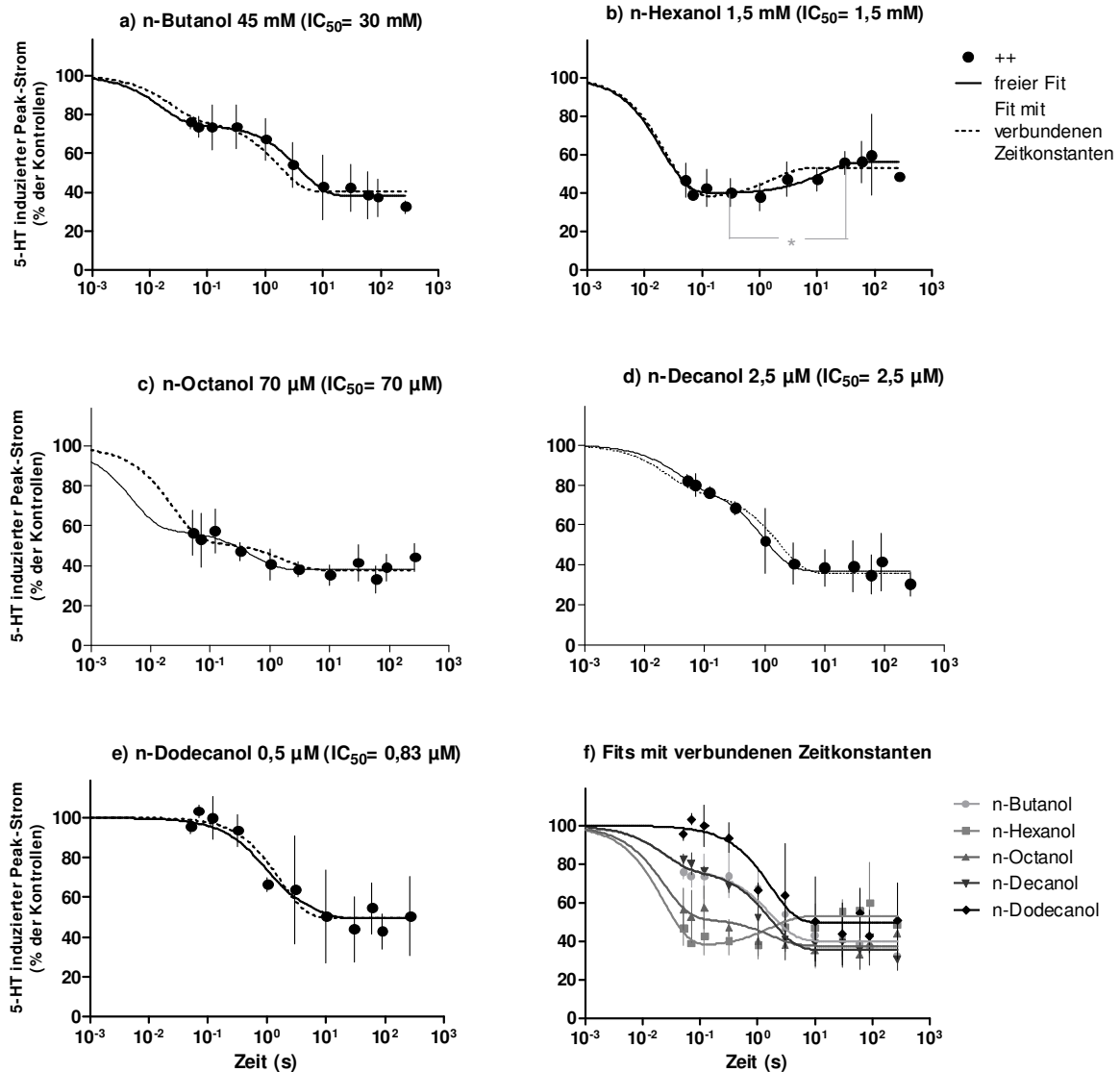


Abbildung 52: *n*-Alkohol-Einwaschkurven bei *n*-Alkohol Konzentrationen, die gleich oder ähnlich dem IC_{50} -Wert der Äquilibrium-Applikation gewählt wurden. Dargestellt ist der relative Peakstrom bei jeweiliger *n*-Alkohol Einwaschdauer als Prozent des 5-HT (30 μ M)-induzierten Kontrollstromes, der für Rundown (mit einer Zeitkonstante typischerweise im Zehn-Minutenbereich) korrigiert wurde (siehe Methodenteil 4.7.2). Jede Einwaschkurve besteht aus 5-10 Einzelpatches. Die Parameter der gefitteten Kurven (durchgezogene Linien; freier Fit, siehe Methodenteil) sind in Tabelle 3 aufgelistet. In f) sind alle Einwaschdaten der untersuchten *n*-Alkanole aus den Abbildungen 52 a-e zusammengefasst und erneut gefittet worden (verbundener Fit, siehe Methodenteil), diesmal simultan für alle *n*-Alkanole mit der Bedingung dass die Zeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow} zwar variieren durften, aber ein allen *n*-Alkanolen gemeinsamer Wert sowohl für τ_{fast} als auch für τ_{slow} resultieren musste. Die anderen Fitparameter konnten frei und individuell variieren (siehe Methodenteil). In den Abbildungen a-e sind diese verbundenen Fits für jedes *n*-Alkanol separat als gestrichelte Linien dargestellt (Fitparameter sind in Tabelle 4 angegeben).

n-Alkanol	τ_{fast} (ms)	F_{fast} (%)	τ_{slow} (s)	F_{slow} (%)	Plateau (%)	R^2
Butanol	24 (14 - 71)	38 (27 - 48)	1.7 (1.2 - 2.7)	62	40 (36 - 44)	0.71
Hexanol		134 (111 - 157)		-34	53 (48 - 58)	0.31
Octanol		77 (62 - 92)		23	38 (32 - 43)	0.47
Decanol		35 (23 - 46)		65	36 (30 - 41)	0.81
Dodecanol		0 (0 - 10)		100	50 (45 - 54)	0.71

Tabelle 4: Fitparameter und 95 % Konfidenzintervalle der Einwaschkurven mit verbundenen Zeitkonstanten. Die Fitparameter der einzelnen n-Alkanole entstammen dem verbundenen Fit bei dem alle n-Alkanole simultan gefittet wurden und dabei ein allen n-Alkanolen gemeinsamer Wert für die schnelle Zeitkonstante (τ_{fast}) und ein allen n-Alkanolen gemeinsamer Wert für die langsame Zeitkonstante (τ_{slow}) resultieren musste (Abb. 52 f und Abb. 52 a-e, gestrichelte Linien). Die anderen Fitparameter konnten individuell und frei variieren. Dabei fällt auf dass die Konfidenzintervalle für die schnelle und langsame Zeitkonstante deutlich enger geworden sind, verglichen mit den Zeitkonstanten der freien Fits aus Tabelle 3. Die Konfidenzintervalle für die anderen Parameter hingegen sind nur gering gegenüber denen aus Tabelle 3 verändert.

Während Potenzierung in den Einwaschexperimenten (30 μ M 5-HT) für n-Hexanol gesehen worden war, zeigte sich bei dieser 5-HT Konzentration kein direkter Hinweis auf Potenzierung bei den n-Alkanolen mit kürzerer Kettenlänge als n-Hexanol. Jedoch wurden in der Literatur in „Whole-cell“ Experimenten amplituden-potenzierende Eigenschaften von Alkoholen bis zu einer Kettenlänge von 6 Kohlenstoffatomen beschrieben, allerdings ausschließlich bei Strömen, welche durch niedrige 5-HT Konzentrationen induziert waren (Stevens et al., 2005b; Jenkins et al., 1996). Folglich wurde die Wirkung von Ethanol und n-Butanol, in sehr ähnlichen Konzentrationen zu denen aus den „Whole-cell“ Experimenten appliziert, auch an „excised outside-out Patches“ zusammen mit niedrigen 5-HT-Konzentrationen getestet. Dabei wurde in jedem Experiment zusätzlich eine 30 μ M 5-HT induzierte Kontrolle und Substanzspur gemessen. Somit konnte auch die Qualität des „Patches“ beurteilt werden.

Während die durch 30 μM 5-HT induzierten Ströme auch in diesen Experimenten durch die untersuchten n-Alkanole nicht potenziert wurden, konnten bei den niedrigen 5-HT Konzentrationen (1 und 2 μM) zum Teil Potenzierungen der Stromamplitude durch n-Butanol beobachtet werden (Abb. 19 und 20). Dabei schienen diese abhängig zu sein von der Kinetik der Kontrollströme, welche sich mit der „Lebensdauer“ der „Patche“ veränderte. Ethanol hingegen zeigte auch bei niedrigen 5-HT Konzentrationen ausschließlich inhibierende Effekte auf die Stromamplitude.

Die Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT wurde in der Offen-Kanal-Applikation weder durch Ethanol noch durch n-Butanol stark verändert. Die statistisch nicht signifikante leichte Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT durch Ethanol impliziert, dass ein eventueller kompetitiver Antagonismus bestenfalls schwach sein würde. Somit gibt es für keinen der untersuchten n-Alkanole Hinweise auf eine starke Kompetitivität mit 5-HT.

6.3 Vergleich der (molekularen bis systemischen) Potenzen von n-Alkanolen

Vergleicht man die IC_{50} -Werte der Strominhibierung durch n-Alkanole am $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptor mit IC_{50} oder EC_{50} Werten für andere Ionenkanäle, Proteine oder weiter integrierte Systeme (Aktionspotentiale bzw. Stellreflexe), so erkennt man, dass diese sich nicht viel voneinander unterscheiden (Abb. 53).

Mit zunehmender Größe und somit Hydrophobie der n-Alkanole nimmt die Potenz der n-Alkanole zu und folgt dabei einer Meyer-Overton Korrelation. Ab einer Kettenlänge von ungefähr 12 Kohlenstoffatomen bleibt zwar noch Aktivität erhalten, jedoch steigt die Potenz weniger an als von der Meyer-Overton Korrelation vorausgesagt, bevor sie schließlich zu verschwinden beginnt (siehe bakterielle Luciferase oder 5-HT_3 -Rezeptor in N1E-115 Zellen, Abb. 53). Ab einer bestimmten Kettenlänge geht die Wirkung eventuell sogar ganz verloren (Pringle et al., 1981). Dieses Phänomen wird auch als Cutoff bezeichnet und kann nicht nur bei n-Alkanolen, sondern auch in anderen homologen Reihen nachgewiesen werden (Liu et al., 1994). Der Cutoff liegt für die n-Alkanole meist zwischen einer Kettenlänge von 12 bis 14 Kohlenstoffatomen. Dabei

lassen sich die Cutoff Phänomene nicht nur auf molekularer Ebene, sondern auch in höheren Ebenen des Nervensystems beobachten (siehe Stellreflexverlust bei Kaulquappen, Abb. 53). Dies könnte ein Hinweis auf eine geringe Spezifität der Wirkung von n-Alkanolen sein.

Über mögliche Ursachen des Cutoffs wurde in den letzten dreißig Jahren viel spekuliert. Diverse Mechanismen, welche den plötzlichen Wirkungsverlust erklären sollten, wurden vorgeschlagen. Nachdem sich die Theorie der Lipidmembranen als primärem Wirkort für Anästhetika nicht durchsetzen konnte, rückte die sogenannte ‚Protein-Theorie‘ zunehmend in den Vordergrund. Hier galten Proteine als Hauptangriffspunkt von Anästhetika (Franks und Lieb, 1984; Richards et al., 1978; Franks und Lieb, 1982). Jedoch konnte auch mithilfe der ‚Protein-Theorie‘ bis heute keine zufriedenstellende Erklärung für den Cutoff-Effekt gefunden werden.

Durch die Analyse der homologen Reihe der n-Alkanole am 5-HT_{3A}-Rezeptor als Modell ligandengesteuerter Ionenkanäle wurde in dieser Arbeit versucht, Hinweise auf die molekularen anästhetischen Interaktionen zu finden.

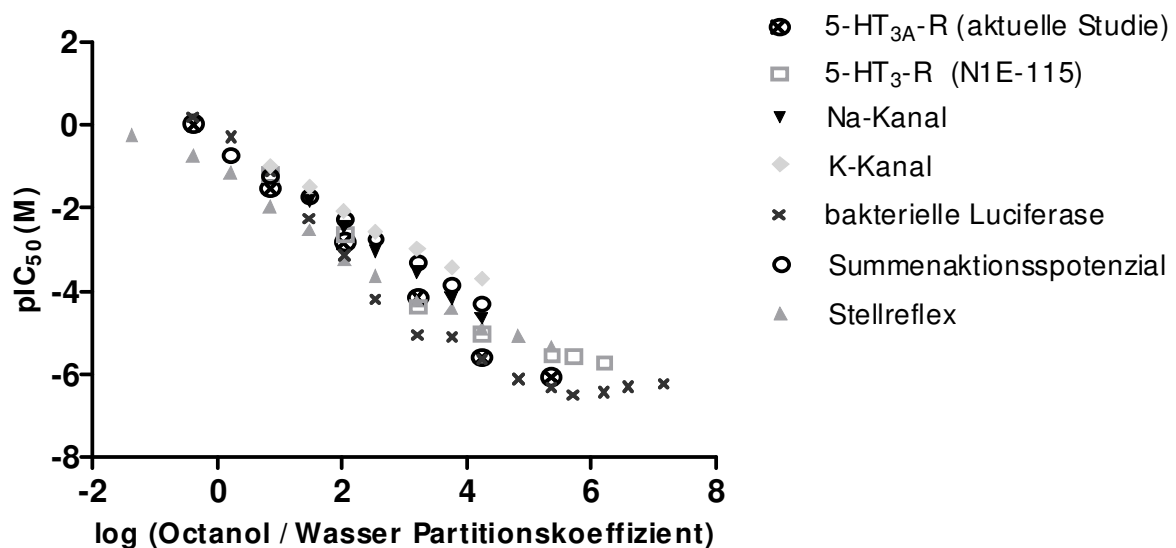


Abbildung 53: Meyer Overton Korrelationen der Effekte von n-Alkanolen auf verschiedene Ionenkanäle, Zelltypen und Verhaltensreaktionen. Gegen die n-Alkanol-Partitionskoeffizienten wurden IC_{50} -Werte doppellogarithmisch aufgetragen: \otimes 5-HT_{3A}-Rezeptoren (aktuelle Studie), \square 5-HT₃-Rezeptoren in N1E-115 Zellen (Jenkins et al., 1996), \blacktriangledown Natrium-Kanäle (Haydon und Urban, 1983) und \blacklozenge Kalium-Kanäle (Haydon & Urban, 1986) in Tintenfisch-Riesenaxonen, \times bakterielle Luciferase (Curry et al., 1990), \circ Summenaktionspotenzial des Nervus Ischiadicus des Frosches (Requena und Haydon, 1985) und \blacktriangle Verlust des Stellreflexes bei Kaulquappen (Alifimoff et al., 1989).

(log (Octanol / Wasser Partitionskoeffizient): Methanol: -1,38; Ethanol: -0,4; n-Propanol: 0,21; n-Butanol: 0,84; n-Pentanol: 1,47; n-Hexanol: 2,03; n-Heptanol: 2,53; n-Octanol: 3,21; n-Nonanol: 3,76; n-Decanol: 4,24; n-Undecanol: 4,83; n-Dodecanol: 5,36; n-Tridecanol: 5,71; n-Tetradecanol: 6,21; n-Pentadecanol: 6,60 und n-Hexadecanol: 7,17)

6.4 Komponenten der Wirkung von n-Alkanolen auf 5-HT_{3A}-Rezeptoren-vermittelte Ströme

n-Alkanole wirken gleichzeitig auf mehrere verschiedene Komponenten des 5-HT-induzierten Stromes. So beeinflussen sie sowohl die maximale Stromamplitude als auch die Aktivierung und Desensibilisierung des Stromes. Da es in „excised outside-out Patches“ möglich war, sich überlagernde n-Alkanol-Effekte aufzutrennen (Abb. 52), konnten schnelle und langsame inhibitorische, aber auch potenzierende Komponenten auf den 5-HT-induzierten Strom festgestellt werden. Der Anteil der einzelnen Komponenten am Gesamteffekt war dabei abhängig von der n-Alkanol Konzentration, der Dauer der n-Alkanol Exposition und der Kettenlänge des n-Alkanols. Obwohl n-Alkanole strukturell gesehen einfach gebaute Substanzen sind, zeigten sie bei elektrophysiologischen Messungen ein komplexes Wirkspektrum am 5-HT_{3A}-Rezeptor.

Die Inhibierung war insgesamt bei kurzer n-Alkanol-Exposition (Offen-Kanal-Applikation) schwächer als bei längerer n-Alkanol-Exposition (Äquilibrium-Applikation; siehe auch Konzentrations-Wirkungskurven für die Stromamplitude). Mittels der Einwaschexperimente konnten zwei Komponenten der Inhibierung (schnelle und langsame Inhibierung) festgestellt werden, deren Zeitkonstanten sich um ungefähr zwei Größenordnungen unterschieden (Tabelle 3). Mit zunehmender Kettenlänge des n-Alkanols wurde die schnelle Inhibierung immer schwächer, bis sie dann ab einer Kettenlänge von 12 Kohlenstoffatomen ganz verloren war.

Während alle n-Alkanole mindestens eine, meist zwei starke inhibierende Komponenten aufwiesen, konnte im Vergleich dazu nur vereinzelt Potenzierung direkt beobachtet werden, die auch dann nur schwach ausgeprägt war. Dies war zum Beispiel der Fall für n-Hexanol (siehe Abb. 28 und 52). Hier folgte der schnellen Inhibierung eine langsame Potenzierung, die einer gleichzeitigen langsamen Inhibierung dominierend überlagert war oder diese sogar vollständig ausschaltete. In anderen Fällen war Evidenz für eine Überlagerung von inhibierenden und potenzierenden Effekte nur indirekter Natur.

Schaute man sich die Konzentrations-Wirkungskurven in Bezug auf die Stromamplitude genauer an, so fiel auf, dass n-Butanol dem allgemeinen Trend mit zunehmender Kettenlänge nicht ganz folgte. Hier war die Äquilibrium-Applikation ($IC_{50} = 3 \cdot 10^{-2}$) bereits ungefähr dreimal potenter als die Offen-Kanal-Applikation ($IC_{50} = 8,8 \cdot 10^{-2}$), während bei Ethanol und n-Hexanol der Potenzunterschied zwischen beiden Applikationen nicht signifikant unterschiedlich war. Die schnelle inhibitorische Komponente durch n-Butanol schien also schwächer ausgeprägt als bei Ethanol oder n-Hexanol (Abb. 52). Möglicherweise gab es hier ähnlich wie bei n-Hexanol auch eine potenzierende Komponente, nur dass diese für n-Butanol schneller war und die schnelle statt die langsam inhibierende Komponente überlagerte. Ein Vergleich mit anderen verwandten homologen Reihen könnte zukünftig helfen, diese Hypothese zu prüfen.

Direkte Hinweise auf eine schnelle, jedoch relativ geringe Potenzierung durch n-Butanol wurde nur für Ströme, die durch niedrige 5-HT Konzentrationen induziert wurden, beobachtet, und auch dann nicht in jeder Messung (Abb. 19 und 20). Diese Potenzierung war deutlich geringer als die in „Whole-cell“- Experimenten in N1E-115-Zellen mit 5-HT₃-Rezeptoren (Jenkins et al., 1996) beschriebene Potenzierung, die ihrerseits noch viel kleiner war als die für 5-HT_{3A}-Rezeptoren in Xenopus Oozyten (Stevens et al., 2005b). Es ist möglich, dass, wie in den Abbildungen 19 und 20 angedeutet, die Stromkinetik einen Einfluss auf die Ausprägung von potenzierenden Effekten hat. Die etwa fünfzigfach langsamere Kinetik bei „Whole-cells“ (welche bei Xenopus Oozyten sogar noch langsamer ist) könnte also eventuell der Grund für die unterschiedlichen Ausmaße und die zum Teil scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse in Bezug auf die Strompotenzierung durch n-Alkanole zwischen „Whole-cell“ Experimenten untereinander und denen an „excised Patchen“ sein. Vielleicht erklärt sich auch so, warum potenzierende Eigenschaften für n-Hexanol zwar in 5-HT₃ Rezeptoren in oben genannten N1E-115-Zellen (Jenkins et al., 1996), jedoch nicht in Xenopus Oozyten (Stevens et al., 2005a; Stevens et al., 2005b) nachgewiesen werden konnten.

6.5 Bedeutung der molekularen Größe der n-Alkanole hinsichtlich Funktion und Potenzverlust

Durch kontinuierliches Verlängern der Kettenlänge der n-Alkanole wurde in dieser Arbeit versucht, die Bedeutung der molekularen Größe in Bezug auf die Funktion und den bereits in der Literatur beschriebenen Potenzverlust und Cutoff Effekt zu charakterisieren.

Bis dato hatte man am 5-HT_{3A}-Rezeptor sowohl inhibierende als auch potenzierende Aktivität von n-Alkanolen beobachtet. Der Cutoff des inhibierenden Effektes wurde dabei um Pentadecanol beschrieben (Jenkins et al., 1996), während der Verlust des potenzierenden Effektes um n-Hexanol diskutiert wurde (Jenkins et al., 1996; Stevens et al., 2005b).

Die Experimente an „excised outside-out Patchen“ verkomplizierten das Verständnis des Cutoffs zusätzlich, indem mindestens zwei unterschiedliche inhibierende Effekte der n-Alkanole am 5-HT_{3A}-Rezeptor nachgewiesen wurden, nämlich ein schneller und ein langsamer inhibierender Effekt. Der schnelle inhibierende Effekt war dabei, im Vergleich zu den kürzeren n-Alkanolen, ab n-Decanol nicht mehr nachweisbar. Es konnte also ein Cutoff für den schnellen inhibierenden Effekt um n-Decanol festgestellt werden, während aber noch langsamere inhibierende Aktivität für die länger-kettigen n-Alkanole übrig blieb, welche ebenfalls kontinuierlich abnahm.

Der Potenzverlust und der Cutoff Effekt wurden in der Vergangenheit oft dadurch erklärt dass die Substanzen ab einer gewissen Kettenlänge ihren Wirkort nicht mehr erreichen konnten. Tatsächlich gab es in der Literatur Hinweise darauf, dass langkettige n-Alkanole einige Zeit brauchten, bis sie ihren vollen Effekt etabliert hatten. So konnte es beispielsweise bis zu 15 Minuten dauern, bis n-Alkanole, welche in eine Lipid-doppelschicht aufgenommen wurden, ein Gleichgewicht erreicht hatten (Franks und Lieb, 1986). Andere Experimente an Nervenmembranvesikeln des Hummers zeigten, dass das Ausmaß des inhibierenden Effektes durch langkettige n-Alkanole von der Membranlipidkonzentration der Präparation abhängig war (Rodriguez et al., 1988). Desweiteren wurde in Studien am Tintenfisch-Riesenaxon, in denen die axolemmale Membran von mehreren Schwann-Zell-Schichten umgeben war, beobachtet dass die

Zeitkonstanten der Blockade von Natrium- und Kaliumströmen von der Molekülgröße des n-Alkanols abhängig waren (Haydon und Urban, 1986).

Befänden sich die anästhetischen Bindungsstellen in einem Gleichgewichtszustand mit anderen umliegenden lipophilen Phasen, entweder in der Lipiddoppelschicht selbst oder in Verbindung mit anderen Proteinen mit lipophilen und hydrophoben Domänen, so könnten die anästhetischen Bindungsstellen erst dann vollständig besetzt werden, wenn die umliegenden Phasen mit Wirksubstanz aufgefüllt sind. Um dieses potenzielle Problem zu minimieren, wurde in dieser Arbeit eine „excised outside-out“ Membrankonfiguration zusammen mit einem schnellen Lösungsaustauschsystem verwendet, welche einen kontinuierlichen Fluss unverarmter n-Alkanollösung in unmittelbare Nähe des „Patches“ gewähren sollten. Tatsächlich konnten dann auch ähnliche Zeitkonstanten (weniger als ein Faktor 10 in Tabelle 3 und weniger als ein Faktor 3 wie in den Konfidenzintervallen in Tabelle 4 widergespiegelt) für die gemessenen n-Alkanole gefunden werden. Der Potenzverlust und Cutoff Effekt scheint also kein einfacher Artefakt zu sein, der durch ein Nichterreichen der Substanz am Wirkort bedingt gewesen wäre. Allerdings wurde ab n-Dodecanol ein Potenzverlust der n-Alkanole festgestellt.

Wenn die Zeitkonstanten eine einfache Bindung am anästhetischen Wirkort beschrieben, würde man erwarten dass sie sich proportional zu der applizierten Konzentration der n-Alkanole verändern würden (Demazumder und Dilger, 2001). Würden zwei benachbarte n-Alkanole verglichen, bedeutete dies also dass sich deren Zeitkonstanten um einen Faktor 30 unterschieden oder um einen Faktor 90.000, wenn n-Butanol und n-Dodecanol miteinander verglichen würden. Die Tatsache, dass die Zeitkonstanten in „excised outside-out Patches“ für alle n-Alkanole nur leicht variierten, deutet darauf hin, dass Konformationsänderungen eher als Bindungsreaktionen die Einwaschkinetiken der Effekte bestimmen.

Alternativ zu Nichterreichen des Wirkortes durch die Substanz versuchte man, den Potenzverlust durch molekulare Größenverhältnisse am Wirkort zu erklären. So stellte man sich vor, dass die n-Alkanole in lipophilen Taschen am Protein binden würden und der Potenzverlust ausschließlich dadurch bedingt sei, dass die n-Alkanole ab einer

gewissen Kettenlänge zu groß würden, um in die Tasche hineinzupassen (Jenkins et al., 1996).

Wie jedoch konnte dieses Konzept die Tatsache erklären, dass der Anteil der schnellen Inhibierung an der Gesamtinhibierung ab n-Octanol kontinuierlich abnahm, und für n-Dodecanol gar nicht mehr registrierbar war? Bedeutete dies dass es mindestens zwei Bindungstaschen geben müsste, eine für den schnellen und eine für den langsamen inhibitorischen Effekt, wobei die langkettigen n-Alkanole nur in einer und die kurzkettigen in beiden Taschen binden konnten? Noch komplizierter wurde es dadurch dass n-Dodecanol immer noch zu einer Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstante führte, und somit hier noch schnelle Aktivität vorhanden sein musste.

Das Konzept von Bindungstaschen mit limitierten Ausmaßen war zudem problematisch, da die molekulare Größe nicht die ausschließliche Ursache des Potenzverlustes der langkettigen n-Alkanole sein konnte: so konnte zum Beispiel Anandamid (n-arachidonylethanolamine), ein aus 22 Kohlenstoffatomen bestehendes lineares Molekül, welches genau wie die n-Alkanole eine terminale Hydroxylgruppe aufweist, noch Ströme des 5-HT_{3A}-Rezeptors inhibieren (Barann et al., 2002). Anandamid besitzt im Gegensatz zu n-Alkanolen zusätzlich eine polare Amidgruppe sowie 4 Doppelbindungen. Eventuell ist das Molekül dadurch besser löslich und kann in einer Tasche binden, welche zwar groß genug ist für Moleküle dieser Größe, aber worin die sterische Anordnung der polaren und hydrophoben Bindungsstellen so konfiguriert ist, dass sie ungeeignet wird für n-Alkanole, welche größer sind als n-Dodecanol. Die Probleme, welche sich bei der Klärung des Cutoff-Phänomens stellten, waren also komplex. Abschließend kann nur wiederholt werden, dass der Cutoff alleine, ohne zusätzliche Messungen der Bindungskräfte, nicht zur Bestimmung der Konfiguration der Bindungsstellen ausreicht (Eckenhoff et al., 1999).

6.6 Vergleich der n-Alkanole mit Propofol und Phenolderivaten

Da n-Alkanole, Propofol und Phenolderivate strukturverwandte Substanzen darstellen, sie bestehen allesamt aus einer hydrophoben Domäne und einer polaren Hydroxyl-

gruppe, schien es von Interesse, ihre Aktivitäten am 5-HT_{3A}-Rezeptor miteinander zu vergleichen. Da n-Alkanole strukturell gesehen einfacher aufgebaut sind, sie besitzen keine verzweigten Kohlenstoffketten, keine delokalisierten Elektronen und keine aromatische Ringstruktur, galt es zu klären, ob auch die Aktivitäten am 5-HT_{3A}-Rezeptor weniger komplex würden.

Genau wie bei Propofol konnten auch bei den Einwasch-Experimenten mit n-Alkanolen ein schneller und ein langsamer inhibierender Prozess auf die Stromamplitude festgestellt werden, welche sich um 2 Größenordnungen voneinander unterschieden und denen von Propofol ähnlich waren (35 ms und 4,8 s, (Barann et al., 2008)). Diese Tatsache könnte auf ähnliche Wirkmechanismen von n-Alkanolen und Propofol hinweisen.

Sowohl n-Alkanole als auch Propofol hatten weiterhin gemeinsam, dass sie zu einer Beschleunigung der Desensibilisierung der 5-HT induzierten Ströme führten, und dies bereits in der Offen-Kanal-Applikation, was also bedeutete, dass der Effekt sehr schnell war.

Eine starke Stromamplitudenpotenzierung bei hoher 5-HT Konzentration (30 μ M) oder eine deutliche Verlangsamung der Desensibilisierung wie sie für 2-Isopropylphenol oder Phenol beobachtet wurden (Barann et al., 2008), ließ sich bei den n-Alkanolen nicht nachweisen. Im Gegenteil wurde die Desensibilisierung durch n-Alkanole sogar beschleunigt. Die Tatsache dass n-Alkanole im Gegensatz zu Phenolderivaten keine starke Potenzierung bewirken, könnte damit zusammenhängen, dass die phenolische Hydroxylgruppe stärkere Wasserstoffbrücken als die n-alkanolische Hydroxylgruppe bilden kann. Ein ähnliches Phänomen ließ sich bei Trichloroethanol nachweisen, das verglichen mit Ethanol ebenfalls mehr potenzierende Aktivität aufwies (Zhou und Lovinger, 1996) und ebenso vergleichsweise stärkere Wasserstoffbrücken bilden kann.

Im Gegensatz zu n-Dodecanol, welches ebenfalls aus 12 Kohlenstoffatomen besteht, besaß Propofol noch schnelle inhibierende Aktivität auf die Stromamplitude. Dies könnte mit der erhöhten Wasserlöslichkeit von Propofol gegenüber n-Dodecanol zusammenhängen. Der Cutoff Effekt oder totale Potenzverlust wurde in der Literatur oft dadurch

begründet, dass die Wasserlöslichkeit einer Substanz überschritten war und folglich die Substanz nicht mehr entsprechend wirken konnte (Franks und Lieb, 1985; Peoples und Ren, 2002; Jenkins et al., 1996). Diese Theorie vermochte zwar den totalen Potenzverlust zu erklären, bot aber keine Lösung, wie die Potenzverminderung vor dem eigentlichen Cutoff zustande kam.

Genau wie n-Dodecanol und Propofol, welche jeweils aus 12 Kohlenstoffatomen bestehen, sind auch n-Hexanol und Phenol vergleichbar. Beide Substanzen bestehen aus 6 Kohlenstoffatomen und einer Hydroxylgruppe und unterscheiden sich lediglich durch die phenolische Ringstruktur. Die ermittelten wässrigen Äquilibrium-IC₅₀-Werte dieser beiden Substanzen waren fast gleich: 1,6 mM für Phenol (Barann et al., 2008) und 1,5 mM für n-Hexanol (Tabelle 2), was einen Potenzquotienten von 0,9 ergab. Um die absoluten Potenzen der Interaktion beider Substanzen mit dem anästhetischen Wirkort besser vergleichen zu können, und Verfälschungen der Werte durch die Interaktion mit Wasser auszuräumen (beide Substanzen interagieren mit Wasser), wurden die jeweiligen Potenzen in der Gasphase miteinander verglichen, wo keine Interaktion der Moleküle stattfinden sollte. Mithilfe der Wasser/Gas Partitionskoeffizienten von Abraham (Abraham et al., 1994) ergab sich in der Gasphase ein Potenzquotient von 39. Also schien Phenol viel stärker als n-Hexanol mit der Bindungsstelle am 5-HT_{3A}-Rezeptor interagieren zu können.

n-Dodecanol war potenter als n-Hexanol wobei die Potenz der n-Alkanole mit jeder zusätzlichen Methylengruppe (-CH₂) um einen Faktor von 5,1 anstieg (Tabelle 2). Wurde die Kettenlänge der Moleküle doppeltlogarithmisch gegen deren Potenz aufgetragen, oder wie in Abbildung 53 die n-Octanol/Wasser Partitionskoeffizienten gegen die Potenz, so resultierte eine lineare Relation. Die zunehmende Potenz mit zunehmender Kettenlänge oder Hydrophobie deutete darauf hin, dass die Interaktionsstelle am Rezeptor hydrophobe Regionen aufweist, mit welchen die Methylengruppen interagieren können.

In gleicher Weise wie n-Hexanol und Phenol konnten auch Propofol und n-Dodecanol miteinander verglichen werden. Die Wasser/Gas Partitionskoeffizienten von Propofol (Grossherr et al., 2007) und n-Dodecanol, welche extrapoliert wurden aus (Abraham et

al., 1994), ergaben einen Potenzquotienten von 8. Angesichts des Potenzunterschiedes zwischen Phenol und n-Hexanol von 39 (beide 6 Kohlenstoffatome) schien die Potenz von Propofol verglichen mit n-Dodecanol (beide 12 Kohlenstoffatome) fünfmal schwächer. Andere Untersuchungen waren ebenfalls zum Ergebnis gekommen dass Propofol verglichen mit den Phenolen weniger potent zu sein schien (Barann et al., 2008). Obwohl die Reaktivität der phenolischen Hydroxylgruppe sowohl für Propofol als auch für Phenol größer war als die der n-Alkanole, schien die Hydroxylgruppe von Propofol verglichen mit der von Phenol schwächer zu sein. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Hydroxylgruppe von Propofol, im Gegensatz zu der des Phenols, von zwei Isopropylgruppen umgeben ist, welche eventuell die Interaktionsmöglichkeiten des Propofols zumindest im Hinblick auf die Hydroxylgruppe limitieren könnten.

Schlussfolgernd waren die n-Alkanole verglichen mit Propofol und Phenolderivaten zwar strukturell einfachere Substanzen, jedoch blieb viel der Komplexität der funktionellen Substanzwirkungen erhalten. Allerdings war die Potenzierung durch n-Alkanole schwächer ausgeprägt. Dies war konsistent mit der weniger reaktiven Hydroxylgruppe der n-Alkanole, welche als wichtiger Faktor der potenzierenden Fähigkeit vermutet wird.

Auch die n-Alkanole zeigten genau wie Propofol und Phenolderivate zwei Zeitkonstanten der Substanzaktivität, welche sich durch zwei Größenordnungen unterschieden. Auch in Bezug auf die funktionellen Cutoffs, welche ähnlich aber nicht identisch waren, wurden Parallelen gesehen.

Um die Bedeutung der Hydroxylgruppe für die Potenzierung sowie den Ursprung der beiden Zeitkonstanten und den oder die funktionellen Cutoffs zu verstehen, werden in der Zukunft zusätzliche Studien mit homologen Reihen, welche schwächere oder keine polaren Gruppen besitzen, folgen müssen.

7 Zusammenfassung

Diese Arbeit war Teil einer Untersuchung der molekularen Wirkungen von Anästhetika und verwandten, systematisch veränderten Substanzen auf den 5-HT_{3A}-Rezeptor als Prototypen ligandengesteuerter Ionenkanäle. Da Propofol auf elektrophysiologischer Ebene am 5-HT_{3A}-Rezeptor deutlich weniger potent war als andere intravenöse Anästhetika, und dennoch bereits ein komplexes Wirkspektrum besaß, wurde zum Vergleich in dieser Arbeit die homologe Reihe der n-Alkanole untersucht. n-Alkanole wurden ausgewählt, da sie obwohl strukturell einfacher aufgebaut, mit Propofol und den Phenolderivaten strukturverwandt sind, indem sie ebenfalls aus einer polaren Hydroxylgruppe und einem hydrophoben Anteil bestehen.

Mittels der „Patch-Clamp“ Methode wurden „excised outside-out Patche“ aus HEK 293 Zellen entnommen, welche stabil mit humanen 5-HT_{3A}-Rezeptoren transfiziert worden waren. Mithilfe eines schnellen Lösungsaustauschsystems wurden n-Alkanole auf die „Patche“ appliziert und deren Wirkung auf den 5-HT induzierten Strom untersucht. Es wurden insgesamt sieben n-Alkanole untersucht, begonnen mit Ethanol, welchem sukzessive 2 Kohlenstoffatome hinzugefügt wurden.

Jedes dieser untersuchten n-Alkanole zeigte nicht nur eine Wirkung, sondern ein ganzes Spektrum von Wirkungen am 5-HT_{3A}-Rezeptor. So konnten schnelle und langsame inhibierende, sowie potenzierende Effekte auf die Stromamplitude und Beschleunigung der Aktivierung und der Desensibilisierung der induzierten Ströme beobachtet werden. Der jeweilige Anteil der einzelnen Komponenten am totalen Effekt hing dabei sowohl von der Konzentration des n-Alkanols als auch von der Dauer der n-Alkanol-Applikation und der Kettenlänge des n-Alkanols ab. In der Äquilibrium-Applikation überwog der inhibierende Effekt der n-Alkanole wobei die IC₅₀-Werte mit jeder zusätzlichen Methylengruppe (-CH₂) um einen Faktor von 5,1 abnahmen. Der schnelle und der langsame inhibierende Effekt unterschieden sich um zwei Größenordnungen. Beide Effekte hatten ähnliche Zeitkonstanten für alle n-Alkanole und unterschieden sich nicht viel von den Zeitkonstanten, welche für Propofol bestimmt worden waren. Der allgemeine Trend in der Progression der homologen Reihe der n-Alkanole war das Verschwinden des schnellen inhibierenden und des potenzierenden Effektes, welche nicht mehr durch einen einzigen sondern durch mehrere sukzessive Cutoff-Effekte erklärt werden musste.

Verglichen mit Propofol und den Phenolderivaten blieben bei den n-Alkanolen viele Funktionen des Wirkspektrums erhalten. Die ähnlichen ermittelten Zeitkonstanten sowie die Parallelen bezüglich der Cutoff-Effekte ließen auf ähnliche Wirkmechanismen dieser strukturverwandten Substanzen schließen. Der potenzierende Effekt der n-Alkanole war allerdings schwächer ausgeprägt als bei den Phenolderivaten, was auf die weniger reaktive Hydroxylgruppe der n-Alkanole zurückgeführt werden könnte.

8 Literaturverzeichnis

Abraham MH, Andonianhaftvan J, Whiting GS, Leo A, Taft RS. Hydrogen-Bonding .34. the Factors That Influence the Solubility of Gases and Vapors in Water at 298-K, and A New Method for Its Determination. *J Chem Soc Perk T* 2 1994; 8: 1777-1791

Alifimoff JK, Firestone LL, Miller KW. Anaesthetic potencies of primary alkanols: implications for the molecular dimensions of the anaesthetic site. *Br J Pharmacol* 1989; 96: 9-16

Barann M. Habilitationsschrift: Funktionelle Charakterisierung muriner und humaner 5-HT₃-Rezeptoren und deren Beeinflussung durch Anästhetika. Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und spezielle Intensivmedizin der Universität Bonn; 2000

Barann M, Göthert M, Bönisch H, Dybek A, Urban BW. 5-HT₃ receptors in outside-out patches of N1E-115 neuroblastoma cells: basic properties and effects of pentobarbital. *Neuropharmacology* 1997; 36: 655-664

Barann M, Linden I, Witten S, Urban BW. Molecular actions of propofol on human 5-HT_{3A} receptors: enhancement as well as inhibition by closely related phenol derivatives. *Anesth Analg* 2008; 106: 846-857

Barann M, Meder W, Dorner Z, Bruss M, Bonisch H, Gothert M, Urban BW. Recombinant human 5-HT_{3A} receptors in outside-out patches of HEK 293 cells: basic properties and barbiturate effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362: 255-265

Barann M, Molderings G, Bruss M, Bonisch H, Urban BW, Gothert M. Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT_{3A} receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 589-596

Barnes JM, Barnes NM, Costall B, Deakin JF, Ironside JW, Kilpatrick GJ, Naylor RJ, Rudd JA, Simpson MD, Slater P, Tyers MB. Identification and distribution of 5-HT₃ recognition sites within the human brainstem. *Neurosci Lett* 1990; 111: 80-86

Brett RS, Dilger JP, Adams PR, Lancaster B. A method for the rapid exchange of solutions bathing excised membrane patches. *Biophys J* 1986; 50: 987-992

Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2745-2752

Curry S, Lieb WR, Franks NP. Effects of general anesthetics on the bacterial luciferase enzyme from *Vibrio harveyi*: an anesthetic target site with differential sensitivity. *Biochemistry* 1990; 29: 4641-4652

Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Br J Pharmacol* 1999; 397: 359-363

Demazumder D, Dilger JP. The kinetics of competitive antagonism by cisatracurium of embryonic and adult nicotinic receptors. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 797-807

Derkach V, Surprenant A, North RA. 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Br J Pharmacol* 1989; 339: 706-709

Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, et al. The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. *J Biol Chem* 1999; 274: 30799-30810

Eckenhoff RG, Tanner JW, Johansson JS. Steric hindrance is not required for n-alkanol cutoff in soluble proteins. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 414-418

Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Br J Pharmacol* 1994; 367: 607-614

Franks NP, Lieb WR. Molecular mechanisms of general anaesthesia. *Br J Pharmacol* 1982; 300: 487-493

Franks NP, Lieb WR. Mapping of general anaesthetic target sites provides a molecular basis for cutoff effects. *Br J Pharmacol* 1985; 316: 349-351

Franks NP, Lieb WR. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Br J Pharmacol* 1984; 310: 599-601

Franks NP, Lieb WR. Partitioning of long-chain alcohols into lipid bilayers: implications for mechanisms of general anesthesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 5116-5120

Galligan JJ. Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroent Motil* 2002; 14: 611-623

Gershon MD. Serotonin: its role and receptors in enteric neurotransmission. *Adv Exp Med Biol* 1991; 294: 221-230

Grossherr M, Hengstenberg A, Dibbelt L, Meier T, Igl B-W, Gehring H. Blutgaspartial-coefficient für Propofol beim Menschen und verschiedenen Spezies. *DAC online* 2007.

Gupta SK, Kunka RL, Metz A, Lloyd T, Rudolph G, Perel JM. Effect of alosetron (a new 5-HT₃ receptor antagonist) on the pharmacokinetics of haloperidol in schizophrenic patients. *J Clin Pharmacol* 1995; 35: 202-207

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflug Arch Eur J Phy* 1981; 391: 85-100

Haydon DA, Urban BW. The action of alcohols and other non-ionic surface active substances on the sodium current of the squid giant axon. *J Physiol* 1983; 341: 411-427

Haydon DA, Urban BW. The actions of some general anaesthetics on the potassium current of the squid giant axon. *J Physiol* 1986; 373: 311-327

Israili Z.H. Clinical pharmacology of serotonin receptor type 3 (5-HT₃) antagonists. *Curr Med Chem* 2001; 1: 171-199

Jackson MB, Yakel JL. The 5-HT₃ receptor channel. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 447-468

Jenkins A, Franks NP, Lieb WR. Actions of general anaesthetics on 5-HT₃ receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 1507-1515

Katsurabayashi S, Kubota H, Tokutomi N, Akaike N. A distinct distribution of functional presynaptic 5-HT receptor subtypes on GABAergic nerve terminals projecting to single hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacology* 2003; 44: 1022-1030

Kilpatrick GJ, Bunce KT, Tyers MB. 5-HT₃ receptors. *Med Res Rev* 1990; 10: 441-475

Liu J, Laster MJ, Koblin DD, Eger EI, Halsey MJ, Taheri S, et al. A cutoff in potency exists in the perfluoroalkanes. *Anesth Analg* 1994; 79: 238-244

Lovinger DM. Ethanol potentiates ion current mediated by 5-HT₃ receptors on neuroblastoma cells and isolated neurons. *Alcohol Alcohol Suppl* 1991; 1: 181-185

Lovinger DM, White G. Ethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine₃ receptor-mediated ion current in neuroblastoma cells and isolated adult mammalian neurons. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 263-270

Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 1991; 254: 432-437

Minami M, Endo T, Hirafuji M. Role of serotonin in emesis. *Folia Pharmacol JPN* 1996; 108: 233-242

Miquel MC, Emerit MB, Nosjean A, Simon A, Rumajogee P, Brisorgueil MJ, et al. Differential subcellular localization of the 5-HT3-A₅ receptor subunit in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 449-457

Morales M, Wang SD. Differential composition of 5-hydroxytryptamine₃ receptors synthesized in the rat CNS and peripheral nervous system. *J Neurosci* 2002; 22: 6732-6741

Mott DD, Erreger K, Banke TG, Traynelis SF. Open probability of homomeric murine 5-HT_{3A} serotonin receptors depends on subunit occupancy. *J Physiol* 2001; 535: 427-443

Mullins LJ. Some Physical Mechanisms in Narcosis. *Chemical Reviews* 1954;54:289-323

Nayak SV, Ronde P, Spier AD, Lummis SC, Nichols RA. Calcium changes induced by presynaptic 5-hydroxytryptamine-3 serotonin receptors on isolated terminals from various regions of the rat brain. *Neuroscience* 1999; 91: 107-117

Niesler B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 2003; 310: 101-111

Numberger M, Draguhn A. *Patch-Clamp-Technik*. Heidelberg-Berlin-Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1996

Ohuoha DC, Knable MB, Wolf SS, Kleinman JE, Hyde TM. The subnuclear distribution of 5-HT₃ receptors in the human nucleus of the solitary tract and other structures of the caudal medulla. *Brain Res* 1994; 637: 222-226

Parker RM, Barnes JM, Ge J, Barber PC, Barnes NM. Autoradiographic distribution of [3H]-(S)-zacopride-labelled 5-HT₃ receptors in human brain. *J Neurol Sci* 1996; 144: 119-127

Peoples RW, Ren H. Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by straight-chain diols: implications for the mechanism of the alcohol cutoff effect. *Mol Pharmacol* 2002; 61: 169-176

Pringle MJ, Brown KB, Miller KW. Can the Lipid Theories of Anesthesia Account for the Cutoff in Anesthetic Potency in Homologous Series of Alcohols. *Mol Pharmacol* 1981; 19: 49-55

Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch*. In: Serotonin. De Gruyter, Berlin 2002; 259. Auflage: 1532.

Reeves DC, Lummis SC. The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel (review). *Mol Membr Biol* 2002; 19: 11-26

Requena J, Haydon DA. Is There A Cutoffs in the Adsorption of Long-Chain Amphiphilic Molecules Into Lipid-Membranes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 814: 191-194

Reynolds DJ, Leslie RA, Grahame-Smith DG, Harvey JM. Localization of 5-HT₃ receptor binding sites in human dorsal vagal complex. *Eur J Pharmacol* 1989; 174: 127-130

Richards CD, Martin K, Gregory S, Keightley CA, Hesketh TR, Smith GA, et al. Degenerate perturbations of protein structure as the mechanism of anaesthetic action. *Br J Pharmacol* 1978; 276: 775-779

Rodriguez N, Villegas R, Requena J. The Interaction of Homologous Series of Alkanols with Sodium-Channels in Nerve Membrane-Vesicles. *J Membrane Biol* 1988; 104: 139-146

Sakurai-Yamashita Y, Yamashita K, Kaibara M, Enjoji A, Kanematsu T, Taniyama K. Differential distribution of 5-hydroxytryptamine₃ receptor in the colon between human and guinea pig. *Chin J Physiol* 1999; 42: 195-198

Saxena PR, Villalon CM. 5-Hydroxytryptamine: a chameleon in the heart. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 223-227

Stevens R, Rüsçh D, Solt K, Raines DE, Davies PA. Modulation of human 5-hydroxytryptamine type 3AB receptors by volatile anesthetics and n-alcohols. *J Pharmacol Exp Ther* 2005a; 314: 338-345

Stevens RJ, Rüsçh D, Davies PA, Raines DE. Molecular properties important for inhaled anesthetic action on human 5-HT_{3A} receptors. *Anesth Analg* 2005b; 100: 1696-1703

Tecott LH, Maricq AV, Julius D. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1430-1434

Thompson AJ, Lummis SC. The 5-HT₃ receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Tar* 2007; 11: 527-540

Witten S. Promotionsschrift: Molekulare Mechanismen von Phenol-Derivaten an ligandengesteuerten Ionenkanälen Klinik für Anästhesiologie, Universität Bonn; 2010

Yakel JL, Lagrutta A, Adelman JP, North RA. Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5030-5033

Yang J. Ion permeation through 5-hydroxytryptamine-gated channels in neuroblastoma N18 cells. *J Gen Physiol* 1990; 96: 1177-1198

Zhou Q, Lovinger DM. Pharmacologic characteristics of potentiation of 5-HT₃ receptors by alcohols and diethyl ether in NCB-20 neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 732-740

9 Danksagung

Herrn PD Dr. Martin Barann danke ich für die sehr nette und hilfsbereite Betreuung sowie die kompetente Hilfe bei der Durchführung und Interpretation der gewonnenen Daten.

Bei Herrn Professor Dr. Bernd W. Urban möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit der Durchführung einer experimentellen Doktorarbeit, die Bereitstellung des Promotions-themas, die außergewöhnliche Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und Denken sowie die stetige Disposition, Hilfsbereitschaft und fachliche Kompetenz bei der Interpretation der Experimente.

Besonderer Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Anästhesie-Labore, insbesondere Frau Zita Dorner, die stetig kompetent und hilfsbereit bei der Vorbereitung und Durchführung der Experimente zur Seite stand, sowie Frau Von der Bussche, die sich hervorragend um die Zellkulturen gekümmert hat.

Bei Frau Merle Meiboom möchte ich mich herzlich für die geduldige Einführung in die Patch Clamp Methode bedanken. Auch Herrn Dr. Stefan Witten danke ich für kompetente Tips und Reparaturen an der Patch Clamp Apparatur.

10 Lebenslauf

Name	DECKER
Vorname	<u>Anne-Marie</u> Amélie Marguerite
Geburtsdatum	14. November 1983
Geburtsort	Luxemburg
Staatsangehörigkeit	luxemburgisch
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1990 – 1996	Primärschule (Grundschule) in Echternach (L) 1.- 6. Klasse
1996 – 2003	Gymnasium (Lycée de Garçons Luxemburg-Limpertsberg)
2003	Abitur und Reifezeugnis in wissenschaftlicher Ausrichtung: Abteilung Latein-Mathematik-Physik mit der Beurteilung gut

Hochschulbildung:

2003 - 2004	1. Studienjahr Humanmedizin, Université du Luxembourg
2004 - 2009	Studium der Humanmedizin, Universität Bonn
2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 01/2010	Fertigstellung der Promotionsarbeit