

Die Wirkung des neurotrophen Absinth-Wirkstoffs α -Thujon auf den 5-HT₃-Rezeptor

Tobias Otto Joachim Deiml

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität
München
(Direktor: Prof. Dr. H. J. Möller)

Die Wirkung des neurotrophen Absinth-Wirkstoffs α -Thujon auf den 5-HT₃-Rezeptor

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt von Tobias Otto Joachim Deiml
aus Stuttgart - Bad Cannstatt
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Rupprecht
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. P. Grafe Prof. Dr. J. Remien
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. G. Hapfelmeier
Dekan	Prof. Dr. Dr.h.c. Klaus Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2003

Meinen Eltern gewidmet

Abkürzungen

5-HT	Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin)
5-OHi	5-Hydroxyindol
A	Agonist
B	Blockierter Zustand des Rezeptors
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
D	Dopamin
EC ₅₀	halbmaximal-effektive Konzentration
GABA	γ-Aminobuttersäure
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
IC ₅₀	halbmaximal-inhibitorische Konzentration
K _{on}	Assoziationskonstante
K _{off}	Dissoziationskonstante
mCPBG	Methylcyclophenhylobiguanid
MG	Molekulargewicht
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MW	Mittelwert
n	Anzahl der gewerteten Experimente
O	Offener Zustand des Rezeptors
R	Geschlossener Zustand des Rezeptors (resting state)
RA	Geschlossener Zustand des Rezeptors mit gebundenem Agonist
SD	Standardabweichung
ZNS	Zentrales Nervensystem

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	7
2. Theoretische Grundlagen	9
2.1. α-Thujon	9
2.1.1. Absinth - historischer Rückblick	9
2.1.2. Toxische Wirkung von α -Thujon	10
2.2. Neurophysiologische Grundlagen	10
2.2.1. Neurobiologie psychiatrischer Erkrankungen	10
2.2.2. Neuronale Grundlagen von Wahrnehmung und Bewusstsein.....	12
2.2.3. Einteilung der Ionenkanäle	13
2.3. Serotoninrezeptoren	14
2.3.1. Allgemeines	14
2.3.2. Physiologie und klinische Bedeutung des serotonergen Systems	14
2.3.3. Der 5-HT ₃ -Rezeptor.....	16
2.3.3.1. Psychopharmakologische Bedeutung des 5-HT ₃ -Rezeptors.....	16
2.3.3.2. Die Wirkung einiger Psychopharmaka am 5-HT ₃ -Rezeptor.....	17
2.3.3.3. Agonisten und Antagonisten am 5-HT ₃ -Rezeptor	18
2.3.3.4. Rezeptor-Verteilung im ZNS.....	19
2.3.3.5. Tertiär- und Quartärstruktur des 5-HT ₃ -Rezeptors	20
2.3.3.6. Die Aktivierung des 5-HT ₃ -Rezeptors.....	23
2.3.3.7. Kinetik des 5-HT ₃ -Rezeptors.....	24
2.3.3.8. Die Desensibilisierung der 5-HT ₃ -Rezeptoren	25
2.3.3.9. Beeinflussung der 5-HT ₃ -Rezeptor-Desensibilisierung durch 5-Hydroxyindol	30
2.4. Die Patch-Clamp Technik	31
2.4.1. Die Membran-Konfigurationen	31
2.4.2. Verfahren der Transmitter-Applikation	33
2.4.3. Heterologe Expressionssysteme.....	35
3. Fragestellung	37
4. Methodik	39
4.1. Zellkultur	39
4.2. Rezeptorexpression	39
4.3. Elektrophysiologie	40
4.3.1. Herstellung der Patch-Pipetten	40
4.3.2. Die Whole-Cell Konfiguration	41
4.3.3. Das piezogesteuerte Applikationssystem.....	42
4.3.4. Verwendete Lösungen	44
4.3.4.1. Intrazellulärlösung.....	44
4.3.4.2. Extrazellulärlösung.....	44
4.3.4.3. Serotonin	44
4.3.4.4. Methylcyclophenylbiguanid (mCPBG).....	44
4.3.4.5. α -Thujon.....	44
4.3.4.6. 5-Hydroxyindol	45

4.3.5.	Messgrößen und Daten-Auswertung.....	45
4.3.5.1.	Stromaufzeichnung.....	45
4.3.5.2.	Messgrößen	45
4.3.5.3.	Statistische Auswertung	46
4.4.	Computersimulation der 5-HT₃-Rezeptor-Kinetik	46
5.	<i>Ergebnisse</i>	48
5.1.	α-Thujon verstärkt die Desensitisierung von 5-HT_{3A}-Rezeptoren	49
5.2.	5-Hydroxyindol verlangsamt die Desensitisierung von 5-HT_{3A}-Rezeptoren	53
5.3.	Der Effekt von α-Thujon auf die Desensitisierung von 5-HT_{3AB}-Rezeptoren ...	55
5.4.	Der Effekt von 5-Hydroxyindol auf die Desensitisierung von 5-HT_{3AB}-Rezeptoren	56
5.5.	Der Effekt von α-Thujon auf mCPBG-induzierte 5-HT₃-Rezeptor-Antworten	58
6.	<i>Diskussion</i>	60
6.1.	Der Effekt von α-Thujon	61
6.2.	Der Effekt von 5-Hydroxyindol.....	62
6.3.	Die mCPBG-induzierte Kanalblockade.....	63
6.4.	Schlussfolgerung	63
7.	<i>Zusammenfassung</i>	64
8.	<i>Literaturverzeichnis</i>	66
9.	<i>Abbildungs- und Tabellen-verzeichnis</i>.....	75
10.	<i>Anhang</i>	77
10.1.	Materialien und Geräte	77
10.1.1.	Verwendete Chemikalien und Lösungen	77
10.1.2.	Zellkultur	79
10.1.3.	Verbrauchsmittel.....	79
10.1.4.	Geräte.....	79
10.2.	Danksagung	81
10.3.	Verzeichnis eigener Publikationen	82
10.4.	Lebenslauf.....	83

1. Einleitung

Vincent van Gogh erschoss sich am Nachmittag des 27. Juli 1890 in Auvers-sur-Oise in Frankreich und verstarb am frühen Morgen des zweiten darauffolgenden Tages. Dieser tragische Selbstmord war das Fanal einer langen Erkrankung des berühmten Malers, welche von vielen Autoren mit seinem Absinthmissbrauch in Verbindung gebracht wird.

Absinth ist ein alkoholisches Getränk, welches sich insbesondere im 19. und frühen 20. Jahrhundert beträchtlicher Beliebtheit erfreute. Ursache der Popularität des wegen seiner smaragdgrünen Farbe auch "grüne Fee" genannten Likörs waren insbesondere die ihm nachgesagten psychotropen Effekte. Hierzu zählen eine Erweiterung des Bewusstseins, Euphorie und Veränderungen der Wahrnehmung. Zurückzuführen sind diese Effekte am ehesten auf den Gehalt an Thujon (Arnold, 1989).

Der Begriff „Absinthismus“ steht für ein Krankheitsbild infolge eines langjährigen Absinthmissbrauchs. Es ist gekennzeichnet durch gastrointestinale Beschwerden, Halluzinationen, epileptische Anfälle, Hirnschäden und ein erhöhtes Risiko für psychiatrische Erkrankungen und Selbstmord (Arnold, 1989). Dies führte dazu, dass Absinth 1915 in Frankreich und 1923 in Deutschland verboten wurde (Meschler et al., 1998). Am 29. Oktober 1991 trat nun in Deutschland, im Rahmen der Umsetzung von EU-Richtlinien zur Angleichung europäischer Rechtsvorschriften, eine Verordnung in Kraft, welche die Verwendung thujonhaltiger Pflanzen und Pflanzenteile sowie von Aromaextrakten aus solchen Pflanzen gestattet. Demnach darf Thujon, trotz eines offiziell fortbestehenden Verwendungsverbotes, innerhalb bestimmter Grenzwerte in Spirituosen enthalten sein. 5 mg/l bei bis zu 25 Volumenprozent Alkohol und 10 mg/l bei darüber liegendem Alkoholgehalt (Hein et al., 2001). In Deutschland entwickelt sich das Getränk aktuell zu einem „Trend-“, und „Szenetränk“, welches über das Internet und in Lokalen erhältlich ist. Geworben wird dabei mit der „halluzinogenen und psychoaktiven Kraft“ (Licha, 2001). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit, sich aus ärztlich-psychiatrischer Sicht mit der Thematik auseinander zusetzen, zumal noch wenige Untersuchungen zur Wirkung von Thujon auf den Organismus vorliegen (Hein et al., 2001).

Man weiß heute, dass Störungen u.a. des serotoninen Systems an der Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener psychiatrischer Krankheiten, insbesondere affektiver Störungen, beteiligt sind (Möller, 1995). In einer kürzlich veröffentlichten Studie unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass verschiedene Antidepressiva als

Antagonisten am 5-HT₃-Rezeptor wirken (Eisensamer et al., im Druck). Dies könnte einerseits ein bis dato unbekanntes Wirkprinzip von Antidepressiva darstellen und uns andererseits einen Schritt näher an das Verständnis der biologischen Entstehungsmechanismen affektiver Erkrankungen bringen. Auf der Grundlage der halluzinogenen und affektmodulierenden Effekte, die durch α -Thujon ausgelöst werden können (Arnold, 1989), soll in der vorliegenden Studie die Wirkung von α -Thujon auf die Funktion des 5-HT₃-Rezeptors untersucht werden. Ausgehend von elektrophysiologischen Messungen soll durch ein kinetisches Modell die Interaktion zwischen α -Thujon und dem 5-HT₃-Rezeptor beschrieben werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. α -Thujon

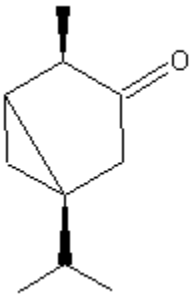


Abb. 2-1: Strukturformel von α -Thujon

α -Thujon ist mutmaßlich der entscheidende psychotrope Wirkstoff von Absinth. Zu dessen Herstellung wird Wermutöl, ein Extrakt aus der Wermutpflanze, *Artemisia absinthium*, verwendet. Hierbei variiert das Verhältnis von α -Thujons zu β -Thujon. Je nach Wachstumsbedingungen übersteigt der Gehalt des β -Diastereomers oft den des aktiveren α -Thujons

(Arnold, 1989). Wermutextrakte wurden bereits im alten Ägypten therapeutisch eingesetzt, beispielsweise gegen gastrointestinale Würmer. Thujon kann man auch aus Beifuss, Rainfarn, Lebensbaum und Salbei gewinnen (Arnold, 1989). Sweatoson®, ein Medikament zur Behandlung von Hyperhydrosis, wird aus Salbeiextrakt hergestellt und enthält Thujon. Hier wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass es noch keine ausreichenden Untersuchungen zur Wirkung von Thujon auf den Organismus gibt und daher die Anwendung des Medikaments in der Schwangerschaft und bei Kindern einer strengen Indikationsstellung unterliegen sollte.

2.1.1. Absinth - historischer Rückblick

Nachdem Absinth ursprünglich in der Schweiz erfunden wurde, begann sein Siegeszug gegen Ende des 18. Jahrhunderts mit Beginn der industriellen Produktion durch Henri-Louis Pernod in Frankreich. Von dort aus erlebte Absinth in der Folgezeit weltweite Verbreitung und erfreute sich insbesondere in Intellektuellen- und Künstlerkreisen erheblicher Beliebtheit (Arnold, 1989). „Nach dem ersten Glas siehst Du die Dinge wie Du wünschst, dass sie wären. Nach dem zweiten, siehst Du die Dinge, wie sie nicht sind. Zum Schluss siehst Du die Dinge, wie sie wirklich sind, und dies ist das schrecklichste auf der Welt.“ So hat Oscar Wilde den Absinthrausch beschrieben, der neben van Gogh, Gauguin, Picasso und Hemingway zu den wohl berühmtesten Absinthtrinkern gehörte (Hein et al., 2001). Durch den ansteigenden Konsum von Absinth traten bald auch die damit verbundenen medizinischen Probleme in den Blickpunkt.

2.1.2. Toxische Wirkung von α -Thujon

Der Begriff "Absinthismus" steht für ein Krankheitsbild als Folge langjährigen übertriebenen Absinthgenusses und ist u.a. durch Schlafstörungen, affektive Störungen und neurologische Symptome, wie Tremor, Paralyse und Krampfanfälle, gekennzeichnet. Letztere treten insbesondere bei akuter Intoxikation mit α -Thujon auf (Weisbord et al., 1997), was durch einen Antagonismus am inhibitorisch wirksamen GABA_A-Rezeptor erklärt wird (Höld et al., 2000). Die funktionelle Hemmung des GABA_A-Rezeptors durch α -Thujon konnte durch Diazepam aufgehoben werden (Höld et al., 2000). Die Vermutung, dass α -Thujon aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem Cannabinoid Δ^9 -THC Cannabinoid-Rezeptor aktiviert, wurde nicht bestätigt. Thujon bindet zwar am CB₁-Cannabinoid-Rezeptor, bewirkt jedoch keine Signaltransduktion (Meschler und Howlett, 1999).

Weisbord et al. beschrieben 1997 den Fall eines 31-jährigen Patienten bei dem es infolge übermäßigen Konsums von Wermut zu einer akuten Rhabdomyolyse mit Nierenversagen kam.

Wie andere Terpene, erhöht α -Thujon die Porphyrinproduktion in der Leber. Dies könnte ein potentiell Risiko für Patienten mit Störungen der Hämsynthese bedeuten.

Zu den Grundlagen der psychotropen Wirkung des Thujon gibt es bislang noch keine Untersuchungen. Insbesondere sind außer dem GABA_A-Rezeptor noch keine anderen ligandengesteuerten Ionenkanäle auf eine mögliche Wirkung von Thujon hin untersucht worden.

2.2. Neurophysiologische Grundlagen

2.2.1. Neurobiologie psychiatrischer Erkrankungen

Spätestens seit Formulierung der Katecholamin-Hypothese der Depression durch Schildkraut (1965) und der Serotonin-Hypothese der Depression durch Coppen (1967) gilt es als unangefochten, dass Dysbalancen innerhalb verschiedener Neurotransmittersysteme an der Entstehung psychiatrischer Erkrankungen beteiligt sind. Die Monoaminmangel-Hypothese sieht die Ursache sog. endogener Depressionen in einem Mangel an Serotonin und/oder Noradrenalin im synaptischen Spalt. Dies konnte insofern belegt werden, als bei ängstlich-agitierten depressiven Patienten verminderte Werte des Serotonin-Abbauprodukts 5-HIAA im

Liquor nachgewiesen wurden. Bei psychomotorisch verlangsamten und antriebsgeminderten depressiven Patienten waren diese Werte allerdings normal. Hier war stattdessen das Noradrenalin-Abbauprodukt MHPG im Urin erniedrigt (Frank, 2000).

Da der antidepressive Effekt der klassischen Antidepressiva erst nach ein bis zwei Wochen einsetzt, kann man die Hemmung der synaptischen Monoaminwiederaufnahme jedoch nicht als alleinigen antidepressiven Mechanismus betrachten. Auch eine Veränderung der Rezeptordichte und -empfindlichkeit, wie man sie nach längerer antidepressiver Pharmakotherapie beobachtet, scheint eine entscheidende Rolle zu spielen (Frank, 2000).

Große Bedeutung für die Entstehung von Psychosen, z.B. der Schizophrenie, hat auch der Dopamin-Metabolismus im Sinne einer Störung dopaminerger Synapsen innerhalb des mesolimbischen Systems (Möller, 1995). Ausgangspunkt für diese Hypothese waren Beobachtungen, dass Amphetaminmissbrauch sowie die Gabe von Dopamin bei Morbus Parkinson gehäuft schizophrenieformige Symptome auslösen. Zudem lassen sich psychotische Symptome durch Neuroleptika, die typischerweise eine postsynaptische Rezeptorblockade an dopaminergen Synapsen bewirken (Frank, 2000), therapieren.

Bei schizophrenen Patienten konnte man darüber hinaus einen verminderten Glutamat Spiegel im Liquor feststellen. Da Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter ist (s.u.), unterstellt man einer Störung in diesem Bereich eine Rolle bei der Minussymptomatik der Schizophrenie. Medikamente wie Clozapin, das man u.a. zur Therapie der Minussymptomatik einsetzt, weisen gegenüber anderen Neuroleptika eine geringere Dopaminrezeptoraffinität auf. Dies spricht für die gleichberechtigte Gültigkeit der Glutamat-Hypothese neben der Dopamin-Hypothese (Frank, 2000).

Die Serotonin-Hypothese besagt, dass ein Transmitter-Mangel innerhalb des serotonergen Systems für die Genese u.a. affektiver Psychosen eine wichtige Rolle spielt (Möller, 1995). Auf dieser Hypothese beruht das Wirkprinzip selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer. Unklar ist, inwieweit eine direkte Beeinflussung der Funktion von Serotonin-Rezeptoren sowohl in der Genese als auch in der Therapie psychiatrischer Erkrankungen eine Rolle spielt. Erste Hinweise darauf fanden sich in einer kürzlich veröffentlichten Studie unserer Arbeitsgruppe, in der gezeigt wurde, dass verschiedene Antidepressiva als Antagonisten am 5-HT₃-Rezeptor wirken (Eisensamer et al., im Druck). Dies würde ein neues zusätzliches Wirkprinzip von Antidepressiva oder allgemein von Psychopharmaka darstellen.

2.2.2. Neuronale Grundlagen von Wahrnehmung und Bewusstsein

Soweit man bisher weiss, bildet ein Zusammenspiel neuronaler Netzwerke die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der höheren Funktionen des ZNS, wie Wahrnehmung, Bewusstsein und Affekt. Die Informationsweiterleitung und -bewertung innerhalb des ZNS wird heute als ein gleichzeitig seriell und parallel ablaufender Prozess der Aktivierung multifokaler, eng miteinander verschalteter neuronaler Netzwerke verstanden. Diese Netzwerke bestehen aus synaptischen Verschaltungen von Neuronen. Hierbei unterscheidet man divergente und konvergente Verschaltungen. Divergenz bedeutet, dass ein Neuron Information auf viele andere verteilt, Konvergenz bedeutet, dass ein Neuron Information von vielen anderen erhält. Das serotonerge System wird gern isoliert betrachtet, obwohl aufgrund des hohen Vernetzungsgrades der verschiedenen Transmittersysteme im ZNS prinzipiell davon auszugehen ist, dass jede Veränderung der Aktivität in einem System auch Veränderungen in den anderen mit sich führt. Die Aktivität und Effizienz der in verschiedenen Bereichen des ZNS operierenden lokalen Netzwerke wird durch „überregionale“ Systeme beeinflusst und aufeinander abgestimmt. Diese Systeme unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Reichweite ihrer Projektionen und der Verwendung jeweils spezifischer Transmitter wie z.B. Acetylcholin oder Serotonin. Die Reichweite ihrer Projektionen bestimmt das Ausmaß ihrer „globalisierenden“ Wirkung und durch die Verwendung unterschiedlicher Transmitter unterscheiden sie sich in ihrer Wirkung auf andere, lokale Netzwerke. Die in den Raphe-Kernen im Mittelhirn lokalisierten Perikaryen des global-modulatorischen serotonergen Systems besitzen die längsten und am stärksten verzweigten Axone und sind daher in der Lage, lokale neuronale Netzwerke in allen Bereichen des ZNS zu beeinflussen. Das serotonerge System ist u.a. an komplexen Funktionen, wie der Regulation von Schlaf, Gedächtnis, Affekt, Angst und Aggression beteiligt (Hüther und Rüter, 2000).

Die Informationsleitung innerhalb eines einzelnen Neurons erfolgt durch Aktionspotentiale. Diese beruhen auf Potentialveränderungen der Nervenzellmembran. Die Übertragung der Aktionspotentiale von Neuron zu Neuron kann auf zwei verschiedene Arten geschehen: Selten geschieht dies durch elektrische Synapsen. Die weitaus häufigste Variante ist die Weiterleitung über chemische Synapsen. In chemischen Synapsen überträgt ein Neurotransmitter, indirekt und unidirektional ein Signal: Erreicht ein Aktionspotential das präsynaptische Ende eines Neurons, wird der Neurotransmitter freigesetzt und diffundiert

über den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran. Vermittelt durch für den jeweiligen Neurotransmitter spezifische Rezeptor-Ionenkanal-Komplexe ändert sich die Permeabilität der postsynaptischen Membran für bestimmte Ionen. Dies führt zu einer Veränderung des Membranpotentials der postsynaptischen Membran (Klinke, 1996; Greger 1996; Petrides 1997b).

Grundsätzlich unterscheidet man exzitatorische (erregende) und inhibitorische (hemmende) Neurotransmittersysteme. Bindet der exzitatorisch wirkende Transmitter Glutamat an seinen spezifischen Rezeptor, führt dies an der postsynaptischen Membran zur Bildung eines exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP), d.h. es kommt zur Depolarisation der Zellmembran. Überschreitet das Membranpotential dabei einen bestimmten Schwellenwert in depolarisierende Richtung, so wird ein Aktionspotential ausgelöst. Bindet hingegen ein inhibitorischer Transmitter, z.B. GABA, an seinen spezifischen Rezeptor, so entsteht ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP), es kommt also zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran, was der Auslösung eines Aktionspotentials entgegenwirkt. (Klinke 1996). Der 5-HT₃-Rezeptor ist für Kationen permeabel. Somit kommt es bei Aktivierung zu einer Membrandepolarisation, also zu einer exzitatorischen Wirkung. Demgegenüber vermitteln die inhibitorisch wirksamen GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren einen Anionen-Strom.

2.2.3. Einteilung der Ionenkanäle

Ionenkanäle sind für die Aufrechterhaltung und für Veränderungen des Membranpotentials von Neuronen verantwortlich. Generell unterscheidet man zwischen spannungsabhängigen und ligandengesteuerten Ionenkanälen. Spannungsabhängige Ionenkanäle stabilisieren einerseits das Ruhemembranpotential und sind andererseits an der Bildung von Aktionspotentialen beteiligt. Ligandengesteuerte Ionenkanäle, zu denen u.a. der 5-HT₃-Rezeptor gehört, vermitteln hingegen überwiegend die synaptische Signalübertragung. Ligandengesteuerte Ionenkanäle lassen sich nach Ionenselektivität in kationenspezifische (exzitatorische) und anionenspezifische (inhibitorische) sowie in ionotrope und metabotrope Kanäle unterteilen. 5-HT₃-Rezeptoren sind, wie Glutamat- und Acetylcholin-Rezeptoren, kationenspezifisch. Demgegenüber sind beispielsweise Glycin- und GABA_A-Rezeptoren anionenspezifisch. Ionotrope Rezeptoren, wie z.B. 5-HT₃-Rezeptoren, sind dadurch gekennzeichnet, dass Rezeptor und Ionenkanal aus demselben Protein bestehen. Hier bewirkt

die Bindung des spezifischen Neurotransmitters direkt, d.h. ohne zwischengeschaltete Signalkaskaden, eine Änderung des Isomerisierungszustands des Kanalproteins und damit die Öffnung des Ionenkanals. Bei metabotropen Rezeptoren, zu denen alle anderen 5-HT-Rezeptoren zählen, erfolgt nach Transmitterbindung die Öffnung des Ionenkanals indirekt über eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade. Der eigentliche Rezeptor und der Ionenkanal sind hier also zwei unterschiedliche Proteinstrukturen (Klinke, 1996; Petrides, 1997b).

2.3. Serotoninrezeptoren

2.3.1. Allgemeines

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist vermutlich der pharmakologisch vielseitigste Vertreter aller Neurotransmitter und Neurohormone. Es induziert die Aktivierung und/oder Inhibition verschiedener exokriner und endokriner Drüsen, glatter Muskelzellen und Herzmuskelzellen, zentraler und peripherer Neurone, Zellen der Hämatopoese sowie des Immunsystems. Ursache dieser Vielfalt ist u.a. die Expression verschiedener Rezeptoruntereinheiten (Fozard, 1992).

Serotonin wurde erstmals vor etwa 150 Jahren beschrieben und wurde kurz darauf synthetisiert. Bald zeigte sich, dass Serotonin u.a. für die Blutdruckregulation, aber auch im Zusammenhang mit der Entstehung einiger psychiatrischer Störungen bedeutsam ist (Möller 1995).

Unter den Serotoninrezeptoren unterscheidet man zur Zeit sieben verschiedene Untergruppen, 5-HT₁₋₇, die ihrerseits insgesamt 15 strukturell und pharmakologisch unterschiedliche Subtypen bilden. Die meisten sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit second-messenger-gesteuerter Signaltransduktion. Lediglich der 5-HT₃-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal (Barnes und Sharp, 1999).

2.3.2. Physiologie und klinische Bedeutung des serotonergen Systems

Die selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) gehören zu den am meisten verkauften Medikamenten weltweit (Tabelle 1). Dies verdeutlicht die immense Bedeutung des

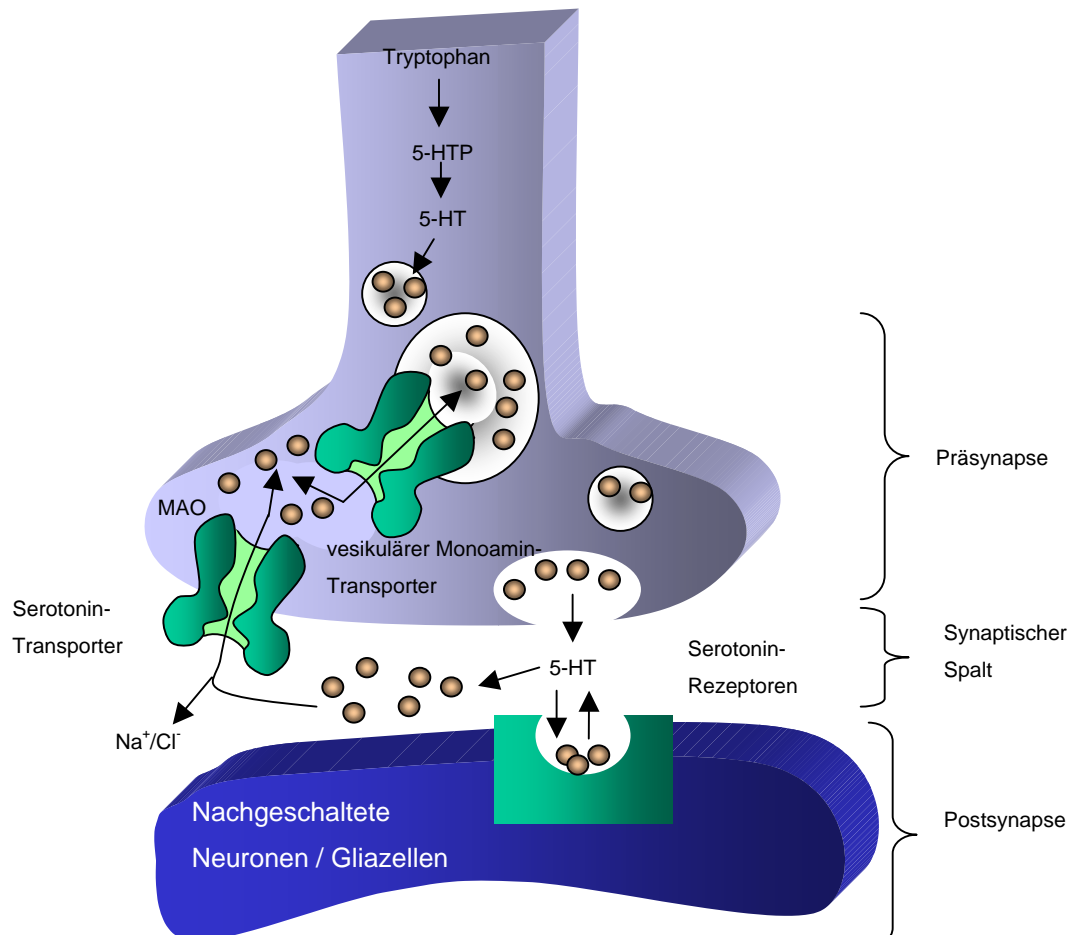


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Serotonin-Wiederaufnahme und -Wiederabspeicherung in serotonergen Axonterminalen (modifiziert nach Hüther und Rüter, 2000)

serotonergen Systems für die experimentelle und klinische (Psycho-) Pharmakologie. Abb. 2-2 zeigt die schematische Darstellung einer serotonergen Synapse mit dem Prozess der Serotoninwiederaufnahme. SSRI und trizyklische Antidepressiva bewirken eine Blockade der präterminalen Serotonintransporter und bewirken somit eine Verlängerung der Verweildauer von 5-HT im synaptischen Spalt (Hüther und Rüter, 2000).

Tabelle 1: Weltweit führende Psychopharmaka

Rang	Produkt	Wirkstoff	Wirkmechanismus	Medikamentenklasse	Umsatz in Mio US-\$ (im Jahr 2000)
1	Prozac	Fluoxetin	SSRI	Antidepressivum	2875
2	Seroxat	Paroxetin	SSRI	Antidepressivum	2416
3	Zyprexa	Olanzapin	D ₁₋₅ /5-HT ₂ /andere	Antipsychotikum	2391
4	Zoloft	Sertralin	SSRI	Antidepressivum	2248
5	Risperdal	Risperidon	D ₁₋₅ /5-HT ₂ /andere	Antipsychotikum	1707

(Jones und Blackburn, 2002)

Neben dieser für die Behandlung von Depressionen, Angststörungen und anderer seelischer Erkrankungen verwendeten Gruppe von Medikamenten gibt es noch eine Reihe anderer Pharmaka, die in das serotonerge System eingreifen. So spielen z.B. die 5-HT_{1B/D}-Agonisten in der Behandlung der Migräne und die 5-HT₃-Antagonisten in der Behandlung der Chemotherapie-induzierten Vomitus/Emesis eine wichtige Rolle (Jones und Blackburn, 2002). Der 5-HT₃-Rezeptor könnte darüber hinaus auch im Zusammenhang mit einer Reihe anderer psychiatrischer Erkrankungen und deren Behandlung eine wichtige Zielstruktur darstellen, zumal einige Antidepressiva die Funktion des 5-HT₃-Rezeptors hemmen können (Eisensamer et al., 2003).

2.3.3. Der 5-HT₃-Rezeptor

Die Aktivität von 5-HT₃-Rezeptoren steuert verschiedene physiologische Abläufe: Dies reicht von der Modulation neuronaler Aktivität und der Transmitterfreisetzung bis zum Verhalten (Barnes und Sharp, 1999).

2.3.3.1. Psychopharmakologische Bedeutung des 5-HT₃-Rezeptors

Nach den bisherigen Erkenntnissen aus *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen bewirkt eine Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren eine

- erhöhte Aktivität viscer-affektiver Neurone (Übelkeit, Erbrechen)
- verminderte synaptische Ausschüttung von Acetylcholin und Noradrenalin
- vermehrte synaptische Ausschüttung von GABA und Dopamin

(Hüther und Rüter, 2000).

Zudem gibt es Hinweise dafür, dass 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten anxiolytisch wirken (Jones und Piper, 1994). Die postulierte antipsychotische Potenz von 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten (Costall und Naylor, 1994a) lässt sich auch durch die antagonistische Wirkung von Clozapin am 5-HT₃-Rezeptor untermauern (Brunello et al., 1995). 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten wirken darüber hinaus cholinerg, was die tierexperimentelle Beobachtung stützt, dass sie die kognitive Leistung verbessern (Costall und Naylor, 1994b). Zusammenfassend stellt sich ein Zusammenhang dar zwischen Antagonismus am 5-HT₃-Rezeptor und einem

- antipsychotischen Effekt
- stimmungsaufhellenden Effekt

- anxiolytischen Effekt
- nootropischen Effekt.

Demnach stellt sich die Frage, inwieweit ähnliche Effekte, wie sie für α -Thujon beschrieben sind, ebenfalls mit einem Antagonismus oder Agonismus am 5-HT₃-Rezeptor in Zusammenhang stehen. So könnte α -Thujon beispielsweise über einen Agonismus direkt „pro-psychotisch“ oder über einen Entzugsmechanismus in der Karenz psychosfördernd wirken.

2.3.3.2. Die Wirkung einiger Psychopharmaka am 5-HT₃-Rezeptor

Zur Wirkung verschiedener Psychopharmaka auf die Funktion des 5-HT₃-Rezeptors gibt es noch verhältnismäßig wenige Untersuchungen. Die bisherigen Erkenntnisse sind hier tabellarisch dargestellt.

Tabelle 2: Die Wirkung verschiedener Psychopharmaka am 5-HT₃-Rezeptor

Substanz	Klassifizierung	Effekt am 5-HT₃-Rezeptor	Mechanismus
Flupentixol (Fluanxol [®])	„hochpotentes“ Neuroleptikum	inhibitorisch	nicht-kompetitiver Antagonismus ¹
Levomepromazin (Neurocil [®])	„niedrigpotentes“ Neuroleptikum	inhibitorisch	nicht-kompetitiver Antagonismus ¹
Haloperidol (Haldol [®])	„hochpotentes“ Neuroleptikum	inhibitorisch	nicht-kompetitiver Antagonismus ¹
Risperidon (Risperdal [®])	„atypisches“ Neuroleptikum	inhibitorisch	nicht-kompetitiver Antagonismus ¹
Clozapin (Leponex [®])	„atypisches“ Neuroleptikum	inhibitorisch	kompetitiver Antagonismus ²
Desipramin (Pertofran [®])	trizyklisches Antidepressivum	inhibitorisch	nicht-kompetitiver Antagonismus ³

Moclobemid (Aurorix [®])	reversibler Mono- aminoxidasehemmer	keinen ³	
Mirtazapin (Remergil [®])	Antidepressivum	inhibitorisch	kompetitiver Antagonismus ³
Fluoxetin (Fluctin [®])	selektiver Serotonin- wiederaufnahmememmer	inhibitorisch	nicht-kompetitiver Antagonismus ³
Reboxetin (Edronax [®])	selektiver Noradrenalin- wiederaufnahmememmer	inhibitorisch	nicht-kompetitiver Antagonismus ³

¹Rammes et al., 2003; ²Hermann et al., 1996; ³Eisensamer et al. 2003; ⁴Fan, 1994

2.3.3.3. Agonisten und Antagonisten am 5-HT₃-Rezeptor

Serotonin ist für alle Serotoninrezeptoren der natürliche Agonist und wird im Organismus aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan gebildet. Die Affinität von Serotonin für die 5-HT₃-Rezeptorbindungsstelle ist allerdings, verglichen mit einigen nicht natürlichen Agonisten, relativ gering (Nejt et al., 1986). Neben Serotonin ist Dopamin ein weiterer endogener Agonist des 5-HT₃-Rezeptors. Serotonin aktiviert neben Serotoninrezeptoren auch α_2 -Adrenorezeptoren (Allgaier et al., 1995; Schlicker et al., 1994).

Nicht natürliche 5-HT₃-Rezeptoragonisten sind z.B. 2-Methyl-5-HT sowie die Amidinderivate Phenylbiguanid (PBG) und Metachlorophenylbiguanid (mCPBG). Das funktionelle Ansprechen des Rezeptors auf die verschiedenen Agonisten hängt sowohl von der Spezies als auch von der Untereinheiten-Zusammensetzung des Kanals ab (vgl. Tabelle 2). Die Agonisten 5-HT und 2-Methyl-5-HT wirken am homomeren 5HT_{3A}-Rezeptor mit einer ähnlichen Potenz (Costall and Naylor 1994a). Am heteromeren 5HT_{3AB}-Rezeptor sind sie hingegen weniger potent (Davies et al., 1999). Der Effekt von PBG und mCPBG am 5-HT₃-Rezeptor ist stark speziesabhängig. In der Tabelle 2 sind einige Agonisten und Antagonisten des 5-HT₃-Rezeptors mit der entsprechenden halbmaximalen effektiven (EC₅₀) bzw. inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) aufgelistet.

Tabelle 3: Agonisten und Antagonisten am 5-HT₃-Rezeptor

	Maus	Human		
	5-HT _{3A}	5-HT _{3A}	5-HT _{3AB}	5-HT ₃ nativ
Agonisten	*EC₅₀			
5-HT	2,9 μM ²	2,9 μM ¹ 3,4 μM ⁴	6,0 μM ¹	2,3 μM ²
2-Me-5-HT	2,3 μM ²	4,1 μM ¹ 10 μM ⁴	12,1 μM ¹	2,8 μM ²
PBG	12,5 μM ²	80 μM ⁴		41,2 μM ²
mCPBG	0,55 μM ²	2,5 μM ¹ 1,0 μM ⁴	2,1 μM ¹	1,9 μM ²
*halbmax. Effektiv-Konzentration				
Antagonisten	**IC₅₀			
Metoclopramid	0,11 μM ²	69 nM ⁴		0,29 μM ²
Phenobarbital		127 μM ³		
Methohexital		95 μM ³		
Ondansetron		103 pM ⁴		
Tubocurarin		2,8 μM ⁴	14,2 μM ¹	
**halbmax. inhibit. Konzentration		3,4 μM ¹		

¹Davies et al., 1999; ²Lankiewicz et al., 1998; ³Barann et al., 2000;

Kompetitive Antagonisten hemmen die Wirkung von 5-HT am 5-HT₃-Rezeptor, indem sie mit dem Agonisten um dessen Bindungsstelle konkurrieren. Hierzu zählen z.B. die Antiemetika Tropisetron und Ondansetron sowie das Antidepressivum Mirtazapin. Verschiedene dampfförmige Anästhetika und Alkohole (Ethanol, Methanol) verstärken hingegen die Funktion des 5HT₃-Rezeptors (Machu and Harris, 1994).

2.3.3.4. Rezeptor-Verteilung im ZNS

Die Region mit der höchsten Dichte an 5-HT₃-Rezeptoren liegt im hinteren vagalen Komplex des Hirnstamms. Dieses mit der Physiologie des Brechreizes eng assoziierte Areal umfasst den Nucleus tractus solitarius, die Area postrema und den dorsalen motorischen Vagus Kern.

Hier vermutet man auch den Angriffspunkt des stark antiemetisch wirksamen 5-HT₃-Rezeptorantagonisten Ondansetron.

Die 5-HT₃-Rezeptorexpression im gesamten Vorderhirn ist hingegen vergleichsweise gering. Dort wiederum findet sich die höchste Dichte im Hippocampus, in der Amygdala und in manchen oberflächlichen Kortexschichten. In diesen Verteilungen zeigen sich jedoch Speziesunterschiede. So findet man z.B. beim Menschen eine hohe Rezeptordichte im Nucleus caudatus und im Putamen, hingegen eine niedrigere in den Kortexregionen. Dieses Verteilungsmuster ist bei Nagern umgekehrt. Man findet jedoch bei den meisten Spezies (z.B. Mensch, Maus und Ratte) im Hippocampus durchgehend hohe 5-HT₃-Rezeptorkonzentrationen (Barnes, 1999; Parker et al., 1996).

Darüber hinaus wurden 5HT₃-Rezeptoren auch im enterischen Nervensystem und im sympathischen Nervensystem von Hasen, Katzen und Ratten gefunden (Costall and Naylor, 1994b).

2.3.3.5. Tertiär- und Quartärstruktur des 5-HT₃-Rezeptors

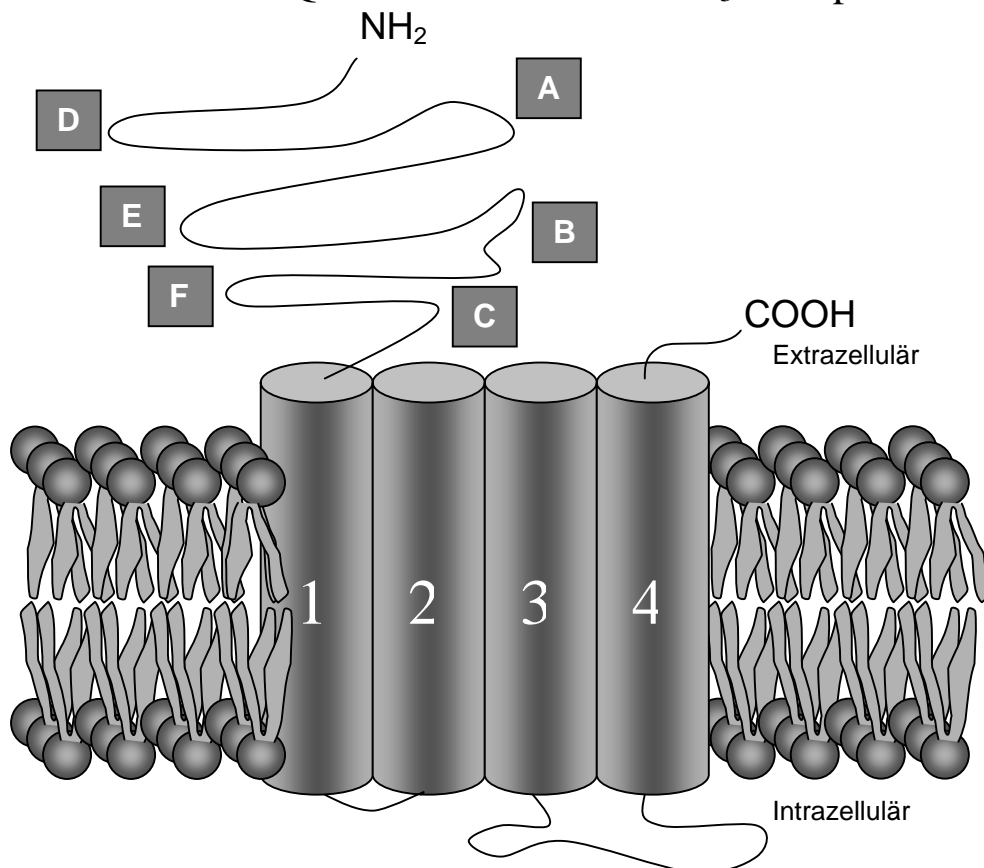


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Untereinheit (Tertiärstruktur) eines Ionenkanals in seiner Lage innerhalb der Zellmembran. Die Schleifen A-F der extrazellulären Domäne zeigen die wahrscheinlichen Bindungsstellen für 5-HT am 5-HT₃-Rezeptor (modifiziert nach Reeves und Lummis, 2002). Besonders hervorgehoben sind die transmembranären Domänen (TM) 1-4.

Derzeit kennt man die Aminosäuresequenz von drei verschiedenen Untereinheiten des 5-HT₃-Rezeptors (Tertiärstruktur Abb. 2-3): A, B und C (Reeves und Lummis, 2002). Im Jahr 1991 wurde die 5-HT_{3A}-Rezeptor-Untereinheit aus Nervengewebe der Maus kloniert. Im Jahr 1995 gelang die Klonierung der 487 Aminosäuren langen 5-HT_{3A}-Untereinheit aus Neural-Material von menschlichem Dickdarm-Gewebe. Diese Untereinheit weist eine hohe Ähnlichkeit mit Untereinheiten anderer ligandengesteuerter Ionenkanäle, z.B. nicotinerger Acetylcholin-,

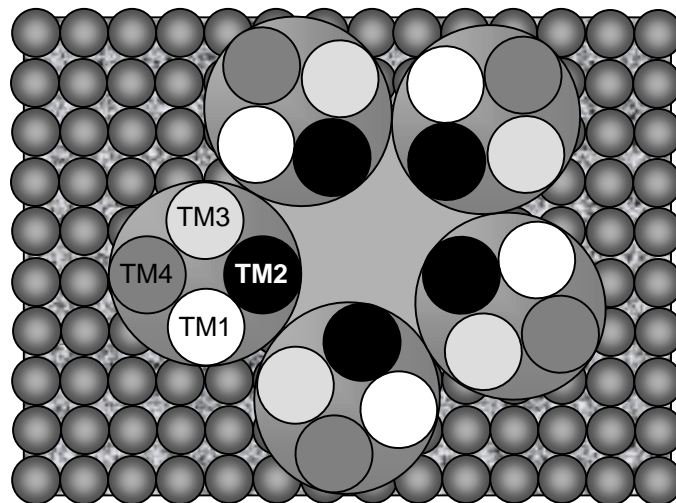


Abb. 2-4: Quartärstruktur eines Ionenkanals (Aufsicht): Die fünf Untereinheiten sind in einer Weise angeordnet, dass die porenbildenden TM2-Domänen das Kanallumen bilden (frei nach Waxham, 1999).

GABA_A- und Glycin-Rezeptoren auf, denen eine Cystein-Schleife in der N-terminalen Domäne gemeinsam ist (Mariq et al., 1991; Miyake et al., 1995). Die 5-HT_{3A}-Untereinheit von Maus und Meerschweinchen existiert in zwei Splicevarianten: Es gibt eine Langform (5-HT_{3A1}) und eine um 6 Aminosäuren kürzere Kurzform (5-HT_{3A8}). Hierbei ist bemerkenswert, dass die Kurzform im Vergleich zur Langform um das 4-6 fache überwiegt (Werner et al., 1994). Diese Splicevarianten kommen allerdings beim Menschen nicht vor.

Die klonierten 5-HT_{3A}-Untereinheiten können heterolog, z.B. in HEK 293-Zellen oder Xenopus-Oozyten, exprimiert werden. Die transfizierten Zellen bilden aus den Untereinheiten ein homopentamer Protein, das als funktionaler Rezeptor-Kanal in die Zellmembran eingelagert wird. Die auf diese Weise gebildeten homomeren Rezeptoren, sog. 5-HT_{3A}-Rezeptoren, ähneln in ihren biophysikalischen Eigenschaften in vieler Hinsicht nativen 5-HT₃-Rezeptoren. Die lange Splice-Variante der 5-HT_{3A}-Untereinheiten von Maus und Meerschweinchen bildet, im Gegensatz zur kurzen Form, beim Kanalprotein eine zusätzliche

intrazelluläre Phosphorylierungsstelle. Sich daraus ergebende Unterschiede in der Rezeptor-Physiologie konnten aber bislang nicht nachgewiesen werden (Barnes and Sharp, 1999). Vielmehr gaben einige funktionelle Unterschiede zwischen nativen 5-HT₃-Rezeptoren und den heterolog exprimierten homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptoren Anlass zur Vermutung, dass die nativen Rezeptoren einen zusätzlichen Faktor, möglicherweise eine noch unbekannte Untereinheit enthalten (van Hooft et al., 1997a). Im Jahr 1999 wurde schließlich diese Untereinheit, die sog. 5-HT_{3B}-Untereinheit, aus menschlichem Gewebe (Davies et al., 1999),

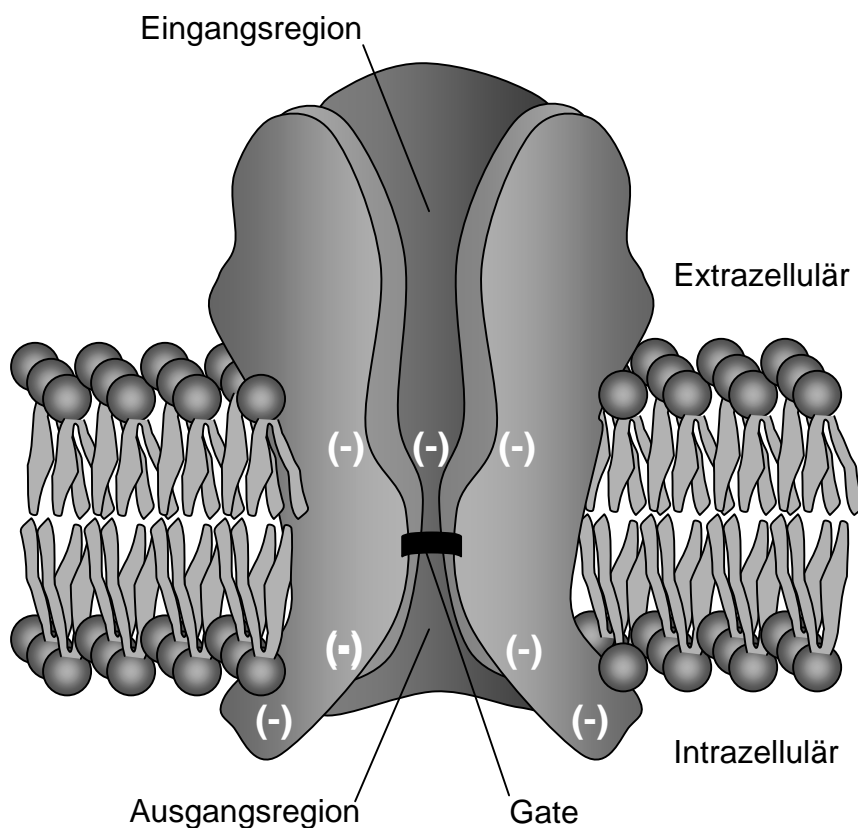


Abb. 2-5: Schematische Darstellung des typischen Aufbaus eines ligandengesteuerten Ionenkanals aus 5 Untereinheiten (Pentamer). Am Beispiel eines kationenspezifischen Kanals ist das zwischen Ringen negativ geladener Aminosäure-Reste gelegene 'Gate' hervorgehoben (frei nach Waxham, 1999).

im Jahr 2000 auch aus Neuralmaterial der Maus kloniert (Hanna et al., 2000).

Unter heterologer Expression der 5-HT_{3B}-Untereinheit bildet sich jedoch kein funktionales homomeres Kanalprotein. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass diese Untereinheit die Kanalporen-bildende transmembranäre TM2-Region nicht besitzt (Davies et al., 1999). Erst in Koexpression zusammen mit der 5-HT_{3A}-Untereinheit bildet sich ein heteropentamer Kanalprotein, der 5-HT_{3AB}-Rezeptor. Der homomere 5-HT_{3A}-Rezeptor und der heteromere 5-

HT_{3AB}-Rezeptor unterscheiden sich pharmakologisch wenig (Brady et al., 2001). Hingegen weisen sie erhebliche biophysikalische Unterschiede auf. Der 5-HT_{3AB}-Rezeptor besitzt beispielsweise eine wesentlich höhere Einzelkanal-Leitfähigkeit (Davies et al., 1999). In einer detaillierten Vergleichsstudie unter sonst gleichen experimentellen Bedingungen konnten deutliche Unterschiede insbesondere in Kanal-Kinetik und Transmitter-vermittelter Rezeptor-Regulation dargestellt werden (Hapfelmeier et al., 2003). Somit könnte eine differentielle Koexpression der 5-HT_{3B}-Untereinheit bei nativen 5-HT₃-Rezeptoren die unterschiedlichen Befunde hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften erklären (Yang J et al., 1992; Hussy et al., 1994; Fletcher and Barnes, 1998). Nach neuesten Erkenntnissen kommen endogene 5-HT₃-Rezeptoren im Nervengewebe sowohl als homomere als auch als heteromere Variante vor (Morales et al., 2001).

Die Abb. 2-4 zeigt schematisch die quartäre Struktur eines liganden-gesteuerten Ionenkanals mit dem typischen Aufbau der Kanalpore.

2.3.3.6. Die Aktivierung des 5-HT₃-Rezeptors

Beim 5-HT₃-Rezeptor fungiert das glykosilierte N-Terminal als Bindungsstelle für Serotonin (Eiselé et al., 1993). Nach Bindung des Transmitters erfolgt die Kanalöffnung direkt durch eine Änderung des Isomerisierungszustandes des Kanal-Proteins, d.h. ohne zwischengeschaltete Signalkaskaden, wie bei den G-Protein-gekoppelten Kanälen (Petrides 1997b). Der Mechanismus der Aktivierung von ionotropen (ligandengesteuerten) Kanälen ist bisher überwiegend für den Acetylcholinrezeptor untersucht: Die Bindung des Agonisten wird innerhalb der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors durch zwei benachbarte Cysteinreste, die eine Disulfidbrücke bilden, vermittelt. Diese Struktur ist auch bei anderen ionotropen Rezeptoren vorhanden. Die Transmitterbindung verursacht schließlich eine Konformationsänderung des Kanalproteins im Sinne einer leichten Drehung der TM2-Segmente um ihre Längsachse, was die Kanalpore leicht öffnet und dadurch den Ionenfluss entlang des elektrochemischen Gradienten ermöglicht (Waxham, 1999). Das Schließen der Kanäle kann durch Dissoziation des Agonisten (Deaktivierung) oder durch Desensitisierung erfolgen (Jones und Westbrook 1996).

Die Aktivierung des 5-HT₃-Rezeptors nach Bindung von 5-HT verläuft gegenüber anderen ionotropen Rezeptoren vergleichsweise langsam (Waxham, 1999). Die Pore des 5-HT₃-Rezeptors ist kationenselektiv, überwiegend für monovalente Ionen wie Na⁺ und K⁺, aber auch für die divalenten Kationen Ca²⁺ und Mg²⁺ (Yang, 1990; Barnes und Sharp, 1999).

2.3.3.7. Kinetik des 5-HT₃-Rezeptors

Wie bereits erwähnt, bewirkt die Bindung des Liganden bei einem ligandengesteuerten Ionenkanal direkt die Öffnung des Ionenkanals. Hierbei kommt es zu einer Veränderung des Isomerisierungszustands des Kanals im Sinne einer Rotation der TM2-Segmente, die die Kanalpore bilden. Die Öffnung ermöglicht schließlich den Ionenfluss. Diese Kanalaktivierung kann man mit der „*Three-State-Kinetic Theory*“ (del Castillo und Katz, 1957) beschreiben. Hiernach gehen die Rezeptor-Ionenkanal-Komplexe, ausgehend vom geschlossen-ungebundenen Zustand (R), nach Bindung des Agonisten (A) in den gebundenen (noch geschlossenen) Zustand (RA) und dann erst in den offenen Zustand (O) über. Im offenen Zustand (O) ist der Kanal dann für die jeweiligen kanalspezifischen Ionen passierbar. Der Übergang von Zustand R nach RA wird als „*binding*“ bezeichnet. Die darauffolgende Isomerisierung zum Zustand des offenen Kanals (O) nennt man „*gating*“.

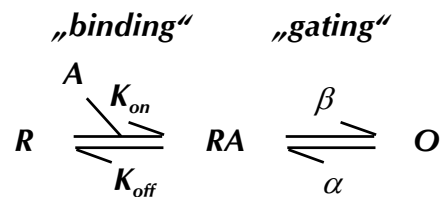


Abb. 2-6: Vereinfachtes Reaktionsschema zum Funktionsprinzip eines ligandengesteuerten Ionenkanals. Unter Bindung des Agonisten A geht der Zustand R in einen geschlossen-gebundenen Zustand (RA) über, welcher dann in den Offenzustand O übergehen kann. Diese bidirektionalen Reaktionen werden von den Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten (K_{on} bzw. K_{off}) und von den „gating“-Raten β bzw. α bestimmt.

In Abhängigkeit von Agonist und Ionenkanal können auch mehrere Bindungsschritte zur Öffnung des Ionenkanals notwendig sein. Wie viele Bindungsschritte nötig sind, lässt sich anhand des Hill-Koeffizienten der Dosiswirkungsbeziehung zwischen Agonist und der induzierten Rezeptorantwort abschätzen. Je nach der Art des Kanals, des Agonisten und dessen Konzentration, sowie einer möglichen zusätzlichen Interaktion zwischen Rezeptor und Agonist, muss ein solches Reaktionsschema um zusätzliche Schritte, z.B. Desensitisierungs- oder Blockade-Schritte, erweitert werden. Darüber hinaus sind auch in Dauer und Gesamtleitfähigkeit unterschiedliche Offenzustände denkbar.

2.3.3.8. Die Desensibilisierung der 5-HT₃-Rezeptoren

Ein Mechanismus, den viele Ionenkanäle gemeinsam haben, ist die Desensibilisierung. Dieser Begriff definiert das Inaktivieren der Kanäle unter Anwesenheit des Agonisten. Ein solcher Rezeptor-Mechanismus ist bei manchen Transmittersystemen der entscheidende Faktor, der bei der elektrochemischen Signal-Übertragung über Synapsen die postsynaptische Rezeptor-Antwort zeitlich begrenzt. Somit reguliert dieser Steuerungsmechanismus die Stärke einer transmittervermittelten synaptischen Übertragung, die sog. synaptische Effizienz (Jones und Westbrook, 1996).

Im elektrophysiologischen Experiment kann man die Rezeptor-Desensibilisierung erfassen, indem man die Transmitter-induzierte Stromantwort der Ionenkanäle als Strom-Zeit-Diagramm aufzeichnet. Hierbei stellt man unter Anwesenheit des Transmitters einen Stromabfall als Zeichen der Rezeptor-Desensibilisierung fest. Der Stromabfall lässt sich anhand einer Exponentialgleichung beschreiben und mittels einer Zeitkonstanten quantifizieren. Je nach Art des Ionenkanals beträgt diese Zeitkonstante wenige Millisekunden (z.B. bei glutamatergen, sog. AMPA-Rezeptoren) bis einige Sekunden (z.B. bei 5-HT₃-Rezeptoren). Die Desensibilisierung kann auch biphasisch verlaufen, d.h. sich aus einer schnelleren und einer langsameren Komponente zusammensetzen. Man kann hierfür entsprechend zwei unterschiedliche Zeitkonstanten angeben. Typischerweise findet man dies z.B. bei GABA_A-Rezeptoren und bei den homomeren 5-HT₃-Rezeptoren. Die genauen molekularen, proteindynamischen Mechanismen der Rezeptor-Desensibilisierung sind allerdings noch sehr wenig bekannt.

Wenn sich ein Ionenkanal im Desensibilisierungszustand befindet, ist er für seinen Agonisten insensitiv. Im Sinne einer Refraktärzeit braucht der Rezeptor wieder eine gewisse Zeit, bis er wieder in einem aktivierbaren Zustand ist. Diese "Erholungszeit" oder Rezeptor-Resensibilisierung kann von 100 ms (Glutamat-Rezeptoren) bis zu einer Minute (5-HT₃-Rezeptoren) betragen. Solange dauert es dann, bis der entsprechende (z.B. postsynaptisch-lokalisierte) Rezeptor auf eine (präsynaptische) Transmitterausschüttung wieder eine maximale Stromantwort, also eine postsynaptische Antwort vermitteln kann. Auf diese Weise reguliert die Resensibilisierungs-Zeit eines Rezeptors die Fähigkeit der entsprechenden Synapse, eine bestimmte Aktionspotentialfrequenz auf das nächste Neuron zu übertragen. Die Resensibilisierungs-Zeit des Ionenkanals begrenzt also nach oben die Frequenz einer elektrochemischen Signalübertragung (innerhalb des Transmittersystems) vom einen zum

nächsten Neuron. Somit kann eine Synapse die Funktion eines sog. Tiefpass-Filters übernehmen (Jones und Westbrook 1995; Jones und Westbrook 1996).

Die Desensibilisierung eines ligandengesteuerten Ionenkanals kann durch verschiedene Faktoren reguliert werden. Beim 5-HT₃-Rezeptor kann z.B. durch Ersatz des 4th Lysin-Rest in der TM2-Domäne oder durch Ersatz des Leu²⁸⁶ im TM2-Segment durch andere Aminosäuren die Desensibilisierung verstärkt oder abgeschwächt werden (Yakel et al., 1993; Gunthorpe et al., 2000). Auch Veränderungen der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration sowie der Differenzierungsstatus der Zellen beeinflussen die 5-HT₃-Rezeptor-Desensibilisierung (Lobitz et al., 2001; Shao et al., 1991).

2.3.3.8.1 5-HT_{3A}-Rezeptor: Desensibilisierung durch einen Agonist-induzierten Offen-Kanal-Block

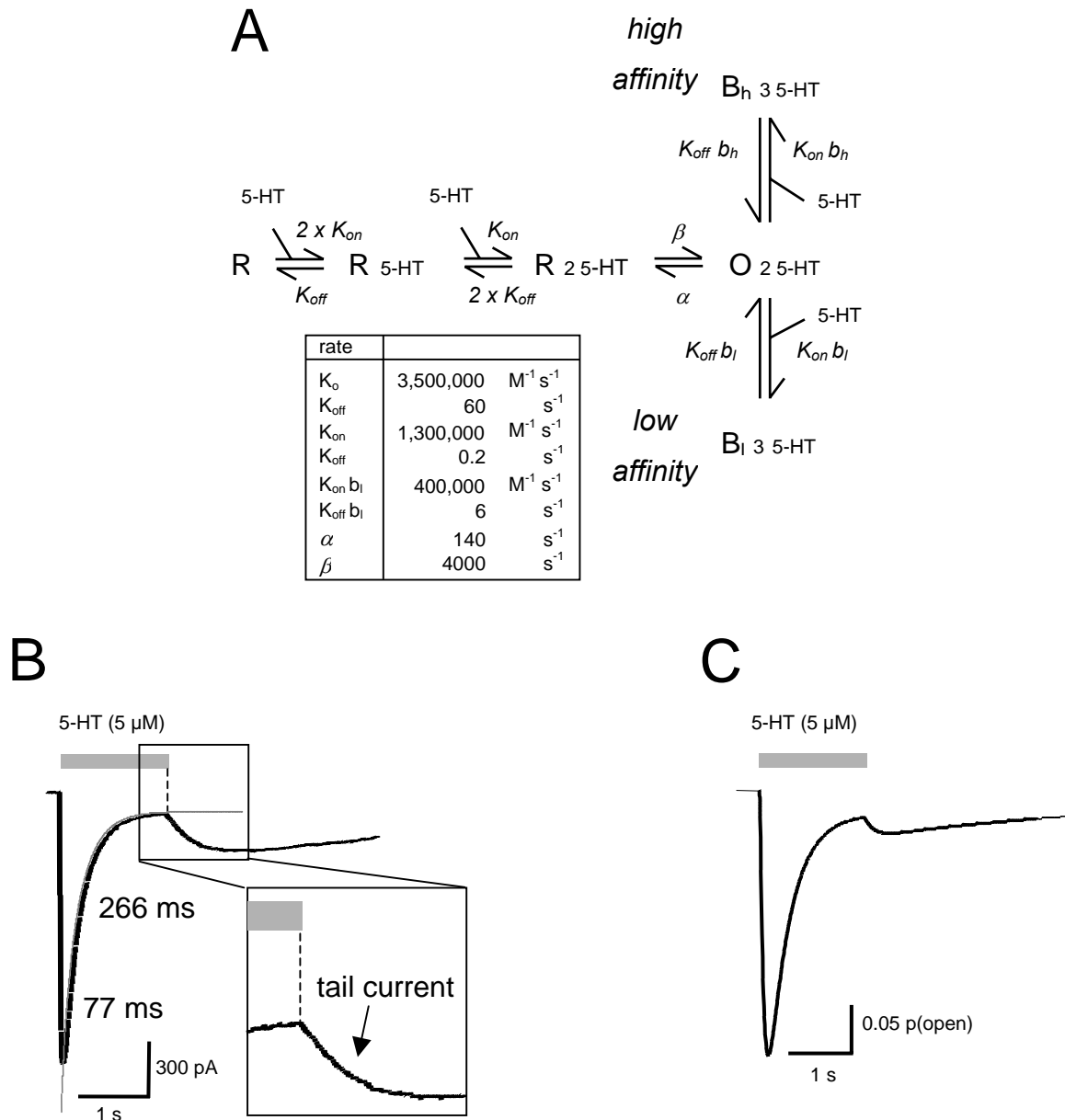


Abb. 2-7: **A:** Kinetisches Modell der Agonisten-Wirkung am homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor (Hapfelmeier et al., 2003). Dieses Modell beschreibt eine Rezeptor-Desensibilisierung, die durch eine Kanalblockade durch den Agonist 5-HT verursacht wird. **B:** Typische Stromantwort des 5-HT_{3A}-Rezeptors nach Aktivierung durch 5-HT. Der "Tailcurrent" kommt dadurch zustande, dass sich nach Dissoziation von 5-HT die Kanalblockade löst. Die noch kurzzeitig aktivierten Kanäle lassen daraufhin noch einen "Nachstrom" von Ionen passieren **C:** Die mittels Modell simulierte Stromantwort (hierbei wird der Zeitverlauf des offenen Zustands des Kanals (O) berechnet und grafisch aufgetragen) ähnelt stark dem experimentell ermittelten Ionenstrom. Diese Übereinstimmung spricht für die Plausibilität des Modells.

Legendre et al. (2000) beschreiben für den ACh-Rezeptor der motorischen Endplatte des Zebrafischs einen Agonist-induzierten Block. Dies bedeutet, dass der Agonist Acetylcholin zusätzlich einen Offenkanalblock am Ionenkanal verursacht. Grundlage dessen war die Beobachtung eines sog. "Nachstroms" ("Tailcurrent") infolge der Dissoziation des Agonisten von den Rezeptoren.

Einen sehr ähnlichen Befund erheben Hapfelmeier et al. (2003) am homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor. Auch sie beobachteten einen solchen Tailcurrent. Nach der Entfernung von 5-HT vom 5-HT_{3A}-Rezeptor kam es zu dem erneuten, wenn auch deutlich kleineren Ionenfluss (Abb. 2-7 B). Bei Applikation des Agonisten 5-HT (grauer Balken) kommt es zunächst zur Öffnung der Kanäle (Ionenfluss) und anschließend zur Kanalschließung unter fortwährender Anwesenheit des Agonisten im Sinne der oben bereits erwähnten Desensibilisierung. Typischerweise verläuft die Desensibilisierung beim homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor biphasisch. (zwei Zeitkonstanten) (Abb. 2-7 B). Bei Dissoziation von 5-HT (Ende des grauen Balkens) kommt es zum Nachstrom (Tailcurrent). Ein Tailcurrent ist ein typischer elektrophysiologischer Befund, der sich als Zeichen einer "Umkehr-Reaktion" eines Offen-Kanal-Block-Mechanismus zeigt (Hapfelmeier et al., 2003).

Basierend auf der „*Three-State-Kinetic Theory*“ (siehe Punkt 2.3.3.7) erstellten Hapfelmeier et al. (2003) ein kinetisches Reaktionsschema für den 5-HT_{3A}-Rezeptor, welches sowohl den biphasischen Verlauf der Desensibilisierung als auch den charakteristischen Tailcurrent simuliert (Abb. 2.7 A). Dieses Schema beschreibt das Zusammenspiel einer *high affinity*- und *low affinity*-Komponente eines Agonist-induzierten Offen-Kanal-Blocks als den entscheidenden Mechanismus der Rezeptor-Desensibilisierung.

2.3.3.8.2 Die Desensibilisierung des 5-HT_{3AB}-Rezeptors

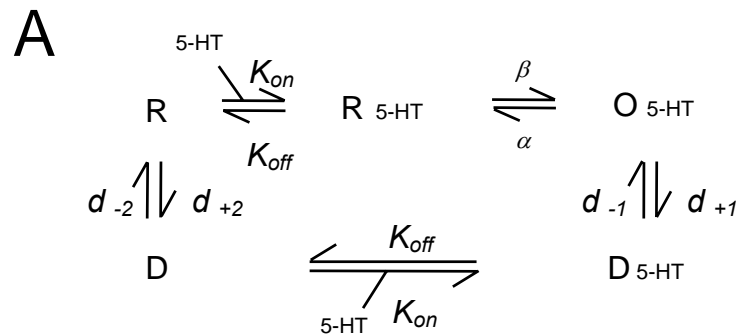
Der heteromere 5-HT_{3AB}-Rezeptor unterscheidet sich in seinen Stromantworten grundlegend vom homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor (Hapfelmeier et al., 2003). Insbesondere löst die schnelle Entfernung von 5-HT hier keinen Tailcurrent aus. Die Desensibilisierung lässt sich typischerweise mit nur einer Zeitkonstante charakterisieren (monophasischer Verlauf).

Abb. 2-8 B zeigt eine typische Stromantwort des 5-HT_{3AB}-Rezeptors auf die Aktivierung durch 5-HT (grauer Balken).

Nach Erreichen des Peaks zeigt sich die durch Rezeptor-Desensibilisierung bedingte Abnahme des Stroms. Im Modell beschreiben die Desensibilisierungs-Hin- und -Rückraten d_{+1} (2 s^{-1}) bzw. d_{-1} ($0,1 \text{ s}^{-1}$) dieses Phänomen. Nach der Desapplikation von 5-HT fällt der Strom dann

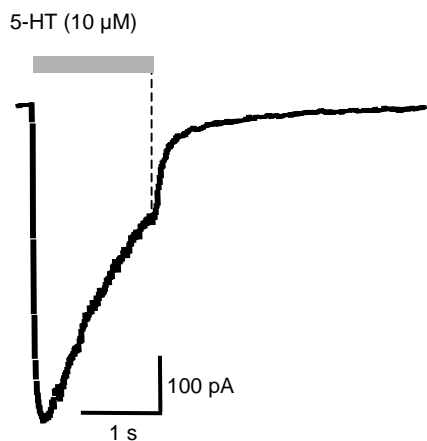
relativ rasch ab. Den hierbei zugrundeliegenden Kanal-Mechanismus nennt man Deaktivierung (Schließen der Kanäle bei Agonist-Dissoziation).

Das den 5-HT_{3AB}-Rezeptor beschreibende kinetische Modell zeigt: Der geschlossen-



rate		
K_{on}	1,000,000	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
K_{off}	15	s^{-1}
d_{+1}	2	s^{-1}
d_{-1}	0.1	s^{-1}
d_{+2}	0.01	s^{-1}
d_{-2}	0.25	s^{-1}
α	140	s^{-1}
β	500	s^{-1}

B



C

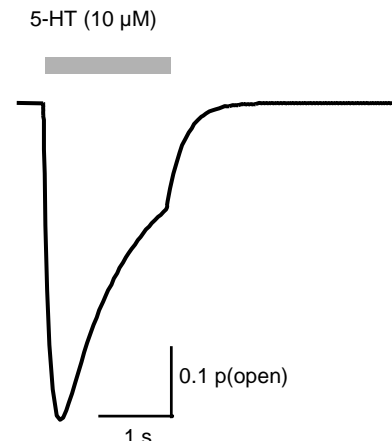


Abb. 2-8 **A**: Kinetisches Modell des 5-HT_{3AB}-Rezeptors (Hapfelmeier et al., 2003); In diesem Modell ist die Desensibilisierung der Rezeptoren nach einem bisher mehrfach beschriebenen Prinzip dargestellt: Der offene Zustand des Kanals geht unter Einfluss des bereits gebundenen Agonisten-Moleküls direkt, d.h. unter Änderung des Isomerisierungs-Zustands, in einen desensibilisierten (geschlossenen) Zustand über. Von diesem Zustand kann das 5-HT-Molekül wieder dissoziieren. Der desensibilisierte Kanal (D) geht schliesslich wieder in den aktivierbaren Zustand (R) über (Resensibilisierung). Somit ergibt sich das zirkuläre Reaktionsschema. **B**: Typische Stromantwort des 5-HT_{3AB}-Rezeptors nach Aktivierung durch 5-HT. Hier zeigt sich kein Tailcurrent; **C**: Die mittels Modell simulierte Stromantwort (hierbei wird der Zeitverlauf des offenen Zustands des Kanals (O) berechnet und grafisch aufgetragen).

aktivierbare Rezeptor (R) bindet ein 5-HT-Molekül (R 5-HT) und kann dann öffnen (charakterisiert durch die "gating"-Konstanten β und α). Vom offenen Zustand (O 5-HT) geht der Rezeptor in einen gebunden-desensitisierten Zustand (D 5-HT) über. Von diesem kann das 5-HT-Molekül wieder dissoziieren (dann ungebunden-desensitisierte Zustand D). Der Kanal im Zustand D resensitisiert schließlich zum geschlossenen- aktivierbaren Zustand (R).

2.3.3.9. Beeinflussung der 5-HT₃-Rezeptor-Desensitisierung durch 5-Hydroxyindol

5-Hydroxyindol (5-OHi, C₈H₇NO) ist der aromatische Rest des natürlichen 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten 5-HT. Diese Substanz besitzt zwar bislang keine physiologische oder pharmakologische Relevanz, sie wurde aber öfter als Modell-Wirkstoff bei *in vitro*-Untersuchungen zur Funktion und Pharmakologie des 5-HT₃-Rezeptors eingesetzt (Kooyman et al., 1994; van Hooft et al., 1997b). Hierbei fiel auf, dass 5-OHi trotz struktureller Gemeinsamkeiten mit 5-HT keine agonistische Wirkung am 5-HT₃-Rezeptor entfaltet, obwohl es an der 5-HT-Bindungsstelle am Rezeptor binden kann (Kooyman et al., 1994). Zusammen mit 5-HT appliziert, verstärkt 5-OHi jedoch die 5-HT-induzierten Rezeptorantworten und verlangsamt gleichzeitig die Desensitisierung der 5-HT₃-Rezeptoren. Der genaue Mechanismus der Interaktion mit dem Rezeptor-Protein, durch den 5-OHi die Kanalkinetik moduliert, ist allerdings noch nicht bekannt.

Höhere Konzentrationen von 5-OHi (über 10 mmol/l) haben hingegen einen inhibitorischen Effekt auf die 5-HT₃-Rezeptor-Aktivität. Dabei kommt es ebenfalls gleichzeitig zu einer Verlangsamung der Desensitisierung. Interessanterweise ist die Hemmung der Stromantworten durch 5-OHi mit einem Tailcurrent (siehe oben!) assoziiert. Dieser weist auf einen Kanal-Block-Mechanismus hin. Es konnte aber nicht klar dargestellt werden, ob 5-OHi wirklich das kanalblockierende Molekül ist (Kooyman et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung von 5-OHi an heterolog exprimierten 5-HT₃-Rezeptoren (homomere und heteromere Variante) reproduziert und näher untersucht werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollen im Sinne eines Modell-Mechanismus, insbesondere im Vergleich mit der Wirkung von α -Thujon, beschrieben werden.

2.4. Die Patch-Clamp Technik

Die Patch-Clamp Technik ermöglicht die Untersuchung von Leitfähigkeit, Kinetik und Pharmakologie von spannungs- und ligandengesteuerten membranständigen Ionenkanälen. Dabei wird mit der Spitze einer sehr fein ausgezogenen Glaspipette entweder eine ganze Zelle (sog. Whole-cell Patch) oder nur ein kleines Membranstück (patch = "Flicken") aufgenommen (Hamill et al., 1981). Die Zelle bzw. das Membranstück verschließt dabei die Pipettenöffnung und bildet dort eine elektrische Barriere. Die mit der Pipette verbundene Verstärker-Apparatur registriert den Ionenfluss, der die membranständigen Ionenkanäle passiert.

Dieses sog. Voltage-Clamp-Verfahren (Spannungsklemme) wurde in den 70er Jahren von Erwin Neher und Bert Sackman am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München entwickelt. Die Apparatur arbeitet in der Weise, dass sie an der Spannungsklemme durch Erzeugung eines Kompensationsstroms, der dem transmembranären Strom entgegengerichtet ist, Veränderungen des Membranpotentials ausgleicht. Dabei wird das Membranpotential gemessen, mit einer Sollspannung verglichen, und bei Abweichungen der entsprechende Kompensationsstrom in die Zelle injiziert. Durch Messung dieses Stroms mit einem speziellen Verstärker kann man den Ionenfluss durch die Kanäle beobachten und aufzeichnen (Numberger und Draguhn, 1996).

Die eigentliche technische Schwierigkeit der Patch-Clamp-Technik besteht in der Unterdrückung und Filterung von Stör- und Rausch-Signalen. Ein wichtiger Faktor dafür ist u.a. ein hoher elektrischer Abdichtwiderstand (im $G\Omega$ -Bereich, sog. "Giga-seal") zwischen Zellmembran und Pipettenspitze. Diesen kann man meistens durch Anlegen eines Unterdrucks im Pipetteninneren erzeugen. Bei ausreichender Reduzierung des Rausch-Signals kann man Ionenströme im pico-Ampere-Bereich registrieren (Numberger und Draguhn, 1996).

2.4.1. Die Membran-Konfigurationen

Bei der Patch-Clamp-Technik bedient man sich verschiedener Membran-Konfigurationen, die u.a. je nach Fragestellung oder experimentellen Bedingungen verwendet werden. So

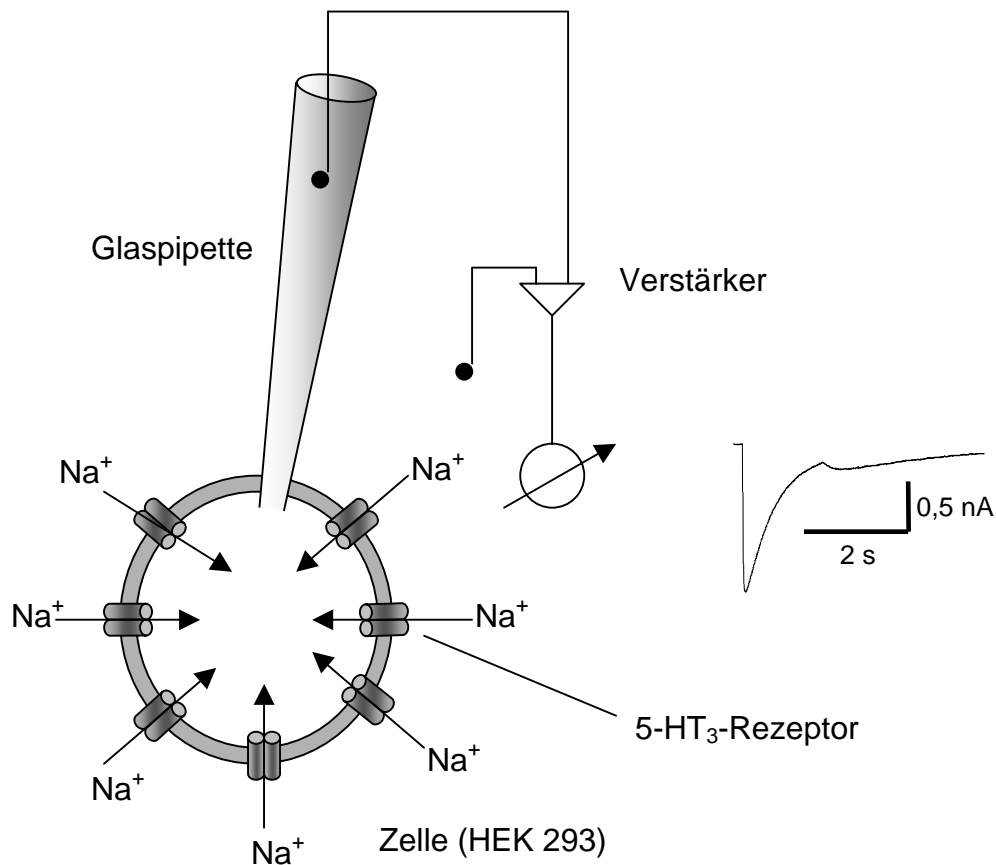


Abb. 2-9: Schematische Darstellung der Whole-cell Konfiguration. Bei der Whole-Cell-Konfiguration besteht eine Verbindung zwischen Intrazellulärraum und dem Pipetteninneren. Es wird eine Summation aus Einzelkanalströmen registriert (hier am Beispiel eines typischen 5-HT₃-Rezeptor-vermittelten Stroms) (Abb. modifiziert nach Numberger und Draguhn, 1996).

unterscheidet man die sog. Whole-Cell-, Outside-out-, Inside-out- und Cell-attached-Konfiguration.

In der Whole-Cell-Konfiguration (Abb. 2-9) hat die Messelektrode einen "elektrischen Zugang" zum Intrazellulärraum einer ganzen Zelle (daher "Whole-Cell"). Dadurch erfasst man die auf der gesamten Zell-Sphäre exprimierten Ionenkanäle und kann ihre Antworten als Summenströme aufzuzeichnen. In Abb. 2-9 ist als Beispiel ein Summenstrom aus Einzelkanalströmen von ca. einigen Tausend 5-HT_{3A}-Rezeptoren dargestellt. Dieser Strom besteht bei den gewählten experimentellen Bedingungen aus einem Na⁺-Ionenfluss. Der Strom hat negatives Vorzeichen, was nach den üblichen Konventionen einem Einwärtsstrom entspricht.

Wenn man die Antworten einzelner Kanäle erfassen und aufzeichnen möchte, muss man auf die Outside-out- oder Inside-out-Konfiguration zurückgreifen. Hierbei wird von einer am Boden der Kultur-Schale anhaftenden Zelle lediglich ein Membran-"Flicken" (Patch) förmlich

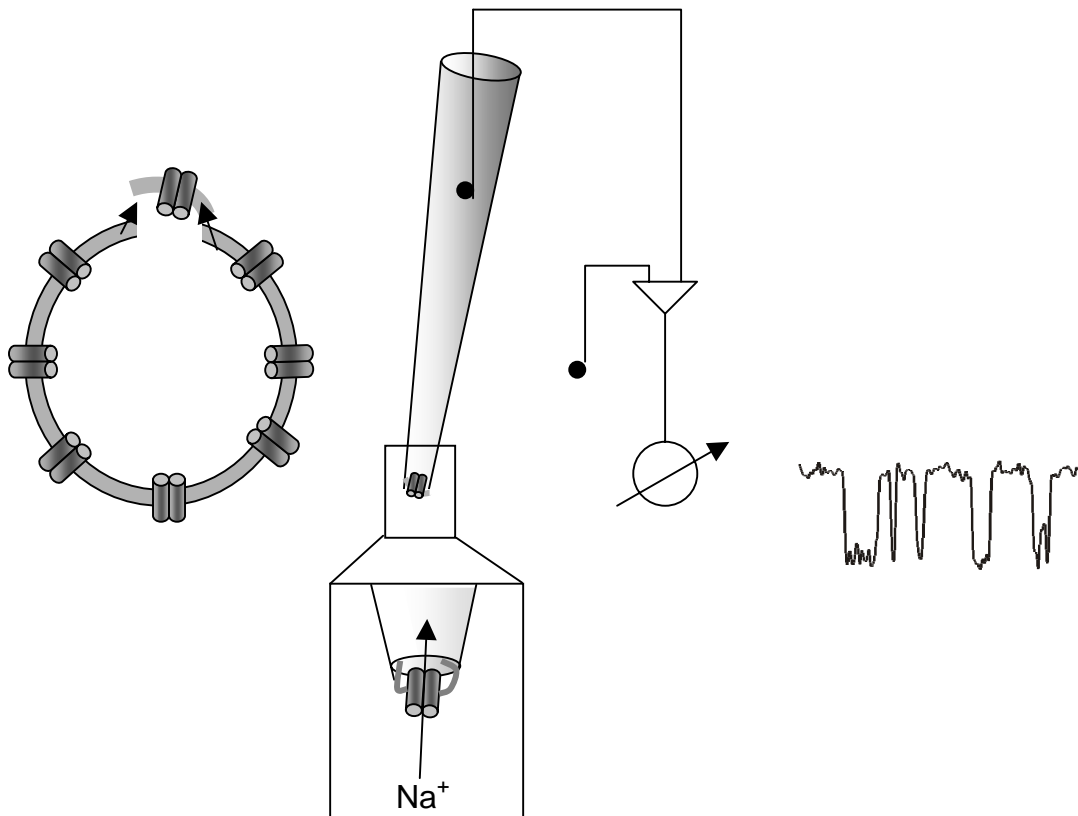


Abb. 2-10: Schematische Darstellung der Outside-out Konfiguration. Bei der Outside-out-Konfiguration weist die intrazelluläre Seite eines Membran-„Flickens“ (= engl. patch) zum Pipetteninneren und die extrazelluläre Seite zur Badlösung. Im Idealfall kann man dadurch die Stromantworten einzelner Kanäle registrieren. (Abb. modifiziert nach Numberger und Draghun, 1996)

herausgerissen. Bei diesem Vorgang bildet der Patch durch die Membranspannung eine Art Halbvesikel um die Pipettenspitze (vgl. Abb. 2-10).

Neben den beiden dargestellten Patch-Clamp-Konfigurationen gibt es noch weitere, selten verwendete Konfigurationen (Cell-attached, Inside-out, etc.), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Für die vorliegende Fragestellung wurde die Whole-Cell-Konfiguration als geeignete Technik gewählt.

2.4.2. Verfahren der Transmitter-Applikation

Die an der Pipettenspitze befindliche Zellmembran bzw. Zelle stellt letztlich ein Modell für die postsynaptische Membran bzw. für das postsynaptische Neuron dar. Die umgebende Badlösung ist hierbei mit dem Milieu des synaptischen Spaltes zu vergleichen. Die besondere Schwierigkeit besteht nun darin, auch für die Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt

ein geeignetes Modell zu schaffen. Im synaptischen Spalt der GABAergen Synapse z. B. wird sehr schnell (< 1 ms) ein GABA-Gradient erzeugt (Maconochie et al., 1994; Jones und Westbrook, 1995), der dann aufgrund Diffusion und Wiederaufnahme in die Präsynapse innerhalb von Millisekunden wieder abfällt (Clements, 1996). Um im Rahmen von Patch-Clamp-Untersuchungen ligandengesteuerter Ionenkanäle eine derart schnelle Transmitterfreisetzung mit Bildung kurzer Transmittergradienten nachzuahmen, wurden verschiedene Perfusions- bzw. Applikationsverfahren entwickelt.

Die ursprünglichen langsameren Verfahren, die die Transmitterlösung schwerkraftgetrieben über Schlauchsysteme applizieren, sind zur Erfassung der schnellen Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik ligandengesteuerter Ionenkanäle wenig geeignet (Numberger und Draguhn, 1996).

Schnellere Applikationssysteme, wie z. B. das „U-Tube“-Verfahren (siehe Abb. 2-11)

erlauben hingegen einen vollständigen Lösungswechsel in der Umgebung der Zelle binnen etwa 100 ms (Numberger und Draguhn, 1996).

Die sehr schnelle Aktivierung ionotroper Kanäle innerhalb weniger Millisekunden kann man dadurch jedoch nicht beurteilen, es kommt letztlich zu einer Limitierung der zeitlichen Auflösung durch die Transmitteranflutung. Da im weiteren die Entfernung des Transmitters passiv durch Abdiffusion erfolgt, ist die Inaktivierung der transmitterinduzierten Ionenströme weniger Ausdruck der

spezifischen Inaktivierungskinetik der Ionenkanäle, sondern vielmehr der Abflutungs- geschwindigkeit des Transmitters unterworfen. Gerade die Inaktivierungskinetik von Ionenkanälen ist aber ganz entscheidend für den Zeitverlauf synaptischer Antworten. Daher benötigt man zu deren Beurteilung ein System, das sowohl eine sehr schnelle Applikation als auch Desapplikation des Transmitters erlaubt. Dafür wurde das in dieser Arbeit verwendete piezogetriebene Applikationssystem entwickelt (Franke et al., 1987), das weiter unten näher beschrieben ist.

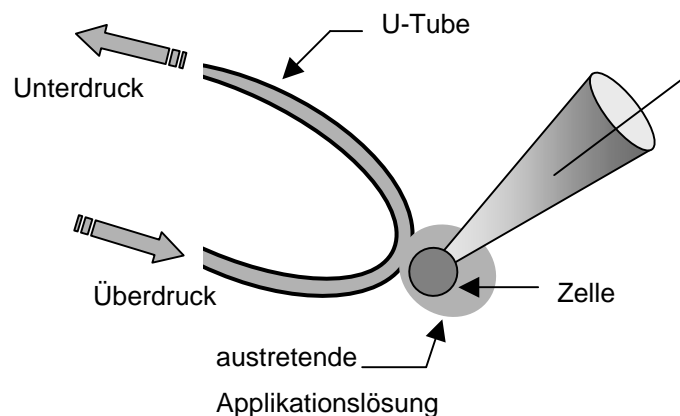


Abb. 2-11: Bei der „U-Tube“ strömt die Perfusionslösung druckgetrieben in einen Schenkel eines U-förmigen Glasröhrchens. An den anderen Schenkel wird ein Unterdruck angelegt, der durch einen Ventilmechanismus abgeschaltet werden kann. Zwischen beiden Schenkeln befindet sich ein Loch in der Glasröhre, an das die Zelle herangebracht wird. Bei Abschaltung des Unterdrucks fließt die Perfusionslösung durch das Loch und umspült die Zelle.

Ein neueres Verfahren zur gezielten Transmitterapplikation an beliebigen, eng begrenzten neuronalen Strukturen innerhalb eines Schnittpräparates ist die photolytische Freisetzung von gekapselten (engl. *caged*) Transmittern. Dabei aktiviert man den mit einer Schutzgruppe biologisch inaktivierten Agonist durch einen UV-Blitz (McGray und Trentham, 1989). Die Desapplikation des Transmitters erfolgt aber durch passive Abdiffusion.

2.4.3. Heterologe Expressionssysteme

Heterologe Expressionssysteme sind kultivierbare Zellen, mit deren Hilfe man Ionenkanäle mit definierter Untereinheitenzusammensetzung exprimieren kann. Heterolog bedeutet, dass die Expression eines Proteins durch eine transfizierte Zelle erfolgt, die im nativen Zustand dieses Protein nicht exprimiert (Numberger and Draguhn, 1996). Neben *Xenopus laevis*-Oozyten, Mausfibroblasten und HeLa-Zellen eignet sich die sehr gebräuchliche Kulturzelllinie HEK 293 besonders gut als heterologes Expressionssystem (Numberger and Draguhn, 1996).

Bei der Anwendung eines heterologen Expressionssystem geht man wie folgt vor: Zunächst wird das zu untersuchende Protein kloniert, d. h. die zugehörige mRNA wird detektiert und in cDNA umgeschrieben. Diese wird dann in Plasmide, die als Transfektionsvektoren dienen, eingebaut. Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle (Löffler 1997). Dabei unterscheidet man zwischen transienter und stabiler Transfektion. Bei der transienten Transfektion werden die Proteine bis zum zellulären Abbau der Plasmide nur vorübergehend, d. h. einige Tage exprimiert. Stabile Transfektion kann z. B. durch einen Selektionsdruck erreicht werden (Numberger and Draguhn, 1996).

Eine Barriere für die Transfektion stellt die Zellmembran dar. Bei der Transfektion muss die DNA die Zellmembran überwinden, um in den Zellkern zu diffundieren. Dazu wurden unterschiedliche Methoden entwickelt: Bei der Calcium-Phosphat-Technik wird die DNA komplexiert und damit die elektrochemische Barriere zwischen negativem Zellinneren und der negativ geladenen DNA aufgehoben (Petrides, 1997a). Die Fremd-DNA kann auch mit Hilfe von Liposomen oder durch Mikroinjektion in die Zelle geschleust werden (Petrides, 1997a). Eine weitere Möglichkeit die Zellmembran zu überwinden ist die Verwendung der sog. „Genkanone“. Hierbei werden die Zellen mit DNA-beladenen Goldpartikeln „beschossen“ (Yang NS, 1990). Bei der Elektroporation, wie wir sie für unsere Versuche verwendet haben, wird die Zellmembran in einem elektrischen Feld vorübergehend für die

Plasmide durchlässig (Numberger and Draguhn, 1996). Sog. „Genfähren“ sind Viren mittels derer Fremd-DNA in das Genom von Zellen integriert werden kann (Löffler, 1997; Petrides, 1997a).

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK 293-Zellen, die in nativer Form keine 5-HT₃-Rezeptoren exprimieren, mittels Elektroporation transient transfiziert.

3. Fragestellung

Absinth war vor allem im 19. Jahrhundert wegen seiner psychotropen Wirkungen, insbesondere in Künstlerkreisen, bekannt und berüchtigt. Man versprach sich vom Genuss dieses Likörs Halluzinationen, Bewusstseinsweiterung und euphorische Zustände. Bereits damals kannte man ein durch chronischen Absinth-Missbrauch bedingtes Krankheitsbild, den „Absinthismus“. Absinthismus ist einigen Beschreibungen nach durch unspezifische neurologische Störungen, welche auch bei einer Alkohol-Entzugssymptomatik auftreten können, aber auch durch psychiatrische Störungen gekennzeichnet.

Heutzutage geht man davon aus, dass α -Thujon der entscheidende psychotrope Wirkstoff im Absinth ist. Der α -Thujon-Gehalt des nun wieder in der Gastronomie erhältlichen Absinth ist deshalb per Verordnung limitiert. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass man sich in der klinischen Psychiatrie künftig wieder mit „Absinthismus“ auseinandersetzen muss.

Die vorliegende Arbeit stellt den ersten experimentellen Zugang zur psychotropen Wirkkomponente des α -Thujon dar. Der 5-HT₃-Rezeptor könnte hierbei ein möglicher Wirkort sein. Dieser Liganden-gesteuerte Ionenkanal spielt als Teil des zentralen serotonergen Systems mutmaßlich bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von psychiatrischen Erkrankungen, aber auch bei der Wirkung einiger psychotroper Substanzen und Psychopharmaka eine Rolle. Deshalb soll die Wirkung von α -Thujon auf die Funktion des 5-HT₃-Rezeptors untersucht werden.

Als Modell für serotonerge Synapsen dienen HEK 293-Zellen, die klonierte humane 5-HT₃-Rezeptoren heterolog exprimieren. Mittels Patch-Clamp-Technik in Ganzzelleableitung (Whole-Cell-Konfiguration) leiten wir Agonist-induzierte Stromantworten der Rezeptoren ab. Diese Stromantworten werden als Strom-Zeit-Diagramme aufgezeichnet und anschließend analysiert. Dabei soll festgestellt werden, inwieweit α -Thujon die Stromantworten und damit die Rezeptorfunktion beeinflusst. Daraus sollen Rückschlüsse auf die Art der Interaktion zwischen α -Thujon und dem 5-HT₃-Rezeptor gezogen werden. Diese mögliche Interaktion soll zusätzlich anhand eines kinetischen Modells beschrieben werden. Darüber hinaus soll der als Homomer exprimierte 5-HT_{3A}-Rezeptor, der bislang ein gängiges *in vitro*-Modell für den 5-HT₃-Rezeptor darstellte, mit dem möglicherweise physiologisch relevanteren heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptor bezüglich der α -Thujon-Wirkung verglichen werden.

Die gewonnenen Ergebnisse könnten helfen, die synaptischen Mechanismen dieses Wirkstoffs innerhalb des serotoninergeren System besser zu verstehen und somit die psychotrope Wirkung des Absinth ein Stück weit näher zu beleuchten.

4. Methodik

4.1. Zellkultur

Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) wurden in einem Minimal-Essential-Medium (MEM) kultiviert, das mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), 4 mmol/l L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin supplementiert ist (Rezeptur für MEM und FKS: siehe Anhang). Die Zellkulturen werden in Petrischalen (100 x 20 mm) in 5% CO₂, 95% Luft, bei 37° C und 100% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubationsschrank (Haeraeus) inkubiert. Dreimal wöchentlich werden nach Entfernung des alten Mediums die adhären Zellen je einer Petrischale mit 3 ml PBS-Puffer (Rezeptur: siehe Anhang) gewaschen, mit 2 ml Trypsinlösung vom Schälchenboden lösgelöst und anschließend zusammen mit 3 ml MEM resuspendiert. Die Zellsuspension wird abzentrifugiert (1200 U/min, 4 min, bei 4° C) und der Überstand vollständig entfernt. Die Zellen werden schließlich in 10 ml MEM pro Schälchen unter Halbierung der Zellkonzentration neu ausgesät.

4.2. Rezeptorexpression

Die Expression der 5-HT_{3A}- bzw. 5-HT_{3AB}-Rezeptoren wurde durch Transfektion erreicht. Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation 12-18 Stunden vor den Patch-Clamp-Experimenten. Hierbei wurde die transiente Rezeptorexpression (für ca. 20-40 h) durch HEK 293-Zellen genutzt. Als Transfektionsvektor diente das Plasmid pCDM8 mit cDNA für die humane 5-HT_{3A}- bzw. 5-HT_{3B}-Untereinheit (GenBank-Nummern: siehe Anhang). Eine weitere cDNA für GFP (grün fluoreszierendes Protein) wurde als Expressionsmarker cotransfiziert. Zellen, die GFP exprimieren, was man unter Anregung mit 460 nm an der Grünfluoreszenz sieht, exprimieren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auch einen funktionellen 5-HT₃-Rezeptor.

Zur Transfektion wurden die HEK 293-Zellen einer Petrischale (100 x 20 mm) nach Waschen mit PBS-Puffer durch Trypsin abgelöst, in Medium resuspendiert, abzentrifugiert (1000 U/min, 4 min) und schließlich in 1950 µl Elektroporationspuffer und 50 µl Magnesiumsulfatlösung (genaue Zusammensetzung beider Lösungen: siehe Anhang) wieder resuspendiert. 400 µl dieser Zellsuspension wurden mit je 3 µg der Plasmide für die Rezeptorunter-

einheiten und 6 μg GFP-Plasmid versetzt. Dann erfolgte die Elektroporation bei 350 V und 1 mF (abhängig vom Transfektionserfolg der vorangegangenen Elektroporation). Je 80-120 μl der elektroporierten Zellsuspension wurden in Petrischalen (35 x 10 mm) gegeben und bis zur Durchführung der Experimente bei 5% CO_2 , 95% Luft, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 37° C inkubiert.

Nach der Inkubationsperiode exprimierten 5-30% der transfizierten Zellen das im Zytoplasma gelöste GFP. An über 50% der grün fluoreszierenden Zellen induzierte 5-HT Stromantworten. Eine Lösung ohne Agonist induzierte jedoch keinerlei Antworten an den Zellen. An nicht transfizierten HEK 293-Zellen konnten ebenfalls keine Stromantworten ausgelöst werden.

Die Kinetik der 5-HT₃-Rezeptor-vermittelten Ströme von HEK 293-Zellen mit oder ohne ko-exprimiertem GFP unterschied sich nicht. Die Transfektion der Zellen nur mit der 5-HT_{3B}-Untereinheit brachte keine funktionellen Kanäle hervor.

4.3. Elektrophysiologie

Alle Patch-Clamp-Experimente wurden bei Raumtemperatur (20-23° C) durchgeführt. Gemessen wurden Agonist-induzierte Einwärtsströme in der Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzelleableitung). Zur Durchführung der Experimente mit den transfizierten HEK 293-Zellen wurde das MEM durch Extrazellulärlösung (Rezeptur: siehe Anhang) ersetzt.

4.3.1. Herstellung der Patch-Pipetten

Verwendet wurden Glaspipetten-Rohlinge aus Borosilikat (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 1,17 mm). Die Messelektroden wurden mit einem Elektrodenziehgerät im Zweizugverfahren hergestellt. Nach dem Vorziehen (die Pipette wird durch eine Glühwendel mittig angeschmolzen und dabei um ca. 1 cm ausgezogen) erfolgt in einem zweiten Schritt ein weiteres Auseinanderziehen, bis die Pipette an der dünnsten Stelle reißt. In einem dritten Schritt wurden die ausgezogenen Enden mit der Glühwendel hitzepoliert. Die zwei entstandenen Pipetten wurden mit Intrazellulärlösung (Rezeptur: siehe Anhang) gefüllt und hatten dann einen seriellen Widerstand von 4-9 M Ω .

4.3.2. Die Whole-Cell Konfiguration

Bei der Patch-Clamp-Technik gibt es unterschiedliche Messkonfigurationen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Whole-Cell-Konfiguration werden Stromantworten aller Ionenkanäle der gesamten Zellmembran erfasst. Um diese Konfiguration zu erreichen, wird zunächst die Pipettenspitze unter Mikroskopsicht an die Zellmembran einer am Schälchenboden adhärenen Zelle herangeführt. Beim Aufsetzen der Spitze auf die Zellmembran verringert sich der serielle Pipettenwiderstand. Dies sieht man daran, dass die Stromantwort auf einen über die Pipettenöffnung angelegten Spannungspuls kleiner wird. Über die Pipetten-Halterung kann man nun auf das Pipetteninnere eine Sog ausüben, wodurch die Zellmembran in die Pipettenöffnung ein Stück weit eingezogen wird. In diesem Moment hat man die sog. Cell-attached-Konfiguration erreicht. Der Stromfluss durch die Pipettenspitze, der durch die Kommandospannung erzeugt wird, sinkt im besten Fall fast auf null. Dies signalisiert einen hohen Abdichtwiderstand (= Seal) zwischen Pipette und Zellmembran. Durch einen zweiten – kürzeren und stärkeren Sog – wird die Zellmembran durchbrochen (man spricht hier von 'perforiert') und damit die Whole-Cell-Konfiguration hergestellt. Dies kann man anhand der sog. kapazitiven Artefakte (Lade- und Entladeströme der nun als Kondensator wirkenden Zellmembran) sehen. Dabei soll der hohe Abdichtwiderstand zwischen Pipettenspitze und Zellmembran erhalten bleiben. Liegt dieser Widerstand im $G\Omega$ -Bereich spricht man vom sog. Gigaseal.

Nun kann man mit Hilfe des Patch-Clamp-Verstärkers (Axopatch 200b) eine Clamp-Spannung anlegen. Diese liegt also über die Zellmembran hinweg an und bildet die treibende Kraft für den Ionenfluss. Wir legen ca. -40 mV an, um die Agonist-induzierten 5-HT₃-Rezeptor-Antworten, die bei der Ionen-Zusammensetzung der verwendeten Intra- und Extrazellulärlösung aus einem reinen Na⁺-Fluss bestehen, als Einwärtsstrom aufzuzeichnen. Die Ströme werden mittels Analog-Digital-Wandler (Digidata 1200 A/D Converter) bei einer Rate von 20 kHz digitalisiert und einer Tiefpassfilterung (2 kHz) unterzogen. Die dafür verwendete Software nennt sich pClamp 6.0 und ist, wie die dazugehörige Hardware, von Axon Instruments Inc. (Foster City, CA, USA).

4.3.3. Das piezogesteuerte Applikationssystem

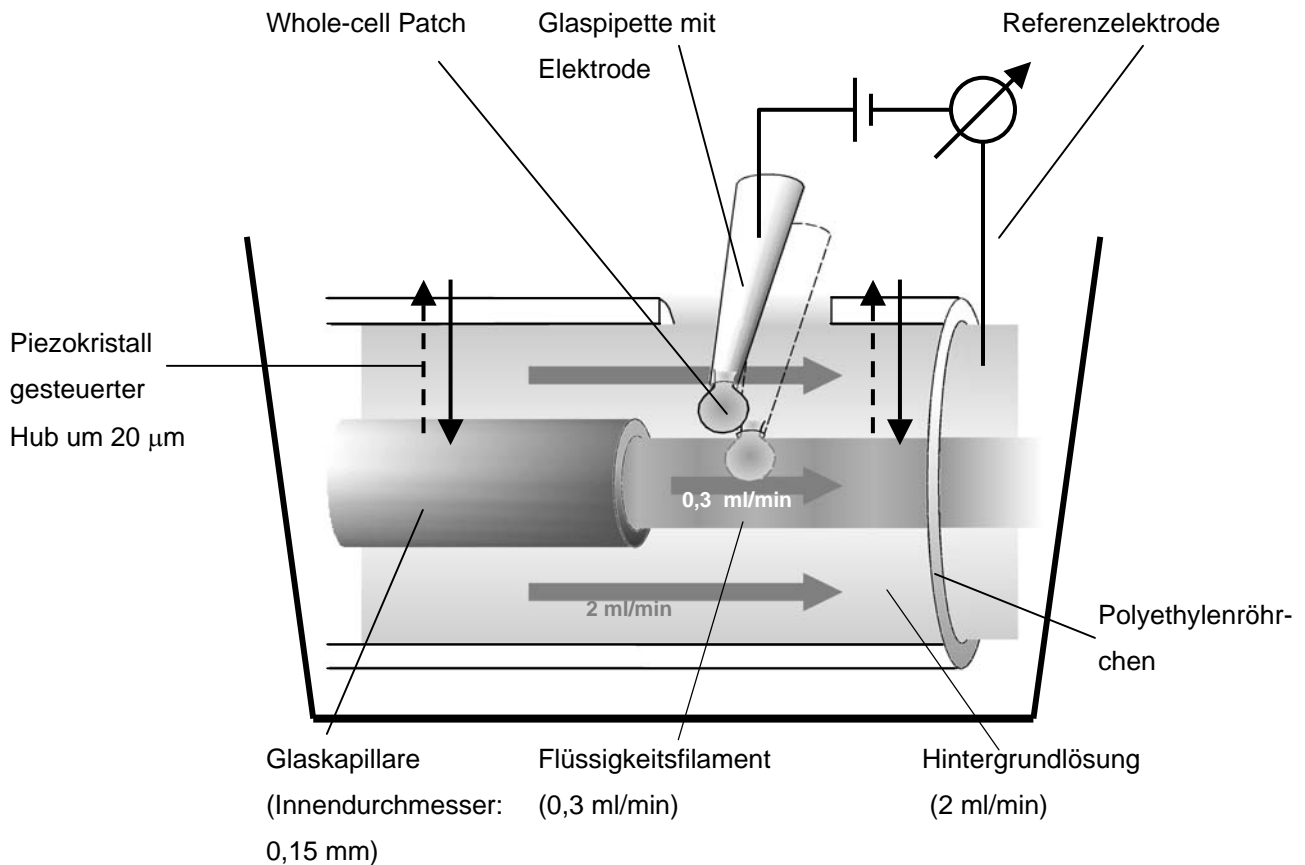


Abb. 4-1: Schemazeichnung des schnellen, piezobetriebenen Applikationssystems. Ein von der Aufzeichnungssoftware angesteuerter Piezokristall bewegt das Flüssigkeitsfilament mit der Agonisten-Lösung um 20 µm auf die Zelle zu und wieder von ihr weg. Damit werden Austauschzeiten der Flüssigkeit in der Umgebung der Zelle von < 1 ms erreicht.

Der 5-HT₃-Rezeptor besitzt als ligandengesteuerter Ionenkanal die Eigenschaft, nach Aktivierung durch den Agonisten innerhalb von 10-200 Millisekunden vom geschlossenen in den offenen Zustand überzugehen. Zur experimentellen Erfassung solch schneller Prozesse benötigt man ein Applikationssystem, das den Lösungswechsel in kürzerer Zeit vornimmt als die Zeitkonstante der schnellsten Zustandsänderung, die beschrieben werden soll (Numberger und Draguhn, 1996). Dem hier verwendeten schnellen Applikationssystem (Abb. 4-1), mit dem (bei Outside-out-Patches) Applikations- und Desapplikationszeiten von unter 100 µs erreicht werden (Franke, 1987), kommt daher eine besondere Bedeutung zu.

Bei dem verwendeten Applikationssystem ist ein Polyethylenröhrchen an einem Piezokristall befestigt (Abb. 4-1). Durch dieses Röhrchen fließt schwerkraftgetrieben die umgebende sog.

Hintergrundlösung. Innerhalb dieses Röhrchens fließt die Agonisten-Lösung aus einer dünnen Glaskapillare druckgetrieben in gleicher Richtung. Dabei bildet sich unter laminaren Strömungsverhältnissen das sog. Flüssigkeitsfilament mit scharfer Grenze zur Hintergrundlösung.

An diese Grenze (sichtbar gemacht durch Anfärbung der Agonisten-Lösung mit Lissamingrün) wird unter Binokularsicht die Zelle platziert. Bei Aktivierung des Piezokristalls bewegt sich das Flüssigkeitsfilament um 20 µm auf die Zelle zu und umhüllt diese (Applikation). Bei Inaktivierung des Piezokristalls senkt sich das Polyethylenröhrchen wieder nach unten und damit von der Zelle weg (Desapplikation). Die Dauer der Piezo-Aktivierung bestimmt demnach die Dauer der Agonisten-Applikation, wir wählen im Allgemeinen 1,5 Sekunden. Die Abb. 4-2 stellt den hier beschriebenen Ablauf nochmals schematisch dar.

Zwischen den Einzelpulsen wurden Pausen von 45 s Dauer eingehalten, um eine vollständige Resensitisierung der 5-HT₃-Rezeptoren zu gewährleisten. Mindestens zwei stabile einzelne Stromantworten wurden jeweils gemittelt.

Die Glaskapillare ist mit einem Reservoir verbunden, welches aus zwei voneinander getrennten, dicht abgeschlossenen Tanks besteht. Ein Tank enthält die Kontrolllösung, d.h.

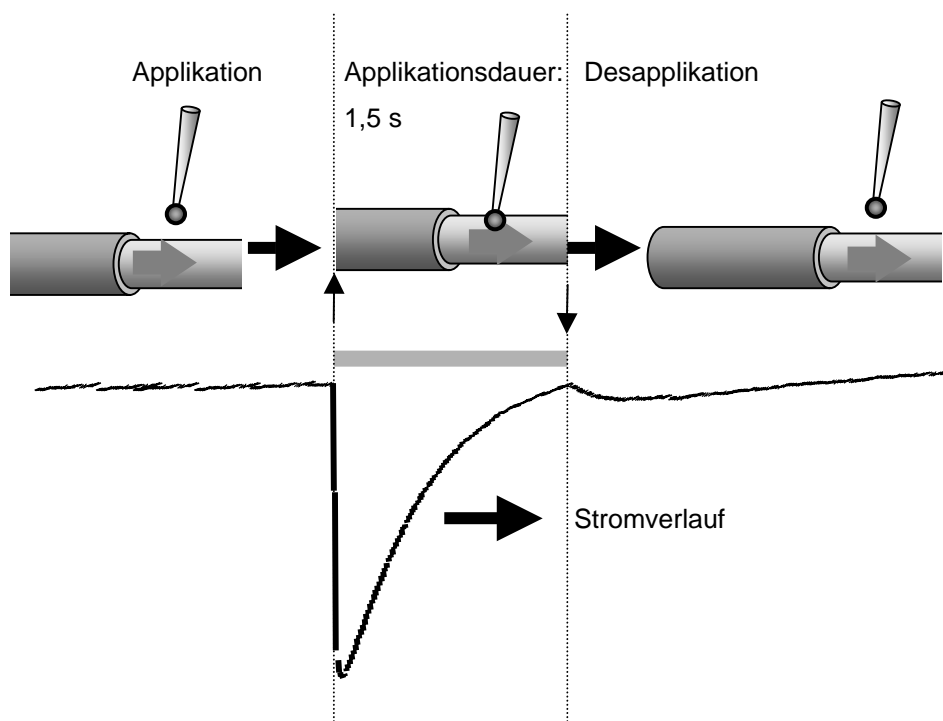


Abb. 4-2: Schematische Darstellung von Applikation und Desapplikation von 5-HT mit resultierender Stromantwort (5-HT_{3A}-Rezeptor)

den Transmitter alleine, der andere zusätzlich die zu untersuchende Substanz (z.B. α-Thujon).

Durch manuelle Umschaltung speist wahlweise einer der beiden Tanks das Flüssigkeitsfilament. Bei einigen der Experimente befindet sich die zu untersuchende Substanz zusätzlich in der Hintergrundlösung. Hierdurch können die Rezeptoren beliebig lange mit der jeweiligen Substanz interagieren.

4.3.4. Verwendete Lösungen

4.3.4.1. Intrazellulärlösung

Die Intrazellulärlösung (genaue Zusammensetzung: siehe Anhang) ist der physiologischen Intrazellulärflüssigkeit nachempfunden. Sie wird in die Messpipette, die in der Whole-Cell-Konfiguration Anschluss an den Intrazellulärraum hat, eingefüllt.

4.3.4.2. Extrazellulärlösung

Die sog. Extrazellulärlösung ist in Ionen-Zusammensetzung, pH und Osmolarität dem physiologischen Extrazellulärmilieu angeglichen (genaue Zusammensetzung: siehe Anhang). Sie bildet das Umgebungsmilieu der Zellen in den Experimenten.

4.3.4.3. Serotonin

Zur Herstellung der 5-HT-Lösung wurde zunächst eine 5-HT-Stammlösung (10^{-1} mol/l in aqua dest.) angesetzt und eingefroren. In einer Verdünnungsreihe mit Extrazellulärlösung wurde die jeweils gewünschte 5-HT Konzentration hergestellt.

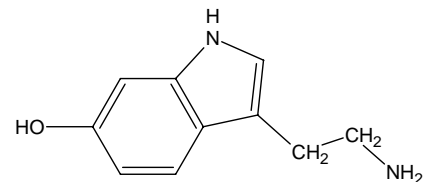


Abb. 4-3: Strukturformel von Serotonin (MG: 213 g/mol)

4.3.4.4. Methylcyclophenylbiguanid (mCPBG)

Die angegebenen Konzentrationen des selektiven 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten mCPBG (TOCRIS, Bristol, UK) wurden analog zum Vorgehen mit 5-HT hergestellt.

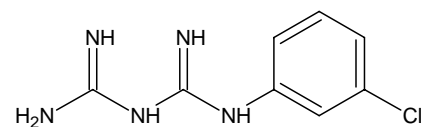


Abb. 4-4: Strukturformel von mCPBG (MG: 248 g/mol)

4.3.4.5. α -Thujon

α -Thujon (C₁₉H₁₆O, MG 152) ist bei Raumtemperatur flüssig, hat eine ölige Konsistenz und riecht intensiv nach Tannenöl. Eine α -Thujon-Stammlösung (10^{-1} mol/l) wurde als Emulsion

in DMSO (Dimethylsulfoxid, C_2H_6OS) angesetzt. Die Verdünnung erfolgte in Extrazellulärlösung. In vorhergehenden Experimenten konnte eine Wirkung von DMSO (in den verwendeten Verdünnungen) auf die 5-HT₃-Rezeptor-Ströme ausgeschlossen werden (Daten hier nicht gezeigt).

4.3.4.6. 5-Hydroxyindol

5-OHi (C_8H_7NO , MG 133, Fa. Sigma) ist der aromatischen Rest von 5-HT, ist aber kein 5-HT₃-Rezeptor-Agonist. Eine 5-OHi-Stammlösung (10^{-1} mol/l in DMSO) wurde bei $-20^\circ C$ aufbewahrt, vor jedem Versuchstag aufgetaut und mit Extrazellulärlösung in einer Verdünnungsreihe verdünnt.

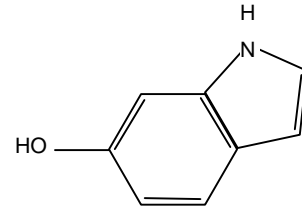


Abb.4-5: Strukturformel von 5-OHi (MG: 133 g/mol)

4.3.5. Messgrößen und Daten-Auswertung

4.3.5.1. Stromaufzeichnung

Die Aufzeichnung der 5-HT-induzierten Ströme erfolgte durch einen Rechner-gesteuerten Patch-Clamp-Verstärker (Axopatch 200B) mittels pClamp 6.0 Software. Die Digitalisierungsrate betrug 10 kHz (Digidata 1200 A/D Converter). Die Tiefpass-Eckfrequenz betrug 2 kHz. Die Ströme wurden auf einer Festplatte gespeichert und anschließend mit AxoGraph 3 Software ausgewertet. Die Messgrößen (s. u.) wurden mit Hilfe von Detektionsalgorithmen computergestützt ermittelt.

4.3.5.2. Messgrößen

Die gemessenen Stromantworten werden als Strom-Zeit-Diagramme aufgezeichnet, die verschiedene Informationen beinhalten. Bei deren Analyse können verschiedene Parameter bestimmt werden

4.3.5.2.1 Stromamplitude (Peak)

Messung in der Einheit der Stromgröße (meist pA), in Abb. 5-2 A Darstellung als Relativwert innerhalb einer Messreihe, normalisiert auf die Stromamplitude der Kontrollmessung.

4.3.5.2.2 Zeitkonstante der Desensibilisierung

Die Desensibilisierung von Rezeptor-Kanälen ist typischerweise ein exponentieller Stromabfall in Gegenwart des Agonisten. Somit kann man diese Desensibilisierung mittels exponentiellen Fittings (AxoGraph© Software, vgl. Anhang) nach folgender Formel mathematisch beschreiben:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau_0) + I_s$$

I_0 ist die Komponente des Stromabfalls, τ_0 die Zeitkonstante und I_s der Steady-State-Strom. Monoexponentielles Fitting lässt sich jedoch nicht auf alle Stromverläufe anwenden. Die Desensibilisierungsphase des 5-HT_{3A}-Rezeptors, die typischerweise aus einer langsamen und einer schnellen Komponente besteht, wurde deshalb mit einer biexponentiellen Funktion angepasst:

$$I(t) = I_{\text{schnell}} \exp(-t/\tau_{\text{schnell}}) + I_{\text{langsam}} \exp(-t/\tau_{\text{langsam}}) + I_s$$

I_{schnell} und I_{langsam} sind die Fraktionen der schnellen und langsamen Komponente des Stromabfalls. τ_{schnell} und τ_{langsam} sind die schnelle und die langsame Zeitkonstante.

4.3.5.3. Statistische Auswertung

Gemittelte Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

4.4. Computersimulation der 5-HT₃-Rezeptor-Kinetik

Für die Simulation der Rezeptor-vermittelten Ströme wurde eine spezielle Software „Bioq – Modeling Biochemical Reactions“, Version 2.0 (Parnas & Parnas Neurobiology Lab, Hebrew University, Jerusalem, Israel) verwendet. Dieses Programm beruht auf der Berechnung von Differentialgleichungssystemen. Der Anwender kann hierbei ein kinetisches Reaktionsschema für den Ionenkanal aufstellen und Ratenkonstanten für die einzelnen Hin- bzw. Rückreaktionen einsetzen. Die Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Zustände (offen, geschlossen) im Zeitverlauf werden von der Software berechnet und dargestellt. Der Verlauf

der Offenzustände ist demnach als simulierter Ionenstrom zu verstehen. Zeigt sich unter Verwendung eines stimmigen Reaktionsschemas in Verbindung mit passenden Raten eine gute Übereinstimmung des simulierten mit dem gemessenen Ionenstrom, kann das entworfene Reaktionsschema als kinetisches Modell für den untersuchten Ionenkanal angesehen werden.

5. Ergebnisse

Durch HEK 293-Zellen exprimierte homomere 5-HT_{3A}- und heteromere 5-HT_{3AB}-Rezeptoren sind gleich permeabel für Na⁺- und K⁺-Ionen, während die 5-HT_{3A}-Rezeptoren hingegen eine höhere Ca²⁺-Leitfähigkeit besitzen als die 5-HT_{3AB}-Rezeptoren (Davies et al., 1999). In der vorliegenden Studie haben wir die Patch-Clamp-Messungen in Ca²⁺- und Mg²⁺-freier Extrazellulärlösung durchgeführt. Dadurch wurden einerseits die Unterschiede in der Ca²⁺-Permeabilität zwischen homomeren und heteromeren 5-HT₃-Rezeptoren und andererseits die Verstärkung der Rezeptor-Desensitisierung durch extrazelluläres Ca²⁺ und Mg²⁺ (Brown et al., 1998; Maricq et al., 1991; Mochizuki et al., 1999; Yakel, 1992; Lobitz et al., 2001) eliminiert. Diese experimentellen Bedingungen wurden deshalb bereits in unserer vorhergehenden Studie (Hapfelmeier et al., 2003) sowie in anderen Studien mit heterolog exprimierten 5HT₃-Rezeptoren verwendet (Lankiewicz et al., 1998; Lobitz et al., 2001).

Hapfelmeier et al. (2003) untersuchten den Mechanismus der Desensitisierung von auf HEK 293-Zellen exprimierten 5-HT₃-Rezeptoren. Unter Zuhilfenahme von kinetischer Modellierung konnten sie zeigen, dass der endogene Agonist 5-HT bei homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptoren die Desensitisierung über einen Kanal-Block verursacht (Abb. 2-7). Wenn jedoch die 5-HT_{3B}-Rezeptor-Untereinheit co-exprimiert wird, desensitisieren die resultierenden Heteromere (5-HT_{3AB}-Rezeptoren) nach der 5-HT-Aktivierung unabhängig von einer Kanalblockade (Abb. 2-8).

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns nun schwerpunktmäßig mit dem Effekt von α -Thujon auf diese Desensitierungs-Mechanismen beschäftigt. Dazu führten wir ähnliche Patch-Clamp-Experimente (Whole-Cell-Konfiguration, Rezeptor-Expression auf HEK 293-Zellen) mit homomeren (5-HT_{3A}-) und heteromeren (5-HT_{3AB}-) Rezeptoren durch.

5.1. α -Thujon verstärkt die Desensitisierung von 5-HT_{3A}-Rezeptoren

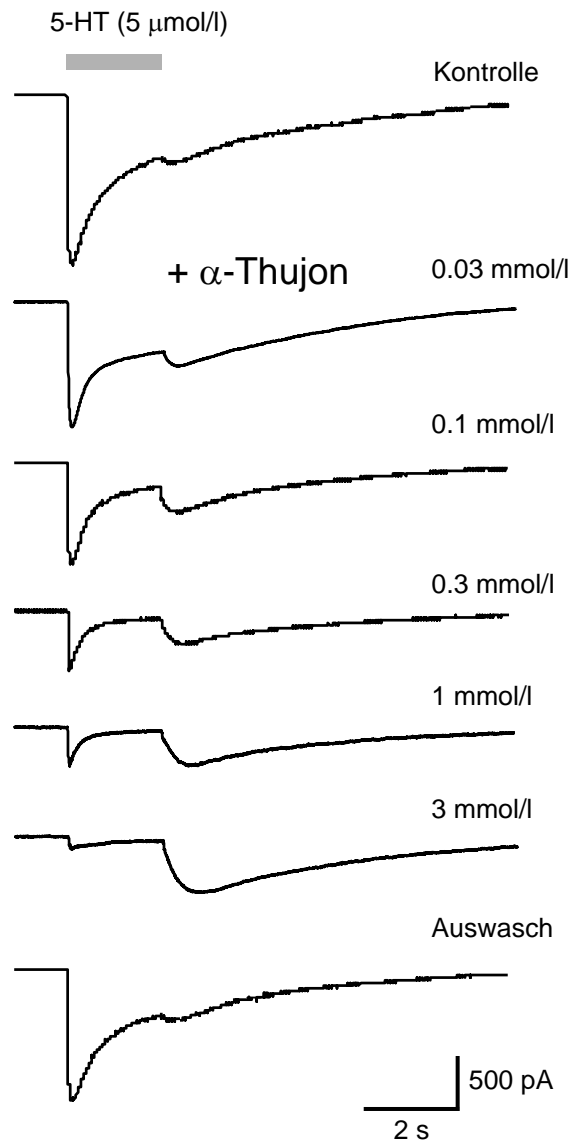


Abb. 5-1: Stromantworten des 5-HT_{3A}-Rezeptors auf 5-HT in Gegenwart steigender α -Thujon-Konzentrationen. Der Effekt von α -Thujon war auswaschbar.

Die Abb. 5-1 (oben) zeigt die Antwort einer Zelle mit 5-HT_{3A}-Rezeptoren auf eine 1,5 s lange Applikation von 5-HT (5 μ mol/l). Nachdem der induzierte Einwärtsstrom einen Peak erreicht, geht er - aufgrund der Rezeptor-Desensitisierung - in Gegenwart des Agonisten wieder

zurück. Die rasche Entfernung von 5-HT, also das Ende des 5-HT-Stimulus, induziert einen kurzzeitigen Wiederanstieg des Stromes, den sog. Tailcurrent. Basierend auf dieser Beobachtung hat unsere Arbeitsgruppe ein kinetisches Modell entwickelt, das die Desensibilisierung des homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptors durch einen Agonist-induzierten Off-Kanal-Block erklärt (Abb. 2-7). Das Zusammenspiel eines *high affinity*- und eines *low affinity*-Blocks erklärt dabei den typischen biphasischen Zeitverlauf der Desensibilisierung (Hapfelmeier et al., 2003).

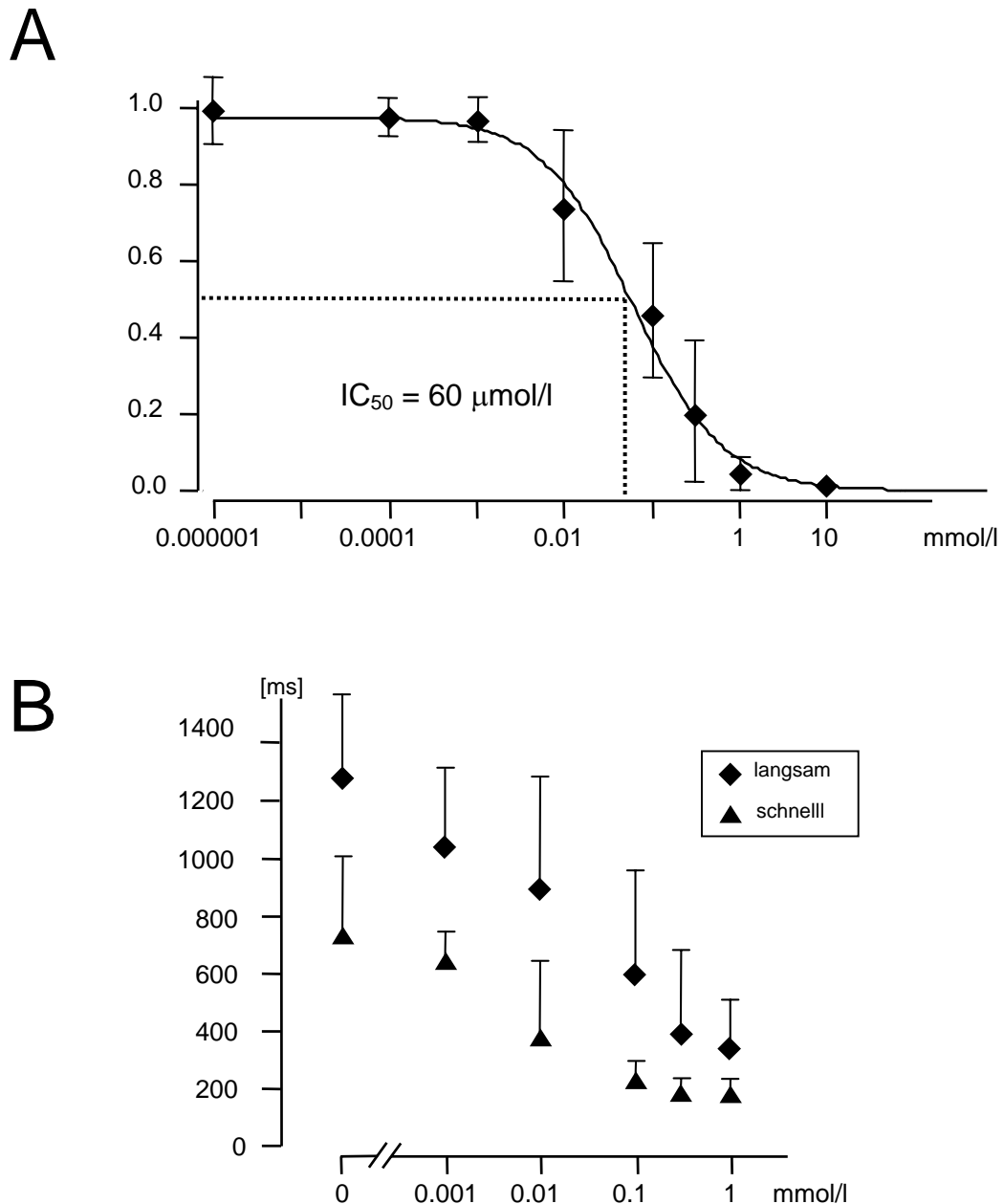


Abb. 5-2: Dosiswirkungs-Beziehung für α -Thujon. **A** Strom-Amplitude (y-Achse, Darstellung als Relativwert normalisiert auf die Stromamplitude der Kontrollmessung). **B** Langsame und schnelle Desensibilierungs-Zeitkonstanten [ms] (y-Achse). x-Achsen: α -Thujon-Konzentration in [mmol/l].

In Gegenwart von α -Thujon verringerte sich die Stromantwort auf den 5-HT-Stimulus und die Desensibilisierung wurde beschleunigt. Dieser inhibitorische Effekt war konzentrationsabhängig (Abb. 5-2). Demgegenüber nahm die Amplitude der Tailcurrents, die die Umkehrung eines Kanal-Blocks anzeigen, mit steigender α -Thujon-Konzentration zu (Abb. 5-1). Diese Befunde weisen auf eine Kanal-Blockade durch α -Thujon hin. Um diesen möglichen Mechanismus genauer zu untersuchen, haben wir eine hohe Konzentration von α -Thujon (1 mmol/l) in unterschiedlichen zeitlichen Abfolgen appliziert (Abb. 5-3): Im Modus

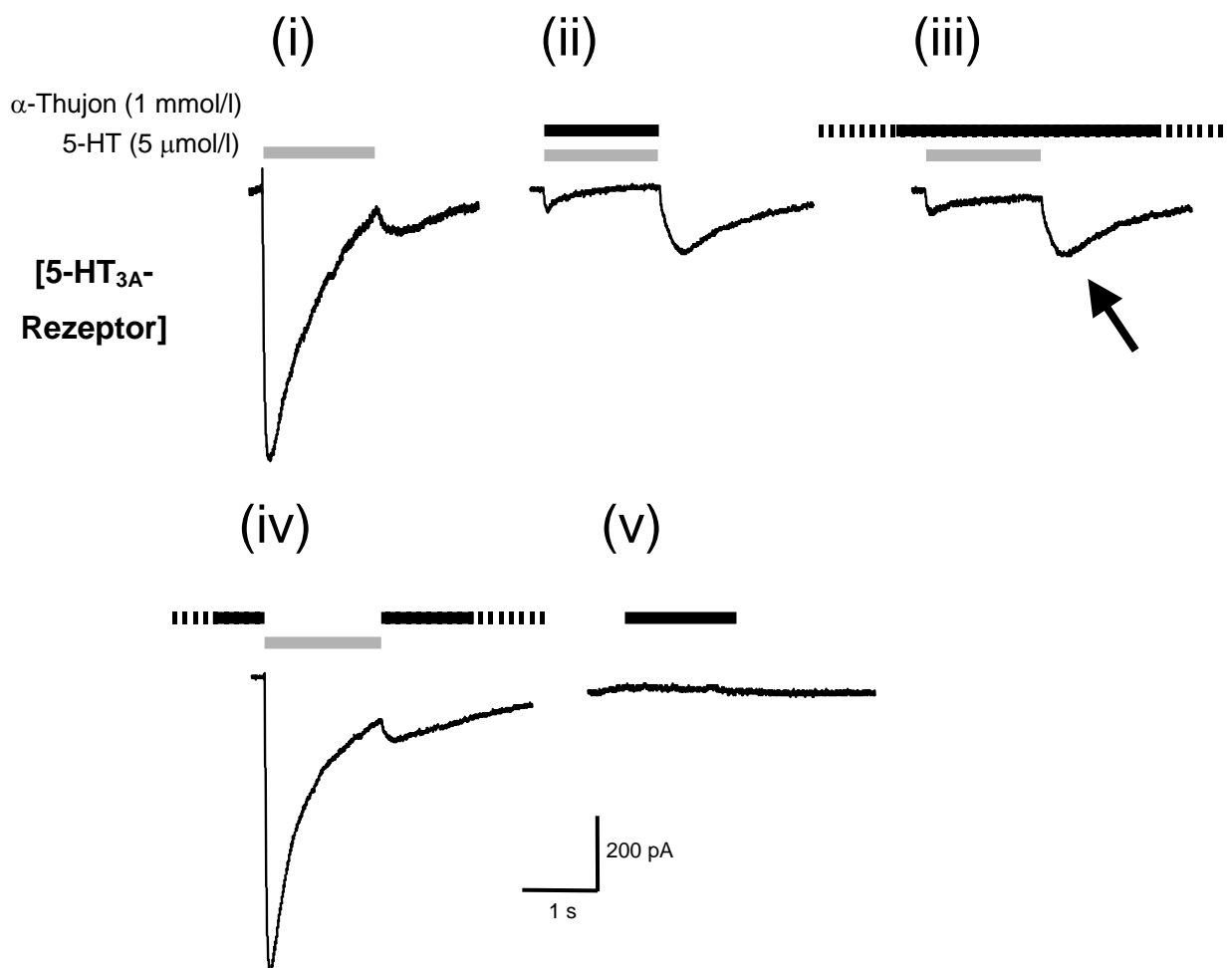


Abb. 5-3 Stromantworten des 5-HT_{3A} -Rezeptors auf 5-HT in Gegenwart von α -Thujon in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen (i-iv) und auf α -Thujon allein (v).

(i) stellt sich der Kontrollstrom, also die Stromantwort auf den 5-HT-Stimulus dar. Im Modus (ii) zeigt sich eine Strom-Antwort bei gleichzeitiger Applikation von 5-HT und α -Thujon. Modus (iii) zeigt den Effekt einer prolongierten α -Thujon-Applikation (3 Minuten vor,

während und nach dem 5-HT-Stimulus). Im Modus (iv) sieht man einen Strom unter α -Thujon-Applikation nur vor und nach dem 5-HT-Stimulus. Modus (v) beschreibt die Applikation nur von α -Thujon (ohne 5-HT) für 1,5 s.

Diese Versuchsreihe ergab, dass der α -Thujon-Effekt, den man im Applikationsmodus (ii) sieht, durch eine verlängerte Applikation im Modus (iii) nicht wesentlich verstärkt oder verändert wird. Insbesondere kommt es hier auch in Anwesenheit von α -Thujon zur Auslösung eines Tailcurrents (Pfeil in Abb. 5-3). Dies spricht gegen einen direkten Kanalblockierenden Effekt von α -Thujon. Ein Kanal-Blocker müsste nämlich in diesem Applikationsmodus (iii) den Tailcurrent unterdrücken, wie man es typischerweise sieht, wenn man $GABA_A$ -Rezeptor-Ströme mit dem $GABA_A$ -Kanal-Blocker Picrotoxin blockiert (Abb. 5-

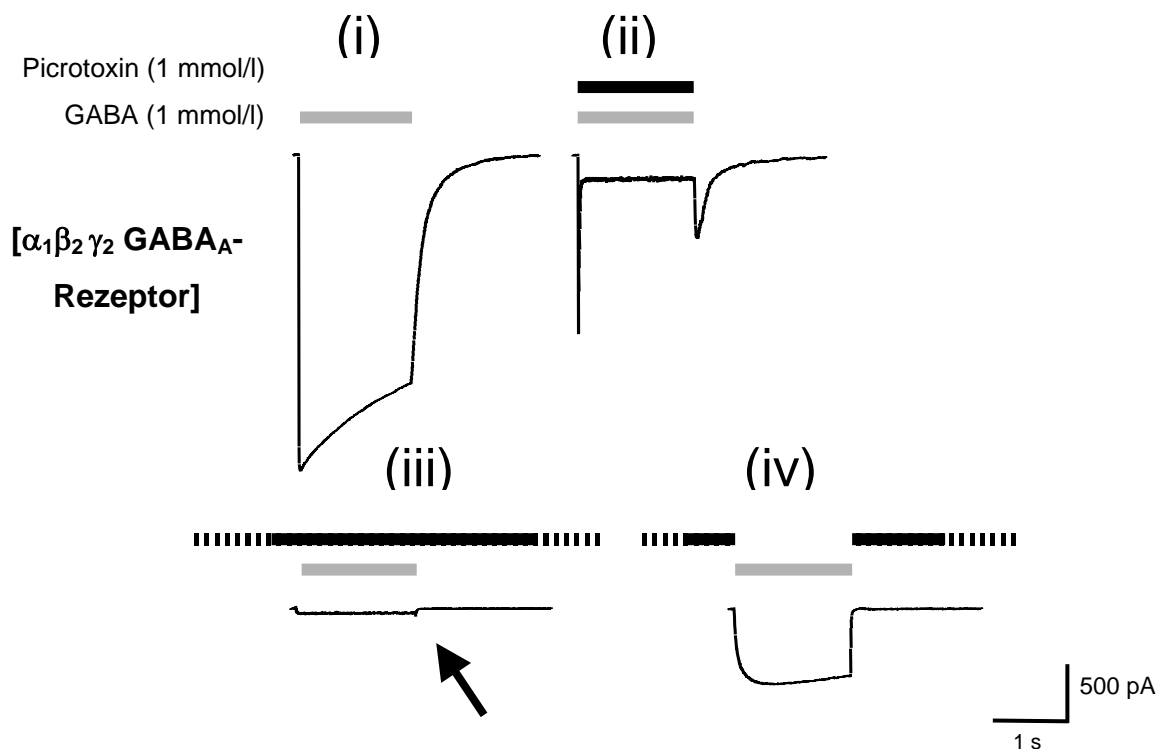


Abb. 5-4: Picrotoxin (1 mmol/l) und GABA (1 mmol/l) am $\alpha_1\beta_2\gamma_2 GABA_A$ -Rezeptor in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen zur Demonstration eines direkten Kanalblock-Mechanismus.

4, Pfeil)

Im Modus (iv) zeigt sich überhaupt kein wesentlicher Effekt durch eine α -Thujon-Applikation, die vor und nach, jedoch nicht während des 5-HT-Stimulus erfolgt. Auch hierin unterscheidet sich die Interaktion zwischen α -Thujon und dem 5-HT_{3A}-Rezeptor grundsätzlich von jener zwischen Picrotoxin und dem $GABA_A$ -Rezeptor (Abb. 5-4). Im Modus (v) sieht man, dass α -Thujon alleine keine Strom-Antworten auslösen kann.

Offensichtlich ist also α -Thujon kein direkter Kanalblocker am 5-HT_{3A}-Rezeptor, entfaltet aber dennoch in Gegenwart des Agonisten 5-HT einen inhibitorischen Effekt, der wie ein

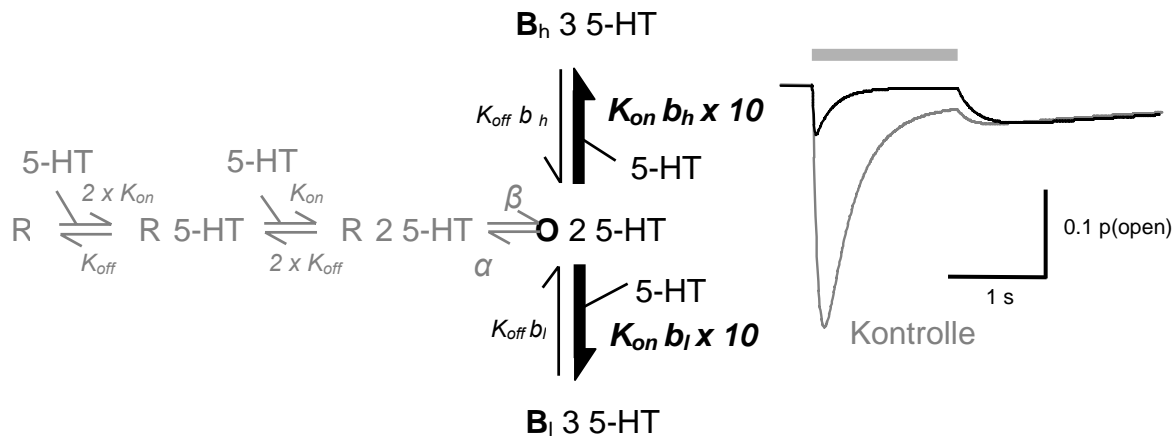


Abb. 5-5: Verändertes kinetisches Modell (links) und Simulation des unter dem Einfluss von α -Thujon beobachteten Stromverlaufes (rechts, schwarz) im Vergleich zum Kontrollstrom (rechts, grau).

"indirekter Kanalblock" erscheint. Diesen möglichen Mechanismus beschreiben wir anhand eines kinetischen Modells (Abb. 5-5): Demnach verstärkt α -Thujon den 5-HT-induzierten Offen-Kanal-Block am 5-HT_{3A}-Rezeptor. Diese "Block-Verstärkung" ist durch 10-fache Werte der Hinraten ($K_{on} b_h$ und $K_{on} b_l$) des 5-HT-vermittelten Blocks verdeutlicht. Der α -Thujon-Effekt lässt sich mit dem modifizierten Modell entsprechend simulieren (Abb. 5-5 rechts).

5.2. 5-Hydroxyindol verlangsamt die Desensibilisierung von 5-HT_{3A}-Rezeptoren

5-Hydroxyindol (5-OHi) ist der aromatische Rest von 5-HT, hat jedoch am 5-HT₃-Rezeptor keine direkte agonistische Wirkung. 5-OHi vergrößert aber 5-HT-induzierte 5-HT₃-Rezeptor-Antworten und verlangsamt gleichzeitig die Rezeptor-Desensibilisierung. Bei höheren 5-OHi-Konzentrationen ($> 10 \text{ mmol/l}$) überwiegt hingegen ein zusätzlicher Block-Effekt und es kommt, ähnlich wie bei α -Thujon, zu Tailcurrents, die bislang auf die Dissoziation von 5-OHi zurückgeführt wurden (Kooyman et al., 1994). Wir konnten jedoch zeigen (Abb. 5-6 A), dass diese Tailcurrents auch in Anwesenheit von 5-OHi (20 mmol/l) unverändert auftreten (vgl. Modus (ii) und (iii)!). Sie entstehen also offensichtlich nicht durch die Dissoziation von 5-OHi, sondern durch die Dissoziation von 5-HT. Dies widerspricht einem direkten Kanal-Block-Mechanismus, wie ihn Kooyman et al. (1994) für 5-OHi anführen. Insofern ähneln sich

auch interessanterweise 5-OHi und α -Thujon. Beide Substanzen vermitteln offenbar indirekt eine Kanal-Blockade der 5-HT_{3A}-Rezeptoren, indem sie den 5-HT-induzierten Block verstärken.

Mithilfe eines kinetischen Modells (Abb. 5-6 B) konnten wir simulieren, dass sowohl die Verlangsamung der Desensibilisierung als auch die (verstärkte) Auslösung von Tailcurrents durch eine durch 5-OHi veränderte Kinetik des 5-HT-induzierten Offen-Kanal-Blocks verursacht sein könnte. Im Gegensatz zum α -Thujon-Effekt bewirken diese Veränderungen

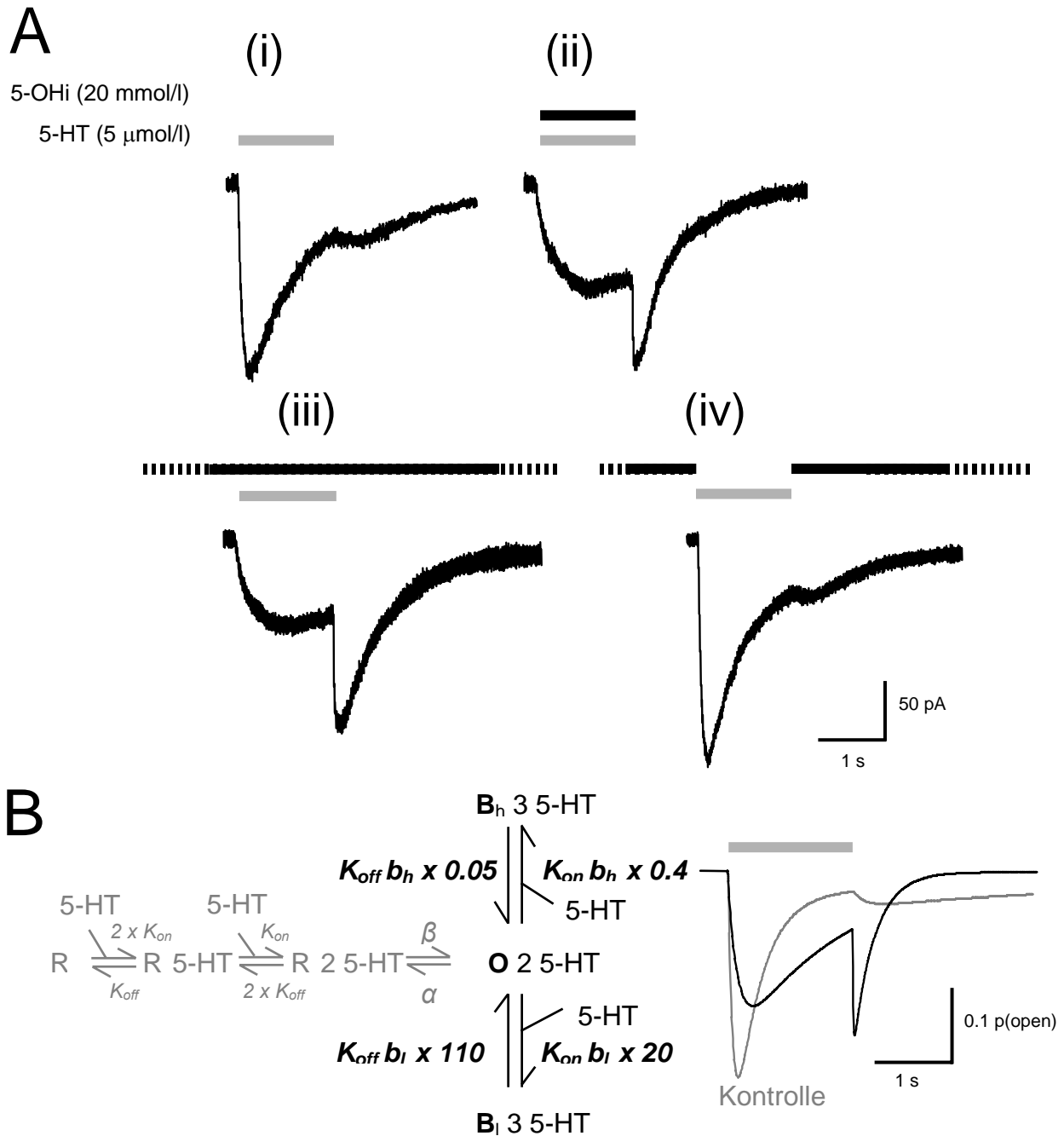


Abb. 5-6: **A**: Stromantworten des 5-HT_{3A}-Rezeptors auf 5-HT in Gegenwart von 5-OHi in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen; **B**: Verändertes kinetisches Modell (links) und Simulation des unter dem Einfluss von 5-OHi beobachteten Stromverlaufes (rechts, schwarz) im Vergleich zum Kontrollstrom (rechts, grau).

jedoch eine verlangsamte Desensitisierung der Kanäle. An dieser Stelle soll insbesondere hervorgehoben werden, dass 5-OHi und α -Thujon die Rezeptorkinetik nach einem ähnlichen Prinzip modulieren.

5.3. Der Effekt von α -Thujon auf die Desensitisierung von 5-HT_{3AB}-Rezeptoren

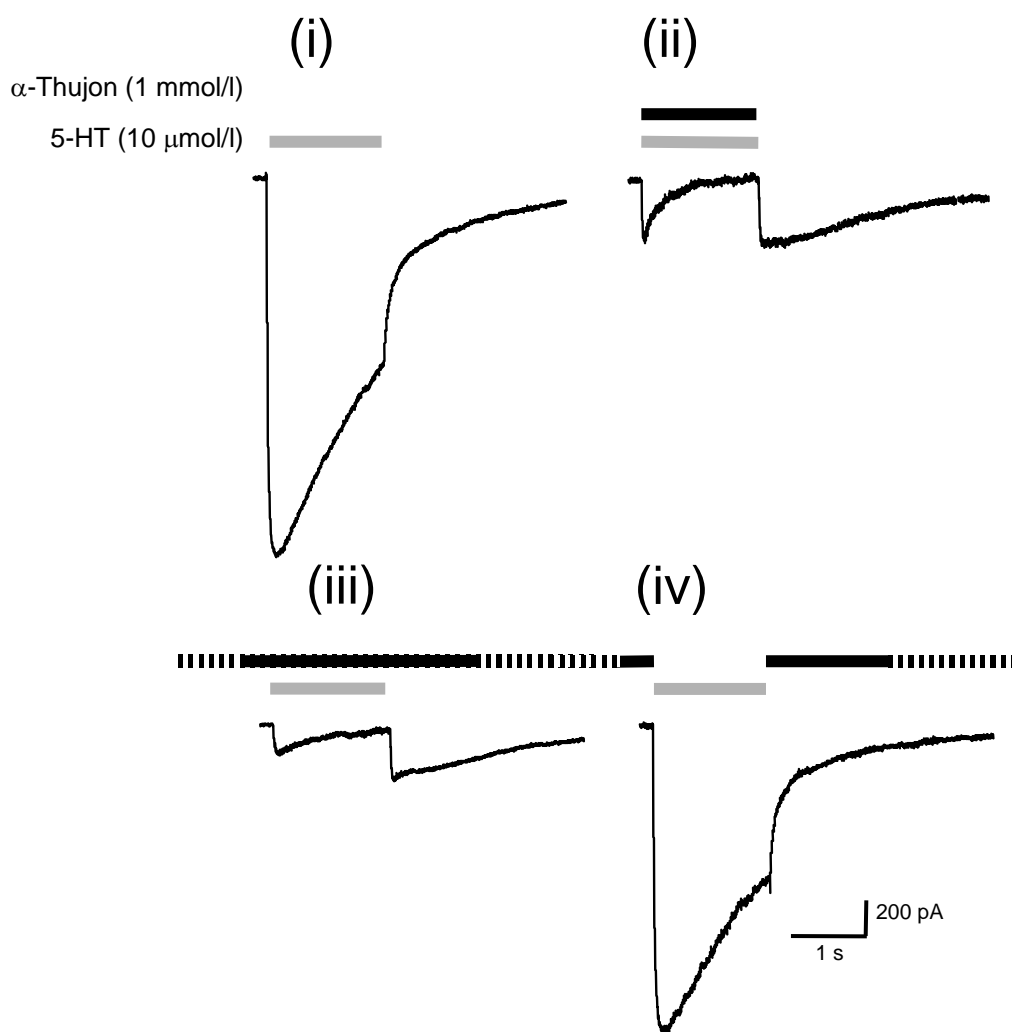


Abb. 5-7: Stromantworten des 5-HT_{3AB}-Rezeptors auf 5-HT in Gegenwart von α -Thujon in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen (i-iv).

Nach Aktivierung heteromerer 5-HT_{3AB}-Rezeptoren durch 5-HT entstehen keine Tailcurrents. Die Desensitisierung dieser Kanäle verläuft also offenbar ohne einen Kanal-Block durch den

Agonisten 5-HT. Den hierbei zugrundeliegenden Mechanismus beschreibt man üblicherweise durch ein kinetisches Modell, das die Rezeptor-Desensitisierung im Sinne einer Isomerisierung vom aktiven zum inaktiven Kanal-Zustand (ohne zusätzliche Bindungsschritte) darstellt. Daraus ergibt sich das kinetische Modell aus Abb. 2-8 (Hapfelmeier et al., 2003).

In Gegenwart von α -Thujon (1 mmol/l) waren die 5-HT_{3AB}-Rezeptor-Antworten auf den 5-HT-Stimulus (10 μ mol/l für 1,5 s) deutlich reduziert und die Desensitisierung beschleunigt. Zusätzlich zeigten sich bei Desapplikation von 5-HT plötzlich deutliche langgezogene Tailcurrents (Abb. 5-7). Offensichtlich erzeugt α -Thujon *de novo* eine zusätzliche Kanal-Block-Komponente von 5-HT an diesem Rezeptor. Diesen möglichen Mechanismus haben wir in das Ausgangs-Modell (Abb. 2-8) in Form eines zusätzlichen Blocks eingefügt (Abb. 5-8, links). Unter Anpassung der Hin- und Rückrate dieses Blockade-Schrittes konnte der beobachtete α -Thujon-Effekt anschaulich simuliert werden (Abb. 5-8, rechts).

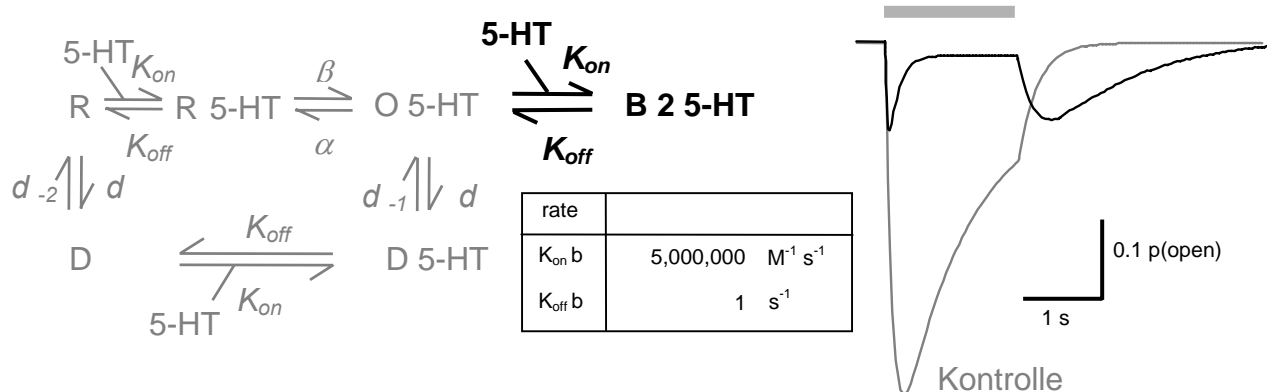


Abb. 5-8: Kinetisches Modell des 5-HT_{3AB}-Rezeptors (links) und dem simulierten Stromverlauf unter dem Einfluss von α -Thujon (rechts, schwarz) im Vergleich zum simulierten Kontrollstrom (rechts, grau).

5.4. Der Effekt von 5-Hydroxyindol auf die Desensitisierung von 5-HT_{3AB}-Rezeptoren

Wieder wurden 5-HT_{3AB}-Rezeptor-Antworten durch Aktivierung mit 5-HT erzeugt. In Gegenwart von 5-OHi (20 mmol/l) war - wie bei α -Thujon - die Strom-Amplitude verkleinert und - anders als bei α -Thujon - die Desensitisierung deutlich verlangsamt. Abermals tauchten am Ende des 5-HT-Stimulus Tailcurrents auf. Anders als unter α -Thujon waren die Tailcurrents unter 5-OHi typischerweise spitz und kurz (Abb. 5-9 A). Aber auch diese

Tailcurrents waren unter kontinuierlicher Applikation von 5-OHi nicht unterdrückt, was wiederum gegen eine direkte Kanal-Blockade durch 5-OHi spricht. Den wahrscheinlicheren Mechanismus einer 5-OHi-induzierten zusätzlichen Kanal-Block-Komponente von 5-HT haben wir wieder mit einem Modell simuliert (Abb. 5-9 B). Die Unterschiede zwischen dem Effekt von α -Thujon und dem von 5-OHi lassen sich gut durch unterschiedliche Hin- und Rückraten des Blockade-Schrittes erklären (vgl. Abb. 5-8 und Abb. 5-9 B). Eine niedrigere 5-OHi-Konzentration (1 mmol/l) vergrößerte die Stromantwort und verlangsamte gleichzeitig die Desensibilisierung. Tailcurrents waren hierbei jedoch nicht zu

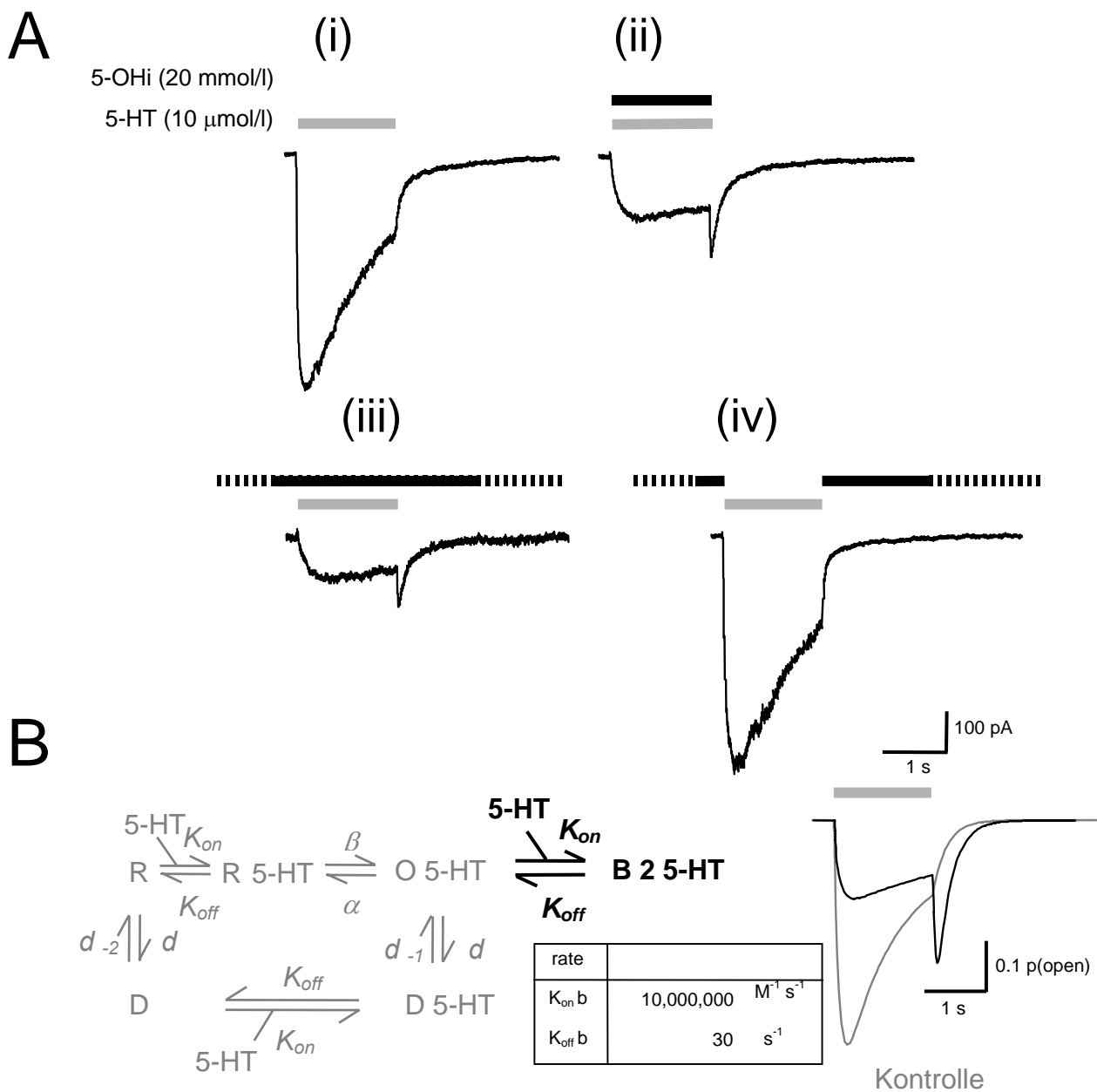


Abb. 5-9: **A:** Stromantworten des $5-HT_{3AB}$ -Rezeptors auf 5-HT in Gegenwart hoher Konzentrationen von 5-OHi (20 mmol/l) in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen (i-iv). **B:** Kinetisches Modell des $5-HT_{3AB}$ -Rezeptors mit zusätzlichem Block und den Blockraten, mit denen sich der rechts (schwarz) im Vergleich zur Kontrolle (grau) dargestellte Strom simulieren lässt.

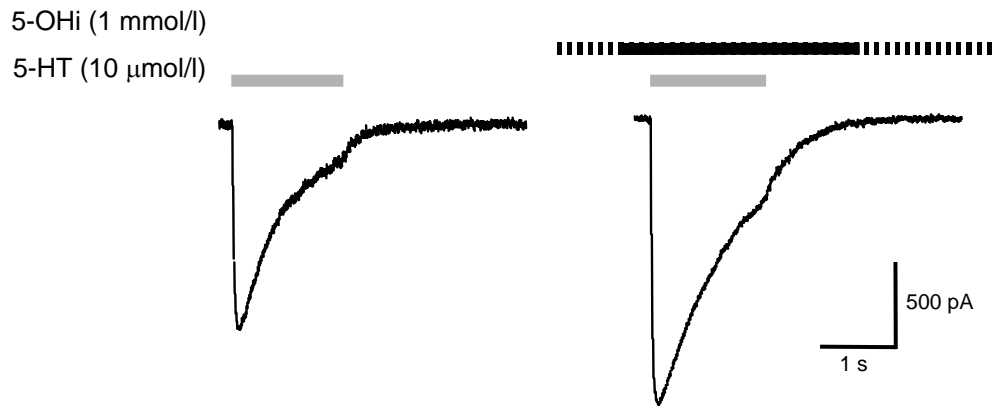


Abb. 5.10: Stromantwort von 5-HT_{3AB} -Rezeptoren auf 5-HT ohne und mit 5-OHi (1 mmol/l).

sehen (Abb. 5-10). Diese Effekte wurden bereits für endogene 5-HT_3 -Rezeptoren beschrieben (Kooyman et al., 1994; van Hooft et al., 1997b) und werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht detailliert untersucht und modelliert. Der beobachtete Strom-Zeit-Verlauf könnte durch eine verminderte Desensitisierungs-Konstante (d_{+1}) zustandekommen.

5.5. Der Effekt von α -Thujon auf mCPBG-induzierte 5-HT_3 -Rezeptor-Antworten

Der spezifische 5-HT_3 -Rezeptor-Agonist mCPBG induziert eine zusätzliche Kanal-Blockade sowohl an homomeren als auch an heteromeren Rezeptoren (Hapfelmeier et al., 2003). Ein mCPBG-Stimulus (10 μmol/l für 1,5 s) erzeugt deshalb 5-HT_{3A} - und 5-HT_{3AB} -Rezeptor-Antworten mit Tailcurrents am Ende des Stimulus (Abb. 5-11). α -Thujon (1 mmol/l) hatte eine starke inhibitorische Wirkung auch auf diese Antworten. Wiederum waren die Tailcurrents unter α -Thujon vergrößert und durch kontinuierliche α -Thujon-Applikation nicht unterdrückt. Dies legt nahe, dass α -Thujon auch die blockierende Komponente von mCPBG am 5-HT_3 -Rezeptor verstärkt.

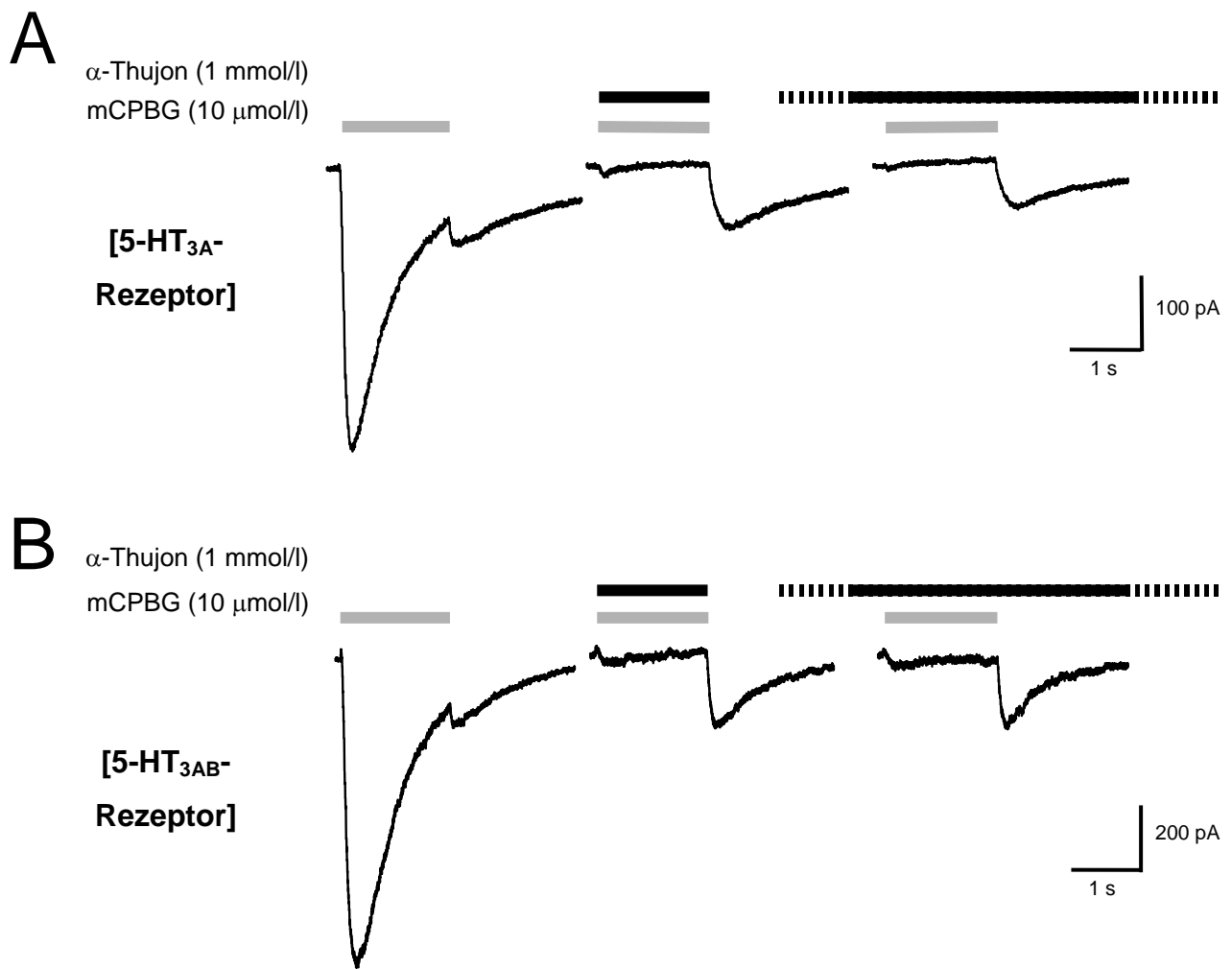


Abb. 5-11: **A:** Stromantworten des 5-HT_{3A}-Rezeptors auf mCPBG in Gegenwart von α -Thujon in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen **B:** Stromantworten des 5-HT_{3AB}-Rezeptors auf mCPBG in Gegenwart von α -Thujon in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen

6. Diskussion

In einer vorhergehenden Studie unserer Arbeitsgruppe (Hapfelmeier et al., 2003) konnte gezeigt werden, dass der Mechanismus der Desensibilisierung von 5-HT₃-Rezeptoren sowohl von der Rezeptor-Untereinheiten-Zusammensetzung als auch vom jeweiligen Liganden bestimmt wird. Die vorliegende Arbeit untersucht und vergleicht die Wirkung des psychotropen Absinth-Inhaltsstoffs α -Thujon und die einer hohen 5-OHi-Konzentration (der aromatische Rest von 5-HT) auf Liganden-aktivierte 5-HT₃-Rezeptor-Ströme. Hierbei zeigte sich ein funktionell-inhibitorischer Effekt, der (indirekt) durch einen Offen-Kanal-Block der Rezeptor-Kanäle verursacht wird. Der Agonist selbst bewirkt offensichtlich diese Kanal-Blockade, und zwar unabhängig von der angelegten Clamp-Spannung, die an der Zellmembran und somit an den Ionen-Kanälen anliegt (Hapfelmeier et al., 2003). Dies ist insofern von Bedeutung, da ein Offen-Kanal-Block an Ionenkanälen auch Spannungs-abhängig sein kann, d.h. beispielsweise nur bei einer negativen Clamp-Spannung auftritt (Legendre et al., 2000).

Die Experimente mit den verschiedenen zeitlichen Abfolgen der Wirkstoff-Applikation deuteten daraufhin, dass die beobachtete inhibitorische Wirkung indirekt, d.h. über einen Agonist-induzierten Offen-Kanal-Block der Rezeptoren vermittelt wird. Ein solches Wirk-Prinzip der Beeinflussung der Rezeptor-Funktion ist bisher noch nicht beschrieben worden. Es könnte sich hierbei jedoch um einen Mechanismus handeln, der nicht nur für α -Thujon und 5-OHi relevant ist. Möglicherweise gibt es weitere Pharmaka und Ionenkanäle, die auf diese Weise interagieren, zumal auch für den Acetylcholin-Rezeptor der motorischen Endplatte ein Agonist-induzierter Offen-Kanal-Block beschrieben worden ist (Legendre et al., 2000).

Zur Simulation und anschaulichen Beschreibung der möglichen zugrundeliegenden Mechanismen des α -Thujon- und 5-OHi-Effekts verwendeten wir kinetische Modelle. Dabei betrachteten wir hauptsächlich die blockierende Komponente des Agonisten 5-HT. Andere Komponenten und Abläufe innerhalb des jeweiligen kinetischen Modells sowie mögliche weitere Interaktionen zwischen Substanz und Rezeptor könnten zusätzlich zu den beobachteten Effekten beitragen. Dies könnte auch die vorhandenen Diskrepanzen zwischen simulierten und gemessenen Rezeptor-Antworten erklären. Wir wollten aber die Modelle so einfach wie möglich halten, um die wesentlichen, an der Substanz-Wirkung beteiligten Mechanismen anschaulich hervorzuheben. Auch die innerhalb der kinetischen Modelle verwendeten Zahlen-Werte der Übergangsraten repräsentieren unter Umständen nur eine von

mehreren möglichen Kombinationen. Darüber hinaus könnten auch zeitlich-dynamische anstelle von konstanten Übergangsraten die Rezeptorkinetik und somit die beobachteten Substanz-Effekte beschreiben. Dies stand jedoch nicht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Unsere Hauptintension war, den entscheidenden Schlüsselmechanismus als einen möglichen, pharmakologisch relevanten Mechanismus herauszustellen.

6.1. Der Effekt von α -Thujon

Eine umfangreiche Arbeit von Höld et al. (2000) ergab, dass α -Thujon in Konzentrationen, wie sie *in vivo* im Gehirn erreicht werden können, GABA_A-Rezeptor-vermittelte Antworten vermindert. Diesen *in vitro*-Effekt, welchen man auf eine nicht-kompetitive Blockade von GABA_A-Rezeptoren zurückführte, machte man für die pro-convulsiven Eigenschaften von α -Thujon verantwortlich (Höld et al., 2000).

Im Hinblick auf die psychotropen Eigenschaften von α -Thujon haben wir in der vorliegenden Arbeit erstmals nach einer möglichen Wirkung am 5-HT₃-Rezeptor gesucht. Unsere Experimente mit homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptoren ergaben einen inhibitorischen Effekt, der reversibel und Konzentrations-abhängig war (Abb. 5-1, 5-2). Eine signifikante Reduktion der Strom-Amplitude zeigte sich ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$. Die zugehörige IC₅₀ lag bei 60 μM . Hierbei handelt es sich um Wirkstoff-Konzentrationen, wie man sie im Gehirn von Mäusen nach intraperitonealer α -Thujon-Applikation nachgewiesen hat (Höld et al., 2000). Um den Wirkmechanismus besser untersuchen zu können, verwendeten wir eine relativ hohe α -Thujon-Konzentrationen (1 mmol/l), welche wir in verschiedenen zeitlichen Abfolgen applizierten. Auffälligerweise traten die Tailcurrents, die die Umkehrung eines Offen-Kanal-Blocks anzeigen, auch in der kontinuierlichen Anwesenheit von α -Thujon auf. Wäre α -Thujon selbst das Kanal-blockierende Agens, hätte die Anwesenheit von α -Thujon, analog zum Kanal-Blocker Picrotoxin am GABA_A-Rezeptor (Abb. 5-4), den Tailcurrent unterdrücken müssen. Dies führte uns zu dem Schluss, dass eine noch nicht näher beschriebene Interaktion zwischen α -Thujon und dem 5-HT_{3A}-Rezeptor die Kanal-blockierende Eigenschaft des Agonisten 5-HT an diesem Rezeptor verstärkt. Dies wäre eine mögliche Erklärung sowohl für den inhibitorischen Effekt als auch für die vergrößerten Tailcurrents.

Bei den heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptoren treten nur in Gegenwart von α -Thujon am Ende des 5-HT-Stimulus Tailcurrents auf. Anhand eines kinetischen Modells veranschaulichen wir diesen Effekt durch Einführung einer zusätzlichen 5-HT-induzierten Kanal-Blockade.

6.2. Der Effekt von 5-Hydroxyindol

Auch in Gegenwart von 5-OHi (höhere Konzentrationen; 20 mmol/l) traten am Ende des 5-HT-Stimulus sowohl bei homomeren als auch bei heteromeren 5-HT₃-Rezeptoren Tailcurrents auf. Auch diese Tailcurrents führten wir auf einen (verstärkten) 5-HT-vermittelten Kanal-Block zurück. Allerdings verlangsamte 5-OHi, im Gegensatz zu α -Thujon, gleichzeitig die Desensibilisierung der 5-HT₃-Rezeptoren. Für beide Rezeptor-Typen veranschaulicht ein kinetisches Modell den 5-OHi-Effekt anhand eines 5-HT-induzierten Kanal-Blocks (siehe Abb. 5-6 B und Abb. 5-8).

Die molekularen Mechanismen und möglichen Interaktionen, denen die veränderten Agonisten-Eigenschaften unter dem Einfluss der Wirkstoffe zugrundeliegen, bleiben unklar und standen auch nicht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Kooyman et al. (1994) schreiben, dass hohe 5-OHi-Konzentrationen einen Radioliganden von der Agonisten-Bindungsstelle des 5-HT₃-Rezeptors kompetitiv verdrängen. Daraus schließen die Autoren, dass 5-OHi auch den Liganden 5-HT kompetitiv verdrängt und dadurch blockierend wirkt. Dieser Mechanismus lässt sich jedoch nicht mit den Tailcurrents nach dem schnellen Auswasch von 5-OHi (Kooyman et al., 1994) in Einklang bringen. Am Beispiel des GABA_A-Rezeptors und Bicucullin zeigt sich nämlich, dass die Aufhebung eines kompetitiven Blocks keine Tailcurrents induzieren kann (Hapfelmeier et al., 2001). Dieser Befund steht wiederum in Einklang mit der Tatsache, dass keine Tailcurrents nach Auswasch des kompetitiven 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten Ondansetron beschrieben sind.

Aufgrund der strukturellen Analogie mit 5-HT ist eine zusätzliche Bindung von 5-OHi an der Agonisten-Bindungsstelle durchaus denkbar (Kooyman et al., 1994). Dies kann aber keinesfalls unsere Beobachtung erklären, dass die Tailcurrents auch in kontinuierlicher Anwesenheit von 5-OHi auftraten und somit offensichtlich von der Desapplikation des Agonisten 5-HT ausgelöst wurden. Deshalb kamen wir zu dem Schluss, dass eine Interaktion zwischen 5-OHi und einer unbekanntenen Bindungsstelle am 5-HT₃-Rezeptor die Tailcurrents über einen 5-HT-induzierten Kanal-Block erzeugt.

6.3. Die mCPBG-induzierte Kanalblockade

Interessanterweise bewirkt der spezifische 5-HT₃-Rezeptor-Agonist mCPBG sowohl an homomeren als auch an heteromeren 5-HT₃-Rezeptoren zusätzlich eine Kanal-Blockade (Lankiewicz et al., 1998; Hapfelmeier et al., 2003). Dies zeigt einmal mehr, dass ein Agonist-induzierter Kanal-Block einen Mechanismus der Rezeptor-Desensibilisierung darstellen könnte, welcher durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann. Hierzu gehören beispielsweise die Quartär-Struktur des Rezeptors, die Art des Agonisten und die Interaktion mit einer Substanz, wie z.B. α -Thujon. In den meisten bisherigen Arbeiten wurde Kanal-Blockade als ein vom Agonist unabhängiger, dafür meist Spannungs-abhängiger Substanz-Effekt beschrieben.

6.4. Schlussfolgerung

α -Thujon vermindert die 5-HT₃-Rezeptor-Aktivität, indem es den Mechanismus der Agonist-induzierten Rezeptor-Desensibilisierung beeinflusst. Wie wir auch am Beispiel von 5-OHi sehen, könnte solch ein Wirkmechanismus, der zuvor noch nicht beschrieben worden ist, theoretisch auch für andere (Psycho-) Pharmaka relevant sein. Der Verminderung serotonerger Rezeptor-Antworten könnte zu den psychotropen Wirkungen von α -Thujon beitragen.

7. Zusammenfassung

α -Thujon, der psychotrope Wirkstoff im Absinth erzeugt bei akuten Intoxikationen u.a. zerebrale Krämpfe. Diese können zum Teil auf eine inhibitorische Wirkung am GABA_A-Rezeptor zurückgeführt werden (Höld et al., 2000). Im Hinblick auf die psychotropen Wirkungen von α -Thujon stellt die vorliegende Arbeit den bislang ersten experimentellen Zugang dar. Hierbei war der Effekt von α -Thujon auf die 5-HT₃-Rezeptor-Aktivität von Interesse, da dieser kationenselektive Liganden-gesteuerte Ionenkanal u.a. in der Regulation von Affekt und Wahrnehmung eine Rolle spielt. Zudem zeigt der 5-HT₃-Rezeptor eine erhebliche Homologie mit dem anionenselektiven GABA_A-Rezeptor.

Eine Möglichkeit, um Liganden-gesteuerte Ionenkanäle *in vitro* elektrophysiologisch zu untersuchen, ist die Kultivierung nativer Zellen, die endogen den jeweiligen Rezeptor-Kanal exprimieren. Für eine isolierte Betrachtung der funktionellen Rezeptor-Aktivität ist es jedoch vorteilhafter, anhand klonierter cDNA die Rezeptoren heterolog zu exprimieren. Als Modell für neuronale 5-HT₃-Rezeptoren, deren Quartärstruktur man nicht genau kennt, haben wir homomere sog. 5-HT_{3A}-Rezeptoren bzw. heteromere 5-HT_{3AB}-Rezeptoren in HEK 293-Zellen heterolog exprimiert. In einer vorhergehenden Arbeit (Hapfelmeier et al., 2003) haben wir zunächst die biokinetischen Eigenschaften dieser rekombinant-transfizierten 5-HT₃-Rezeptoren untersucht. Das hauptsächliche Interesse galt dabei insbesondere dem Mechanismus der Rezeptor-Desensibilisierung. Desensibilisierung beschreibt die funktionelle Inaktivierung Liganden-aktivierter Ionenkanäle. Sie reguliert dadurch die Transmitter-gesteuerte synaptische Übertragung.

Es stellte sich dabei heraus, dass der natürliche Agonist 5-HT bei den homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptoren die Desensibilisierung durch Blockade der geöffneten Rezeptor-Kanäle im Sinne eines sog. Offen-Kanal-Blocks bewerkstelligt. Die Desensibilisierung der heteromeren Rezeptoren vollzieht sich hingegen, ohne dass 5-HT eine solche Kanal-Blockade bewirkt (Hapfelmeier et al., 2003).

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigte α -Thujon sowohl an den homomeren 5-HT_{3A}- als auch an den heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptoren einen hemmenden Effekt. Dieser hemmende Effekt wurde ebenfalls durch einen Offen-Kanal-Block verursacht. Allerdings ist α -Thujon hierbei offenbar nicht das blockierende Agens. Mit Hilfe eines kinetischen Modells lässt sich der blockierende Effekt aber dadurch erklären, dass α -Thujon indirekt die blockierende Eigenschaft des Transmitters 5-HT am 5-HT_{3A}-Rezeptor verstärkt. Darüber

hinaus generiert α -Thujon *de novo* eine blockierende Eigenschaft des Transmitters 5-HT am heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptor.

Zusammengefasst vermindert α -Thujon die funktionelle Aktivität der 5-HT₃-Rezeptoren, indem es deren Desensibilisierung moduliert. Die hemmende Wirkung an diesem Teil des serotonergen Transmittersystems könnte möglicherweise zu den psychotropen Effekten von α -Thujon beitragen.

8. Literaturverzeichnis

- Allgaier C, Warnke P, Stangl AP, Feuerstein T (1995) Effects of 5-HT receptor agonists on depolarization-induced [3H]-noradrenaline release in rabbit hippocampus and human neocortex. *Br J Pharmacol* 116:1769-1774
- Arnold WN (1989) Absinthe. *Sci Am* 260:112-117
- Barann M, Meder W, Dorner Z, Büss M, Bönisch H, Göthert M, Urban BW (2000) Recombinant human 5-HT_{3A} receptors in outside-out patches of HEK 293 cells: basic properties and barbiturate effects. *Arch Pharmacol* 362:255-265
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152
- Bonkovsky HL, Cable EE, Cable JW (1992) Porphyrogenic properties of the terpenes camphor, pinene, and Thujone. *Biochem Pharm* 43:2359-2368
- Brady CA, Stanford IM, Ali I, Lin L, Williams JM, Dubin AE, Hope AG, Barnes NM (2001) Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT_{3A} receptors versus heteromeric 5-HT_{3A/3B} receptors. *Neuropharmacology* 41:282-284.
- Brown AM, Hope AG, Lambert JJ, Peters JA (1998) Ion permeation and conduction in a human recombinant 5-HT₃ receptor subunit (h5-HT_{3A}). *J Physiol* 507:653-665
- Brunello N, Masotto C, Steardo L, Markstein R, Racagni G (1995) New insights into the biology of schizophrenia through the mechanism of action of clozapine. *Neuropharmacology* 13:177-213
- Brunello N, den Boer JA, Judd LL, Kasper S, Kelsey JE, Lader M, Lecrubier Y, Lepine JP, Lydiard RB, Medndlewicz, Montgomery SA, Racagni G, Stein MB, Wittchen H-U

- (2000) Social phobia: diagnosis and epidemiology, neurobiology and pharmacology, comorbidity and treatment. *J Affective Disord* 60:61-74
- Campbell AD, McBride WJ (1995) Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 51:835-842
- Clements JD (1996) Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci* 19:163-171
- Colquhoun D, Hawkes AG (1981) On the stochastic properties of single ion channels. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 211:205-235
- Coppen A (1967) The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 113:1237-1264
- Costall B, Naylor RJ (1994a) 5-HT₃ receptor antagonism and schizophrenia. In: 5-Hydroxytryptamine₃ receptor antagonists. King FD, Jones BJ, Sanger GJ (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton:183-201
- Costall B, Naylor RJ (1994b) 5-HT₃-receptor antagonists in the treatment of cognitive disorders. In: 5-Hydroxytryptamine₃ receptor antagonists. King FD, Jones BJ, Sanger GJ (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton:203-219
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JL, Hales TG, Kirkness EF (1999) The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397:359-363
- Del Castillo J Katz B (1957) Interaction at endplate receptors between different choline derivates. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 146:369-381
- Eisensamer B, Rammes G, Gimpl G, Shapa M, Ferrari U, Hapfelmeier G, Bondy B, Ziegelgänsberger W, Holsboer F, Rupprecht R (2003) Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT₃) receptor. *Mol Psychiatry*, im Druck

- Fletcher S, Barnes NM (1998) Desperately seeking subunits: are native 5-HT₃ receptors really homomeric complexes? *Trends Pharmacol Sci* 19:212-215
- Franke C, Hatt H, Dudel J (1987) Liquid filament switch for ultra-fast exchanges of solutions at excised patches of synaptic membrane of crayfish muscle. *Neurosci Lett* 77:199-204
- Eiselé JL, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D (1993) Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366:479-483
- Fan P (1994) Inhibition of the 5-HT₃ receptor-mediated current by the protein kinase inhibitor, H-7. *Brain Res* 649:310-312
- Fozard JR (1992) 5-HT₃ Receptors in the context of the Multiplicity of 5-HT Receptors. In: *Central and peripheral 5-HT₃ receptors*, Academic Press Limited: 1-17
- Frank W (2000) *Psychiatrie*, Urban & Fischer Verlag München, Jena, 14.Auflage
- Greger R (1996) Membranpotential. In: *Lehrbuch der Physiologie*, Klinke, R., Silbernagl, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage:47-58
- Gunthorpe MJ, Peters JA, Gill CH, Lambert JJ, Lummis SC (2000) The 4th lysine in the putative channel lining domain affects desensitization but not the single-channel conductance of recombinant homomeric 5-HT_{3A} receptors. *J Physiol* 522:187-198
- Gunthorpe MJ, Lummis SC (2001) Conversion of the ion selectivity of the 5-HT_{3A} receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channel superfamily. *J Biol Chem* 276:10977-10983
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F (1981) Improved patch-clamp techniques for high resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85-100

- Hanna MC, Davies PA, Hales TG, Kirkness EF (2000) evidence for expression of heteromeric serotonin 5-HT₃ receptors in rodents. *J Neurochem* 75:240-247
- Hapfelmeier G, Haseneder R, Schneck H, Kochs E (2000) Patch-Clamp-Untersuchungen an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren mittels ultraschnellem Applikations-System. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 35:601-603
- Hapfelmeier G, Haseneder R, Kochs E, Beyerle M, Zieglgänsberger W (2001) Coadministered nitrous oxide enhances the effect of isoflurane on GABAergic transmission by an increase in open-channel block. *J Pharmacol Exp Ther* 298:201-208
- Hapfelmeier G, Tredt C, Haseneder R, Zieglgänsberger W, Eisensamer B, Rupprecht R and Rammes G (2003) Co-expression of the 5-HT_{3B} serotonin receptor subunit alters the biophysics of the 5-HT₃ receptor. *Biophys J* 84:1720-1733
- Hein J, Lobbey L, Neumärker KJ (2001) Absinth – Neue Mode, alte Probleme. *Deutsches Ärzteblatt* 42: 2334-2339
- Hermann B, Wetzel CH, Pestel E, Zieglgänsberger W, Holsboer F, and Rupprecht R (1996) Functional antagonistic properties of clozapine at the 5-HT₃ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 225:957-60
- Höld KM, Sirisoma NS, Ikeda T, Narahashi T, Casida JE (2000) α -Thujon (the active component of absinthe): γ -aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *PNAS* 97:3826-3831
- Hovius R, Tairi AP, Blasey H, Bernard A, Lundstrom K, Vogel H (1998) Characterization of a mouse serotonin 5-HT₃ receptor purified from mammalian cells. *J Neurochem* 70:824-834
- Huganir RL, Delcour AH, Greengard P, Hess GP (1986) Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature* 321:774-776

- Huganir RL, Greengard P (1990) Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron* 5:555-567
- Hussy N, Lukas W, Jones KA (1994) Functional properties of a cloned 5-hydroxytryptamine ionotropic receptor subunit: comparison with native mouse receptors. *J Physiol* 481:311-323
- Hüther G, Rüter E (2000) Das serotonerge System. UNI-MED Verlag AG, Bremen 1. Auflage
- Jones BJ, Piper DC (1994) 5-HT₃ receptor antagonists in anxiety. In: 5-Hydroxytryptamine₃ receptor antagonists. King FD, Jones BJ, Sanger GJ (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton: 155-181
- Jones BJ, Blackburn TP (2002) The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* 71:555-568
- Jones MV und Westbrook GL (1995) Desensitized states prolong GABA_A channel responses to brief agonist applications. *Neuron* 15:181-191
- Jones MV und Westbrook GL (1996) The impact of receptor desensitization on the fast synaptic transmission. *TINS* 19:96-101
- Klinke R (1996) Erregungsübertragung in Zellverbänden. In: Lehrbuch der Physiologie, Klinke, R., Silbernagl, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage:59-78
- Kooyman AR, van Hooft JA, Vanderheijden PML, Vijerberg HPM (1994) Competitive and non-competitive effects of 5-hydroxyindole on 5-HT₃ receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 112:541-546
- Lankiewicz S, Lobitz N, Wetzel CHR, Rupprecht R, Gisselmann G, Hatt H (1998) Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of 5-

hydroxytryptamine₃ receptor cDNA and its splice variants from guinea pig. *Mol Pharmacol* 53:202-212

Legendre P, Ali DW, Drapeau P (2000) Recovery from open channel block by acetylcholine during neuromuscular transmission in zebrafish. *J Neurosci* 20:140-148

Licha M (2001) <http://www.absintheon.de>

Lobitz N, Gisselmann G, Hatt H, Wetzel CH (2001) A single amino-acid in the TM1 domain is an important determinant of the desensitization kinetic of recombinant human and guinea pig alpha-homomeric 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Pharmacol* 59:844-851

Löffler G (1997) Replikation und Gentechnik. In: *Biochemie und Pathobiochemie*, Löffler G, Petrides PE (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 5. Auflage:205-237

Maconochie DJ, Zempel JM, Steinbach JH (1994) How quickly can GABA_A receptors open? *Neuron* 12:61-71

Machu TK, Harris A (1994) Alcohols and anesthetics enhance the function of 5-hydroxytryptamine₃ receptors expressed in xenopus laevis oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 271:898-905

Mariq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT₃ Receptor, a serotonin-gated ion channel. *science* 254:432-437

McCray JA, Trentham DR (1989) Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 18:239-70

Meschler JP, Howlett AC (1999) Thujone exhibits low affinity for cannabinoid receptors but fails to evoke cannabimetic responses. *Pharm Biochem Behav* 62:473-480

- Miyake A, Mochizuki S, Takemoto Y, Akuzawa S (1995) Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine₃ receptor: heterogeneity in distribution and function among species. *Mol Pharmacol* 48:407-416.
- Mochizuki S, Miyake A, Furuichi K (1999) Ion permeation properties of a cloned human 5-HT₃ receptor transiently expressed in HEK 293 cells. *Amino Acids* 17:243-255
- Möller HJ, Laux G, Deister A (1995) *Psychiatrie*. Hippokrates Verlag Stuttgart (Duale Reihe). 1. Auflage
- Morales M, Mccollum N, Kirkness E (2001) 5-HT₃ receptor subunits A and B are co-expressed in neurons of the dorsal root ganglion. *J Comp Neur* 438:163-172
- Nejt HC, Vijverberg HPM., Bercken Van Den J (1986) The Dopamine response in mouse neuroblastoma cells is mediated by serotonin 5-HT₃ Receptors. *Eur J Pharmacol* 127:271-274
- Numberger M, Draguhn A (1996) *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford 1.Auflage
- Petrides, PE (1997a) Gendiagnostik und Getherapie. In: *Biochemie und Pathobiochemie*, Löffler G, Petrides PE (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 5. Auflage:317-355
- Petrides PE , Löffler G, (1997b) *Nervengewebe*. In: *Biochemie und Pathobiochemie* Springer Verlag, Berlin 5. Auflage:971-993
- Rammes G, Eisensamer B, Ferrari U, Shapa M, Gimpl G, Holsboer F, Hapfelmeier G, Ziegelgänsberger W, Rupprecht R (2003) Antipsychotic drugs antagonise human serotonin type 3 (5-HT₃) receptor currents in a non-competitive manner. Wird zur Publikation eingereicht.
- 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 Memb Biol* 19:11-26

- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-522
- Schlicker E, Kathmann M, Exner HJ, Detzner M, Göthert M (1994) The 5-HT₃ receptor agonist 1-(m-chlorophenyl)-biguanide facilitates noradrenaline release by blockade of α_2 -adrenoceptors in the mouse brain cortex. *Arch Pharmacol* 349:20-24
- Schmidt CJ, Black CK (1989) The putative 5-HT agonist phenylbiguanid induces carrier-mediated release of dopamine. *Eur J Pharmacol* 167:309-310
- Shao XM, Yakel YL, Jackson MB (1991) Differentiation of NG108-15 cells alters channel conductance and desensitization kinetics of the 5-HT₃ receptor. *J Neurophys* 65:630-638
- van Hooft JA, Kreikamp AP, Vijverberg HP (1997a) Native 5-HT₃ receptors expressed in *Xenopus* oocytes differ from homopentameric 5-HT₃ receptors. *J Neurochem* 69:1318-1321.
- van Hooft JA, van der Haar E, and Vijverberg HP (1997b) Allosteric potentiation of the 5-HT₃ receptor-mediated ion current in N1E-115 neuroblastoma cells by 5-hydroxyindole and analogues. *Neuropharmacology* 36:649-653
- Waxham NM (1999) Neurotransmitter Receptors. In: *Fundamental Neuroscience* Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR Academic Press:235-267
- Weisboard SD, Soule JB, Kimmel PL (1997) Poison on line - acute renal failure caused by oil of wormwood purchased through the internet. *New Engl J Med* 337:825-827
- Werner P, Kawashima E, Reid J, Hussy N, Lundstrom K, Buell G, Humbert Y (1994) Organization of the mouse 5-HT₃ receptor gene and functional expression of two splice variants. *Br Res Mol Br Res* 26:233-241

- Yakel JL (1992) HT₃ receptors as cation channels. In: Central and peripheral HT₃ receptors, Academic Press, London
- Yakel JL, Lagrutta A, Adelman JP, North RA (1993) Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-Hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5030-5033
- Yang J (1990) Ion permeation through 5-Hydroxytryptamine-gated channels in neuroblastoma N18 cells. *J Gen Physiol* 96:1177-1198
- Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *PNAS* 87:9568-9572
- Yang J, Mathie A, Hille B (1992) 5-HT₃ receptor channels in dissociated rat superior cervical ganglion neurons. *J Physiol* 448:237-256
- Yi SJ, Gifford AN, Johnson KM (1991) Effect of cocaine and 5-HT₃ receptor antagonists on 5-HT-induced dopamine release from rat striatal synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 199:185-189

9. Abbildungs- und Tabellen- verzeichnis

	<i>Seite</i>
Abb. 2-1: Strukturformel von α -Thujon.	9
Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Serotoninwiederaufnahme.	15
Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Tertiärstruktur eines Ionenkanals in seiner Lage innerhalb der Zellmembran.	20
Abb. 2-4: Quartärstruktur eines Ionenkanals.	21
Abb. 2-5: Schematische Darstellung des typischen Aufbaus eines ligandengesteuerten Ionenkanals aus fünf Untereinheiten.	22
Abb. 2-6: Vereinfachtes Reaktionsschema zum Funktionsprinzip von ligandengesteuerten Ionenkanälen.	24
Abb. 2-7: Kinetisches Modell der 5-HT _{3A} -Rezeptordesensitisierung mit Stromverlauf und simulierter Stromantwort.	27
Abb. 2-8: Kinetisches Modell der 5-HT _{3AB} -Rezeptordesensitisierung mit Stromverlauf und simulierter Stromantwort.	29
Abb. 2-9: Schematische Darstellung einer Whole-cell Konfiguration.	32
Abb. 2-10: Schematische Darstellung der Outside-out Konfiguration.	33
Abb. 2-11: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer U-Tube.	34
Abb. 4-1: Funktionsprinzip des Piezokristall gesteuerten Applikationssystems.	42
Abb. 4-2: Schema der Agonistenapplikation in dem Piezokristall gesteuerten Applikationssystem.	43
Abb. 4-3: Strukturformel von Serotonin.	44
Abb. 4-4: Strukturformel von mCPBG.	44
Abb. 4-5: Strukturformel von 5-Hydroxyindol.	45
Abb. 5-1: Dosiswirkungsbeziehung von α -Thujon am 5-HT _{3A} -Rezeptor: Stromverläufe in Gegenwart unterschiedlicher α -Thujon-Konzentrationen.	49

Abb. 5-2:	Dosiswirkungsbeziehung von α -Thujon am 5-HT _{3A} -Rezeptor.	50
Abb. 5-3:	α -Thujon am 5-HT _{3A} -Rezeptor in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen.	51
Abb. 5-4:	Picrotoxin am $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA _A -Rezeptor zur Verdeutlichung eines typischen Stromverlaufs bei Kanalblockade.	52
Abb. 5-5:	Kinetisches Modell zur Wirkung von α -Thujon am 5-HT _{3A} -Rezeptor.	53
Abb. 5-6:	5-OHi am 5-HT _{3A} -Rezeptor in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen mit kinetischem Modell zur Wirkung der Substanz.	54
Abb. 5-7:	α -Thujon am 5-HT _{3AB} -Rezeptor in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen.	55
Abb. 5-8:	Kinetisches Modell zur Wirkung von α -Thujon am 5-HT _{3AB} -Rezeptor.	56
Abb. 5-9:	5-OHi (20 mmol/l) am 5-HT _{3AB} -Rezeptor in unterschiedlichen zeitlichen Applikationsabfolgen mit kinetischem Modell zur Wirkung der Substanz.	57
Abb. 5-10:	5-OHi (1 mmol/l) am 5-HT _{3AB} -Rezeptor.	58
Abb. 5-11:	α -Thujon mit mCPBG am 5-HT _{3A} - und 5-HT _{3AB} - Rezeptor in unterschiedlichen zeitlichen Abfolgen der Applikation	59
Tabelle 1:	Weltweit führende Psychopharmaka	15
Tabelle 2:	Die Wirkung verschiedener Psychopharmaka am 5-HT ₃ -Rezeptor	17
Tabelle 3:	Agonisten und Antagonisten am 5-HT ₃ -Rezeptor	19

10. Anhang

10.1. Materialien und Geräte

10.1.1. Verwendete Chemikalien und Lösungen

Bezug der Chemikalien, wenn nicht gesondert angegeben, bei Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland.

Minimum Essential Medium (MEM), Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland:

	(mg/l)
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	264
KCl	400
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200
NaCl	6800
NaHCO ₃	200
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	158
D-Glucose	1000
Phenolrot	10

Aminosäuren:

L-Arginin-HCl	126
L-Cystin	24
L-Histidin HCl x H ₂ O	42
L-Isoleucin	52
L-Leucin	52
L-Lysin x HCl	73
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	32
L-Threonin	48
L-Tryptophan	10
L-Thyrosin	10
L-Valin	46

Vitamine:

D-Ca Pantothenat	1,0
Cholinchlorid	1,0
Folsäure	1,0
i-Inositol	2,0
Nikotinamid	1,0
Pyridoxal-HCl	1,0
Riboflavin	0,10
Thiamin-HCl	1,0

Phosphat Buffered Saline (PBS)-Puffer:

	(%)
KCl	0,2
NaCl	8,0
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,4
KH ₂ PO ₄	0,2
pH	7,3

Elektroporationspuffer:

	(mmol/l)
KH ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O	50
K-Acetat	20
pH	7,35 (eingestellt mit CH ₃ COOH)

Magnesiumsulfatlösung:

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 M
pH	7,67 (eingestellt mit NaOH)

Extrazellulärlösung:

	(mmol/l)
NaCl	162
KCl	5,3
Na ₂ HPO ₄	0,67
KH ₂ PO ₄	0,22
HEPES	15
L-Glucose	5,6
CaCl ₂	2,0
pH	7,35 (eingestellt mit NaOH)
Osmolarität:	340 mOsm/l

Intrazellulärlösung:

	(mmol/l)
KCl	140
MgCl ₂	2,0
EGTA	11
HEPES	10
Glucose	10
pH	7,3 (eingestellt mit KOH)
Osmolarität:	340 mOsm/l

Weitere Chemikalien:

DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Isofluran (Forene®)	Deutsche Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Sevofluran	Maruishi Pharmaceutical Co., Osaka, Japan
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland

10.1.2. Zellkultur

HEK 293-Zellen (ATCC¹ CRL 1573) DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

Plasmid pCDM8 mit cDNA:

Humane 5-HT _{3A} -Untereinheit	(nucleotides 217-1,663 GenBank accession no. D49394)
Humane 5-HT _{3B} -Untereinheit	(nucleotides 55-1,393 GenBank accession no. AF080582)

10.1.3. Verbrauchsmittel

Zellpräparation und Transfektion:

Petrischalen (100 x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen (35 x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Patch-Clamp-Methodik:

Borosilikat Glaspipetten (GC150TF-10) Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, England

10.1.4. Geräte

Zellpräparation und Transfektion:

Digifuge GL	Heraeus Instruments, München, Deutschland
Lamin Air©	Heraeus Instruments, München, Deutschland
Brutschrank IG 150	Jouan, Saint-Herblain, Frankreich
Elektroporationssystem	Biotechnologies and Experimental Research, Inc., San Diego, CA,
	USA

¹ American Type Culture Collection

Patch-Clamp-Methodik:

Feinwaage SBC 32	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Elektrodenziehgerät	
DMZ-Universalpuller	Zeitz Instruments, Augsburg, Deutschland
Auflichtmikroskop Axiovert	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzlampe (Filter: 460 nm)	
mit HBO 50	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Patch-Clamp-Verstärker Axopatch 200B	Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA
Analog-Digital-Wandler	
Digidata 1200 A/D Converter	Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA
Piezzokristall Minitranslator P-249.20	Physik Instrumente, Waldbronn, Deutschland

EDV-Umgebung:

Power Macintosh 7200/90	Apple Computer, Cupertino, CA, USA
Vektra Pentium PC	Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA
pClamp 6.0 Software	Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA
AxoGraph 3 Software	Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA
SigmaStat 2.03 Software	SPSS Sience, Chicago, IL, USA
Bioq 2.0 Software	Parnas & Parnas Neurobiology Lab, Hebrew University, Jerusalem, Israel
	(www.ls.huji.ac.il/~parnas/BIOQ/bioq.html)

10.2. Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. R. Rupprecht für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Promotion an der Klinik für Psychiatrie durchführen zu können, sowie für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. G. Hapfelmeier für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die vorzügliche Betreuung und Ansprechbarkeit in allen Belangen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Zieglgänsberger für die Hilfe.

Herrn Dr. T. Baghai für die guten Ratschläge und das stets offene Ohr für alle Probleme bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Rainer Haseneder für die Unterstützung bei der graphischen Ausarbeitung.

Frau Christiane Rewerts für die technische Assistenz.

10.3. Verzeichnis eigener Publikationen

Deiml TOJ, Haseneder R, Ziegelgänsberger W, Rupprecht R, Hapfelmeier G (2003) α -Thujone reduces 5-HT₃ receptor activity by modulating the mechanisms of desensitisation. Zur Publikation eingereicht bei J Pharmacol Exp Ther

Baghai T, Schüle C, Zwanzger P, Zill P, Ella R, Eser D, Deiml T, Minov C, Rupprecht R, Bondy B (2003) No influence of a functional polymorphism within the serotonin transporter gene on partial sleep deprivation in major depression. World J of Biolog Psychiatry (in press)

Baghai T, Schüle C, Zwanzger P, Zill P, Ella R, Eser D, Deiml T, Minov C, Rupprecht R, Bondy B (2003) Influence of a functional polymorphism within the angiotensin I converting enzyme gene on partial sleep deprivation in patients with major depression. Neurosci Lett (in press)

10.4. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Tobias Deiml
Wohnort: Aurbacherstr. 6
81541 München
Tel.: 089 – 28788930
Geburtstag und –ort: 01.12.1971 in Stuttgart – Bad Cannstatt
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Eltern: Dr. Gerd Deiml, Chefarzt a.D.
Eicke Deiml, Grundschullehrerin / Hausfrau

Schulbildung

1978 – 1982 Grundschule St. Martin I Deggendorf
1982 – 1992 Robert-Koch-Gymnasium Deggendorf
08.07.1992 Abitur

Berufsausbildung

1993 – 1994 Vorklinisches Studium / Universität Göttingen
1994 – 1997 Vorklinisches Studium / Ludwig-Maximilians-Universität
München mit Wartezeit auf Übernahme in den klinischen
Studienabschnitt
1997 – 2000 Klinisches Studium / Ludwig-Maximilians-Universität München
10.2000 – 02.2001 1. Teil des Praktischen Jahres / Innere Medizin,
Kreiskrankenhaus Starnberg
02.2001 – 05.2001 2. Teil des Praktischen Jahres / Psychiatrie, Psychiatrische Klinik
der Universität München
05.2001 – 09.2001 3. Teil des Praktischen Jahres / Chirurgie, Chirurgische Klinik
der Universität München

01.2002 Tätigkeit als Arzt im Praktikum im Rahmen des Tandem-Projektes an der Psychiatrischen Klinik der Universität München und dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München.

Famulaturen

09.1997 – 10.1997 Orthopädie / Klinikum Großhadern
03.1999 – 04.1999 Psychiatrie / Klinikum Innenstadt d. Universität München
04.1999 – 04.1999 Innere Medizin / Klinikum Deggendorf

Studienbegleitende Tätigkeiten

08.1996 - 01.1997 Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut Dr. Schauerte, Grünwald bei der Durchführung pharmakologischer Studien.
11.1999 – 02.2000 Tätigkeit als Co-Assistent in dem Kursus der Makroskopischen Anatomie an der Anatomischen Anstalt der Universität München