

Molekulare Mechanismen von Phenol-Derivaten an
ligandengesteuerten Ionenkanälen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stefan Witten

aus

Stolberg (Rhld.)

Bonn, 2009

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

Durchführung der experimentellen Arbeiten an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Universität Bonn

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2010

1.Referent: PD Dr. Martin Barann

2.Referent: Prof. Dr. Volker Herzog

Bonn, 2009

Erscheinungsjahr: 2010

Abkürzungsverzeichnis

cDNA	<i>Complementary DNA</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	<i>Effective Concentration 50 %</i>
GABA	γ-Aminobuttersäure
<i>gating</i>	Mechanismus des Öffnen der Kanal-Pore
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
h	Stunden
(h)	Human
I	Induzierter Strom
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50 %</i>
kb	Kilobasenpaar
m / V	Masse pro Volumen
ms	Millisekunden
nACh	nicotinischer Acetylcholin
pA	Piko Ampere
R	Resistenz
R	Widerstand
S.D.	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
sek.	Sekunden
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propanediol
Tubes	Glaskapillare des Perfusionskopfes
U	<i>Unit</i>
U	Spannung
UV	Ultraviolettes Licht

V

Volt

wt

wild type (Wild-Typ)

Aminosäuren

Ala

Alanin

Phe

Phenylalanin

4-Me-Phe

4-Methyl-Phenylalanin *

4-F-Phe

4-Fluor-Phenylalanin *

Ser

Serin

Tyr

Tyrosin

mTyr

meta-Tyrosin *

(* Aminosäuren nach Beene et al. (2004))

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Inhaltsverzeichnis	6
1. Einleitung	1
1.1 Anästhesie und Narkose	1
1.2 Das Anästhetikum Propofol	2
1.3 Ligandengesteuerte Ionenkanäle	3
1.3.1 5-HT-Rezeptor	4
1.3.2 Glycin-Rezeptor	8
1.4 Zielsetzung der Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Materialien:	10
2.1.1 Verbrauchsmaterial und Reagenzien.....	10
2.1.2 Oligonukleotide und Enzyme	12
2.1.3 Medium, Puffer und Lösungen.....	12
2.1.2.1 Medium Zellkultur:	12
2.1.2.2 Puffer für die „Patch Clamp“-Experimente:	12
2.1.2.3 Lösungen für die „Patch Clamp“-Experimente:.....	13
2.1.4 Geräte	14
2.1.4 Software	14
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Methoden der Zellkultur.....	15
2.2.1.1 Stabile Transfektion am (h) 5-HT _{3A} -Rezeptor	15
2.2.1.2 Stabile Transfektion am (h) α 1 Glycin-Rezeptors	15
2.2.1.3 Kryokonservierung.....	15
2.2.1.4 Passagieren und Kultivieren von HEK 293.....	16
2.2.1.5 Herstellen einer monoklonalen Zelllinie aus einer polyklonalen.....	16
2.2.2 Die „Patch Clamp“-Methode	17
2.2.2.1 Durchführung der „Patch Clamp“-Experimente	18
2.2.2.2 Das Applikationssystem (RSC 200) von Biologic.....	20
2.2.2.3 Lösungsapplikation	20
2.2.2.4 Datenanalyse	22
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	27
2.2.3.1 Plasmid Mini-Präparation	27

2.2.3.2 Plasmid Maxi-Präparation.....	27
2.2.3.3 DNA-Reinigung durch Phenol / Chloroform-Extraktion.....	28
2.2.3.4 Ethanolpräzipitation von DNA.....	28
2.2.3.5 Gelelektrophorese von DNA.....	28
2.2.3.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	29
2.2.3.7 PCR mit Einbau von Restriktions-Schnittstellen.....	29
2.2.3.8 Sequenzierung von DNA.....	30
2.2.3.9 Restriktionsverdau von DNA.....	30
2.2.3.10 Ligation von DNA.....	30
2.2.3.11 Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Evaluierung der Messapparatur.....	32
3.2 Molekulare Wechselwirkung von Phenol-Derivaten mit dem 5-HT _{3A} -Rezeptor	33
3.2.1 Effekte auf die Amplitude bei Equilibrium-Applikation	34
3.2.1 Effekte auf die Desensibilisierung	36
3.2.2 Schnelle und langsame Substanz-Effekte von Propofol-Derivaten	39
3.2.3 Die Hydroxyl-Gruppe als entscheidender Faktor für Potenzierung.....	41
3.2.4 Kompetitivität der Phenol-Derivate mit 5-HT.....	43
3.2.3 Inhibierung oder Potenzierung aufgrund der Aktivierungs-Kinetik	47
3.2.4 Induzierte Amplitude durch Phenol nach Reststrom.....	49
3.2.5 Spezifische Effekte unterliegen zuzüglich der Lipophilie	51
3.3 Unterdrückung der Potenzierung durch Alkyl-Gruppen.....	52
3.3.1 Vergrößerung der Alkyl-Gruppe in ortho-Position.....	53
3.3.2 Flankieren der Hydroxyl-Gruppe durch kleinere Alkyl-Gruppen.....	55
3.3.3 Inhibition oder Potenzierung durch andere Positionen am aromatischen Ring	57
3.4 Effekte unterschiedlicher funktioneller Gruppen.....	59
3.4.1 Phenol und Anilin.....	59
3.4.2 2-Isopropylphenol und 2-Isopropylanilin.....	61
3.4.3 Propofol und 2,6-Diisopropylanilin	63
3.4.4 Phenol und Thiophenol	65
3.4.5 2-Isopropylphenol und 2-Isoprpylbenzolthiol.....	67
3.4.6 Halogenbenzole.....	69
3.5 Verstärkung der Potenzierung durch Alkyl-Gruppen	70
3.5.1 Potenzierung durch Positionsveränderungen von Methyl-Gruppen	70

3.5.1	Potenzierung durch Positionsveränderungen von Methyl-Gruppen	70
3.5.2	Positionsveränderungen von Isopropyl-Gruppen.....	72
3.6	Effekte unterschiedlicher Alkyl-Gruppen	74
3.6.1	Konstitutionsisomere.....	74
3.6.2	Verkürzung der Alkyl-Gruppe	78
3.7	Abbruch der Potenzierung in para-Position	82
3.7.1	Abbruch durch die Länge der Alkyl-Gruppen	82
3.7.2	Qualitative Übersicht aller verwendeter Substanzen	84
3.8	Der homopentamere humane $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor	86
3.8.1	Molekularbiologische Herstellung und Charakterisierung	86
3.8.2	Elektrophysiologische Charakterisierung	88
3.8.3	Herstellung einer monoklonalen Zelllinie aus einer polyklonalen.....	93
4.	Diskussion	95
4.1	Validation der Messapparatur	95
4.2	Untersuchungen der molekulare Mechanismen	96
4.3	Propofol und Derivate am 5-HT _{3A} -Rezeptor.....	96
4.4.1	Effekte der Phenol-Derivate.....	97
4.4.2	Alkyl- und funktionelle Gruppen	99
4.4.3	Anästhetische Aktivität durch Phenol-Derivate	104
4.3	Etablierung des (h) $\alpha 1$ Glycin-Rezeptors	106
5.	Zusammenfassung.....	108
6.	Anhang	109
7.	Literaturverzeichnis.....	111
7.1	Referenzen.....	111
7.2	Originalarbeit und Beiträge während der Anfertigung der Dissertation	117
9.	Danksagung.....	119

1. Einleitung

1.1 Anästhesie und Narkose

Die Narkose ist ein oftmals durch Anästhetika herbeigeführter bewusstloser Zustand, bei dem verstärkt Sinneswahrnehmungen abgeschaltet werden. Narkose bezeichnet einen Zustand des reversiblen Komas.

Anästhesie und Narkose sind weitestgehend unverstanden (Urban et al., 2006). Die molekularen Effekte bzw. Wirkmechanismen, die der Narkose zugrunde liegen, sind vollkommen unklar und in ihrer Komplexität unüberschaubar (Urban, 1992). Dennoch sind Narkosen in der heutigen Zeit mit einer großen Leichtigkeit durchzuführen und die Mortalität ist bei nicht Risiko-Patienten äußerst gering: Weniger als ein Todesfall bei 200.000 Narkosen (Urban und Bleckwenn, 2002).

Die Effekte, die der Narkose zugrunde liegen, sind äußerst komplexe Prozesse, bei dem mehr als nur der Mechanismus eines Rezeptors im Zentralen Nervensystem eine Rolle spielt (Urban et al., 1995). Die Darlegung von anästhetischen Wirkungen deutet darauf hin, dass Anästhetika in eine große Vielzahl von physicochemischen Prozessen eingreifen. Die stärksten erregbaren Prozesse sind die, die mit der Aktivität von ligandengesteuerten Ionenkanälen in Verbindung stehen (Richards, 1998). Postanoide-Rezeptoren sowie Mitochondrien und der damit verbundene Energie-Stoffwechsel werden ebenfalls durch Anästhetika beeinflusst. Diese „Targets“ sind jedoch nicht für eine große Anzahl von Anästhetika erforscht (Urban et al., 2006). Spezifische Effekte an ligandengesteuerten Ionenkanälen von einigen Anästhetika sind bekannt (Formen und Miller, 1989). Es gibt einen Zusammenhang zwischen Nervenmembran, Wirkung und Anreicherung der Anästhetika (Mullins, 1954). Biologische Membranen bestehen hauptsächlich aus Proteinen und Membranlipiden. Letztere sind amphipatische Moleküle, d.h. sie verfügen über einen hydrophilen und einen hydrophoben (Lipiddoppelschichten) Anteil. Während für die meisten polaren (hydrophilen) Moleküle die Lipiddoppelschicht praktisch nicht permeabel ist, passieren lipophile Substanzen die Membran (Stryer, 1999). Diese Eigenschaft stellt sich bei der Meyer Overton-Korrelation dar. Hier wurde der Zusammenhang zwischen analgetischer Potenz und Lipidlöslichkeit in Form einer Korrelation dargestellt (Meyer, 1899; Meyer 1937; Overton 1901). Spezifische und / oder unspezifische Wechselwirkungen der Anästhetika mit ihren Wirkungsorten werden diskutiert (Urban et al., 2006).

1.2 Das Anästhetikum Propofol

Propofol gehört zur Stoffklasse der Hypnotika (Schlafmittel). Hierunter fallen die Narkotika oder Anästhetika. Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Anästhetika, die sich vollkommen in ihrer molekularen Struktur unterscheiden (Urban et al., 2006) - vom einfachen Edelgas Xenon über halogenierte Ether wie z.B. Halothan, Isofluran und Sevofluran bis hin zu äußerst komplexen Strukturen wie Alfaxalon und Fentanyl. Anästhetika werden intravenös injiziert wie Propofol, das häufigste verwendete intravenöse Anästhetikum, welches um 1980 entdeckt wurde (Langley und Heel, 1988), oder über einen Tubus eingeatmet wie die halogenierten Ether. Propofol ist im klinischen Gebrauch in einer Öl-in-Wasser Emulsion gelöst. Aufgrund hoher Lipidlöslichkeit ist es in dem Lipid Cremophor EL[®] gelöst, welches unpolare Substanzen in wässrigen Lösungen schützt. Propofol wird in der Leber metabolisiert und über den Harn als Glucuronid-Konjugate ausgeschieden (Trapani et al., 2000). Charakteristisch für die Pharmakokinetik der Propofol-Emulsion ist eine rasche Verteilung in Blut und Gewebe. Dies führt zu einem schnellen Anfluten von Propofol und zu einer kurzen Wirkdauer.

Propofol wird oft zur Einleitung einer Allgemeinanästhesie verabreicht, bei der später die Narkose mit einem halogenierten Ether fortgeführt wird. Man kann allerdings auch Narkosen alleine mit Propofol durchführen. Die gute „Steuerbarkeit“ der Narkose durch diesen Arzneistoff, die geringe Kumulation im Plasma und eine gute Erholung nach der Applikation sind Vorteile. Als äußerst positiv gegenüber den Inhalationsethern ist das geringere Auftreten von Übelkeit und Erbrechen (PONV = „Postoperative Nausea and Vomiting“) bei der Verwendung von Propofol, was bei den Ethern ein großes Problem darstellt (Borgeat und Stirnemann, 1998). Nachteile sind ein relativ hohes Auftreten von Apnoe, sowie Blutdruckabfall (Trapani et al., 2000). Das Auftauchen von Schmerz und anafylaktischen Reaktionen erfordern oftmals eine zusätzliche Applikation von Analgetika während der Operation.

Das Molekül Propofol ist äußerst simpel und symmetrisch (Barann et al., 2008). Aufgebaut aus zwei Isopropylgruppen, einer Hydroxylgruppe und einem aromatischen Benzolring (siehe Abbildung 1).

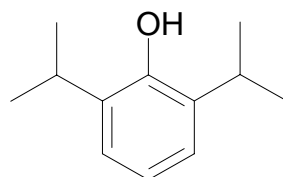


Abbildung 1: Strukturformel von Propofol (2,6-Diisopropylphenol)

Aufgrund der Einfachheit der Struktur ist Propofol ein hervorragendes Modell um Mechanismen an ligandengesteuerten Ionenkanälen zu erforschen.

1.3 Ligandengesteuerte Ionenkanäle

In dieser Arbeit wurde mit zwei homopentameren ligandengesteuerten Ionenkanälen gearbeitet: 1.) der exzitatorische 5-HT_{3A}-Rezeptor und 2.) der inhibitorische $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor. Diese beiden Kanäle sind Proteinkomplexe, die mit fünf gleichen Untereinheiten eine Pore bilden. Ligandengesteuerte Ionenkanäle (ionotrope Kanäle) zeichnen sich dadurch aus, dass sich nach der Bindung von Liganden, der Kanal (Pore) unter bestimmten Umständen, durch Konformationsänderung, öffnet. Die treibende Kraft, die die Ionen fließen lässt, ist die angelegte Spannung und der Konzentrationsgradient zwischen Extra- und Intrazellulärraum. Ionenkanäle sind permeabel und Ionenselektiv. Der 5-HT₃-Rezeptor ist permeabel für einwertige und zweiwertige Kationen (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺). Der Glycin-Rezeptor ist, beginnend bei der stärksten Permeabilität, selektiv für einwertige Anionen: SCN⁻, I⁻, Br⁻, Cl⁻, F⁻ (Bormann et al., 1987).

Man unterscheidet bei ligandengesteuerten Ionenkanälen zwischen vier empirischen Zuständen: geschlossen, offen, geschlossen erregbar und geschlossen nicht erregbar. Verschiedene andere Rezeptor-Zustände werden diskutiert (Mott et al., 2001; Beato et al., 2004).

Die Größe des Ionenflusses hängt sowohl von der Anzahl der öffnenden Kanäle, als auch von der Dauer des geöffneten Zustandes ab. Ionenkanäle rufen oftmals charakteristische Ionenströme hervor. Dabei spielen ebenfalls die Art der Methode, „Whole Cell“- , „excised Patch“ (siehe Abschnitt 2.2.2) und die Konzentration des Agonisten eine entscheidende Rolle. Der Kanal öffnet / aktiviert (τ_{ON}) unter Einwirkung des Agonisten sehr schnell. Aktivierungszeiten können, beim 5-HT_{3A}-Rezeptor im „excised Patch“, Größenordnungen zwischen 5 und 20 ms haben. Der Kanal schließt langsamer, im Vergleich zur Aktivierung, ebenfalls unter Einwirkung des Agonisten (Desensibilisierung, τ_{OFF}). Man unterscheidet zwischen Desensibilisierung und Deaktivierung, wobei die Desensibilisierung ein Schließen des Kanals ohne Agonist beschreibt. Die Desensibilisierungszeiten sind den Faktor 20 bis 50 langsamer.

1.3.1 5-HT-Rezeptor

Berridge (1971) zeigte, die spezifische Wirkung von 5-HT (5-Hydroxytryptamin). Er entwickelte ein Modell mit isolierten Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora*. Die Sekretion von Speichel beim unstimulierten Modell ist sehr langsam (0,5-1,0 nl/min), steigt jedoch an, wenn eine geringe Konzentration von 5-HT hinzugegeben wird (40 nl/min). Wird die Hydroxyl-Gruppe von 5-HT entfernt, ausgetauscht durch andere Gruppen (-Cl, -OCH₃, -CH₃) oder versetzt an andere Positionen im Indolring (4-, 6-), nimmt die Aktivität der Speicheldrüsen ab.

5-HT₃-Rezeptoren kommen im peripheren und zentralen Nervensystem vor. Man nimmt an, dass sie eine entscheidende Rolle bei Übelkeit und Erbrechen spielen. Es ist bekannt, dass antiemetogene Substanzen den 5-HT_{3A}-Rezeptor inhibieren, während emetogene Substanzen dies nicht tun (Barann et al., 2006).

Der 5-HT₃-Rezeptor ist ein Mitglied der „Cys-loop“ Familie wie auch Glycin-, GABA_A- und der nACh-Rezeptor (Thompson et al., 2006) mit großen strukturellen und funktionalen Homologien zum nACh-Rezeptor (Thompson und Lummis, 2006). Der Agonist (5-HT) bindet innerhalb einer Bindungstasche und setzt den Öffnungs-Mechanismus in Kraft. Viel wurde über die Bedeutung der einzelnen „loops“ diskutiert. Die Liganden-Bindungsseite liegt auf der Oberfläche von zwei angrenzenden Untereinheiten und bildet sich aus den loops A bis C (siehe Abbildung 2). Für eine vollständige Funktion des Rezeptors sind die Aminosäuren, in den Positionen 143 und 153, essentiell (siehe Abbildung 3) (Beene et al., 2004). Tauscht man an der Position 234 die Aminosäure Tyr (wt) durch andere Aminosäuren (Phe, 4-F-Phe, mTyr, 4-Me-Phe) aus, so verändern sich die EC₅₀-Werte um einem Faktor <10. Beene et al. (2004) schlossen daraus, dass die Hydroxyl-Gruppe von Tyr₂₄₃ nicht essentiell ist für Rezeptorfunktionen.

Entfernt man die Hydroxyl-Gruppe von Tyr₁₄₃ (wt) (siehe Abbildung 3) oder verlängert man die Kettenlänge um eine weitere Methyl-Gruppe, so steigt der EC₅₀ um das 30- bis 40-fache. Entfernt man die aromatische Gruppe oder ändert man die Position der Hydroxyl-Gruppe, führt dies zu einem 100-fachen Anstieg des EC₅₀-Wertes und einer zwei- bis vierfachen Verlangsamung der Desensibilisierung (Beene et al., 2004). Die Aminosäure Tyr₁₄₃ spielt eine entscheidende Rolle in der Rezeptorfunktion.

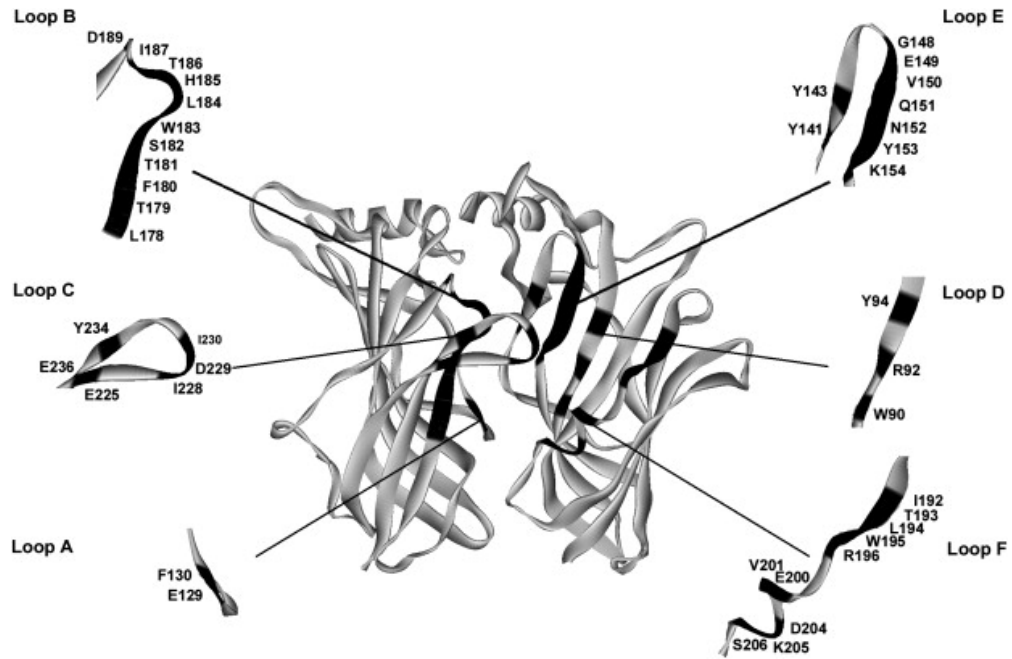


Abbildung 2: Modell von dem 5-HT_{3A}-Rezeptor Bindungs-Domäne. Gezeigt werden zwei von fünf Untereinheiten. Die Bindungsseite ist lokalisiert auf der Oberfläche der zwei Untereinheiten, die die prinzipiellen Komponenten für Bindung bereitstellen (loop A-C) und komplementär (loop D-F). Aus Barnes et al. (2008).

Beene et al. (2004) zeigten, dass die Aminosäure Tyr153 des 5-HT_{3A}-Rezeptors (siehe Abbildung 3) zuzüglich entscheidend ist für die Rezeptorfunktion. Der Austausch des aromatischen Rings, durch Ala oder Ser, führte zu einem ≥ 100 -fachen Anstieg des EC₅₀-Wertes. Entfernung der Hydroxyl-Gruppe (Phe) oder Austausch der Hydroxyl-Gruppe (4-F-Phe; 4-Me-Phe) führte zu einem ~ 20 -fachen Anstieg des EC₅₀-Wertes. Dieses Ergebnis zeigt die Bedeutung des aromatischen Rings und der Hydroxyl-Gruppe für Rezeptorfunktion.

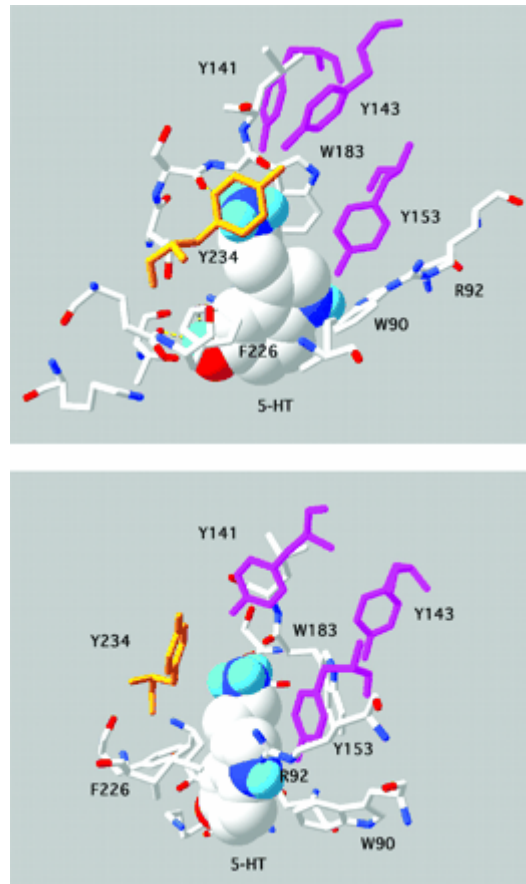


Abbildung 3: Das Modell zeigt die Bindung von einem 5-HT-Molekül an einen 5-HT_{3A}-Rezeptor mit den essentiellen Aminosäuren, von zwei Sichtweisen. Aus Beene et al. (2004).

Die engste Stelle der Kanalpore wird durch die TM2-Segmente begrenzt (siehe Abbildung 4), bei der die negativen Ladungen der Aminosäuren zum Poreninneren gerichtet sind, um so permeabler für Kationen zu sein. Dennoch spielt die Engstelle bei der Leitfähigkeit nur eine geringere Rolle, da das Portal des Zytoplasmas (siehe Abbildung 4) und die dort vorzufindende Aminosäuren-Zusammensetzung entscheidend für die Leitfähigkeit ist (Kelley et al., 2003). Der 5-HT_{3B}-Rezeptor hat eine ~13-fache höhere Leitfähigkeit als der 5-HT_{3A}-Rezeptor.

In der Arbeit von Mott et al. (2001) wurde gezeigt, dass die Konzentrations-Wirkungskurven am (m) 5-HT_{3A}-Rezeptor zwischen „Whole Cell“- und „excised Patch“ (siehe Abbildung 5) sich nicht unterscheiden ($EC_{50} = 2,0 \mu\text{M}$), während die Kinetiken der Aktivierung und Desensibilisierung am „Whole Cell-Patch“ wesentlich langsamer ablaufen, in Bezug zum „excised Patch“. Ferner wurde gezeigt, dass die Kinetik der Desensibilisierung schneller ein Schließen der Kanäle zulässt, als der Prozess der Deaktivierung. Betrachtet man die Messungen zu den Doppelpuls-Intervalle am (m) 5-HT_{3A}-Rezeptor (Aufeinanderfolgende 5-HT-Pulse um die Zeit der Regeneration eines vollständigen Öffnens des Kanals zu ermitteln),

so stellt man fest, dass die Zeit für die Regeneration bei langen 5-HT-Pulsen wesentlich größer ist als bei kurzen Pulsen (τ_{recovery} 19,4 sek.; τ_{recovery} 9,0 sek.). Dies lässt die Vermutung zu, dass zwei verschiedene Wege aus der Desensibilisierung existieren. Van Hooft und Vijverberg (1996) stellten in ihrer Arbeit volle und partielle 5-HT-Agonisten dar. Während der Wirkungsgrad (EC_{50}) der vollen Agonisten größer ist, ist die konzentrationsabhängige Aktivierung und Desensibilisierung, bei Vordesensibilisierung durch Agonist, in umgekehrter Reihenfolge. Setzt man diese Erkenntnis in Bezug zu der kurzen und langen 5-HT-Applikation bei Mott et al. (2001), so ist die Idee, dass es mehrere Prozesse der Desensibilisierung gibt, kaum noch von der Hand zu weisen.

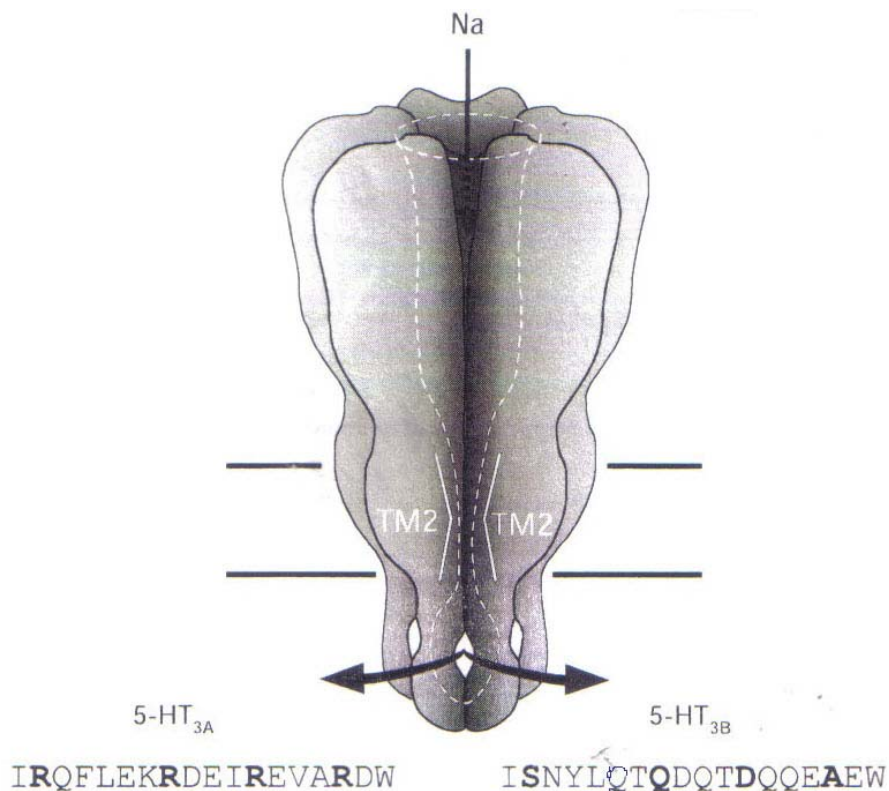


Abbildung 4: Schematische Darstellung des 5-HT₃-Rezeptors mit Angabe der TM2-Segmente und des zyttoplasmatischen Portals unterhalb der TM2-Segmente. Aus Kelley et al. (2003).

1.3.2 Glycin-Rezeptor

Glycin ist im Gegensatz zu 5-HT ein inhibitorischer Neurotransmitter, der sehr schnell im Zentralen Nervensystem wirkt. Der Erregungsübergang zwischen den Nervenzellen und das damit Einhergehende „abfeuern“ von Neuronen, wird durch eine anwachsende Chlorid-Permeabilität der neuronalen Membran inhibiert (Barker und McBurney, 1979).

Glycin-Rezeptoren gehören ebenfalls wie GABA_A, 5-HT₃ und ACh zur „*superfamily of cyst-loop ligand gated ion channels*“ (Grenningloh et al., 1987). Sie haben wie der 5-HT-Rezeptor eine pentamere Struktur, in der die Kanal-Pore von fünf Untereinheiten umgeben ist. Es sind fünf verschiedene Untereinheiten bekannt (α 1- α 4 und β). Ein homomerer Rezeptor kann nur von α -Untereinheiten aufgebaut sein, ein β -homomer ist nicht bekannt (Legendre, 2001). Die homomere Form ist die vorherrschende in jungen Tieren, sie wird von $\alpha\beta$ -heteromeren im erwachsenen Stadium abgelöst (Legendre, 2001). Die Zeitkonstanten der Aktivierung sind beim Glycin-Rezeptor wesentlich schneller als beim 5-HT₃-Rezeptor (Mott et al., 2001).

Betrachtet man Anästhetika, so stellen sich unterschiedliche Effekte zwischen 5-HT- und Glycin-Rezeptoren dar. Während Propofol inhibitorisch am 5-HT-Rezeptor wirkt (Barann et al., 2008), potenziert das intravenöse Anästhetikum am Glycin-Rezeptor (Ahrens et al., 2004; Dong und Xu, 2002). Andere Anästhetika wie Alphaxalon (Steroid-Anästhetikum) und Isofluran (Inhalations-Anästhetikum) zeigten ebenfalls potenzierende Eigenschaften an Glycin-Rezeptoren (Yevenes et al., 2008). Propofol sowie strukturanaloge Derivate wie 2,6- oder 3,5-Dimethylphenol zeigten intrinsische Aktivität an Glycin-Rezeptoren (Haeseler et al., 2005). Dong und Xu, 2002 versuchten in ihrer Arbeit Erkenntnis über anästhetische Mechanismen zu erlangen. Glycin- und GABA-Rezeptoren verursachten eine Potenzierung der Amplitude bei klinischen Konzentrationen von Propofol (5 μ M), während bei höheren Konzentrationen es zu einer Inhibierung kam (100 μ M). Die klinische Konzentration von Propofol verlangsamte zusätzlich die Deaktivierung am Glycin-Rezeptor.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Potenzierende Substanzen an inhibitorischen Rezeptoren bzw. inhibierende Substanzen an exzitatorischen Rezeptoren könnten Auslöser für Narkose und die damit oftmals einhergehenden negativen Eigenschaften wie Übelkeit und Erbrechen sein. 5-HT₃-Rezeptoren sind an pathologischen Zusammenhängen wie Übelkeit und Erbrechen nach Anästhetika- und / oder Chemotherapie-Einsatz beteiligt. Es ist bekannt, dass 5-HT₃-Inhibitoren positive Eigenschaften haben, in Bezug auf Übelkeit und Erbrechen, wie Propofol (Barann et al., 2006).

Primäres Ziel dieser Arbeit ist es, ausgehend vom Anästhetikum Propofol, die Wirkungsweise bzw. die Wirkungsmechanismen dieses einfachen Strukturmodells zu verstehen. Um zu begreifen, was Propofol verursacht und welche Struktur dieses Moleküls für welchen Mechanismus verantwortlich ist, wurden strukturanaloge Derivate untersucht. Propofol wurde zerlegt und durch funktionelle Gruppen modifiziert. So konnte eine sehr umfassende Studie über molekulare Mechanismen von Phenol-Derivaten dargestellt werden. Da man weiß, dass diese Substanzen postsynaptisch sehr schnell wirken, wurden elektrophysiologische Untersuchungen, Mithilfe eines schnellen Lösungsaustausch-Systems, an Liganden gesteuerten Ionenkanälen durchgeführt.

Ein weiteres Ziel bestand darin, neben dem exzitatorischen homopentameren (h) 5-HT_{3A}-Rezeptor einen inhibitorischen homopentameren (h) $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor stabil in HEK 293 Zellen zu etablieren und elektrophysiologisch zu charakterisieren. Anschließend sollten die Mechanismen der Propofol-Derivate an diesem Rezeptor ebenfalls elektrophysiologisch untersucht werden.

Molekulare Mechanismen sollten an exzitatorischen und inhibitorischen Rezeptoren unter gleichen Bedingungen (beide Rezeptoren stabil transfiziert in HEK 293 und Homopentamere) untersucht werden, um so mögliche grundlegende Unterschiede herauszustellen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien:

2.1.1 Verbrauchsmaterial und Reagenzien

Verbrauchsmaterial und Reagenzien	Hersteller
Anilin (HCl)	Sigma Aldrich, Steinheim
Benzene	Sigma Aldrich, Steinheim
4-n-Butylphenol *	Alfa Aesar, Karlsruhe
2-tert.-Butyl-6-Methylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
Borosilikat-Glaskapillaren	World Precision Instruments, FL, USA
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Chlorbenzene	Fluka, Steinheim
m-Cresol	Fluka, Steinheim
o-Cresol	Fluka, Steinheim
p-Cresol	Fluka, Steinheim
1,2-Diethylbenzene *	Sigma Aldrich, Steinheim
2,6-Diethylphenol *	Astra Zeneca, Wedel
2,6-Diisopropylanilin *	Sigma Aldrich, Steinheim
1,3-Diisopropylbenzene **	Sigma Aldrich, Steinheim
2,5-Diisopropylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
2,6-Dimethylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
2,5-Dimethylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
3,5-Dimethylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
EGTA	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylbutylthiobarbital	Sigma Aldrich, Steinheim
2-Ethylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
2-Ethyl-6-Methylphenol *	Alfa Aesar, Karlsruhe
3-Ethylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
4-Ethylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
Fluorobenzene	Sigma Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum	Biochrom AG, Berlin

Geneticin (G418)	Sigma Aldrich, Steinheim
HEPES (9105.3)	Carl Roth GmbH + CO.KG, Karlsruhe
HEK 293 Zelllinie	Pharmakologisches Institut, Bonn
2-Isopropylanilin *	ABCR
Isopropanol	Merck, KGaA, Darmstadt
2-Isopropylbenzenethiol *	Sigma Aldrich, Steinheim
2-Isopropylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
3-Isopropylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
4-Isopropylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Sigma Chemical CO, St.Louis, MO, USA
Klonzylinder	Sigma Aldrich, Steinheim
Kulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Methanol	Riedel-de Haen Seelze
Natriumchlorid	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
2-Naphthol *	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydrochlorid-Lösung	Hedinger, Stuttgart
Nitrogen	Linde, Höllriegelskreuth
Paneticin	Biotech GmbH, Aidenbach
Pentobarbital	Sigma Aldrich, Steinheim
4-n-Pentylphenol *	Alfa Aesar, Karlsruhe
Petrischalen (35 mm Durchmesser)	Nunc, Wiesbaden
Phenol	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin-Streptomycin-Glutamin (PSG)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Propofol (2,6-Diisopropylphenol) *	RBI, Natick, MA, USA
2-Propylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
3-Propylphenol *	Alfa Aesar, Karlsruhe
4-Propylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
2-tert.-Butylphenol *	Sigma Aldrich, Steinheim
Thiophenol	Sigma Aldrich, Steinheim
Thymol (5-Methyl-2-[1-methylethyl]phenol)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Serotonincreatininsulfatkomplex	Sigma Aldrich, Steinheim

Silberdrähte	Science Products GmbH, Hofheim
Strychnin / Strychnin 2H ₂ O	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Oligonukleotide und Enzyme

Oligonukleotide (MBI):

Gly R s (Sequenzierung)	tctttgagtggcaggaacagg
Gly R as (Sequenzierung)	tagtaacccatctgccgctcc
Primer s für EcoRI	attagaattccaggtctggacgctctcc
Primer as für XbaI	attatctagatgtgctattcccaggtcc

Enzyme:

Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
Taq DNA-Polymerase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	Roche, Invitrogen

2.1.3 Medium, Puffer und Lösungen

2.1.2.1 Medium Zellkultur:

DMEM-Nutrix F12 ohne Glutamin (Gibco)

10 % fötales Kälberserum; inaktiviert bei 57° C für 30 min

1 % (PSG): 10.000 E Penicillin

10.000 mg Streptomycin

29,2 mg Glutamin

3 % Natriumbicarbonat

1,5 % Panecitin

2.1.2.2 Puffer für die „Patch Clamp“-Experimente:

a) Extrazelluläre Pufferlösung (ECS) in Aqua bidest.

150 mM Natriumchlorid (NaCl)

1,8 mM Calciumchlorid (CaCl)

1 mM Magnesiumdichlorid (MgCl₂*6 H₂O)

10 mM HEPES

5,6 mM Kaliumhydroxid (KOH)

Um einen physiologischen pH-Wert von 7,45 zu erhalten, wurde dieser je nach Bedarf mit 1 M Salzsäure oder 1 M Natriumhydroxid eingestellt.

b) Intrazelluläre Pufferlösung (ICS) gelöst in Aqua bidest.

140 mM Kaliumchlorid (KCl)

5 mM Magnesiumdichlorid (MgCl₂)

10 mM HEPES

10 mM EGTA

1,9 mM Kaliumhydroxid (KOH)

Um einen physiologischen pH-Wert von 7,3 zu erhalten, wurde dieser je nach Bedarf mit 1 M Salzsäure oder 1 M Kaliumhydroxid eingestellt.

2.1.2.3 Lösungen für die „Patch Clamp“-Experimente:

a) Perfusionslösungen:

Die Perfusionslösungen wurden ein Tag vor Gebrauch in ECS angesetzt und über Nacht unter Lichtschutz rühren gelassen. Substanzen die mit einem Stern (*) angegeben sind, wurden als 1 M Ethanol-Stock angesetzt; die mit zwei Sternen (**) angegeben sind wurden als 0,1 M Ethanol-Stock angesetzt. Aus diesem Ethanol-Stock wurden nun ebenfalls die Perfusionslösungen ein Tag vor Gebrauch in ECS angesetzt und über Nacht rühren gelassen. Der Ethanol-Stock wurde bei -20° C eingefroren.

b) Serotoninlösung:

25 mM Serotoninstocks wurde in Aqua bidest gelöst und bei -20° C eingefroren. Je nach gewünschter Konzentration konnte diese Lösung dann für die Experimente verwendet werden.

2.1.4 Geräte

Geräte	Hersteller
Axiovert 25 Umkehrmikroskop	Zeiss, Jena
Bessel Lowpass-Filter	Frequency Devices, MA, USA
Digidata 1200 Analog/Digitalumwandler	Axon Instruments, Molecular Devices Corporation, CA, USA
EVH-9	Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich
Klimabrutschrank BB 6060	Heraeus, Hanau
ID 30 Mikroskop	Zeiss, Jena
L/M-CPZ 101 Hitze-Polierapparatur	List Medical, Darmstadt
L/M-EPC-7 Patch-Clamp-Verstärker	List Medical, Darmstadt
Telaval 31 Mikroskop	Zeiss, Jena
Patch-Pipette-Puller PA-10	ESF Elektronik, Göttingen
Rapid solution exchange (RSC 200)	Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich
Supelcosil-Säule	Sigma Aldrich, Deisenhofen

2.1.4 Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism3 [®]	GraphPad, CA, USA
Microsoft Office 2003 [®]	Microsoft Corporation, CA, USA
RSC V1.04	Biologic Science Instruments, USA
pClamp [®] 8 und clampfit	Axon Instruments, Molecular Devices Corporation, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Zellkultur

2.2.1.1 Stabile Transfektion am (h) 5-HT_{3A}-Rezeptor

Die (h) 5-HT_{3A}-Rezeptor cDNA wurde über den pCDNA3 (5,4 kb; Geneticin, Ampicilin^R) Vektor in HEK 293 (menschliche Nieren Stammzellen) Zellen transfiziert. Die Transfektion wurde mittels der Calciumphosphat-Transfektion durchgeführt (Chen und Okayama, 1987), am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Abt. Bönisch). Die Integration der (h) 5-HT_{3A}-Rezeptor cDNA ins menschliche Genom erfolgte an unspezifischer Stelle.

Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von Genecitin (800 µg/ml) selektioniert. Tote Zellen setzten sich nicht am Flaschenboden fest und durch Mediumwechsel (alle zwei Tage) wurden tote Zellen aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Die Zellen wurden nun in Petrischalen ausgesät und nach Auftreten einzelner Zellkolonien durch Klonzylinder (Sigma) abgegrenzt und in 24-well Kulturplatten (Falcon) bis zu einer hohen Konfluenz kultiviert. Aus den Transfektionen wurden 20-40 Kolonien in Bezug auf Expression des humanen 5-HT_{3A} Rezeptors getestet. Man postuliert, dass eine Kolonie für einen Klon steht. Die Testung erfolgte mit [¹⁴C]Guanidinium Influx und Bindung des selektiven 5-HT₃ Rezeptor Antagonisten [³H]GR 65630 [3-(5-methyl-1H-imidazol-4-yl)-1(1-metzhyl-1H-indol-3-yl)-1-propanone] oder durch spezielle [³H]5-HT Aufnahmeexperimente. Klone, die starke Expression aufwiesen, wurden kryokonserviert. Mit einem dieser Klone wurden alle im Ergebnisteil beschriebenen Experimente durchgeführt.

2.2.1.2 Stabile Transfektion am (h) α1 Glycin-Rezeptors

Die Transfektion mit kationischen Liposomen des humanen α1 Glycin-Rezeptors-Gens (1,6 kb) mit Hilfe des pCDNA3 Vektors (5,4 kb), erfolgte durch das Protokoll und die Substanzen von TransIT[®]. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von Genecitin (800 µg/ml) selektioniert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Diese Arbeiten erfolgten teilweise mit freundlicher Unterstützung der Pharmakologie und Toxikologie (Abt. Bönisch).

2.2.1.3 Kryokonservierung

Die Zellen (HEK 293) wurden aus der Zellkulturflasche abgeerntet (mit dem Spatel oder durch abklopfen) und in ein Falcon-Tube überführt. Bei 1000 U / min wurden die Zellen 10 min lang zentrifugiert. Das Zellsediment wurde im üblichen Zellkulturmedium, ohne

Antibiotika, mit 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden für 1-2 Stunden bei -20°C , dann bei -80°C eingefroren. Die Arbeitsschritte sollten nach Zugabe mit DMSO schnell erfolgen, da die Substanz für Zellen toxisch ist. Diese Schritte, bei denen die Zellen in nicht geschlossenen Behältern vorlagen, wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

2.2.1.4 Passagieren und Kultivieren von HEK 293

Alle Arbeitsschritte, bei denen die Zellen in nicht geschlossenen Behältern vorlagen, wurden ebenfalls unter der Sterilbank durchgeführt. Das Medium (DMEM) war für beide Rezeptoren. Die HEK 293 Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C , 95 % Luftfeuchtigkeit und in einer ca. 5 % CO_2 angereicherten Atmosphäre inkubiert; sowohl Zellkulturflasche als auch Petrischalen.

- 1) Das Passagieren des 5-HT_{3A}-Rezeptor: Die Zellen wurden aus der Kulturflasche abgeerntet, in ein Falcon-Tube überführt und bei 1000 U für 10 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und es wurden 10 ml neues Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden durch rauf- / runter-pipettieren homogenisiert. Es wurde 1 ml von dieser Zellsuspension in eine neue Kulturflasche (20 ml Zellkulturflasche) überführt, so dass man auf ein Gesamtvolumen in der Kulturflasche von 21 ml kam. Der Rest der Zellsuspension wurde 1:10 mit Medium verdünnt. In Petrischalen (Durchmesser: 35 mm) wurden 2 ml Medium vorgelegt und 1 Tropfen der 1:10 Verdünnung auf die Petrischalen pipettiert.
- 2) Das Passagieren des $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor: Die Zellen wurden in der Kulturflasche durch rauf/runter-pipettieren homogenisiert. Anschließend wurde 1 ml in eine neue 10 ml Zellkulturflasche überführt, so dass das Gesamtvolumen in der Flasche 11 ml betrug. Anschließend wurde 1 Tropfen der Zellsuspension in eine Petrischale überführt, in dem 2 ml Medium vorgelegt wurde.

2.2.1.5 Herstellen einer monoklonalen Zelllinie aus einer polyklonalen

Der Mischklon (polyklonaler Klon) wurde in einer greiner Tissue Culture Flaks eine Woche im Brutschrank herangezogen (siehe 2.2.1.4). Die Zellen wurden vom Flaschengrund abgeklopft und mit 20 ml Medium zentrifugiert (800 U / min). Das Pellet wurde mit 10 ml Medium aufgenommen und eine 1:20 Verdünnung wurde erstellt. 6 Tropfen dieser 1:20 Verdünnung wurden in eine Petrischale (100 x 20 mm), in der 12 ml Medium vorgelegt wurde, überführt. 24 h später wurden jeweils einzelne Klone (monoklonale Klone), unter dem

Mikroskop bei geeigneter Vergrößerung, einzeln in ein Well (greiner 24 Well Suspension Culture Plate) überführt. Dabei wurden 0,5 ml Medium in jeweils ein Well vorgelegt und mit einer Pipette 10 µl des Mediums, unter dem Mikroskop mit dem Klon eingezogen und so in das jeweilige Well überführt. Nach einer Woche wurde das Medium im Well gewechselt. Dabei wurden 0,4 ml Medium abgezogen und sofort 0,4 ml frisches Medium erneut hinzugegeben. Nach einer Woche wurden die Klone umgesetzt in nunc Cell Culture Flaks. 5 ml Medium wurden in jede Flaks vorgelegt. Die Klone innerhalb des Wells wurden mit vorsichtigem rauf-runter pipettieren vom Well-Grund gelöst und in die nunc Cell Culture Flaks überführt. Das Passagieren der Zellen geschah je nach Zelldichte und Verfärbung des Mediums, meist nach ca. einer Woche. Je nach Zelldichte wurden die Zellen 1:10 oder 1:5 passagiert in nunc Cell Culture Flaks (zur Prozedur, siehe 2.2.1.4) und bei Bedarf eingefroren (siehe 2.2.1.3).

2.2.2 Die „Patch Clamp“-Methode

Die Methode der „Patch Clamp“-Technik beruht im Wesentlichen auf der von Hamill et al., 1981 beschriebenen. Zellmembranen enthalten Ionen- (ionotrope) Kanäle, bei denen man durch die „Voltage Clamp“-Technik Ionenströme messen kann. Wenn man bei Liganden gesteuerten Ionen-Kanälen die Spannung konstant hält und sich der Kanal durch einen Liganden öffnet, fällt der Membranwiderstand ab und ein Ionenfluss, der als treibende Kraft die anliegende Spannung hat, ist so zu detektieren. Dieser Strom kann mittels „outside out“-Patch oder „Whole Cell“-Patch gemessen werden. Erstere Konfiguration ist eine wenige µm² Fläche (nur Patch genannt) der Membran durch die Ionen fließen können. Die Kanäle können in folgenden vier experimentell unterschiedlichen Zuständen sein: Offen, geschlossen, geschlossen durch Agonist erregbar und geschlossen durch Agonist nicht erregbar.

Die Methode, mit der man nun „excised“ oder „Whole Cell“-Patch erhalten kann, wird nun im Folgenden erklärt. Betrachtet man Abbildung 5, so sieht man, dass man mittels Mikromanipulator manuell und durch die Betrachtung eines Mikroskops auf die Zelle, den so genannten ersten Kontakt „cell-attached“ herstellen muss. Durch starkes Ansaugen erhält man den so genannten „seal“ bei dem sich ein Membranwiderstand von mehreren GΩ einstellt. Erhöht man nun durch stärker werdendes Ansaugen den Unterdruck, reißt die Zelle auf. Man erhält die „whole-cell“ Konfiguration bzw. den „Whole Cell“-Patch; dieser offenbart sich durch ein Abfallen des Membranwiderstandes. Mit dieser Konfiguration kann man nun

„Whole Cell“-Messungen machen. Zieht man die Pipette mittels Mikromanipulator nach oben, von dem Petrischalengrund weg, so kann man die „outside-out“ Konfiguration erhalten. Mit diesem beschriebenen „excised Patch“ kann man ebenfalls messen. Mit der „inside-out“ Konfiguration wurde nicht gearbeitet.

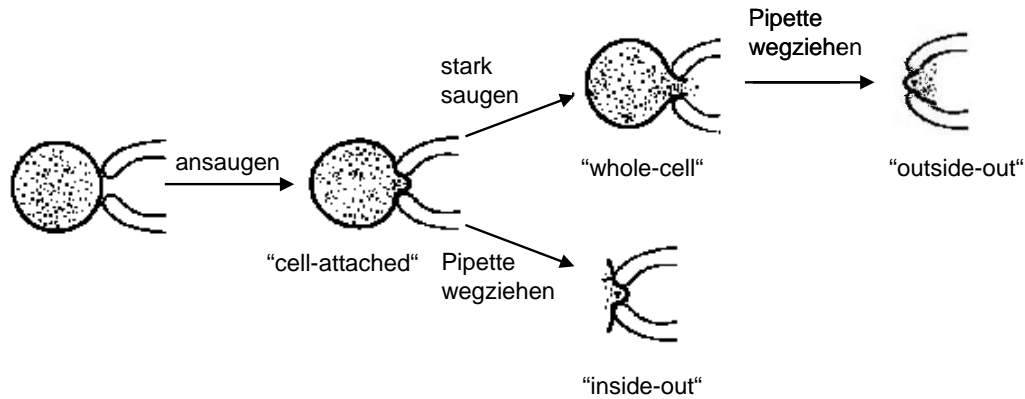


Abbildung 5: Mögliche „Patch Clamp“-Konfigurationen nach Hamill et al., 1981; beschrieben von Linden, 2006. In dieser Arbeit wurden Versuche im „outside out“- im folgenden nur „excised Patch“ genannt und „Whole Cell“-Modus durchgeführt.

2.2.2.1 Durchführung der „Patch Clamp“-Experimente

Bei den durchzuführenden Versuchen wurden die Lösungen täglich neu angesetzt und anschließend in die dafür vorgesehen Reservoirs gefüllt (siehe Abbildung 6). Die Pipettenelektrode und die Badelektrode wurden vor jedem Experiment 24 h chloridiert. Dies erfolgte in einer Natrium-Hypochlorid-Lösung, der Draht erschien nun schwarz bzw. grau anstelle von silbrig. Patchpipetten wurden ebenfalls täglich neu hergestellt. Diese wurden unter Hilfe des Pipettenpullers nach Anleitung des Herstellers zu pfeilähnlichen Pipetten hergestellt (siehe Abbildung 9). Der Poliervorgang, der anschließend noch erfolgen musste, sollte die Pipetten weniger scharfkantig werden lassen. Die Pipette wurde hierbei vor einen Heizdraht gestellt und so lange „poliert“ bis eine gewünschte Form der Pipette und ein Pipettenwiderstand von 3 bis 5 M Ω eintrat. Die Pipette wurde vor dem Experiment mit Intrazellulärlösung (ICS) befüllt. Von der Petrischale wurde vorsichtig das Medium verworfen, so dass sich keine Zellen vom Grund lösen und es wurde Extrazellulärlösung (ECS) hinzugegeben. In die Extrazellulärlösung wurde vorher Glucose (0,2 %) hinzugegeben, unter der Annahme, dass die Zellen weniger in Schock verfallen. Um „excised“ oder „Whole Cell“-Patche nun zu erlangen, wurde wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben vorgegangen. Es sei erwähnt, dass die Auswahl der Zellen für „excised“ Patche eine andere war wie für „Whole

Cell“-Patche. Während man erste nach Möglichkeit im Zellverbund suchte, sollten „Whole Cell“-Patche nach Möglichkeit vereinzelt vorliegen. Erhielt man nun einen „excised“ Patch, so wurde der Patch unter Verwendung des Mikromanipulators vor den Perfusionskopf positioniert. Beim „Whole Cell“-Patch musste der Perfusionskopf vor die Zelle am Petrischalengrund positioniert werden. Je nach gewünschtem Experiment wurden nun die Lösungen vom Applikationssystem (RSC 200, Biologic) appliziert unter Benutzung so genannter „Parameterfiles“ (siehe Abbildung 6). Die „Parameterfiles“ sind Programme, die den Ablauf des Applikationssystems steuern. Der Low-pass-Filter filterte die erhaltenden Daten, bei einer vom Verstärker eingestellten Aufnahme­frequenz von 2 kHz. Digitalisiert wurde das analoge Signal mit einem Analog / Digitalumwandler bei 1 kHz (Digidata 1200). Das Membranpotenzial des Patches wurde erst 200 ms vor Aufnahme der Stromspur von 0 mV auf -100 mV gesetzt. Bei permanenter -100 mV angelegter Spannung würde der Patch schon nach kurzer Zeit kaputt gehen.

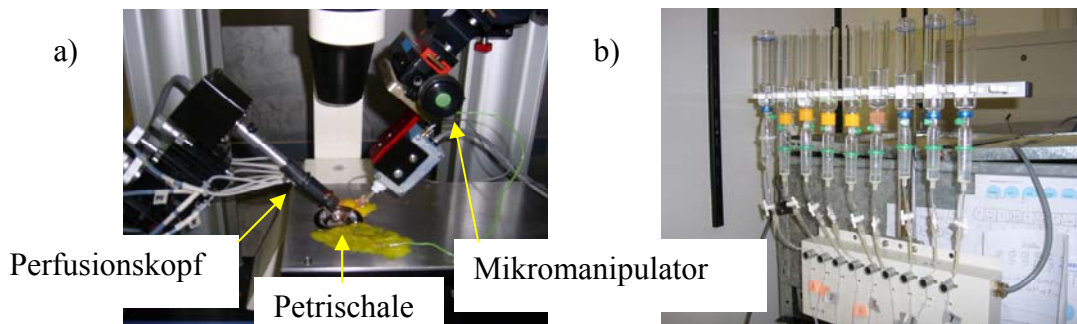


Abbildung 6: a) Aufbau der „Patch Clamp“-Apparatur bei einem Experiment. b) Reservoirs mit Lösungen. Die Lösungen wurden über die Schläuche und den Perfusionskopf auf den „Patch“ appliziert.

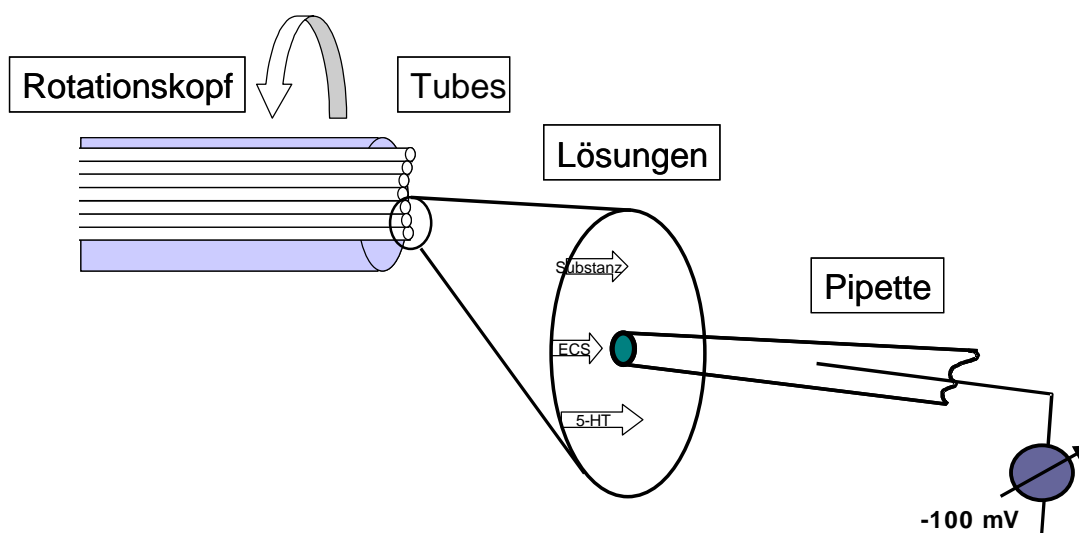


Abbildung 7: Schematische Darstellung der „Patch Clamp“-Apparatur. Auf der Spitze der Pipette sitzt der „excised Patch“ auf den Lösungen appliziert werden können.

2.2.2.2 Das Applikationssystem (RSC 200) von Biologic

Das Applikationssystem ermöglicht einen sehr schnellen Lösungsaustausch von Substanzen ($\leq 2\text{ms}$). Von den Reservoirs, die aus Glas bestehen, fließen die Lösungen durch inerte Teflonschläuche um einen Verlust von lipophilen Phenolderivaten zu vermeiden (Barann, et al., 2000). Die Teflonschläuche sind an zwei Stellen durch flexible Gummischläuche unterbrochen. Einmal dort, wo die Ventile des RSC 200 das Öffnen und Schließen der Substanzzugabe steuern und einmal dort wo der Übergang zwischen Schlauch und Glaskapillar des Perfusionskopfes stattfindet. Die flexiblen Schläuche sind weniger starr und ermöglichen so einen frei rotierenden Perfusionskopf. Das Anbringen der Glaskapillare am Perfusionskopf sowie das Anbringen der Schläuche erfolgte manuell.

2.2.2.3 Lösungsapplikation

Die Programmierung der „Parameterfiles“ erfolgte mithilfe des Programms RSC V1.04. Für verschiedene Experimente, wie sie im Ergebnis-Teil der Arbeit beschrieben sind, benötigte man unterschiedliche Parameterfiles, die den Lösungsaustausch steuerten. Es musste darauf geachtet werden, dass bei den Experimenten der Perfusionskopf immer nur zum benachbarten Tube springt, um so keine vorzeitige Desensibilisierung des Kanals zu erhalten. Nach jeder Versuchsstromspur wurde eine Kontrollstromspur, in der Regel $30\ \mu\text{M}$ 5-HT, durchgeführt. Kontrollstromspuren und Versuchsstromspuren wurden jeweils gemittelt und man analysierte anschließend die auftretenden Effekte. Es wurden folgende in dieser Arbeit beschriebenen Lösungsapplikations-Protokolle verwendet:

1.) Erstellen von Konzentrationswirkungskurven von den drei wesentlichen Applikationsmodi. Die Substanzen wurden folgendermaßen appliziert:

- Equilibrium- oder kontinuierliche Applikation: 1 min vor und während der 5-HT-Applikation.
- Offen-Kanal-Applikation: Ausschließliche Applikation der Substanz während der 5-HT-Applikation.
- Geschlossen-Kanal-Applikation: Applikation der Substanz ausschließlich vor (1 min) der 5-HT-Applikation.

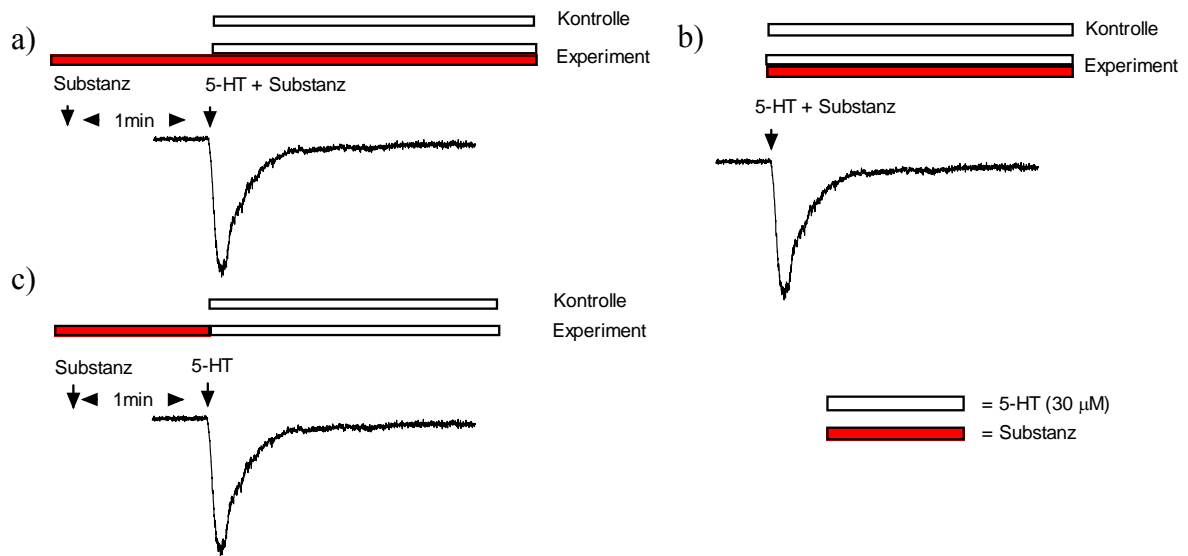


Abbildung 8: a) Equilibrium- b) Offen-Kanal- c) Geschlossen-Kanal-Applikation. Die Applikationsmodi sind vor der Abbildung 8 erklärt. Die Legende zur Abbildung befindet sich unten rechts.

2) Erstellen von Einwaschexperimenten:

Bei dieser Art von Experimenten handelt es sich um verkürzte bzw. verlängerte Equilibrium-Applikationen. Die Zeit des Substanzeinwasches wird variiert von 32 ms (kleinste Einwaschzeit, die das RSC 200 zulässt) auf über z.B. 3 Minuten. Die exakten Zeitintervalle sind der jeweiligen Achse des Graphen zu entnehmen. Man kann durch solche Experimente klären, wie „schnell“ der Effekt einer Substanz ist und welche kinetischen Mechanismen diesem Effekt zu Grunde liegen.

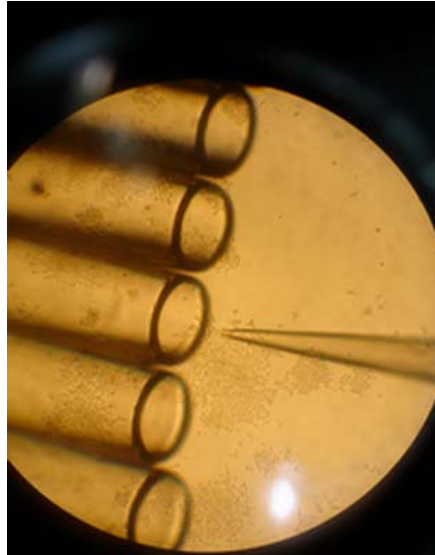


Abbildung 9: Betrachtung durch das Mikroskop. Die Abbildung zeigt die Position der Pipette vor den Tubes des Perfusionskopfes.

2.2.2.4 Datenanalyse

1. Software und Statistik:

Die Stromspuren werden als analoges Signal anschließend digitalisiert (Digidata 1200, Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Die Analyse der Stromspuren wurde mit dem Programm Clampfit[®] durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten wurde in GraphPad Prism3[®] Software als Prozent der Kontrolle und unter Angabe der Standardabweichung (S.D.) angegeben. Die Mittelwerte zweier Gruppen wurden gegebenenfalls mittels gepaarten bzw. ungepaarten zweiseitigen Student's t-test auf Signifikanz untersucht. Befand sich die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $p \leq 0,05$ wurde der Unterschied als signifikant und bei $p \leq 0,01$ als höher signifikant eingestuft.

2. Stromspurenanalyse:

a) In Bezug auf die Amplitude

Der Peak wurde unter Hilfe des Kursers abgegriffen und in pA abgelesen (siehe Abbildung 10). Die Maximalamplitude wird in den analysierten Abbildungen als 5-HT induzierter Strom angegeben (auf der y-Achse).

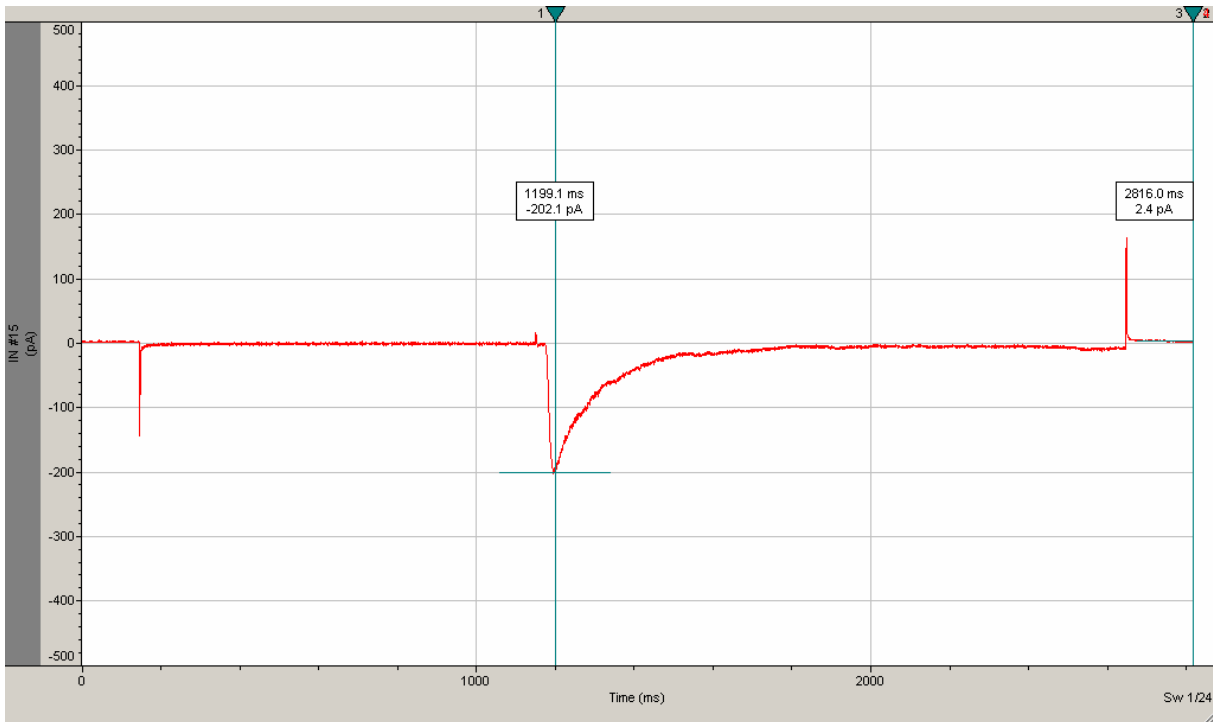


Abbildung 10 : Darstellung einer Originalstromspur in dem Programm Clampex. Mit dem Cursor wird die Amplitudenspitze (Maximalstrom des „Patches“) in pA abgelesen.

Die Effekte, die auftraten wie Potenzierung oder Inhibierung stellen sich nun in einem GraphPad Prism3[®] Graphen dar. Die Konzentrationswirkungskurven wurden in einer vorhandenen Gleichung der Software „gefittet“, die einen sigmoidalen Konzentrations-Wirkungsverlauf mit variablen Slope darstellt.

$$y = \text{bottom} + \frac{(\text{top} - \text{bottom})}{1 + 10^{(\log \text{EC50} - x) * \text{Hillslope}}}$$

Gingen die einzelnen Konzentrationspunkte bei kleiner werdender Konzentration gegen 100 %, so wurde vor dem „Fit“ der „Top“ auf 100 gesetzt und „Bottom“ auf 0. Wurden die Werte bei geringer werdender Konzentration größer als 100 % oder blieben deutlich unter diesem Wert, so wurde der Top variabel gelassen.

Die Einwasch-Experimente wurden ebenfalls als Prozent der 30 μM 5-HT-Kontrolle gemittelt. Geringere Einwaschzeiten (< 1 min) konnten sich entweder als potenzierender Effekt oder als inhibierender Effekt darstellen, gleiches galt für längere Einwaschzeiten (> 1 min).

Die Kinetik der Zeitkonstanten wurde unter Verwendung folgender Gleichung gefittet:

Für Propofol und 2-Isopropylphenol:

$$y = Y_{\max 1} * \exp(-K_1 * X) + (100 - Y_{\max 2} - \text{Plateau}) * \exp(-K_2 * X) + \text{Plateau}$$

Für Phenol und 1,3-Diisopropylbenzol:

$$y = \text{Span} * (-K_1 * X) + \text{Plateau}$$

y = Stromantwort

Y_{max1} = maximale Antwort des 1. Effekts

Y_{max2} = maximale Antwort des 2. Effekts

K₁ = Konstante, mit der 1. Effekt abläuft

K₂ = Konstante, mit der 2. Effekt abläuft

Plateau = Wert, der Effekt 1 von Effekt 2 trennt (d.h. Effekt 1 ist abgeschlossen).

Aus Linden, 2006

3) Zeitkonstanten: Die Aktivierungs- (τ_{ON}) und Inaktivierungszeitkonstanten (τ_{OFF}) wurden nach Möglichkeit biexponentiell (siehe Abbildung 11) mit folgender Standard-Exponentialfunktion nach Chebyshev gefittet:

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

A = Amplitude der Funktion, berechnet ab dem gewählten Startpunkt der Kurvenanpassung

C = Konstante Inaktivierung

n = 1 für monoexponentielle (Abb. 9) und n = 2 für biexponentielle (Abb. 10) Berechnungen

t = Zeit

τ = Zeitkonstante

Aus Linden, 2006

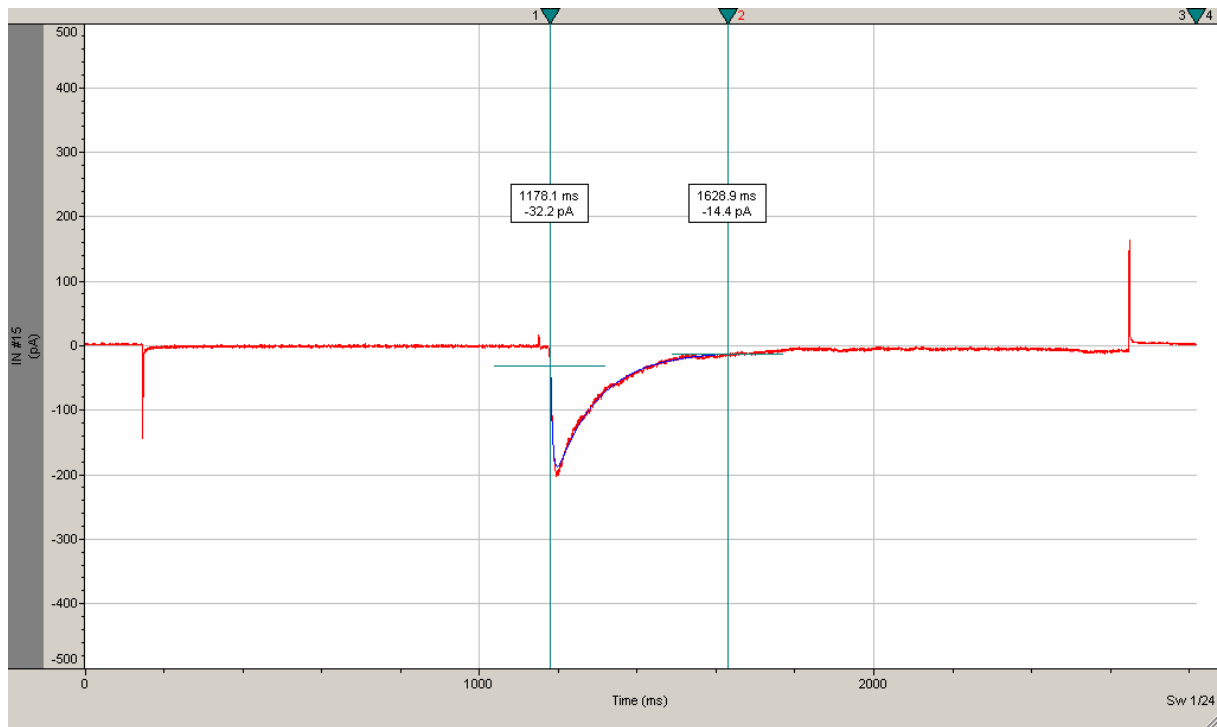


Abbildung 11 : Originalstromspur biexponentiell nach Chebychev „gefittet“. Als blaue Spur dargestellt ist der biexponentiellen „Fit“ zur Bestimmung von τ_{ON} (Aktivierung) und τ_{OFF} (Desensibilisierung). Die Aktivierung verläuft vom Beginn der Stromantwort bis zur Amplitudenspitze. Die Desensibilisierung verläuft von der Amplitudenspitze bis zum „steady state“ Strom

Sollte ein biexponentieller „Fit“ nicht gelingen, so wird monoexponentiell „gefittet“ (siehe Abbildung 12).

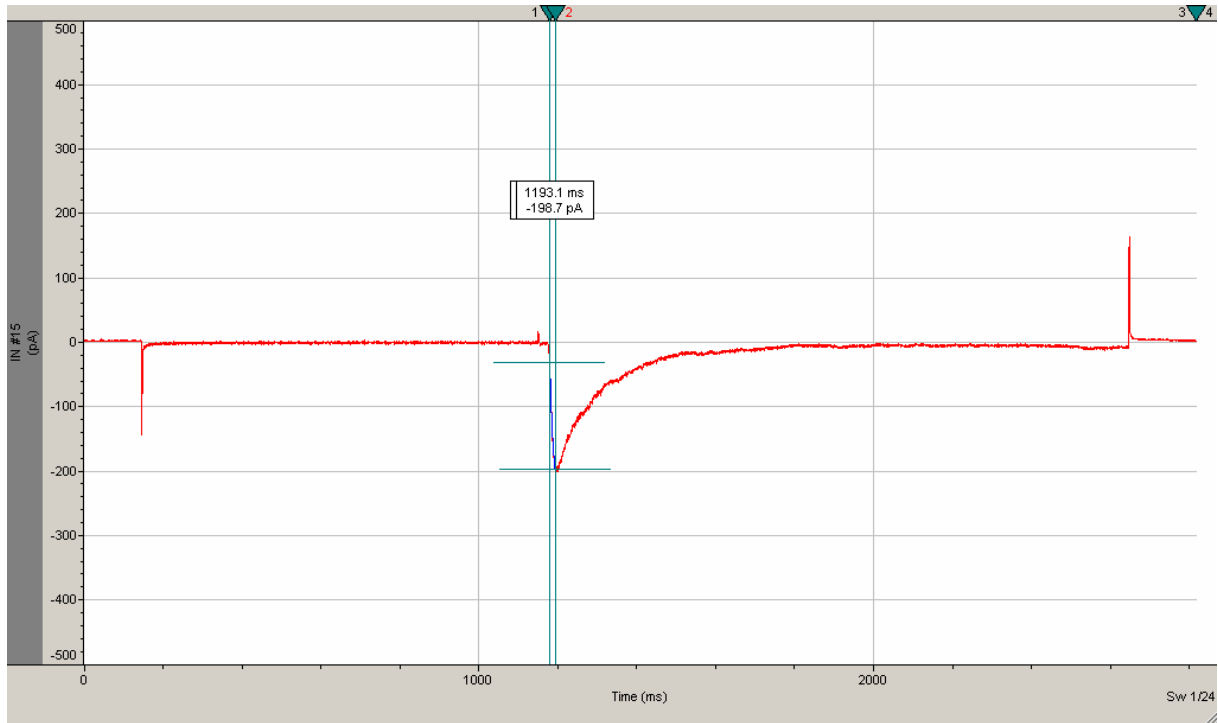


Abbildung 12: Monoexponentieller „Fit“, blau dargestellt, nach Chebychev zur Bestimmung des τ_{ON} (Aktivierung). Die Aktivierung verläuft vom Beginn der Stromantwort bis zur Amplitudenspitze.

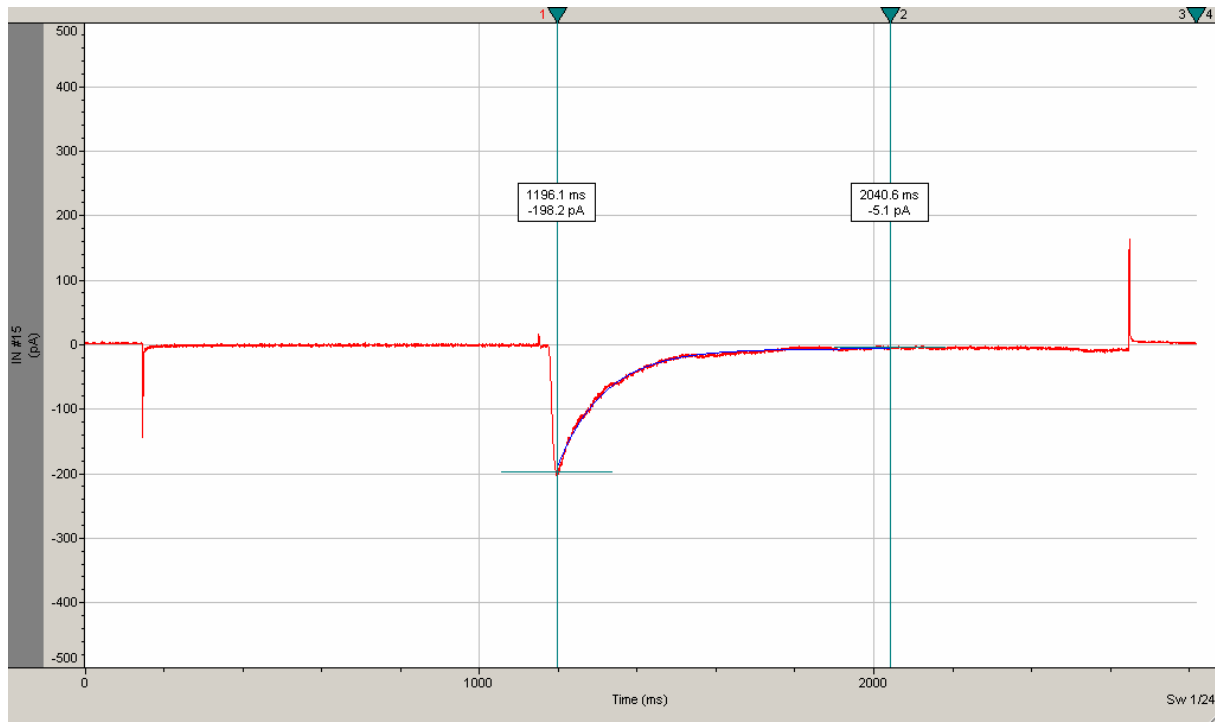


Abbildung 13: Monoexponentieller „Fit“, blau dargestellt, nach Chebychev zur Bestimmung des τ_{OFF} (Desensibilisierung). Die Desensibilisierung verläuft von der Amplitudenspitze bis zum „steady state“ Strom

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

Die nun folgenden Methoden wurden mit freundlicher und sachlicher Unterstützung am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Abt. Bönisch) durchgeführt.

2.2.3.1 Plasmid Mini-Präparation

Für die Isolierung (Präparation) geringer Mengen (bis 20 μg) wurde das „Fast Mini Kit“ der Firma Eppendorf benutzt. Die Isolation ist dem Handbuch des Kits zu entnehmen. Eine kleine Menge Bakterien-Übernachtskultur (1,5 ml) wurde angesetzt. Das Prinzip beruht darauf, dass die Bakterien durch das Kit lysiert werden. Die Plasmid-DNA fällt im Gegensatz zur chromosomalen DNA im basischen Bereich und wird anschließend durch Bindung an die Silicagel-Matrix isoliert werden. Die Plasmid-DNA kann anschließend für weitere Versuche ohne Aufreinigung verwendet werden.

2.2.3.2 Plasmid Maxi-Präparation

Größere Mengen Plasmid-DNA (bis 1,2 mg) erhielt man mit dem Kit „GenElute HP Plasmid Maxiprep“ von der Firma Sigma, die Isolation ist dem Handbuch zu entnehmen. Hierfür

wurde eine 150 ml Bakterien-Übernachtskultur angesetzt. Das Prinzip der Isolierung ist 2.2.3.1 zu entnehmen. Eluierte Plasmid-DNA wurde hier jedoch noch einmal mit Ethanol gewaschen, gefällt und auf 1 µg / ml eingestellt.

2.2.3.3 DNA-Reinigung durch Phenol / Chloroform-Extraktion

Verunreinigungen durch Proteine wurden durch eine Ausschüttelung in einer Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol Lösung (25 : 24 : 1) durchgeführt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation herbeigeführt (13000 g für 1 min). Die wässrige Phase wurde entnommen und einer erneuten Extraktion unterworfen (Chloroform / Isoamylalkohol; 24:1) um noch gelöstes Phenol zu extrahieren. Durch Ethanol wurde die DNA dann präzipitiert.

2.2.3.4 Ethanolpräzipitation von DNA

Die Konzentrierung und Reinigung von DNA wurde unter Verwendung der Ethanolpräzipitation durchgeführt. DNA führt unter Zugabe von Ethanol und in Gegenwart von Na^+ zu einem Niederschlag. Zur Nukleinsäurelösung wurde das 2,5-fache Volumen eiskaltes Ethanol (96 %) und 1 / 10 Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,2) gegeben. Anschließend wurde für 2 h bei -20°C inkubiert und dann zentrifugiert (13000 g, 4°C , 30 min). Der Fällungsansatz wurde 2 mal gewaschen (70 % Ethanol, eiskalt). Nach erneutem zentrifugieren (13000 g, 4°C , 30 min) wurde der Fällungsansatz in der SpeedVac (Savant) getrocknet und in H_2O gelöst.

2.2.3.5 Gelelektrophorese von DNA

Das Prinzip dieser Methode ist ein Molekularsieb, bei dem eine Spannung (1 – 5 V/cm) angelegt wird und die negativ geladenen Nukleinsäuren unter einer bestimmten Geschwindigkeit zur Anode wandern. Die zurückgelegte Wegstrecke ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Basenpaare, das heißt je größer das DNA-Fragment, desto geringer der zurück gelegte Weg. Größenbestimmung erfolgte mittels aufgetragener „DNA-Leiter“ (Gene RulerTM). DNA-Fragmente die zwischen 0,8 – 10 kb groß waren auf 0,7 %-igen (m / V), Fragmente die zwischen 0,1 – 2 kb groß waren auf 2 %-igen (m/V) Gelen aufgetrennt. Die Agarose wurde in TBE-Puffer aufgekocht und mit

Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt und in eine horizontale Kammer gegossen. Die DNA-Proben und die DNA-Leiter wurden mit Puffer (5x) versetzt und in die „Slots“ (Taschen) des Gels eingefüllt. TBE dient hier ebenfalls als Laufpuffer. Ethidiumbromid interkaliert nun mit der DNA und macht diese unter UV-Licht (254 nm) sichtbar.

2.2.3.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Das DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell unter UV-Licht herausgeschnitten. Die Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mit dem Kit „GenElute Agarose Spin Column“ der Firma Sigma.

2.2.3.7 PCR mit Einbau von Restriktions-Schnittstellen

Die Polymerasekettenreaktion ist (engl. polymerase chain reaction) eine *in vitro* Methode, bei der DNA amplifiziert (vervielfältigt) wird. Die Primer (Oligonukleotide) flankieren, das zu amplifizierende Fragment. Das Prinzip, einer typisch angesetzten PCR, beruht auf folgenden Schritten: Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige Helix der DNA, die über Wasserstoffbrückenbindung ihre Struktur aufrecht erhält, durch Erhitzen 94°C, 30 – 60 sek. zerstört. Anschließend erfolgt das „Annealing“ (50 – 60°C, 30 – 60 sek.). Bei diesem Kühlungs-Vorgang werden die Primer an das jeweilige DNA-Fragment hybridisiert. Nun erfolgt der Schritt der Elongation (72°C, 1 min / kb), bei dem die hitzestabile Taq-Polymerase nun Nukleotide an das 3'-Ende der immer länger werdenden Stränge der DNA anlagert. Diese Schritte werden nun bis zu 40 x wiederholt. Dem Schritt Denaturierung kann ein Schritt Initiale Denaturierung vorweg gehen, bei dem einmalig 90 sek. mit 94°C das Reaktionsgefäß erhitzt wird. Diese Schritte laufen in einem „Thermocycler“ ab.

Die Reaktionskomponenten wurden in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis zusammen pipettiert. Der Ansatz enthielt Matrizen-DNA, 0,1 – 1 µg „sense“ und „antisense“ Primer, 0,2 mM dNTPs, Reaktionspuffer indem sich schon MgCl₂ befand und 1,25 U Taq-Polymerase. Die Auswahl der Primer erfolgte aus der Sequenzdatenbank. Die Länge sollte zwischen 15 – 30 Basenpaare aufweisen und der G / C-Gehalt sollte zwischen 40 - 60 % liegen. Die Primer wurden von der Firma MWG bezogen.

Zum Einbau von Restriktionsstellen wurde ein 3'-Überhang innerhalb des Primers so synthetisiert, dass er bei anschließenden Amplifikationen für das jeweilige Restriktionsenzym kodiert (siehe Abbildung 14). Nach Isolierung aus dem Agarosegel (siehe Abschnitt 2.2.3.6) wurden diese PCR-Produkte in den linearisierten Vektor durch Ligation eingebracht.

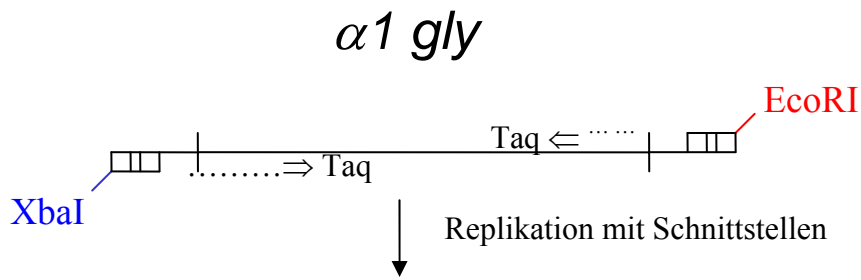


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Primerdesign für die eingebauten Schnittstellen

2.2.3.8 Sequenzierung von DNA

Das Prinzip der DNA-Sequenzierung beruht auf der Methode von Sanger et al. (1977). Hierbei entsteht durch eingesetzte Didesoxynukleotide ein Kettenabbruch der DNA-Sequenz. Unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primern (IRD 800) wurde die Sequenzierung von der Firma MWG unter beschriebener Methode durchgeführt.

2.2.3.9 Restriktionsverdau von DNA

Um zu überprüfen, ob ein DNA-Fragment in dem gewünschten Vektor enthalten ist, kann die gesamte DNA mittels bakterieller Restriktionsenzyme geschnitten werden. Hierbei spalten diese Enzyme hydrolytisch das Rückgrad (Phosphodiester-Bindungen) beider DNA-Stränge. Das Enzym erkennt die für ihn zu schneidende Sequenz. Es entstehen, bei denen unter 2.1.2 beschriebenen Enzymen, so genannte „sticky ends“. Die Stränge weisen kohäsive Enden auf, bei denen die erneute Verknüpfung der komplementären Sequenz besser gelingt. Ein Standardansatz für den Restriktionsverdau enthielt: 0,5 - 1 µg DNA, 2 µl Restriktionsenzym (10 x) und 1 U Restriktionsenzym. Der Ansatz wird mit H₂O auf 20 µl eingestellt. Der Restriktionsverdau wird bei 37°C 1 h durchgeführt.

2.2.3.10 Ligation von DNA

Die Veresterung der Phosphodiester-Brücke der 3'-Hydroxylgruppe und der 5'-Phosphatgruppe wird unter Spaltung von ATP durch eine T4-DNA-Ligase katalysiert. Es wurden ca. 25 ng geschnittener Vektor und das DNA-Insert 1 : 5 bis 1 : 10 mit Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase in einem Volumen von 10 µl über Nacht bei 14°C inkubiert.

2.2.3.11 Transformation kompetenter *E. coli*

Die kompetenten *E. coli* (XL1-Blue, Stratagene und NovaBlue, Novagen) wurden bei -20°C gelagert und aliquotiert mit 50 µl Bakteriensuspension. Auf Eis wurde dieses Aliquot bei Bedarf aufgetaut und 1 –2 µl Ligationsansatz unter mischen hinzugegeben. Nach einer ½ h auf Eis wurde den Zellen ein Hitzeschock (30 sek., 42°C) verabreicht. Nach wiederholter 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und für 10 – 30 min. bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die transformierten Zellen bildeten nun die Resistenzen für das jeweilige Antibiotikum. Von der Suspension wurden nun verschiedene Mengen (50 – 250 µl) auf eine Agarplatte (10 µg Kanamycin; 1,5 % Agar-Agar in LB-Medium) pipettiert und mit einem Drigalskispatel ausgestrichen. Die Agarplatte enthielt das entsprechende Antibiotikum (Ampicilin 200 µg / ml). Nach 16 h (37°C) waren die Platten auswertbar. Die einzelnen Klone konnten nun mit sterilen Zahnstochern gepickt werden und in Bakterien-Übernachtskulturen für erneute Plasmid-Präparationen hochgezogen werden (2.2.3.1 oder 2.2.3.2).

3. Ergebnisse

3.1 Evaluierung der Messapparatur

In diesem Versuchsansatz wurden Offen-, Equilibrium- und Geschlossen-Kanal- Experimente durchgeführt. In diesem speziellen Experiment wurde allerdings auf eine Substanz verzichtet und somit ausschließlich gegen den Puffer gemessen (Negativkontrollen). Der Hintergrund dieses Experimentes war, festzustellen wie groß der Fehler des Messsystems sein kann; also eine Eichung der Messapparatur. Bei verschiedenen extrem geringen Konzentrationen einer Konzentrations-Wirkungskurve erreichte man nicht die 100 % einer Kontrolle, sondern lag teilweise bis zu 10 % unter bzw. über diesem Wert. In der ersten Konzentrations-Wirkungskurve des Benzols (nicht dargestellte Daten) erreichte man eine immer größer werdende Hemmung bei geringeren Konzentrationen. Diese Widersprüchlichkeit wurde nun durch Negativkontrollen untersucht.

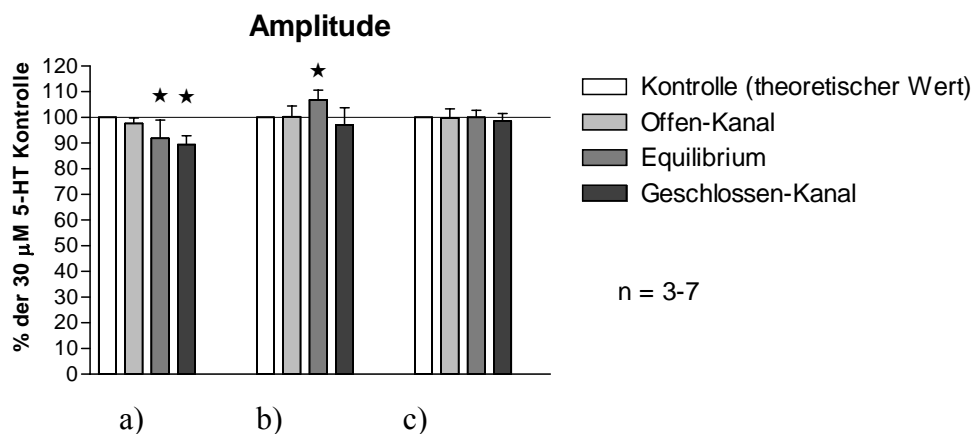


Abbildung 15: Versuchsabläufe der Offen-Kanal-/ Equilibrium-/ Geschlossen-Kanal-Applikation gegen den Puffer gemessen bezogen auf die Amplitude. (*) Signifikante Unterschied von der Kontrolle ($p \leq 0,05$, ungepaarter t-Test) a) Messungen mit alten Schläuchen, nach Benzolverunreinigung. b) Messungen mit neuen Schläuchen. c) Messungen, 3 Monate nachdem die neuen Schläuche angebracht wurden. Die Schläuche wurden 3 Monate mit Phenol-Derivaten verunreinigt. Vermutlich wurden durch den drei monatigen Gebrauch, Weichmacher herausgespült.

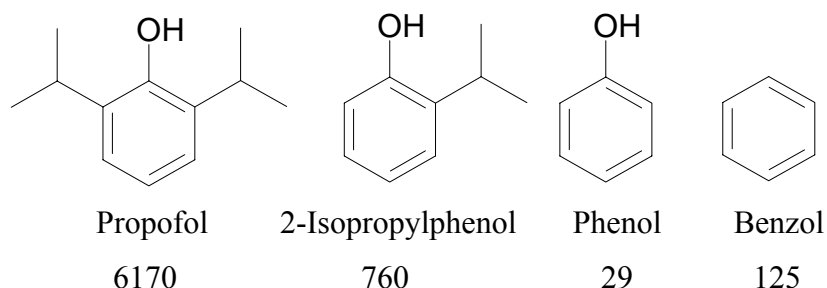
Betrachtet man Abbildung 15 a), so sieht man deutlich, dass die Schläuche die mit Benzol-Konzentrationen von bis zu 10 mM kontaminiert sind, nicht immer dem 100 % Wert entsprechen; insbesondere ist dies in der Equilibrium- u. Geschlossen-Kanal-Applikation zu sehen. Die Mittelwerte der entsprechenden Roh-Daten können zwischen 89 ± 3 (siehe

Abbildung 15 a), Geschlossen-Kanal) unterhalb von 100 %, bis hin zu 107 ± 4 (siehe Abbildung 15 b), Equilibrium) oberhalb von 100 % liegen. Betrachtet man Abbildung 15 b) u. c), so erkennt man, dass es größere Abweichungen oberhalb und unterhalb von 100 % gibt, wenn die Schläuche neuer sind. Der Grund hierfür könnte sein, dass anfangs Weichmacher in den Schläuchen vorhanden sind, die zu einem späteren Zeitpunkt (3 Monate) weggespült sein könnten. Um statistische Fehler durch Verunreinigungen zu vermeiden wurde bei den Experimenten wie folgt vorgegangen: Verfärbten sich die Schläuche von weiß nach gelblich, wurden diese umgehend ausgetauscht. Anschließend wurden diese Schläuche eine halbe Stunde mit zweifach destilliertem Wasser gespült.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Fehler der Messapparatur im schlimmsten dargestellten Fall bis zu ca. 10 % betragen kann. Jedoch kann man davon ausgehen, dass bei hohen Konzentrationen bei dem z.B. der IC_{50} der einzelnen Substanzen ermittelt wird, die Verunreinigung gegenüber dem Effekt der eigentlichen Substanz äußerst gering ist.

3.2 Molekulare Wechselwirkung von Phenol-Derivaten mit dem 5-HT_{3A}-Rezeptor

In folgendem Abschnitt werden die molekularen Mechanismen einzelner Phenol-Derivate, ausgehend vom Propofol, beschrieben. Propofol, das häufigste angewandte intravenöse Anästhetikum eignet sich für den klinischen Gebrauch durch seine gute Steuerung der Narkose und seine vorteilhafte antiemetische Wirkung, im Gegensatz zu anderen Anästhetika. Die Einfachheit der Molekularen Struktur macht es deshalb zur idealen Test-Substanz für das Verständnis molekularer Effekte an ligandengesteuerten Ionenkanälen.



Dargestellt sind von links nach rechts Propofol, 2-Isopropylphenol, Phenol und Benzol. P oct./water ist der Partizipationskoeffizient, der die Verteilung zwischen Ölphase und Wasserphase angibt. Der Partizipationskoeffizient ist somit ein Maß für die Lipophilie der

einzelnen Substanzen. Sollte den Substanzwirkungen ein lipophiler unspezifischer Mechanismus zugrunde liegen, müssten die angegebenen Partizipationswerte proportional zur Wirkpotenz sein. Beispielsweise müsste Propofol um einen Faktor von 8 stärker wirken als 2-Isopropylphenol. Die dargestellten Isopropyl-Substituenten in ortho-Position werden ausgehend vom Propofol bis hin zum Phenol nacheinander eliminiert. Entfernt man die hydrophile Hydroxyl-Gruppe am Phenol, erhält man Benzol. Welche Strukturwirkungsbeziehungen die einzelnen Gruppen (Alkyl-, Hydroxyl-Gruppe und aromatischer Benzolring) haben, soll durch eine Reihe von Experimenten geklärt werden. Unspezifische lipophile Wechselwirkung und / oder spezifische Wechselwirkung stehen als mögliche Mechanismen zur Debatte.

3.2.1 Effekte auf die Amplitude bei Equilibrium-Applikation

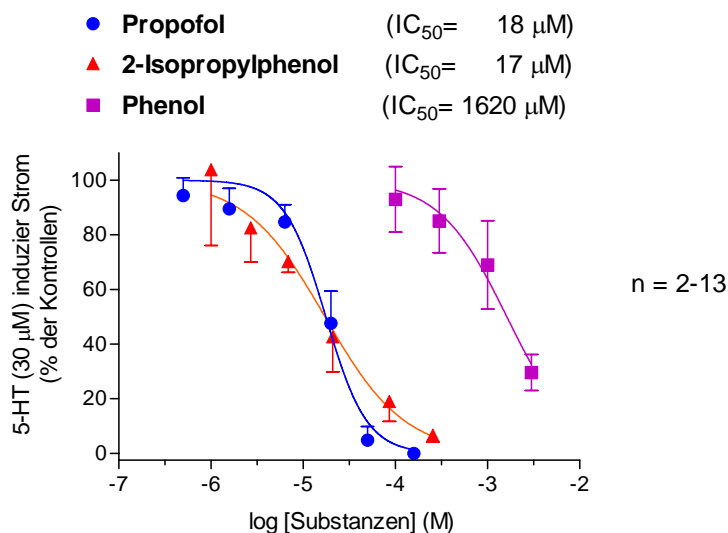


Abbildung 16: Durch Equilibrium Applikation induzierte Amplitudenhemmung der einzelnen Phenol-Derivate mit dargestelltem IC₅₀. Darstellung nach Barann et al. (2008).

Propofol und 2-Isopropylphenol zeigen trotz unterschiedlicher Lipophilie (Faktor \cong 8) einen ähnlichen IC₅₀ (siehe Abbildung 16). Jedoch sind die Steilheiten der Konzentrationswirkungskurven (Propofol, n_{Hill} = 2 ± 0,2; 2-Isopropylphenol n_{Hill} = 1 ± 0,2) unterschiedlich. Phenol ist die geringste potenteste Substanz (IC₅₀ = 1,6 ± 0,2 mM).

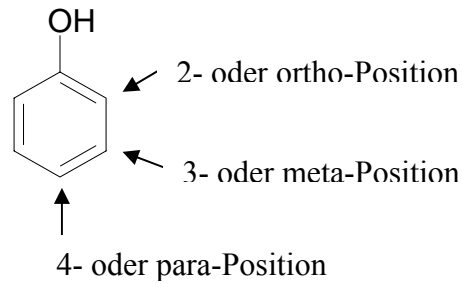


Abbildung 17: Nomenklatur der Substituentenstellung am aromatischen Ring des Phenols.

Da es in den folgenden Abbildungen um die möglichen Positionen von Alkyl-Gruppen am aromatischen Ring des Phenols geht, werden die Formen der Beschriftung in Abbildung 17 noch einmal dargestellt.

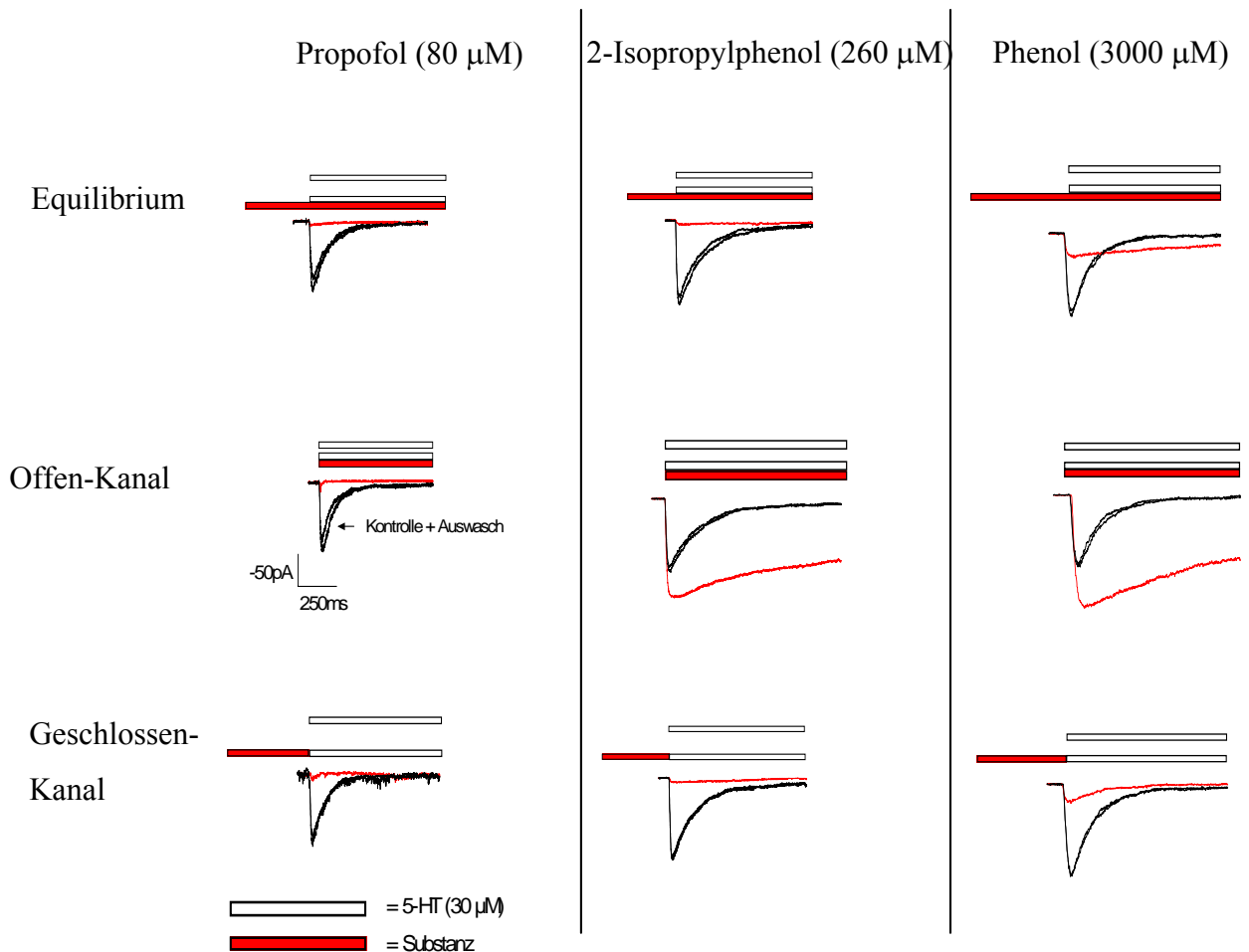


Abbildung 18: Effekt von Propofol, 2-Isopropylphenol und Phenol (siehe oben) bei 30 μM 5-HT und drei verschiedenen Applikationsmodi (linker Rand der Abbildung). Dargestellt sind die jeweiligen Originalstromspuren. Der Substanz-Effekt ist die jeweilige rote Stromspur, die schwarzen Stromspuren zeigen jeweils Kontrolle und Auswasch (Barann et al., 2008).

In der Offen-Kanal Applikation zeigen 2-Isopropylphenol und Phenol eine Potenzierung in Bezug auf die Amplitude, sowie eine deutliche Verlangsamung der Desensibilisierung. In der Equilibrium- und in der Geschlossen-Kanal-Applikation sieht man eine Amplitudenunterdrückung. Durch Applikation der Substanzen vor der 5-HT Zugabe wird die Amplitudenpotenzierung aufgehoben (siehe Abbildung 18).

3.2.1 Effekte auf die Desensibilisierung

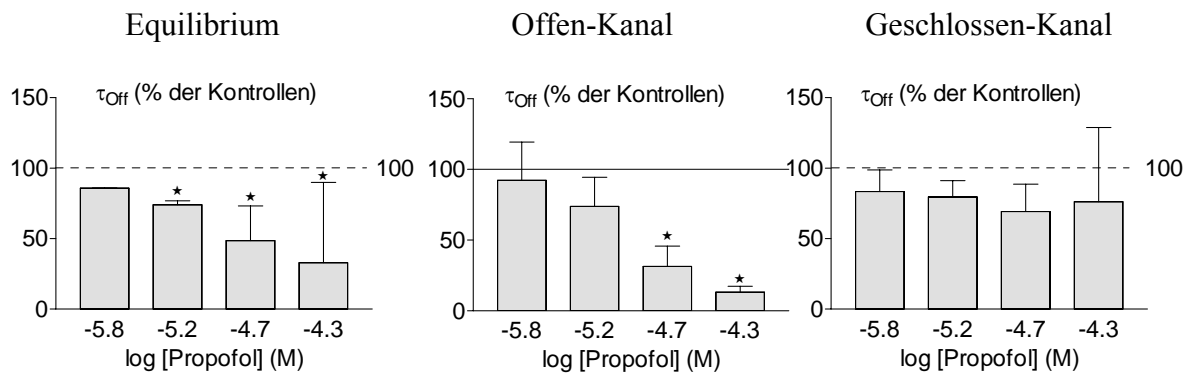


Abbildung 19: Propofol-Desensibilisierungsraten (τ_{Off}) über vier dargestellte Konzentrationswirkungspunkte; n = 2-7. Überhalb der Abbildung sind die Applikationsmodi dargestellt (p < 0,05; gepaarter t-Test); (Barann et al., 2008).

Equilibrium- und Offen-Kanal-Applikation verursachen eine Beschleunigung der Desensibilisierung bei Propofol-Konzentrationen $\geq 6 \mu\text{M}$. Die Geschlossen-Kanal-Applikation (siehe Abbildung 19) zeigt keinen konzentrationsabhängigen Effekt.

Die in der gesamten Arbeit dargestellten Propofol- und 2-Isopropylphenol-Konzentrationen sind teilweise aus der Arbeit von Linden (2006), siehe hierzu Linden (2006).

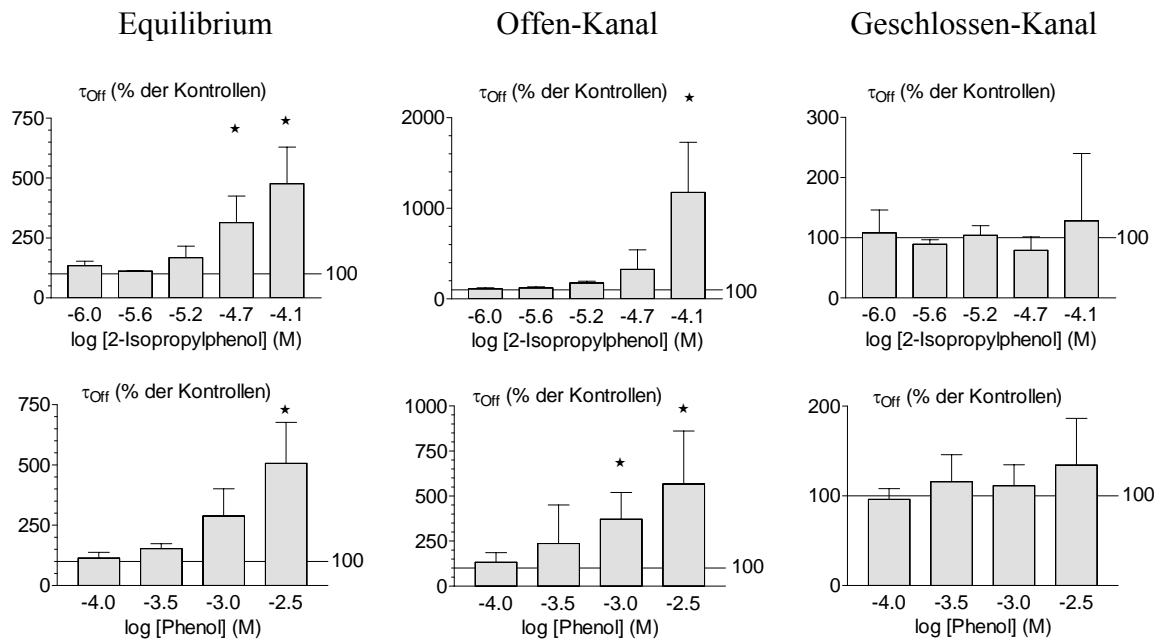


Abbildung 20: 2-Isopropylphenol- (obere Reihe) und Phenol- (untere Reihe) Desensibilisierungsraten (τ_{off}) über den dargestellten Konzentrationswirkungsbereich; $n = 2-7$. ($p < 0,05$; gepaarter t-Test); Überhalb der Abbildung sind die Applikationsmodi dargestellt für 2-Isopropylphenol und Phenol (Barann et al., 2008).

Die beiden Strukturähnlichen Propofolderivate 2-Isopropylphenol ($\geq 20 \mu\text{M}$) und Phenol ($\geq 1 \text{ mM}$) zeigen, sowohl in der Equilibrium als auch in der Offen-Kanal Applikation eine Verlangsamung der Desensibilisierung (z.B. 2-Isopropylphenol um 214% bei $\geq 21 \mu\text{M}$; Phenol 188% bei 1mM) bei steigender Konzentration, während die Geschlossen-Kanal-Applikation unverändert bleibt über den gesamten Konzentrationsbereich (siehe Abbildung 20).

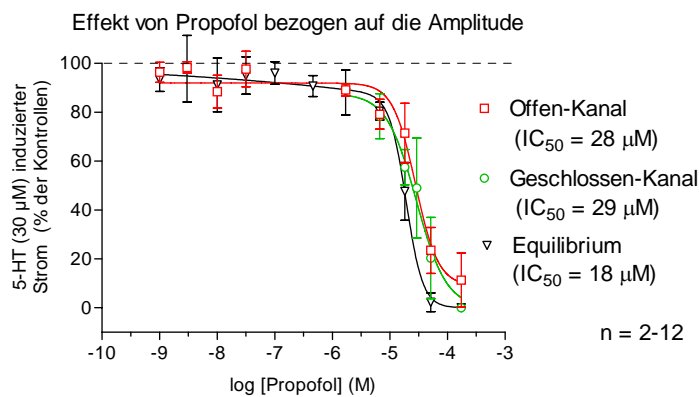


Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurven von Propofol bei drei Applikationsmodi (Offen-Kanal-, Equilibrium-, Geschlossen-Kanal-Applikation) bezogen auf die Amplitude.

Betrachtet man Propofol, so stellt sich eine Hemmung der Amplitude (siehe Abbildung 21) und eine Beschleunigung der Desensibilisierung ($\geq 6 \mu\text{M}$) dar, während bei 2-Isopropylphenol ($\geq 20 \mu\text{M}$) und Phenol ($\geq 1000 \mu\text{M}$) eine Verlangsamung der Desensibilisierung zunimmt (Abbildung 20). Diese gegenteiligen Effekte stellen sich nur dann da, wenn die Substanzen während der 5-HT Zugabe appliziert werden (Equilibrium-, Offen-Kanal-Applikation).

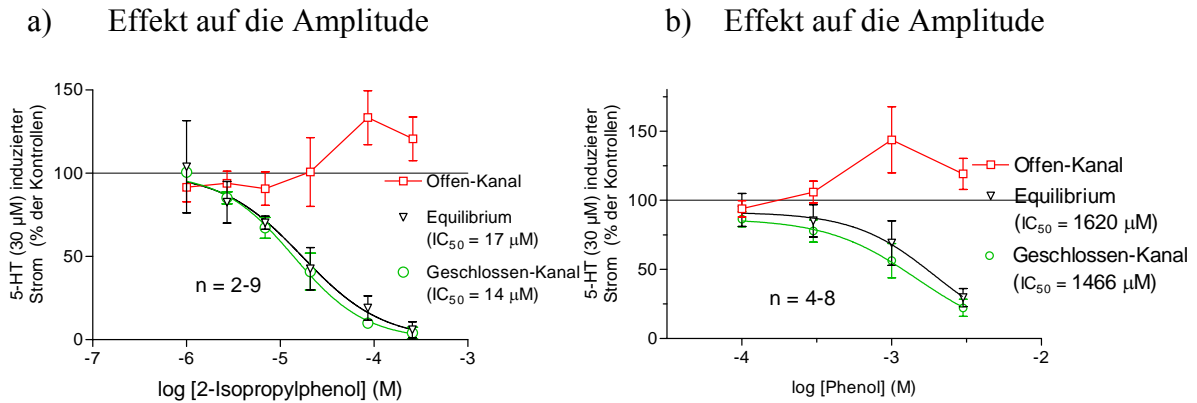


Abbildung 22: a) Amplituden-Hemmung / -Potenzierung von 2-Isopropylphenol bei drei Applikationsmodi (Offen-Kanal-, Equilibrium-, Geschlossen-Kanal-Applikation). b) Dargestellte Amplituden-Hemmung / -Potenzierung von Phenol bei drei Applikationsmodi (Offen-Kanal-, Equilibrium-, Geschlossen-Kanal-Applikation).

Betrachtet man die Offen-Kanal-Applikation bei den in Abbildung 22 dargestellten Propofol-Derivaten, so sieht man deutlich, dass die Potenzierung in einem bestimmten Konzentrationsbereich am stärksten ausgeprägt ist, bei Phenol (1 mM) und bei 2-Isopropylphenol (0,1 mM). Bei steigenden Konzentrationen wird diese Amplitudenpotenzierung bei beiden Propofol-Derivaten durch eine Inhibierung überlagert (siehe Abbildung 22). Dass der potenzierende Effekt dennoch auch bei steigender Konzentration vorhanden ist, sieht man deutlich anhand der Desensibilisierungsraten in Abbildung 20. Betrachtet man Equilibrium- und Geschlossen-Kanal-Applikation (siehe Abbildung 20 u. Abbildung 22), so erkennt man ebenfalls, dass ein potenzierender Effekt in der Equilibrium-Applikation vorhanden ist, wenn man die Equilibrium- mit der Geschlossen-Kanal-Applikation vergleicht. Beim Phenol ist dieser Effekt jedoch deutlicher zu sehen (siehe Abbildung 22).

3.2.2 Schnelle und langsame Substanz-Effekte von Propofol-Derivaten

Da gegenteilige Effekte bei Propofol-Derivaten immer dann auftraten, wenn 5-HT mit der Substanz zusammen appliziert wurde, also dann wenn schnelle Agonisten-Effekte stattfanden, sollte nun in den folgenden Experimenten der Zeitverlauf der Substanzeffekte geklärt werden. Zuzüglich sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Hydroxyl-Gruppe bei den folgenden beschriebenen Effekten beinhaltet.

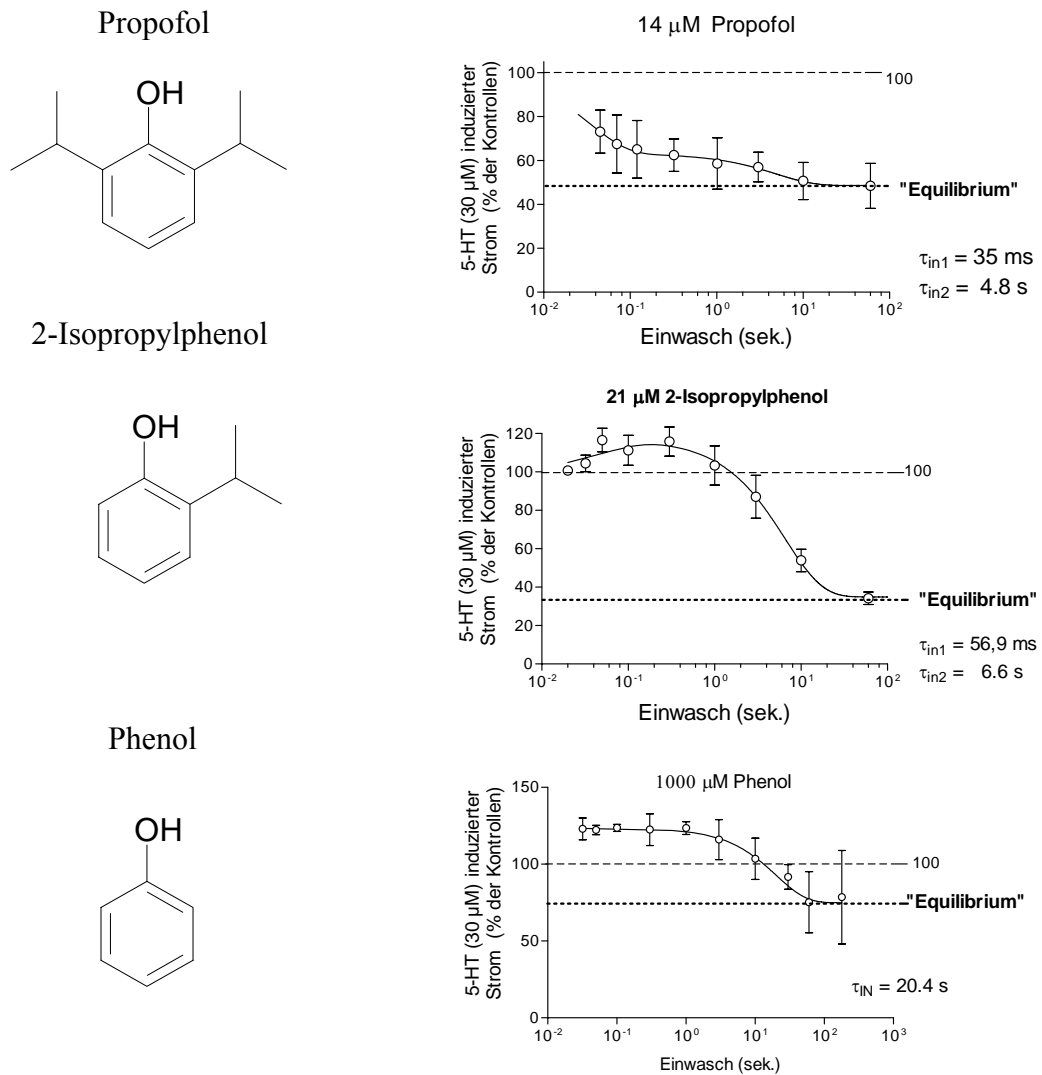
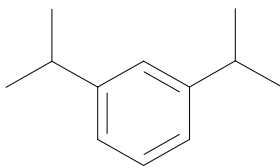


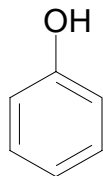
Abbildung 23: Verschiedene Vorapplikationszeiten der drei Substanzen (von oben nach unten): Propofol, 2-Isopropylphenol und Phenol; $n = 2-19$. Ströme sind induziert durch $30 \mu\text{M}$ 5-HT in Gegenwart der jeweiligen Substanz und bei verschiedenen Vorapplikationszeiten der jeweiligen Substanz. Die gewählten Substanz-Konzentrationen liegen im Bereich des IC_{50} -Wertes (Barann et al., 2008). Propofol zeigt einen schnellen und langsamen inhibitorischen Prozess, während bei 2-Isopropylphenol und Phenol der schnelle Prozess eine Potenzierung und der langsame eine Inhibierung ist.

Zwei verschiedene Prozesse wurden für alle drei Substanzen beim Equilibrium-Einwasch beobachtet. Beim Propofol sind diese beiden Effekte inhibitorisch mit einer schnellen Zeitkonstante von 35 ms (τ_{in1}) und einer langsamen von 4,8 sek (τ_{in2}). Beim 2-Isopropylphenol ist der schnelle Prozess ein potenzierender ($\tau_{in1} = 56,9$ ms) und der langsame ein inhibitorischer ($\tau_{in2} = 6,6$ sek.) (siehe Abbildung 23). Der schnelle auftretende potenzierende Effekt des Phenols ist sofort da und demnach nicht auflösbar, der langsame beträgt 20,4 sek. (τ_N).

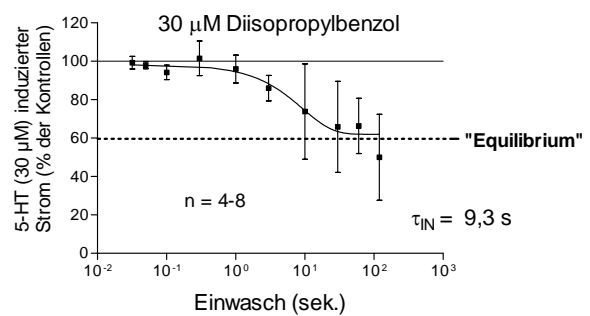
1,3-Diisopropylbenzol



Phenol



a) Equilibrium-Einwasch



b) Geschlossen-Kanal-Einwasch

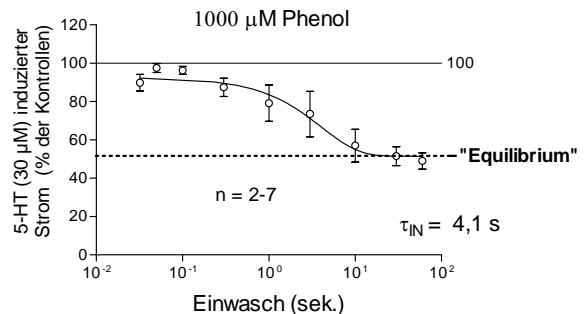


Abbildung 24: a) Equilibrium-Einwasch von 1,3-Diisopropylbenzol (gewählte Konzentration liegt im Bereich des IC_{50}). Ströme sind induziert durch 30 μ M 5-HT in Gegenwart von 1,3-Diisopropylbenzol und bei verschiedenen Vorapplikationszeiten von 1,3-Diisopropylbenzol. b) Geschlossen-Kanal-Einwasch von Phenol (gewählte Konzentration liegt im Bereich des IC_{50}). Ströme sind induziert durch 30 μ M 5-HT und Phenol, welches ausschließlich vor der 5-HT-Applikation bei verschiedenen Vorapplikationszeiten appliziert wird. a) u. b) zeigen, dass nur ein inhibitorischer Prozess zu sehen ist.

Fehlt die Hydroxyl-Gruppe, wie beim 1,3-Diisopropylbenzol (siehe Abbildung 24 a)) ist nur ein langsamer Prozess zu sehen ($\tau_N = 9,3$ s) im Gegensatz zum Propofol (siehe Abbildung 25).

Phenol zeigt ebenfalls, in der Geschlossen-Kanal-Einwasch Applikation über den gesamten Zeitverlauf, nur einen langsamen Prozess ($\tau_N = 4,1$ s) (siehe Abbildung 26 b)) im Gegensatz zum Equilibrium-Einwasch (siehe Abbildung 23).

Sowohl die Hydroxyl-Gruppe als auch die Applikation, mit dem Agonisten zusammen, spielen eine entscheidene Rolle für schnelle Prozesse. Die Hydroxyl-Gruppe scheint demnach, mit schnellen Agonisten-Prozessen, zu interagieren.

Es stellt sich demnach die Frage welche Desensibilisierungswerte ohne Hydroxyl-Gruppe auftreten.

3.2.3 Die Hydroxyl-Gruppe als entscheidender Faktor für Potenzierung

Die dargestellten Ergebnisse in Abbildung 21 und Abbildung 23 zeigen, dass eine Potenzierung, durch beidseitiges Flankieren der Hydroxyl-Gruppe in ortho-Position, aufgehoben wird. Liegt die Hydroxyl-Gruppe von einer ortho-Seite frei vor, findet Potenzierung statt. Die Potenzierung stellt sich immer mit einer Verlangsamung der Desensibilisierung dar (siehe Abbildung 20), sobald die Substanz mit dem Agonisten appliziert wird. Ob die Verlangsamung der Desensibilisierung ebenfalls zu einer Amplituden-Potenzierung führt, hängt davon ab, ob die Potenzierung die Inhibition übertrifft.

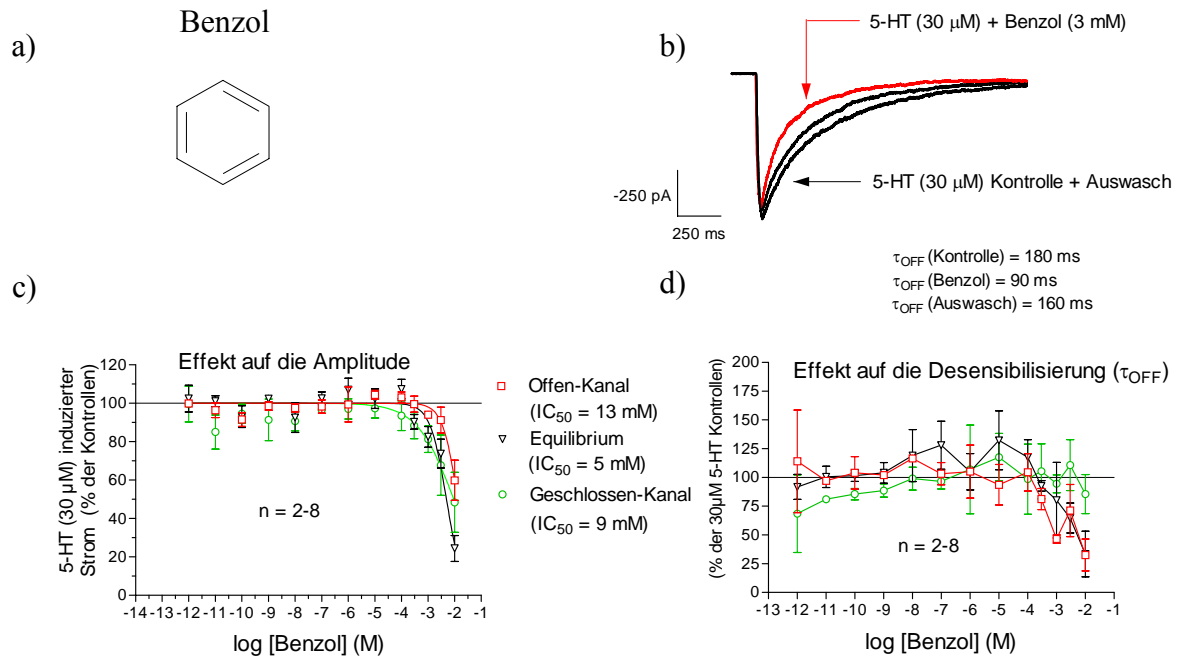


Abbildung 27: a) Strukturformel Benzol b) Offen-Kanal-Experiment mit 3 mM Benzol c) Konzentrations-Wirkungskurven in der Offen-, Equilibrium- und Geschlossen-Kanal-Applikation von Benzol bezogen auf die Amplitude b) Konzentrations-Wirkungskurve in der Offen-, Equilibrium- und Geschlossen-Kanal-Applikation von Benzol bezogen auf die Desensibilisierungsrate (τ_{OFF}).

Benzol zeigte in der Offen-Kanal-Applikation keine Verlangsamung der Desensibilisierung wie Phenol (siehe Abbildung 20). Über den gesamten Konzentrationsverlauf (1 pM bis 10 mM; Abbildung 27 c)) konnte in der Offen-Kanal-Applikation keine Potenzierung gesehen werden, sowie keine deutliche Verlangsamung der Desensibilisierung (siehe Abbildung 27). Eine weitere Fragestellung ist nun, ob die Isopropyl-Gruppen alleine potenzierende Effekte hervorrufen können, sofern überhaupt keine Vorapplikation mit der Substanz stattfindet wie in Abbildung 24 a).

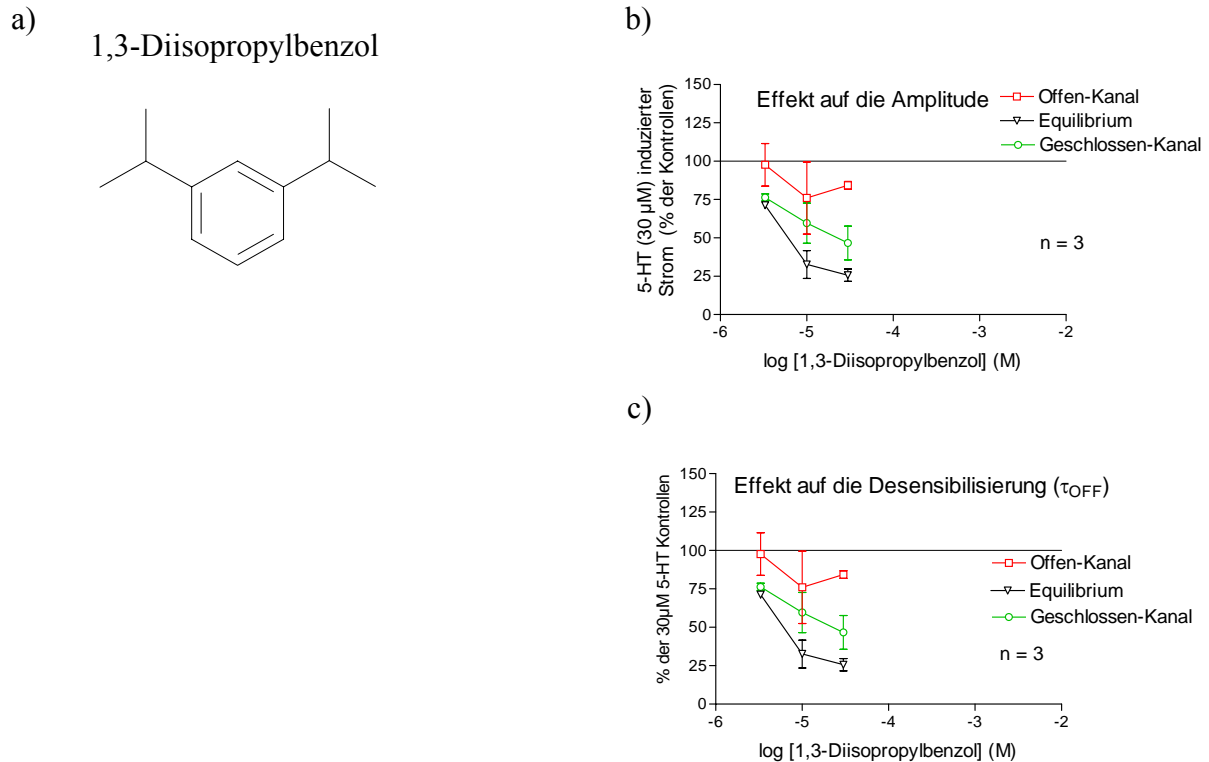


Abbildung 28: a) Strukturformel von 1,3-Diisopropylbenzol. b) Amplitudenhemmung von 1,3-Diisopropylbenzol in der Offen-, Equilibrium- und Geschlossen-Kanal-Applikation c) Desensibilisierungsbeschleunigung (τ_{OFF}) von 1,3-Diisopropylbenzol in der Offen-, Equilibrium- und Geschlossen-Kanal-Applikation

Die Ergebnisse zeigen deutlich, für den angegebenen Konzentrationsbereich, dass 1,3-Diisopropylbenzol ausschließlich eine Amplituden-Inhibierung, sowie eine Beschleunigung der Desensibilisierung bei zunehmender Konzentration verursacht. Isopropyl-Gruppen alleine spielen demnach keine Rolle für die Potenzierung.

3.2.4 Kompetitivität der Phenol-Derivate mit 5-HT

In Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3 konnte gezeigt werden, welche Bedeutung die Hydroxyl-Gruppe und die beiden angrenzenden Isopropyl-Gruppen in ortho-Position, bei den verschiedenen Versuchsabläufen, haben. Inwiefern die Derivate reagieren bzw. mit 5-HT interagieren, sollte durch die folgenden Experimente geklärt werden.

Ob Propofol und die jeweiligen Derivate bei verschiedenen Applikationsmodi an dem 5-HT-Rezeptor binden, musste durch Experimente geklärt werden, die Rückschlüsse auf Kompetitivität zulassen. Bei den folgenden Experimenten wurden deshalb die Agonisten-

Konzentration (5-HT) von 3 μM und 30 μM gewählt, die Substanz-Konzentrationen liegen im Bereich des IC_{50} .

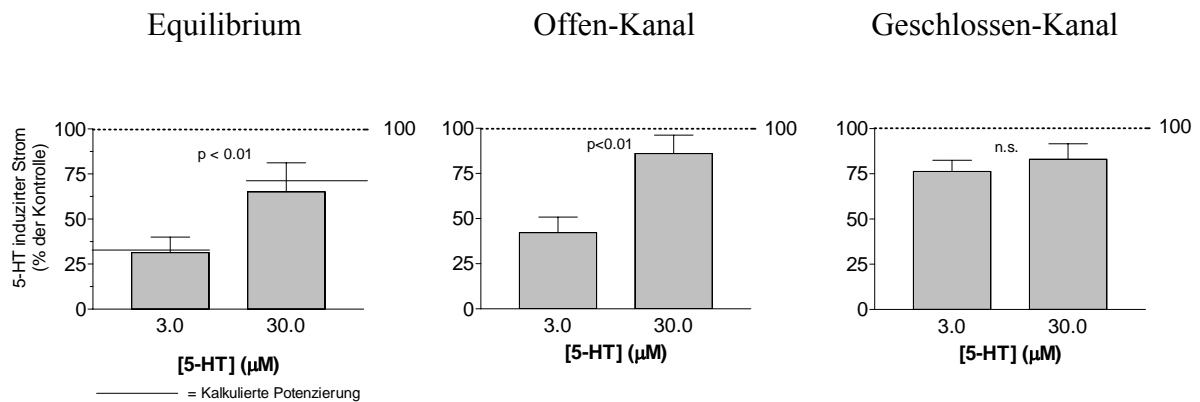


Abbildung 29: Kompetitivitäts-Experimente von Propofol (14 μM), bei zwei verschiedenen 5-HT-Konzentrationen und drei verschiedenen Applikationsmodi, $n = 4-10$ ($p < 0,05$ gepaarter t-Test); (Barann et al., 2008). Equilibrium- und Offen-Kanal-Applikation sind kompetitiv, während die Geschlossen-Kanal-Applikation nicht kompetitiv ist.

Im Fall von Propofol werden bei 3 μM 5-HT induzierte Ströme um 58 % unterdrückt, während 30 μM 5-HT induzierte Ströme den Strom um 14 % unterdrücken (siehe Abbildung 29).

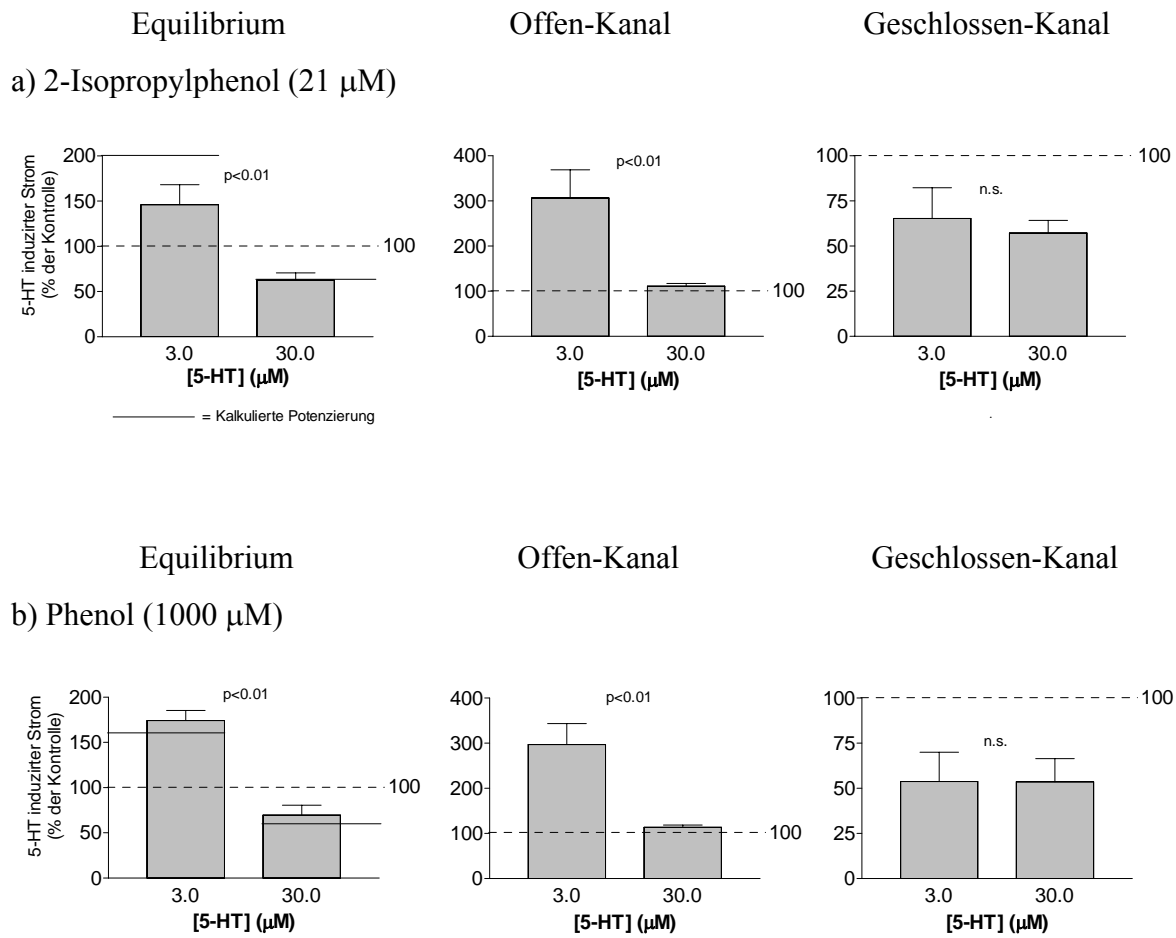


Abbildung 30: Kompetitivitäts-Experimente von a) 2-Isopropylphenol- (21 μM) und b) Phenol-Applikationen (1000 μM), bei zwei verschiedenen 5-HT-Konzentrationen und drei verschiedenen Applikationsmodi, $n = 5-8$ ($p < 0,05$; ungepaarter t-Test); (Barann et al., 2008). 2-Isopropylphenol und Phenol sind in der Equilibrium- und Offen-Kanal-Applikation kompetitiv, während Geschlossen-Kanal-Applikation für beide Derivate nicht kompetitiv ist.

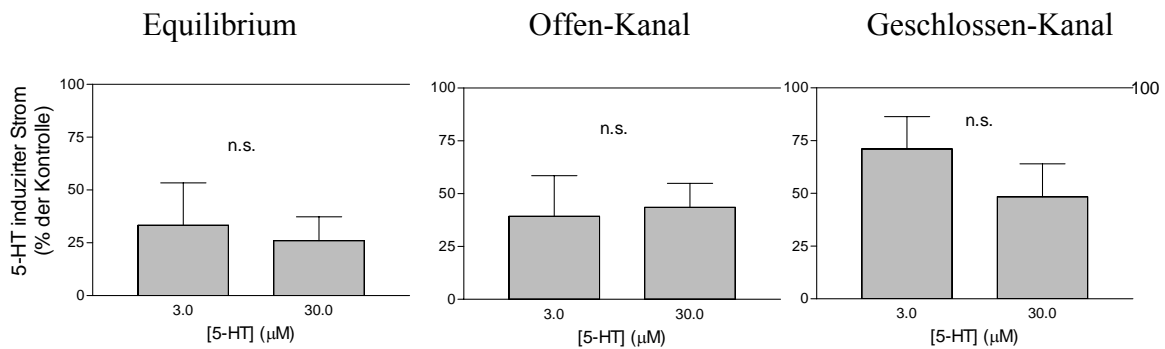


Abbildung 31: Kompetitivitäts-Experimente von Benzol (10 mM), bei zwei verschiedenen 5-HT-Konzentrationen und drei verschiedenen Applikationsmodi, $n = 4-8$ ($p < 0,05$; ungepaarter t-Test). Benzol zeigt in der Equilibrium-, Offen-Kanal- und Geschlossen-Kanal-Applikation keine kompetitivität.

In der Geschlossen-Kanal-Applikation konnte bei allen drei Substanzen kein Unterschied in Bezug auf Inhibierung, bei unterschiedlicher 5-HT-Konzentration, beobachtet werden. Wenn schneller und langsamer Effekt multipliziert werden, für jeweils jede Substanz, erhält man das Produkt für 3 µM und 30 µM 5-HT (durchgezogene Linie, siehe Abbildung 29 u. Abbildung 30). Man sieht, dass der kalkulierte Effekt sehr nahe dem gemessenen ist. 2-Isopropylphenol und Phenol induzieren bei 3 µM 5-HT einen stärkeren potenzierenden Effekt (206 % und 197 %) als bei 30 µM 5-HT (11 % und 13 %).

Die Geschlossen-Kanal-Applikation ist die Applikationsform, bei der die Substanz nicht unmittelbar mit dem Agonisten (5-HT) appliziert wird. Interaktion mit der 5-HT-Bindungsstelle (Kompetitivität) findet also nur dann statt, wenn beide Substanzen zeitgleich appliziert werden und somit zeitgleich interagieren. Betrachtet man Abbildung 24 b), so erkennt man dort, dass in der Geschlossen-Kanal-Einwasch-Applikation sich nur ein langsamer Effekt darstellt, im Gegensatz zu zwei Effekten im Equilibrium-Einwasch (siehe Abbildung 23). Diese Erkenntnis zusammen mit den Kompetitivitäts-Versuchen zeigen eindeutig, dass spezifische Interaktion nur dem Agonisten zusammen stattfindet.

Benzol zeigt bei allen drei Applikationsmodi keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die zwei verschiedenen 5-HT-Konzentrationen (siehe Abbildung 31). Benzol kompetitiert demnach nicht mit dem Agonisten (5-HT) und reagiert demnach nicht unmittelbar mit der 5-HT-Bindungsstelle, wie die drei anderen Substanzen (siehe Abbildung 29 u. Abbildung 30). Die Hydroxyl-Gruppe ist demnach ausschlaggebend für spezifische Interaktion an der 5-HT-Bindungsstelle.

3.2.3 Inhibierung oder Potenzierung aufgrund der Aktivierungs-Kinetik

In dem folgenden Abschnitt werden durch Phenol-Derivat induzierte Effekte gezeigt, die nicht nur auf verschiedene Vorapplikationen der Substanzen zurückzuführen sind. Das schnelle und langsame Aktivierungs-Kinetiken einen Einfluss auf die Amplitude der Ströme haben, zeigt folgendes Experiment:

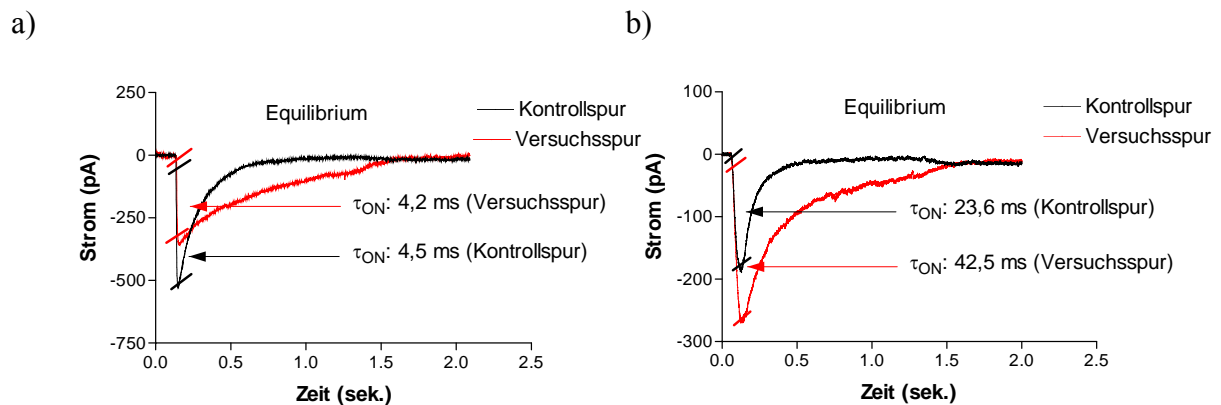


Abbildung 32: Gleiches Experiment (Equilibrium-Applikation mit 1 mM Phenol), zwei verschiedene Patche: a) und b). Der Patch a) zeigt eine Amplitudenhemmung, während der Patch b) eine Amplitudenpotenzierung zeigt.

Trotz gleichem Experiment entsteht beim Patch a) (siehe Abbildung 32), eine Inhibition während beim Patch b) eine Potenzierung stattfindet. Beide Versuche unterscheiden sich in deren Aktivierungs-Kinetik (τ_{ON}). In der nun folgenden Abbildung wird dieses Phänomen bei einer Vielzahl von Patchen statistisch dargestellt.

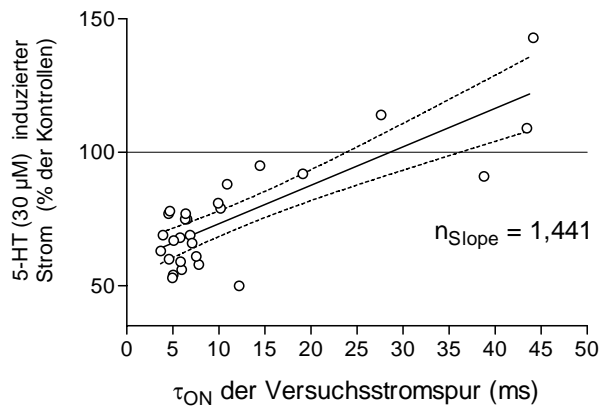


Abbildung 33: Einzeldarstellung von Patchen bei Equilibrium-Applikation von 1mM Phenol (ein Kreis steht für jeweils einen Patch). Aufgrund der unterschiedlichen Aktivierungskinetik (τ_{ON}) kommt es zu einer Potenzierung der Amplitude ($\tau_{ON} \geq 20\text{ms}$) oder zu einer Hemmung ($\tau_{ON} \leq 20\text{ms}$).

Betrachtet man Abbildung 33, so erkennt man deutlich, dass bei steigender τ_{ON} -Kinetik die Inhibierung durch das Phenol abnimmt bzw. in eine Potenzierung übergeht. Hieraus lässt sich deutlich erkennen, dass das Ergebnis eines Experimentes von der Kinetik des individuellen Patches abhängig sein kann.

Ein langsames τ_{ON} (Aktivierungs-Kinetik) begünstigt somit, vermutlich, ein längeres Anbinden von Phenol an den 5-HT Bindungsstellen. Jedoch sollte man beachten, dass Patches mit einer Aktivierungs-Kinetik $\geq 15\text{ ms}$ äußerst selten sind.

3.2.4 Induzierte Amplitude durch Phenol nach Reststrom

Experimente haben gezeigt, dass Phenol nicht nur unmittelbar Einfluss hat, auf den aktivierbaren, also den nicht-desensibilisierten Patch hat, sondern auch Effekte hervorruft bei desensibilisierten Patch wie in Abbildung 34 a) dargestellt.

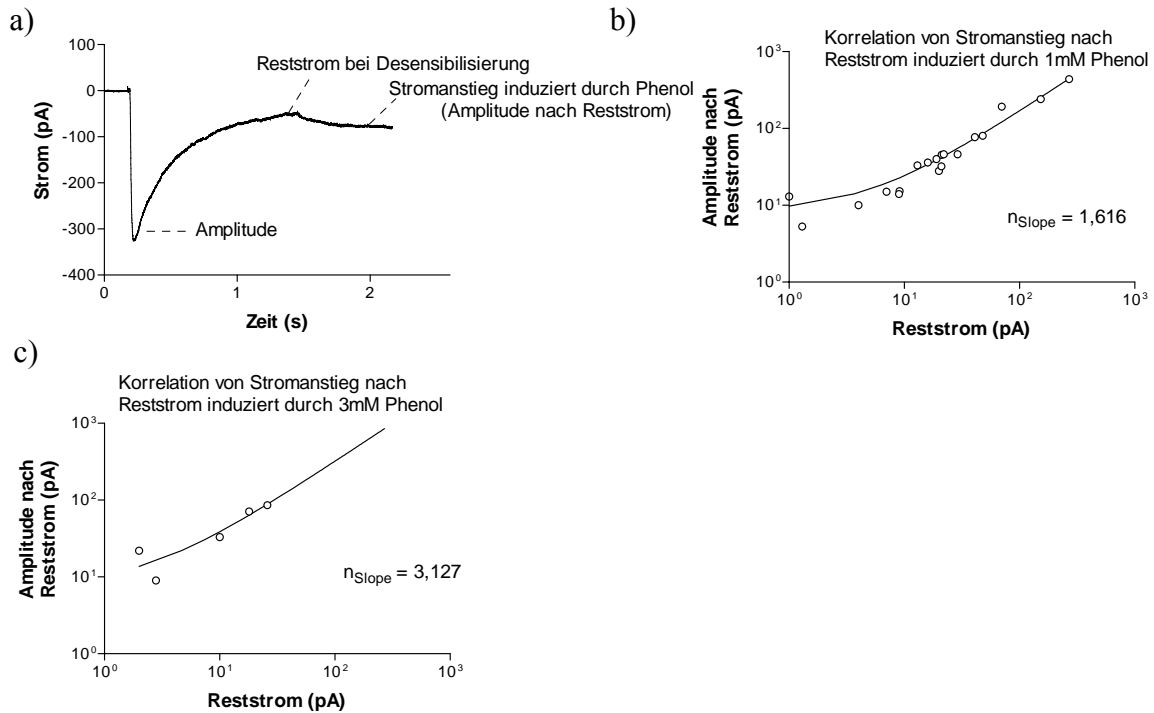


Abbildung 34: a) Stromanstieg nach Reststrom bedingt durch Phenol-Einwasch (Originalstromspur) b) Stromanstieg nach Reststrom bedingt durch 1 mM Phenol-Einwasch (ein Kreis steht für jeweils einen Patch). c) Stromanstieg nach Reststrom bedingt durch 3 mM Phenol-Einwasch (ein Kreis steht für jeweils einen Patch).

In Abbildung 34 a) sieht man deutlich, dass ein Stromanstieg bei desensibilisierten Patch aktiviert wird, induziert durch Phenol. 3 mM Phenol aktiviert eine größere Anzahl von Kanälen als 1 mM Phenol, dieses kann man deutlich anhand unterschiedlicher Steilheiten der Graphen erkennen (3 mM $n_{\text{Slope}}=3,1$; 1 mM $n_{\text{Slope}}=1,6$). Die 3 mM Konzentration aktiviert demnach doppelt so viele Kanäle wie 1 mM. Die Tatsache, dass der Graph einer Korrelation unterliegt, also je mehr Reststrom desto größer die Amplitude nach Reststrom, zeigt, dass bei desensibilisiertem Patch die gleichen Kanäle aktiviert werden, wie bei nicht desensibilisiertem Patch. Denn es gilt, je größer die Amplitude, desto größer der Reststrom (siehe Abbildung 34 a)).

Dieser Stromanstieg findet nicht nur beim vollständig desensibilisiertem Patch statt, sondern auch wenn man zu unterschiedlichen Zeiten, auf teils desensibilisierte Patche, Phenol appliziert (siehe Abbildung 35).

Ergebnisse

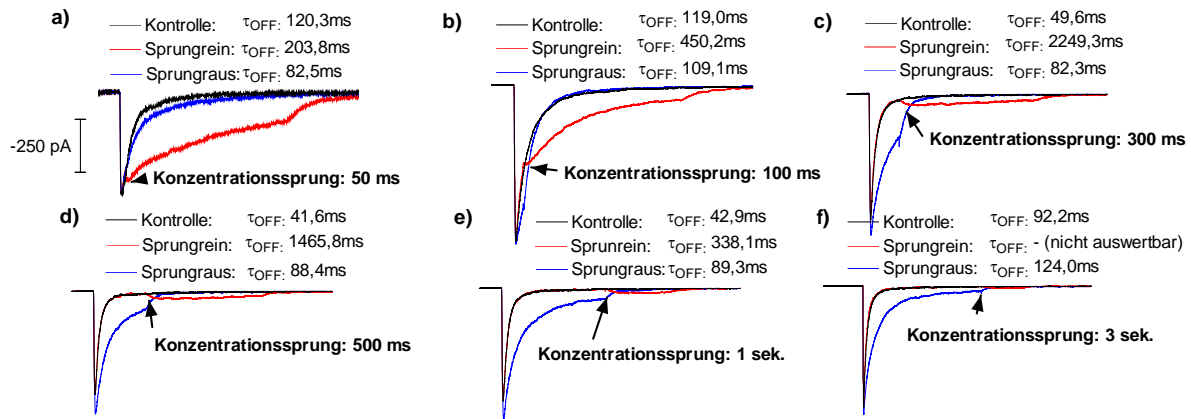


Abbildung 35: „Sprung-Experimente“. Darstellung von Stromspuren bei denen zuzüglich, bei verschiedenen Einwasch-Zeiten a) 50ms, b) 100ms, c) 300ms, d) 500ms, e) 1sek., f) 3 sek.

1 mM Phenol zur 30 μ M 5-HT-Applikation hinzugegeben bzw. ausgewaschen wurde. Die Desensibilisierungsraten der jeweiligen Patche sind oberhalb der einzelnen Abbildungen zu entnehmen.

Genauso wie eine Desensibilisierung bei Phenol-Einwasch (Sprungrein) verlangsamt wird, die sich immer in einer Amplituden-Potenzierung darstellt, findet umgekehrtes bei einem „Wegnehmen“ (Sprungraus) von Phenol und einer weiterhin reinen 5-HT-Applikation statt. Abbildung 35 a)- c) zeigen, dass je weiter fortgeschritten die Desensibilisierung ist, desto stärker wird der durch Phenol eingeleitete verlangsamt Desensibilisierungs-Prozess. Warum Abbildung 35 d)- f) dies nicht wiedergeben, könnte aufgrund erschwerter Auswertung, in Bezug auf die jeweiligen „Fitting-Parameter“ (siehe Abschnitt 2.2.2.4), zurückzuführen sein.

Phenol aktiviert hier also Kanäle, während es Phenol-Derivate gibt bei denen eine Inhibierung, im Bereich des Reststroms, durch ECS (Puffer)-Einwasch aufgehoben wird (siehe Abbildung 36 b))

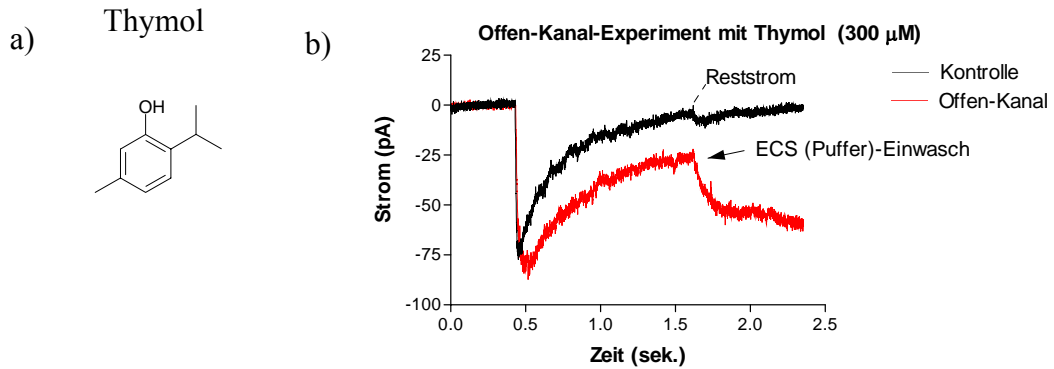


Abbildung 36: a) Strukturformel Thymol b) Experiment in der Offen-Kanal-Applikation mit 300 μM Thymol, mit anschließendem ECS-Einwasch dargestellt. Durch den ECS-Einwasch wird der Kanal-Block-Effekt des Thymols aufgehoben.

Betrachtet man Abbildung 36 b), so erkennt man, dass Thymol in der Offen-Kanal-Applikation die Amplitude nicht nur potenziert, sondern auch inhibiert. Dieses Phänomen ist dadurch zu erkennen, dass der ECS-Einwasch eine Inhibierung aufhebt. Dennoch überlagert die Potenzierung die Inhibierung bezogen auf die Amplitude auch bei hohen Thymol-Konzentrationen (siehe Abbildung 36 b)). Dieser Effekt findet bei Phenol nicht statt.

3.2.5 Spezifische Effekte unterliegen zuzüglich der Lipophilie

Unter der Berücksichtigung das Phenol-Derivate mit Hydroxyl-Gruppe spezifischen Mechanismen unterliegen, in der Offen-Kanal- und der Equilibrium-Applikation, wie bei Kompetitions-Experimenten mit 5-HT (siehe Abschnitt 3.2.4) oder bei Einwasch-Experimenten, bei denen sich schnelle und langsame Effekte zeigen (siehe Abschnitt 3.2.2); unterliegt die Geschlossen-Kanal-Applikation einem anderen Mechanismus (nicht spezifisch), (siehe Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2).

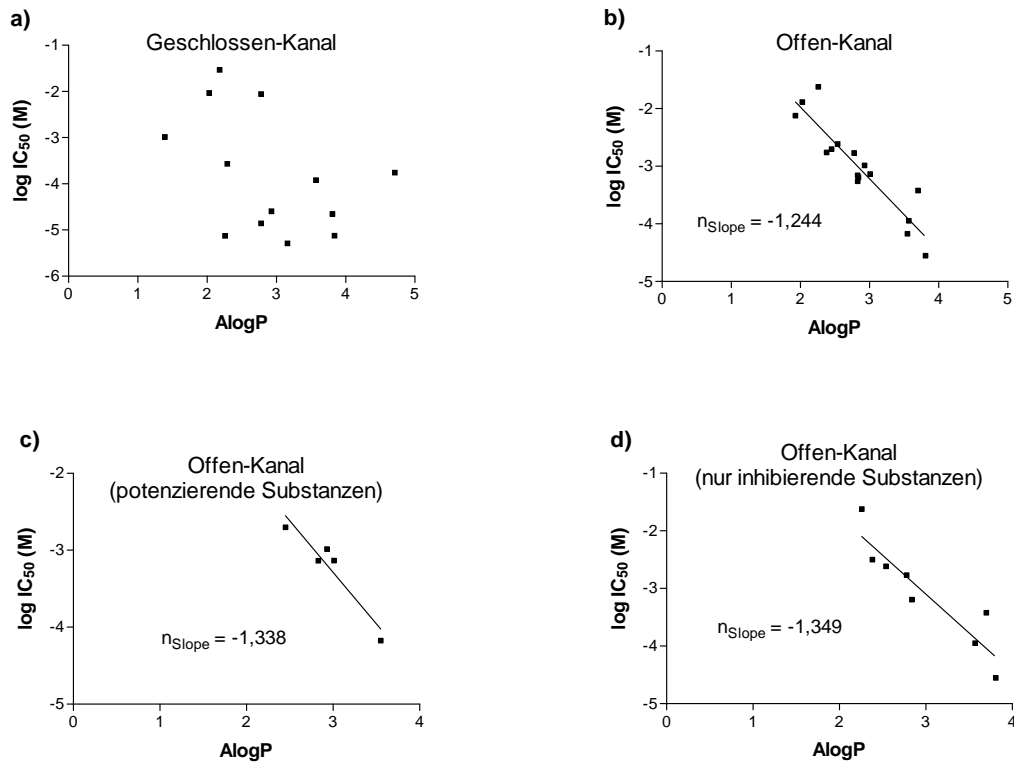


Abbildung 37 : Meyer-Overton-Korrelationen. Aufgetragen sind alle vorhandenen IC_{50} -Werte der einzelnen Substanzen aus der Tabelle 1 gegen die $AlogP$ -Werte, die das Maß für Lipophilie darstellt.

Die in Abbildung 37 dargestellten Meyer-Overton-Korrelationen zeigen den Zusammenhang zwischen Potenz (IC_{50}) und Lipophilie ($AlogP$). Abbildung 37 b) zeigt, dass der spezifische Mechanismus, der sich in der Offen-Kanal-Applikation offenbart, zusätzlich einer lipophilen Wechselwirkung unterliegt. Unabhängig davon, ob die Hydroxyl-Gruppe partiell frei ist, wie bei den potenzierenden Substanzen (siehe Abbildung 37 c)) oder von beiden ortho-Seiten vollständig umschlossen, wie bei den nur inhibierenden Substanzen (siehe Abbildung 37 d)). Der unspezifische Mechanismus (Geschlossen-Kanal-Applikation) (siehe Abbildung 37 a)) unterliegt nicht einer solchen Korrelation.

3.3 Unterdrückung der Potenzierung durch Alkyl-Gruppen

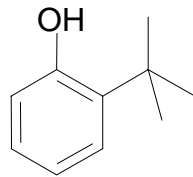
Wie im Abschnitt 3.2 schon dargestellt, verhindert eine beidseitige Flankierung der Hydroxyl-Gruppe, in ortho-Position durch Isopropyl-Gruppen, den Mechanismus der Potenzierung, während bei 2-Isopropylphenol Potenzierungseffekte deutlich auftreten. Eine mögliche Erklärung ist eine sterische Behinderung der Hydroxyl-Gruppe, sofern diese von beiden

Seiten (ortho) erfolgt. Erfolgt die Abschirmung partiell, also nur von einer Seite, wie beim 2-Isopropylphenol, so ist die Folge eine Potenzierung.

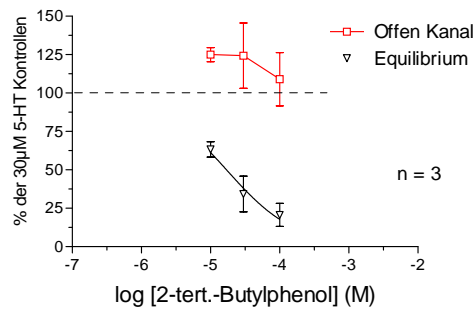
3.3.1 Vergrößerung der Alkyl-Gruppe in ortho-Position

Ob man auch durch eine einseitige Flankierung der Hydroxyl-Gruppe, in ortho-Position, die Potenzierung aufheben kann, sollte durch folgende Experimente geklärt werden.

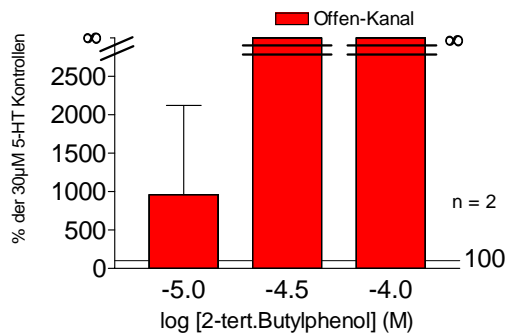
a) 2-tert. Butylphenol



b) Effekt auf die Amplitude



c) Effekt auf die Desensibilisierung (τ_{OFF})



d) Effekt auf die Desensibilisierung (τ_{OFF})

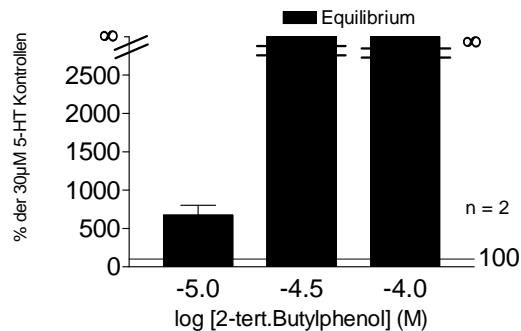


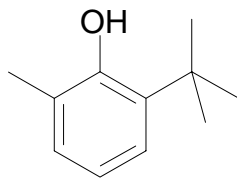
Abbildung 38: a) Strukturformel 2-tert. Butylphenol. b) Amplituden-Potenzierung /-Hemmung von 2-tert. Butylphenol in Offen- und Equilibrium-Applikation. c) Desensibilisierungsverlangsamung (τ_{OFF}) von 2-tert. Butylphenol in der Offen-Kanal-Applikation d) Desensibilisierungsverlangsamung (τ_{OFF}) von 2-tert. Butylphenol in der Equilibrium-Applikation

Trotz einer Vergrößerung der Alkyl-Gruppe in ortho-Position (2-ter. Butyl) konnte der Effekt der Potenzierung nicht ausgeschaltet werden (siehe Abbildung 38). Eine Verlangsamung der Desensibilisierung, die bei vorherig beschriebenen Phenol-Derivaten eine Potenzierung offenbart, sowohl in Offen-Kanal- als auch in Equilibrium-Applikation, war bei 2-

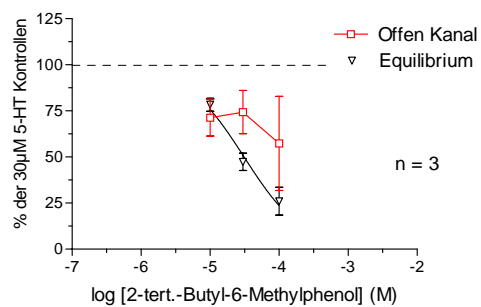
tert.-Butylphenol ab einer Konzentration von 30 μM nicht mehr auflösbar (siehe Abbildung 38 c) und d)).

Der Effekt der Potenzierung konnte beim 2-tert.-Butylphenol-6-Methylphenol wieder aufgehoben werden. Betrachtet man Abbildung 39, so erkennt man, dass im gleichen Konzentrationsbereich 2-ter.-Butyl-6-Methylphenol, in der Offen-Kanal-Applikation, nicht mehr potenziert. Außerdem beschleunigt 2-ter.-Butyl-6-Methylphenol die Desensibilisierung (siehe Abbildung 39), während ohne die Methyl-Gruppe der Prozess verlangsamt (siehe Abbildung 38). Der Effekt scheint hier jedoch für angegebene Konzentrationspunkte nicht konzentrationsabhängig zu sein.

a) 2-tert.-Butyl-6-Methylphenol



b) Effekt auf die Amplitude



c) Effekt auf die Desensibilisierung (τ_{OFF})

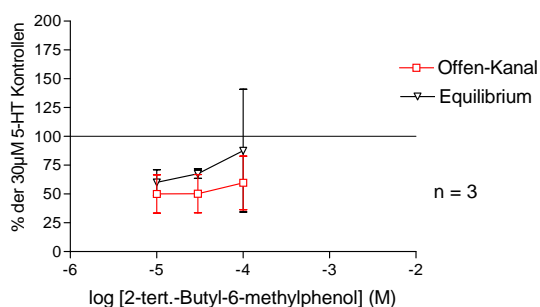
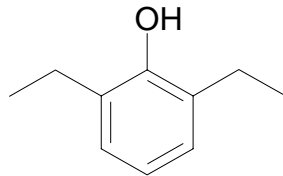


Abbildung 39: a) Strukturformel 2-tert.-Butyl-6-Methylphenol. b) Amplitudenhemmung von 2-ter.-Butyl-6-Methylphenol in Offen- und Equilibrium-Applikation c) Desensibilisierungsbeschleunigung (τ_{OFF}) von 2-ter.-Butyl-6-Methylphenol in Offen- und Equilibrium-Applikation.

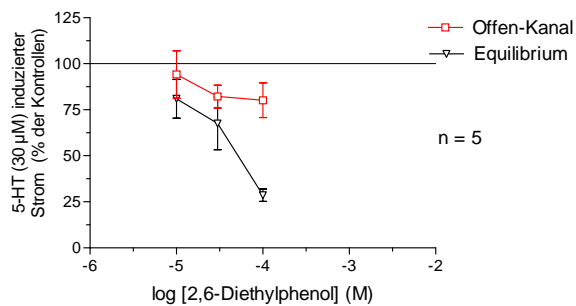
3.3.2 Flankieren der Hydroxyl-Gruppe durch kleinere Alkyl-Gruppen

Das Ergebnis in Abbildung 39 erbrachte eine neue interessante Fragestellung. Reichen grundsätzlich kleine Alkyl-Gruppen aus, in ortho-Position, um Potenzierungsmechanismen auszuschalten? Schirmen diese Gruppen von geringer Größe bzw. Umfang die Hydroxyl-Gruppe sterisch ab? Um dieser Fragen nachzugehen, wurden folgende Versuche durchgeführt:

a) 2,6-Diethylphenol



b) Effekt auf die Amplitude



c) Effekt auf die Desensibilisierung (τ_{OFF})

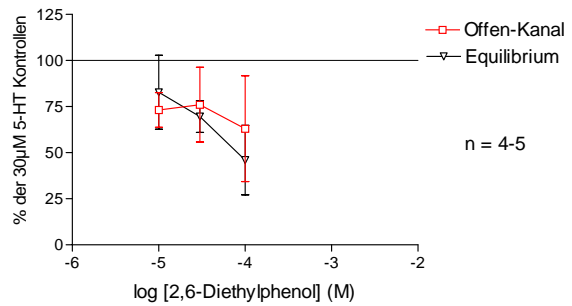


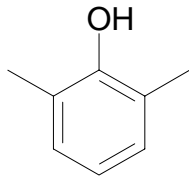
Abbildung 40: a) Strukturformel 2,6-Diethylphenol. b) Konzentrationswirkungskurve der Amplitude von 2,6-Diethylphenol in Offen- und Equilibrium-Applikation. c) Desensibilisierungsbeschleunigung (τ_{OFF}) von 2,6-Diethylphenol in Offen- und Equilibrium-Applikation.

Betrachtet man Abbildung 40, so erkennt man, dass Ethyl-Gruppen die von beiden ortho-Positionen die Hydroxyl-Gruppe des Phenols flankieren, alleine ausreichen Inhibition hervorzurufen. Für den beschriebenen Konzentrationsbereich konnte weder eine Potenzierung der Amplitude, in der Offen-Kanal-Applikation, gezeigt werden (siehe Abbildung 40 b)), noch eine Verlangsamung der Desensibilisierung (siehe Abbildung 40 c)).

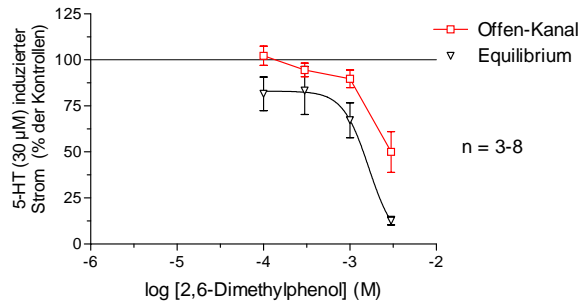
Beide Ethyl-Gruppen reichen also aus, um den Effekt der Potenzierung auszuschalten. Folglich stellt sich nun die Frage ob dies im Fall von 2,6-Dimethylphenol ebenfalls so ist.

a)

2,6-Dimethylphenol



b) Effekt auf die Amplitude



c) Effekt auf die Desensibilisierung (τ_{OFF})

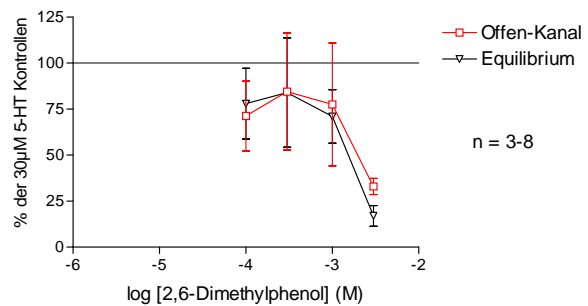


Abbildung 41: a) Strukturformel 2,6-Dimethylphenol. b) Konzentrationswirkungskurve der Amplitude von 2,6-Dimethylphenol in Offen- und Equilibrium-Applikation. c) Desensibilisierungsbeschleunigung (τ_{OFF}) von 2,6-Dimethylphenol in Offen- und Equilibrium-Applikation.

In dem in Abbildung 41 b) und c) dargestellten Konzentrationsbereich findet bei 2,6-Dimethylphenol eine Inhibition der Amplitude und eine Beschleunigung der Desensibilisierung statt. Der Effekt ist konzentrationsabhängig.

Methyl-Gruppen, welche die Hydroxyl-Gruppe von beiden Seiten flankieren, reichen aus um den Effekt der Potenzierung aufzuheben. Eine ausreichende sterische Abschirmung der Hydroxyl-Gruppe ist demnach durch diese kleinste Form der Alkyl-Gruppen gegeben.

Postuliert man, dass Phenol-Derivate direkt mit der 5-HT-Bindungsstelle durch Verstärkung der Effekte bei geringerer Agonisten-Konzentration (siehe Abbildung 29 u. Abbildung 30) interagieren und unterschiedliche Mechanismen, wie Potenzierung und Inhibierung hervorrufen, so stellt sich die Frage in wie weit Alkyl-Gruppen durch sterische Behinderung der Hydroxyl-Gruppe keine Wechselwirkung mit der 5-HT-Bindungsstelle zulassen.

3.3.3 Inhibition oder Potenzierung durch andere Positionen am aromatischen Ring

In den folgenden Abbildungen werden Phenol-Derivate dargestellt, die außerhalb der ortho-Position am aromatischen Ring für inhibierende Mechanismen sorgen.

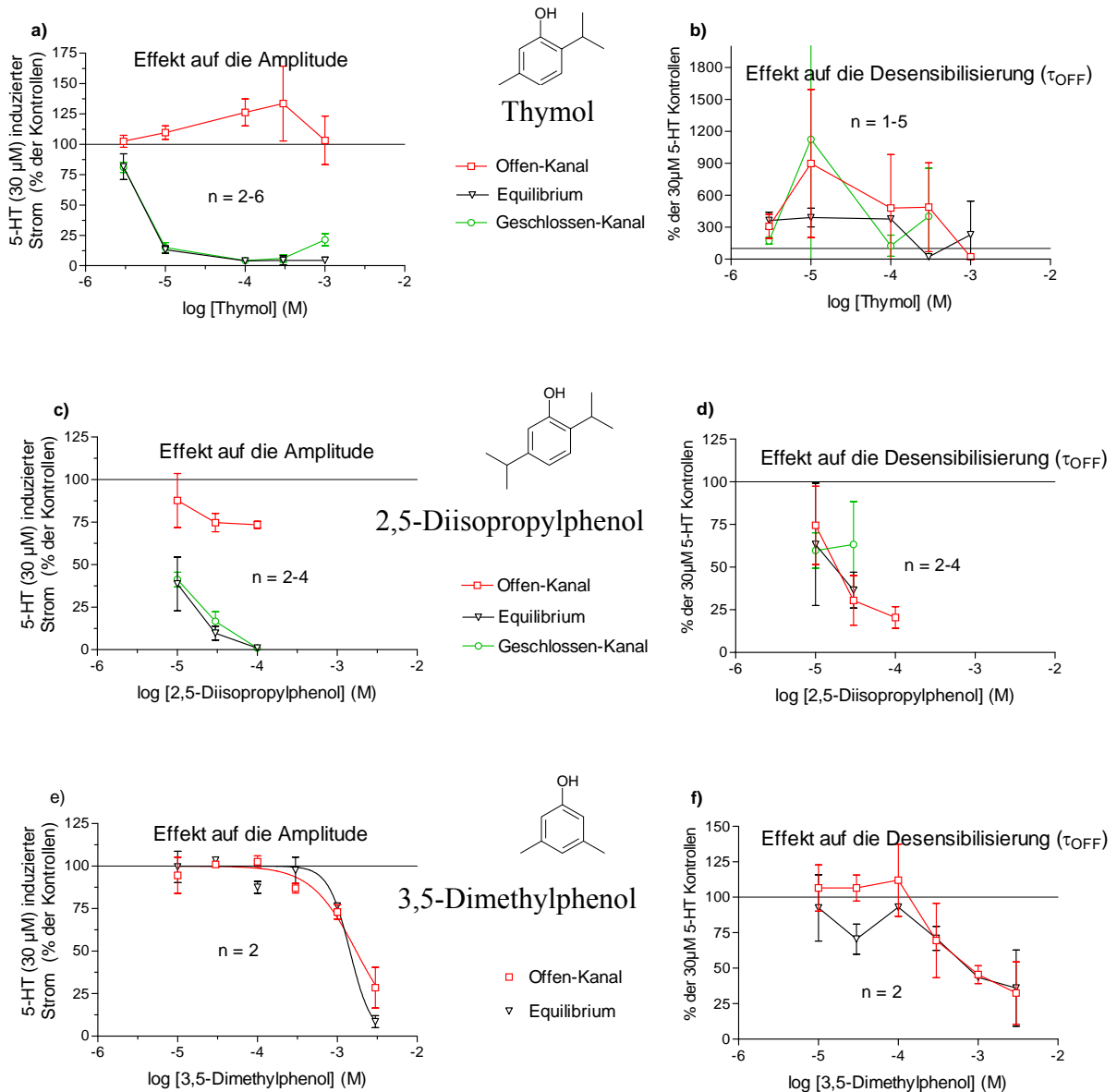


Abbildung 42: Links in der Abbildung von oben nach unten: Konzentrationswirkungskurven der Amplitude in der Offen-, Equilibrium und Geschlossen-Kanal-Applikation von a) Thymol c) 2,5-Diisopropylphenol und e) 3,5-Dimethylphenol. / Rechts in der Abbildung von oben nach unten: Konzentrationswirkungskurven der Desensibilisierung (τ_{OFF}) in der Offen-, Equilibrium und Geschlossen-Kanal-Applikation von b) Thymol d) 2,5-Diisopropylphenol und f) 3,5-Dimethylphenol.

Wie in Abbildung 22 beschrieben, zeigt 2-Isopropylphenol in der Offen-Kanal-Applikation, eine Potenzierung, innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs, während eine minimale Flankierung der Hydroxyl-Gruppe, von beiden ortho-Position, dieses verhindert (siehe Abbildung 41).

Thymol ist ein Strukturderivat von 2-Isopropylphenol und besitzt zuzüglich an der 5. Position des aromatischen Rings eine Methyl-Gruppe. Dennoch reicht diese Methylgruppe nicht aus, um den Effekt der Potenzierung zu verhindern (siehe Abbildung 42 a)). Eine Isopropyl-Gruppe in der 5. Position führt jedoch zu einer Inhibition der Amplitude (siehe Abbildung 42 b)). Die Größe des Umfangs könnte hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

3,5-Dimethylphenol zeigte in Bezug auf die Amplitude keine Potenzierung im angegebenen Konzentrationsbereich (siehe Abbildung 42 c)). Betrachtet man die Desensibilisierungswerte (τ_{OFF}), so erkennt man eine konzentrationsabhängige Beschleunigung. Bei allen bisher beobachteten Phenol-Derivaten beinhaltet eine Verlangsamung der Desensibilisierung einen potenzierenden, eine Beschleunigung einen inhibitorischen Mechanismus. Zwei Methyl-Gruppen in meta-Position reichen demnach aus, um Potenzierung zu verhindern. Während ein relativ großes Molekül wie 2-Naphthol (siehe Abbildung 43) wiederum Potenzierung hervorrufen kann.

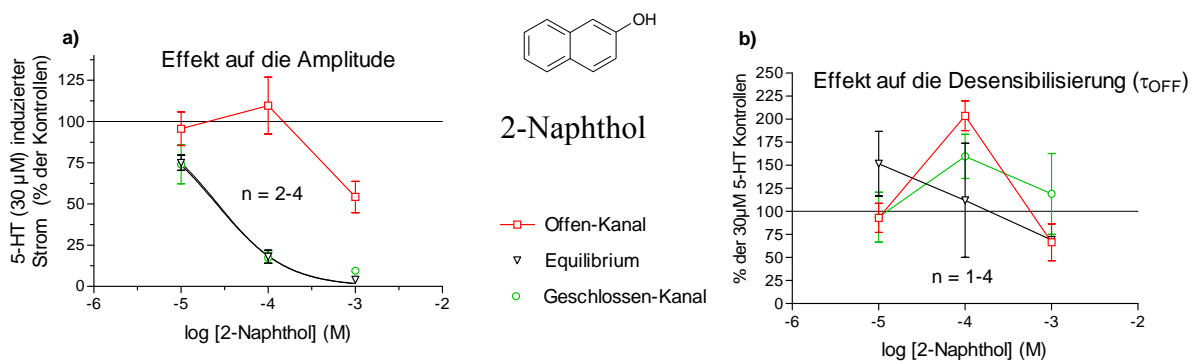


Abbildung 43: Amplitudenpotenzierung von 2-Naphthol in der Offen-Kanal-Applikation. Equilibrium und Geschlossen-Kanal-Applikation zeigen eine identische Amplitudenhemmung für den dargestellten Konzentrationsbereich. b) Desensibilisierungswerte (τ_{OFF}) von 2-Naphthol in der Offen-, Equilibrium und Geschlossen-Kanal-Applikation.

3.4 Effekte unterschiedlicher funktioneller Gruppen

Im Abschnitt 3.2 wurde beschrieben, welche Bedeutung die Hydroxyl-Gruppe im Phenol in Bezug auf die Effekte und somit auf die Mechanismen beim 5-HT_{3A}-Rezeptor hat. Im nun folgenden Abschnitt soll geklärt werden, ob andere funktionelle Gruppen ähnliche oder sogar gleiche Effekte auslösen können. Oder ob andere funktionelle Gruppen den Effekt verstärken bzw. abschwächen.

In den nun folgenden Versuchen werden Phenole mit den jeweiligen Anilinen verglichen.

3.4.1 Phenol und Anilin

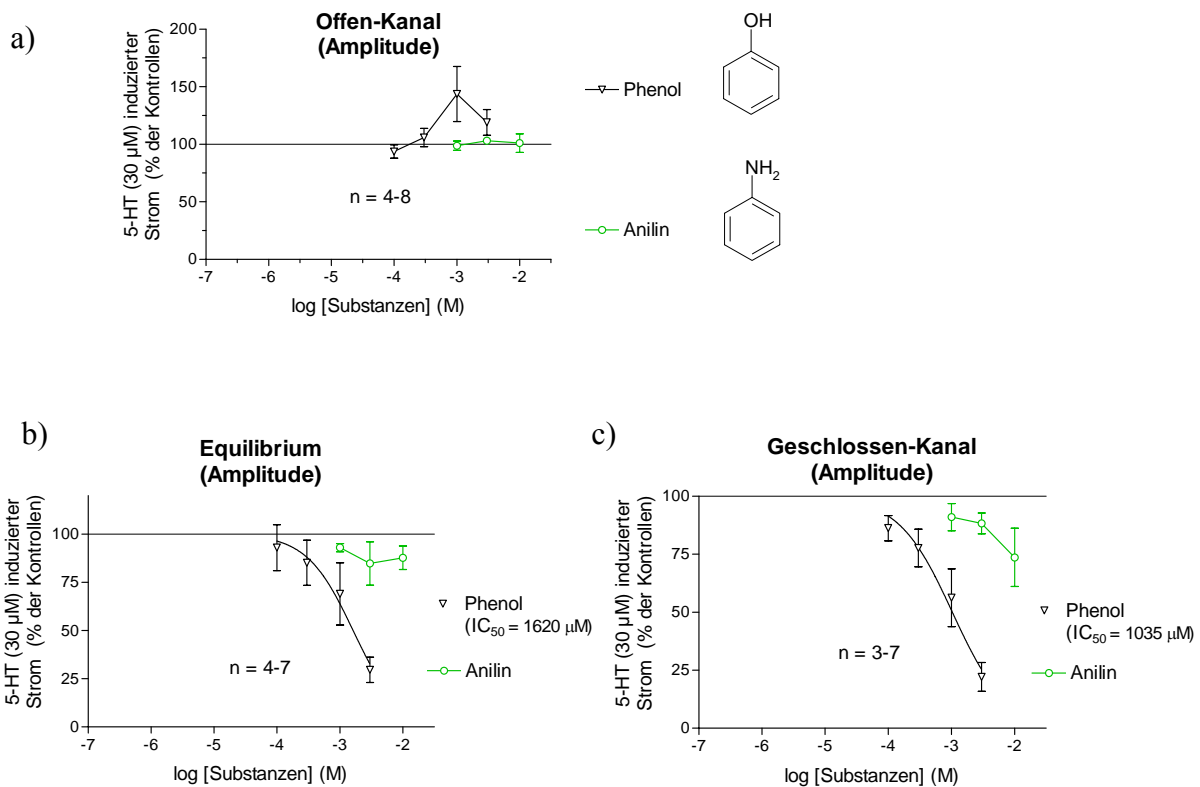


Abbildung 44: Vergleich der Konzentrationswirkungskurven von Phenol und Anilin bezogen auf die Amplitude in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium- c) Geschlossen-Kanal-Applikation.

Anilin zeigt in der Offen-Kanal-Applikation keinen Effekt, selbst bei hohen Konzentrationen (10 mM; siehe Abbildung 44 a)). Folglich gibt es keinen schnellen Effekt des Anilins. Anilin verursacht bei hohen Konzentrationen in der Equilibrium- und Geschlossen-Kanal-Applikation schwache inhibitorische Effekte, dennoch ist das Phenol die wesentlich potentere Substanz.

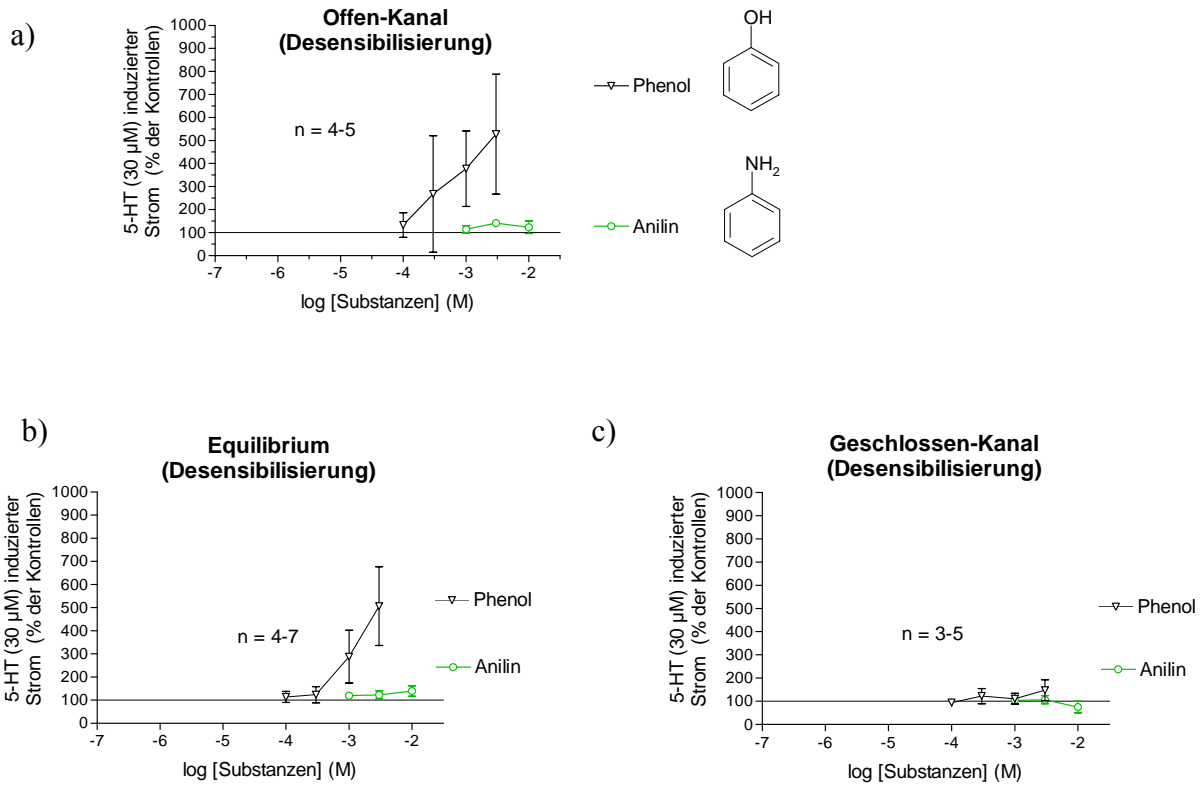


Abbildung 45: Vergleich der Desensibilisierung (τ_{OFF}) von Phenol und Anilin in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium- c) Geschlossen-Kanal-Applikation.

Die Desensibilisierungs-Werte in Abbildung 45 zeigen, für die Substanz Anilin bei allen Applikationsmodi, kaum Effekt. Hier stellt sich klar heraus, dass Anilin über einen vollkommen unterschiedlichen Mechanismus verfügen muss, im Gegensatz zu den anderen Phenol-Derivaten, da weder Beschleunigung noch Verlangsamung deutlich zu sehen ist.

3.4.2 2-Isopropylphenol und 2-Isopropylanilin

In den folgenden Experimenten wurden ortho-Isopropyl-Derivate von den jeweiligen Phenolen und Anilinen gegenübergestellt.

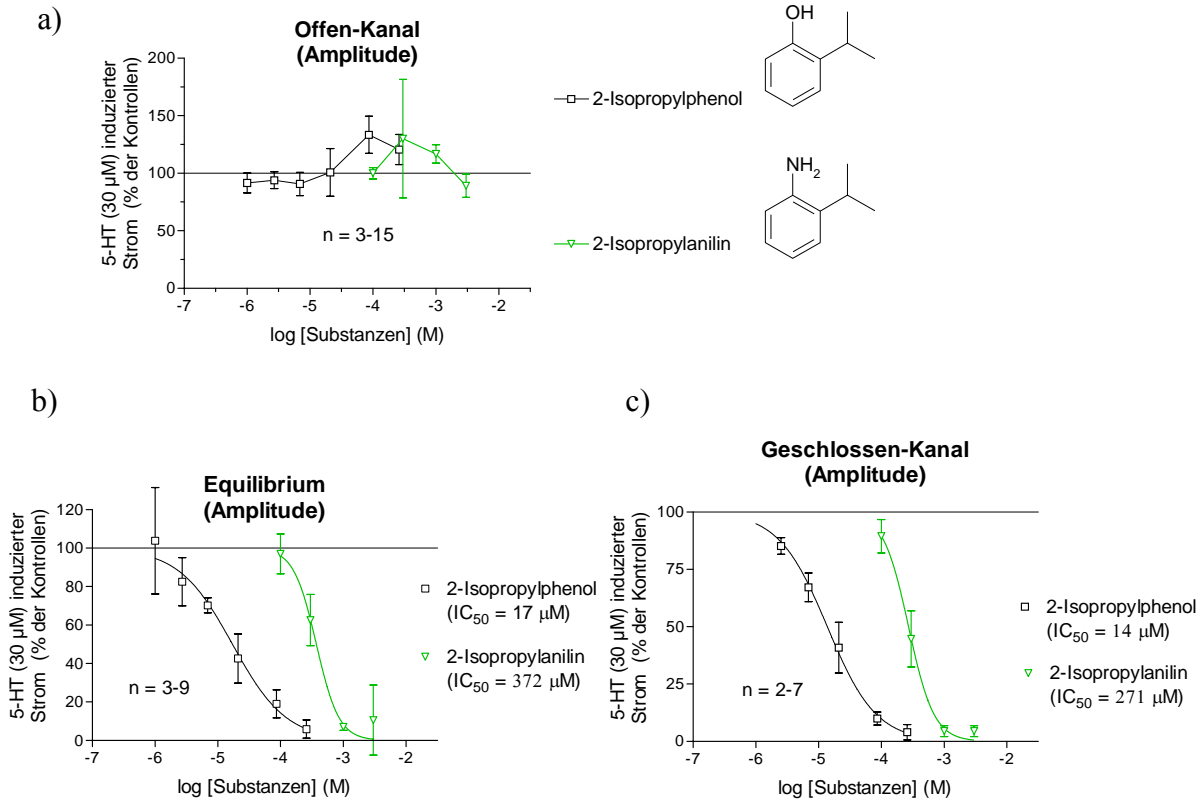


Abbildung 46: Vergleich der Konzentrationswirkungskurven von 2-Isopropylphenol und 2-Isopropylanilin bezogen auf die Amplitude in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium- c) Geschlossen-Kanal-Applikation.

Betrachtet man Abbildung 46 b) und c) so sieht man, dass auch hier die jeweiligen Phenol-Derivate potenter sind als die jeweiligen Aniline, (in der Equilibrium-Applikation um einen Faktor 22, in der Geschlossen-Applikation um einen Faktor 19). In der Offen-Kanal-Applikation potenziert 2-Isopropylanilin wie auch 2-Isopropylphenol, während Anilin (siehe Abbildung 44 a)) nicht potenziert. Hier also verursacht die Isopropyl-Gruppe, in ortho-Position, den Effekt der Potenzierung (siehe Abbildung 46). Dennoch ist 2-Isopropylphenol, auch was den Effekt der Potenzierung angeht, die potentere Substanz (siehe Abbildung 46 a)). Der potenziierende Mechanismus zeichnet sich ebenfalls sehr deutlich bei den Desensibilisierungs-Werten ab (siehe Abbildung 47 a)). Nicht zu verstehen ist jedoch, warum eine Verlangsamung in Geschlossen-Kanal-Applikation mit zunehmender Konzentration darstellt, da 2-Isopropylanilin hier nicht potenziert (siehe Abbildung 47 c)).

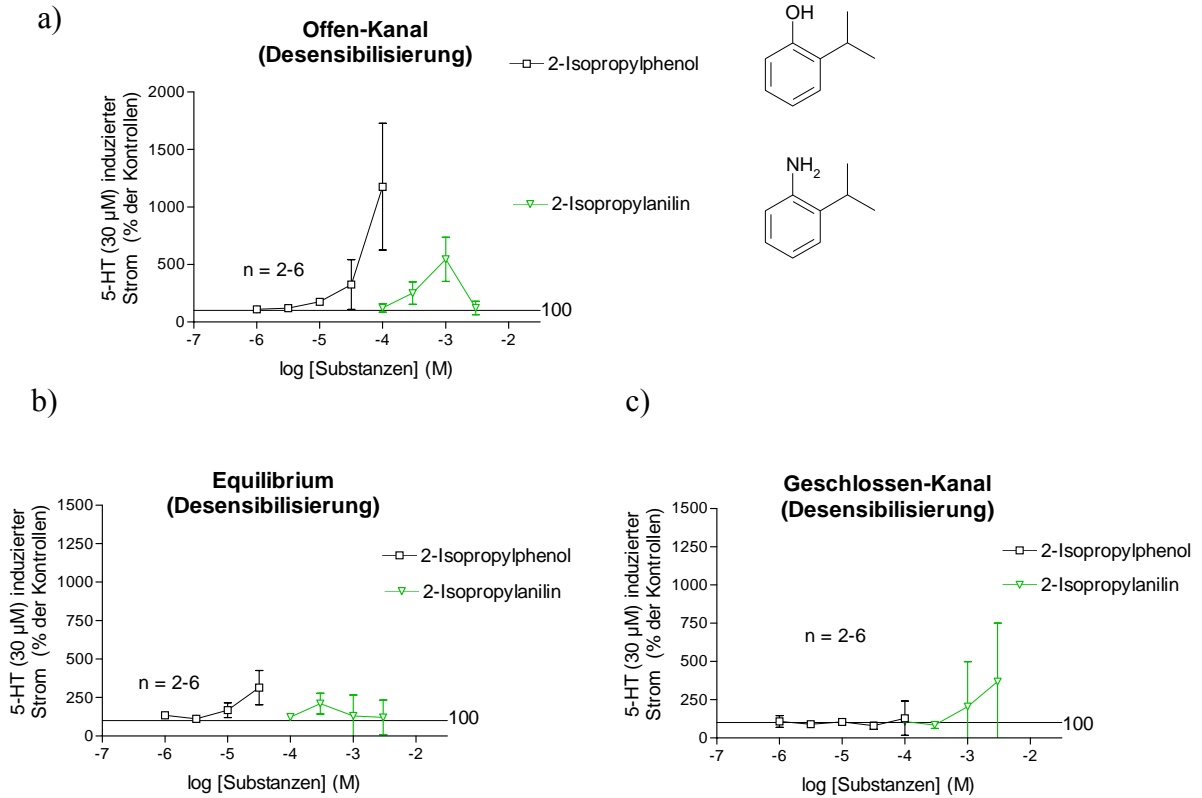


Abbildung 47: Vergleich der Desensibilisierung (τ_{OFF}) von 2-Isopropylphenol und 2-Isopropylanilin in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium- c) Geschlossen-Kanal-Applikation.

3.4.3 Propofol und 2,6-Diisopropylanilin

Von großem Interesse ist 2,6-Diisopropylanilin, da es den direkten Vergleich zum Propofol darstellt.

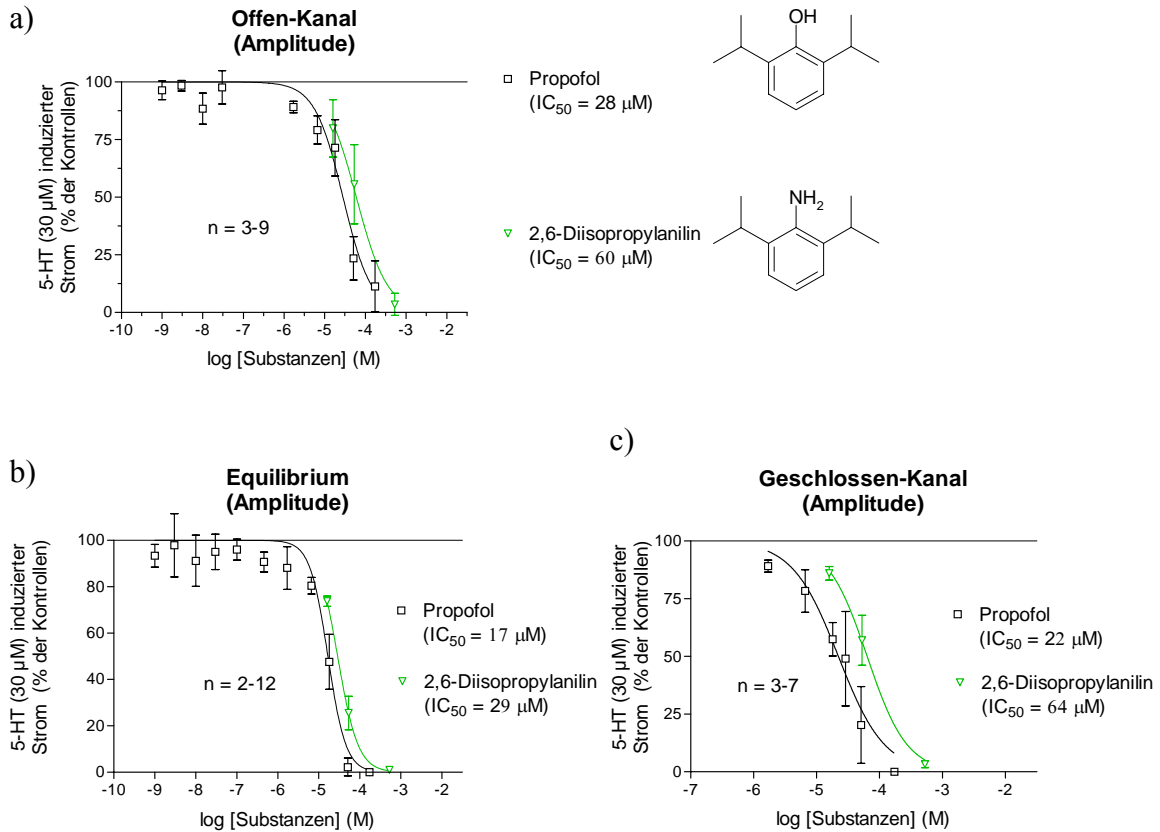


Abbildung 48: Vergleich der Konzentrationswirkungskurven von 2,6-Diisopropylphenol und 2,6-Diisopropylanilin bezogen auf die Amplitude in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium- c) Geschlossen-Kanal-Applikation.

2,6-Diisopropylanilin ist in allen drei Applikationsmodi weniger potent als das Phenolstruktur-Derivat Propofol (siehe Abbildung 48). In der Offen-Kanal- als auch in der Equilibrium-Applikation ist 2,6-Diisopropylanilin um einen Faktor 2 weniger potent als Propofol. In der Geschlossen-Kanal-Applikation ist 2,6-Diisopropylanilin um einen Faktor 3 weniger potent. Bei den 2-Isopropylanalogen sind die Faktoren 22 und 19 (Equilibrium-, Geschlossen-Kanal-Applikation).

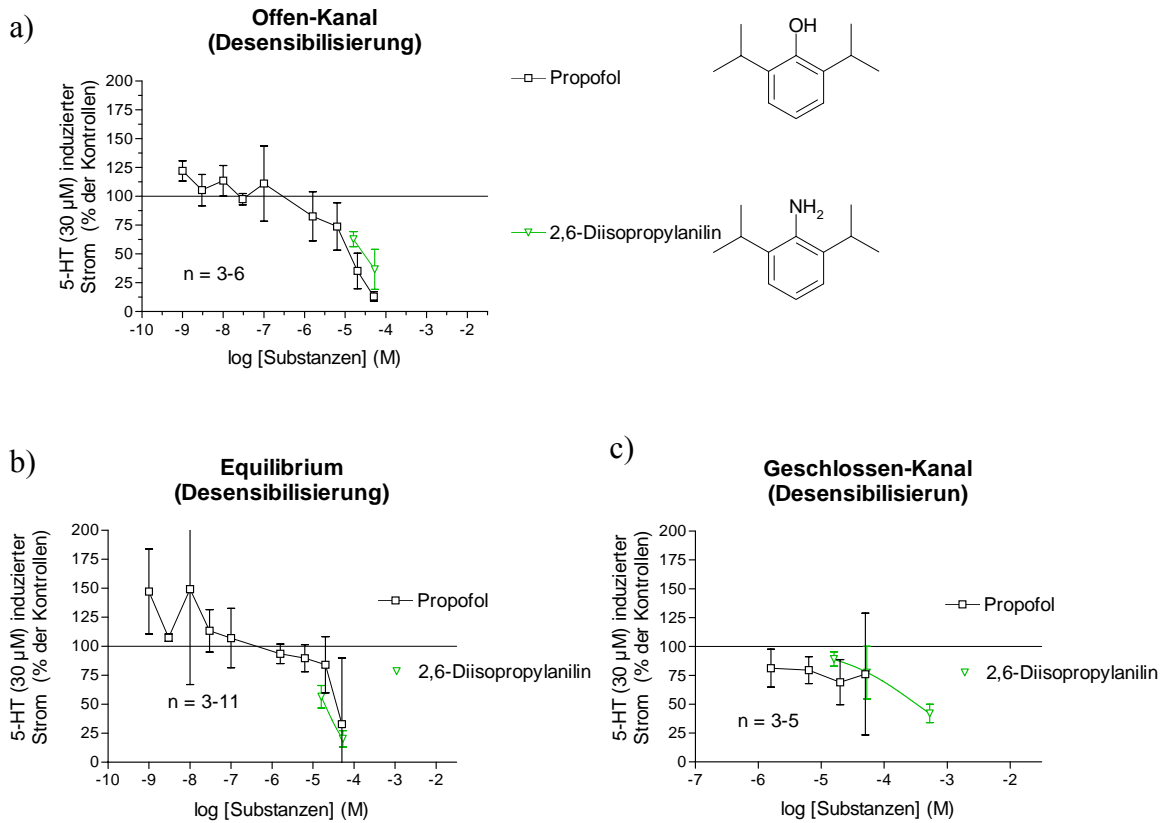


Abbildung 49: Vergleich der Desensibilisierung (τ_{OFF}) von 2,6-Diisopropylphenol und 2,6-Diisopropylanilin in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium- c) Geschlossen-Kanal-Applikation.

Sowohl in der Equilibrium- als auch in der Offen-Kanal-Applikation, also immer dann wenn der schnelle Effekt der Substanz einsetzt, ist bei Propofol eine konzentrationsabhängige Beschleunigung der Desensibilisierung zu sehen (siehe Abbildung 49), nicht jedoch in der Geschlossen-Kanal-Applikation. 2,6-Diisopropylanilin zeigt jedoch in allen Applikationsmodi eine konzentrationsabhängige Beschleunigung der Desensibilisierung (siehe Abbildung 49). Dieses deutet auf unterschiedliche Mechanismen der jeweiligen Substanzen hin. Zusammenfassend kann man sagen, dass Phenole potenter sind als die jeweiligen Aniline und das bei den Strukturanaloga unterschiedliche Mechanismen wirken.

Wie aber verhält es sich mit anderen funktionellen Gruppen? Was passiert, wenn man die Hydroxyl-Gruppe durch eine Mercapto-Gruppe austauscht. Im Folgenden soll darauf eingegangen werden.

3.4.4 Phenol und Thiophenol

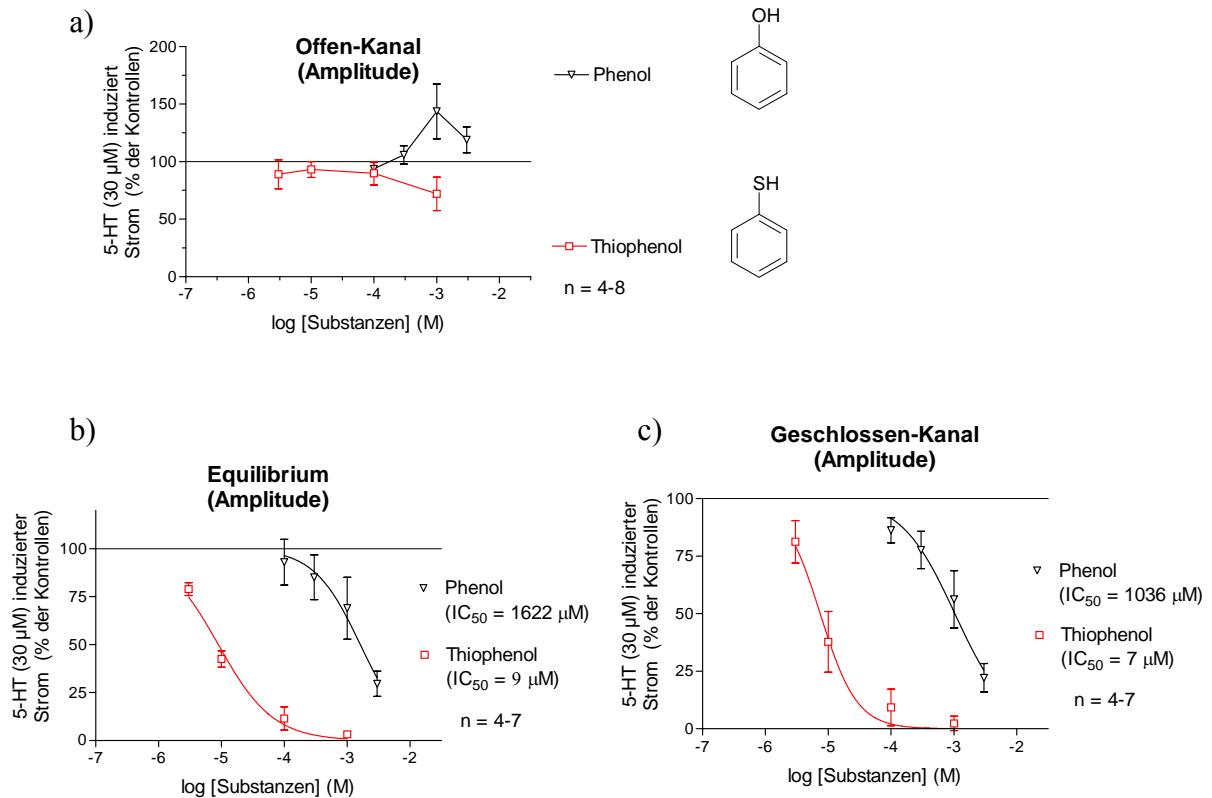


Abbildung 50: Vergleich der Konzentrationswirkungskurven von Thiophenol und Phenol bezogen auf die Amplitude in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium- c) Geschlossen-Kanal-Applikation.

Thiophenol ist in der Equilibrium- und in der Geschlossen-Kanal-Applikation ein wesentlich stärkerer Inhibitor als Phenol (Faktor 180 u. 148) (siehe Abbildung 50 b) u. c)). In der Offen-Kanal-Applikation setzt bei Thiophenol der hemmende Effekt erst bei ca. 1mM ein (siehe Abbildung 50 a)). Vergleicht man die Offen-Kanal-Applikation mit der Geschlossen-Kanal-/Equilibrium-Applikation, so sieht man, dass für den starken hemmenden Effekt eine Vorapplikation der Substanz nötig ist. Der starke inhibitorische Effekt ist demnach kein schneller Effekt.

Thiophenol zeigt bei allen Applikationsmodi eine Beschleunigung der Desensibilisierung (siehe Abbildung 51), Phenol eine Verlangsamung, sofern es mit 5-HT zusammen appliziert wird (Equilibrium u. Offen-Kanal). Thiophenol aktiviert hier offenbar einen unterschiedlichen Mechanismus.

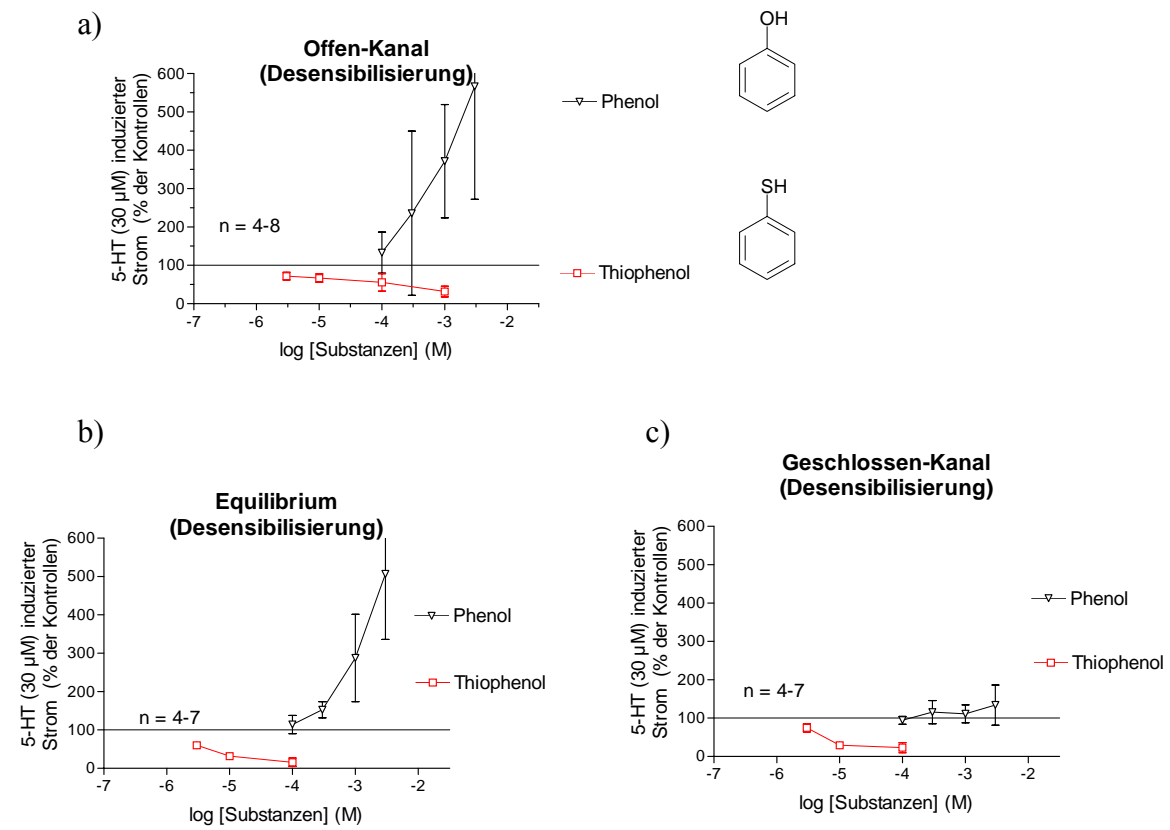


Abbildung 51: Vergleich der Desensibilisierung (τ_{OFF}) von Thiophenol und Phenol in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium- c) Geschlossen-Kanal-Applikation.

3.4.5 2-Isopropylphenol und 2-Isopropylbenzothiol

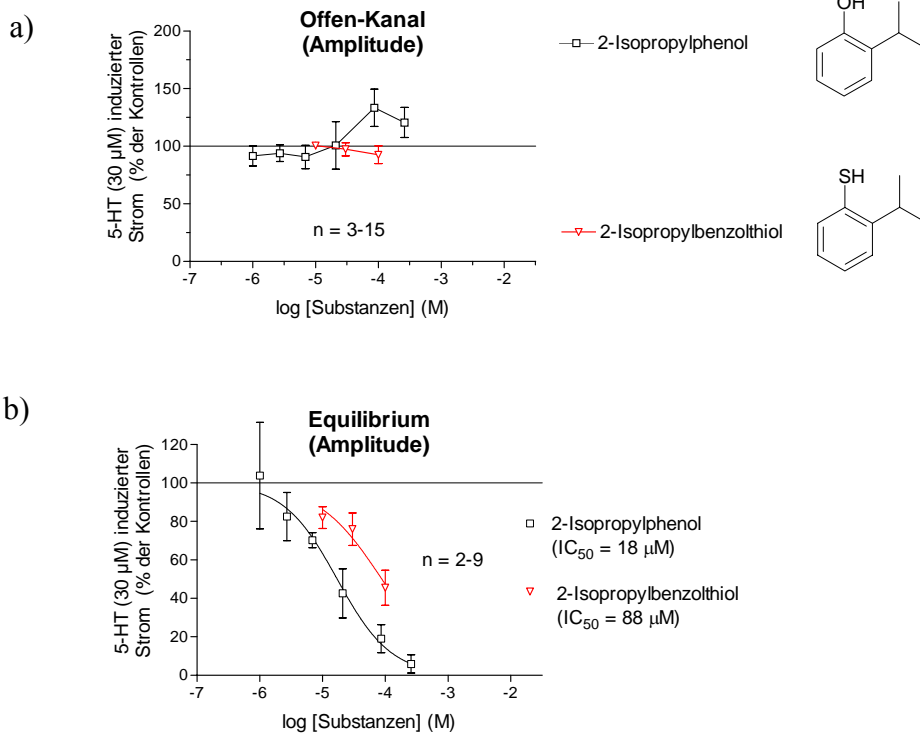


Abbildung 52: Vergleich der Konzentrationswirkungskurven von 2-Isopropylphenol und 2-Isopropylbenzothiol bezogen auf die Amplitude in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium-Applikation.

Abbildung 52 a) zeigt deutlich, dass 2-Isopropylbenzothiol in dem angegebenen Konzentrationsbereich nicht potenziert, im Gegensatz zu 2-Isopropylphenol und 2-Isopropylanilin (siehe Abbildung 46 a). Keinerlei Verlangsamung der Desensibilisierung von 2-Isopropylbenzothiol zeigt sich zusätzlich in Abbildung 53. Zusammenfassend kann man sagen, dass 2-Isopropylphenol (IC₅₀ = 18 µM) um einen Faktor 5 potenter ist als 2-Isopropylbenzothiol (IC₅₀ = 88 µM) in der entsprechenden Equilibrium-Applikation, während 2-Isopropylbenzothiol um einen Faktor 4 potenter ist als das entsprechende Anilin (2-Isopropylanilin; IC₅₀ = 372 µM).

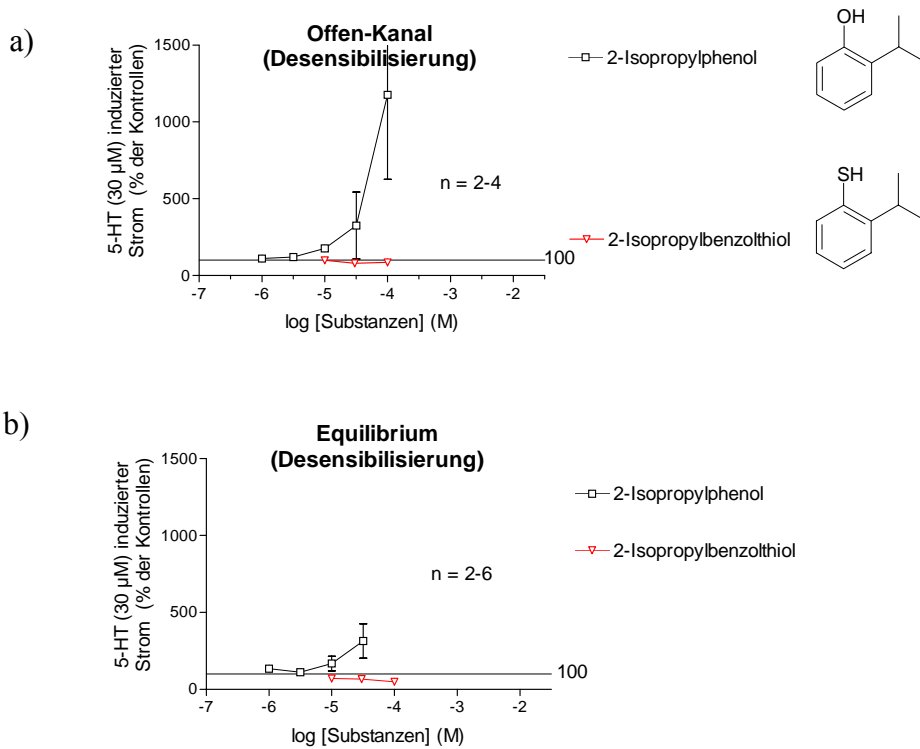


Abbildung 53: Vergleich der Desensibilisierung (τ_{OFF}) von 2-Isopropylphenol und 2-Isopropylbenzothiol in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium-Applikation.

Bisher wurde auf funktionelle Gruppen von phenolischen Aromaten eingegangen, die ein (Phenol u. Thiophenol) oder zwei Wasserstoffatome (Anilin) tragen. Diese Substanzen interagieren wahrscheinlich mit der 5-HT-Bindungsstelle, indem sie zumindest als Wasserstoff-Donor mit Proteinen, innerhalb der Bindungstasche, Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Möglich sind auch Reaktionen als Akzeptor. Wasserstoffbrückenbindungen sind innerhalb der Bindungen von ligandengesteuerten Ionenkanälen von großem Interesse.

In dem folgenden Abschnitt soll darauf eingegangen werden, wie Halogenbenzole mit dem 5-HT_{3A}-Rezeptor interagieren?

3.4.6 Halogenbenzole

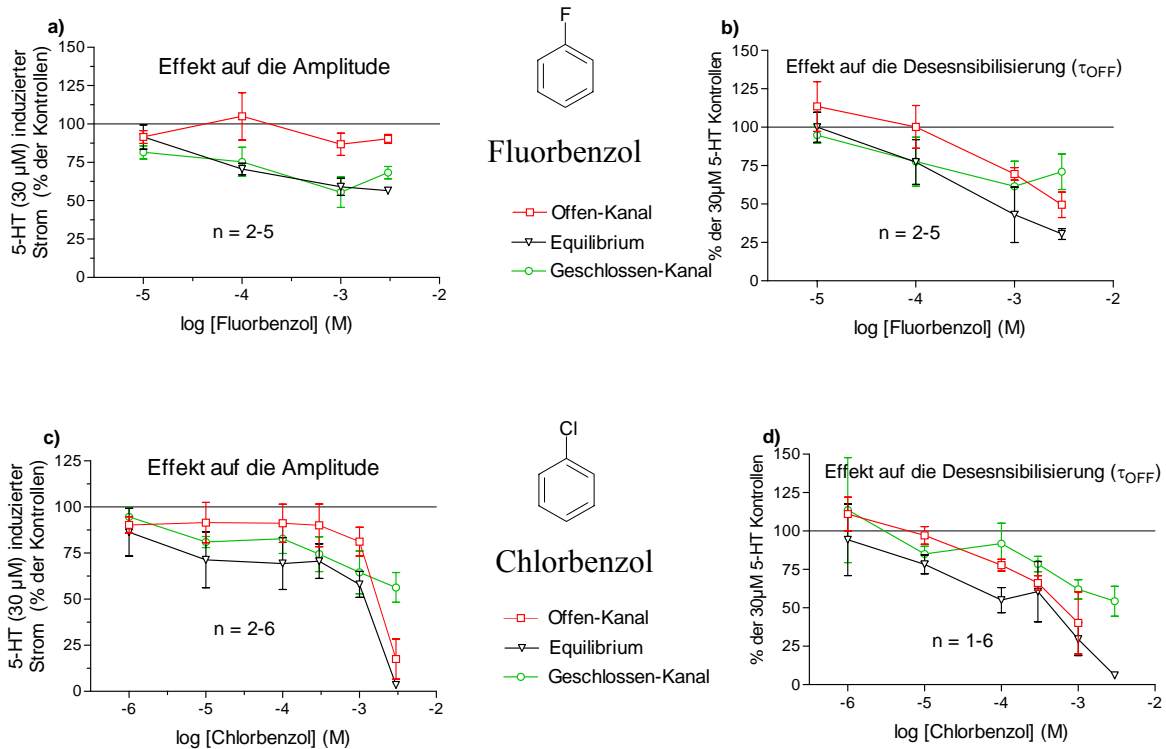


Abbildung 54: a) Amplitudenhemmung von Fluorbenzol in der Offener-, Equilibrium und Geschlossen-Kanal-Applikation. b) Denesibilisierungsbeschleunigung (τ_{OFF}) von Fluorbenzol in der Offener-, Equilibrium und Geschlossen-Kanal-Applikation. c) Amplitudenhemmung von Chlorbenzol in der Offener-, Equilibrium und Geschlossen-Kanal-Applikation. d) Denesibilisierungsbeschleunigung (τ_{OFF}) von Chlorbenzol in der Offener-, Equilibrium und Geschlossen-Kanal-Applikation.

Fluorbenzol zeigt in der Equilibrium- und Geschlossen-Kanal-Applikation etwa die gleiche Hemmung (siehe Abbildung 54 a)). Diese Inhibition nimmt jedoch nur leicht, bei zunehmender Konzentration, zu. In der Offener-Kanal-Applikation ist bei steigender Konzentration, wenig Hemmung zu erkennen. Die Substanz braucht demnach eine längere Vorapplikation, so dass diese am Rezeptor wirkt.

Chlorbenzol wirkt stärker inhibitorisch, wenn es mit 5-HT zusammen appliziert wird (siehe Abbildung 54 c)); bei Betrachtung der höchsten Konzentration von 10 mM (Equilibrium und Offener-Kanal). Somit ist Chlorbenzol eine schnell wirkende Substanz, im Gegensatz zu Fluorbenzol. Die Substanzen verursachen somit verschiedene Effekte. Jedoch zeigen beide Halogenderivate Beschleunigung mit zunehmender Konzentration in Bezug auf die Denesibilisierung (siehe Abbildung 54 b) u. d)).

3.5 Verstärkung der Potenzierung durch Alkyl-Gruppen

3.5.1 Potenzierung durch Positionsveränderungen von Methyl-Gruppen

Wie in Kapitel 3.2 eingehend erklärt, können zusätzliche Alkyl-Gruppen, am phenolischen Aromaten, die Potenzierung der Amplitude und die Verlangsamung der Desensibilisierung aufheben und andere Mechanismen wie Inhibition und Beschleunigung in Gang setzten.

Können aber Alkyl-Gruppen Effekte wie Potenzierung und Verlangsamung verstärken? Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine umfassende Studie durchgeführt, die sich mit Methyl-Gruppen beschäftigt, die an unterschiedlichen Positionen (ortho, meta, para) des phenolischen Aromaten substituiert wurden. Es sei erwähnt, das der Partizipationskoeffizient ($P_{oct./water}$) bei den nun folgenden Substanzen fast gleich groß ist.

3.5.1 Potenzierung durch Positionsveränderungen von Methyl-Gruppen

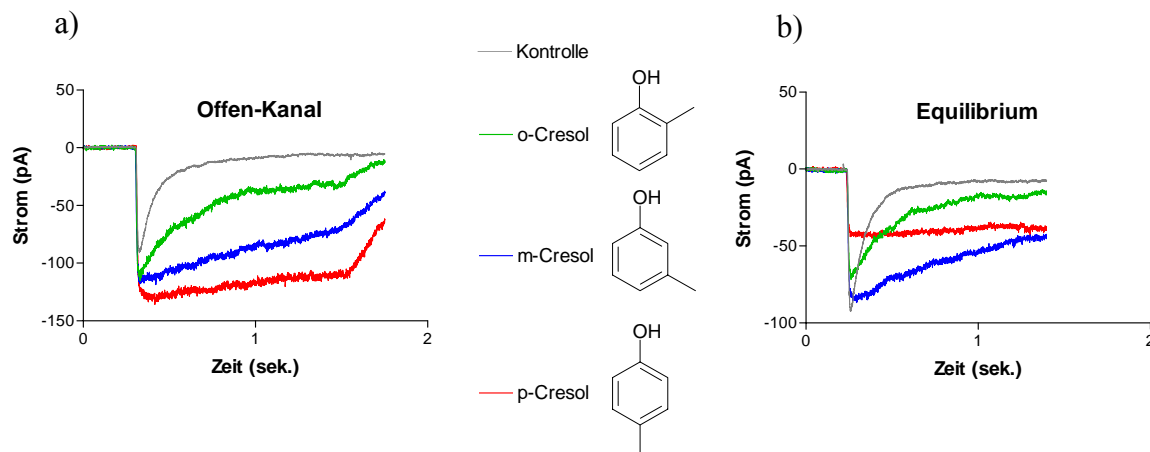


Abbildung 55: Originalstromspuren. a) Offen-Kanal- b) Equilibrium-Applikation von 1 mM o-, m- und p-Cresol. / In der Offen-Kanal-Applikation zeigen alle Cresole eine Potenzierung der Amplitude und eine Beschleunigung der Desensibilisierung (τ_{OFF}). Die Equilibrium-Applikation zeigt eine Amplitudenhemmung und eine Beschleunigung der Desensibilisierung.

Abbildung 55 a) und b) zeigt einen Patch an dem die Offen-Kanal- a) und Equilibrium-Applikation b) durchgeführt wurde. Man erkennt deutlich, dass von der ortho-Position über die meta- bis hin zur para-Position die Potenzierung der Amplitude zunimmt (Offen-Kanal), sowie eine zunehmende Verlangsamung der Desensibilisierung (τ_{OFF}). In der Equilibrium-Applikation wird analog eine Zunahme der Inhibition beobachtet.

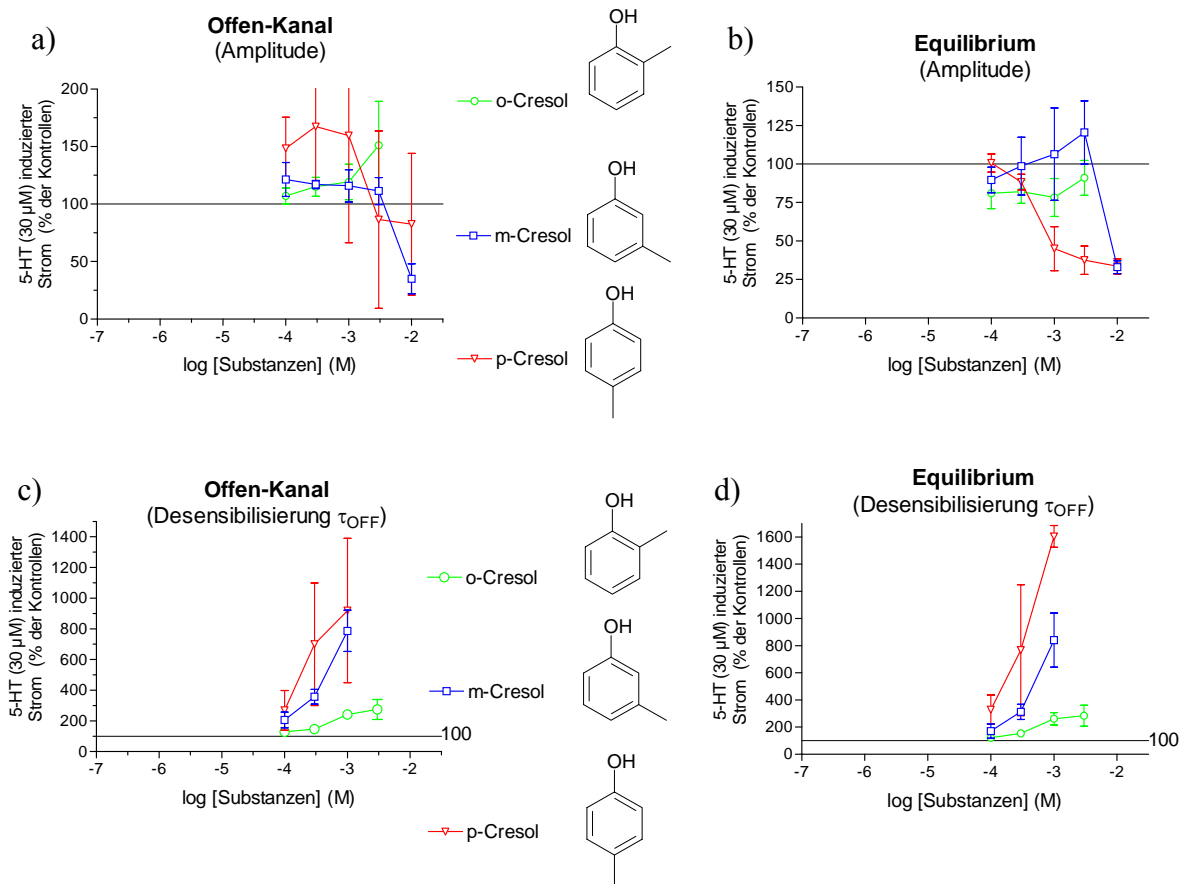


Abbildung 56: Konzentrationswirkungskurven von o-, m- und p-Cresole (n =2-7): a) Offen-Kanal-Applikation bezogen auf die Amplitude. b) Equilibrium-Applikation bezogen auf die Amplitude c) Offen-Kanal-Applikation bezogen auf die Desensibilisierung (τ_{OFF}) d) Equilibrium-Applikation bezogen auf die Desensibilisierung (τ_{OFF}).

Die statistische Auswertung über den gesamten Konzentrationsbereich (Abbildung 56 a) u. b)) bestätigt, dass para-Cresol das potenteste Cresol ist. Meta- und ortho-Cresol sind im unteren Konzentrationsbereich etwa gleich potent. Während ortho- im Gegensatz zu meta-Cresol bei 3 mM stärker potenziert (Offen-Kanal-Applikation). Der sterische Effekt der Methyl-Gruppe bezogen auf die Hydroxyl-Gruppe, wird möglicherweise der Grund dafür sein. Wie schon in Abbildung 55 gesehen, nimmt die Verlangsamung der Desensibilisierung bei steigender Konzentration von ortho-, über meta-, zu para-Cresol zu (siehe Abbildung 56 c) u. d)).

3.5.2 Positionsveränderungen von Isopropyl-Gruppen

Methyl-Gruppen bewirken an unterschiedlichen Positionen (ortho, meta, para), am phenolischen Aromaten, unterschiedliche Effekte. Wie verhält es sich mit anderen Alkyl-Gruppen an gleichen Positionen. Betrachtet man Isopropyl-Gruppen, die durch Propofol und 2-Isopropylphenol in Kapitel 3.2 näher untersucht wurden, so sieht man folgendes:

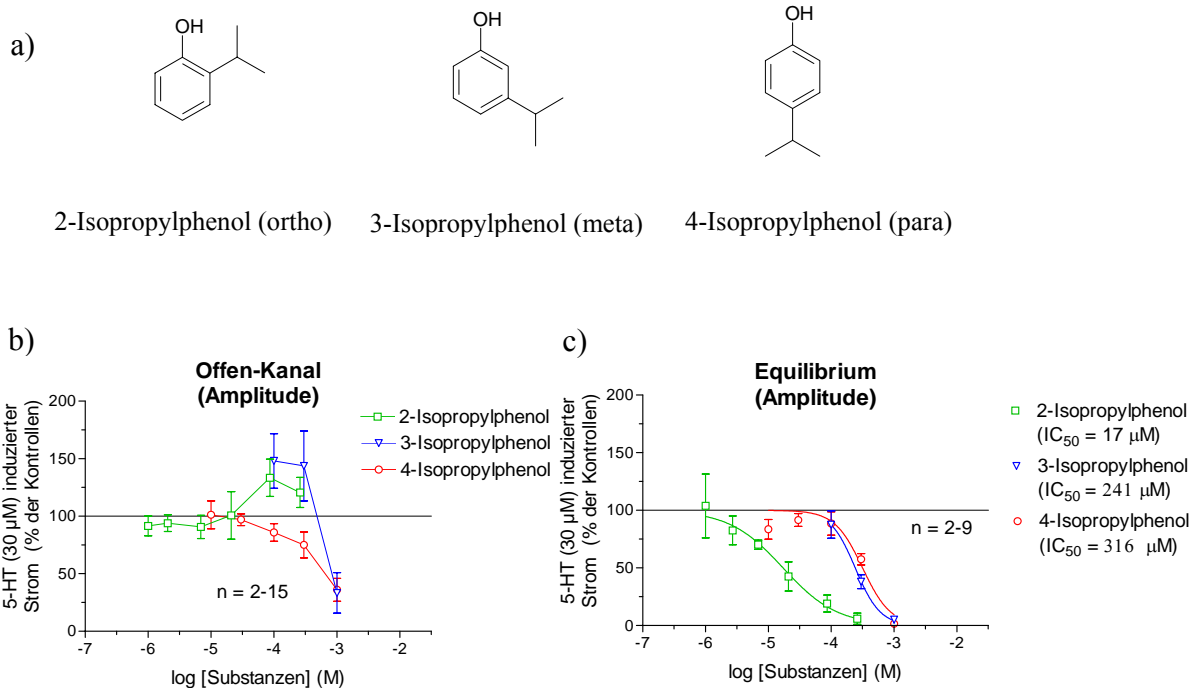


Abbildung 57: a) Strukturformeln von 2-, 3- und 4-Isopropylphenol b) Amplituden-Potenzierung / Hemmung der Isopropyl-Derivate in der Offen-Kanal-Applikation. c) Amplitudenhemmung der Isopropyl-Derivate in der Equilibrium-Applikation.

Betrachtet man den dargestellten Konzentrationsbereich bei 100 µM und 300 µM (siehe Abbildung 57 b)), so stellt man fest, dass 2- und 3-Isopropylphenol ähnlich potent wirken. Während 4-Isopropylphenol, in diesem Konzentrationsbereich, nicht mehr potenziert, in Bezug auf die Amplitude, oder im Bereich der Desensibilisierung verlangsamt (siehe Abbildung 58). Wenn die Isopropyl-Derivate, vor dem 5-HT-Puls zuzüglich appliziert werden (siehe Abbildung 57 c)), also wenn mögliche Effekte hinzukommen, die eine längere Einwaschzeit benötigen, ergeben sich andere Konstellationen. 3- und 4-Isopropylphenol sind ähnlich potent (IC₅₀ = 241 µM u. 316 µM), während 2-Isopropylphenol um einen Faktor 16 potenter ist als die beiden anderen Derivate.

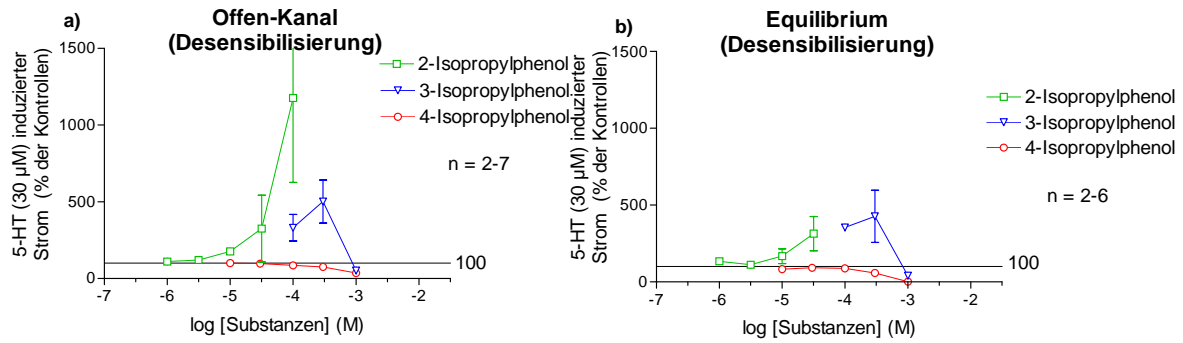


Abbildung 58: Desensibilisierungs-Verlangsamungen / Beschleunigungen von 2-, 3- und 4-Isopropylphenol (τ_{OFF}) in der a) Offen-Kanal- b) Equilibrium-Applikation.

Vergleicht man die Desensibilisierungs-Werte der Cresole (siehe Abbildung 56 c) u. d)) mit denen der 2-Isopropyl-Derivate (siehe Abbildung 58 a) u. b)), so erkennt man, dass sich vollkommen unterschiedliche Effekte darstellen. Während bei den Cresolen in der Reihenfolge: ortho-, meta-, para-Position eine Zunahme der Verlangsamung der Desensibilisierung stattfindet und damit zuzüglich eine Zunahme der Amplituden-Potenzierung, lässt sich bei den Isopropyl-Derivaten eine gegensätzliche Reihenfolge der Desensibilisierungs-Werte feststellen. Abbildung 58 a) u. b) zeigt, dass die ortho-Position (2-Isopropylphenol) stärker verlangsamt als die meta-Position (3-Isopropylphenol), während die para-Position (4-Isopropylphenol) nur noch beschleunigt.

3.6 Effekte unterschiedlicher Alkyl-Gruppen

Wie in den beiden vorherigen Abschnitten beschrieben, bewirken gleiche Alkyl-Gruppen an unterschiedlichen Positionen (ortho, meta, para) des phenolischen Aromaten unterschiedliche Effekte. Von großem Interesse ist es nun zu erfahren, was unterschiedliche Alkyl-Gruppen an gleichen Positionen bewirken.

3.6.1 Konstitutionsisomere

In der folgenden Abbildung, werden Isopropylphenole mit Propylphenolen verglichen.

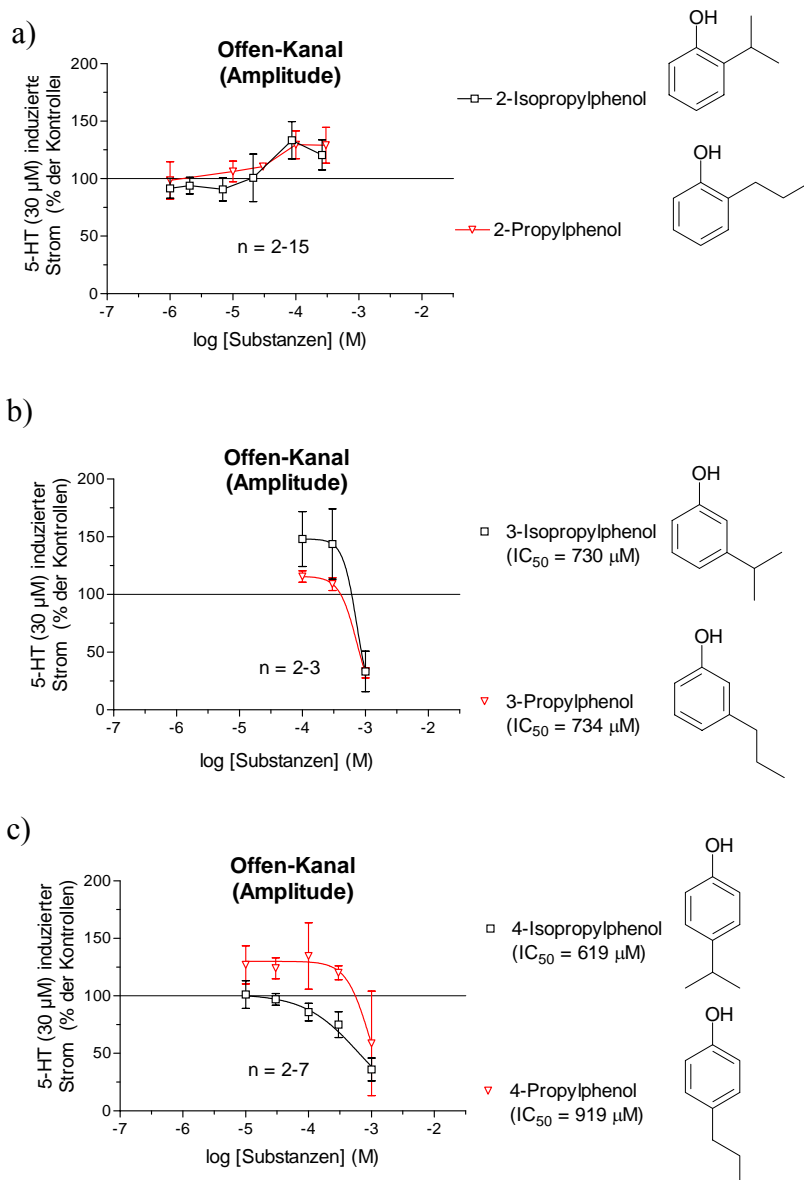


Abbildung 59: Vergleich von Konzentrationswirkungskurven der Amplituden in der Offen-Kanal-Applikation der phenolischen Propyl-Konstitutionsisomeren. a) ortho- b) meta- c) para-Position

Betrachtet man Abbildung 59 a), so erkennt man keinen wesentlichen Unterschied der Konstitutionsisomere für den angegebenen Konzentrationsbereich. Während das 3-Propylphenol weniger stark potenziert als das jeweilige Konstitutionsisomer (3-Isopropylphenol), verhält es sich bei 4-Isopropylphenol und 4-Propylphenol genau umgekehrt (siehe Abbildung 59 b) u. c). Dennoch zeigen die Substanzen ähnliche IC_{50} -Werte.

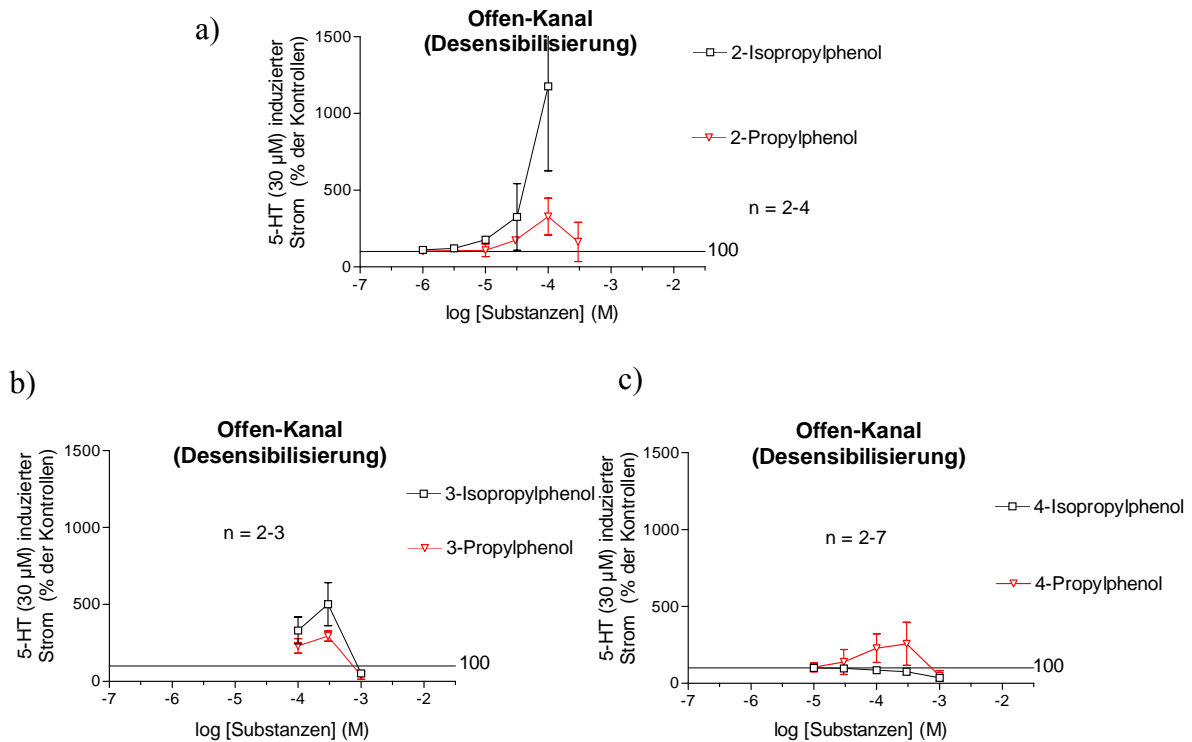


Abbildung 60: Vergleich der Desensibilisierung (τ_{OFF}) in der Offen-Kanal-Applikation der phenolischen Propyl-Konstitutionsisomeren. a) ortho- b) meta- c) para-Position

Vergleicht man die Desensibilisierungs-Werte von Abbildung 60 b) u. c) mit den analogen Amplituden-Werten (Abbildung 59 b) u. c)), so erkennt man, dass Effekte wie Potenzierung der Amplitude und Verlangsamung der Desensibilisierung sich exakt übertragen lassen. Vergleicht man jedoch die 2-Propyl- und 2-Isopropylphenol, sieht man in dem Verlauf der Amplitude kaum Unterschiede, während die Verlangsamung Desensibilisierung von 2-Isopropylphenol wesentlich ausgeprägter ist (siehe Abbildung 59 a) u. Abbildung 60 a)). Demzufolge könnte man vermuten, dass der potenzierende Effekt von 2-Isopropylphenol zusätzlich überlagert wird von einer Inhibition.

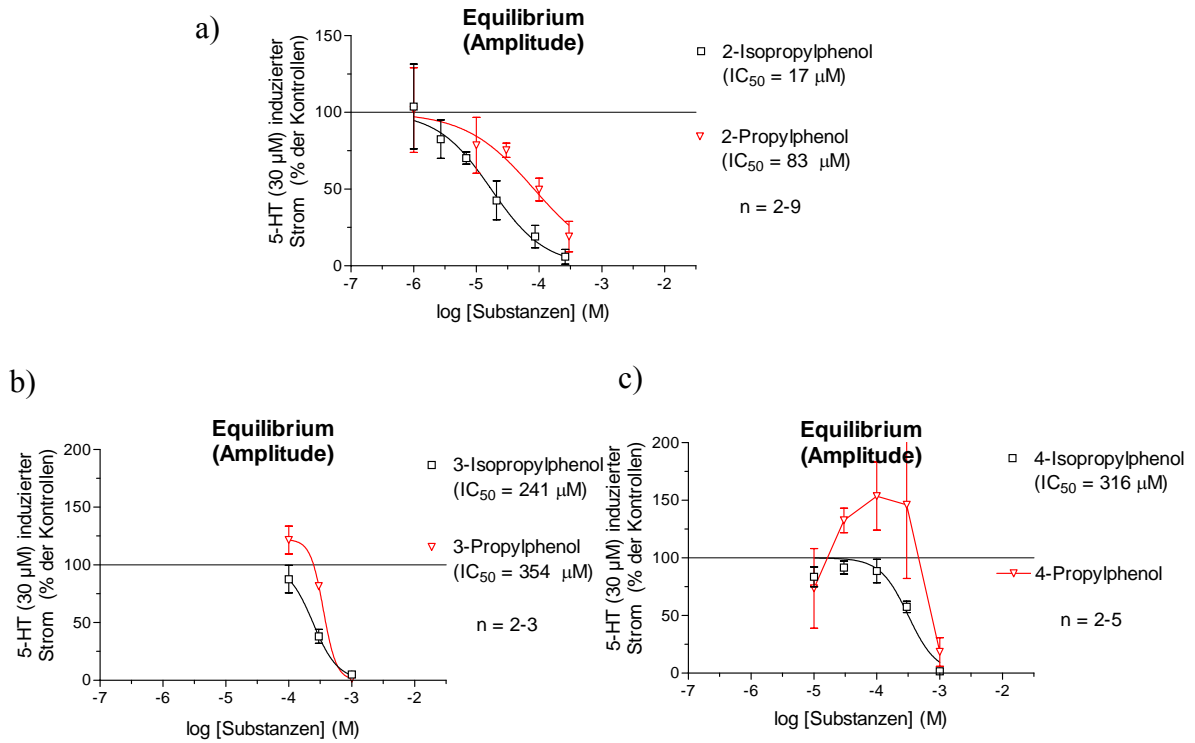


Abbildung 61: Vergleich von Konzentrationswirkungskurven der Amplituden in der Equilibrium-Applikation der phenolischen Propyl-Konstitutionsisomeren. a) ortho- b) meta- c) para-Position

In der Equilibrium-Applikation sind alle Isopropyl-Derivate potenter als die entsprechenden Propyl-Derivate (siehe Abbildung 61 a), b) u. c)). 2-Isopropylphenol ist um einen Faktor 5 potenter als 2-Propylphenol. 3-Isopropylphenol ist um einen Faktor von 1,5 potenter als 3-Propylphenol. Dennoch potenziert 4-Propylphenol stärker als 4-Isopropylphenol zwischen 30 μM und 300 μM .

Das die Isopropyl-Derivate die potenteren Substanzen sind, gegenüber den jeweiligen Propyl-Derivaten spiegelt sich auch in den Desensibilisierungs-Werten wider (siehe Abbildung 62 a) – c)).

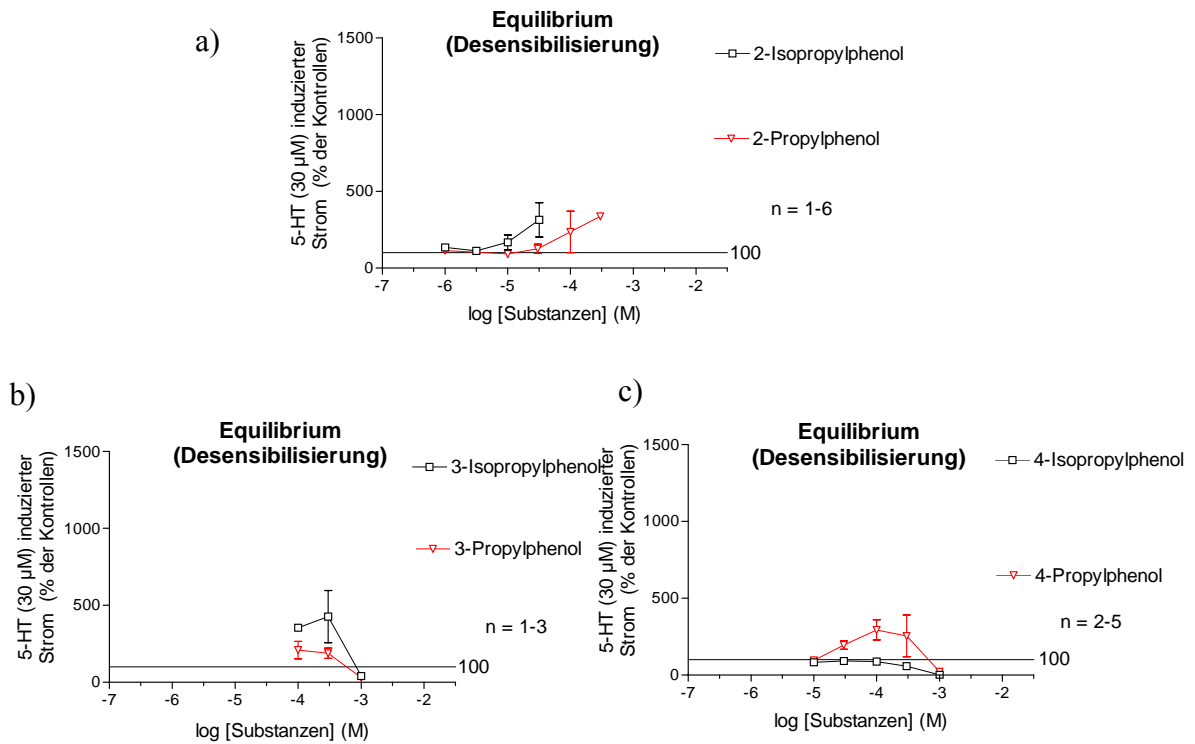


Abbildung 62: Vergleich der Desensibilisierung (τ_{OFF}) in der Equilibrium-Applikation der phenolischen Propyl-Konstitutionsisomeren. a) ortho- b) meta- c) para-Position

3.6.2 Verkürzung der Alkyl-Gruppe

Im Abschnitt 3.6.1 wurde die Wirkung von verschiedenen Konstitutionsisomeren dargestellt. In den nun folgenden Versuchen sollen die Unterschiede aufgezeigt werden, zwischen Ethylen und Propylen, die an gleicher Stelle des phenolischen Aromaten substituiert sind.

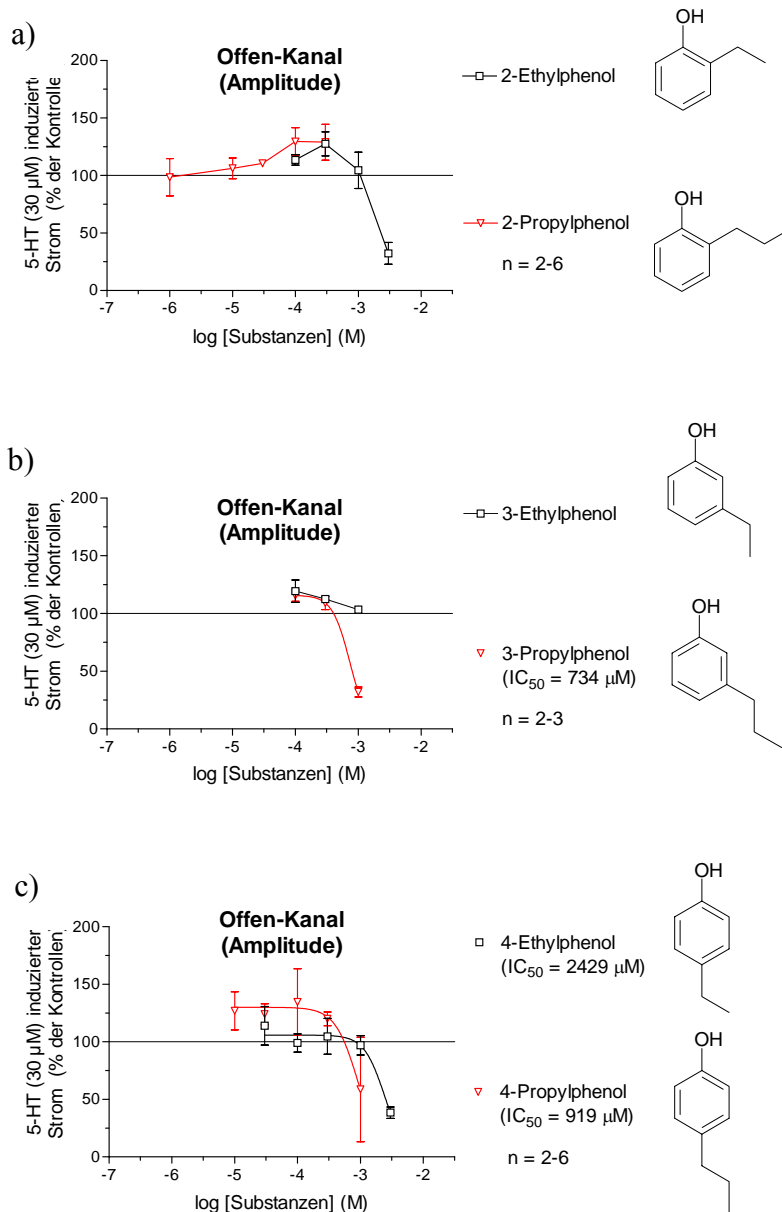


Abbildung 63: Vergleich von Konzentrationswirkungskurven der Amplituden in der Offen-Kanal-Applikation der Ethyl- / Propyl-Phenole in a) ortho- b) meta- c) para-Position. / Die Propylphenole sind potenter als die dementsprechenden Ethylphenole.

4-Propylphenol ist um einen Faktor 3 potenter als 4-Ethylphenol (siehe Abbildung 63 c). Die Potenzierung, von 4-Propylphenol (Amplitude) ist für den Konzentrationsbereich zwischen 30 µM und 300 µM stärker ausgeprägt. Während 2-Ethylphenol annähernd potent

ist wie 2-Propylphenol (bei 100 μM und 300 μM), inhibiert 3-Propylphenol bei 1mM im Vergleich zu 3-Ethylphenol (siehe Abbildung 63 a) u. b)).

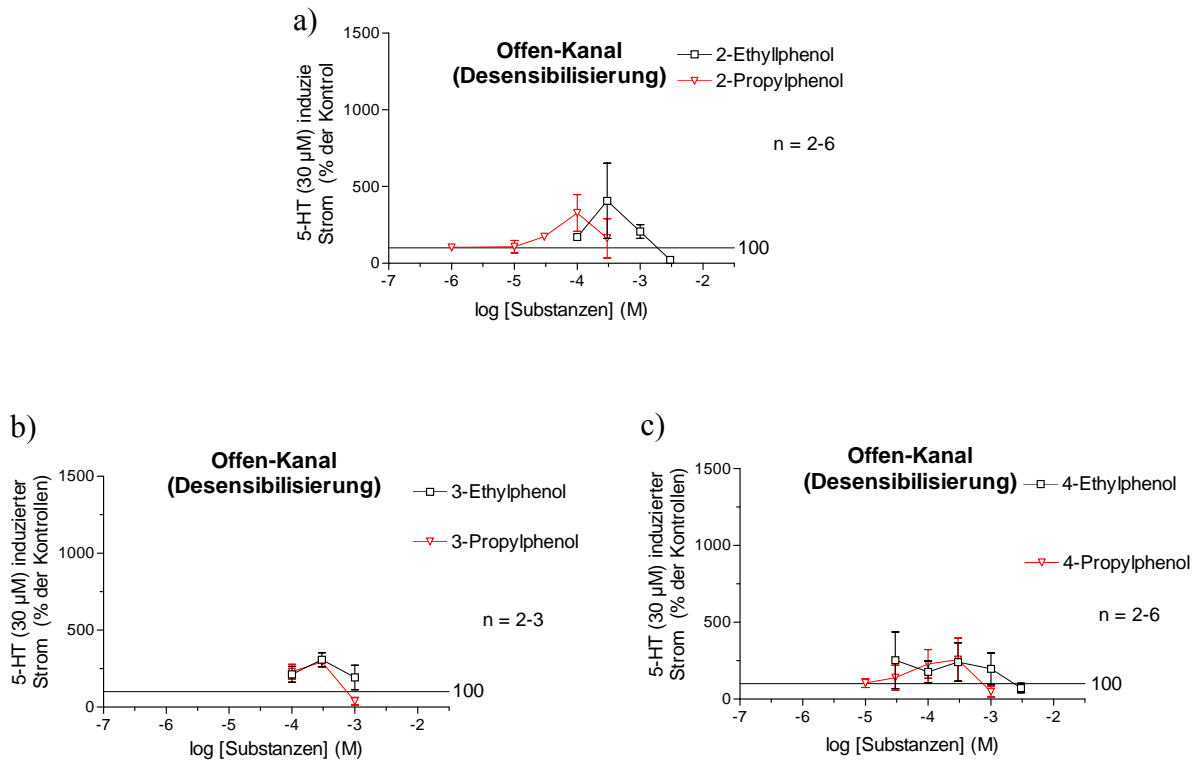


Abbildung 64: Vergleich der Desensibilisierung (τ_{OFF}) in der Offen-Kanal-Applikation der Ethyl- / Propyl-Phenole in a) ortho- b) meta- c) para-Position.

Aus der Abbildung 63 a) – c) lässt sich erkennen, dass die Propylphenole die etwas potenteren Substanzen sind als die jeweiligen Ethylphenole. Innerhalb der Desensibilisierungs-Werte spiegeln sich diese Effekte jedoch nur deutlich, bei 2-Propylphenol und 2-Ethylphenol wider (siehe Abbildung 64 a).

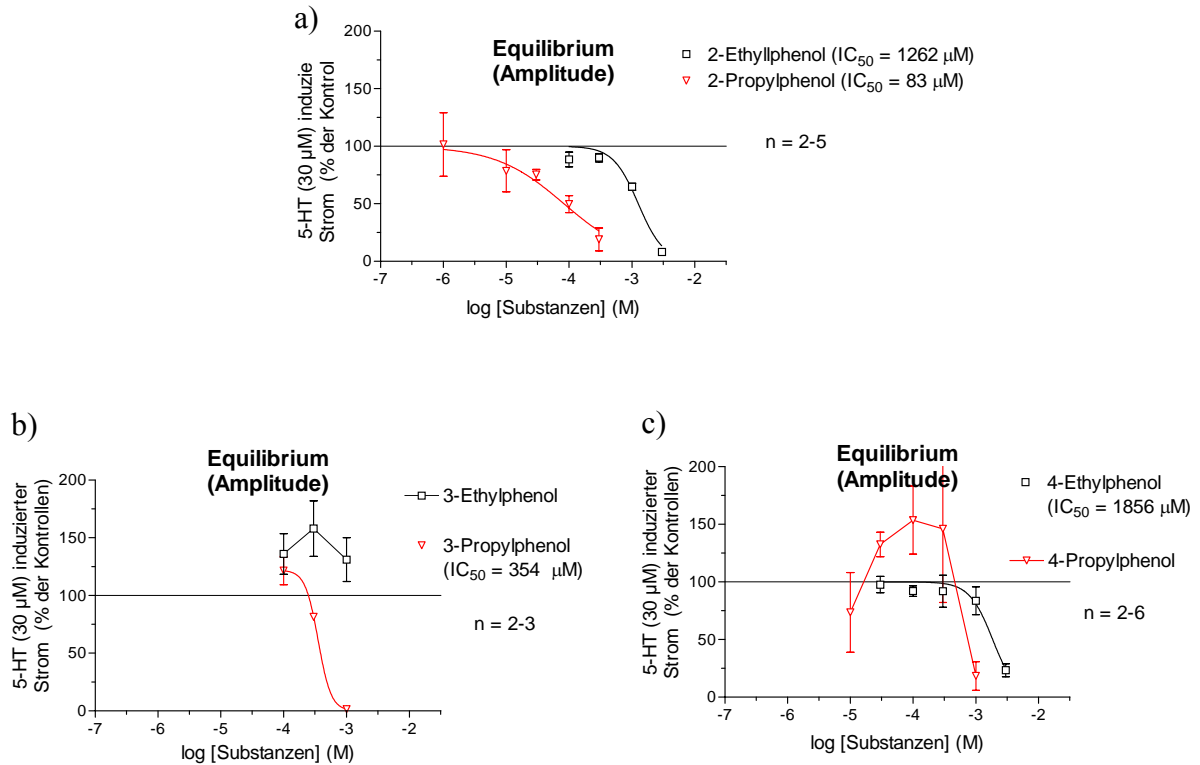


Abbildung 65: Vergleich von Konzentrationswirkungskurven der Amplituden in der Equilibrium-Applikation der Ethyl- / Propyl-Phenole in a) ortho- b) meta- c) para-Position. / Die Propylphenole sind potenter als die dementsprechenden Ethylphenole.

2-Ethylphenol ist im Gegensatz zu 2-Propylphenol um einen Faktor 15 weniger potent (siehe Abbildung 65 a)). 3-Ethylphenol zeigt im Bereich zwischen $100 \mu M$ und $1000 \mu M$ keine Inhibierung, im Gegensatz zu 3-Propylphenol (siehe Abbildung 65 b)). Wie schon in vorherigen Abbildungen gezeigt, potenziert 4-Propylphenol auch in der Equilibrium-Applikation. Der schnell einsetzende Effekt, der mit 5-HT zusammen einsetzt, ist möglicherweise dominant gegenüber einem langsamen inhibitorischen. Betrachtet man die Konzentrationskurven bei 1 mM , so stellt man erneut fest, dass 4-Propylphenol wesentlich potenter ist als 4-Ethylphenol (siehe Abbildung 65 c)).

Man sieht deutlich, dass bei den Propylphenolen, im Vergleich mit den Ethylphenolen, unterschiedliche Mechanismen greifen.

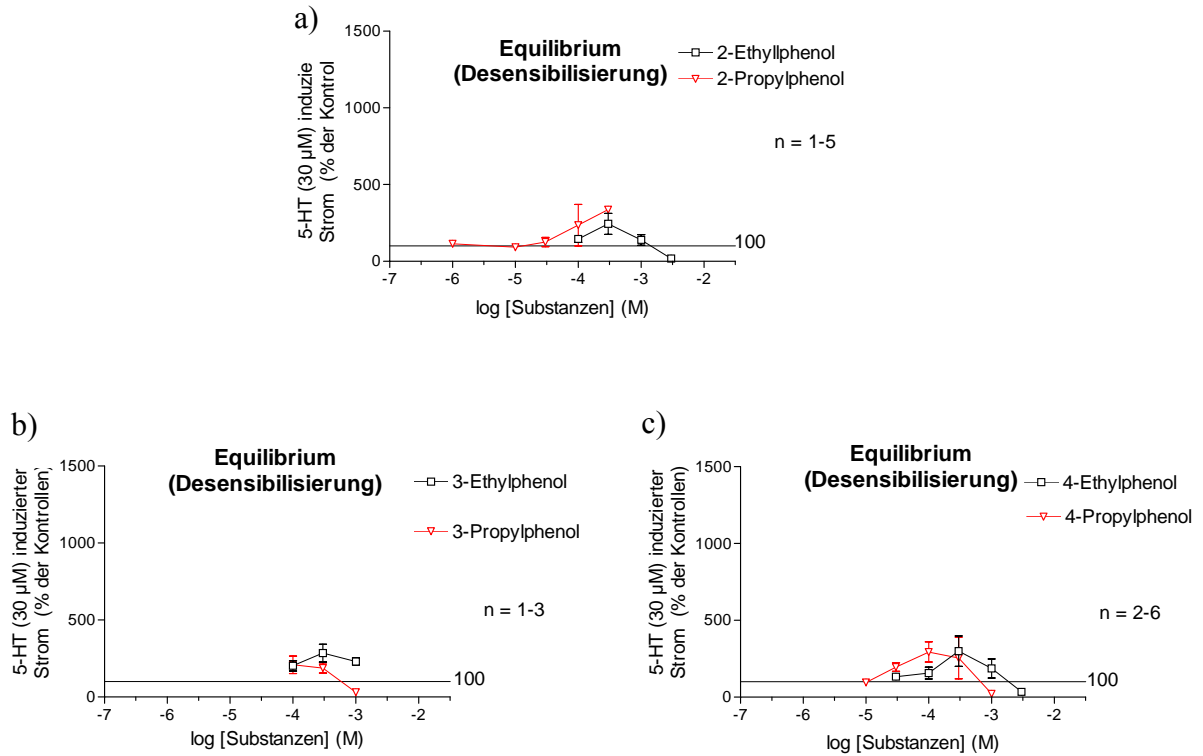


Abbildung 66: Vergleich der Desensibilisierung (τ_{OFF}) in der Equilibrium-Applikation der Ethyl- / Propyl-Phenole in a) ortho- b) meta- c) para-Position.

Vergleicht man Abbildung 65 a) mit Abbildung 66 a), so erkennt man deutlich, dass bei beiden Phenol-Derivaten, die Potenzierung der Amplitude durch eine Inhibierung überlagert wird. Die überlagerte Potenzierung zeigt sich durch die verlangsamten Desensibilisierungswerte in Abbildung 66 a). Bei geringeren Konzentrationen zeigt sich bei den Propyl-Derivaten eine stärkere Verlangsamung der Desensibilisierung; dieser Verlauf ließe sich unter Umständen ebenfalls auch bei 3-Ethylphenol und 3-Propylphenol erkennen, jedoch ist hier der Konzentrationsbereich zu klein gewählt.

3.7 Abbruch der Potenzierung in para-Position

Wie schon in Abbildung 59 gesehen, führen unterschiedliche Konstitutionsisomere zu unterschiedlichen Effekten. Während 4-Propylphenol (para-Position) noch potenziert, inhibiert 4-Isopropylphenol in allen Applikationsmodi. Ein unterschiedlicher Umfang bzw. eine unterschiedliche Größe dieser beiden Konstitutionsisomere bewirken offenbar diese zwei unterschiedlichen (spezifischen) Effekte.

3.7.1 Abbruch durch die Länge der Alkyl-Gruppen

Von großem Interesse ist es nun herauszufinden, ob es möglich ist, einen „Cut-Off-Effekt“ nur durch eine Verlängerung der Alkyl-Gruppen in para-Position zu erreichen, also bei welcher Kettenlänge es zu einem Abbruch der Potenzierung kommt. Eine Inhibierung der Amplitude und keine Verlangsamung der Desensibilisierung (τ_{OFF}) wären die Folgen.

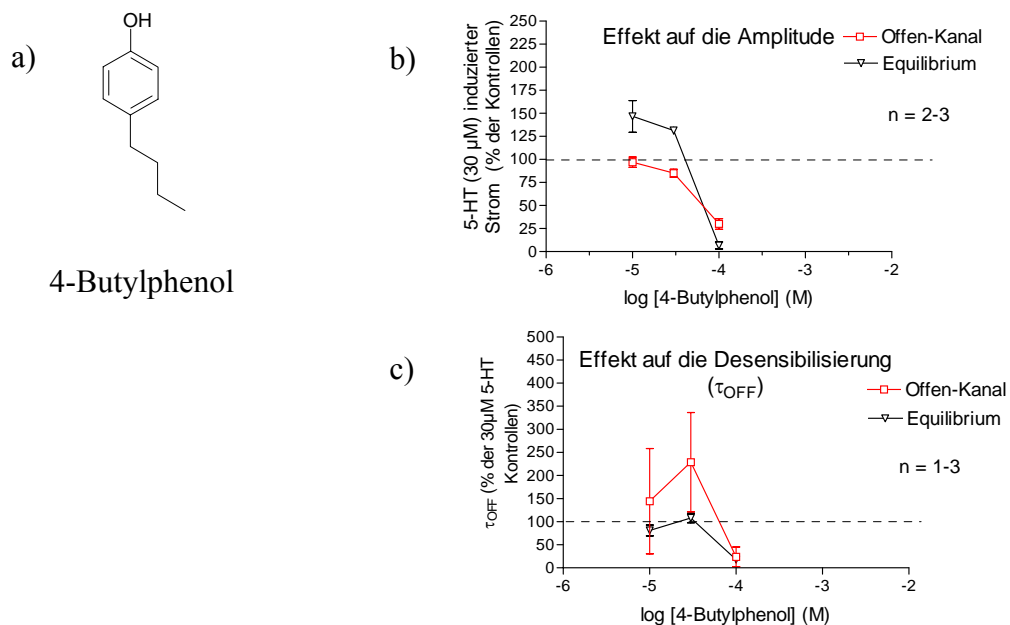


Abbildung 67: a) Strukturformel 4-Butylphenol. b) Konzentrationswirkungskurven der Amplitude von 4-Butylphenol in Offen.-Kanal- und Equilibrium-Applikation. c) Desensibilisierung (τ_{OFF}) von 4-Butylphenol in Offen.-Kanal- und Equilibrium-Applikation.

Wie in Abbildung 67 a) zu erkennen ist, findet bei 4-Butylphenol in der Equilibrium-Applikation, für den Bereich 10 μM bis 30 μM , eine Potenzierung der Amplitude statt, bei gleichzeitiger Verlangsamung der Desensibilisierung (siehe Abbildung 67 b)). Während man umgekehrt in der Offen-Kanal-Applikation eine Hemmung der Amplitude sieht (siehe

Abbildung 67 a)), bei gleichzeitiger Beschleunigung der Desensibilisierung (siehe Abbildung 67 c)).

Ein Effekt der eine Beschleunigung der Desensibilisierung zeigt, bei gleichzeitiger Potenzierung der Amplitude ist hier zum ersten mal zu sehen, und wurde bei sonst keinem anderen Phenol-Derivat zuvor gesehen.

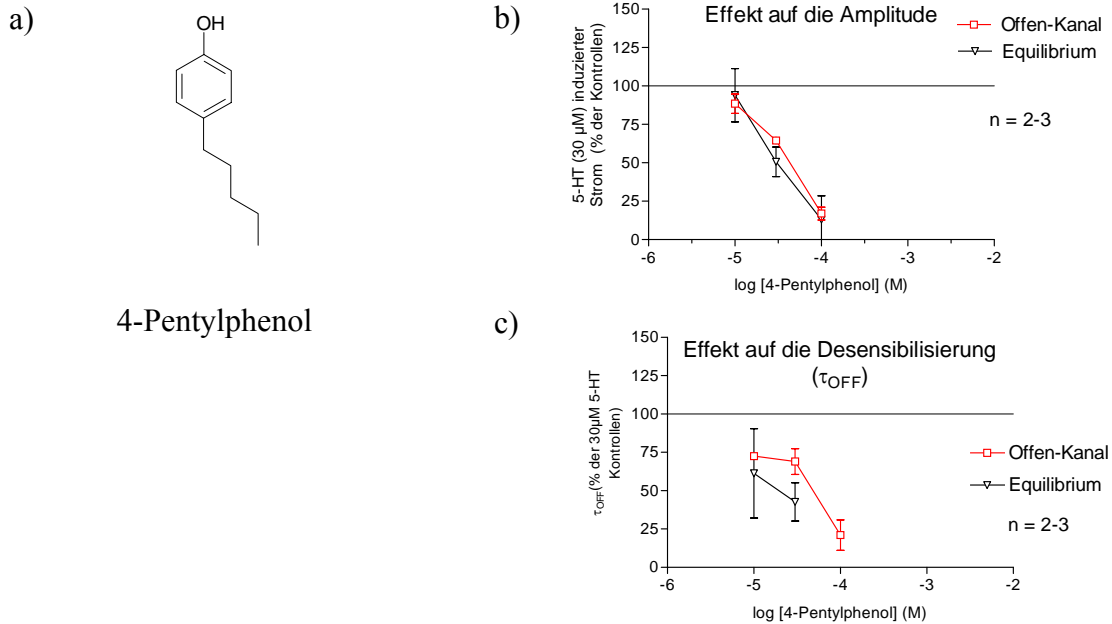


Abbildung 68: a) Strukturformel 4-Pentylphenol. b) Konzentrationswirkungskurven der Amplitude von 4-Pentylphenol in Offen.-Kanal- und Equilibrium-Applikation. c) Desensibilisierung (τ_{OFF}) von 4-Pentylphenol in Offen.-Kanal- und Equilibrium-Applikation.

Abbildung 68 b) u. c) zeigen den einsetzenden „Cut-Off-Effekt“ von 4-Pentylphenol. Inhibition (Amplitude) und Beschleunigung (Desensibilisierung; τ_{OFF}) sind die Folgen. Demnach ist möglicherweise der Umfang dieser Alkyl-Gruppe in para-Position zu groß, um an gleicher Stelle wie 4-Butylphenol zu binden.

3.7.2 Qualitative Übersicht aller verwendeter Substanzen

Substanz	IC ₅₀ Eq (µM)	IC ₅₀ Of.K (µM)	IC ₅₀ Ge.K (µM)	Potenzierer: (+) Nicht-Potenzierer: (-)
Anilin	-	-	-	-
Benzol	4710	13001	9268	-
4-n-Butylph.	38	67	-	+
2-te-Bu-6-Methylph.	31	380	-	-
Chlorbenz.	906	1698	877	-
m-Cresol	9506	7551	-	+
o-Cresol	-	-	-	+
p-Cresol	1282	-	-	+
1,2-Diethylbenz.	86	-	-	-
2,6-Diethylph.	49	-	-	-
2,6-Diisopropylan.	54	113	121	-
1,3-Diisopropylbenz.	34	-	175	-
2,5-Diisopropylph.	5	-	5	-
2,6-Dimethylph.	1371	-	-	-
3,5-Dimethylph.	1442	1730	-	-
2-Ethylph.	1262	1991	-	+
2-Ethyl-6-Methylph.	368	548	-	-
3-Ethylph.	-	-	-	+
4-Ethylph.	1858	2427	-	+
Fluorbenz.	3908	-	29512	-
2-Isopropylanilin	372	-	272	+
2-Isopropylbenz.thio	88	-	-	-
2-Isopropylph.	18	-	14	+
3-Isopropylph.	242	697	-	+
4-Isopropylph.	316	122	-	-
2-Naphthol	26	1035	26	+
4-Pentylph.	32	41	-	-
Phenol	1621	-	1035	+
Propofol	17	28	22	-
2-Propylph.	83	-	-	+

Ergebnisse

3-Propylph.	354	735	-	+
4-Propylph.	834	919	-	+
2-tert.-Butylph.	31	380	-	+
Thioph.	8,9	23823	7,5	-
Thymol	5	-	5	+

Tabelle 1: Gesamtübersicht aller vorhandenen IC₅₀-Werte der verwendeten Substanzen in Equilibrium-(Eq), Offen-Kanal-(Of.K), Geschlossen-Kanal-(Ge.K) Applikation.

3.8 Der homopentamere humane $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor

Die grundlegende Idee einen neuen stabilen transfizierten $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor zu etablieren, war es neben einem exzitatorischen humanen homopentameren Rezeptor (5-HT_{3A}), einen humanen homopentameren inhibitorischen Rezeptor ($\alpha 1$ Glycin) zu erhalten. Ziel dieser Arbeit sollte sein, ähnliche molekulare Mechanismen durch Phenol-Derivate zu erforschen, wie es schon am 5-HT_{3A}-Rezeptor gemacht worden ist.

3.8.1 Molekularbiologische Herstellung und Charakterisierung

Das homopentamere humane *$\alpha 1$ gly*-Gen (1,6 kb) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Betz aus Frankfurt zur Verfügung gestellt. Es wurde mittels der unter Abschnitt 2.1.2 angegebenen Oligonukleotide sequenziert (2.2.3.8). Nach Bestätigung der korrekten Sequenz (siehe Anhang) wurde unter Abschnitt 2.2.3.7 eine PCR mit zusätzlichem Einbau von Restriktionsschnittstellen vollzogen. Nach anschließendem Auftragen von pCDNA3-Vektor (5,4 kb) und *$\alpha 1$ gly*-Gen (2.2.3.5) (siehe Abbildung 69) wurden diese beiden DNA-Banden aus dem Gel isoliert (2.2.3.6) und unter Hilfe der Restriktionsenzyme XbaI und EcoRI verdaut (2.2.3.9). Anschließend wurden Vektor und Gen zusammen homogenisiert und legiert (2.2.3.10).

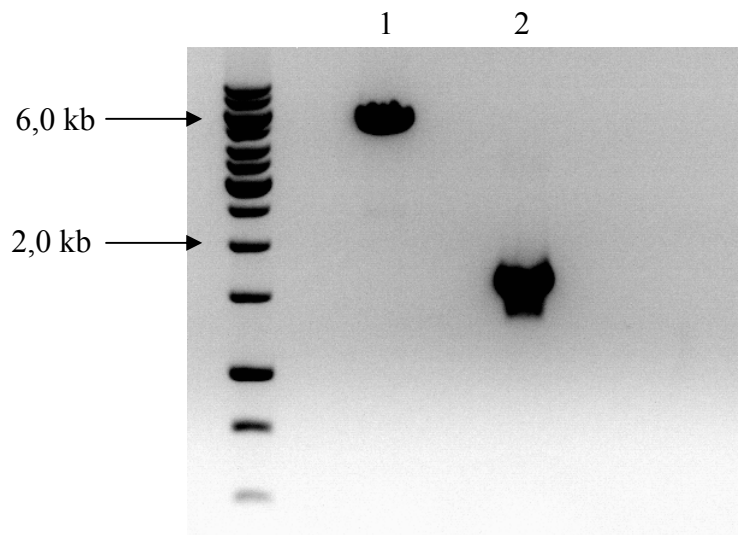


Abbildung 69: Links auf dem Gel: GeneRuler™. Tasche 1: pCDNA3-Vektor; Tasche 2: $\alpha 1$ gly-Gen.

Nach vollzogener Transformation (2.2.3.11) wurden 10 Bakterien-Klone gepickt und einer erneuten Plasmid-Isolation (2.2.3.2) mit anschließendem Restriktionsverdau unterzogen (2.2.3.9). Das Ergebnis ist in Abbildung 70 zu sehen.

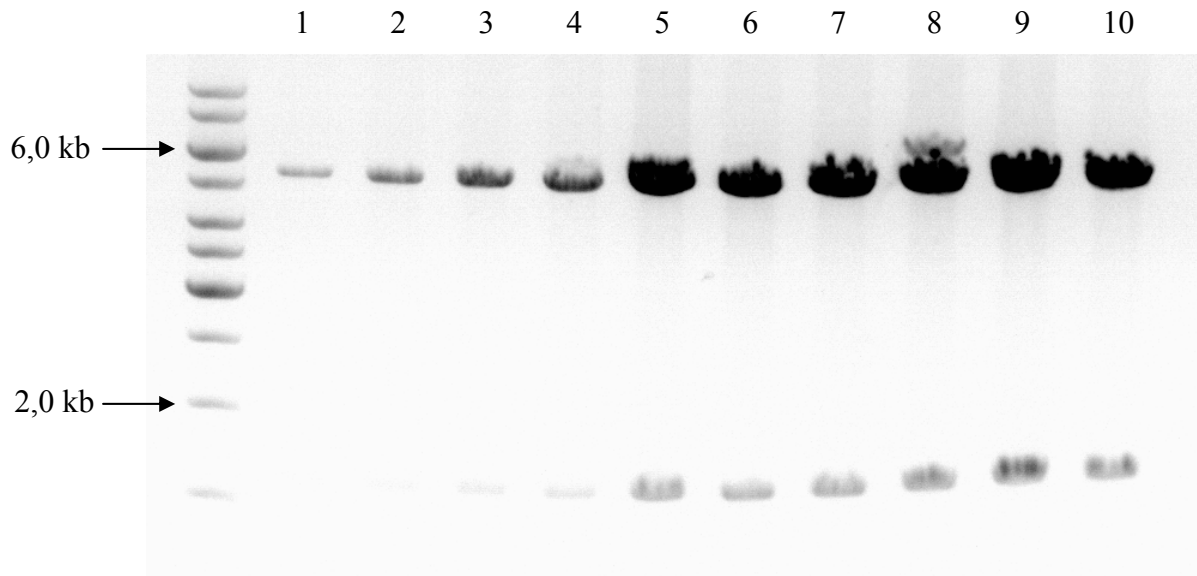


Abbildung 70: 10 gepickte Klone mit anschließendem Restriktionsverdau. Tasche 1 und 2 enthielten nicht das integrierte *α1 gly*-Gen. Tasche 3-10 enthielten das integrierte *α1 gly*-Gen und den Vektor pcDNA3. Links auf dem Gel: GeneRuler™.

Acht von Zehn Bakterien-Klone enthielten das *α1 gly*-Gen (Abbildung 70, Tasche 3 –10). Der in Abbildung 71 dargestellte isolierte Vektor mit integriertem Gen wurde für die Transfektion (2.2.1.2) in HEK 293 herangezogen.

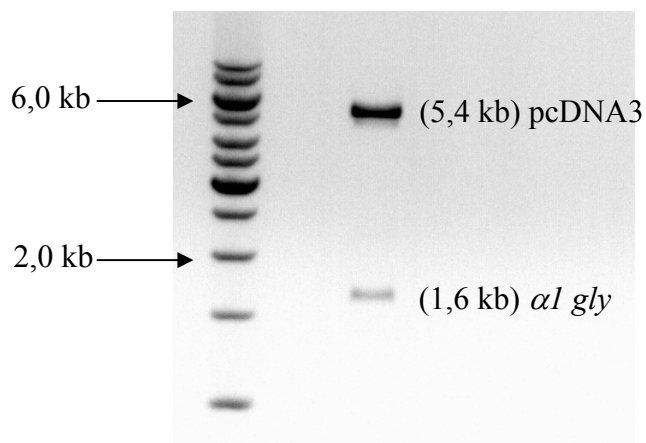


Abbildung 71: Zeigt den präparierten Klon (2.2.3.9) der für die Transfektion genommen wurde. Links auf dem Gel: GeneRuler™.

Mit dem nun so entstandenen polyklonalen HEK 293-Klon wurden elektrophysiologische Charakterisierungs-Experimente gemacht (3.8.2).

3.8.2 Elektrophysiologische Charakterisierung

Die elektrophysiologischen Untersuchungen ergaben, dass im „excised Patch“ leider keine Ströme zu sehen waren, von daher musste im „Whole Cell“-Modus gearbeitet werden. Hier zeigten sich manchmal relativ große Ströme (siehe Abbildung 72). Die dargestellten elektrophysiologischen Ergebnisse sind ausschließlich Daten der polyklonalen Zelllinie.

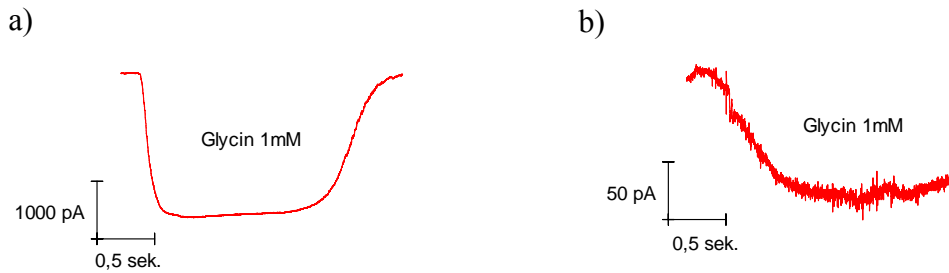


Abbildung 72: Originalstromspuren vom $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor induziert durch 1mM Glycin a) Ein selten beobachteter „Whole Cell“-Patch mit großem Strom. b) Ein häufig beobachteter „Whole Cell“-Patch mit geringem Strom.

Daher wurde weiterhin im „Whole Cell“-Modus gearbeitet; im Abschnitt 3.8 sowohl am 5-HT_{3A}- als auch am $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor. Um den $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor grundlegend physiologisch zu charakterisieren, wurden Konzentrationswirkungskurven sowohl vom 5-HT_{3A}-Rezeptor als auch vom $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor angefertigt, um bei beiden Rezeptoren mögliche Unterschiede herauszustellen.

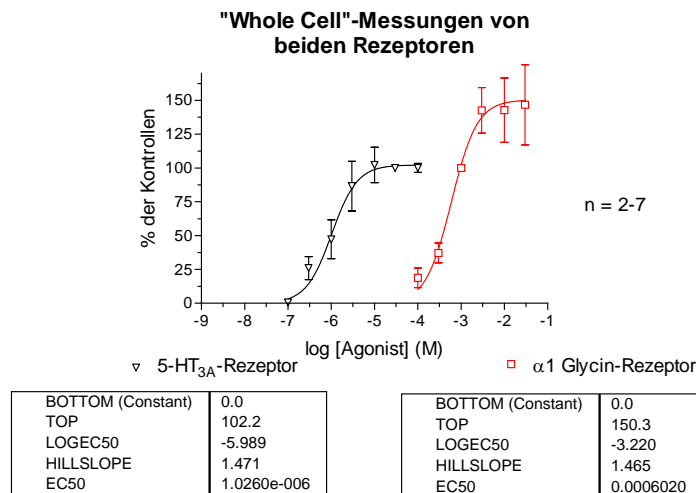


Abbildung 73: Konzentrationswirkungskurven vom 5-HT_{3A}-Rezeptor (schwarz) normiert auf 30 μM 5-HT und α1 Glycine-Rezeptor (rot) normiert auf 1 mM Glycine; beide im „Whole Cell“-Modus.

Die dargestellte Abbildung 73 zeigt, dass der 5-HT_{3A}-Rezeptor um einen Faktor von ca. 600 potenter ist, zum jeweiligen Agonisten, als der α1 Glycine-Rezeptor, bei jedoch gleichen Steilheiten der Kurve (Hillslope 1,471; 1,465). Walkenbach et al. (2005) zeigten, für den 5-HT_{3A}-Rezeptor „excised Patch“ einen EC₅₀ = 10,4 μM (Hillslope 1,567). Man erkennt den deutlichen Unterschied der Aktivitäten bezüglich des Agonisten zwischen „Whole Cell“ und „excised Patch“ (Faktor 7).

Weitere elektrophysiologische Charakterisierungen des α1 Glycine-Rezeptors sind zum einen Inhibition nachzuweisen, gegenüber eines Glycine-Inhibitors (Strychnin) und zum anderen eine Stromspannungskurve darzustellen (siehe Abbildung 74 a) u. b)).

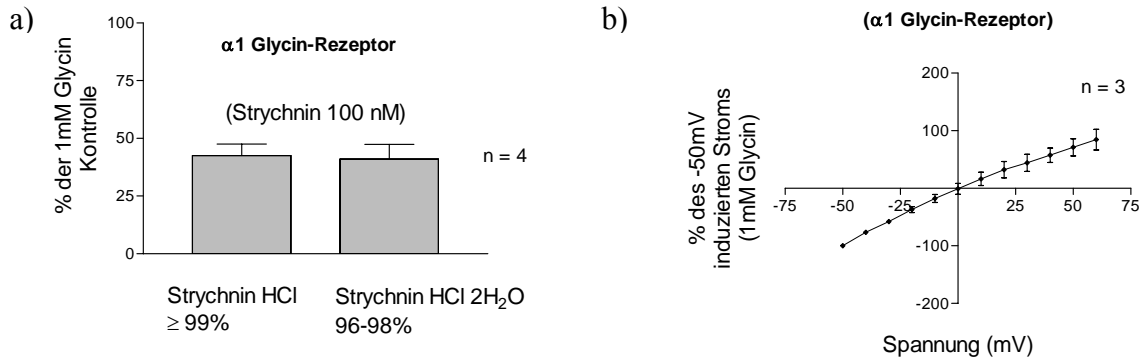


Abbildung 74: $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor: a) Inhibition des Glycin-Stromes bei zwei verschiedenen Strychnin-Salzen, jeweils 100 nM (Whole Cell). b) Stromspannungskurve, normiert auf -50 mV bei 1mM Glycin (Whole Cell).

Der $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor zeigt bei zwei verschiedenen Strychnin-Salzen gleich starke Inhibition (siehe Abbildung 74 a)). Die Stromspannungskurve (siehe Abbildung 74 b)) zeigt im Gegensatz zum 5-HT_{3A}-Rezeptor „excised Patch“ keine Rektifizierung (Barann et al., 2000). Die Zeit des Auswasches (Auswasch während Agonisten / Substanz-Applikation) wurde auf 15 sek festgelegt. Experimentell wurde gezeigt, dass diese Zeit ausreicht, um einen vollständigen Auswasch zu erhalten (Daten nicht dargestellt).

Da die Zeitkonstanten der Aktivierung (τ_{ON}) am $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor Werte > 20 ms darstellten, wurden Experimente durchgeführt, bei denen der Vorlauf der Lösung heruntergesetzt wurde; sowohl am $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor als auch am 5-HT_{3A}-Rezeptor. Es sei darauf hingewiesen, dass der Vorlauf der Lösung am „excised Patch“ essentiell ist, da die Trennung zwischen Ende der ersten Substanzapplikation und Beginn des Agonisten-Einwasches ansonsten nicht „scharf“ ist. Dieser Vorlauf führt jedoch beim „Whole Cell“-Patch dazu, dass am Petrischalen-Grund ein Konzentrations-Gradient entsteht, was möglicherweise zu einem frühzeitigen Öffnen bei einem Teil der Kanäle führt.

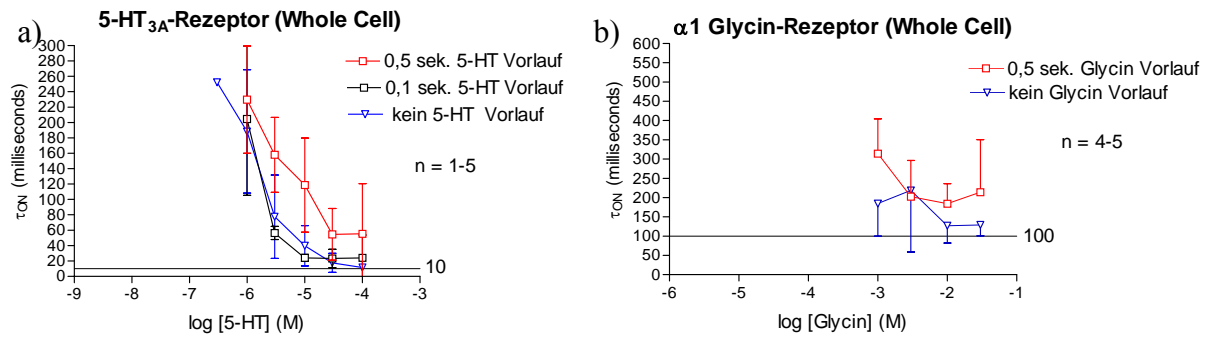


Abbildung 75: Verschiedene Zeitvorläufe von Agonisten-Konzentrationen bezogen auf die Kinetik der Zeitkonstante der Aktivierung (τ_{ON}) a) (Whole Cell) 5-HT_{3A}- b) (Whole Cell) $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor.

Die Abbildung 75 a) u. b) zeigt deutlich, dass bei weniger langem Agonisten-Vorlauf es zu schnelleren Aktivierungs-Kinetiken der Zeitkonstanten (τ_{ON}) kommt und dass diese konzentrationsabhängig sind. Die Aktivierungszeitkonstanten des 5-HT_{3A}-Rezeptors sind wesentlich schneller als die des $\alpha 1$ Glycin-Rezeptors (siehe Abbildung 75 a) u. b)).

Von großem Interesse ist weiterhin, wie die molekularen Mechanismen von Phenol-Derivaten am $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor sind, und ob diesen Mechanismen spezifische, wie am 5-HT_{3A}-Rezeptor, oder unspezifische Effekte zugrunde liegen.

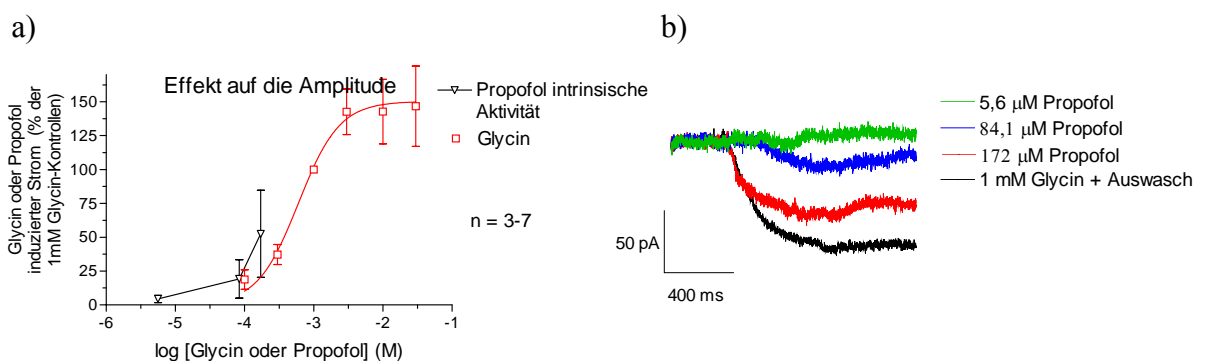


Abbildung 76: $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor : a) Intrinsische Aktivität von Propofol und Glycin (Whole Cell) am $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor. Propofol ist der potentere Agonist am $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor b) Originalstromspuren eines $\alpha 1$ Glycin „Whole Cell“-Patches induziert durch verschiedene Propofol-Konzentrationen und 1 mM Glycin.

Betrachtet man Abbildung 76 a), so erkennt man, dass Propofol der etwas potentere Agonist ist. Um zu entscheiden ob dieser Agonisten-Effekt spezifisch ist, wurde im Folgenden Phenol das Grundgerüst aller Derivate untersucht.

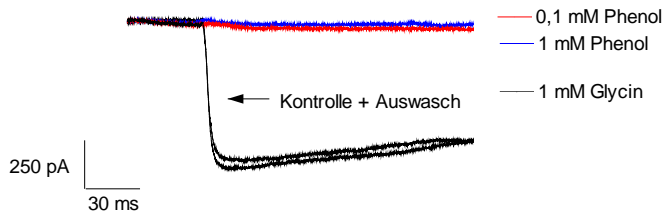


Abbildung 77: Originalstromspur am α_1 Glycin-Rezeptor (Whole Cell); testen auf intrinsische Aktivität durch 0,1 und 1mM Phenol. Phenol zeigt für diesen Konzentrationsbereich keine intrinsische Aktivität.

Phenol zeigt im Gegensatz zu Propofol (siehe Abbildung 77) keine intrinsische Aktivität für den angegebenen Konzentrationsbereich. Dies bedeutet, dass der Rezeptor nicht gegenüber allen Phenolen gleich empfindsam ist, was demzufolge auf spezifische Mechanismen hindeutet.

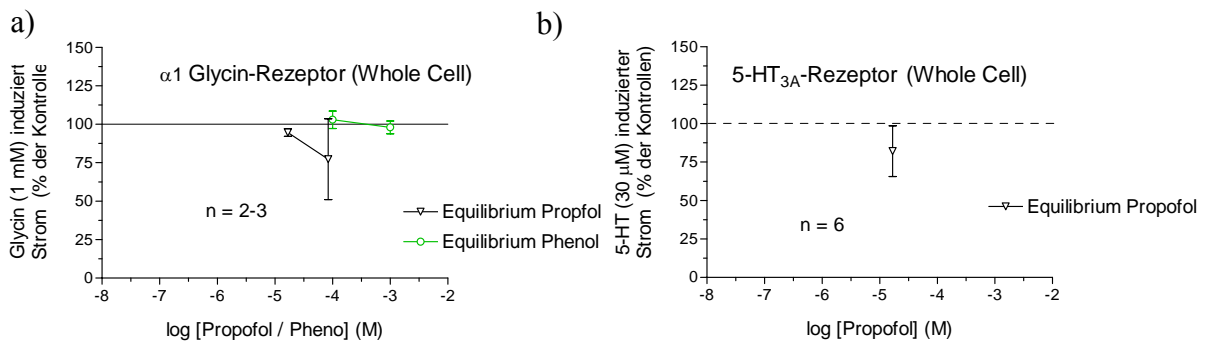


Abbildung 78: Gleichgewicht-Anwendung 1min von Propofol (schwarz) und Phenol (grün) a) (Whole Cell) am α_1 Glycin- b) (Whole Cell) am 5-HT_{3A}-Rezeptor.

Abbildung 78 a) zeigt das in der Gleichgewicht-Anwendung Propofol erst ab einer Konzentration von ca. 100 μ M Hemmung zeigt, während Phenol bis hin zu 1 mM keine Effekte hervorruft. Zum Vergleich zeigt Propofol bei 17 μ M (IC₅₀ vom „excised Patch“) am 5-HT_{3A}-Rezeptor „Whole Cell“-Patch wesentlich weniger Hemmung als am „excised Patch“ (siehe Abbildung 78 b)).

3.8.3 Herstellung einer monoklonalen Zelllinie aus einer polyklonalen

Monoklonaler Klon:	Anzahl „Whole Cell“-Patche	kein Strom	bis 100 pA	bis 500 pA	bis 1000 pA	bis 2000 pA	bis 3000 pA
MK2B1	21	15	6				
MK1A8	9	3	3	1	2		
MK2A4	11	5	5	1			
MK2A3	10	5	5				
MK2A7	5	5					
MK1A1	7	4		1	1		1
MK1B1	6	5	1				
MK1A2	4	1		1	2		
MK1A3	7	2	5				
MK1A7	2		2				
MK1B2	7	4			3		
MK2B6	6	4	2				
MK1A9	5	3	1	1			
MK1A11	9	5	4				
MK2A10	4	3	1				
MK2A9	8	7	1				
MK1A6	9	4	4	1			
MK1A4	5	4	1				
MK2B3	7	4	3				
MK2B4	11	11					
MK2B10	8	7	1				
MK2B9	7	6	1				
MK2A8	6	4	1		1		
MK2A11	6	1	5				
MK2A12	5	1	1		2	1	
MK1B7	6	2	4				
MK1B9	7	3	4				
MK1B8	5	1		1	3		
MK1A12	7	6	1				
MK1A10	7	3	3				1
MK2A5	6	4	2				
MK2A6	8	4		3	1		
MK2A2	8	4	1		2	1	
MK2A1	8	5	3				
MK1B5	4	1		1			1
MK1B6	7	6	1				
MK1B4	7	4	1	1	1		
MK1B3	3	2	1				
MK1B10	8	7			1		
MK1B11	7	5	1		1		
MK2B11	8	8					
MK2B7	6	6					
MK2B5	5	1	1	2			
MK2B8	5	3	2				
MK2B12	5	4	1				

Tabelle 2: Monoklonale Klone mit der gesamten Anzahl der jeweiligen „Whole Cell“-Patche und den daraus resultierenden erfolgreichen Stromgrößen in piko Ampere (pA). Rot dargestellt Klone wurden kryokonserviert (2.2.1.3).

Die in Tabelle 2 rot dargestellten Klone wurden kryokonserviert (2.2.1.3). Zusätzlich wurden mit diesen Klonen „excised Patch“-Experimente gemacht (Daten nicht dargestellt). Leider wurde zu keinem Zeitpunkt eine Stromantwort bei einem dieser Experimenten (excised Patch) gemessen.

4. Diskussion

4.1 Validation der Messapparatur

Zur Charakterisierung der Phenol-Derivate wurde in dieser Arbeit die „Patch-Clamp“-Methode unter Berücksichtigung eines schnellen Lösungsapplikationssystem verwendet. Durch den schnellen Lösungsaustausch (≤ 10 ms) bietet dieses System die Möglichkeit, schnelles Öffnen und Schließen von Membrankanälen zu erfassen und die daraus resultierenden Stromeffekte zu analysieren. Die Reversibilität der Strommessungen stellt einen großen Vorteil dieser Methode dar. Auf eine erste Kontrollmessung erfolgt eine Versuchsmessung und anschließend wieder eine Kontrollmessung (Auswasch), so dass man den Effekt der Versuchsmessung klar von den Kontrollen abgrenzen kann.

Dennoch zeigen die dargestellten klassischen Experimente in Abschnitt 3.1, bei denen ausschließlich gegen den Puffer (ECS) gemessen wurde (Negativkontrollen), dass der auftretende Fehler bei ca. 10 % liegen kann (siehe Abbildung 15). Folgende Möglichkeiten kommen hierfür in Betracht:

- 1.) Eine Verunreinigung des Schlauchsystems durch eine vorherige Benutzung von Phenol-Derivaten.
- 2.) Weichmacher oder andere Substanzen die sich in den Schläuchen befinden und sich während der Benutzung des Systems aus diesen lösen. Dies würde erklären, warum in Abbildung 15 c) nach drei Monaten Benutzung der Anlage, die Kontrollen bei einem sehr guten Wert von ca. 100 % lagen.
- 3.) Das Auftreten von Kanalverlust-Ereignissen. Hierbei verliert der Patch Kanäle bzw. Kanäle werden irreversibel zerstört. Läuft dieses Ereignis nicht kontinuierlich ab, also verliert die Versuchsstromspur mehr Kanäle als die Kontrollstromspur innerhalb einer Messung, so entsteht ein Fehler in der Auswertung, der nicht unmittelbar auf die Messapparatur zurückzuführen ist. Leider kamen diese Ereignisse (Kanalverluste) sehr häufig vor, so dass man nicht einfach nur darauf zurückgreifen konnte, nur solche Patche zu nehmen, die diesem Ereignis nicht unterlegen waren.

Nichtsdestotrotz konnten potenzierende und inhibierende Mechanismen von Phenol-Derivaten klar herausgestellt werden, da sich diese Mechanismen in mehr als nur einem Effekt äußern - im weiteren Verlauf der Diskussion wird hier noch genauer darauf eingegangen. Dennoch stößt man bei äußerst geringen Konzentrationen an die Auflösung der Messapparatur bzw. des Messsystems. D. h., Prozesse die in geringen Konzentrationen

beispielsweise 5 % Inhibierung oder Potenzierung zeigen, sind nicht klar zu trennen bezüglich Effekt einer Substanz oder Fehler des Messsystems.

4.2 Untersuchungen der molekulare Mechanismen

Primäres Ziel der Arbeit war es, die molekularen Mechanismen von Propofol zu verstehen. James und Glen (1980) untersuchten in ihrer Arbeit verschiedene Alkylphenole in Bezug auf ihre intravenöse anästhetische Aktivität bei Mäusen. Zu diesem Zeitpunkt war bekannt, dass 2,6-Diethylphenol in Mäusen und 2,6-Diisopropylphenol (Propofol) bei Menschen sehr gut funktionieren. In ihrer Studie von über fünfzig Alkylphenolen kamen sie zu dem Schluss, dass die optimalen Erfordernisse für intravenöse anästhetische Aktivität bei Di-sek-Alkyl Substituenten gegeben sind, wobei die Summe der Kohlenstoffatome der Substituenten zwischen Sechs und Acht liegen sollte.

Anästhetische Wirkungen spielen bei einer Reihe von Prozessen im Zentralen Nervensystem eine Rolle. Von großer Bedeutung sind solche Prozesse, die mit der Aktivität von ligandengesteuerten Ionenkanälen in Verbindung stehen (Richards, 1998). Diese Prozesse sollten nun an verschiedenen Phenol-Derivaten untersucht werden, ausgehend von Propofol, im Rahmen von „Patch-Clamp“-Versuchen am 5-HT_{3A}- und α 1 Glycin-Rezeptor.

4.3 Propofol und Derivate am 5-HT_{3A}-Rezeptor

Betrachtet man die Strukturformel von Propofol (siehe Abbildung 1), so könnte man annehmen, dass bei einem so simplen Molekül der Wirkmechanismus am 5-HT_{3A}-Rezeptor ähnlich einfach funktioniert. Eine Reihe von Ergebnissen zeigten aber, dass dies nicht der Fall ist. Anästhetische Potenz wird oftmals mit unspezifischer lipophiler Wechselwirkung in Verbindung gebracht. Das bedeutet, je lipophiler eine Substanz ist, desto potenter ist sie. Überführt man diese Hypothese in Bezug auf unser Modellsystem 5-HT_{3A}-Rezeptor, so stellt man folgendes fest: Betrachtet man zunächst einmal die IC₅₀-Werte für Propofol, 2-Isopropylphenol und Phenol, so sieht man, dass Propofol und Isopropylphenol gleich potent sind, während der IC₅₀ für Phenol um einen Faktor 93 weniger potent ist. Demgegenüber steht der Partitionskoeffizient, der als Maß für Lipophilie und somit unspezifische Wechselwirkungen steht. Hier sollte Propofol um einen Faktor 213 potenter sein als Phenol.

Unspezifische lipophile Wechselwirkung dieser Substanzen kann als alleinige Ursache somit ausgeschlossen werden.

Krasowski et al. (2001) zeigten von verschiedenen Propofol-Analogen anästhetische Wirkung an *Xenopus laevis* Kaulquappen, sowie Selbstaktivität dieser Propofol-Derivate am GABA_A-Rezeptor und schlossen reine Lipophilie als Ursache dafür aus.

4.4.1 Effekte der Phenol-Derivate

Wie in Abschnitt 4.3 bereits beschrieben, kommt eine unspezifische lipophile Wechselwirkung am 5-HT_{3A}-Rezeptor als alleiniger Mechanismus wahrscheinlich nicht in Frage. Was aber genau bezüglich der Struktur von Phenol-Derivaten für spezifische Wechselwirkungen erforderlich ist, wie diese Effekte zu verstehen sind, wird nun im Folgenden diskutiert:

Propofol verursacht ab einer Konzentration von ca. 1,6 µM (siehe Abbildung 21), sowohl in der Offen-Kanal- als auch in der Equilibrium-Applikation, eine Inhibierung der Amplitude und eine Beschleunigung der Desensibilisierung (τ_{OFF}) (siehe Abbildung 19). Diese beiden Effekte sind konzentrationsabhängig und nehmen bei ansteigender Konzentration zu. Wird die Hydroxyl-Gruppe nicht mehr von beiden Seiten flankiert, wie beim 2-Isopropylphenol oder gar nicht mehr, wie beim Phenol, so weicht die Inhibierung der Amplitude einer Potenzierung (siehe Abbildung 22) und die Beschleunigung der Desensibilisierung einer Verlangsamung. Die Potenzierung der Amplitude offenbart sich nur für einen bestimmten Konzentrationsbereich, während bei zunehmender Konzentration die Potenzierung durch eine Inhibierung überlagert wird. Der Mechanismus der Potenzierung der Amplitude offenbart sich immer mit einer Verlangsamung der Desensibilisierung, dies unterscheidet diesen Mechanismus von rein inhibitorischen Substanzen. Potenzierung wird, gegebenenfalls, in der Equilibrium-Applikation, überlagert durch eine Inhibierung. Doch auch hier zeigte sich bei allen potenzierenden Substanzen eine Verlangsamung der Desensibilisierung, die somit auch in der Equilibrium-Applikation bei 2-Isopropylphenol und Phenol zu sehen war (siehe Abbildung 20). In der Geschlossen-Kanal-Applikation konnte nur eine Inhibierung der Amplitude festgestellt werden. Betrachtet man nun die Equilibrium-Applikation als Summe der Offen-Kanal und Geschlossen-Kanal-Applikation, so sieht man, dass die Equilibrium-Applikation sich zwar insgesamt als Inhibition darstellt (Effekt; Geschlossen-Kanal) sich aber von der Geschlossen-Kanal-Applikation durch den zusätzlichen Effekt der Verlangsamung (τ_{OFF}) unterscheidet (Effekt; Offen-Kanal). Demzufolge deutet sich hier bereits an, dass potenzierende und inhibierende Effekte unterschiedlicher Natur und voneinander trennbar

sind. Da die Geschlossen-Kanal-Applikation keinen Effekt über den gesamten Konzentrationsbereich auf die Desensibilisierung hat (siehe Abbildung 19 u. Abbildung 20), könnte man hier einen anderen Wirkmechanismus vermuten, der vielleicht nicht in direktem Zusammenhang mit der Rezeptorbindungsstelle steht.

Um festzustellen, ob Phenol-Derivate direkt in Verbindung mit der Rezeptorbindungsstelle stehen, wurden Kompetitivitätsversuche durchgeführt, bei denen Propofol, 2-Isopropylphenol und Phenol im Bereich des IC_{50} bei unterschiedlichen Agonisten-Konzentration (3 und 30 μM) gemessen wurden (siehe Abbildung 29 u. Abbildung 30). Potenzierende und inhibierende Effekte verstärken sich, bei geringerer Agonisten-Konzentration, sowohl in der Offen-Kanal als auch in der Equilibrium-Applikation, nicht aber in der Geschlossen-Kanal-Applikation. Sobald also 5-HT zusammen mit einem Derivat appliziert wird, ist der Effekt kompetitiv. Wird die Substanz ausschließlich vorher appliziert, ist der Effekt nicht mehr kompetitiv. Entweder spielt hier die Rezeptor-Konformation eine Rolle und / oder die Geschwindigkeit mit der die Phenol-Derivate reagieren.

Abbildung 23 zeigt schnelle und langsame Effekte von Phenol-Derivaten, die klar voneinander zu trennen sind. Beim Propofol sind beide Effekte inhibitorisch, während 2-Isopropylphenol und Phenol Potenzierungen zeigen, die im weiteren Zeitverlauf einer Inhibition weichen. Schnelle Effekte können sowohl inhibitorisch als auch potenzierend sein, während langsame Effekte nur inhibitorisch sind.

Das Phänomen der Potenzierung kann man folgendermaßen erklären: Die Substanz konkurriert mit dem Agonisten (5-HT) um die gleiche Bindungsstelle, wie Kompetitivitäts-Experimente gezeigt haben (siehe Abbildung 29 u. Abbildung 30). Das alleine reicht aber nicht, da auch Propofol, eine nicht potenzierende Substanz, ebenfalls zu 5-HT kompetitiv ist (siehe Abbildung 29). Bei potenzierenden Substanzen muss die Hydroxyl-Gruppe partiell frei sein, das heißt sie darf nicht von beiden ortho-Seiten mit Alkyl-Substituenten flankiert werden. Ist also die Hydroxyl-Gruppe partiell frei, könnte es sein, dass diese Substanzen länger an der Agonisten-Bindungsstelle binden. 5-HT bindet dann zu einem späteren Zeitpunkt, was demnach die Desensibilisierung verspätet einleitet. Verlangsamung der Desensibilisierung äußert sich in einer Amplituden-Potenzierung. Ein Hinweis auf diese Theorie zeigt sich in Abbildung 32 u. Abbildung 33. Hier führt eine Verlangsamung der Aktivierung (τ_{ON}) innerhalb der Equilibrium-Applikation zu einer Potenzierung der Amplitude, anstelle einer Inhibition. Ist die Zeitkonstante der Aktivierung ≥ 25 ms, so setzt sich die Potenzierung gegenüber der Inhibition in der Equilibrium-Applikation durch

(Phenol, 1 mM). D. h., es bleibt mehr Zeit für die Substanz an der Bindungsstelle zu binden, bevor die Desensibilisierung eingeleitet wird und so setzt sich Potenzierung anstelle Inhibierung ist die Folge. Potenzierung korreliert hier also mit der Zeitkonstante der Aktivierung. Längeres Binden dieser Substanzen an der Agonisten-Bindungsstelle, sowohl in der Aktivierungs- als auch in der Desensibilisierungs-Kinetik könnte zu einem verspäteten schließen der Kanäle durch den Agonisten (Desensibilisierung) führen. Eine weitere Erklärung des Phänomens Potenzierung der Amplitude wäre, dass die partiell freie Hydroxyl-Gruppe einen speziellen Mechanismus in Gang setzt, der diese Potenzierung bewirkt.

Krasowski et al. (2001) zeigten, dass eine Punktmutation beim GABA_A-Rezeptor, (β_2 (M286W)) innerhalb der TM3-Domäne, ein Abbruch der Potenzierung durch Propofol verursacht, jedoch keinen Einfluss auf die direkte Aktivierung durch Propofol hat. Während Mutationen innerhalb der α_2 -Untereinheiten, auch innerhalb der TM3 und TM3-Domänen, keinen Einfluss auf Potenzierung durch Propofol hatten (Krasowski et al., 1998). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die α_1 -Untereinheit mehr Potenzierung am GABA_A-Rezeptor verursacht als die α_6 -Untereinheit (Krasowski et al., 1997). Diese Arbeiten deuten auf eine allosterische Bindungsstelle für Propofol und dessen Derivate hin, wie sie ebenfalls beim 5-HT_{3A}-Rezeptor vorhanden sein könnte. Dennoch haben Kompetitivitäts-Experimente gezeigt, dass Propofol, zuzüglich Derivate, an der 5-HT-Bindungsstelle binden können (siehe Abbildung 29 u. Abbildung 30). Ein zusätzlicher allosterischer Effekt könnte demnach unabhängig voneinander sein.

4.4.2 Alkyl- und funktionelle Gruppen

Von Anfang an stellte sich die Frage, welche Bedeutung die einzelnen Komponenten (aromatischer Ring, Isopropyl- und Hydroxyl-Gruppen) in Bezug auf die Wirkmechanismen haben. Mindestens zwei Effekte konnten beim Einwasch beobachtet werden, ein schneller und ein langsamer (siehe Abbildung 23). Fehlte die Hydroxyl-Gruppe (siehe Abbildung 24), wie beim 1,3-Diisopropylbenzol, beobachtete man nur einen langsamen Effekt. Krasowski et al. (2001) veranschaulichten am GABA_A-Rezeptor, bei gleicher Substanz (1,3-Diisopropylbenzol) keine Potenzierung, während mit Hydroxyl-Gruppe wieder Potenzierung vorhanden war. Die Potenzierung der Amplitude, die sich durch die Einwasch-Versuche als schneller Effekt verifizieren lässt, fehlt vollständig beim Benzol, ebenso wie die Verlangsamung der Desensibilisierung. Phenol und Benzol unterscheiden sich durch die Hydroxyl-Gruppe, die beim Benzol fehlt. Somit steuert die Hydroxyl-Gruppe einen spezifischen schnellen Effekt, der sich entweder in Potenzierung oder Inhibierung äußern

kann. Beene et al. (2004) zeigten, dass die Hydroxyl-Gruppe von Tyrosin und die damit Verbundenen Wasserstoffbrückenbindungen, innerhalb der Bindungstasche, essentiell sind für das Öffnen des Kanals. Somit könnte die Hydroxyl-Gruppe von Phenolen, innerhalb dieser Bindungstasche, eine Rolle spielen und dadurch zu schnellen Prozessen, wie Potenzierung besteuern. Krasowski et al. (2002) zeigten, dass das Proton der Hydroxyl-Gruppe des Propofols und die damit formierte Wasserstoffbrückenbindung innerhalb der Bindungstasche, des GABA_A-Rezeptors, eine der wichtigsten Funktionen für Potenzierung bzw. direkte Aktivierung des Kanals ist.

Welche Bedeutung ist den Alkyl-Gruppen zuzuordnen? Betrachtet man Abbildung 79, so erkennt man, dass sobald die Hydroxyl-Gruppe von beiden Seiten mit Alkyl-Gruppen flankiert wird, der Effekt der Potenzierung aufgehoben ist. Bei keinem Phenol-Derivat konnte dann Potenzierung beobachtet werden, selbst wenn die Hydroxyl-Gruppe nur von Methyl-Substituenten flankiert wurde. Krasowski et al. (2001) stellten in ihrer Arbeit Punktmutanten am GABA_A-Rezeptor vor und zeigten, dass weder 2,6-Dimethylphenol noch 2-Isopropylphenol den Abbruch der Potenzierung besteuerten, wohl aber 2,6-Diethylphenol. Innerhalb dieser Bindungstasche scheint die Hydroxyl-Gruppe beim 2,6-Dimethylphenol noch Wasserstoffbrückenbindung einzugehen. Beim 5-HT_{3A}-Rezeptor gibt es keinen Alkyl-Substituenten, der durch eine einseitige ortho-Flankierung groß genug ist, die Potenzierung aufzuheben – wie 2-tert-Butylphenol. Wie in dem vorherigen Abschnitt bereits besprochen, scheint die Hydroxyl-Gruppe und deren Bindung von entscheidender Bedeutung zu sein. Es ist offenbar so, dass die beidseitige Flankierung diesen Mechanismus (Potenzierung) unterbindet (5-HT_{3A}-Rezeptor), während dies von einer ortho-Position nicht möglich ist. Krasowski et al., zeigten am GABA_A-Rezeptor, dass nur 2-Cyclopentylphenol, als mono-ortho-Substanz, den potenzierenden Mechanismus am GABA_A-Rezeptor unterbindet, aufgrund des zu großen Umfangs.

Trotzdem interagiert die Hydroxyl-Gruppe, am 5-HT_{3A}-Rezeptor, auch bei beidseitiger Flankierung und steuert auch hier einen schnellen, allerdings inhibitorischen, Effekt (siehe Abbildung 23) im Gegensatz zum 1,3-Diisopropylbenzol (siehe Abbildung 24) und wirkt kompetitiv im Gegensatz zum Benzol (siehe Abbildung 29 u. Abbildung 31).

Die ortho-Positionen scheinen, bei der Begünstigung von Potenzierung bzw. Inhibierung und der damit verbundenen Interaktion der Hydroxyl-Gruppe, eine entscheidende Rolle zu spielen. Welche Rolle aber spielen para- und meta-Position?

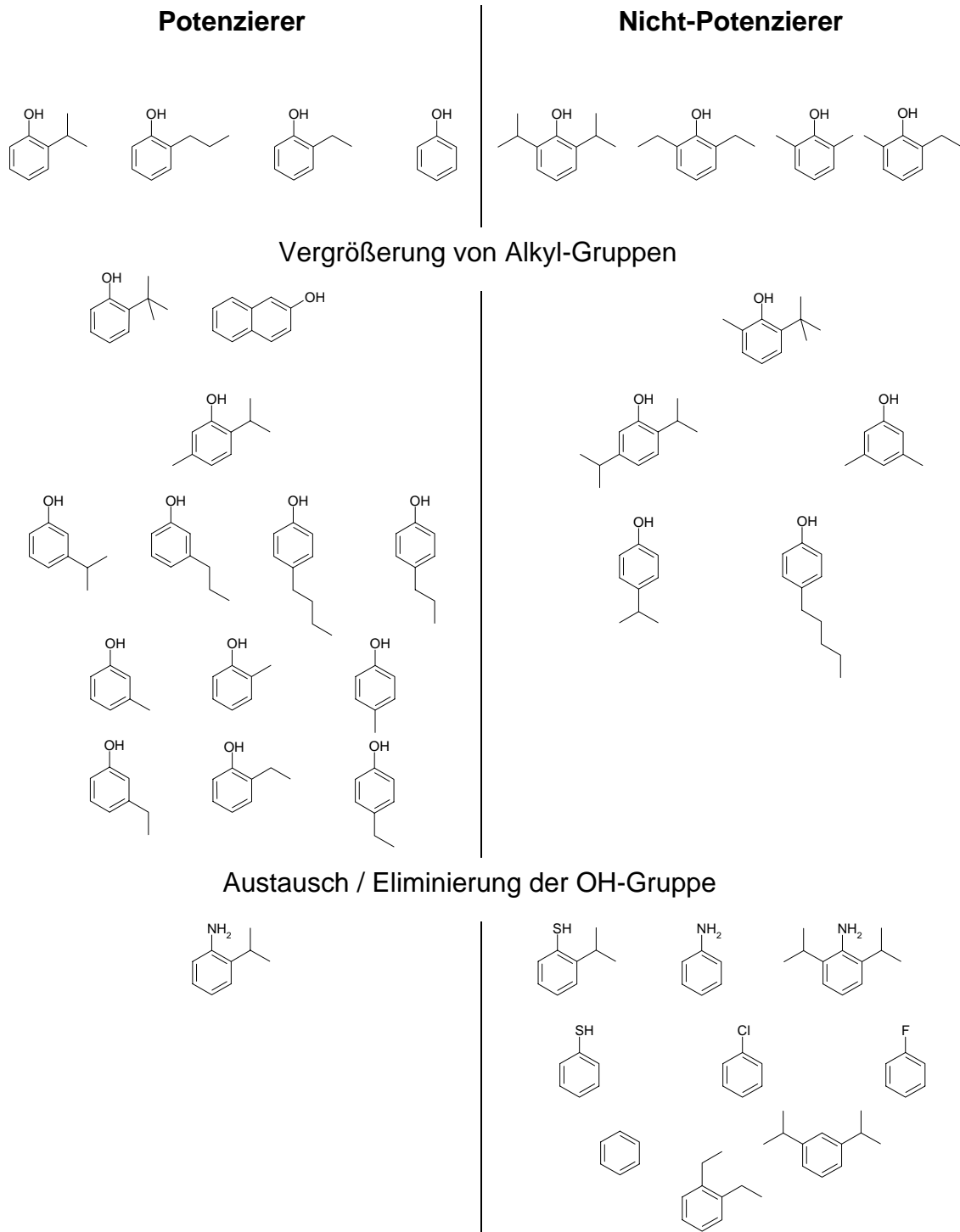


Abbildung 79: Übersicht über die Phenol-Derivate und ihre Einteilung in 5-HT_{3A}-Rezeptor potenzierenden und nicht potenzierenden Substanzen.

Betrachtet man Abbildung 42, so sieht man, dass Thymol trotz einer Methyl-Gruppe in meta-Position den 5-HT induzierten Strom noch potenziert. Vergrößert man den Substituenten in dieser Position (2,5-Diisopropylphenol), so findet dieser Effekt (Potenzierung) nicht mehr statt. Der Umfang dieser Gruppe scheint demnach so groß zu sein, so dass die Hydroxyl-Gruppe des Phenols nicht mehr an ihren Wirkungs-Ort gelangen kann, um dort Wasserstoffbrückenbindung einzugehen. Ebenfalls können zwei Methyl-Gruppen in jeweils beiden meta-Positionen (siehe Abbildung 42) (3,5-Dimethylphenol) die Position des Phenol-Derivats so behindern, dass auch hier kein potenzierender Effekt auftritt. Krasowski et al. (2001) zeigten am GABA_A-Rezeptor, dass an gleicher Position (3,5-Di-tert-Butylphenol) jedoch mit tert-Butyl-Gruppen es zu einer Potenzierung kam, während die gleichen Gruppen an beiden ortho-Positionen nicht mehr potenzierten, sowie auch die Methyl-Gruppen an beiden ortho-Positionen, am 5-HT_{3A}-Rezeptor, nicht mehr potenzierten. Hier also stellen sich andere Wirkmechanismen bei beiden Rezeptoren, innerhalb der Bindungstasche, dar und deuten auf grundsätzliche Unterschiede bei beiden Rezeptoren hin.

Insgesamt ist der Umfang beim Thymol größer als bei 3,5-Dimethylphenol, jedoch scheint diese sterische Anordnung die Bindung der Hydroxyl-Gruppe nicht zu unterbinden. Dies ist ein weiterer entscheidender Hinweis auf spezifische Struktur-Wirkungsbeziehungen der phenolischen Derivate. 2-Cyclopentylphenol und 2,6-Di-Cyclopentylphenol waren bei James und Glen (1980), wie auch bei Krasowski et al. (2001), als Anästhetikum inaktiv, was auf sterische Behinderung (Überdeckung) der Hydroxyl-Gruppe zurückgeführt wurde.

Von großem Interesse sind zusätzlich Isomere, die den gleichen Substituenten tragen, jedoch an verschiedenen Positionen des phenolischen Aromaten substituiert sind. Betrachtet man Abbildung 55, so erkennt man unterschiedliche Cresol-Isomere, die trotz gleicher Substituenten, jedoch an unterschiedlichen Stellen, unterschiedlich potent sind. Von para über meta nach ortho nimmt das Ausmaß der Potenz ab (siehe Abbildung 56). Lässt man eine Isopropyl-Gruppe am phenolischen Ring an gleichen Positionen „rotieren“ (siehe Abbildung 57), so findet an der para-Position ein vollkommen anderer Effekt, Inhibierung anstelle Potenzierung, statt. Betrachtet man nun diese Ergebnisse, so stellt man fest, dass gleiche Alkyl-Substituenten, jedoch an verschiedenen Positionen, spezifische Bindung der Hydroxyl-Gruppe verstärken (Cresole) oder sogar vollständig unterbinden können (para-Isopropylphenol). Krasowski et al. (2001) zeigten in diesem Zusammenhang, dass 3,5-Di-tert-Butylphenol potenziert, während 2,6- und 2,4-Di-tert-Butylphenol dieses nicht machen.

Die Konstitution der Isomere scheint demnach ebenfalls von großer Bedeutung zu sein. James und Glen (1980) folgerten, dass für anästhetische Aktivität Di-sekundäre Alkyl-Substituenten an Phenolen erforderlich sind. Solche Konstitutionsisomere steuern spezifische Wirkmechanismen. So scheinen die Isopropylphenole grundsätzlich potenter zu sein als deren n-Propyl-Pendants (siehe Abschnitt 3.6.1). Trotz gleicher Summenformel und gleicher Position scheint die Bindung auch hier spezifisch beeinflussbar.

Ein Vergleich von funktionellen Gruppen (Abschnitt 3.4.1 – 3.4.4) zeigte, dass die Phenole grundsätzlich potenter sind als Aniline. In Bezug auf spezifische Bindung könnte hier die Hydroxyl-Gruppe und deren stärkere Fähigkeit als Protonen-Donor, durch die größere Elektronegativität des Sauerstoffatoms, von entscheidender Bedeutung sein.

Thiophenol ist jedoch wesentlich potenter als Phenol, obwohl dem Sauerstoffatom der Hydroxyl-Gruppe auch hier eine höhere Elektronegativität zuzuordnen ist. Die Mercapto-Gruppe, die hier ebenfalls als Protonen-Donor fungieren kann, besitzt ein Schwefelatom, welches von größerem Umfang ist, als das des Sauerstoffatoms. H_2S ist ein Gas, während H_2O eine Flüssigkeit (Raumtemperatur) darstellt. Betrachtet man also diese wesentlich schwächere Form der Wasserstoffbrückenbindung und Dipoleigenschaften von Mercapto-Gruppen, so lässt sich nur schwer darüber diskutieren warum Thiophenol so potent ist.

2-Isopropylanilin zeigte als einzige nicht phenolische Substanz Potenzierung – wenn auch nur sehr schwach. Die Isopropyl-Gruppe könnte hier entscheidend dazu beitragen, dass die NH_2 -Gruppe an entscheidender Position Wasserstoffbrückenbindung eingeht. Da eine Flankierung von beiden ortho-Seiten Potenzierung verhindert (siehe Abschnitt 3.4.2 – 3.4.3).

Potenzierung induziert, durch Phenol-Derivate am $GABA_A$ -Rezeptor, korreliert mit dem log P-Wert (Lipophilie), während nicht-potenzierende Substanzen, dies nicht tun (Krasowski et al., 2001). In dieser Arbeit wurde Potenzierung am $5-HT_{3A}$ -Rezeptor gezeigt (spezifische Wechselwirkung), die zuzüglich mit der Lipophilie von Phenol-Derivaten korreliert (siehe Abbildung 37 b-d)), während unspezifische Wechselwirkung nicht korreliert (siehe Abbildung 37 a)). Dies bedeutet, dass die postulierte Bindungstasche die Lipidlöslichkeit der Phenol-Derivate zuzüglich berücksichtigt. Lipidlöslichkeit von Phenol-Derivaten wird von Alkyl-Substituenten beeinflusst. Je mehr Alkyl-Gruppen ein Phenol-Derivat hat desto potenter ist es (siehe Abbildung 37 b)-d)). Die Ausnahmen bilden solche Derivate, die dieselben Alkyl-Gruppen haben, die allerdings an verschiedenen Positionen des aromatischen Rings substituiert vorliegen; wie z.B. Cresole. Cresole zeigen trotz ähnlicher log P-Werte

unterschiedliche Potenzen. Eine mögliche Erklärung ist, dass Phenol-Derivate Membranen passieren müssen um an die Bindungstasche zu gelangen. Je lipophiler ein Phenol-Derivat ist, desto „einfacher“ passiert es die Membran um dort mit der Bindungstasche zu interagieren. Cresol-Isomere passieren die Membran, aufgrund ähnlicher Lipophilie, identisch. Unterschiedliche Potenzen sind nur das Resultat unterschiedlicher Interaktionen mit der Bindungstasche – die auch von Alkyl-Gruppen gesteuert werden.

Zusammenfassend lässt sich folgendes postulieren: Phenole die durch Alkyl-Gruppen nicht sterisch abgeschirmt oder vom Umfang her zu groß sind, binden an gleichen Bindungsstellen wie 5-HT. Dadurch wird der Vorgang der Desensibilisierung weniger schnell eingeleitet und eine Verlangsamung ist die Folge; die sich mit einer Erhöhung (Potenzierung) der Amplitude darstellt. Betrachtet man die Wirkungsweisen der Cresol- und Isopropyl-Isomere (siehe Abbildung 56 u. Abbildung 57), so stellen sich bei fast gleicher Lipophilie unterschiedliche Potenzen dar. Unspezifische lipophile Wechselwirkung alleine kann unmöglich der Grund, für diese unterschiedlichen Wirkmechanismen sein.

4.4.3 Anästhetische Aktivität durch Phenol-Derivate

Es ist bekannt, dass eine Reihe von intravenösen Anästhetika wie Pentobarbital und Methohexital den 5-HT_{3A}-Rezeptor inhibieren (Barann et al., 2006). Appaud und Lambert (1996) zeigten an einer neuroblastoma Zelllinie, die inhibierende Wirkung am 5-HT₃-Rezeptor der intravenösen Anästhetika: Etomidat, Ketamin, Thiopentan und Propofol. Mit Ausnahme von Thiopentan hatten alle Anästhetika einen IC₅₀-Wert außerhalb der klinischen Konzentration. Der 5-HT₃-Rezeptor eignet sich demnach nicht als Modell zur Bestimmung der anästhetischen Relevanz. James und Glen (1980) zeigten die intravenösen anästhetischen Eigenschaften von Alkyl-Phenolen an Mäusen. Sie zeigten in einer vergleichenden Serie von 2,6-Dialkylphenolen folgenden Trend:

Di-sek-Alkyl > n-Alkyl, sek-Alkyl > Di-n-Alkyl (von rechts nach links, zunehmende anästhetische Potenz).

Während 2,6-Di-sek.-Butylphenol das Optimum anästhetischer Aktivität darstellt, ist bei 2,6-Di-ter.-Butylphenol keine anästhetische Aktivität vorhanden. Sie schlossen daraus, dass aufgrund der Planarität der Alkyl-Gruppen von 2,6-Di-sek.-Butylphenol die Hydroxyl-Gruppe nicht vollständig überdeckt ist. Sie zeigten zuzüglich, dass anästhetische Aktivität für ortho-Alkyl-Phenole höher ist als bei den vergleichbaren para-Isomeren. Daraus schlossen sie, dass das Ausmaß der Abschirmung der Hydroxyl-Gruppe für anästhetische Potenz entscheidend

ist. Krasowski et al. (2001) untersuchten eine Serie von Propofol-Derivaten. Der Ausfall von einem aufrichtenden Reflex in *Xenopus laevis* Kaulquappen für einen bestimmten Zeitraum, diente als Maß für anästhetische Aktivität. Derivate ohne Hydroxyl-Gruppe zeigten keine anästhetische Wirkung. Höchste anästhetische Potenz zeigte 2,6-Di-*sec.*-Butylphenol. Keine anästhetische Potenz zeigte 2-Di-*tert.*-Butylphenol. Dieses Ergebnis spiegelt sich in den Mausversuchen von James und Glen (1980) wider. Krasowski et al. (2001) zeigten am GABA_A-Rezeptor, dass die Derivate: 2,6-Di-*sec.*-Butylphenol, Propofol und 2,6-Diethylphenol aktiv (intrinsisch aktivierend und potenzierend) sind. Während 2-Di-*tert.*-Butylphenol inaktiv ist. Propofol (2,6-Diisopropylphenol) ist 10-fach anästhetisch potenter als 2,6-Diethylphenol.

Der GABA_A-Rezeptor ist entscheidend in der Anästhesie und ist ein geeignetes Modell um anästhetische Wirkungen zu untersuchen. Allerdings gibt es Substanzen wie 2,6-Dibromphenol, die aktiv am Rezeptor wirken aber keine anästhetische Aktivität zeigen.

Beim 5-HT_{3A}-Rezeptor ist die Abschirmung der Hydroxyl-Gruppe in *ortho*-Position entscheidet für Beschleunigung der Desensibilisierungskinetik (Propofol) oder Verlangsamung (2-Isopropylphenol) (siehe Abbildung 18). Zwei Effekte bei zwei verschiedenen Substanzen – Propofol schirmt die Hydroxyl-Gruppe stärker ab als 2-Isopropylphenol. Beide Substanzen zeigen jedoch anästhetische Wirkung (James und Glen 1980; Krasowski et al., 2001). Diesem Beispiel entsprechend, eignet sich der 5-HT_{3A}-Rezeptor nicht als anästhetisches Modell. Der 5-HT_{3A}-Rezeptor zeigt jedoch, dass der Trend (siehe Abbildung 21, Abbildung 40 u. Abbildung 41):

2,6-Diisopropylphenol > 2,6-Diethylphenol > 2,6-Dimethylphenol (von rechts nach links; zunehmende Potenz bezogen auf den IC₅₀-Wert) sich auf die anästhetische Aktivität bei Kaulquappen übertragen lässt (Krasowski et al., 2001).

4.3 Etablierung des (h) $\alpha 1$ Glycin-Rezeptors

Primäres Ziel dieses Teilbereiches ist es, neben einer stabilen in HEK293 transfizierten (h) homopentameren exzitatorischen Rezeptoreinheit (5-HT_{3A}) eine stabil transfizierte (h) inhibitorische homopentamere Rezeptoreinheit ($\alpha 1$ Glycin) molekularbiologisch zu etablieren und elektrophysiologisch zu charakterisieren. Mechanismen von Phenol-Derivaten sollen am inhibitorischen $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor elektrophysiologisch erforscht und gegenüber dem exzitatorischen 5-HT_{3A}-Rezeptor abgegrenzt werden.

Nach gelungener stabiler Transfektion, konnte zu keinem Zeitpunkt ein „excised Patch“-Strom gemessen werden, obwohl es durchaus „Whole Cell“-Patche gab, die über ähnlich große Ströme verfügten wie „Whole Cell“-Patche vom 5-HT_{3A}-Rezeptor (bis zu 5,5 nA). Eine mögliche Erklärung ist, dass 5-HT induzierte Ströme am 5-HT_{3A}-Rezeptor („Whole-Cell“) in Wirklichkeit wesentlich größer sind. Die Desensibilisierung aber schon zu einem früheren Zeitpunkt einsetzt. Ein Indiz ist, dass „Whole Cell“-Patche auch wesentlich empfindsamer gegenüber dem Agonisten sind, als „excised Patche“ (EC₅₀: „Whole Cell“-Patch $\approx 1 \mu\text{M}$, „excised Patch“ $\approx 7 \mu\text{M}$) (siehe Abbildung 73).

Aus mechanischer Sicht könnte es sein, dass durch die Applikation der Lösung sich die Zelle am Petrischalen-Grund verformt und so ein frühzeitiges Öffnen der Kanäle einsetzt. Da der „excised Patch“ möglicherweise auf der Pipette „gespannt wie ein Segel“ vorliegt, ist dieser von einem frühzeitigen Öffnen der Kanäle nicht betroffen.

„Whole Cell“-Versuche für den $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor ergaben einen EC₅₀ von 602 μM und einen Hillslope von 1,465. Haeseler et al. (2005) zeigten bei gleichem Rezeptor, ebenfalls in HEK293 Zellen, in einem transienten Versuchsansatz, einen EC₅₀ von 12,8 μM bei einem Hillslope von 0,9. Grenningloh et al. (1990) zeigten an *Xenopus* Oocyten einen EC₅₀ von 300 μM und eine höhere Sensibilität gegenüber Strychnin (IC₅₀ = 16 nM), zum Vergleich siehe Abbildung 74. Über die Gründe der weniger großen Sensibilität des Rezeptors kann nur spekuliert werden. Da die stabile Variante, im Gegensatz zur transienten, ins Chromosom randomisiert integriert, könnte es sein, dass hier durch benachbarte Gene ungewollte Prozessierungsvorgänge eingreifen, die dazu führen, dass der Rezeptor sich verändert an der Oberfläche darstellt. Grundsätzlich zeigen eine nicht Rektifizierung des Ionenstromes (siehe Abbildung 74) und eine höhere Empfindlichkeit von Propofol gegenüber Glycin (siehe Abbildung 73), wie sie auch von Ahrens et al. (2004) gefunden wurden deutlich, dass es sich um eine solide $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor Variante handelt.

Hohe Propofol Konzentrationen bei der Equilibrium-Applikation mit Glycin (1mM) führten zu einer Inhibition der Amplitude (siehe Abbildung 78). Dong und Xu (2002) zeigten

ebenfalls, dass der Glycin-Strom bei höheren Konzentrationen gehemmt wird, während Ahrens et al. (2004) gegenteiliges fand. Nicht zu verstehen ist, dass die Zeitkonstante der Aktivierung (τ_{ON}) wesentlich langsamer ist, als die vom 5-HT_{3A}-Rezeptor (siehe Abbildung 75), obwohl dies eigentlich nicht der Fall sein dürfte (Mott et al., 2001).

Verschiedene Phenol-Derivate wurden am $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor untersucht (Ahrens et al., 2004; Haeseler et al., 2005). Betrachtet man die Tatsache, dass Propofol intrinsische Aktivität zeigt (siehe Abbildung 76), so stellen sich hier vollkommen unterschiedliche Eigenschaften gegenüber dem exzitatorischen 5-HT_{3A}-Rezeptor dar, bei dem Propofol nicht intrinsisch wirkt. Die Tatsache, dass Propofol intrinsisch wirkt, am $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor, und Phenol nicht (siehe Abbildung 77) zeigt, dass Isopropyl-Gruppen hier, ebenfalls wie am 5-HT_{3A}-Rezeptor, bestimmte „Effekte“ steuern.

5. Zusammenfassung

Der 5-HT_{3A}-Rezeptor ist der einzige exzitatorische Rezeptor aus der „Cys-loop“ Superfamilie, der nach Ligandenbindung permeabel für Kationen (Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺) ist. Von daher ist der 5-HT_{3A}-Rezeptor ein ausgezeichneter Kandidat, um schnelle Effekte, die bei der Anästhesie eine große Rolle spielen, mithilfe der „Patch-Clamp“-Technik zu untersuchen (Richards, 1998).

Ausgehend vom Anästhetikum Propofol konnte man bei verschiedenen Phenol-Derivaten Amplituden potenzierende und inhibierende Effekte voneinander abgrenzen. Potenzierende Effekte gingen bei diesen Substanzen immer mit einer Verlangsamung der Desensibilisierung einher; inhibierende Effekte mit einer Beschleunigung. Potenzierung konnte bei hohen Konzentrationen jedoch durch eine Inhibierung, in Bezug auf die Amplitude, überlagert werden (Kanal-Block-Effekt). Inhibierende Effekte kamen durch beidseitiges Abschirmen der Hydroxyl-Gruppe in ortho-Position (sterische Abschirmung) oder durch einen zu großen Umfang des Moleküls zustande.

Eine unspezifische lipophile Wechselwirkung alleine kann ausgeschlossen werden, da bei drei Phenol-Derivaten kompetitive Mechanismen nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 29 u. Abbildung 30). Es gilt zu klären, ob die Vorapplikation alleine (Geschlossen-Kanal-Applikation) rein unspezifischen Charakter hat.

Unspezifische Wechselwirkung alleine ist zuzüglich auszuschließen, da einige untersuchte Phenol-Derivate (siehe Abbildung 16) nicht entsprechend ihres Partitionskoeffizientens ($P_{\text{oct.}} / \text{water}$) agieren.

Schnelle Effekte sind von langsamen Effekten abzugrenzen und zeigen bei Phenol-Derivaten unterschiedliche Mechanismen (siehe Abbildung 23).

Der (h) homopentamere $\alpha 1$ Glycin-Rezeptor zeigt ebenfalls spezifische Wechselwirkung. Während Propofol ein intrinsischer Aktivator ist, bewirkt Phenol keine Selbstaktivierung.

Zusammenfassend kann man postulieren, dass die Komponenten des Propofols (Hydroxyl-Gruppe, Isopropyl-Gruppen) spezifische Mechanismen an ligandengesteuerten Ionenkanälen steuern.

6. Anhang

Sequenzierungsanalyse des (h) *al Glycin-Gen*

```

Query  917  TGGACTAACTCTGCCCCAGTTTATCTTGAAGGAAGAGAAGGACTTGAGATACTGCACCAA  976
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   1     TGGACTAACTCTGCCCCAGTTTATCTTGAAGGAAGAGAAGGACTTGAGATACTGCACCAA  60

Query  977  GCACTACAACACAGGTAAATTCACCTGCATTGAGGCCCGGTTCCACCTGGAGCGGCAGAT  1036
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   61  GCACTACAACACAGGTAAATTCACCTGCATTGAGGCCCGGTTCCACCTGGAGCGGCAGAT  120

Query  1037  GGGTTACTACCTGATTGAGATGTATATTCCCAGCCTGCTCATTGTCATCCTCTCATGGAT  1096
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   121  GGGTTACTACCTGATTGAGATGTATATTCCCAGCCTGCTCATTGTCATCCTCTCATGGAT  180

Query  1097  CTCCTTCTGGATCAACATGGATGCTGCACCTGCTCGTGTGGGCCTAGGCATCACCCTGT  1156
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   181  CTCCTTCTGGATCAACATGGATGCTGCACCTGCTCGTGTGGGCCTAGGCATCACCCTGT  240

Query  1157  GCTCACCATGACCACCCAGAGCTCCGGCTCTCGAGCATCTCTGCCAAGGTGTCTATGT  1216
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   241  GCTCACCATGACCACCCAGAGCTCCGGCTCTCGAGCATCTCTGCCAAGGTGTCTATGT  300

Query  1217  GAAAGCCATTGACATTTGGATGGCAGTTTGCCCTGCTCTTTGTGTTCTCAGCCCTATTAGA  1276
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   301  GAAAGCCATTGACATTTGGATGGCAGTTTGCCCTGCTCTTTGTGTTCTCAGCCCTATTAGA  360

Query  1277  ATATGCTGCCGTTAACTTTGTGTCTCGGCAACATAAGGAGCTGCTCCGATTGAGGAGAA  1336
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   361  ATATGCTGCCGTTAACTTTGTGTCTCGGCAACATAAGGAGCTGCTCCGATTGAGGAGAA  420

Query  1337  GCGGAGACATCACAAGGAGGATGAAGCTGGAGAAGGCCGCTTTAACTTCTCTGCCTATGG  1396
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   421  GCGGAGACATCACAAGGAGGATGAAGCTGGAGAAGGCCGCTTTAACTTCTCTGCCTATGG  480

Query  1397  GATGGGCCAGCCTGTCTACAGGCCAAGGATGGCATCTCAGTCAAGGGCGCCAACAACAG  1456
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   481  GATGGGCCAGCCTGTCTACAGGCCAAGGATGGCATCTCAGTCAAGGGCGCCAACAACAG  540

Query  1457  TAACACCACCAACCCCTCCTGCACCATCTAAGTCCCCAGAGGAGATGCGAAAACCTTT  1516
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   541  TAACACCACCAACCCCTCCTGCACCATCTAAGTCCCCAGAGGAGATGCGAAAACCTTT  600
    
```

Anhang

```
Query 1517 CATCCAGAGGGCCAAGAAGATCGACAAAATATCCCGCATTGGCTTCCCATGGCCTTCCT 1576
          |||
Sbjct 601 CATCCAGAGGGCCAAGAAGATCGACAAAATATCCCGCATTGGCTTCCCATGGCCTTCCT 660

Query 1577 CATTTTCAACATGTTCTACTGGATCATCTACAAGATTGTCCGTAGAGAGGACGTCCACAA 1636
          |||
Sbjct 661 CATTTTCAACATGTTCTACTGGATCATCTACAAGATTGTCCGTAGAGAGGACGTCCACAA 720

Query 1637 CCAGTGAAGGGTCTGAAAGGTTGGGGGAGGCTGGGAGAGGGGAACGTGGGAATAGCACA 1695
          |||
Sbjct 721 CCAGTGAAGGGTCTGAAAGGTTGGGGGAGGCTGGGAGAGGGGAACGTGGGAATAGCACA 779
```

Abbildung 80: Sequenzierungsanalyse des (h) $\alpha 1$ Glycin-Gen ; mit Gendatenbankabgleich (ClustalW)

7. Literaturverzeichnis

7.1 Referenzen

- Ahrens J, Haeseler G, Leuwer M, Mohammadi B, Krampfl K, Dengler R, Bufler J (2004) 2,6 Di-tert-butylphenol, a nonanaesthetic propofol analog, modulates $\alpha_1\beta$ glycine receptors function in a manner distinct from propofol. *Anesth Analg* 99:91-106
- Appaud BL, Lambert DG (1996) Interaction of i.v. anaesthetics agents with 5-HT₃ receptors. *Br J Anaesth* 76:271-273
- Barann M, Linden I, Witten S, Urban BW (2008) Molecular actions of propofol on human 5-HT_{3A} receptors: enhancement as well as inhibition by closely related phenol derivatives. *Anesth Analg* 106:846-57
- Barann M, Bruess M, Brinkmann M, Linden I, Lyutenska M, Schneider M, Walkembach J, Wittmann M (2006) 5-HT₃ receptors and emesis. *Pharmacol Rep* 58:253-272
- Barann M, Friedrich P, Retzmann K, Dybek A, Urban BW (2000) Loss of propofol during in vitro experiments. *Anesthesiology* 93:310-1
- Barker JL, McBurney RN (1979) Pentobarbiton modulation of postsynaptic GABA receptor function on cultured mammalian neurons. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 206:319-327
- Barnes NM, Hales TG, Lummis SCR, Peters JA (2009) The 5-HT₃ receptor – the relationship between structure and function (review). *Neuropharmacology* 56:273-284
- Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, Sivilotti LG (2004) The activation mechanism of α_1 homomeric glycine receptors. *J Neurosci* 24:865-906
- Beene DL, Price KL, Lester HA, Dougherty DA, Lummis SCR (2004) Tyrosine Residues that control binding and gating in the 5-Hydroxytryptamine₃ receptor revealed by unnatural amino acid mutagenesis. *J Neurosci* 24:9097-9104
- Berridge MJ (1972) The mode of action of 5-Hydroxytryptamin. *J Exp Biol* 56:311-321

- Borgeat A, Stirnemann HR (1998) Antiemetic effect of propofol. *Anaesthesist* 47:918-924
- Bormann J, Hamill OP, Sakmann B (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385:243-86
- Bowery NG, Smart TG (2006) GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 147:109-119
- Bruss M, Gothert M, Hayer M, Bonisch M (1998) Molecular cloning of alternatively spliced human 5-HT₃ receptor cDNAs. *Ann N Y Acad Sci* 861:234-235
- Chen C, Okayama H (1987) High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7:2745-2752
- Dong XP, Xu TL (2002) The actions of Propofol on γ -aminobutyric acid- α and glycine receptors in acutely dissociated spinal dorsal horn neurons of the rat. *Anesth Analg* 95:907-914
- Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, Wilson SJ, Galindo JE, Glass CA, Luo L, Jackson MR, Lovenberg TW, Erlander MG (1999) The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. *J Biol Chem* 274:30799-30810
- Grenningloh G, Schmieden V, Schofield PR, Seeburg PH, Siddique T, Mohandas TK, Becker CM, Betz H (1990) Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. *EMBO* 9:771-776
- Grenningloh G, Gundelfinger E, Schmitt B, Betz H, Darlinson MG, Barnard EA, Schofield PR, Seeburg PH (1987) Glycine vs GABA receptors. *Nature* 330:245-26

- Haeseler G, Ahrens J, Krampfl K, Bufler J, Dengler R, Hecker H, Aronson JK, Leuwer M (2005) Structural features of phenol derivatives determining potency for activation of chloride currents via α_1 homomeric and $\alpha_1\beta$ heteromeric glycine receptors. *Br J Pharmacol* 145:916-925
- Hamill OP, Sakman B (1981) Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature* 294:462-464
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100
- Harvey RJ, Schmieden V, Von Holst A, Laube B, Rohrer H, Betz H (2000) Glycine receptors containing the α_4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci* 12:994-1001
- James R, Glen JG (1980) Synthesis, biological evaluation, and preliminary structure-activity considerations of a series of alkylphenols as intravenous anesthetic agents. *J Med Chem* 23:1350-1357
- Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, Peters JA (2003) A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature* 424:321-324
- Krasowski MD, Hong X, Hopfinger AJ, Harrison NL (2002) 4D-QSAR Analysis of a Set of Propofol Analogues: Mapping Binding Sites for an Anesthetic Phenol on the GABA_A Receptor. *J Med Chem* 45:3210-3221
- Krasowski D, Jenkins A, Flood P, Kung AY, Hopfinger AJ, Harrison NL (2001) General anesthetic potencies of a series of propofol analogs correlated with potency for potentiation of γ -aminobutyric acid (GABA) current at the GABA_A receptor but not with lipid solubility. *J Pharmacol Exp Ther* 297:338-351

- Krasowski MD, Nishikawa K, Nikolaeva N, Lin A, Harrison NL (2001) Methionine 286 in transmembrane domain 3 of the GABA_A receptor β subunit controls a binding cavity for Propofol and other alkylphenol general anesthetics. *Neuropharmacol* 41:952-964
- Krasowski MD, Koltchine VV, Rick CE, Ye Q, Finn SE, Harrison NL (1998) Propofol and Other Intravenous Anesthetics Have Sites of Action on the γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor Distinct from that for Isoflurane. *Mol Pharmacol* 53:530-538
- Krasowski MD, O'Shea SM, Rick M, Whiting PJ, Hadingham KL, Czajkowski C, Harrison NL (1997) α Subunit Isoform Influences GABA_A Receptor Modulation by Propofol *Neuropharmacol* 36:941-949
- Langley MS, Heel RC (1998) Propofol. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and use as an intravenous anaesthetic. *Drugs* 35:334-372
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58:560-593
- Legendre P, Muller E, Badiu CI, Meier J, Vannier C, Triller A (2002) Desensitization of homomeric $\alpha 1$ glycine receptor increases with receptor density. *Mol Pharmacol* 62:817-827
- Linden I (2006) Untersuchung molekularer Wirkungen von Allgemeinanästhetika an humanen 5-HT_{3A} Rezeptoren, deren Bedeutung für postoperative Emesis. Dissertationsschrift der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn.
- Meyer H (1899) Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Arch Exp Pharmacol* 42:109-118
- Meyer H (1937) Contributions to the theory of narcosis. *Trans Faraday Soc* 33:1062-1068
- Miller PS, Harvey RJ, Smart TG (2004) Differential agonist sensitivity of glycine receptors $\alpha 2$ subunit splice variants. *Br J Pharmacol* 143:19-26

- Mott DD, Erreger K, Banke TG, Traynelis SF (2001) Open probability of homomeric murine 5-HT_{3A} serotonin receptors depends on subunit occupancy. *J Physiol* 535:427-443
- Mullins LJ (1954) Some physical mechanism in narcosis. *Chem Rev* 54:289-323
- Overton E (1901) *Studie über die Narkose*. Jena: Gustav Fischer Verlag
- Pistis M, Belelli D, Peters JA, Lambert JJ (1997) The interaction of general anaesthetics with recombinant GABA_A and glycine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes: a comparative study. *Br J Pharmacol* 122:1707-1719
- Reeves DC, Lummis SCR (2002) The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel (review). *Mol Membr Biol* 19:11-26
- Richards CD (1998) What the actions of anaesthetics on fast synaptic transmission reveal about the molecular mechanism of anaesthesia. *Toxicol Lett* 101:41-50
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Stryer L (1999) *Biochemie*. 4. Aufl. Spektrum Akad. Verl. Heidelberg, Berlin, Oxford
- Thompson AJ, Lummis SCR (2006) 5-HT_{3A} receptors (review). *Curr Pharmaceu* 12:3615-3630
- Thompson AJ, Chau P-L, Chan SL, SCR Lummis (2006) Unbinding pathways of an agonist and an antagonist from the 5-HT₃ receptor. *Biophysic J* 90:1979-1991
- Trapani G, Altomare C, Liso G, Sanna E, Biggio G (2000) Propofol in anesthesia. Mechanism of action, structure-activity relationships, and drug delivery. *Curr Med Chem* 7:249-71
- Urban BW, Bleckwenn M, Barann M (2006) Interactions of anaesthetics with their targets: Non-specific, specific or both? *Pharmacol Therap* 111:729-770

- Urban BW, Bleckwenn M (2002) Concepts and correlation relevant to general anaesthesia. *Br J Anaesth* 89:3-16
- Urban BW, Dusch DS, Frenkel C, Rehberg B, Wartenberg HC (1995) Greifen Allgemeinanästhetika an spezifische Rezeptoren an? *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 30:375-382
- Urban BW (1992) Der anästhetische Wirkort: Vom intakten Gehirn zum isolierten Protein. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 27:68-75
- Van Hooft JA, Vijverberg HPK (1996) Selection of distinct conformational states of the 5-HT₃ receptor by full and partial agonists. *Br J Pharmacol* 117:839-846
- Walkembach J, Brüss M, Urban BW, Barann M (2005) Interactions of metoclopramide and ergotamine with human 5-HT(3A) receptors and human 5-HT reuptake carriers. *Br J Pharmacol* 146:543-552
- Yvenes GE, Moraga-Cid G, Peoples RW, Schmalzing G, Aguayo LG (2008) A selective Gβγ-linked intracellular mechanism for modulation of a ligand-gated ion channel by ethanol. *PNAS* 105:20523-20528

7.2 Originalarbeit und Beiträge während der Anfertigung der Dissertation

Originalarbeit:

Barann M, Linden I, Witten S, Urban BW (2008) Molecular actions of propofol on human 5-HT_{3A} receptors: enhancement as well as inhibition by closely related phenol derivatives
Anesth Analg 106:846-57

Beiträge:

Wittes S, Linden I, Urban BW, Barann M. (2008) Molecular action of propofol on human 5-HT_{3A} receptors: enhancement as well as inhibition by closely related phenol derivatives.
[Postervorstellung auf dem 9. Hauptstadtkongress der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivtherapie (DGAI)]

Witten S. (2007) Molecular action of propofol and related derivatives on human 5-HT_{3A} receptors. [Vortrag in Berlin; Unincorporated Channel Meeting (UCM)]

Witten S. (2008) Unterdrückung der Potenzierung durch Alkylreste an Phenol-Derivaten (h 5-HT_{3A}-Studie) / Etablierung und Charakterisierung eines stabil transfizierten $\alpha 1$ hGlycin-Rezeptor. [Vortrag in Berlin; Unincorporated Channel Meeting (UCM)]



9. Danksagung

Herrn PD Dr. Martin Barann danke ich für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas. Die engagierte wissenschaftlich Kritik und Anregung haben einen großen Anteil an dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Urban möchte ich mich für die wissenschaftliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bedanken, die es mir ebenfalls ermöglicht haben diese Arbeit anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Herzog möchte ich mich recht herzlich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Anästhesie-Labore die mich bei allen Arbeiten tatkräftig unterstützt haben. Frau Dorner, die mir mit viel Geduld die Methode (Patch-Clamp-Technik) beibrachte und Frau von den Bussche, die sich rührend um meine Zellkultur kümmerte.

Bei der Abt. Prof. Bönisch (insbesondere Frau Nobis und Frau Wahlstab) möchte ich mich für die Unterstützung der molekularbiologischen Aufgaben recht herzlich bedanken.