

# **Interaktionen der Dialkylether mit humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren**

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

Lisa Christina Schnürch

aus Düsseldorf

2012

# **Interaktionen der Dialkylether mit humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren**

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

Lisa Christina Schnürch

aus Düsseldorf

2012

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Professor Dr. B.W. Urban
2. Gutachter: Herr Professor Dr. E. Schlicker

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.06.2012

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor Herr Professor Dr. A. Hoeft

Meiner Familie



# 1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis.....	5
2 Abkürzungsverzeichnis .....	9
3 Einleitung.....	11
3.1 Serotonin.....	11
3.2 Der Serotonin-Rezeptor (5-HT <sub>3</sub> ).....	12
3.2.1 Aufbau und Funktionsweise .....	12
3.2.2 Verteilung im Organismus.....	14
3.2.3 Der 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor als pharmakologischer Angriffspunkt.....	15
3.2.4 Der 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor als Gegenstand anästhesiologischer Untersuchungen.....	16
3.3 Problemstellung .....	16
4 Material und Methoden .....	20
4.1 Stabile Transfektion.....	20
4.2 Zellkultur .....	20
4.3 Elektrophysiologie.....	21
4.3.1 Patch-Clamp-Technik .....	21
4.4 Superfusionssystem .....	23
4.5 Substanzapplikation .....	24
4.6 Datenanalyse.....	29
4.6.1 Software.....	29
4.6.2 Analyse der Stromspuren .....	29
4.6.3 Statistik .....	32
4.7 Materialien.....	33
4.7.1 Substanzen.....	33
4.7.2 Lösungen .....	34

4.7.3 Geräte.....	35
4.7.4 Software.....	35
5 Ergebnisse.....	36
5.1 Charakterisierung der 5-HT-induzierten Ströme.....	36
5.2 Dipropylether .....	37
5.2.1 Offenkanalapplikation.....	37
5.2.2 Geschlossenkanalapplikation.....	38
5.2.3 Äquilibriumssapplikation .....	39
5.2.4 Konzentrations-Wirkungskurve .....	40
5.2.5 Kinetiken .....	41
5.2.6 Einwasch.....	42
5.3 Dibutylether .....	44
5.3.1 Offenkanalapplikation.....	44
5.3.2 Geschlossenkanalapplikation.....	45
5.3.3 Äquilibriumssapplikation .....	45
5.3.4 Konzentrations-Wirkungskurve .....	46
5.3.5 Kinetiken .....	47
5.3.6 Einwasch.....	48
5.4 Dipentylether.....	49
5.4.1 Offenkanalapplikation.....	49
5.4.2 Geschlossenkanalapplikation.....	50
5.4.3 Äquilibriumssapplikation .....	50
5.4.4 Konzentrations-Wirkungskurve .....	51
5.4.5 Kinetiken .....	52
5.4.6 Einwasch.....	53

5.5 Dihexylether .....	54
5.5.1 Offenkanalapplikation .....	54
5.5.2 Geschlossenkanalapplikation .....	55
5.5.3 Äquilibriumsapplikation .....	56
5.5.4 Konzentrations-Wirkungskurve .....	57
5.5.5 Kinetiken .....	58
5.5.6 Einwasch.....	59
5.6 Diheptylether .....	60
5.6.1 Offenkanalapplikation .....	60
5.6.2 Geschlossenkanalapplikation .....	61
5.6.3 Äquilibriumsapplikation .....	62
5.6.4 Konzentrations-Wirkungskurve .....	63
5.6.5 Kinetiken .....	64
5.7 Konkurrenz.....	65
6 Diskussion.....	66
6.1 Vergleich der Dialkylether untereinander .....	66
6.1.1 Wirkung auf die Stromamplitude .....	66
6.1.2 Wirkung auf die Stromkinetiken.....	69
6.1.3 Einwaschzeitkonstanten .....	70
6.2 Absolute Potenz und freie Energien .....	75
6.3 Cutoff.....	77
6.4 Zusammenfassender Vergleich mit n-Alkanolen.....	78
7 Zusammenfassung .....	80
8 Literaturverzeichnis .....	82
9 Danksagung .....	88



10 Lebenslauf .....89

## 2 Abkürzungsverzeichnis

atm	Physikalische Atmosphäre
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
ECS	extrazelluläre Lösung ( <i>extracellular solution</i> )
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
GΩ	Gigaohm
HEK293	humane embryonale Nierenzellen 293 ( <i>human embryonic kidney</i> )
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IC <sub>50</sub>	Stoffkonzentration bei Inhibierung des Stromes um 50 %
ICS	intrazelluläre Lösung ( <i>intracellular solution</i> )
kHz	Kilohertz
M	molar
MAC	Minimale alveoläre Konzentration
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
[-+]	„minus-plus“ (Offenkanalapplikation)
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
nM	nanomolar
pA	Picoampère
PNS	peripheres Nervensystem
[+-]	„plus-minus“ (Geschlossenkanalapplikation)
PONV	postoperative Übelkeit und Erbrechen ( <i>postoperative nausea and vomiting</i> )
[++]	„plus-plus“ (Äquilibriumapplikation )
s	Sekunde
μg	Mikrogramm

$\mu\text{M}$	mikromolar
$\tau_{\text{off}}$	Abfallzeitkonstante
$\tau_{\text{on}}$	Aktivierungszeitkonstante
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor	5-Hydroxytryptamin <sub>3A</sub> -Rezeptor
$\tau_{\text{fast}}$	schnelle Einwasch-Zeitkonstante
$\tau_{\text{slow}}$	langsame Einwasch-Zeitkonstante
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 3 Einleitung

### 3.1 Serotonin

Serotonin oder 5-Hydroxytryptamin gehört zur Gruppe der biogenen Amine und entsteht durch 5-Hydroxylierung und Decarboxylierung der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Es wirkt im menschlichen Körper als Gewebshormon und neuronaler Transmitter (Löffler, 2005; Müller-Esterl, 2004).

Der Hauptanteil des Serotonins (etwa 90 %) wird in Vesikeln der enterochromaffinen Zellen der Darmmucosa gespeichert. Ins Blut gelangtes 5-HT wird über einen 5-HT-Transporter in Thrombozyten aufgenommen und auch dort in Vesikeln gespeichert. Im Zentralnervensystem liegen die meisten Zellkörper der serotoninerger Neurone in den Raphekernen des Hirnstamms und projizieren sowohl ins Rückenmark als auch in Klein- und Vorderhirn. So soll Serotonin zur Regelung von Blutdruck, Schlaf-Wach-Rhythmus, Stimmung, Schmerzwahrnehmung, Nahrungsaufnahme und Körpertemperatur beitragen (Aktories et al., 2005). Es wurde zudem gezeigt, dass 5-HT bzw. ein Reuptakehemmer durch Einfluss auf Motoneurone zu charakteristischen Kopfbewegungen, Rigor und Tremor führen kann (Martin et al., 1985; Paxinos und Mai, 2004; Vogel, 2008). Eine Wirkung auf Endothelzellen der Blutgefäße von Dura mater und Gehirn macht eine Beteiligung von Serotonin an der Entstehung der Migräne wahrscheinlich (Hoyer et al., 1994). Bei der Alzheimer-Demenz wird als morphologisches Korrelat u.a. eine Degeneration des Serotonin-Systems im Bereich der Nuclei raphe gefunden. Die Monoamin-Mangelhypothese und die Transmitter-Imbalance-Theorie weisen dem Serotonin außerdem eine Rolle bei der Entstehung der affektiven Störungen zu (Lieb et al., 2008).

Peripher entfaltet 5-HT seine Wirkungen beispielsweise an Blutgefäßen der Koronarien, der Lunge und der Niere im Sinne einer Vasokonstriktion, im Skelettmuskel hingegen im Sinne einer Vasodilatation (Pschyrembel, 2001; Schmidt et al., 2005). An den Vorhöfen des Herzens scheint Serotonin außerdem einen positiv chronotropen Effekt auszuüben und gilt als möglicher Auslöser von Tachyarrhythmien. Durch Freisetzung im Gastrointestinaltrakt steigert es - wie in Bronchien und Uterus auch - die Kontraktilität der glatten Muskulatur und ist mitverantwortlich für Emesis und die Entstehung des Brechreizes, insbesondere

postoperativ oder nach Aufnahme von Cytostatika wie etwa Cisplatin. Die Thrombozytenaktivierung kann durch Serotonin potenziert werden (Aktories et al., 2005).

Der Abbau des Serotonins erfolgt über Monoaminoxidasen (überwiegend Typ A) und die Aldehyd-Dehydrogenase. Das Endprodukt 5-Hydroxyindolessigsäure wird mit dem Harn ausgeschieden und kann dort nachgewiesen und quantifiziert werden (Aktories et al., 2005). Ein anderer Stoffwechselweg führt durch Acetylierung und Methylierung zur Bildung von Melatonin (Müller-Esterl, 2004).

## **3.2 Der Serotonin-Rezeptor (5-HT<sub>3</sub>)**

### **3.2.1 Aufbau und Funktionsweise**

Serotonin entfaltet seine zahlreichen Wirkungen durch die Bindung an verschiedene 5-HT-Rezeptoren auf der Plasmamembran der Zielzellen. Bisher ist es gelungen, sieben Familien bzw. Rezeptortypen mit insgesamt 14 unterschiedlichen 5-HT-Rezeptoren zu identifizieren. Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor bildet dabei als einziger Liganden-gesteuerter Ionenkanal neben den übrigen G-Protein-gekoppelten, also metabotropen Rezeptoren eine Ausnahme (Derkach et al., 1989).

Der ionotrope 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist sogleich Rezeptor und Effektor, das heißt, die Bindung von 5-HT löst unmittelbar eine Öffnung des Kanals und einen Ionenfluss aus. Ebenfalls zu den Liganden-gesteuerten Ionenkanälen gehören der inhibitorische GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, der Glycin-Rezeptor und der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor, wobei letzterer besonders große strukturelle und funktionelle Homologien zum 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor aufweist (Reeves und Lummis, 2002; Thompson und Lummis, 2006). Alle genannten ionotropen Rezeptoren gehören zur Gruppe der sogenannten Cys-loop-Rezeptoren, welche sich dadurch auszeichnen, dass sie in ihrer extrazellulären Domäne ein Cysteinpaar besitzen, welches durch Bildung einer Disulfidbrücke zu einer charakteristischen Schleifenstruktur führt.

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor besteht aus fünf Untereinheiten, die jeweils vier transmembranäre Domänen (TM<sub>1</sub>-TM<sub>4</sub>) besitzen und gemeinsam in ihrem Zentrum eine Pore bilden (Abb. 1).

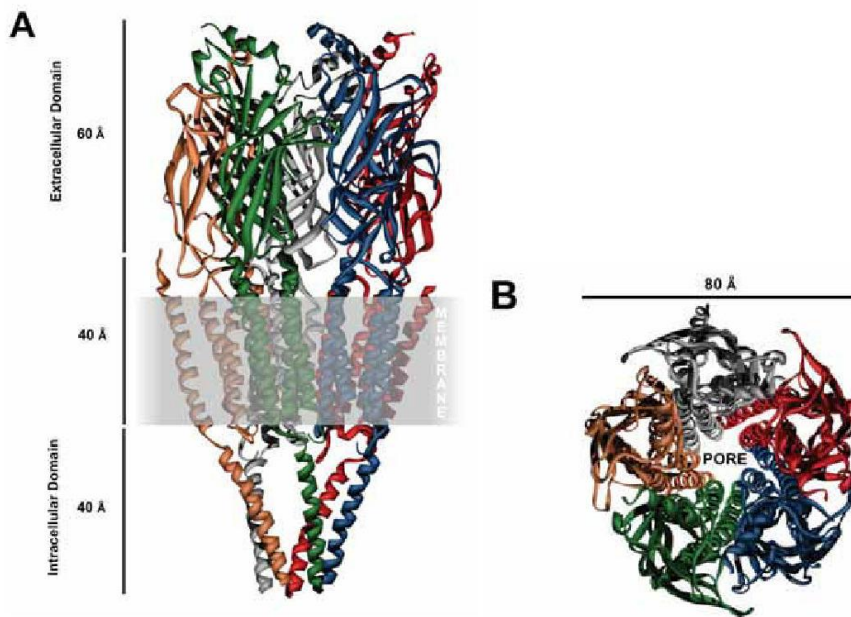


Abb. 1: Modell der fünf transmembranären Untereinheiten des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors nach einem kryoelektronenmikroskopischen Bild des nACh-Rezeptors (aus Thompson und Lummis, 2007). Die Abbildung A zeigt dabei eine Sicht des Rezeptors von der Seite, wobei der graue Bereich die Zellmembran symbolisiert. Die Abbildung B hingegen stellt eine Draufsicht des Kanals dar.

Der extrazelluläre Anteil jeder Untereinheit enthält neben der Agonistenbindungsstelle sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Ende der Peptidkette. Es gibt Hinweise darauf, dass die Peptidketten im transmembranären und intrazellulären Teil des Rezeptors in Form einer  $\alpha$ -Helix vorliegen (Reeves und Lummis, 2002; Thompson und Lummis, 2006).

Die Kanalpore wird hauptsächlich durch die fünf TM<sub>2</sub>-Segmente begrenzt. Nach der Bindung eines Agonisten – vermutlich im Bereich des N-terminalen Endes – kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins durch eine Drehung der TM<sub>2</sub>-Segmente um ihre Längsachse (Lummis, 2004; Unwin, 1995). Dies verursacht die Öffnung des Kanals und ermöglicht so einen Ionenfluss entlang des elektrochemischen Gradienten. Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor gehört zur Gruppe der exzitatorischen Ionenkanäle, denn er ist durch die spezifische Anordnung seiner Aminosäuren im Porenbereich kationenselektiv und zwar vorwiegend für monovalente Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen, in geringem Maße aber auch für divalente Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen (Yang, 1990).

Bisher sind fünf verschiedene Varianten der Untereinheiten des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors bekannt (A-E; Niesler et al., 2008). Essentiell für die Funktion ist dabei das Vorliegen der A-Untereinheit, das heißt zum einen, Heteropentamere müssen immer mindestens eine A-Untereinheit besitzen und zum anderen, lediglich der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor ist als Homopentamer funktionsfähig (Davies et al., 1999). In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor gearbeitet.

Mott et al. zeigten 2001 für den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, dass es insgesamt fünf kooperative Agonisten-Bindungsstellen gibt und erst eine Bindung von drei Molekülen eine Öffnung des Kanals bewirken kann. Unter der anhaltenden Einwirkung der Agonisten kommt es nach dieser Aktivierung zu einer Desensibilisierung des Rezeptors und damit durch eine Konformationsänderung zum Übergang in einen geschlossenen, nicht aktivierbaren Zustand. Die Zeit, die der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor benötigt, um wieder in seinen aktivierbaren Zustand zurückzukehren, lässt sich mit einer Zeitkonstante beschreiben. Nach Barann et al. (2000b) beträgt diese  $14,1 \pm 0,6$  s.

### **3.2.2 Verteilung im Organismus**

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren lassen sich sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem finden und kommen abhängig von der Art des jeweiligen Neurons an prä- oder postsynaptischen Membranen vor (Katsurabayashi et al., 2003; Nayak et al., 1999). Ihre Aktivierung beeinflusst die Ausschüttung anderer Neurotransmitter wie Dopamin, GABA, Cholezystokinin, Substanz P und Acetylcholin (Meiboom, 2011).

Im ZNS befinden sich die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vor allem im Bereich des unteren Hirnstammes und dort insbesondere in der Area postrema und dem Nucleus tractus solitarii (Miquel et al., 2002). Dies erklärt die Rolle des Serotonins bei der Entstehung von Übelkeit und Erbrechen. Weniger hoch ist die Dichte an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in Frontalkortex, Nucleus accumbens, Hypothalamus, Substantia nigra, Teilen des limbischen Systems (Hippocampus, Gyrus cinguli, Amygdala) und im Rückenmark (Barnes et al., 1990; Göthert, 1990; Ohuoha et al., 1994). Neben dem Emesis erzeugenden Effekt zeigten sich außerdem

Einflüsse von „zentralen“ 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auf die kognitiven Leistungen (Harrell und Allan, 2003) und eine Vielzahl psychischer Erkrankungen (beispielsweise Ohuoha, 1993).

Peripher lassen sich 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in hoher Dichte im Gastrointestinaltrakt nachweisen, wo sie Motilität, Peristaltik und Sekretion des Darms regulieren (Galligan, 2002; Thompson und Lummis, 2006). Über Afferenzen im Nervus vagus vermitteln 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren zudem nicht nur die Auslösung des Brechreflexes (Aktories et al., 2005), sondern scheinen auch im kardiovaskulären System Teil des Bezold-Jarisch-Reflexes zu sein (Kilpatrick et al., 1990; Parker et al., 1996). Weitere 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren spielen eine Rolle im Bereich des Urogenitaltraktes (Chen, 1990) und bei der Vermittlung bzw. Verstärkung von Schmerzwahrnehmung (Richardson und Engel, 1985).

### **3.2.3 Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor als pharmakologischer Angriffspunkt**

Besondere Bedeutung in der Klinik erlangte die Gruppe der selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten wie Ondansetron, Granisetron und Tropisetron. Sie wirken bei einem durch Cytostatika oder Strahlentherapie erzeugten Erbrechen stark antiemetisch und nebenwirkungsarm, insbesondere in Kombination mit Dexamethason (Campora et al., 1991; Carmichael et al., 1998). Auch bei postoperativer Nausea und Vomitus (PONV) ist inzwischen die Effektivität der 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten erwiesen. Weitere Einsatzorte sind das Carcinoid-Syndrom (Saslow et al., 1998; Wymenga et al., 1998), Hyperemesis gravidarum (Guikontes et al., 1992), Gastroenteritis (Cubeddu et al., 1997), Bulimia nervosa (Faris et al., 2000), Fibromyalgie oder andere chronische Schmerzzustände (Thompson und Lummis, 2006). Diskutiert werden zudem positive Effekte auf Alkoholabhängigkeit (Johnson et al., 2000), cerebellären Tremor, psychische Erkrankungen wie Angst- und Panikstörungen, das Gilles-de-la-Tourette-Syndrom sowie Psychosen im Rahmen eines Morbus Parkinson (Meiboom, 2011; Wilde und Markham, 1996).

In den USA wird der Antagonist Alosetron erfolgreich bei Patienten mit Reizmagen- bzw. Reizdarmsyndrom oder Dyspepsie eingesetzt (Maxton et al., 1996; Thompson und Lummis, 2006). Ein weiteres Anwendungsgebiet stellt die Behandlung des Pruritus dar. Unabhängig



von seiner Ursache lindern 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten die Symptomatik (Arai et al., 1996; Schwörer et al., 1995).

#### **3.2.4 Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor als Gegenstand anästhesiologischer Untersuchungen**

Bei der Untersuchung potentieller Angriffsstellen gebräuchlicher Anästhetika fanden Franks und Lieb 1994 heraus, dass Narkotika eine größere Wirkung auf die Liganden-gesteuerten als auf die Spannungs-gesteuerten Ionenkanäle ausüben. Dies führte zu intensiven Studien an einem Prototyp der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle, dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor.

Um dabei eine besonders hohe Auflösung der Ströme und ihrer Kinetiken zu erhalten, kombinierte man die Patch-Clamp-Methode (v.a. sogenannte „excised outside-out-Patche“) mit einem schnellen Applikationssystem (Lösungsaustausch in weniger als 1 ms; Barann et al., 1997; Brett et al., 1986). Zunächst wurden native 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an N1E-115-Zellen untersucht, später vor allem die stabil transfizierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren in HEK293-Zellen, die in ihren elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften den nativen Rezeptoren zwar ähneln, aber durch ihre erhöhte Dichte auf der Membran deutlich effektiver zu untersuchen sind. Für diese 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren ergibt sich eine gleichsam maximale Stromamplitude bei einer 5-HT-Konzentration von 30 µM und eine Erholung von der 5-HT-induzierten (30 µM) Desensibilisierung nach etwa 45 s (Barann et al., 1997).

Im nächsten Schritt untersuchte man den humanen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor nicht nur in Gegenwart von Serotonin, sondern auch nach Applikation von Anästhetika oder ihnen ähnlichen Substanzen, um auf diese Weise Einblick in die der Anästhesie zugrundeliegenden Mechanismen zu erlangen (Barann et al., 2008).

### **3.3 Problemstellung**

Die erste öffentlich demonstrierte (und publizierte) Narkoseform im Jahr 1846 war eine „Äther“-Narkose, das heißt, die Narkose wurde durch Einatmen von Diethylether-angereicherter Raumluft herbeigeführt (Roewer und Thiel, 2008). Aufgrund der

Explosivität, der oft ausgeprägten Exzitationsphase, der Schleimhautreizung, der Übelkeit und der Nebenwirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem durch die hohen Dosen wurde der „einfach strukturierte“ Diethylether schließlich durch modernere und nebenwirkungsärmere Substanzen wie etwa halogenierte Ether oder Propofol ersetzt.

Auf der Suche nach Hinweisen auf die Wirkmechanismen der Anästhetika untersuchte man u. a. das heutzutage wohl meist genutzte intravenöse Anästhetikum Propofol in seiner Wirkung am Liganden-gesteuerten Ionenkanal 5-HT<sub>3A</sub>. Es zeigte sich in den Patch-Clamp-Experimenten an „excised outside-out-Patches“, dass sowohl die phenolische Hydroxylgruppe als auch hydrophobe Interaktionen und sterische Restriktionen bei den komplexen Wirkungen von Propofol am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor eine Rolle spielen (Barann et al., 2008). Um weitere Informationen zur Wirkungsweise der Anästhetika und zur Charakterisierung der Bindungsstelle am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zu erhalten, wurde das Molekül Propofol sukzessive zerlegt und verschiedenste Komponenten und Derivate systematisch untersucht (Barann et al., 2008).

Man erhielt schließlich die Gruppe der einwertigen, primären, unverzweigten Alkohole (n-Alkanole), die wie Propofol und ähnliche Phenolderivate aus einer polaren Hydroxylgruppe und einem hydrophoben Anteil bestehen, sich von ihnen jedoch dadurch unterscheiden, dass sie weder Verzweigungen noch delokalisierte Elektronen aufweisen. Vergrößert man nun die Kettenlänge des n-Alkanols, verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen polarem und apolarem Teil des Moleküls zugunsten des hydrophoben Kohlenstoffrestes, und die Lipophilie des Stoffes nimmt zu.

Die Untersuchung der homologen Reihe der n-Alkanole von Ethanol bis Tetradecanol zeigte für jede der gemessenen Substanzen ein Spektrum verschiedener Wirkungen am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor: schnelle und langsame Inhibierung sowie Potenzierung der 5-HT-induzierten Stromamplitude und Beschleunigung der Aktivierungs- und der Desensitivierungskinetiken (Decker, 2011). Die Ausprägung der einzelnen Effekte variierte je nach Konzentration, Kettenlänge und Dauer der Applikation der jeweiligen n-Alkanole. Die IC<sub>50</sub>-Werte nahmen pro zusätzlicher Methylengruppe (-CH<sub>2</sub>) etwa um einen Faktor von 5,1 ab (gültig für die Äquilibriumsapplikation von Ethanol bis Dodecanol). Der zu beobachtende Trend im Verlauf der homologen Reihe war das Abnehmen des (schnellen) inhibierenden und des

potenzierenden Effektes, welches durch mehrere sukzessive Cutoff-Effekte zustande kommen muss (Decker, 2011).

Die Ursache des Cutoff-Effektes, also des Potenzverlustes bei Erreichen einer gewissen Kettenlänge, war bereits in der Vergangenheit häufig Gegenstand von Diskussionen: Es wurde postuliert, dass die Substanzen entweder ihren Wirkort gar nicht erst erreichen (Pringle et al., 1981; Rodriguez et al., 1988) oder die Bindungstasche in ihrer Größe limitiert ist und so die Bindung von Molekülen einer gewissen Kettenlänge verhindert (Pochet et al., 2002).

Eine weitere Variation des Alkohol-Moleküls führte dann zur homologen Reihe der Dialkylether. Sie besitzen ebenso wie n-Alkanole lineare hydrophobe Alkylketten. Im Gegensatz zu den Alkanen aber tragen die symmetrischen Ether in ihrer Mitte ein polares Sauerstoffatom, das nicht wie bei den n-Alkanolen ein acides Wasserstoffatom bindet.

Auf dem Weg zum Verständnis von Wirkmechanismen komplexer Anästhetika an Ligandengesteuerten Ionenkanälen schien es an dieser Stelle also sinnvoll zu sein, wieder zum „einfach strukturierten“ Dialkylether zurückzukehren. Durch Analyse seiner Wirkungen am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor und Vergleich mit den Ergebnissen der homologen Reihen der n-Alkanole sollten weitere Rückschlüsse auf die Bindungsstelle des Rezeptors, die Abhängigkeit von Molekülgröße und Lipophilie, die Effektivität bzw. Potenz bestimmter funktioneller Gruppen sowie die Bedeutung hydrophober und polarer Wechselwirkungen gewonnen werden.

Als Prototyp der Ligandengesteuerten Ionenkanäle wurden in dieser Arbeit ausschließlich stabil transfizierte 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren in HEK293-Zellen benutzt. Um Strom- bzw. Substanzkinetiken im Millisekundenbereich auflösen zu können, wurde hier mit „excised outside-out-Patches“ und einem schnellen Lösungsaustauschsystem gearbeitet.

#### **Zusammenfassend waren die Ziele dieser Experimente:**

1. Identifizierung der Dialkylether-Wirkungen und ihrer einzelnen Komponenten auf 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren bzw. ihre Ströme.
2. Untersuchung der Abhängigkeit dieser Wirkungen von der molekularen Größe und Lipophilie der Substanzen.

3. Vergleich der Effekte der Dialkylether am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor mit der Gruppe der n-Alkanole.
4. Betrachtung möglicher Wirkmechanismen am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor: Interaktionen polarer und hydrophober Gruppen mit dem Wirkort.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Stabile Transfektion

Die Methode der stabilen Transfektion dient dazu, mithilfe eines Plasmids Fremd-DNA in das Genom einer Zielzelle einzubauen, um dann spezielle Proteine wie beispielsweise den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor dauerhaft zu exprimieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Zielzellen sind humane embryonale Nierenzellen (HEK293). Die stabile Transfektion wurde im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn (Abt. Bönisch/Brüss) durchgeführt.

Dabei wurde die 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-cDNA nach der modifizierten Calciumphosphat-Methode in die HEK293-Zellen eingefügt (Brüss et al., 2000). Als Vektor diente pCDNA3; als Promotor wurde der humane Cytomegalievirus-Promotor eingesetzt.

Dem Medium wurde zur Selektionierung Geneticin (800 µg/ml) beigefügt. Zudem fand alle zwei Tage ein Mediumwechsel statt. Mit speziellen Klonzylindern (Sigma, München, Deutschland) wurden die gewachsenen Zellkolonien getrennt und in 24-well-plates (Falcon BD, Franklin Lakes, NJ USA) gesetzt, wo sie bis zur Konfluenz wuchsen.

Schließlich setzte man Messungen eines [<sup>14</sup>C]-Guanidinium-Einstromes und einen selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten ([<sup>3</sup>H]-GR65630) ein, um die Zellen mit der stärksten Expression der humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren zu finden. Diese Kolonien wurden für die weiteren Experimente verwendet.

### 4.2 Zellkultur

Die transfizierten HEK293-Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit in Gegenwart von 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dem Nährmedium DMEM nutrient mix F12 (1:1; v/v) medium wurden folgende Komponenten zugesetzt: 10 % fetales Kälberserum, Penicillin (100 IU/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Geneticin (0,75 mg/ml) und Glutamin (292 µg/ml).

Zur Vorbereitung elektrophysiologischer Experimente wurden die Zellen vorher in Petrischalen (35 mm Durchmesser, NUNC GmbH und Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) überführt und in frischem Medium weitere 10 bis 13 Tage kultiviert.

Alle drei Monate wurde die Zellcharge gegen eine neue ausgetauscht; nicht verwendete Zellen wurden bei -80 °C in 10 % Dimethylsulfoxid kryokonserviert.

## **4.3 Elektrophysiologie**

### **4.3.1 Patch-Clamp-Technik**

Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt (Hamill et al., 1981). Es handelt sich hierbei um eine Methode zur Ableitung transmembranärer Ströme einzelner Zellen, d.h. man macht den Ionenfluss durch eine wenige  $\mu\text{m}^2$  große Membranfläche (Patch) sichtbar und messbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Versuche im sogenannten Excised-outside-out-Modus durchgeführt, weil hierbei zum Einen die applizierten Substanzen nicht durch Zytosol oder durch umgebende Membranen oder Zellen „abgelenkt“ werden und zum Anderen schnelle Stromkinetiken auflösbar sind. Diese Vorgehensweise eignet sich gut für die Untersuchung von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen.

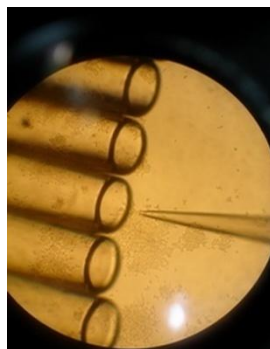
Mit Hilfe des „Patch Pipette Pullers“ PA-10 wurden aus einer Borosilikat-Glaskapillare (Kwik-Fil™, World Precision Instruments, Sarasota, FL USA) jeweils zwei gleichlange Messpipetten hergestellt und anschließend mit der Mikroforge (L/M-CPZ 101, List-Medical-Elektronik, Darmstadt, Deutschland) unter Hitzeanwendung poliert. Diese Pipetten, deren Widerstände nun zwischen 3 und 5 M $\Omega$  betragen, wurden in einer verschlossenen Schachtel bis zum Experiment aufbewahrt.

Unmittelbar vor dem Versuch wurde eine der mit HEK293-Zellen vorbereiteten Petrischalen aus dem Klimabruhschrank entnommen, das Nährmedium dekantiert und durch einen glukosehaltigen Extrazellulärpuffer ersetzt. Zeitnah wurde außerdem eine der zu ver-

wendenden Pipetten mit einer Elektrolytlösung gefüllt, die dem intrazellulären Milieu angepasst war.

Als Elektroden wurden Silberdrähte sowohl in der extrazellulären Lösung im Zellschälchen (sogenannte Badelektrode), als auch in der intrazellulären Lösung der Pipette platziert. Die Silberdrähte waren zuvor in einer Natrium-Hypochloritlösung chloridiert (Farbwechsel von silber zu schwarz) und vor Verwendung mit destilliertem Wasser gespült worden.

Zur Durchführung des elektrophysiologischen Experiments wurde die Pipette in die Badlösung im Zellschälchen getaucht und unter Mikroskopkontrolle (invertiertes Mikroskop) direkt oberhalb einer möglichst dunklen, nicht kugelförmigen Zelle platziert. Unter stärkerer Vergrößerung wurde die Pipettenspitze dann durch den Mikromanipulator mit der Zelle in Kontakt gebracht. Mit einer Vakuumspritze wurde nun ein leichter Unterdruck erzeugt, um eine adäquate Verbindung zwischen Pipette und Zelle herzustellen. Hierbei sollte ein sogenannter „Giga-Seal“, ein Widerstand im Giga- $\Omega$ -Bereich, erzeugt werden, um Leckströme zu minimieren. Der Unterdruck wurde weiter verstärkt, so dass die Zelle aufriss und der Widerstand vorübergehend sank. Wenn man nun die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators wieder langsam von der Zelle entfernte, löste sich ein Stück Membran von der Zelle und schloss sich spontan wieder über der Pipettenspitze. Erneut stieg der Widerstand auf Werte zwischen 1 und 30 G $\Omega$ .



*Abb. 2: Blick durch das Mikroskop während der Positionierung der Pipette vor den Tubes (Foto: G. Grasmeyer).*

Ein solcher Patch wurde anschließend vor dem Applikationssystem positioniert (Abb. 2) und je nach Experiment mit der entsprechenden Lösung umspült.

Kurz vor der Agonisten-Applikation wurde die Haltespannung von null auf -100 mV geklemmt. Öffneten sich nun die Kanäle nach der Agonisten-Applikation, d.h., floss ein Strom, der notwendigerweise die Spannung ändern würde, errechnete der Vorverstärker die zur Gegenregulation und Aufrechterhaltung der Haltespannung erforderliche Stromantwort. Dieser Strom war proportional zum tatsächlichen Ionenfluss. Er wurde verstärkt (L/M-EPC-7, „Patch-Clamp-Verstärker“, List Medical, Darmstadt, Deutschland), durch einen Low-pass-Filter (902-LPF, Frequency Devices, Ottawa, IL USA) bei 1 kHz gefiltert und anschließend mit einem Analog-Digitalwandler (Digidata 1200, Axon Instruments Inc., Foster City, CA USA) digitalisiert. Die Aufnahme­frequenz betrug 2 kHz. Die Haltespannung wurde nach diesem Vorgang wieder auf 0 mV eingestellt.

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt (19-26°C).

#### **4.4 Superfusionssystem**

Um die schnellen Prozesse bei den hier untersuchten Vorgängen angemessen abbilden zu können, wurde ein schnelles Lösungsapplikationssystem (RSC 200, Biologic, Claix, Frankreich) mit einer Flussrate von 1-2 ml/min verwendet. Das rotationsfähige Ende, ausgestattet mit fünf bis neun Glaskapillaren, vollzog einen kompletten Positionswechsel innerhalb von 32 ms. Bedenkt man, dass ein 5-HT-induzierter Strom etwa 20 ms bis zum Erreichen des Peaks benötigt, beträgt der schnellste auflösbare Einwasch 20 ms, wenn die Substanz nur gemeinsam mit 5-HT gegeben wird und 52 ms (20 ms + 32 ms), wenn vorher Substanz eingewaschen wird.

Das Reservoir der Lösungen bestand aus verschiedenen Glasröhren, die, um einen gleichmäßigen Zulauf zu gewährleisten, mit den Tropfkammern von Infusionsbestecken verbunden waren. Von diesen Tropfkammern führte jeweils ein Teflonschlauch (DuPont Teflon, USA) zu einer der Glaskapillaren, vor die der Patch beim Experiment platziert wurde. Teflon wurde wegen seiner chemischen Inertheit ausgewählt, so dass der Verlust lipophiler Substanzen durch Diffusion in Kunststoffe (z.B. Schlauchsysteme) minimiert



werden konnte (Barann et al., 2000a). Um die Substanzen allerdings gezielt applizieren zu können, wurde ein kleiner Teil der Teflonschläuche durch komprimierbare Silikon-schläuche ersetzt. Diese Schlauchstücke wurden durch die Quetschventile des Applika-tionssystems geführt und nur auf Befehl des angeschlossenen Computers freigegeben.

#### 4.5 Substanzapplikation

Um Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten und mit unterschiedlicher Dauer auf einen Patch applizieren zu können, wurden mit dem Programm RSC 200 (Biologic, Claix, Frank-reich) sogenannte Lösungsapplikations-Protokolle verfasst. So konnten durch gezielte Be-wegung des Rotationskopfes und das Öffnen einzelner Schläuche sowie die Anordnung der Lösungen in den Reservoirs Experimente mit unterschiedlichem Ablauf durchgeführt werden.

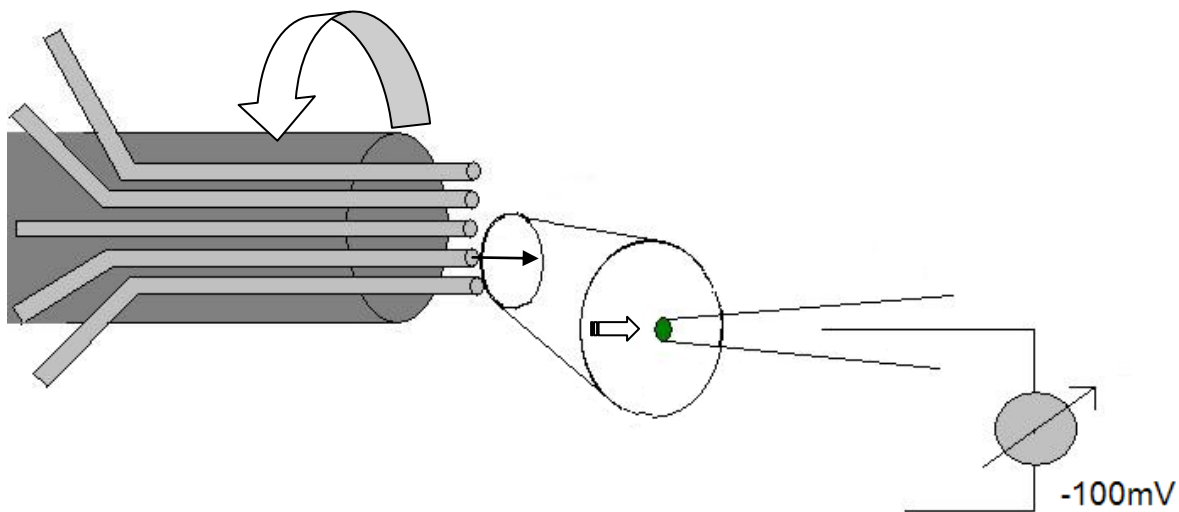


Abb. 3: Aufbau des Applikationssystems (Meiboom, 2011). Die Glaskapillaren (hellgrau) wurden vor dem Patch (grün) positioniert. Der Rotationskopf (dunkelgrau) ermöglichte einen raschen Wechsel der zu applizierenden Lösungen. Es lag eine Haltespannung von -100 mV an.

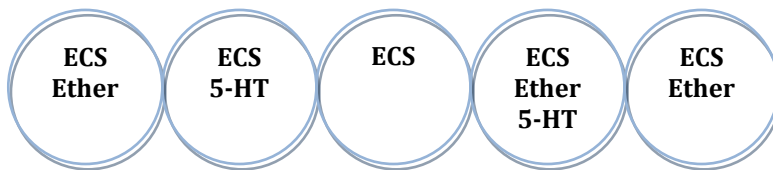
Bei jedem Experiment wurde durch eine 1,2 s andauernde Applikation von 5-HT (5-HT-Puls) eine Kanalöffnung bzw. ein Ionenfluss erzeugt. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Versuche mit dem für sie charakteristischen Aufbau dargestellt.

## a) Konzentrations-Wirkungskurven:

Dieser Aufbau diente dazu, einen eventuell vorhandenen Effekt einer Substanz auf den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zu erkennen und zu quantifizieren. Dabei gab es drei verschiedene Applikationsmodi:

- Äquilibriumapplikation [++]: Die Testsubstanz wurde sowohl 60 s vor als auch während des 5-HT-Pulses appliziert.
- Offenkanalapplikation [-+]: Die Substanz wurde lediglich während des 5-HT-Pulses gegeben.
- Geschlossenkanalapplikation [+ -]: Die Substanz umspülte den Patch 60 s vor dem 5-HT-Puls.

Die Reservoirs und dementsprechend auch die damit verbundenen Glaskapillaren wurden dabei folgendermaßen belegt:



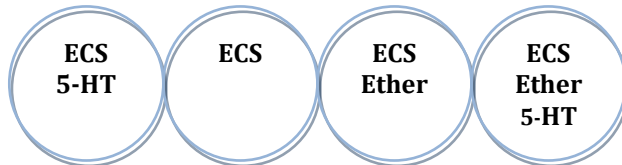
Während eines kompletten Experiments wurden abwechselnd drei Kontrollen mit 30  $\mu$ M Serotonin und drei Messungen mit Substanz und 30  $\mu$ M Serotonin durchgeführt. Zwischen den Aufzeichnungen wurde der Patch 60 s mit Extrazellulärlösung (ECS) gespült. Dieses Zeitintervall wurde so gewählt, damit die Rezeptoren bei jedem neuen Puls wieder aktivierbar waren.

## b) Einwasch-Experimente:

Die Einwasch-Experimente wurden durchgeführt, um die Kinetik der Wirkung der einzelnen Stoffe am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor besser bestimmen zu können. Der Ablauf entsprach der Äquilibriumapplikation. Es wurde jedoch die Vorapplikationszeit variiert, um zu überprüfen, wie schnell ein substanzinduzierter Effekt vollständig zum Tragen kommt. Folgende Einwaschzeiten wurden gewählt: 52 ms, 102 ms, 302 ms, 1 s, 3 s, 10 s, 30 s, 60 s (Äquilibrium-Applikation) und teilweise auch noch

90 s, 120 s, 180 s. Auch bei dieser Anordnung wechselten sich Kontrolle (30  $\mu$ M 5-HT) und Experiment ab.

Die Glasröhren wurden folgendermaßen belegt:



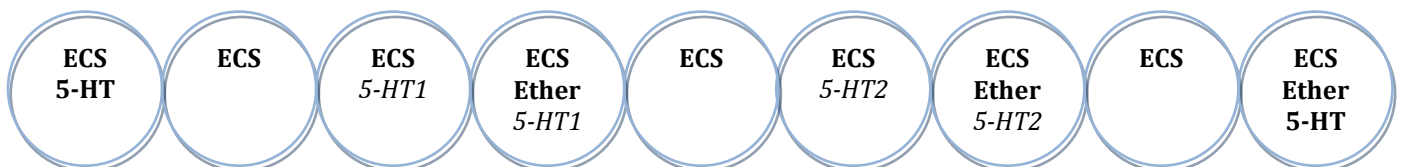
Im Falle von Diheptylether mussten die Experimente der besonders langsamen Kinetik angepasst werden: So wurde die Substanz 3 bis 4 Minuten ein- sowie ausgewaschen. Die Anforderungen an die Lebensdauer eines Patches stiegen auf diese Weise enorm (18-24 Minuten) und so war es nicht immer möglich, jeweils drei Kontrollen und drei Substanzapplikationen pro Patch aufzunehmen. Um dennoch genügend Experimente zu erhalten und rundown-Effekte zu kompensieren, wurden die Kontrolle vor und die Kontrolle nach dem verlängerten Einwasch vor jeder weiteren Analyse jeweils gemittelt.

c) **Kompetitionsexperimente:**

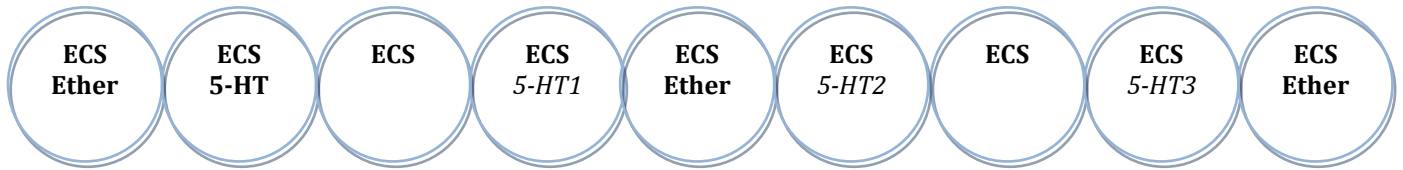
Diese Art von Versuchen wurde durchgeführt, um das Verhalten des Ethers in Gegenwart verschiedener 5-HT-Konzentrationen analysieren zu können und damit gegebenenfalls Informationen über die Bindungsstelle des Ethers zu erhalten.

Folgende 5-HT-Konzentrationen wurden gewählt: 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu$ M. Es wurde in der Offenkanal- und in der Geschlossenkanalapplikation experimentiert, wobei jeweils unterschiedliche Röhren-/Kapillar-Belegungen gewählt werden mussten:

Offenkanalmodus [-+]:



**5-HT** ist dabei die 30  $\mu$ M-Kontrolllösung, während die Angaben *5-HT1* und *5-HT2* zeigen, in welchen Reservoirs sich andere 5-HT-Konzentrationen (bsp. 1, 3, 10, 100  $\mu$ M) befanden.

Geschlossenkanalmodus [+]:

Mit dieser Anordnung konnten gleichzeitig drei verschiedene *5-HT*-Konzentrationen (*5-HT1*, *5-HT2*, *5-HT3*) im Geschlossenkanalmodus miteinander verglichen werden.

**5-HT** symbolisiert wieder die Referenzlösung mit 30  $\mu\text{M}$  Serotonin.

Bei allen Anordnungen wurde stets darauf geachtet, dass unmittelbar vor einem 5-HT-Puls keine Glaskapillare übersprungen wurde. So konnte verhindert werden, dass der Patch schon vor dem 5-HT-Puls Kontakt zur Badlösung, also auch zu 5-HT, bekommt. Es wäre sonst zu einem nicht repräsentativen Strombild gekommen, da einige Kanäle nach Aktivierung durch den Agonisten bereits desensitiviert und nicht-aktivierbar gewesen wären.

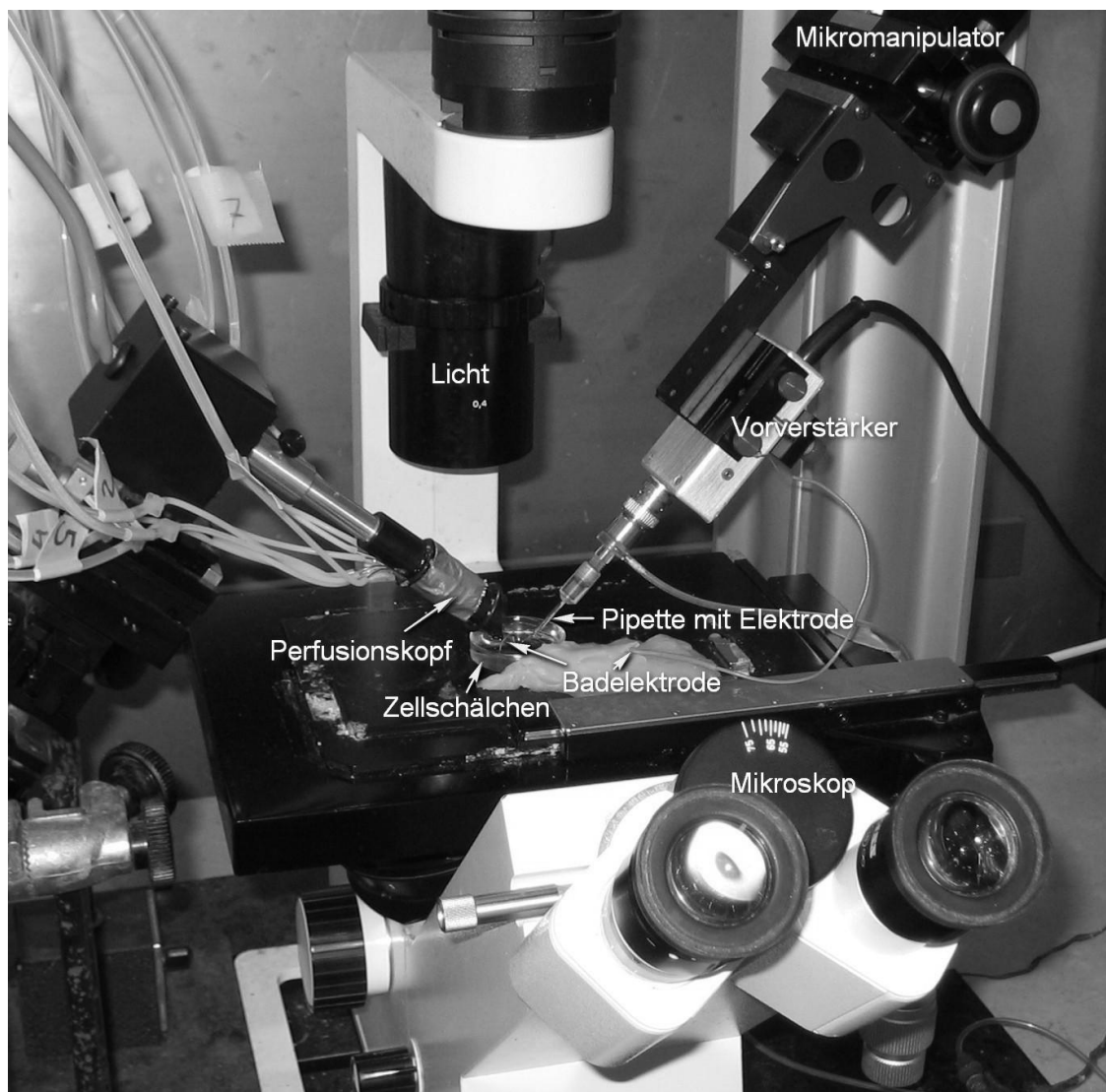


Abb. 4: „Typischer“ Patch-Clamp-Arbeitsplatz. Die Pipette mit dem an der Spitze hängenden Patch wurde im Zellschälchen mit Hilfe des Mikromanipulators vor dem Rotations- bzw. Perfusionskopf positioniert, um anschließend eine Substanzapplikation zu ermöglichen. Durch die Elektroden in Pipette und Badlösung wurde eine Haltespannung von  $-100\text{ mV}$  angelegt (Meiboom, 2011).

Da sehr hydrophobe Substanzen dazu neigen können, sich in Schläuchen anzureichern, wurden die Experimente stets mit der niedrigsten Konzentration begonnen und im Verlauf gesteigert. Vor dem Wechsel zu einer anderen Substanz wurde das Schlauch- bzw. Applikationssystem mit einem Ethanol/Wasser-Gemisch (1:3) etwa 30 Minuten lang gespült und anschließend mit destilliertem Wasser (Aqua bidest) aufgefüllt und bis zum nächsten Versuch belassen.

Jeder im Folgenden angegebene Datenpunkt repräsentiert mindestens drei verschiedene Patche.

## 4.6 Datenanalyse

### 4.6.1 Software

Die gemessenen Ströme wurden mit dem Programm Pclamp 8 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) aufgezeichnet und gespeichert. Dieses Programm ermöglichte es zudem, Applikationseinstellungen zu modifizieren und zum Beispiel Zeitintervalle zwischen 5-HT-Pulsen zu verändern.

Anschließend konnten die Stromspuren mit dem Programm Clampfit 8 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) ausgewertet und mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA USA) analysiert und veranschaulicht werden.

### 4.6.2 Analyse der Stromspuren

Der erste Schritt in der Auswertung der Stromspuren bestand darin, den Leckstrom abzuziehen, indem man die „baseline“ aller Spuren auf 0 pA setzte. Die Kontrollen einerseits und die Experimentalspuren andererseits wurden – falls geeignet – gemittelt, um anschließend die jeweiligen Maximalströme mit Hilfe des Cursors in pA zu bestimmen. Dieser Schritt sollte die Variabilität der Daten und einen eventuellen Rundown - also Kanalverlust im Verlauf der Messungen - kompensieren. Der übliche Rundown hatte eine Zeitkonstante von  $550 \pm 230$  s (n= 6 Patche, jeder mit einer Lebensdauer von mindestens drei Zeitkonstanten). Um  $\tau_{on}$  und  $\tau_{off}$ , also die Aktivierungs- und die Abfallkinetik zu berechnen, wurde eine bi-exponentielle Funktion verwendet.

$$f(t) = \sum_{i=1}^2 A_i e^{-t/\tau_i} + C \quad (1)$$

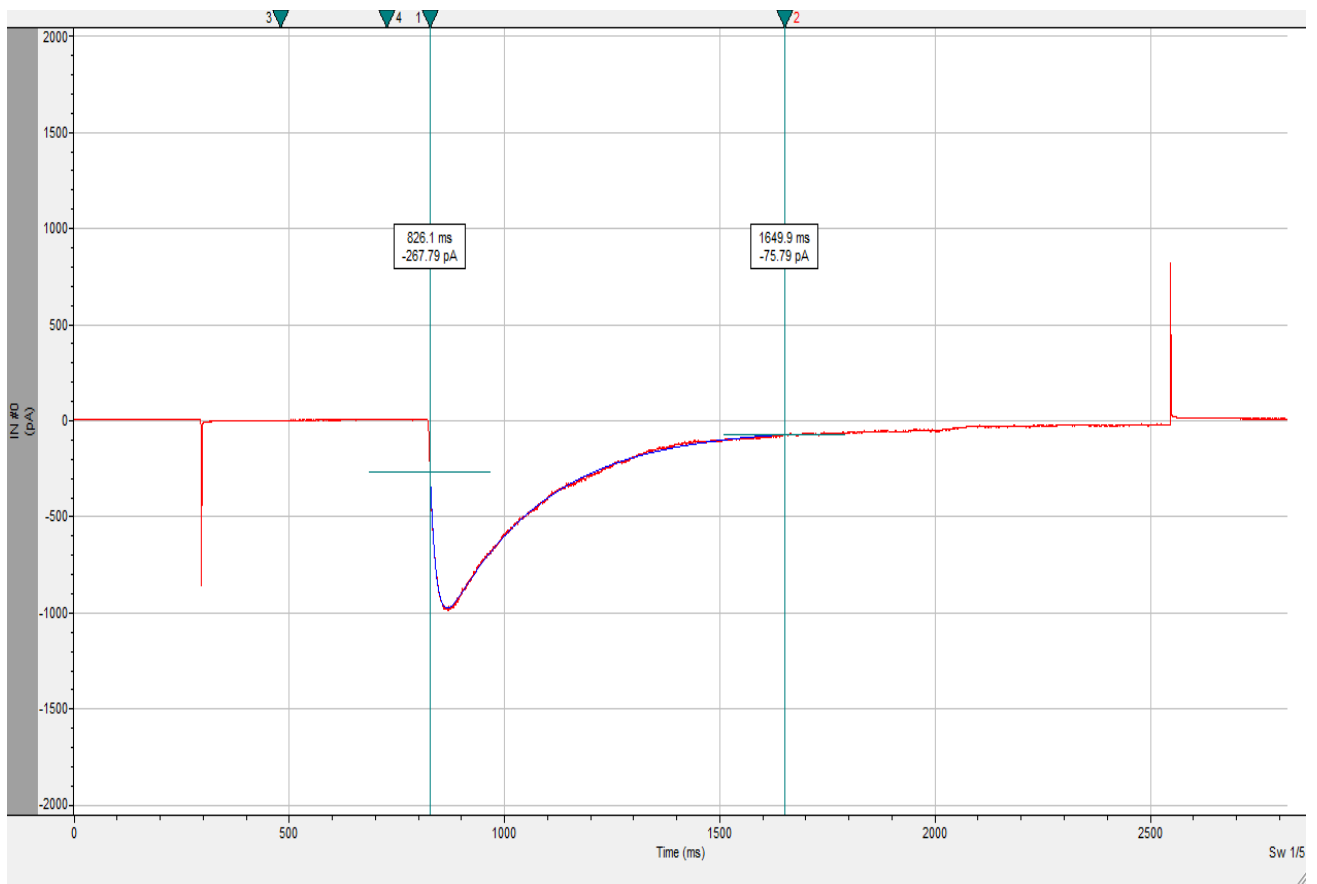


Abb. 5: Ausschnitt aus dem Programm Clampfit. Diese typische  $30 \mu\text{M}$  5-HT-Stromspur wurde zunächst mit ihrer Nulllinie auf das Niveau „0“ gebracht, um einen eventuellen Leckstrom herauszurechnen. Cursor 1 und 2 sind im absteigenden bzw. aufsteigenden Teil der Stromkurve positioniert und umfassen somit den Bereich, der über eine biexponentielle Gleichung gefittet wird (Fit: siehe blaue Kurve im Bild). Die dadurch berechneten Werte für die Aktivierungs- und die Abfallkinetik konnten einer Tabelle entnommen werden. Mithilfe eines Cursors war es ferner möglich, die Amplitudenwerte an der Spitze des Stromes abzulesen.

Die durch Clampfit ermittelten Amplitudenwerte der Experimentalspuren wurden prozentual zu dem aus den Kontrollspuren gemittelten „peak“ angegeben (in % des 5-HT-induzierten Stromes) und in eine GraphPad-Prism-Tabelle eingetragen. Es folgte eine Darstellung der Werte als Graphik, wobei der Reststrom nach Substanzapplikation jeweils gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen wurde. Verwendet wurde für die Erstellung der Konzentrationswirkungskurven die Hill-Gleichung:

$$i = [1 / (1 + C^n / IC_{50}^n)] \quad (2)$$

( $i$  ist der Spitzenstrom in Gegenwart des Medikaments als Fraktion des Kontrollspitzenstroms,  $C$  ist die Substanz-Konzentration,  $n$  ist der Hill-Koeffizient, und  $IC_{50}$  ist die Konzentration der halbmaximalen Inhibierung).

Die Einwaschkurven wurden auf zweierlei Weisen gefittet: Dazu wurde jeweils folgende biexponentielle Funktion verwendet:

$$I(t) = I_{\infty} + F_{fast} * (1 - I_{\infty}) * \exp(-t/\tau_{fast}) + (1 - F_{fast}) * (1 - I_{\infty}) * \exp(-t/\tau_{slow}) \quad (3)$$

Es gilt  $I_{\infty} = I(t \rightarrow \infty)$ , während  $\tau$  jeweils für eine der beiden Zeitkonstanten (**slow** oder **fast**),  $F_{fast}$  für den Anteil der schnellen Zeitkonstante am Gesamtstrom und  $t$  für Zeit steht. Ein erster Fit, der sogenannte freie Fit, wurde für jeden Dialkylether individuell - völlig unabhängig von den anderen Mitgliedern der homologen Reihe - angelegt und ließ die Parameter  $I_{\infty}$ ,  $F_{fast}$ ,  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  frei variieren. Ein zweiter, verbundener Fit sollte für alle Ether gemeinsame Zeitkonstanten ( $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$ ) finden,  $I_{\infty}$  und  $F_{fast}$  jedoch frei variieren lassen.

Die Kompetitionskurven wurden mit folgender Gleichung gefittet:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + IC_{50}^n / C^n) \quad (4)$$

$Y$  ist dabei die Stromantwort, **Top** und **Bottom** sind die Plateaus in derselben Einheit wie  $Y$ ,  $IC_{50}$  ist wieder die Konzentration mit halbmaximaler Inhibierung,  $C$  die jeweilige Substanz-Konzentration und  $n$  ist der Hill-Koeffizient.

Die freie Energie des Transfers von Methylgruppen zwischen der wässrigen Phase und dem Wirkort,  $\Delta\mu^{\theta, CH_2}$ , kann als Steigung einer linearen Regression zwischen Molfraktion der jeweiligen Dialkylether und Anzahl ihrer Kohlenstoffatome berechnet werden (Haydon und Urban, 1983).

$$\log x_{in,50\%}^{ROR} = n * \frac{\Delta\mu^{\theta, CH_2}}{RT} + \text{const.}^{ROR} \quad (5)$$

$$\text{const.}^{ROR} = \log a_{site,50\%}^{ROR} + (\Delta\mu^{\theta, -O-} + 2 * \Delta\mu^{\theta, CH_3}) / RT \quad (6)$$

$x_{in,50\%}$  ist die Molfraktion des Ethers **ROR** in der Phase (wässrig oder gasförmig), in der er eine halbmaximale Unterdrückung der Stromamplitude hervorruft. **log** ist der natürliche



Logarithmus;  $n$  steht für die Anzahl der Methylengruppen des Dialkylethers;  $\Delta\mu^\theta$  ist die freie Energie (oder chemisches Potential oder Enthalpie) der Überführung der entsprechenden funktionellen Gruppe von der Gasphase zum anästhetischen Wirkort.  $a_{site,50\%}$  ist dem-entsprechend die chemische Aktivität am Wirkort. Es wurde dabei erstens angenommen, dass die Interaktion stattfindet, wenn der jeweilige Dialkylether im Gleichgewicht mit dem Zielort steht und zweitens, dass die chemische Aktivität am anästhetischen Wirkort bei 50 % Unterdrückung für alle Ether gleich sind (Haydon und Urban, 1983).

Unter diesen Bedingungen kann darüberhinaus die Differenz zwischen den freien Energien zweier unterschiedlicher Substanzen (**drug1** und **drug2**) berechnet werden:

$$\Delta\mu^{\theta, drug 1} - \Delta\mu^{\theta, drug 2} = RT \cdot (\log x_{gas,50\%}^{drug 1} - \log x_{gas,50\%}^{drug 2}) \quad (7)$$

#### 4.6.3 Statistik

Die in den folgenden Graphiken abgebildeten Datenpunkte stellen jeweils einen Mittelwert verschiedener Patche und die Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken dar. Die im Text genannten Unterschiede zwischen zwei Datenpunkten wurden durch den studentischen t-Test (Microsoft Excel) ermittelt und als signifikant beurteilt, wenn  $p < 0,05$  war. In den Darstellungen der Kinetiken sind alle *nicht* signifikant von der Kontrolle abweichenden Punkte mit einem einheitlichen Symbol gekennzeichnet.  $IC_{50}$ -Werte und ihre 95 %-Konfidenzintervalle wurden mit GraphPad Prism 5 berechnet, ebenso wie die Einwaschzeitkonstanten, ihre Intervalle und der Korrelationskoeffizient  $R^2$ , falls angegeben.

## 4.7 Materialien

### 4.7.1 Substanzen

Die Experimente wurden mit folgenden Substanzen durchgeführt (aufgeführt mit Summenformel, Reinheitsgrad sowie Bezugsfirma und Sitz):

Substanz	Summenformel	Reinheitsgrad	Hersteller
Diethylether	$C_4H_{10}O$	> 99 %	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Deutschland)
Dipropylether	$C_6H_{14}O$	99 %	Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland)
Dibutylether	$C_8H_{18}O$	> 98 %	Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland)
Dipentylether	$C_{10}H_{22}O$	> 99,8 %	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Dihexylether	$C_{12}H_{26}O$	> 96 %	Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland)
Diheptylether	$C_{14}H_{30}O$	> 98 %	TCI Europe N.V. (Eschborn, Deutschland)

Die ersten drei Substanzen wurden direkt in Extrazellulärlösung gelöst. Für die anderen Stoffe wurde angesichts ihrer geringer werdenden Wasserlöslichkeit jeweils ein Ethanolstock hergestellt, welcher zur Herstellung der benötigten Konzentrationen anschließend in ECS weiterverdünnt wurde. Die maximal resultierende Ethanolkonzentration betrug dabei 0,034 M im Experiment mit 100  $\mu$ M Dipentylether; diese Ethanolkonzentration hat einen vernachlässigbar geringen Effekt auf die 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (Decker, 2011).

#### 4.7.2 Lösungen

Die Extrazellulärlösung, die sowohl als Badlösung für das Zellschälchen, als auch zum Lösen der Substanzen verwendet wurde, enthielt neben Aqua bidest folgende Komponenten:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration (mM)</b>
NaCl	150
KCl	5,6
CaCl <sub>2</sub>	1,8
MgCl <sub>2</sub>	1
HEPES	10

Die Badlösung enthielt zusätzlich Glucose (0,056 mM).

Die Intrazellulärlösung für die Pipetten enthielt:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration (mM)</b>
KCl	140
EGTA	10
MgCl <sub>2</sub>	5
HEPES	10

Der pH-Wert wurde in beiden Lösungen mit NaOH bzw. KOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

### 4.7.3 Geräte

Axiovert 25 Umkehrmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Bessel Lowpass-Filter 902-LPF	Frequency Devices, Ottawa, IL USA
Digidata 1200 Analog/Digitalumwandler	Axon Instruments Inc., Foster City, CA USA
Klimabrutschrank BB 6060	Heraeus, Hanau, Deutschland
ID 30 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
L/M-CPZ 101 Hitze-Polierapparatur	List Medical, Darmstadt, Deutschland
L/M-EPC-7 Patch-Clamp-Verstärker	List Medical, Darmstadt, Deutschland
Telaval 31 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Patch-Pipette-Puller PA-10	ESF Elektronik, Göttingen, Deutschland
Rapid solution exchange (RSC 200)	Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich

### 4.7.4 Software

GraphPad Prism5®	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA USA
pClamp® 8 und clampfit	Axon Instruments Inc., Foster City, CA USA
RSC V1.04	Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich
Microsoft Office Excel	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung der 5-HT-induzierten Ströme

Applizierte man auf einen excised-outside-out-Patch eine 5-HT-Konzentration von 30  $\mu\text{M}$ , kam es in Abhängigkeit von der angelegten Spannung zu einem Einwärts- oder Auswärtsstrom. So resultierte etwa bei einer negativen Spannung ein Einwärtsstrom. Während der Messung wurde stets eine negative Spannung von -100 mV angelegt, um einen entsprechend großen Ionenfluss zu erhalten und den Patch möglichst lange erhalten zu können (eine positive Spannung stellt erfahrungsgemäß höhere Anforderungen an die Stabilität einer Membran). Zudem wurde dadurch eine Beteiligung möglicherweise vorhandener spannungsabhängiger Ionenkanäle am gemessenen Stromfluss minimiert.

Da die Größe der Stromantwort auch von der 5-HT-Konzentration abhängt, war es wichtig, als Kontroll- bzw. Referenzstrom für jedes Experiment eine Standardkonzentration zu bestimmen: 30  $\mu\text{M}$  5-HT wurde gewählt, weil es einen nahezu maximalen Ionenfluss produziert. Der Effekt war reproduzierbar, wenn eine Auswaschzeit von 60 s eingehalten wurde (Barann et al., 1997).

Die durchschnittliche Amplitude eines 30  $\mu\text{M}$ -5-HT-induzierten Stromes lag bei  $-359,3 \pm 582,5$  pA (n= 72 Patche). Charakteristisch für den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor war außerdem seine schnelle Aktivierung: Die Zeitkonstante  $\tau_{\text{on}}$  betrug im Mittel  $8,4 \pm 6,3$  ms (n= 102 Experimente bei insgesamt 49 verschiedenen Patchen). Die Abfallzeitkonstante  $\tau_{\text{off}}$  betrug durchschnittlich  $92,5 \pm 71,8$  ms (n= 102 Experimente bei 49 Patchen).

Ohne Zugabe von Serotonin erzeugten Dialkylether keinen relevanten Stromfluss. Für alle der fünf Ether von Dipropyl- bis Diheptylether war die Stromantwort unter 3,5 % der Amplitude der 5-HT-induzierten Ströme (6-12 Patche und zwischen 14 und 20 Experimente pro Substanz).

## 5.2 Dipropylether

Dipropylether wurde in Extrazellulärlösung angesetzt und vor Experimentbeginn etwa eine Stunde lang gerührt. Wichtig war dabei, der Flüchtigkeit der Substanz gerecht zu werden, d.h. ein Entweichen zu verhindern. Dabei kamen beispielsweise innen mit Teflon beschichtete Schraubverschlüsse zum Einsatz, zudem wurden die Tropfkammern mit einem Verschluss versehen. Drei Konzentrationen (1 mM, 3 mM, 10 mM) wurden im Offenkanal- im Geschlossenkanal- und im Äquilibriumsmodus gemessen.

Im Folgenden werden beispielhaft für alle Applikationsarten Originalspuren von Experimenten mit 3 mM Dipropylether gezeigt, da diese Konzentration dem  $IC_{50}$ -Wert (Äquilibriumapplikation) am nächsten liegt. Für die anderen Substanzen wird im weiteren Verlauf ebenso verfahren.

### 5.2.1 Offenkanalapplikation

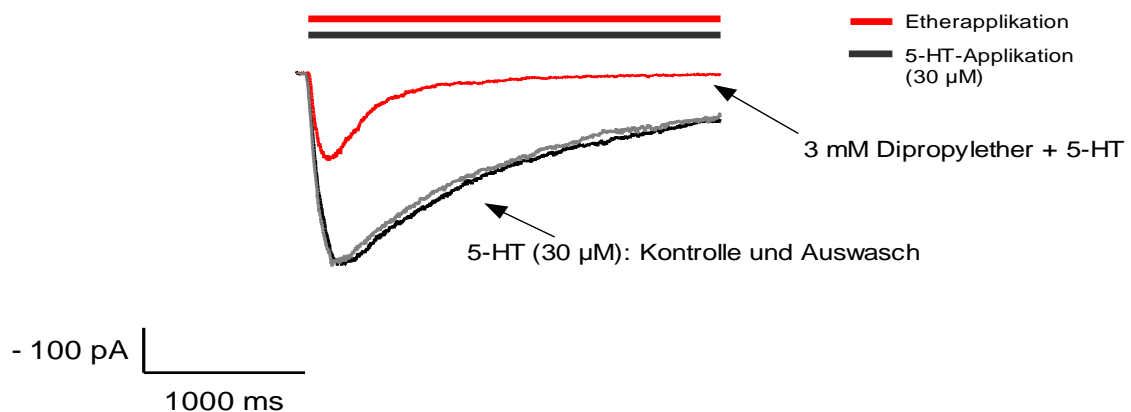


Abb. 6: Originalstromspur eines Experiments mit 3 mM Dipropylether in Offenkanalapplikation. Die schwarze Stromspur stellt den Referenzstrom (30 μM 5-HT) vor der Substanzapplikation dar, die graue Spur die Kontrolle bzw. den Auswasch nach der Substanzapplikation. Die rote Spur entspricht der Stromantwort in Anwesenheit von 30 μM 5-HT und 3 mM Dipropylether.

Wurde Dipropylether wie in der Abbildung nur während der Kanalöffnung durch 5-HT appliziert, wurde eine deutliche Unterdrückung der Stromamplitude sichtbar. Ebenfalls auf-

fällig war die Beschleunigung des Stromabfalls, der schneller war als bei einem üblichen  $30 \mu\text{M}$  5-HT-induzierten Strom. Diese Effekte waren reversibel, d.h. nach Auswasch des Dipropylethers (60 s) überlagerten sich der 5-HT-induzierte Strom (grau) und die ursprüngliche Kontrolle (schwarz).

### 5.2.2 Geschlossenkanalapplikation

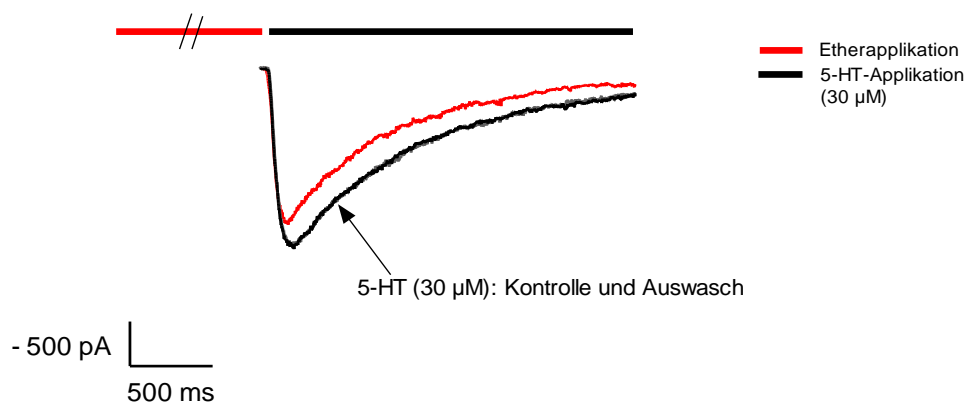


Abb. 7: Originalstrom bei Geschlossenkanalapplikation von 3 mM Dipropylether. Der inhibierende Effekt war deutlich geringer als in der Offenkanalapplikation. Deutlich wurde auch in diesem Experiment die vollständige Auswaschbarkeit der Substanz: Kontroll- und Auswaschspur liegen exakt übereinander.

Während der zweiten Applikationsform umspülten 3 mM Dipropylether ausschließlich 60 s lang vor der 5-HT-Gabe den Patch. Die Substanz wirkte also nur auf den noch verschlossenen Kanal ein. Wie die Graphik eindrücklich zeigt, war nur eine verhältnismäßig geringe Unterdrückung der Amplitude zu sehen und eine Beschleunigung des Stromabfalls fehlte hier fast vollständig.

### 5.2.3 Äquilibriumssapplikation

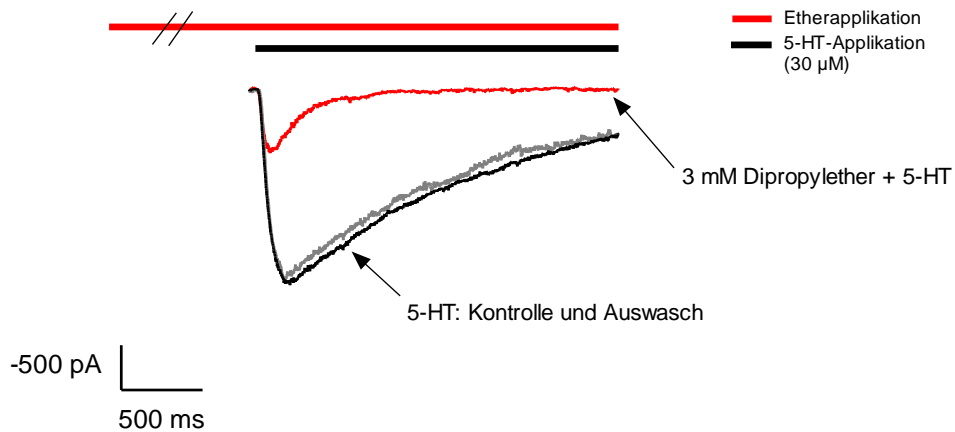


Abb. 8: Typisches Bild eines Stromes bei Äquilibriumssapplikation von 3 mM Dipropylether. Der Effekt auf die Amplitude und die Abfallzeitkonstante war vergleichbar mit der Offenkanalapplikation.

In der Äquilibriumssapplikation wurde der Ether sowohl 60 s lang vor als auch während des 5-HT-Pulses appliziert. Auf diese Weise traf die Substanz erst auf die geschlossenen und anschließend auf die geöffneten Kanäle. Von allen Applikationen fand man hier den größten hemmenden Effekt des Dipropylethers auf den Maximalstrom (siehe Konzentrations-Wirkungskurve). Nicht zu übersehen in diesem Experiment ist zudem die Verringerung der Desensitivierungszeitkonstante  $\tau_{\text{off}}$ .

Bei allen Experimenten war der Auswasch nach der Etherapplikation vollständig.



### 5.2.4 Konzentrations-Wirkungskurve

Um nun den  $IC_{50}$  von Dipropylether am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor abzuschätzen, wurden die Amplitudenmaxima der Experimentalspuren in Relation zu ihrer 5-HT-Kontrolle (30  $\mu$ M) gegen die Konzentration an Dipropylether aufgetragen und mit der Hill-Funktion gefittet.

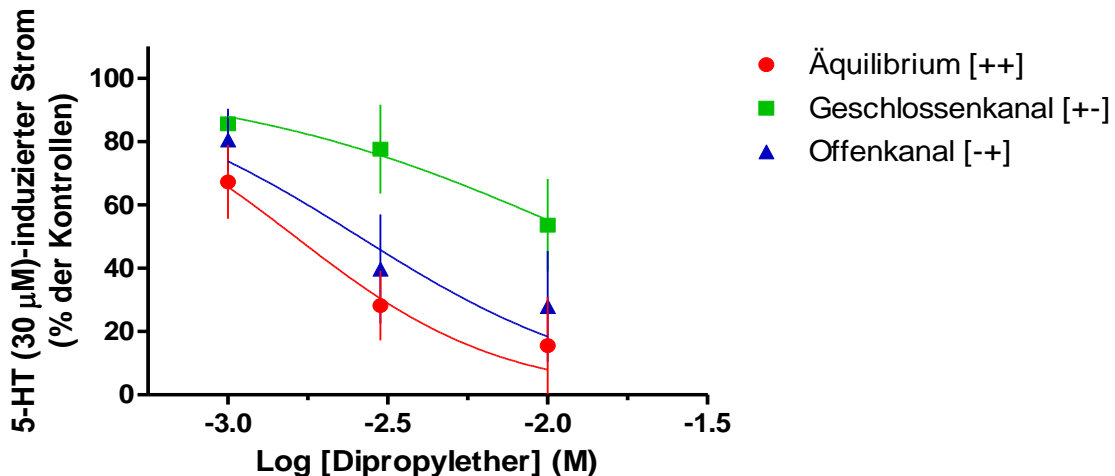


Abb. 9: Konzentrations-Wirkungskurve des Dipropylethers ( $n = 4-10$ ). Die  $IC_{50}$ -Werte betragen: 1,6 mM im Äquilibrium, 2,6 mM für den Offenkanal- und 13,1 mM für den Geschlossenkanalmodus (Daten inklusive Hill-Koeffizienten siehe Tabelle 1).

Wie sich bereits in den Originalstromspuren abzeichnete, ist der inhibierende Effekt in der Äquilibriumapplikation signifikant stärker ausgeprägt als in der Geschlossenkanalapplikation. So fand man etwa bei der Geschlossenkanalapplikation von 1 mM Dipropylether eine mittlere Unterdrückung des Kontrollstroms von  $14,4 \pm 3,4$  % und bei 10 mM einen Effekt von  $46,4 \pm 14,6$  %. Im Äquilibrium mit 1 mM Substanz ergab sich hingegen eine durchschnittliche Inhibition von  $32,8 \pm 11,6$  %, bei 10 mM waren es sogar  $84,5 \pm 15,3$  %. Die Offenkanalapplikation scheint in ihrem Effekt zwar vergleichbar mit der Äquilibriumapplikation: es liegt laut  $t$ -Test kein signifikanter Unterschied der beiden Modi vor; die Konfidenzintervalle der  $IC_{50}$ -Werte der beiden Kurven zeigen jedoch nur eine marginale Überlappung (Tab. 1). Möglicherweise ist die Zahl der Experimente ( $n = 4-10$ ) hier zu gering, um diesen Unterschied zeigen zu können. Die Offenkanalvariante zeigte bei 3 mM zudem eine signifikant stärkere Unterdrückung des 5-HT-induzierten Stromes ( $60,3 \pm 17,2$  %) als dieselbe Dipropylether-Konzentration in der Geschlossenkanalapplikation ( $22,4 \pm 14,1$  %).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Dipropylether seinen unterdrückenden Effekt auf die Stromamplitude vor allem in der Äquilibrium- und Offenkanalapplikation entfaltet, während die Wirkung auf den geschlossenen Kanal verhältnismäßig gering war.

### 5.2.5 Kinetiken

Beobachtet wurden sowohl die Veränderungen der Aktivierungskinetik  $\tau_{on}$  als auch der Abfallkinetik  $\tau_{off}$  unter Einwirkung von Dipropylether.

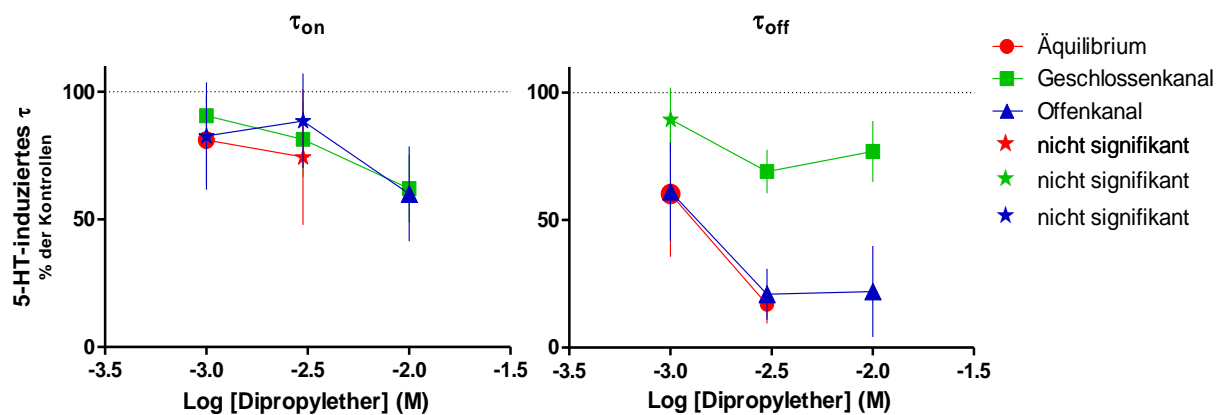


Abb. 10: Aktivierungs- und Abfallkinetik des Dipropylethers ( $n= 4-7$ ). Eine adäquate Analyse der Kinetiken in der Äquilibriumapplikation bei 10 mM Dipropylether war aufgrund des geringen Reststromes nicht möglich. Die durchschnittliche Zeitkonstante der Aktivierung ( $\tau_{on}$ ) betrug für die Kontrollen  $10,6 \pm 5,3$  ms ( $n= 103$  Experimente, 38 Patche). Das Kontroll- $\tau_{off}$  ergab eine Dauer von  $130,7 \pm 98,2$  ms ( $n= 102$  Experimente, 38 Patche). Der Stern symbolisiert nicht signifikant von der Kontrolle abweichende Zeitkonstanten.

Sowohl die Zeitkonstanten der Aktivierungs- als auch der Abfallphase nahmen bei Applikation von Dipropylether auf die Membran tendenziell ab. Die Abfallzeitkonstante wurde in der Geschlossenkanalapplikation bei Gabe von 3 und 10 mM Dipropylether weniger beschleunigt als in den übrigen Applikationsarten und unterstützt so den bisher gewonnenen Eindruck, dass diese Applikationsform hier den geringsten Effekt auf die 5-HT-induzierten Ströme ausübte (vergleiche hierzu bei 3 mM  $69 \pm 8,6$  % der Kontrolle für Geschlossenkanal und  $16,9 \pm 7,5$  % der Kontrolle für Äquilibrium).

### 5.2.6 Einwasch

Die Einwaschexperimente wurden durchgeführt, um die Entwicklung der Wirkungen über die Zeit zu beobachten sowie sich überlagernde Effekte zu demaskieren und zu analysieren. Wann trat eine Wirkung ein, wann war sie vollständig ausgeprägt? Was ergaben sich für Zeitkonstanten?

Als Substanzkonzentration wurde 2 mM gewählt, da diese in etwa dem  $IC_{50}$  des Äquilibrium entspricht (1,6 mM).

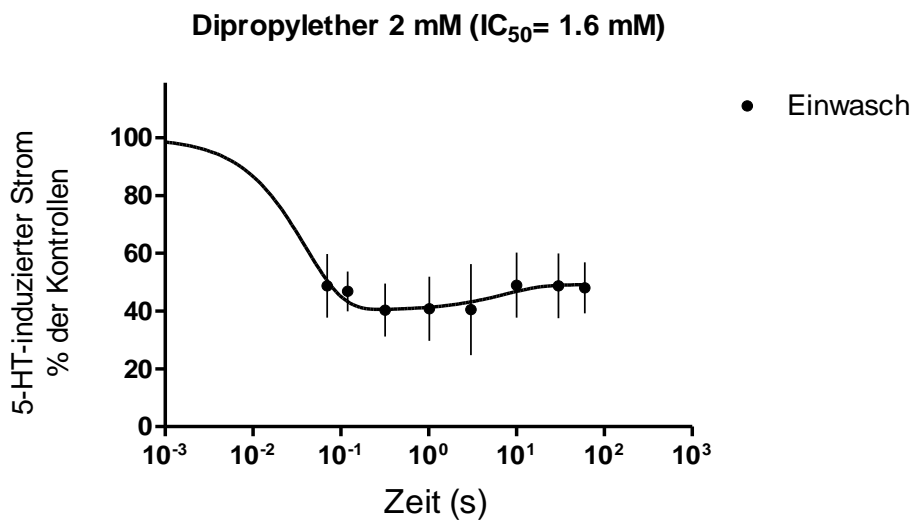


Abb. 11: Einwaschkinetik für 2 mM Dipropylether ( $n = 3-7$ ). Gemessen wurde für 52 ms, 102 ms, 302 ms, 1 s, 3 s, 10 s, 30 s und 60 s. Der „Startpunkt“ wurde bei 100 % festgelegt, da bei einer gegen null gehenden Substanzapplikation von einem vollständigen Kontrollstrom (100 %) ausgegangen werden kann. Alle anderen Parameter konnten frei variieren. Diese Werte und die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle sind in Tabelle 2 (Kapitel 6.1.3) zusammengefasst.

Die erhaltene Einwaschkurve ließ sich biexponentiell adäquat fiten und ergab demnach zwei Phasen für den Einwasch des Dipropylethers. Die Unterdrückung der beiden Phasen konnte jeweils in ihrem Anteil am Gesamteffekt (am Ende des Einwasches nach 60 s) angegeben werden: Der erste, schnelle Effekt mit einer Zeitkonstante ( $\tau_{fast}$ ) von 39,6 ms zeigte einen Anteil von 117,5 % am Gesamteffekt; der Strom wurde zunächst um 60 % unterdrückt. In der zweiten Phase mit einer Zeitkonstante von 7,4 s ( $\tau_{slow}$ ) erholte sich der Strom dann um 9 %, obwohl weiterhin Dipropylether eingewaschen wurde (entsprechender

Anteil von -17,5 % am Gesamteffekt). Der Gesamteffekt nach 60 s entspricht einer Unterdrückung von 51 % (100 % am Gesamteffekt).

Warum hier biexponentiell und nicht monoexponentiell gefittet wurde, wird später in der Zusammenschau mit den anderen Mitgliedern der homologen Reihe und im Vergleich mit n-Alkanolen deutlich.

### 5.3 Dibutylether

Dibutylether wurde ebenso wie Dipropylether in ECS angerührt. Auch hier wurde sorgfältig darauf geachtet, dass alle Gefäße stets zügig verschlossen wurden, um einer möglichen Verdampfung präventiv entgegenzuwirken. Es wurden drei Konzentrationen in allen Applikationsformen gemessen.

#### 5.3.1 Offenkanalapplikation

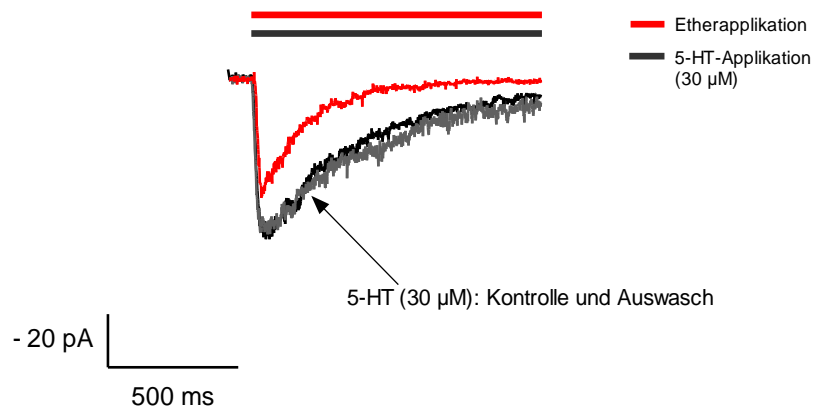


Abb. 12: 300  $\mu\text{M}$  Dibutylether führten in der Offenkanalapplikation zu einer signifikanten Unterdrückung des 5-HT-induzierten Stromes.

Im Vergleich zu dem um zwei C-Atome kürzeren Dipropylether konnte mit einer deutlich geringeren Konzentration an Dibutylether bereits eine signifikante Unterdrückung erzielt werden.

### 5.3.2 Geschlossenkanalapplikation

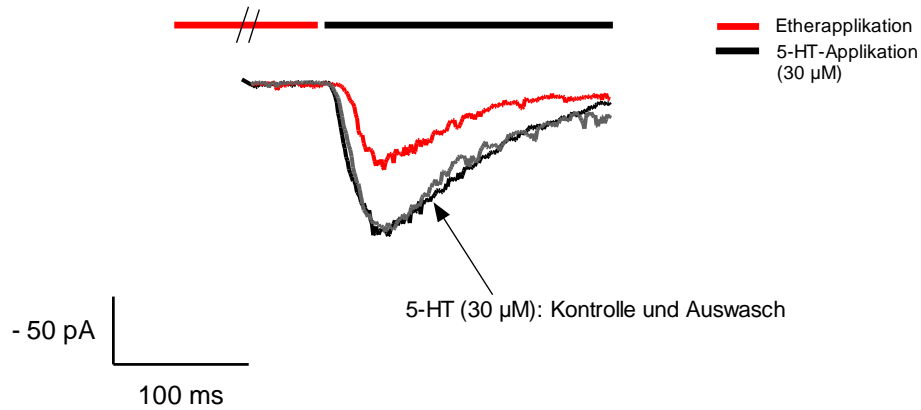


Abb. 13: 300  $\mu$ M Dibutylether im Geschlossenkanalmodus. Auch hier ließ sich eine deutliche Hemmung des Serotonin-induzierten Stromes beobachten.

Diese Experimente zeigten zum Einen die gegenüber dem Dipropylether etwa zehnfach erhöhte Potenz des Dibutylethers und zum Anderen den Zugewinn an Wirkung in der Geschlossenkanalapplikation.

### 5.3.3 Äquilibriumapplikation

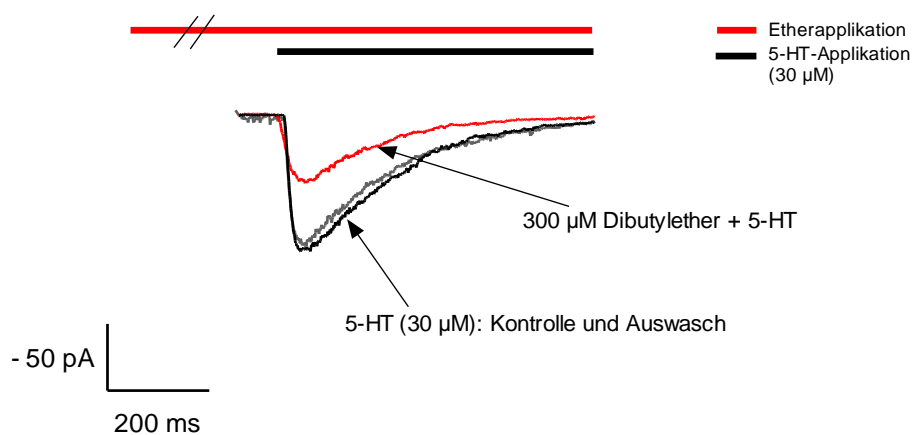


Abb. 14: 300  $\mu$ M Dibutylether im Äquilibrium bewirken eine nahezu halbmaximale Unterdrückung des 5-HT-induzierten Stromes.

Eine der Geschlossenkanalapplikation sehr ähnliche Wirkung zeigte die Anwendung von 300  $\mu\text{M}$  Dibutylether im Äquilibrium.

### 5.3.4 Konzentrations-Wirkungskurve

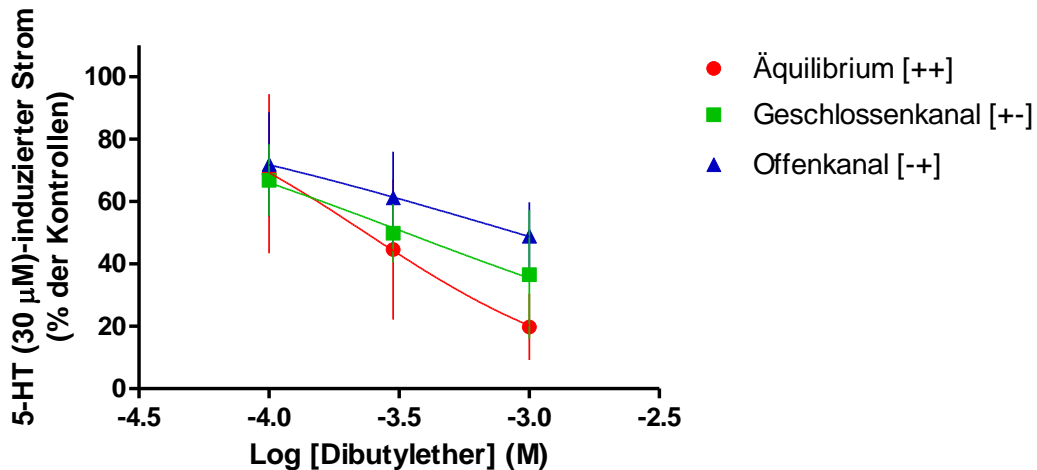


Abb. 15: Konzentrations-Wirkungskurve des Dibutylethers ( $n = 4-9$ ). Anders als beim Dipropylether liegen hier alle drei Applikationsarten eng beieinander: Die  $IC_{50}$ -Werte betragen 235  $\mu\text{M}$  (Äquilibrium), 335  $\mu\text{M}$  (Geschlossenkanal) und 889  $\mu\text{M}$  (Offenkanalapplikation) (Fitparameter siehe Tabelle 1).

Die vorherigen Abschnitte zeigten bereits, dass sich die Wirkungen in den drei Applikationen beim Dibutylether von denen beim Dipropylether unterschieden. Die Konzentrations-Wirkungskurve veranschaulicht dies. Während bei der kleinsten Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) die Effekte der drei Modi vergleichbar waren – sie bewegten sich bei einer Hemmung auf etwa 70 % - divergierten die Punkte bei 1 mM schon deutlicher. Wir fanden hier im Offenkanal-Experiment eine mittlere Unterdrückung des Peak-Stromes von  $51,1 \pm 10,8$  % und im Äquilibrium einen Effekt, der den Strom um  $80,2 \pm 10,6$  % verringerte und signifikant stärker als im entsprechenden Offenkanal-Experiment war. Die Geschlossenkanalvariante nahm hier mit einer Hemmung von  $63,4 \pm 20,7$  % (1 mM) und einer nicht signifikanten Abweichung von den beiden anderen Applikationen eine Art Zwischenstellung ein; verglichen mit der geringen Wirkung auf den Dipropylether kann

man dennoch sagen, dass die Geschlossenkanalapplikation relativ an Effektivität gewonnen hat.

### 5.3.5 Kinetiken

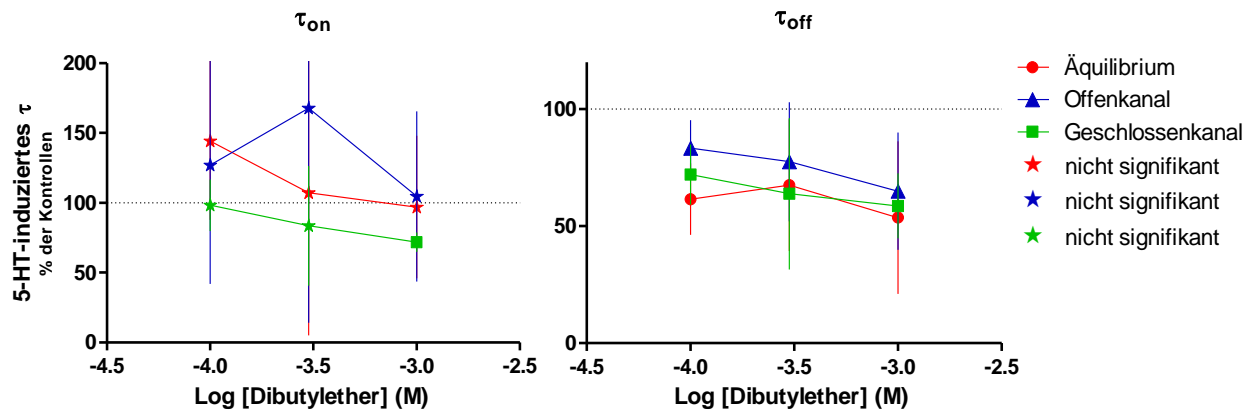


Abb. 16: Aktivierung und Abfall des 5-HT-induzierten Stromes unter dem Einfluss von Dibutylether (100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M und 1 mM) ( $n = 4-9$ ). Die Kontrollen ergaben ein  $\tau_{on}$  von  $7,4 \pm 5,9$  ms und ein  $\tau_{off}$  von  $67,6 \pm 71,8$  ms ( $n = 83$  Experimente und 41 Patche). Der Stern symbolisiert nicht signifikant von der Kontrolle abweichende Zeitkonstanten.

Die Aktivierungszeitkonstante ( $\tau_{on}$ ) wurde in der Geschlossenkanalapplikation bei 1 mM signifikant beschleunigt ( $71,8 \pm 7$  %); alle anderen Applikationen und Konzentrationen zeigten bei dieser Anzahl an Experimenten keinen signifikanten Einfluss auf die Geschwindigkeit der Aktivierung, auch nicht im Sinne einer Verlangsamung. Man beachte hier die große Variabilität der  $\tau_{on}$ -Werte, sichtbar gemacht durch die abgebildete Standardabweichung.

Die Desensitivierung der Kanäle ergab ein homogeneres Bild und zeigte für alle drei Applikationsformen und alle drei Konzentrationen eine signifikante Beschleunigung: So fanden wir bei 1 mM eine Zeitkonstante, die  $53,7 \pm 32,6$  % für das Äquilibrium und  $58,7 \pm 13,9$  % für das Geschlossenkanal-Experiment betrug. Im Offenkanalmodus ergab sich eine mittlere Zeitkonstante von  $64,9 \pm 25,1$  % der Kontrolle.



### 5.3.6 Einwasch

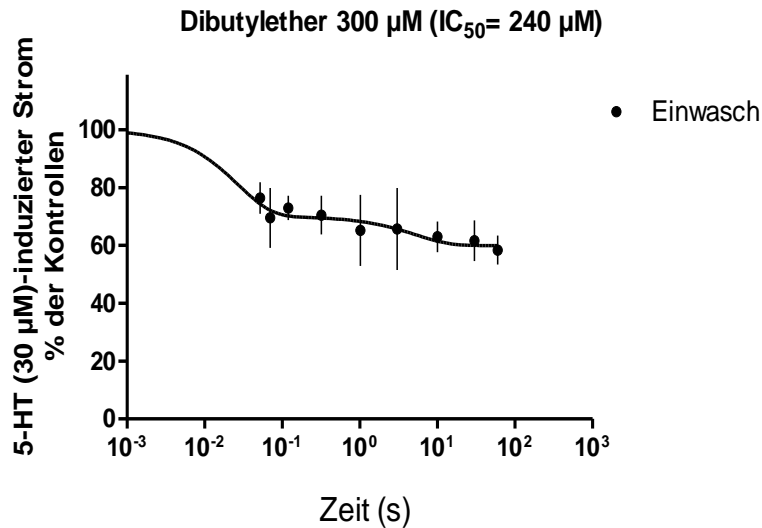


Abb. 17: Einwaschkurve des Dibutylethers ( $n = 4-6$ ). Abgesehen vom Startpunkt (100 %) konnten alle Parameter frei variieren (Fitparameter siehe Tabelle 2).

Es ließen sich im Einwaschexperiment wiederum zwei verschiedene Zeitkonstanten differenzieren: Eine schnelle, die 27 ms betrug und für 74,8 % des Effektes verantwortlich war. Ferner eine langsame Konstante mit einem Wert von 5,3 s. Insgesamt bedeutet dies, dass der Effekt des Dibutylethers vor allem aus der ersten schnellen Phase besteht und die zweite, langsame Phase einen geringeren Einfluss auf den Gesamteffekt hat. Das Plateau erreichte einen Wert von 60 % des Kontrollstromes. Dies entsprach nicht ganz dem erwarteten Bereich einer halbmaximalen Hemmung, bewegte sich aber im Rahmen von Messunterschieden bei verschiedenen Experimenten.

## 5.4 Dipentylether

Um den C<sub>10</sub>-Ether adäquat messen zu können, wurde ein 50 millimolarer Stock in reinem Ethanol angelegt, der im Verlauf vor jedem Experiment weiter verdünnt wurde. So konnte mit den Konzentrationen 10, 30 und 100 µM gemessen werden. Diese Konzentrationen wurden nach den bisherigen Ergebnissen in Erwartung einer um den Faktor zehn steigenden Potenz in zehnfach niedrigerer Konzentration als beim Dibutylether gewählt. Die bisherige Methode, die erforderliche Menge an Substanz direkt mit der Pipette aufzunehmen und in ECS zu lösen, konnte hier aufgrund der geringen Stoffmengen nicht mit der notwendigen Genauigkeit angewendet werden. Wieder wurden Versuche in allen drei Applikationsformen durchgeführt.

### 5.4.1 Offenkanalapplikation

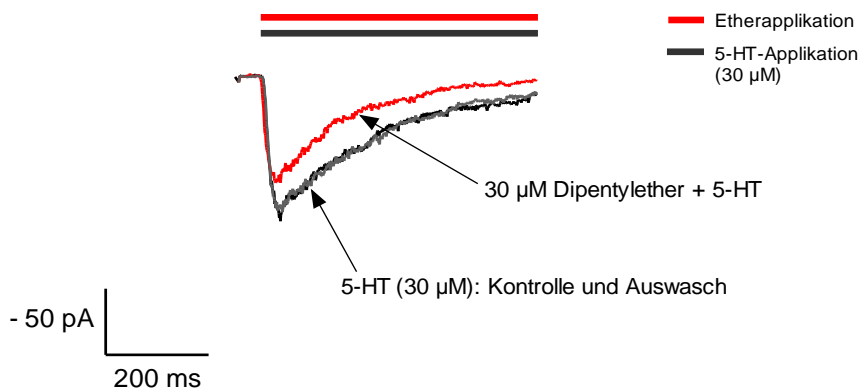


Abb. 18: 30 µM Dipentylether in der Offenkanalapplikation. Die Hemmung betrug in dieser Applikation durchschnittlich  $22,7 \pm 9,6$  % der Kontrolle.

30 µM Dipentylether bewirkten zwar eine Unterdrückung des 5-HT-induzierten Stromes, der Effekt auf den 5-HT-induzierten Strom war aber im Vergleich zu 300 µM Dibutylether (um den Faktor zehn höhere Konzentration) und 3 mM Dipropylether (um den Faktor 100 höhere Konzentration) in derselben Applikationsart relativ gering.

### 5.4.2 Geschlossenkanalapplikation

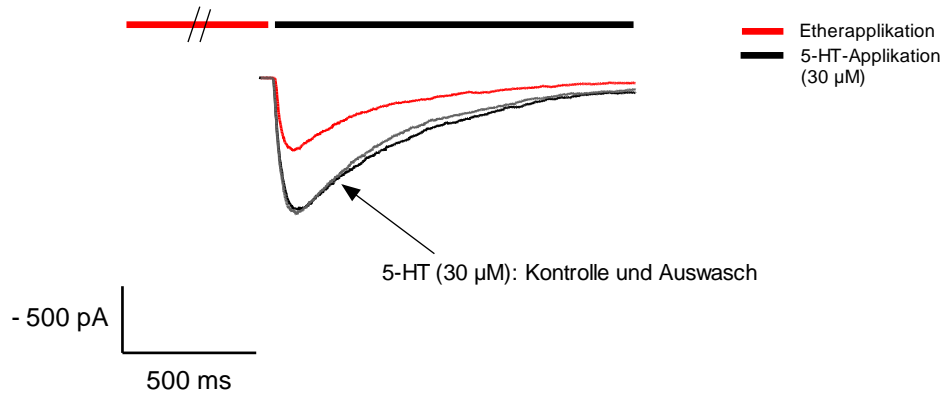


Abb. 19: 30 μM Dipentylether bewirkten in der Geschlossenkanalapplikation eine halbmaximale Hemmung.

Anders als die Offenkanalapplikation stellte sich die Geschlossenkanalvariante bei Applikation von Dipentylether dar: Bereits bei 10 μM erscheint der Effekt sehr stark ( $40,4 \pm 6,2$  %), bei 100 μM schließlich wurde der Strom beinahe vollständig unterdrückt ( $88,9 \pm 5,3$  % Hemmung). Zudem wurde die Abfallkinetik durch Zugabe dieses Ethers beschleunigt.

### 5.4.3 Äquilibriumapplikation

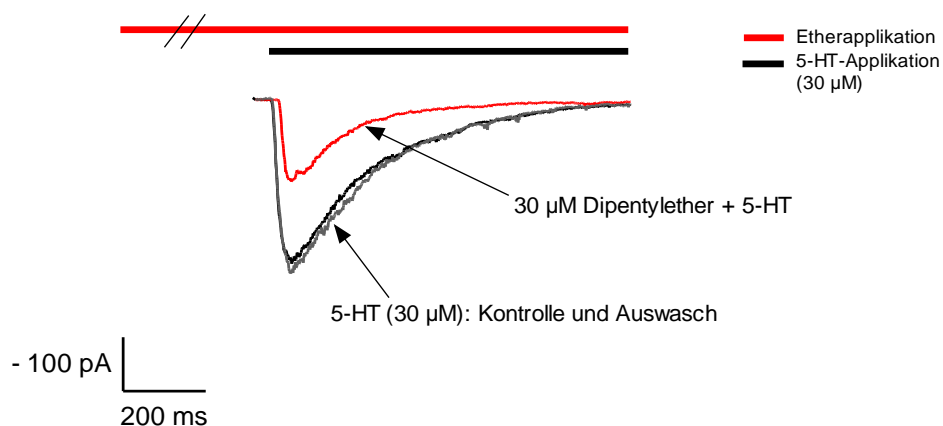


Abb. 20: Die Äquilibriumapplikation von 30 μM Dipentylether mit einer nahezu 50 % großen Unterdrückung.

Die Äquilibriumapplikation ergab für 30  $\mu\text{M}$  ein durchaus vergleichbares Bild zur Geschlossenkanalapplikation: Der Reststrom betrug durchschnittlich  $45,7 \pm 8,2 \%$  (Äquilibrium) und  $41,1 \pm 8,6 \%$  (Geschlossenkanal).

#### 5.4.4 Konzentrations-Wirkungskurve

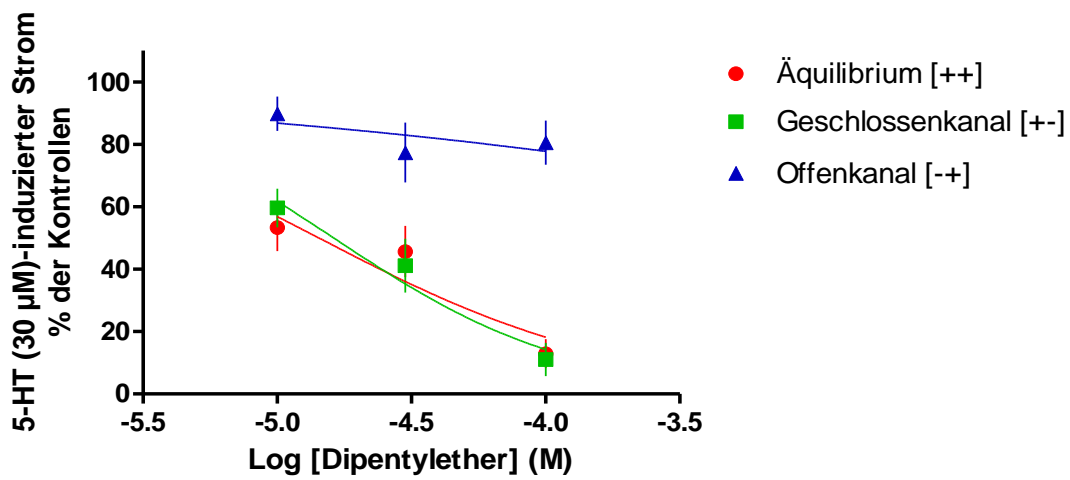


Abb. 21: Gemeinsame Darstellung aller Applikationen und Konzentrationen (Fitparameter siehe Tabelle 1): Deutlich hebt sich inzwischen das Offenkanal-Experiment von den anderen beiden Varianten ab ( $n= 4-8$ ). Folgende  $IC_{50}$ -Werte wurden ermittelt:  $14,3 \mu\text{M}$  (Äquilibrium),  $9,8 \mu\text{M}$  (Geschlossenkanal) und größer als  $200 \mu\text{M}$  (Offenkanal).

Die Konzentrations-Wirkungskurve des Dipentylethers bestätigt, was sich in den vorherigen Abbildungen typischer Originalspuren angedeutet hat: Während die Offenkanalapplikation kaum mehr effektiv in ihrer Hemmung war, schien die Geschlossenkanal- eine ebenso starke Inhibierung hervorzurufen wie die Äquilibriumapplikation. So fanden wir für  $100 \mu\text{M}$  eine Unterdrückung von  $19,5 \pm 7,1 \%$  im Offenkanalmodus,  $88,5 \pm 5,3 \%$  im Geschlossenkanal-Experiment und  $87,1 \pm 4,6 \%$  im Äquilibrium, wobei Letztere keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, beide Applikationen nun aber signifikant vom Offenkanalmodus abwichen. Interessant ist auch die Beobachtung, dass die Wirkung auf die geöffneten Kanäle hier gleichsam nicht mehr steigerbar war: Trotz Elevation der Konzentration änderte sich kaum etwas am Ausmaß des Effektes ( $10,2 \pm 5,5 \%$  für  $10 \mu\text{M}$ ,

n= 6 und  $19,5 \pm 7,1$  % für  $100 \mu\text{M}$ , n= 4). Dies steht im Kontrast zur Entwicklung bzw. Steigung der beiden anderen Modi.

### 5.4.5 Kinetiken

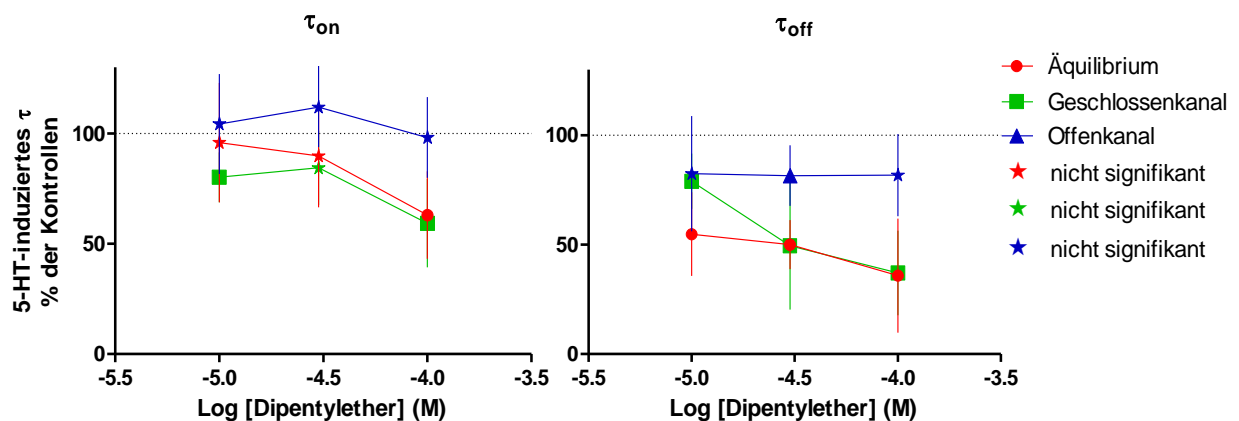


Abb. 22: Einfluss des Dipentylethers auf die Aktivierungs- und die Abfallgeschwindigkeit des 5-HT-induzierten Stromes. Die gestrichelte Linie erleichtert die Beobachtung, dass vor allem die Aktivierung in Bezug zum Kontrollstrom kaum signifikant verändert wurde ( $n= 5-8$ ). Die Aktivierung unter Kontrollbedingungen ergab eine durchschnittliche Zeitkonstante von  $8,5 \pm 4,3$  ms ( $\tau_{on}$ ); die Abfallkinetik zeigte ein  $\tau_{off}$  von  $103,2 \pm 70,7$  ms ( $n= 78$  Experimente an 28 Patchen). Der Stern symbolisiert nicht signifikant von der Kontrolle abweichende Zeitkonstanten.

Das Aktivierungsverhalten der Kanäle unter dem Einfluss von Dipentylether zeigte lediglich für die Geschlossenkanalapplikation bei 10 und  $100 \mu\text{M}$  und für die Applikation im Äquilibrium bei  $100 \mu\text{M}$  eine signifikante Änderung der Geschwindigkeit, hier im Sinne einer Beschleunigung. Eine signifikante Verlangsamung konnte - wie auch bei den bisher betrachteten Ethern - nicht beobachtet werden.

Mit Ausnahme der Offenkanalapplikation, die das  $\tau_{off}$  lediglich bei  $30 \mu\text{M}$  signifikant beschleunigte, wurde die Desensitivierung der Kanäle bzw. der Übergang in die geschlossene, nicht-aktivierbare Form - verglichen mit den entsprechenden Kontrollströmen - durch Zugabe von Dipentylether schneller erreicht. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass Di-

pentylether den 5-HT-induzierten Strom insbesondere in der Geschlossenkanal- und der Äquilibriumapplikation wirksam unterdrückt.

#### 5.4.6 Einwasch

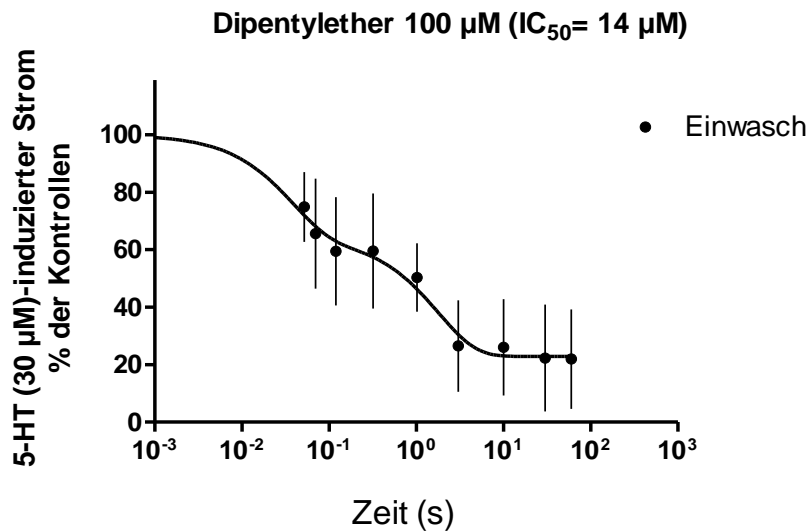


Abb. 23: Einwaschexperiment mit Dipentylether (100  $\mu\text{M}$ ). Wie bei den vorherigen Einwaschversuchen mit Dipropyl- und Dibutylether ließen sich deutlich zwei Zeitkonstanten erkennen (Fitparameter siehe Tabelle 2). Der Unterschied zwischen den Substanzen besteht in ihren Anteilen am Gesamteffekt ( $n = 6-9$ ). Beachte, insbesondere, wenn es später zu einem Vergleich der Ether und ihres Einwaschverhaltens kommt, dass die hier gewählte Konzentration höher als der  $\text{IC}_{50}$  ist. Diese Diskrepanz resultiert aus einem ursprünglich zu niedrig abgeschätzten  $\text{IC}_{50}$ -Wert. Die Schlussfolgerungen aus diesem Experiment werden insgesamt jedoch nicht beeinträchtigt.

Betrachtet man die Einwaschkurve des Dipentylethers, identifiziert man schnell zwei verschiedene Zeitkonstanten. Die schnelle Zeitkonstante (37,6 ms) hatte einen Anteil von 46,5 % am Gesamteffekt. Die langsamere Zeitkonstante betrug in diesem Einwaschexperiment 1,8 s mit einem größeren Anteil am Gesamteffekt (53,5 %). Das Plateau erreichte einen Wert von 22,9 % der Kontrollen und entsprach somit dem erwarteten Effekt der gewählten Dipentylether-Konzentration.

## 5.5 Dihexylether

Für die Messungen mit Dihexylether wurde ein 50 millimolarer Stock in Ethanol angesetzt, um in weiteren Verdünnungsvorgängen die Konzentrationen 1,7  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  herzustellen. Die größte Konzentration entsprach einer gesättigten Lösung, ihr Ethanolanteil lag bei 5,2 mM.

### 5.5.1 Offenkanalapplikation

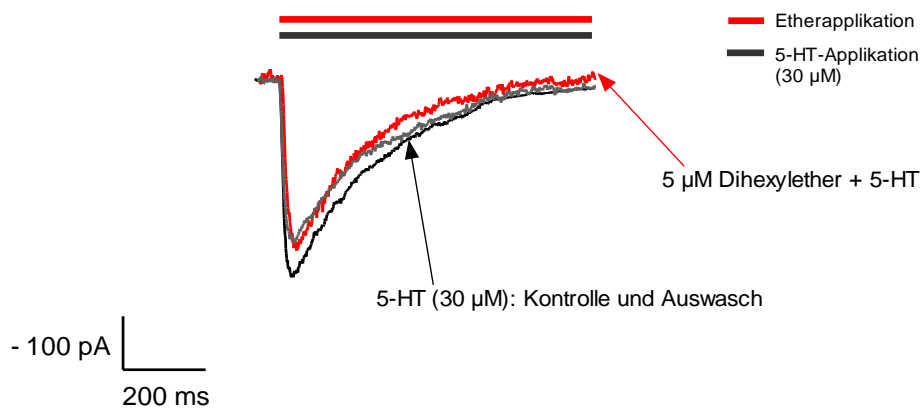


Abb. 24: 5  $\mu\text{M}$  Dihexylether erzielen im Offenkanalexperiment gleichsam keinen Effekt. Dieses Ergebnis konnte auch bei 15  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Zu bemerken ist, dass die beiden Kontrollspuren in diesem Beispiel stärker voneinander abweichen. Dies ist am ehesten auf einen Kanalverlust im Verlauf der Messungen zurückzuführen. Für einen nicht auswaschbaren, also irreversiblen Effekt gab es – wie die folgenden Abbildungen zeigen – keinen Hinweis.

Dihexylether bewirkte im Offenkanalmodus keine signifikante Unterdrückung mehr. Dies änderte sich auch durch Steigerung der Konzentration bis in den Sättigungsbereich nicht.

### 5.5.2 Geschlossenkanalapplikation

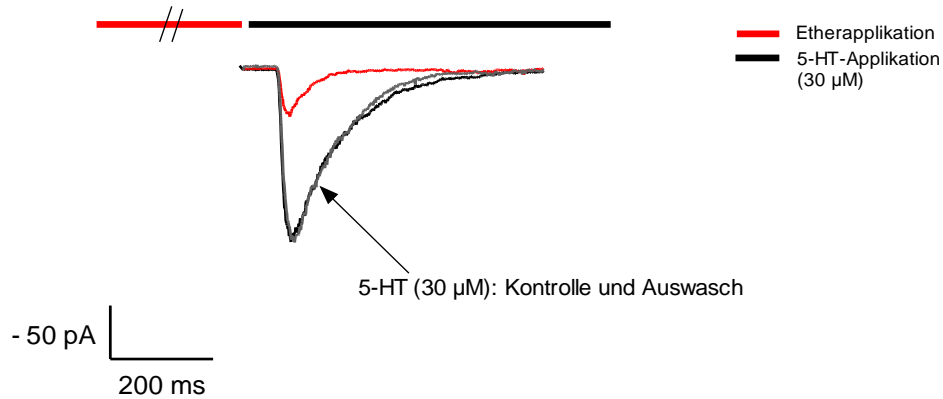


Abb. 25: Der Unterschied zur Offenkanalapplikation wird in dieser Abbildung typischer Originalspuren deutlich. Zudem wird hier deutlich, dass die Substanz vollständig auswaschbar sein kann: Die Kontrollspuren liegen genau aufeinander.

Die starke Wirkung von 5 μM Dihexylether auf den Peakstrom und die Abfallkinetik zeigte sich in allen Experimenten sehr deutlich. Es kam hier durchschnittlich zu einer Hemmung von  $72,4 \pm 4,2$  %. Der Trend einer zunehmenden Wirkung in der Geschlossenkanalapplikation und einer abnehmenden Wirkung in der Offenkanalapplikation setzt sich weiter fort.



### 5.5.3 Äquilibriumssapplikation

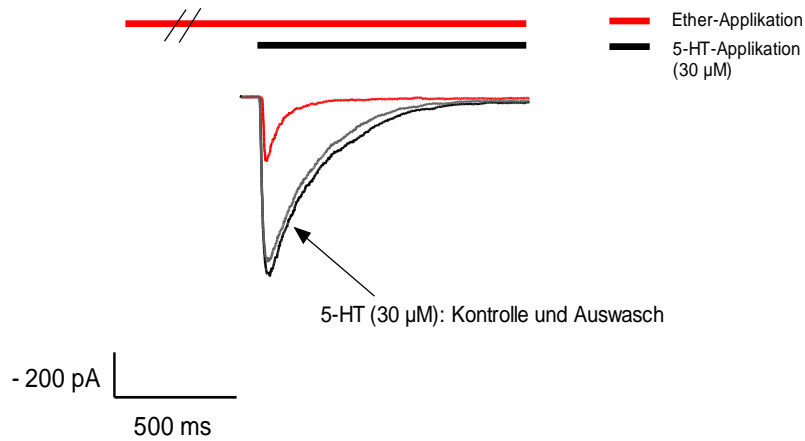


Abb. 26: 5 µM Dihexylether in der Äquilibriumssapplikation

Ähnlich stark wie in der Geschlossenkanalapplikation reagierten die Kanäle in der Äquilibriumssapplikation. Dazu betrachte man beispielsweise die Unterdrückung durch 5 µM Dihexylether, die durchschnittlich bei  $68,4 \pm 11,8 \%$  lag. Es war zudem möglich, mit der gesättigten Lösung (15 µM) den Effekt noch so weit zu steigern, dass lediglich ein Reststrom von etwa  $19,3 \pm 8,7 \%$  floss.

### 5.5.4 Konzentrations-Wirkungskurve

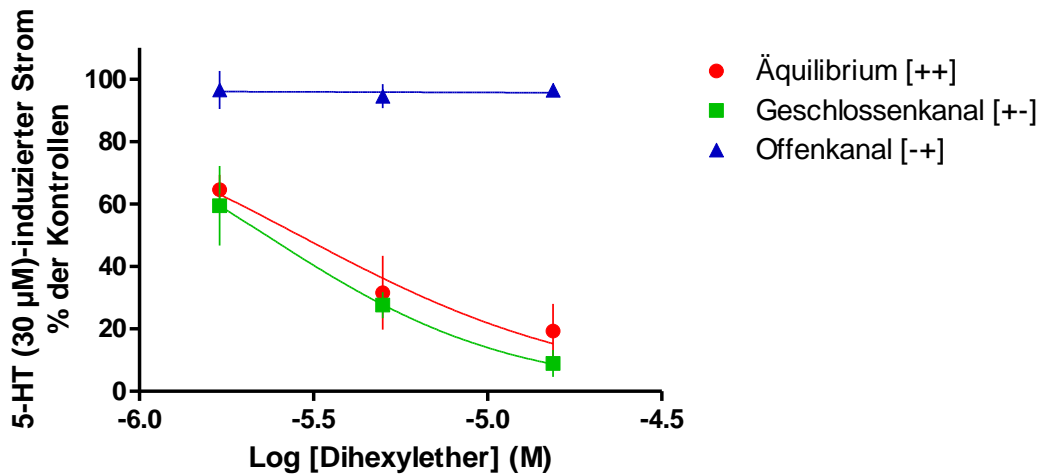


Abb. 27: Konzentrations-Wirkungskurve des Dihexylethers (1,7; 5; 15 µM). Deutlich hebt sich die Offenkanalapplikation von den beiden anderen stark wirkenden Applikationen ab (n= 3-8). Die  $IC_{50}$ -Werte für Dihexylether lagen bei 2,9 µM für das Äquilibrium und bei 2,3 µM für die Geschlossenkanalvariante (siehe Tabelle 1).

Die Konzentrations-Wirkungskurve spiegelt auf eindrucksvolle Weise wider, was die Abbildungen der einzelnen Applikationsformen zuvor exemplarisch gezeigt haben. Der Unterschied zwischen Offenkanalapplikation und Geschlossenkanalapplikation bzw. Äquilibrium ist um ein Vielfaches größer geworden: Das Offenkanalexperiment war unabhängig von der Konzentration gleichsam wirkungslos, während die anderen beiden Modi nach wie vor eine äußerst starke Unterdrückung des 5-HT-induzierten Stromes bewirkten. So fand man in der Offenkanalform für 1,7 µM Dihexylether eine Hemmung von  $3,4 \pm 6,1$  % und für die größtmögliche Konzentration (15 µM, gesättigte Lösung) eine Hemmung von  $3,5 \pm 0,9$  %. Die Unterdrückung des Stromes im Äquilibrium dagegen vermochte sich von  $35,4 \pm 4,8$  % (1,7 µM) bis hin zu  $80,7 \pm 8,7$  % (15 µM) zu steigern. Im Geschlossenkanalexperiment flossen bei 1,7 µM durchschnittlich noch  $59,4 \pm 12,7$  % des Kontrollstromes, bei Verwendung der gesättigten Lösung betrug die Amplitude dann nur noch  $8,93 \pm 4,3$  % der Referenzamplitude. Es stellte sich die Frage, ob der scheinbar vorhandene Unterschied zwischen Äquilibrium und Geschlossenkanalapplikation in der höchsten Konzentration signifikant war, das heißt, ob Dihexylether im Geschlossenkanalmodus den 5-HT-

induzierten Strom wirklich relevant stärker unterdrückte als in der Äquilibriumapplikation. Das Ergebnis des daraufhin durchgeführten t-Testes schloss jedoch eine signifikante Abweichung der beiden Modi voneinander aus.

### 5.5.5 Kinetiken

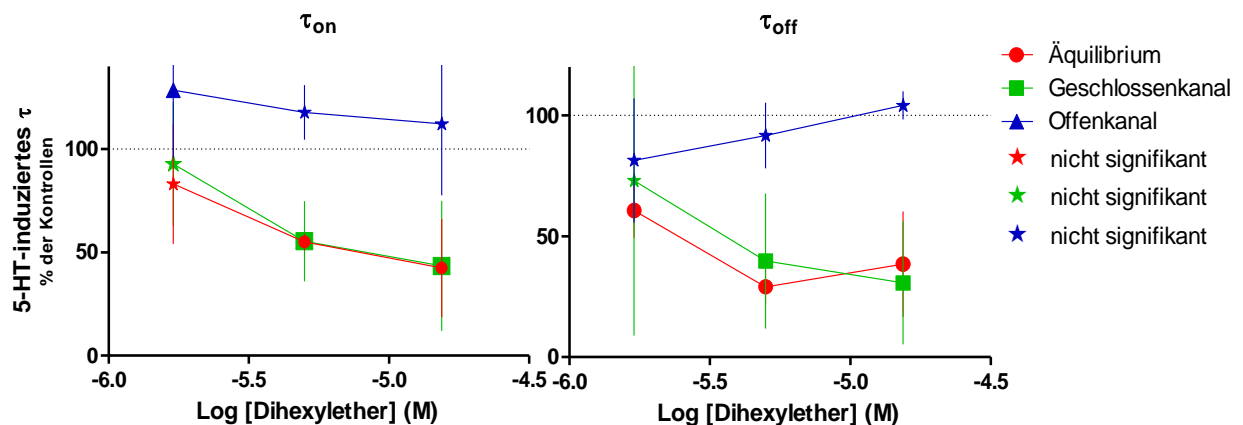


Abb. 28: Die Einwirkung des Dihexylethers auf die Stromkinetik. Die unterschiedliche Beeinflussung der Stromkinetiken durch die Offenkanalapplikation und die anderen beiden Applikationsformen wird deutlich ( $n= 3-8$ ). Folgende Zeitkonstanten wurden für Aktivierung und Desensitivierung der Kontrollen ermittelt:  $7,1 \pm 5,1$  ms ( $\tau_{on}$ ) und  $107,2 \pm 131,7$  ms ( $\tau_{off}$ ;  $n= 50$  Experimente an 28 Patches). Der Stern symbolisiert nicht signifikant von der Kontrolle abweichende Zeitkonstanten.

Die Aktivierungskinetik wurde in der Äquilibrium- und der Geschlossenkanalapplikation in ähnlicher Weise und Ausprägung beeinflusst: Die Datenpunkte liegen beinahe exakt übereinander. Es ließ sich hier - mit Ausnahme der Geschlossenkanalapplikation bei  $1,7 \mu\text{M}$  - eine signifikante und konsequente Beschleunigung der Kanalöffnung beschreiben. Bei der Offenkanalapplikation hingegen fand man für  $1,7 \mu\text{M}$  Dihexylether eine in Bezug auf die Kontrolle signifikante Verlangsamung der Aktivierungszeit ( $128,5 \pm 32,8$  %), während die höheren Konzentrationen ( $5$  und  $15 \mu\text{M}$ ) die Zeit bis zum Erreichen des Peaks weder beschleunigten noch verlangsamten.

Die Offenkanalapplikation bewirkte in keiner der drei Konzentrationen eine signifikante Veränderung der Abfallkinetik, wohingegen Äquilibrium und Geschlossenkanalmodus hier nahezu das gleiche Bild wie bei der Aktivierung boten: Sie beschleunigten – mit Ausnahme von 1,7  $\mu\text{M}$  im Geschlossenkanalmodus - die Desensitivierung der Kanäle.

### 5.5.6 Einwasch

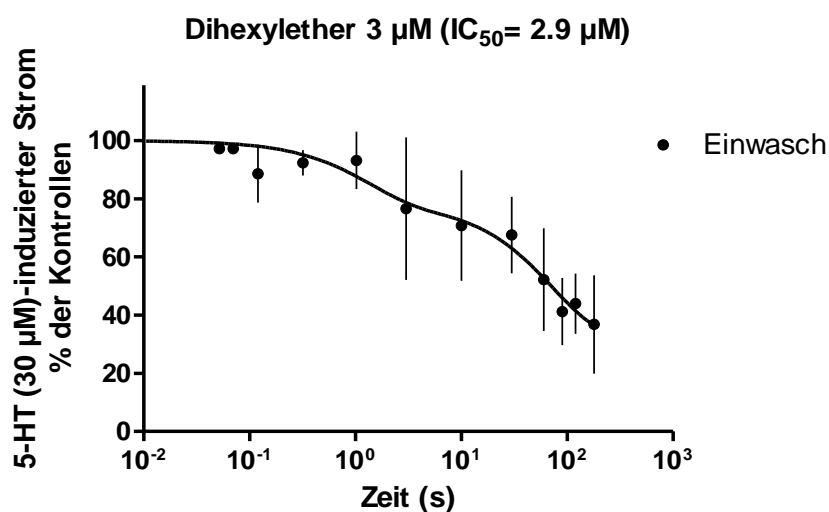


Abb. 29: Erweitertes Einwaschexperiment mit 3  $\mu\text{M}$  Dihexylether und drei zusätzlichen, über die bisherige Höchst-Einwaschdauer von 60 s hinausgehenden Einwaschzeiten: 90 s, 120 s und 180 s ( $n = 3-6$ ; Fitparameter siehe Tabelle 2).

Erneut ließen sich zwei Zeitkonstanten unterscheiden: Eine schnellere mit 1,3 s und eine langsamere mit 73,4 s. Für den Großteil des Effektes verantwortlich war hier vor allem die zweite, langsamere Zeitkonstante mit etwa 68 % Anteil an der Gesamtwirkung. Der steile Abfall zwischen dem 30 s- und dem 60 s-Punkt und die nun sehr langsamen Zeitkonstanten hatten zu der Vermutung geführt, dass ein längerer Einwasch hier möglicherweise eine noch deutlichere Hemmung hervorrufen würde. Die letzten drei Datenpunkte (90 – 180 s) und das ermittelte Plateau von 32,5 % stützen diese Hypothese. Demnach hat Dihexylether eine im Vergleich zu den kürzeren Dialkylethern verlängerte Einwaschzeit bzw. eine andere Einwaschkinetik. Dies passt zu der Beobachtung, dass Dihexylether in der Offenkanalapplikation (20 ms Substanz-Einwasch) keine relevante Wirkung mehr hervorruft.

## 5.6 Diheptylether

Um Experimente mit dem C<sub>14</sub>-Ether durchführen zu können, wurde ein 10 millimolarer Stock in reinem Ethanol angelegt. Es wurden alle drei Modi mit einer gesättigten Lösung (1,4 µM) an Diheptylether gemessen. Die Ethanol-Konzentration betrug hierbei 3,4 mM.

### 5.6.1 Offenkanalapplikation

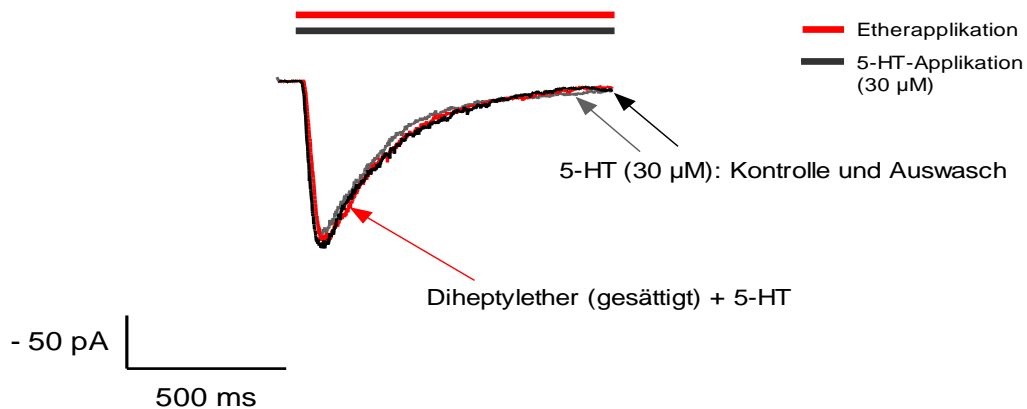


Abb. 30: Eine gesättigte Lösung mit Diheptylether (ca. 1,4 µM) wurde hier im Offenkanalmodus verwendet. Es konnte kein relevanter Effekt nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse mit Diheptylether in der Offenkanalapplikation waren konsistent mit denen der entsprechenden Dihexylether-Experimente: Es fand sich keine signifikante Unterdrückung des 5-HT-induzierten Stromes.

### 5.6.2 Geschlossenkanalapplikation

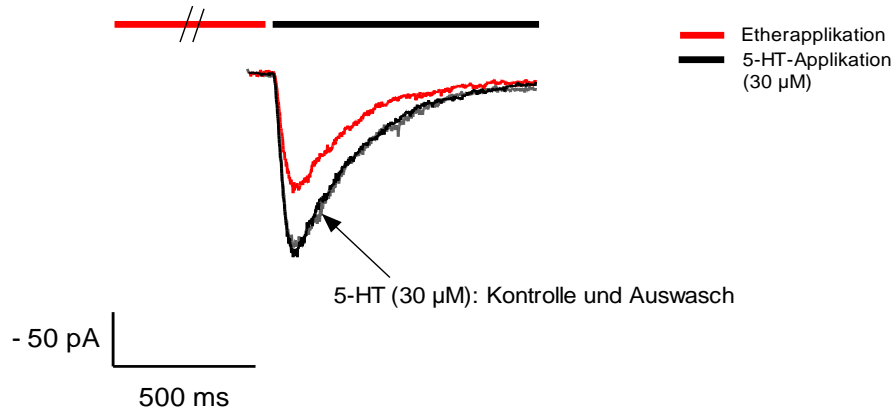


Abb. 31: Eine mit Diheptylether gesättigte Lösung (ca.  $1,4 \mu\text{M}$ ) rief in der Geschlossenkanalvariante zwar eine Hemmung hervor, konnte den 5-HT-induzierten Strom jedoch nicht halbmaximal unterdrücken. Demnach konnte kein  $\text{IC}_{50^+}$  ermittelt werden.

Applizierte man eine gesättigte Lösung an Diheptylether 60 s lang auf den Patch, bevor der 5-HT-Impuls die Kanäle öffnete, konnte man eine durchschnittliche Hemmung von  $36,8 \pm 12,1 \%$  erreichen. Die Kinetik schien allgemein - wie auch in dieser Abbildung - nur wenig beeinflusst zu werden.

### 5.6.3 Äquilibriumapplikation

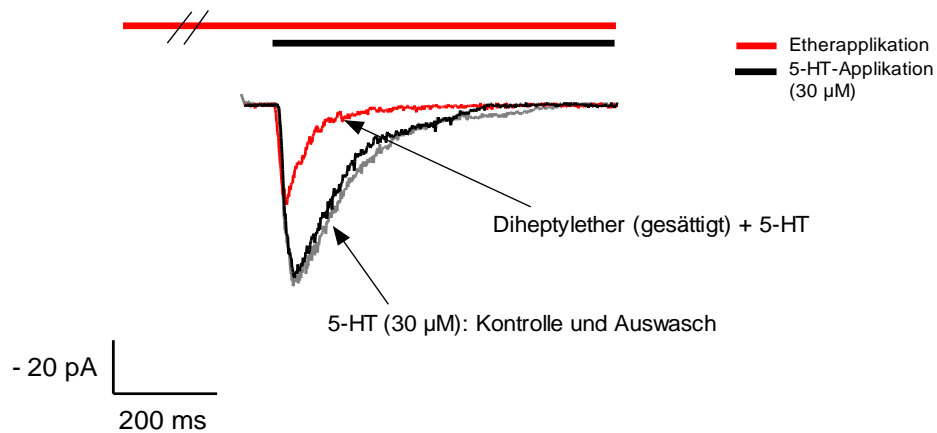


Abb. 32: Es zeigte sich in der Äquilibriumform bezogen auf die Unterdrückung des Peakstroms ein ähnliches Bild wie in der vorherigen Geschlossenkanalapplikation.

Wenn die an Diheptylether gesättigte Lösung sowohl vor als während des 5-HT-Pulses appliziert wurde, flossen durchschnittlich noch  $70,8 \pm 6,2$  % Reststrom. Da die Konzentration an Diheptylether in der wässrigen Lösung nicht steigerbar war, konnte in diesen Experimenten keine halbmaximale Unterdrückung hervorgerufen werden; die Angabe eines  $IC_{50}$  war auch hier nicht möglich.

### 5.6.4 Konzentrations-Wirkungskurve

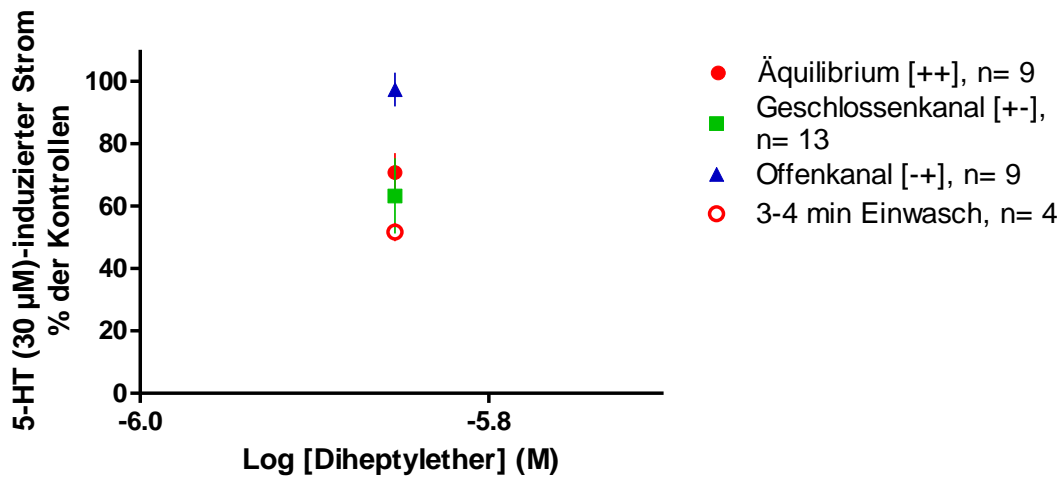


Abb. 33: Die Effekte des Diheptylethers (etwa 1,4 µM in der gesättigten Lösung) in Äquilibrium, Geschlossen- und Offenkanal sowie bei verlängerter Ein- und Auswaschzeit.

Wie die Originalspuren zuvor gezeigt hatten, war es nicht möglich, mit dem üblichen Versuchsablauf einen 5-HT-induzierten Strom durch Zugabe von Diheptylether zu mindestens 50 % zu unterdrücken. Während Diheptylether in der Äquilibrium- und der Geschlossenkanalapplikation durchaus einen relevanten Effekt ausübte, kam es im Offenkanalmodus zu keiner signifikanten Abweichung von den Kontrollen. Da die Einwaschexperimente des C<sub>12</sub>-Ethers bereits verlängerte Einwaschzeitkonstanten gezeigt hatten, schien es hier sinnvoll, zusätzlich Experimente mit einem veränderten Ablauf in Form eines längeren Einwasches durchzuführen, um zu sehen, ob sich die Unterdrückung auf diese Weise erhöhen ließ (Näheres siehe Methoden). Nach 180-240 s Diheptylether-Einwasch ergab sich ein Effekt von  $48,3 \pm 3 \%$ , also beinahe eine halbmaximale Unterdrückung. Die Ergebnisse dieser Versuche unterschieden sich signifikant von den Ergebnissen der regulären Äquilibriumsexperimente (60 s).



### 5.6.5 Kinetiken

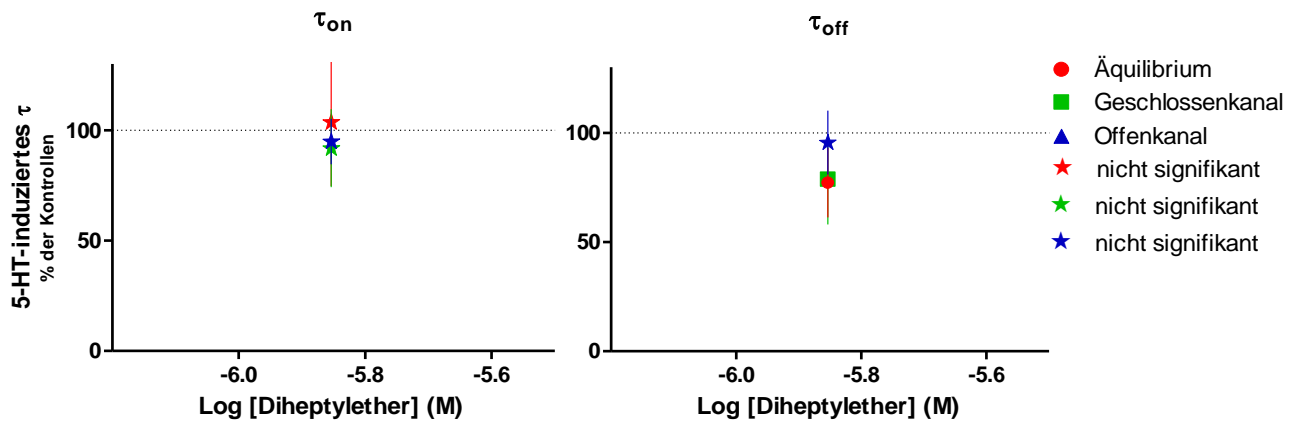


Abb. 34: Die Aktivierungs- und Abfallkinetiken des Diheptylethers ( $n= 4-7$ ). Die Kontrollströme ergaben eine durchschnittliche Aktivierungszeitkonstante von  $8,9 \pm 4,6$  ms ( $\tau_{on}$ ), während die Abfallzeitkonstante  $93 \pm 55,3$  ms ( $\tau_{off}$ ) betrug.

Betrachtet man die Aktivierungskinetik des Diheptylethers, bewegen sich gleichsam alle Punkte im Bereich der Kontrollgröße, das heißt, sie verändern die Geschwindigkeit, mit der die Kanäle aktiviert werden, nicht relevant.

Die Abfallkinetik wurde ebenso wie die Stromamplitude lediglich in der Äquilibrium- und der Geschlossenkanalapplikation signifikant beeinflusst. So kam es zu einer Verringerung der Zeitkonstante auf  $77,2 \pm 15,9$  % (Äquilibrium) bzw.  $78,9 \pm 20,7$  % (Geschlossenkanal).

## 5.7 Konkurrenz

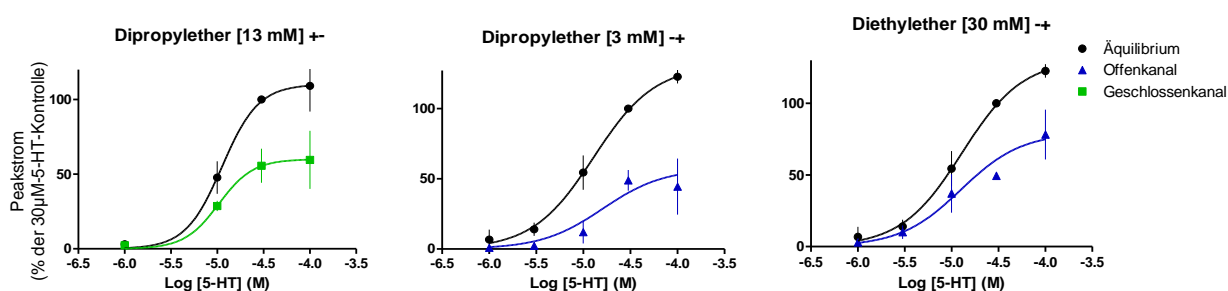


Abb. 35: Konkurrenzexperimente mit 13 mM Dipropylether im Geschlossenkanalmodus und 3 mM Dipropylether sowie 30 mM Diethylether in der Offenkanalapplikation ( $n = 3-12$ ). Die Datenpunkte wurden alle in Bezug zu ihrer entsprechenden 30 μM-Kontrolle (5-HT) gesetzt. Die jeweiligen 95 %-Konfidenzintervalle (in μM) sind in Klammern angegeben: a) Kontrolle:  $EC_{50} = 11,3 \mu\text{M}$  (8,5-15),  $n_H = 2,2$ ; Substanz:  $EC_{50} = 10,4 \mu\text{M}$  (7,3-14,7),  $n_H = 2,3$ . b) Kontrolle:  $EC_{50} = 12,9 \mu\text{M}$  (11,1-14,9),  $n_H = 1,3$ ; Substanz:  $EC_{50} = 16,1 \mu\text{M}$  (9,4-27,2),  $n_H = 1,3$  (festgelegt auf den Kontrollwert); c) Kontrolle: wie zuvor, da Kontrollpunkte der beiden Offenkanalexperimente zum Teil übereinstimmen, da am selben Patch gemessen,  $n_H = 1,3$ ; Substanz:  $EC_{50} = 12,6 \mu\text{M}$  (8,9-17,8),  $n_H = 1,3$  (festgelegt auf den Kontrollwert).

Um die Frage nach einer Konkurrenz zwischen 5-HT und Dialkylethern beantworten zu können, wurden Experimente im Offenkanalmodus mit den  $IC_{50}$ -Konzentrationen des Dipropylethers (3 mM) und des Diethylethers (30 mM) unter Zugabe von fünf verschiedenen 5-HT-Konzentrationen durchgeführt.

Die erste Graphik (Abb. 35 a) stellt gleichsam eine Kontrollkurve dar, denn in der Geschlossenkanalapplikation treffen 5-HT und die Substanz nie gleichzeitig auf die  $5\text{-HT}_{3A}$ -Rezeptoren. Wie erwartet zeigte sich keine Konkurrenz.

Wie verhielten sich die Substanzen, wenn sie tatsächlich gleichzeitig mit Serotonin appliziert werden (Abb. 35 b, c)? Doch auch hier ließ sich keine relevante Verschiebung der Konzentrationswirkungskurve von der Kontrollkurve erkennen. Da es also keinerlei Anhalt für ein ausgeprägtes kompetitives Bindungsverhalten der Dialkylether gab, wurden diese Experimente nicht weiter fortgesetzt.

## 6 Diskussion

Im Folgenden werden die bisher dargestellten Ergebnisse der Dialkylether erweitert bzw. ergänzt, indem Daten des Diethylethers herangezogen werden (bisher unveröffentlichte Daten von Georg Grasmeyer).

### 6.1 Vergleich der Dialkylether untereinander

#### 6.1.1 Wirkung auf die Stromamplitude

Betrachtet man die Konzentrations-Wirkungskurven aller gemessenen Dialkylether, so stellt man fest, dass alle Substanzen in der Lage sind, den durch 30  $\mu\text{M}$  5-HT induzierten Peakstrom zu verringern.

Vergleicht man nun diese inhibierende Wirkung der Dialkylether miteinander, indem man die entsprechenden  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Äquilibriumapplikation betrachtet, wird deutlich, dass die Potenz vom Dipropylether ausgehend bis hin zum Dihexylether zunimmt, also der  $\text{IC}_{50}$  stetig geringer wird. Grob abschätzend kann von einer Abnahme des  $\text{IC}_{50}$  um durchschnittlich eine Zehnerpotenz pro Zunahme der Kettenlänge um zwei Kohlenstoffatome ausgegangen werden (Tab. 1). Der aus 14 Kohlenstoffatomen bestehende Diheptylether setzt dem bisher scheinbar konstant zunehmenden Effekt der homologen Reihe der Dialkylether ein Ende: Die maximal in wässriger Lösung erreichbare Konzentration von 1,4  $\mu\text{M}$  reduziert den Peakstrom nach dem üblichen 60 s-Einwasch lediglich um  $29,2 \pm 6,2$  % der Kontrolle. Laut Vorhersage durch den Trend der zuvor betrachteten Ether müsste eine Konzentration von etwa 0,1-0,3  $\mu\text{M}$  bereits eine halbmaximale Unterdrückung hervorrufen. Ist an dieser Stelle also der sogenannte Cutoff, der plötzliche Potenzverlust trotz steigender Kettenlänge, erreicht? Eine vergleichende Untersuchung der Einwaschzeitkonstanten wird dies zu einem späteren Zeitpunkt näher beleuchten (Kapitel 6.4).

<b>Ether</b>	<b>IC<sub>50</sub><sup>++</sup></b> <b>(M)</b>	<b>n<sub>H</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub><sup>+</sup></b> <b>(M)</b>	<b>n<sub>H</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub><sup>-</sup></b> <b>(M)</b>	<b>n<sub>H</sub></b>
<b>Diethylether</b>	<b>3.0</b> (1.9-3.5) * 10 <sup>-2</sup>	<b>-1.8</b> (± 1.2)	<b>3.5</b> (2.9-3.9) * 10 <sup>-2</sup>	<b>-1.8</b> (± 0.5)	<b>2.0</b> (1.2-2.8) * 10 <sup>-3</sup>	<b>-1.0</b> (±0.4)
<b>Dipropylether</b>	<b>1.6</b> (1.3-2.0) * 10 <sup>-3</sup>	<b>-1.4</b> (± 0.45)	<b>2.6</b> (1.8-3.5) * 10 <sup>-3</sup>	<b>-1.1</b> (± 0.5)	<b>1.3</b> (0.6-2.6) * 10 <sup>-2</sup>	<b>-0,8</b> (±0.4)
<b>Dibutylether</b>	<b>2.4</b> (1.4-3.8) * 10 <sup>-4</sup>	<b>-1.0</b> (± 0.65)	<b>8.9</b> (3.1-25.5) * 10 <sup>-4</sup>	<b>-0.4</b> (± 0.4)	<b>3.4</b> (1.8-6.1) * 10 <sup>-4</sup>	<b>-0,5</b> (±0.4)
<b>Dipentylether</b>	<b>1.4</b> (1.1-1.9) * 10 <sup>-5</sup>	<b>-0.8</b> (± 0.25)	---	---	<b>1.6</b> (1.3-2.0) * 10 <sup>-5</sup>	<b>-1.0</b> (±0.2)
<b>Dihexylether</b>	<b>2.9</b> (2.3-3.5) * 10 <sup>-6</sup>	<b>-1.0</b> (± 0.3)	---	---	<b>2.3</b> (1.9-2.8) * 10 <sup>-6</sup>	<b>-1.2</b> (±0.4)
<b>Diheptylether</b>	<b>(&gt; 1.4 * 10<sup>-6</sup>)</b>	---	---	---	<b>(&gt; 1.4 * 10<sup>-6</sup>)</b>	---

Tab. 1: Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte und ihrer 95 %-Konfidenzintervalle sowie der entsprechenden Hill-Koeffizienten (n<sub>H</sub>) der drei Applikationsmodi Äquilibrium, Offenkanal, Geschlossenkanal. Wenn keine Werte angegeben wurden (---), war es in dieser Applikation nicht möglich, eine Unterdrückung des 5-HT-induzierten Stromes von 50 % zu erreichen. Der für Diheptylether in Klammern angegebene Wert repräsentiert die höchste in wässriger Lösung erreichbare Konzentration.

Interessant scheint ferner der Vergleich der drei Applikationsvarianten untereinander sowie deren Bedeutung und Entwicklung im Verlauf der homologen Reihe. Konstant stark ist der Effekt in der Äquilibriumapplikation (siehe Konzentrations-Wirkungskurven). Dies scheint verständlich, wird doch in diesem Modus die Substanz sowohl vor als auch während des 5-HT-Pulses auf den Patch appliziert. Eine Aufspaltung dieser Applikationsform ergibt demnach auf der einen Seite die Geschlossenkanalapplikation mit 60 s Substanz-Einwasch vor dem Serotonin-Puls und auf der anderen Seite die Offenkanalapplikation mit einer gleichzeitigen Ether- und 5-HT-Gabe, was eine nur etwa 20 ms dauernde Umspülung des Patches mit Substanz bedeutet. Das lässt die Vermutung zu, dass sich die Effekte der Offenkanal- und Geschlossenkanalapplikation zum Gesamteffekt des Äquilibriums addieren lassen (vergleiche dazu die Konzentrations-Wirkungskurven).

Es bleibt die Frage zu klären, welche Applikationsform die wirkungsvollere ist und den größeren Anteil am Gesamteffekt (Äquilibrium) zeigt: der längere Einwasch auf den geschlossenen Kanal oder der kurze Puls während der Öffnung der Kanäle? Dies ist nicht etwa für alle gemessenen Dialkylether gleich; vielmehr zeigt sich eine kontinuierliche Entwicklung vom Dipropyl- bis hin zum Diheptylether. So dominiert beim Dipropylether neben dem Äquilibrium mit einem  $IC_{50}$  mit 1,6 mM noch die Offenkanalapplikation mit einem  $IC_{50}$  von 2,6 mM. Für die Geschlossenkanalapplikation lässt sich hingegen ein  $IC_{50}$  von 13 mM ermitteln (Tab. 1). Diese Verteilung der Anteile am Gesamteffekt deckt sich mit den Beobachtungen beim Diethylether.

Mit steigender Kettenlänge nimmt die Wirkung der Offenkanalapplikation jedoch ab; so wird beim Übergang zum C<sub>8</sub>-Ether erstmals die Geschlossenkanalvariante ebenso effektiv (Tab. 1). Die Ergebnisse der Dipentylether-Messungen zeigen tatsächlich eine wirkungsvollere Inhibierung in der Geschlossenkanalapplikation. Der Dihexylether-Effekt scheint schließlich in der Geschlossenkanalapplikation bereits vollständig zu sein: Die Geschlossenkanal- und die Äquilibriumsapplikation unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, während der Offenkanalmodus unterhalb der gesättigten Lösung keine signifikante Wirkung mehr erzielt (Abb. 27). Das gleiche Bild bietet der Diheptylether.

Was ist jedoch die Ursache für die unterschiedliche Effektivität der Applikationsformen? Möglicherweise bewirkt die Konformationsänderung des Rezeptors während der Öffnung eine Veränderung der Bindungsstelle, so dass die kurzkettigen Ether besonders gut binden und wirken können, während die längerkettigen Ether eine höhere Affinität zum geschlossenen Kanal haben. Vorstellbar sind auch unterschiedliche Substanzkinetiken, die abhängig von der Dauer der Applikation sind. Die Frage kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend beantwortet werden.

### 6.1.2 Wirkung auf die Stromkinetiken

Dialkylether verringern nicht nur wirksam die Amplitude der 5-HT-induzierten Ströme, sie können auch auf die Aktivierungs- und Abfallkinetiken Einfluss nehmen und somit den Zeitpunkt der maximalen Stromamplitude bzw. das Eintreten des Stromabfalls verändern. Die durch 30  $\mu\text{M}$  5-HT induzierten Kontrollströme ergaben Zeitkonstanten für die Aktivierung und die Desensitivierung, die im für den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor und diese Konzentration üblichen Bereich lagen (Walkembach et al., 2005):  $8,4 \pm 6,3$  ms für das  $\tau_{\text{on}}$  und  $92,5 \pm 71,8$  ms für das  $\tau_{\text{off}}$ , überprüft in 102 Experimenten und 49 verschiedenen Patches. Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass die Analyse der Zeitkonstanten abhängig von der Kinetik des Patches und Größe der Stromamplitude Schwierigkeiten bereiten kann. So war es etwa aufgrund der starken Unterdrückung und des zum Teil sehr geringen Reststromes nicht möglich, die Kinetik des Stromes in der Äquilibriumapplikation von 10 mM Dipropylether adäquat zu erfassen.

Um einen Vergleich der Zeitkonstanten der drei Modi und der verschiedenen Substanzen zu ermöglichen, wurden in der folgenden Abbildung für jeden Dialkylether die Mittelwerte der Zeitkonstanten bei der Stoffkonzentration, die dem IC<sub>50</sub> jeweils am nächsten liegt, für alle drei Applikationsformen aufgetragen.

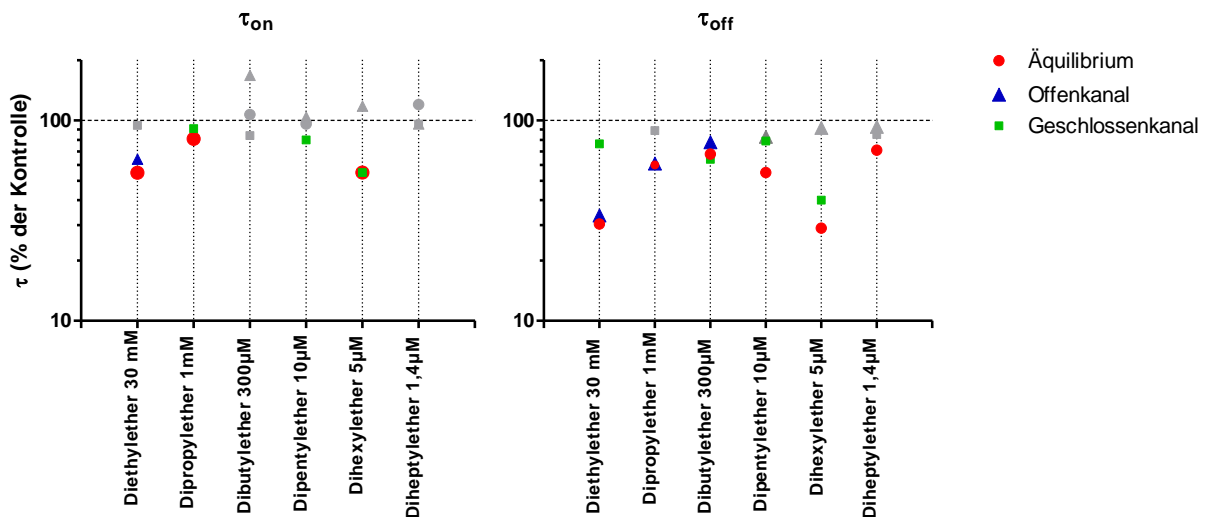


Abb. 36: Übersicht der Aktivierungs- und Abfallkinetiken ( $\tau_{\text{on}}$ ,  $\tau_{\text{off}}$ ) aller gemessenen Substanzen. Abgebildet sind für jede Substanz und jede Applikationsart die Mittelwerte der Zeitkonstanten einer bestimmten Stoffkonzentration (in % der Kontrolle). Gewählt wurde für jede Substanz die Konzentration, die dem jeweiligen IC<sub>50</sub> der Äquilibriumapplikation am nächsten lag. Die Ordinate

*weist dabei eine logarithmische Teilung auf. Die nicht signifikant von der Kontrolle abweichenden Werte wurden in Grautönen dargestellt, die signifikant von der Kontrolle verschiedenen Zeitkonstanten hingegen sind farbig gehalten.*

Es wird deutlich, dass in den meisten Fällen die Aktivierung im Vergleich zum Kontrollstrom nicht signifikant verändert wird. Eine signifikante Beschleunigung des initialen Stromflusses weisen Diethyl-, Dipropyl- und Dihexylether in der Äquilibriumapplikation und Dipropyl-, Dipentyl- und Dihexylether in der Geschlossenkanalvariante auf. In der Offenkanalapplikation erreicht der Strom lediglich beim Diethylether-Experiment den Peak früher als der entsprechende Kontrollstrom. Dibutyl- und Diheptylether beschleunigen in keiner der drei Applikationen die Aktivierungskinetik der 5-HT-induzierten Ströme.

Die Abfallkinetik wird insgesamt deutlich häufiger signifikant beschleunigt als die Aktivierung (Abb. 36). Diethyl- und Dibutylether zeigen in allen Applikationsmodi eine signifikante Beschleunigung des Stromabfalls, während Diheptylether in der Offen- und Geschlossenkanalapplikation erneut keine Veränderung der Kinetik bewirkt.

Aus dieser Zusammenschau der Kinetiken und ihrer Veränderungen lässt sich demnach erstens feststellen, dass es zu keiner signifikanten Verlangsamung der Kinetik kam und zweitens, dass kein eindeutiger Trend zwischen Einfluss auf die Kinetik und Kettenlänge des Ethers besteht. Eine Verlangsamung des Stromabfalls kann als Potenzierung des 5-HT-induzierten Stromes gedeutet werden; dies wurde etwa bei Phenolderivaten gesehen und erfordert demnach möglicherweise eine stärkere polare Gruppe als die des Ether-Sauerstoffs (Barann et al., 2008).

### **6.1.3 Einwaschzeitkonstanten**

Die Einwaschexperimente sollten Auskunft über die Wirkkinetiken der Substanzen geben und gegebenenfalls sich überlagernde Effekte demaskieren. In allen Einwaschkurven ließen sich mindestens zwei Phasen erkennen, so dass ausnahmslos mit einer biexponentiellen Gleichung gefittet werden konnte. Jeder der fünf Dialkylether zeigte einen vergleichsweise schnellen und einen langsamen Effekt. Die erste Phase war stets eine Inhibierung des Kontrollstromes, die zweite Phase hingegen ließ beim Dipropylether eine Erholung des Peakstromes erahnen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der initialen schnellen In-

hibierung beim Dipropylether möglicherweise eine Phase der Potenzierung folgt, die durch eine anhaltende Unterdrückung jedoch nur zu einer partiellen Erholung des Stromes führt. Für alle anderen gemessenen Substanzen konnte dieses Phänomen nicht nachgewiesen werden. Ob diese minimale Potenzierung bei den anderen Dialkylethern nicht vorhanden ist oder ob sie lediglich durch stärkere inhibierende Effekte maskiert wird, ließ sich nicht eruieren. Zudem war es aufgrund der geringen Größe des Effektes und der Variabilität nicht möglich, die mögliche Potenzierung hier statistisch nachzuweisen. Auf diesen möglichen langsamen potenzierenden Effekt des Dipropylethers wird später im Verlauf der Diskussion erneut eingegangen werden, wenn es zum Vergleich mit n-Alkanolen kommt.



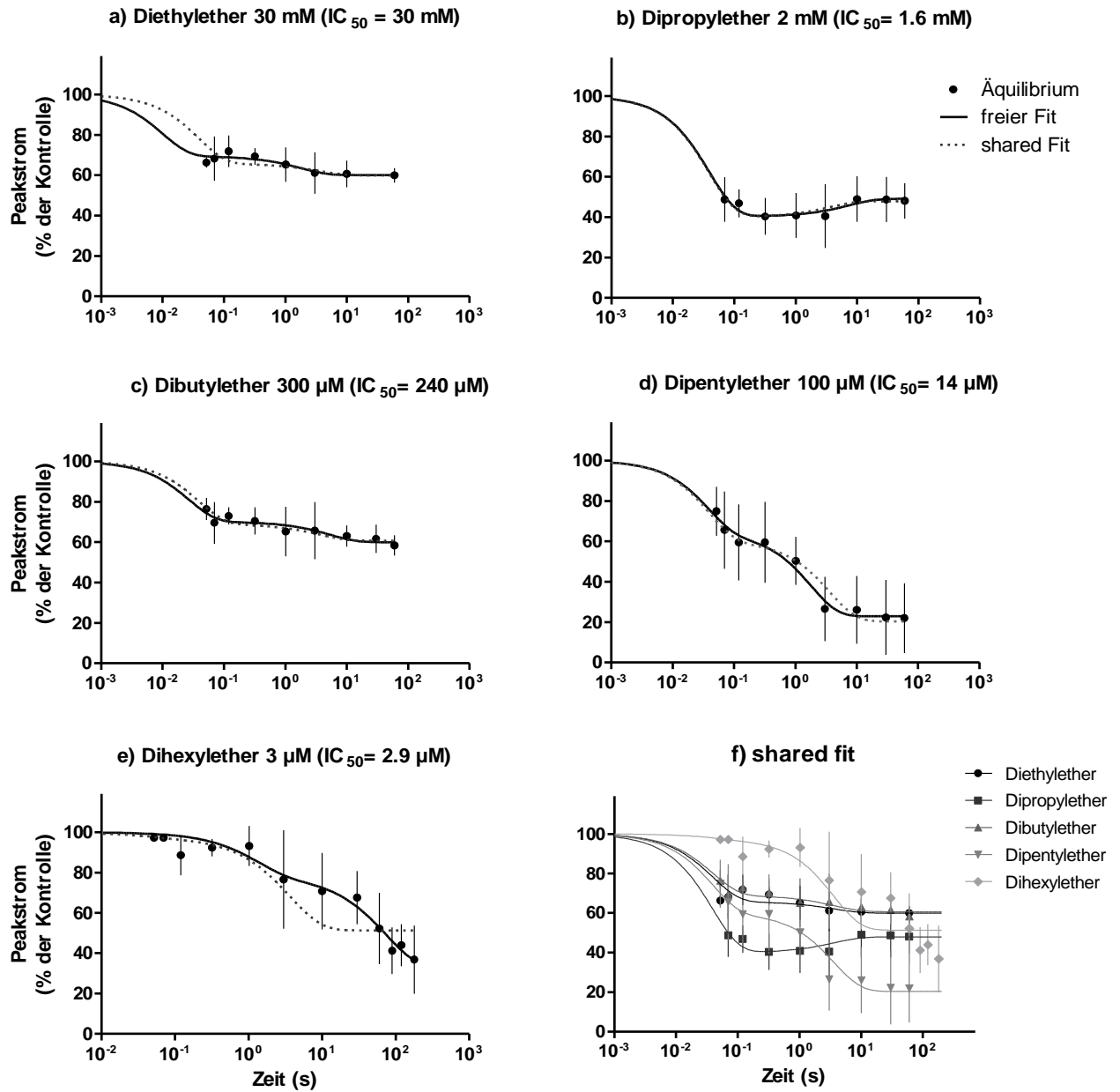


Abb. 37: Einwasch der Dialkylether im Vergleich. Für jede Einwaschkurve gilt  $n = 9-15$  Patche. In der letzten Graphik wurden alle Substanzen gleichzeitig gefittet. Dabei waren  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  für alle Dialkylether identisch. Die daraus entstandenen „shared fits“ wurden neben den freien Fits (durchgezogene Linie) für jede Substanz als gestrichelte Linie dargestellt. Hervorzuheben ist an dieser Stelle die in beiden Fit-Methoden resultierende Potenzierung des Dipropylethers.

Für jeden der Dialkylether unterhalb des Dihexylethers war die Zeitkonstante der schnellen Inhibierung schneller als der erste messbare Punkt und unter Berücksichtigung einer

gewissen Variabilität musste man feststellen, dass sich diese vier  $\tau_{\text{fast}}$ -Werte nicht allzu sehr unterschieden (Tab. 2). Die Zeitkonstanten der zweiten Phase ( $\tau_{\text{slow}}$ ) waren zwischen Diethyl- und Dipentylether ebenfalls ähnlich; lediglich der Dihexylether wich erneut deutlich ab (Abb. 37 e, Tab. 2).

Die Bestimmung der Einwaschzeitkonstanten für den Diheptylether erwies sich als experimentell äußerst schwierig, musste die Einwaschzeit doch über eine Minute ausgedehnt werden, um überhaupt ansatzweise eine halbmaximale Hemmung erreichen zu können (Abb. 33). Durch die limitierte Patch-Lebensdauer wurde die Messung genügend langer Einwaschzeiten sehr erschwert. Eine verlängerte Messung bedeutete zudem auch immer einen relativ vermehrten Kanalverlust während des Experiments. Es konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass Diheptylether den sogenannten Rundown beschleunigt, also etwa einen irreversiblen Effekt auf die Membran ausübt ( $\tau_{\text{rundown}} = 11,6 \pm 4,9$  min, n= 4 Patche, verglichen mit  $9,1 \pm 3,8$  min, n= 6 Patche für die Kontrolle; jeder dieser Patche hatte eine Lebensdauer von mindestens drei Rundown-Zeitkonstanten).

Dialkylether	[ $\mu\text{M}$ ]	$\tau_{\text{fast}}$ (ms)	$F_{\text{fast}}$ (%)	$\tau_{\text{slow}}$ (s)	$F_{\text{slow}}$ (%)	Plateau (%)	$R^2$
Diethylether	30 000	<b>~10</b> -	<b>76</b> (57-96)	<b>1.8</b> (0.5- $\infty$ )	<b>24</b>	<b>60.1</b> (53.2-66.9)	0.22
Dipropylether	2 000	<b>40</b> (25-98)	<b>118</b> (100-139)	<b>7.4</b> (1.7- $\infty$ )	<b>-18</b>	<b>49.1</b> (40.7-57.5)	0.10
Dibutylether	300	<b>27</b> (13- $\infty$ )	<b>75</b> (59-91)	<b>5.3</b> (1.6- $\infty$ )	<b>25</b>	<b>60.0</b> (55.0-65.3)	0.28
Dipentylether	100	<b>38</b> (17- $\infty$ )	<b>47</b> (28-65)	<b>1.8</b> (0.9-31)	<b>53</b>	<b>22.9</b> (15.8-30.0)	0.60
Dihexylether	3	<b>1323</b> (517- $\infty$ )	<b>32</b> (15-50)	<b>73</b> (33- $\infty$ )	<b>68</b>	<b>32.5</b> (10.8-54.3)	0.97

Tab. 2: Parameter des biexponentiellen Fits der Dialkylether. Im sogenannten freien Fit durften alle Parameter frei variieren. Gezeigt werden hier zudem die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle und  $R^2$ -Werte. Der Anteil des langsamen Effektes des Dipropylethers ist negativ, da es sich hierbei – verglichen mit der Stromunterdrückung der ersten Phase – um einen relativen Rückgang der Hemmung handelt.

Um herauszufinden, ob tatsächlich keine Abhängigkeit der Zeitkonstanten von der Kettenlänge besteht, wurden alle Dialkylether erneut, diesmal aber gemeinsam gefittet. Im sogenannten „shared fit“ werden für alle Kurven gemeinsam zwei Zeitkonstanten ( $\tau_{\text{fast}}$  und  $\tau_{\text{slow}}$ ) ermittelt; die Parameter „Plateau“ und „Anteil schneller Effekt“ ( $F_{\text{fast}}$ ) variieren frei (Abb. 37 f, Tab. 3). Obwohl jetzt also lediglich zwei Parameter völlig frei variierten und die Zeitkonstanten für alle Dialkylether die gleichen waren, unterschieden sich diese „shared fits“ mit Ausnahme des Dihexylethers kaum von den freien Fits (Abb. 37 a-e). Bis auf den C<sub>12</sub>-Ether lagen die Zeitkonstanten des freien Fits in oder nahe am 95 %-Konfidenzintervall der entsprechenden Zeitkonstante der „shared fits“. Dies bestätigt die Hypothese, dass die Zeitkonstanten bis dahin nicht kettenlängenabhängig sind.

Die beiden Zeitkonstanten ( $\tau_{\text{fast}}$  und  $\tau_{\text{slow}}$ , shared fit) sind zudem etwa um den Faktor 100 verschieden, was das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Zeitkonstanten erneut bestätigt.

Dialkylether	$\tau_{\text{fast}}$ (ms)	$F_{\text{fast}}$ (%)	$\tau_{\text{slow}}$ (s)	$F_{\text{slow}}$ (%)	Plateau (%)	R <sup>2</sup>
Diethylether	39 (28-67)	86 (52-120)	3.6 (2.4-7.7)	14	59.9 (49.4-70.7)	0.02
Dipropylether		115 (93-138)		-15	47.9 (41.1-54.6)	0.09
Dibutylether		79 (56-102)		21	60.7 (54.0-67.4)	0.26
Dipentylether		50 (41-59)		50	20.3 (14.4-26.2)	0.59
Dihexylether		5 (0-22)		95	51.3 (46.2-56.5)	0.64

Tab. 3: Parameter der „shared fits“ für die Einwaschexperimente der Dialkylether. Während alle Substanzen die schnelle und die langsame Zeitkonstante teilen, variierten  $F_{\text{fast}}$  und das Plateau völlig frei. Dihexylether konnte auf diese Weise nicht adäquat gefittet werden (vgl. Abb. 37 e). Beachte, dass die 95 %-Konfidenzintervalle für die Zeitkonstanten nun – verglichen mit den freien Fits – deutlich eingeschränkter waren (Tab. 2):  $\tau_{\text{fast}}$  ( $\tau_{\text{slow}}$ ) variierte demnach zwischen den verschiedenen Dialkylethern um weniger als den Faktor drei (vier).

## 6.2 Absolute Potenz und freie Energien

Die inhibierende Potenz der Dialkylether bis zum Diheptylether nahm stetig zu, was die mit steigender Kettenlänge sinkenden  $IC_{50}$ -Werte belegen (Tab. 1). Jede zusätzliche Methylengruppe führte etwa zu einer Zunahme der Potenz um den Faktor 3,6 (Diethylether bis Dipentylether, Tab. 1). Die sogenannte (*relative*) Enthalpie,  $\Delta\mu^{\theta,CH_2}$ , spiegelt den Transfer einer Methylengruppe aus der wässrigen Phase zum Wirkort wider und kann als Steigung einer linearen Regression des Mol-Anteils des Dialkylethers, aufgetragen gegen die Anzahl der Kohlenstoffatome, aufgefasst werden (siehe Methoden). Diese relative, weil auf die wässrige Phase bezogene, Enthalpie beträgt -2,88 kJ/mol (Abb. 38 b).

Wird jetzt der Transfer der Methylengruppe nicht von der wässrigen Phase, sondern von der Gasphase aus angenommen, kann eine *absolute* Enthalpie berechnet werden. Sie repräsentiert lediglich die Interaktion der Methylengruppe mit dem Wirkort, da bei solch geringen Stoffkonzentrationen davon ausgegangen werden kann, dass die Dialkylether in der Gasphase keine Wechselwirkungen untereinander ausbilden. Wenn also der Mol-Anteil der jeweiligen Dialkylether in der Gasphase gegen die entsprechende Anzahl der Kohlenstoffatome aufgetragen wird, erbringt die Steigung einen Enthalpiegewinn von -2,09 kJ/mol pro zusätzlicher Methylgruppe (Abb. 38 a).

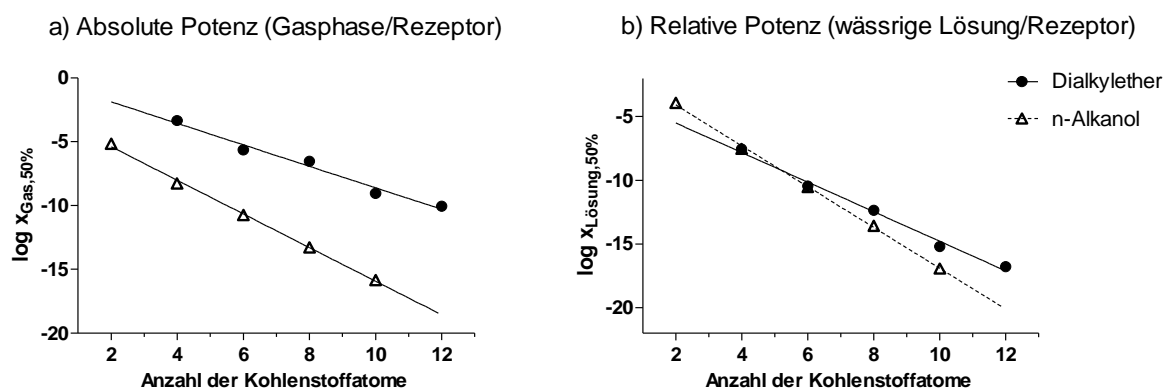


Abb. 38: Die Kettenlängenabhängigkeit der für eine 50 %-Hemmung erforderlichen Konzentration der Dialkylether. Die Konzentrationen sind als Mol-Anteile sowohl in der Gasphase (a) als auch in der wässrigen Phase (b) gegen die Anzahl der Kohlenstoffatome aufgetragen. Die resultierenden Steigungen ergaben einen Enthalpiegewinn von -2,09 kJ/mol aus der Gasphase heraus (absolute freie Energie) und -2,88 kJ/mol aus der wässrigen Lösung heraus (relative freie Energie). Die Daten der

*n*-Alkanole aus einer vorausgegangenen Publikation (Decker, 2011) ergaben entsprechend: -3,27 kJ/mol (absolut) und -3,97 kJ/mol (relativ).

Während der IC<sub>50</sub> *relative* Potenz angibt (auf die wässrige Lösung bezogen), reflektiert der Kehrwert des Partialdruckes P<sub>50</sub> vielmehr *absolute* Potenz (ohne Wechselwirkungen im/mit dem Applikationsmedium). Er kann mithilfe der IC<sub>50</sub>-Werte und der Wasser/Gas-Partitionskoeffizienten aus Tab. 4 berechnet werden.

Dialkylether	P <sub>50</sub> <sup>++</sup> (atm)	$\Delta\mu^{\theta,\text{drug}} - \Delta\mu^{\theta,\text{methane}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	Wasser/Gas Partitions- koeffizient	Wässrige Löslichkeit <sup>1</sup> (M)
Diethylether	3.7*10 <sup>-2</sup>	-18.02	19.9	81.5*10 <sup>-2</sup>
Dipropylether	3.5*10 <sup>-3</sup>	-22.22	11.1	48.0*10 <sup>-3</sup>
Dibutylether	1.4*10 <sup>-3</sup>	-26.42	4.08	23.0*10 <sup>-4</sup>
Dipentylether	1.2*10 <sup>-4</sup>	-30.61	2.94	17.1*10 <sup>-5</sup>
Dihexylether	4.3*10 <sup>-5</sup>	-34.20	1.66	15.4*10 <sup>-6</sup>
Diheptylether			0.95	1.4*10 <sup>-6</sup>

Tab. 4: Absolute Potenz P<sub>50</sub> und Enthalpien. Aus den IC<sub>50</sub>-Werten aus Tabelle 1 und den Wasser/Gas-Partitionskoeffizienten (errechnet durch Zuhilfenahme der Henry-Koeffizienten<sup>1</sup>) konnten die P<sub>50</sub>-Werte berechnet werden. Die mit steigender Kettenlänge zunehmenden Enthalpien bzw. Enthalphiedifferenzen beziehen sich jeweils auf Methan und wurden mithilfe der P<sub>50</sub>-Werte ermittelt.

Wie bei den *n*-Alkanolen auch (Decker, 2011) stammt also der Hauptanteil des Energiegewinns pro zusätzlicher Methylengruppe aus der Interaktion des Methylens mit dem Wirkort (-2,09 kJ/mol) und nicht aus der Energie, die bei Verlassen der wässrigen Phase frei wird (-0,79 kJ/mol). Das wiederum bekräftigt die Annahme, dass Van-der-Waals-Kräfte bei

---

<sup>1</sup> SRC PhysProp Database: <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>. Letzter Zugriff: 18.02.2011.

der Wirkung der Dialkylether eine größere Rolle spielen als hydrophobe Kräfte. Die Tatsache, dass der Wasser/Gas-Partitionskoeffizient verhältnismäßig deutlich weniger kettenlängenabhängig abnimmt als die  $IC_{50}$ -Werte, hatte dies zudem bereits vermuten lassen (Tab. 4).

Vergleicht man nun die Steigung der Regressionen und die daraus folgenden Enthalpiewerte der Dialkylether konkret mit denen der n-Alkanole, so stellt man fest, dass der Energiegewinn pro Methylengruppe bei den Ethern deutlich geringer ist. Während die Differenz der absoluten Potenzen zwischen Diethylether und n-Butanol noch -11 kJ/mol beträgt, berechnet man für die Differenz zwischen Dihexylether und n-Dodecanol -15 kJ/mol (Tab. 4; Decker, 2011). Das mag auf den ersten Blick darauf schließen lassen, dass die Methylengruppen des Dialkylethers weniger stark mit dem Wirkort interagieren. Andererseits könnte sich aber auch bei steigender Kettenlänge der Anteil der polaren Gruppe an der Wirkung verändern. Dies scheint insbesondere für den Ether-Sauerstoff wahrscheinlich, wird er doch in der Mitte des Moleküls durch die wachsenden Seitenketten immer mehr behindert bzw. „abgeschirmt“ und erreicht somit möglicherweise sein Ziel nur noch unzureichend. Die endständige Hydroxylgruppe der n-Alkanole hingegen bleibt stets relativ frei zugänglich.

### **6.3 Cutoff**

Die folgenden Beobachtungen des Cutoff-Verhaltens der Dialkylether decken sich weitgehend mit den Ergebnissen der entsprechenden n-Alkanole (Decker, 2011).

Um auszuschließen, dass der Cutoff lediglich dadurch zustande kommt, dass langkettige Substanzen ihren Wirkort nicht mehr erreichen, wurden die verschiedenen Einwaschzeitkonstanten der Dialkylether untereinander verglichen (Tab. 2). Einschließlich Dipentylether variierten sie - wie bereits erwähnt - kaum. Dies scheint zu bestätigen, dass die Zeitkonstanten nicht das Füllen lipophiler Reservoirs (eine Lipophilie- und somit sicher kettenlängenabhängige Aktion) widerspiegeln (Decker, 2011).

Der allgemeine Trend im Fortschreiten von kurz- zu langkettigen Dialkylethern war der schwindende Anteil der schnellen Inhibierung (etwa 40 ms, Tab. 3), so dass schließlich für

Dihexylether keine schnelle Komponente mehr nachweisbar war (Tab. 2, 3). Auch die langsame Inhibierung (etwa 4000 ms, Tab. 3) war nach Dihexylether nicht mehr vorhanden; der Einwasch für Diheptylether etwa musste mindestens drei Minuten andauern, ehe eine nahezu halbmaximale Hemmung erzielt werden konnte. Diese Beobachtungen konnten bereits für n-Tetradecanol, ebenfalls ein Molekül mit 14 Kohlenstoffatomen, gemacht werden (Decker, 2011). Die Existenz einer *sehr* langsamen Zeitkonstante (zusätzlich zur langsamen Zeitkonstante) wird auch dadurch angedeutet, dass Dihexylether nicht optimal durch den „shared fit“ erfasst wird, da hier die Zeitkonstanten bereits deutlich langsamer werden.

Wie für die n-Alkanole auch mag es also zwei Cutoff-Punkte – für die langsame und die schnelle Inhibierung – geben. Für einen weiteren Cutoff-Punkt einer potenzierenden Wirkung gibt es bei den Dialkylethern im Gegensatz zu den n-Alkanolen nicht genügend Anhaltspunkte (siehe auch Kapitel 6.4).

#### **6.4 Zusammenfassender Vergleich mit n-Alkanolen**

Dialkylether und n-Alkanole haben gemeinsam, dass ihr überwiegender Effekt Strominhibierung ist und zwei etwa um den Faktor 100 verschiedene Zeitkonstanten abgegrenzt werden können (39 ms und 3,6 s für Dialkylether; 24 ms und 1,7 s für n-Alkanole, Decker, 2011).

Würden die Zeitkonstanten die Bindung der Substanzen an den Rezeptor widerspiegeln, wären sie annähernd proportional zu ihrer gemessenen Konzentration (Decker, 2011, Demazumder und Dilger, 2001), müssten sich also zwischen Diethyl- und Dihexylether etwa um einen Faktor von etwa 10 000 unterscheiden. Da dies wie bei den n-Alkanolen (Decker, 2011) hier nicht der Fall ist, scheinen die Zeitkonstanten vielmehr Ausdruck von Konformationsänderungen des Rezeptors zu sein. Innerhalb der Reihe der Dialkylether scheint diese Beeinflussung der Konformationsänderungen (Ruhezustand, aktivierbar – offen – desensibilisiert) ähnlich zu sein, im direkten Vergleich mit den n-Alkanolen jedoch etwa zweimal langsamer (Decker, 2011).

Dialkylether interagieren weniger stark mit dem 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor als n-Alkanole (absolute Potenzen, etwa -15 kJ/mol Unterschied im Vergleich von Dihexylether und n-Dodecanol, Abb. 38 a, Tab. 4); ihre relativen Potenzen aus der wässrigen Phase heraus sind jedoch sehr ähnlich (Abb. 38 b). Dies deutet darauf hin, dass Dialkylether zwar weniger potent bindet, beim Verlassen der wässrigen Umgebung jedoch weniger Energie benötigt als n-Alkanole.

Die stärkere Bindung der n-Alkanole an den Rezeptor mag auch der Grund sein für die insgesamt deutlichere Beschleunigung der Aktivierungs- und Abfallkinetik durch die n-Alkanole (Decker, 2011).

Die Potenzierung, die bei den n-Alkanolen zwar nachweisbar, jedoch geringer ausgeprägt ist als bei Phenolderivaten (Barann et al., 2008; Decker, 2011), war bei der homologen Reihe der Dialkylether weder durch Verlangsamung der Abfallkinetik noch als Amplitudenerhöhung in Experimenten mit geringen 5-HT-Konzentrationen (Abb. 35) zu sehen. Lediglich der Einwasch des Dipropylethers ließ eine minimale Potenzierung neben einer dominierenden Inhibierung erahnen. Es wird demnach immer wahrscheinlicher, dass die potenzierende Wirkung direkt mit der Existenz einer starken (Phenole) oder schwächeren (n-Alkanole) Hydroxylgruppe korreliert (Decker, 2011).

Der MAC-Wert für Diethylether ist mit 1,9 % nahe an dem für 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren ermittelten P<sub>50</sub> (3,7 %, Tabelle 4). Klinische Effekte durch Ethanol wurden bereits bei Konzentrationen, die zehnfach unterhalb des IC<sub>50</sub> für 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren lagen, beobachtet. Zeichen einer moderaten Intoxikation werden bei Menschen ab einem Blutspiegel von 50 mM (2,3 ‰) Ethanol sichtbar, ein der Narkose ähnlicher Zustand tritt ab 100 mM auf (Mullin und Hunt, 1987). Möglicherweise war Diethylether also als Anästhetikum besser geeignet, weil n-Alkanole mit einigen ihrer Wirkorte zu stark interagieren und so mit größerer Wahrscheinlichkeit unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen.



## 7 Zusammenfassung

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik und eines schnellen Lösungsaustauschsystems wurde in dieser Arbeit - als Teil einer Untersuchung molekularer Wirkungsmechanismen von Anästhetika bzw. strukturverwandten Substanzen an einem Liganden-gesteuerten Ionenkanal - die Wirkweise der homologen Reihe der Dialkylether an 5-HT<sub>3A</sub>- Rezeptoren untersucht.

Die Effekte der Dialkylether (Diethyl- bis Diheptylether) auf den Strom des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors waren ebenso vielfältig wie die der n-Alkanole - wenn auch in einigen Fällen weniger stark ausgeprägt. Die Beeinflussung verschiedener Stromparameter führte letztlich zu einer Inhibierung des 5-HT-induzierten Stromes durch Dialkylether. So wurde sowohl das Amplitudenmaximum relevant verringert als auch die Stromkinetik beschleunigt. Wie bereits für die n-Alkanole beobachtet, konnten während der Einwaschexperimente zwei unterschiedliche Phasen der Wirkung - eine schnelle und eine langsame - abgegrenzt werden. Insgesamt ließ sich zunächst mit steigender Kettenlänge (und zunehmender Lipophilie) eine zunehmende Potenz im Sinne sinkender IC<sub>50</sub>-Werte beobachten; es zeigten sich jedoch schließlich zwei Cutoff-Punkte: So verschwand bei Dihexylether die schnelle und bei Diheptylether auch die langsame Inhibierung. Die Analyse der zwei Zeitkonstanten ließ zudem vermuten, dass letztere insbesondere durch Konformationsänderungen des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors und weniger durch Bindungsreaktionen bestimmt wurden.

Die angenommene, statistisch jedoch nicht mehr nachweisbare Potenzierung durch Di-propylether bekräftigte die zuvor angenommene positive Korrelation zwischen der Anwesenheit bzw. Stärke einer Hydroxylgruppe und dem Ausmaß der Potenzierung, das die entsprechende Substanz hervorruft.

Es konnte ferner bestätigt werden, dass die mit steigender Kettenlänge wachsende Potenz der Dialkylether hauptsächlich aus Interaktionen der Methylengruppen mit dem Wirkort und nur zu einem geringeren Teil aus der Energie, die beim Verlassen ihrer wässrigen Umgebung frei wird, resultiert. Die Betrachtung der polaren Mechanismen führte zu dem Schluss, dass die wässrigen Potenzen der Dialkylether und der n-Alkanole ähnlich sind, weil Dialkylether sowohl in Wasser als auch am Rezeptor *schwächer* bzw. n-Alkanole sowohl in

Wasser als auch am Rezeptor *stärker* binden und die „Energiebeträge“ bzw. die resultierenden Potenzen dadurch letztlich wenig verschieden sind.

Durch weiterreichende Vergleiche mit Propofol und Phenolderivaten wird die Theorie des „abgeschirmten“ Sauerstoffs im Dialkylether zu prüfen sein. Eine Zusammenschau aller Substanzen und der sich ergebenden Effekte, ihrer Gemeinsamkeiten und ihrer Unterschiede wird bei der Frage nach anästhetischen Mechanismen und Eigenschaften der Wirkorte schließlich helfen, Puzzleteile zusammenzufügen.

## 8 Literaturverzeichnis

Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München: Elsevier Urban & Fischer, 2005

Arai L, Stayer S, Schwartz R, Dorsey A. The use of ondansetron to treat pruritus associated with intrathecal morphine in two paediatric patients. *Paediatr Anaesth* 1996; 6: 337-339

Barann M, Göthert M, Bönisch H, Dybek A, Urban BW. 5-HT<sub>3</sub> receptors in outside-out patches of N1E-115 neuroblastoma cells: basic properties and effects of pentobarbital. *Neuropharmacology* 1997; 36: 655-664

Barann M, Friederich P, Retzmann K, Dybek A, Urban BW. Loss of propofol during In-Vitro experiments. *Anesthesiology* 2000a; 93: 310-311

Barann M, Meder W, Dorner Z, Brüss M, Bönisch H, Göthert M, Urban BW. Recombinant human 5-HT<sub>3A</sub> receptors in outside-out patches of HEK 293 cells: basic properties and barbiturate effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000b; 362: 255-265

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

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-HT<sub>3</sub> 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

Brüss M, Barann M, Hayer-Zillgen M, Eucker T, Göthert M, Bönisch H. Modified 5-HT<sub>3A</sub> receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT<sub>3A</sub> receptor isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362: 392-401

Campora E, Vidili G, Oliva C, Ardizzoni A, Rosso R. Control of refractory, chemotherapy-induced emesis with the serotonin antagonist ondansetron (GR38032F). *Oncology* 1991; 48: 403-405

Carmichael J, Keizer HJ, Cupissol D, Milliez J, Scheidel P, Schindler AE. Use of granisetron in patients refractory to previous treatment with antiemetics. *Anticancer Drugs* 1998; 9: 381-385

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

Cubeddu LX, Trujillo LM, Talmaciu I, Gonzalez V, Guariguata J, Seijas J, Miller IA, Paska W. Antiemetic activity of ondansetron in acute gastroenteritis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 185-191

Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF. The 5-HT<sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 1999; 397: 359-363

Decker AM. Kinetische und pharmakologische Charakterisierung der molekularen Effekte von n-Alkanolen auf humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren. Doktordissertation, Medizinische Fakultät, Universität Bonn 2011

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

Derkach V, Surprenant A, North RA. 5-HT<sub>3</sub> receptors are membrane ion channels. *Br J Pharmacol* 1989; 339: 706-709

Faris PL, Kim SW, Meller WH, Goodale RL, Oakman SA, Hofbauer RD, Marshall AM, Daughters RS, Banerjee-Stevens D, Eckert ED, Hartman BK. Effect of decreasing afferent vagal activity with ondansetron on symptoms of bulimia nervosa: a randomized, doubleblind trial. *Lancet* 2000; 355: 792-797; comments: *Lancet* 2000; 355: 769-770

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

Göthert M. Presynaptic serotonin receptors in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 604: 102-112

Guikontes E, Spantideas A, Diakakis J. Ondansetron and hyperemesis gravidarum [letter]. *Lancet* 1992; 340: 1223

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981; 391: 85-100

Harrell AV, Allan AM. Improvements in hippocampal-dependent learning and decremental attention in 5-HT<sub>3</sub> receptor overexpressing mice. *Learn Mem* 2003; 10: 410-419

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 (Lond)* 1983; 341: 411-427

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International union of pharmacology classification of receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46: 157-203

Johnson BA, Roache JD, Javors MA, DiClemente CC, Cloninger CR, Prihoda TJ, Bordnick PS, Ait-Daoud N, Hensler J. Ondansetron for reduction of drinking among biologically predisposed alcoholic patients: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 2000; 284: 963-971. Comments: *J Am Med Assoc* 2000; 284: 1016-1017

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-HT<sub>3</sub> receptors. *Med Res Rev* 1990; 10: 441-475

Lieb K, Frauenknecht S, Brunnhuber S. *Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie*. München: Elsevier Urban & Fischer, 2008

Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer, 2005

Lummis SC. The transmembrane domain of the 5-HT<sub>3</sub> receptor: its role in selectivity and gating. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 535-539

Martin P, Frances H, Simon P. Dissociation of head twitches and tremors during the study of interactions with 5-hydroxytryptophan in mice. *J Pharmacol Methods* 1985; 13: 193-200

Maxton DG, Morris J, Whorwell PJ. Selective 5-hydroxytryptamine antagonism: a role in irritable bowel syndrome and functional dyspepsia? *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10: 595-599

Meiboom M. Die Bedeutung der molekularen Struktur des 5-HT-Moleküls für die Funktion des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors. Doktordissertation, Medizinische Fakultät, Universität Bonn 2011

Miquel MC, Emerit MB, Nosjean A, Simon A, Rumajogee P, Brisorgueil MJ, Doucet E, Hamon M, Vergé D. Differential subcellular localization of the 5-HT<sub>3A</sub> receptor subunit in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 449–457

Mott DD, Erreger K, Banke TG, Traynelis SF. Open probability of homomeric murine 5-HT<sub>3A</sub> serotonin receptors depends on subunit occupancy. *J Physiol (Lond)* 2001; 535: 427-443

Mullin MJ, Hunt WA. Actions of ethanol on voltage-sensitive sodium channels: effects on neurotoxin binding. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 242: 536-540

Müller-Esterl W. *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. München: Elsevier Urban & Fischer, 2004

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, Kapeller J, Hammer C, Rappold G. Serotonin type 3 receptor genes: HTR3A, B, C, D, E. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 501-504

Ohuoha DC, Hyde TM, Kleinman JE. The role of serotonin in schizophrenia: an overview of the nomenclature, distribution and alterations of serotonin receptors in the central nervous system. *Psychopharmacology (Berl)* 1993; 112: 5-15

Ohuoha DC, Knable MB, Wolf SS, Kleinman JE, Hyde TM. The subnuclear distribution of 5-HT<sub>3</sub> 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 [<sup>3</sup>H]-(*S*)-zacopride-labelled 5-HT<sub>3</sub> receptors in human brain. *J Neurol Sci* 1996; 144: 119-127

Paxinos G, Mai JK. Raphe nuclei. In: *The Human Nervous System*. London: Elsevier Academic Press, 2004. 2. Auflage: 425-451

Pochet S, Keskiner N, Fernandez M, Marino A, Chaïb N, Dehaye JP, Métioui M. Multiple effects of trichloroethanol on calcium handling in rat submandibular acinar cells. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 568-580

Pschyrembel W. Klinisches Wörterbuch. In: *Serotonin*. De Gruyter, Berlin 2001; 259. Auflage: 1532

Reeves DC, Lummis SC. The molecular basis of the structure and function of the 5-HT<sub>3</sub> receptor: a model ligand-gated ion channel (review). *Mol Membr Biol* 2002; 19: 11-26

Richardson BP, Engel G. Identification of serotonin M-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs. *Nature* 1985; 316: 126-131

Roewer N, Thiel H. *Taschenatlas der Anästhesie*. Stuttgart: Thieme, 2008

Saslow SB, Scolapio JS, Camilleri M, Forstrom LA, Thomforde GM, Burton DD, Rubin J, Pitot HC, Zinmeister AR. Medium term effects of a new 5HT<sub>3</sub> antagonist, alosetron, in patients with carcinoid diarrhea. *Gut* 1998; 42: 628-634

Schmidt RF, Lang F, Thews G. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer, 2005

Schwörer H, Hartmann H, Ramadori G. Relief of cholestatic pruritus by a novel class of drugs 5-hydroxytryptamine type 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptor antagonists: effectiveness of ondansetron. *Pain* 1995; 61: 33-37

Thompson AJ, Lummis SC. 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 3615-3630

Thompson AJ, Lummis SCR. The 5-HT<sub>3</sub> receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 527–540

Unwin N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 1995; 373(6509): 37-43

Vogel HG. Antidepressant Activity. In: Vogel HG, Hrsg. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Berlin – Heidelberg – New York: Springer, 2008: 809-812

Walkembach J, Brüss M, Urban BW, Barann M. Interactions of metoclopramide and ergotamine with human 5-HT<sub>3A</sub> receptors and human 5-HT reuptake carriers. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 543-552

Wilde MI, Markham A. Ondansetron: a review of its pharmacology and preliminary clinical findings in novel applications. *Drugs* 1996; 52: 773-794

Wymenga AN, de Vries EG, Leijnsma MK, Kema IP, Kleibeuker JH. Effects of ondansetron on gastrointestinal symptoms in carcinoid syndrome. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1293-1294

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



## **9 Danksagung**

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Bernd W. Urban für die Bereitstellung des Themas, die intensive Betreuung und Unterstützung bei der Auswertung, Interpretation und Kommunikation der Experimente bedanken. Ebenso danke ich Herrn PD Dr. Martin Barann sehr für die praktische Einarbeitung, die tatkräftige Hilfe in allen technischen Fragen und die geduldige Beratung bei der Auswertung und Deutung der Versuche. Vielen Dank auch an Frau Zita Dorner, die stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Dr. Anne-Marie Decker, Frau Mirjam Steinbach, Frau Dr. Merle Meiboom, Frau Dr. Sandra Brünker und Herrn Dr. Stefan Witten danke ich für die vergnüglichen Stunden im Labor und die wertvollen Hinweise zu Technik, Auswertung und Verständnis der Versuche.

Ich danke Herrn Georg Grasmeyer für die Bereitstellung der Diethylether-Daten und des Patch-Clamp-Fotos.

Besonderer Dank gilt meiner Familie.