

Die Kinetik des heteromeren 5-HT₃-Rezeptors: Untersuchungen mit Patch-Clamp-Technik und Computersimulationen

Christian Jürgen Tredt

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

Die Kinetik des heteromeren 5-HT₃-Rezeptors: Untersuchungen mit Patch-Clamp-Technik und Computersimulationen

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

vorgelegt von Christian Jürgen Tredt
aus Eichstätt
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Rupprecht
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. A. Konnerth Priv. Doz. Dr. M. Näbauer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. G. Hapfelmeier
Dekan	Prof. Dr. Dr. h.c. Klaus Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	22. Juli 2004

Meinen Eltern gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin)
5-HT _{3A} -R	homomerer 5-HT ₃ -Rezeptor
5-HT _{3AB} -R	heteromerer 5-HT ₃ -Rezeptor
α	Schließungsrate des Kanals
A	Agonist
β	Öffnungsrate des Kanals
B	blockierter Zustand des Rezeptors
C	geschlossener Zustand des Rezeptors
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d_{+1}/d_{-1}	Hin-/Rückrate der Rezeptor-Desensibilisierung
D	desensibilisierter Zustand des Rezeptors
EC _x	Effektiv-Konzentration (x % des maximalen Effekts)
GABA	γ -Aminobuttersäure
HEK	menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
K _{on}	Assoziationsrate
K _{off}	Dissoziationsrate
MG	Molekulargewicht
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl der gewerteten Experimente
O	offener Zustand des Rezeptors
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
SD	Standardabweichung
TM	transmembranäres Segment einer Rezeptor-Untereinheiten
ZNS	Zentrales Nervensystem

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	6
1. Einleitung	9
2. Theoretische Grundlagen	11
2.1. Ionotrope Ionenkanäle	11
2.1.1. Funktionsprinzip und Struktur	11
2.1.2. Desensibilisierung und Resensibilisierung.....	13
2.1.3. Beschreibung der Rezeptorkinetik	14
2.2. Der 5-HT₃-Rezeptor	15
2.2.1. Die Untereinheiten des 5-HT ₃ -Rezeptors.....	16
2.2.2. Verteilung der 5-HT ₃ -Rezeptoren in Hirnarealen	17
2.2.3. Physiologie und Pharmakologie.....	18
2.3. Die Patch-Clamp Technik	21
2.3.1. Verschiedene Patch-Clamp-Konfigurationen	22
2.3.2. Applikationsverfahren.....	25
2.3.3. Heterologe Expressionssysteme.....	26
3. Fragestellung	28
4. Methodik	29
4.1. Zellkultur und Rezeptorexpression	29
4.2. Elektrophysiologie	30
4.2.1. Allgemeines	30
4.2.2. Die Whole-Cell-Konfiguration	31
4.2.3. Single-Channel-Ableitung	32
4.2.3.1. Die Outside-Out-Konfiguration.....	32
4.2.3.2. Die Cell-Attached-Konfiguration	33
4.2.4. Das piezogesteuerte Applikationssystem.....	33
4.2.5. Verwendete Lösungen.....	35
4.3. Datenanalyse	36
4.4. Das kinetische Modell	37
5. Ergebnisse	38
5.1. Kinetische Eigenschaften des durch 5-HT aktivierten 5-HT_{3AB}-Rezeptors	38
5.2. Dosis-Wirkungs-Beziehung	41
5.3. Erholungskinetik nach Desensibilisierung	42
5.4. Die kurze Agonisten-Applikation	44
5.5. Die Strom-Spannungs-Beziehung der	47
Rezeptoraktivierung durch 5-HT	47
5.6. Die 5-HT₃-Rezeptoraktivierung durch mCPBG	48
5.6.1. Aktivierung des 5-HT _{3A} -Rezeptors durch mCPBG	48

5.6.2.	Aktivierung des 5-HT _{3AB} -Rezeptors durch mCPBG.....	50
6.	<i>Diskussion</i>	53
6.1.	Die Desensibilisierung des 5-HT _{3AB} -Rezeptors.....	53
6.2.	Vergleich der Eigenschaften von 5-HT _{3A} - und 5-HT _{3AB} -Rezeptoren.....	54
6.3.	Der Effekt von mCPBG auf 5-HT ₃ -Rezeptoren.....	55
7.	<i>Zusammenfassung</i>	57
8.	<i>Literaturverzeichnis</i>	58
9.	<i>Anhang</i>	68
9.1.	Verwendete Lösungen	68
9.2.	Zellkultur	70
9.3.	Verbrauchsmittel	70
9.4.	Geräte	70
10.	<i>Danksagung</i>	72
11.	<i>Lebenslauf</i>	73

1. Einleitung

Der 5-HT₃-Rezeptor gehört zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle (Ortells & Lunt, 1995). Er zeigt eine ausgeprägte Kationenselektivität, ist überwiegend für monovalente Ionen wie Na⁺ und K⁺, aber auch für Ca²⁺ und Mg²⁺ permeabel und vermittelt Einwärtsströme, die eine Membrandepolarisation bewirken (Yang, 1990; Hargreaves et al., 1994; Barnes & Sharp, 1999). Die Aktivierung postsynaptischer 5-HT₃-Rezeptoren ist an der schnellen exzitatorischen synaptischen Übertragung, z.B. im Hippocampus, beteiligt (MacMahon & Kauer, 1997), während präsynaptische 5-HT₃-Rezeptoren die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter, z.B. GABA, regulieren (Koyama et al., 2000; Van Hooft & Vivjerberg, 2000).

Der 5-HT₃-Rezeptor spielt in Genese und Therapie von Angststörungen und Depressionen eine Rolle. Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) und trizyklische Antidepressiva erhöhen die Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt. Darüber hinaus ist seit kurzem bekannt, dass einige Antidepressiva als direkte Antagonisten am 5-HT₃-Rezeptor wirken. Allerdings ist über die genauen Wirkmechanismen wenig bekannt, da man Struktur und Physiologie des 5-HT₃-Rezeptors nur teilweise kennt. Die erstmals 1991 klonierte 5-HT_{3A}-Rezeptor-Untereinheit (Mariat et al., 1991) bildet in heterologen Expressionssystemen funktionale homo-pentamere Komplexe (Mariat et al., 1991; Boess et al., 1995; Green et al., 1995). Diese homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptoren unterscheiden sich aber in einigen pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften von nativen 5-HT₃-Rezeptoren, die nach neuesten Erkenntnissen neben der 5-HT_{3A}-Untereinheit zusätzlich die erst kürzlich klonierte 5-HT_{3B}-Untereinheit enthalten (Davies et al., 1999; Hanna et al., 2000). Unter Coexpression von 5-HT_{3A}- und 5-HT_{3B}-Untereinheiten bilden heterologe Expressionssysteme den heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptor.

Der Agonist Serotonin bewirkt eine schnelle Aktivierung des 5-HT₃-Rezeptors, wodurch sich der Ionenkanal öffnet. Das Schließen der Kanäle erfolgt durch Dissoziation des Agonisten oder durch Desensibilisierung (Lambert et al., 1989; Yang, 1990). Desensibilisierung ist eine typische Eigenschaft ligandengesteuerter Ionenkanäle. Sie beschreibt das Erreichen eines inaktiven Zustands, obwohl der Agonist weiterhin gebunden bleibt. Sie beeinflusst somit den Zeitverlauf einer synaptischen Antwort. Andererseits limitiert die "Erholungszeit" desensibilisierter Rezeptoren (Resensibilisierung) die synaptische Antwort auf wiederholte

Transmitterausschüttungen (Huganir et al, 1986; Huganir & Greengard, 1990). Somit könnte die Desensibilisierung ein wichtiger Mechanismus der Kurzzeit-Regulation der synaptischen Effizienz sein. Die molekularen Grundlagen der Desensibilisierung von Ionenkanälen sind bisher kaum verstanden. Einige molekulare Schritte der Desensibilisierung von ionotropen Glutamat-Rezeptoren konnten kürzlich aufgeklärt werden (Sun et al., 2002).

Die Desensibilisierung von 5-HT₃-Rezeptoren wird durch verschiedene Faktoren, z.B. Aminosäuresequenz der Untereinheiten, extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, Entwicklungsstatus der Zellen und durch Pharmaka reguliert (Shao et al., 1991; Yakel et al., 1993; Gunthorpe et al, 2000; Lobitz et al., 2001;; Eisensamer et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollen die kinetischen Eigenschaften, wie Aktivierung, Desensibilisierung und Resensibilisierung, des heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptors mittels Patch-Clamp-Technik erfasst und anhand eines Reaktionsmodells beschrieben werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Ionotrope Ionenkanäle

2.1.1. Funktionsprinzip und Struktur

Ionenkanäle sind sowohl für die Aufrechterhaltung als auch für Änderungen des Membranpotenzials von Neuronen verantwortlich (Greger, 1996). Grundsätzlich unterscheidet man spannungsgesteuerte (z.B. Natriumkanäle) und ligandengesteuerte (Rezeptor-gekoppelte) Ionenkanäle (Klinke, 1996b). Ligandengesteuerte Ionenkanäle kann man in G-Protein-gekoppelte (metabotrope) und ionotrope Ionenkanäle unterteilen. Im Gegensatz zu den metabotropen Rezeptoren (z.B. GABA_B-Rezeptoren, Katecholamin-Rezeptoren, verschiedene 5-HT-Rezeptoren), bei denen nach Transmitterbindung die Öffnung des Ionenkanals indirekt über eine intrazelluläre G-Protein-gekoppelte Signalkaskade erfolgt - der eigentliche Rezeptor und der Ionenkanal sind demnach zwei unterschiedliche Proteine - (Petrides, 1997a), bildet bei den ionotropen Rezeptoren ein und dasselbe Protein gleichzeitig Rezeptor und Ionenkanal. Nach Bindung des Transmitters erfolgt die Kanalöffnung direkt über eine Änderung des Isomerisierungszustandes des Kanal-Proteins, d.h. ohne zwischengeschaltete Signalkaskaden (Petrides, 1997a). Ionotrope Kanäle sind typischerweise pentamere Proteinkomplexe, die sich in der Regel aus verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen und dabei den Ionenkanal bilden. Innerhalb der verschiedenen ligandengesteuerten Ionenkanäle werden durch Vergleich der Aminosäuresequenz zwei Hauptgruppen unterschieden. Die eine Gruppe besteht aus Glutamat-Rezeptoren, die andere aus GABA_A-, Glycin-, 5-HT₃- und Azetylcholin-Rezeptoren. Azetylcholin-Rezeptoren sind bisher am eingehendsten untersucht worden. Deshalb sollen an diesem Beispiel Struktur und Eigenschaften von Ionenkanälen kurz erläutert werden (Ortells & Lunt, 1995; Waxham, 1999).

Beim Azetylcholin-Rezeptor formen die extrazellulären Domänen einen Trichter, der die Interaktion zwischen den Ionen und der Kanalwand ermöglicht (Unwin N.,1993). Dieser Trichter verengt sich bis zum Zentrum der Membrandoppelschicht, wo sich das sog. „gate“ befindet. Diese Struktur bestimmt den Öffnungszustand der Pore (s. Abb. 2.1 A). Jede der

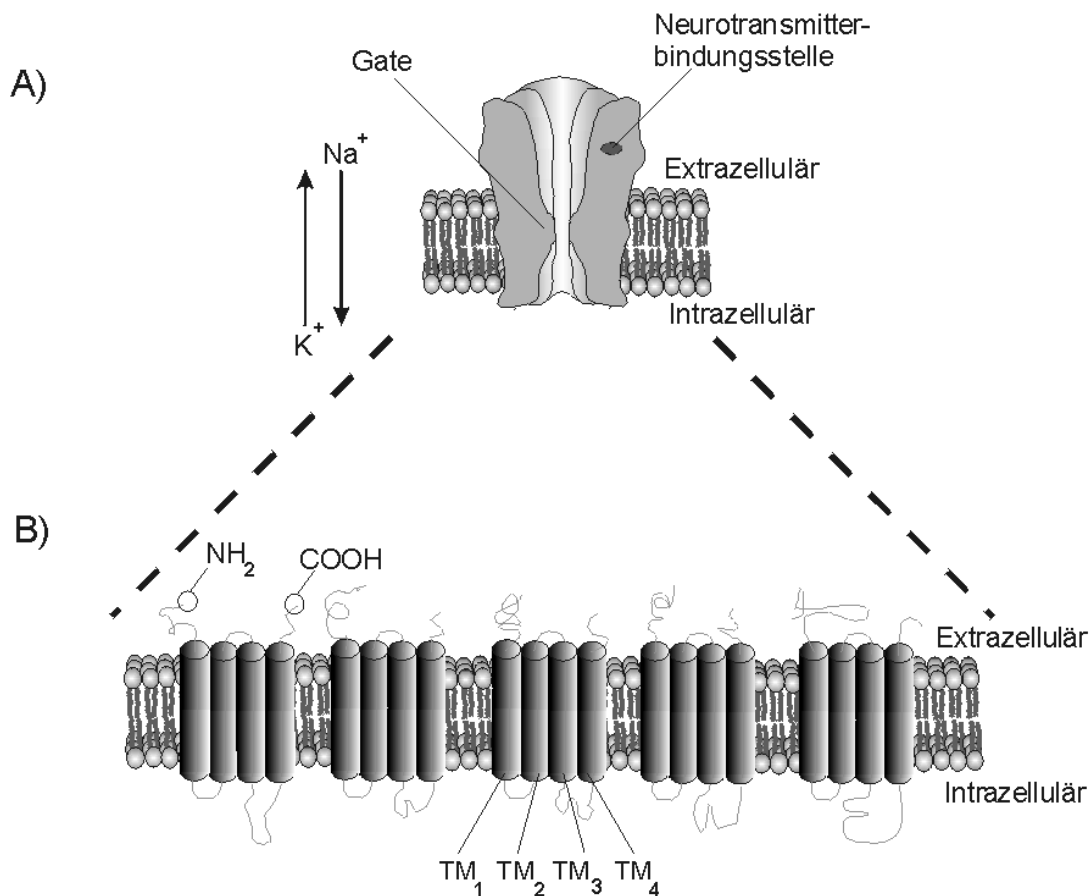


Abb. 2.1 Schematische Darstellung eines Ionenkanals, hier am Beispiel des Azetylcholin-Rezeptors: **A** zeigt die Neurotransmitterbindungsstelle und das „gate“, das bei Bindung eines Neurotransmitters durch Drehung der TM₂-Segmente eine Öffnung des Kanals ermöglicht. **B** zeigt die 5 Untereinheiten des Kanals, die jeweils aus 4 Segmenten bestehen, und die extrazellulären und intrazellulären Aminosäureschleifen zwischen den transmembranären Segmenten TM₁- TM₄. (modifiziert nach Waxham, 1999).

fünf Untereinheiten bildet je vier transmembranäre Domänen (TM₁-TM₄). Hydrophobe Aminosäuren stabilisieren diese Domänen in der hydrophoben Umgebung der Lipidmembran. Der N-Terminus, der C-Terminus und die Schleife zwischen TM₂ und TM₃ befinden sich extrazellulär, während sich die Schleifen zwischen TM₁ und TM₂, und zwischen TM₃ und TM₄ intrazellulär befinden (s. Abb. 2.1 B). Die Kanal-Pore wird hauptsächlich durch die TM₂-Segmente begrenzt. Beim Azetylcholin-Rezeptor sind die Aminosäuren der TM₂-Segmente so angeordnet, dass drei Ringe negativ geladener Aminosäuren die Pore umschließen. Dadurch können nur Kationen den Kanal passieren, während Anionen wegen der Ladungsabstoßung weitgehend ausgeschlossen werden (Imoto et al., 1988; Waxham, 1999). Der 5-HT₃-Rezeptor besitzt eine sehr ähnliche Ionenselektivität, über Struktur und Proteindynamik ist allerdings noch wenig bekannt (Waxham, 1999).

Die Bindung des Agonisten wird innerhalb der α -Untereinheit des Azetylcholin-Rezeptors durch zwei benachbarte Cysteinreste, die eine Disulfidbrücke bilden, vermittelt. Diese Struktur ist auch bei anderen ionotropen Rezeptoren vorhanden. Die Bindung eines Transmitters verursacht eine Konformationsänderung des Kanalproteins im Sinne einer leichten Drehung der TM₂ Segmente um ihre Längsachse, was eine Kanalöffnung bewirkt und dadurch einen Ionenfluss entlang des elektrochemischen Gradienten ermöglicht (Waxham, 1999). Das Schließen der Kanäle kann durch Dissoziation des Agonisten (Deaktivierung) oder durch Desensitisierung erfolgen (Lambert et al., 1989; Yang, 1990; Jones & Westbrook, 1996).

Die molekularen Mechanismen der Desensitisierung sind noch weitgehend ungeklärt. Beim Azetylcholin-Rezeptor des Zebrafischs und beim homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor erfolgt die Desensitisierung offensichtlich durch einen Agonist-induzierten Offenkanalblock (Legendre et al., 2000; Hapfelmeier et al., 2003). Hierbei kommt es nach Bindung des Agonisten erst zur Kanalöffnung, dann blockiert der Agonist die offenen Kanäle. Im Experiment erkennt man dies daran, dass die rasche Entfernung des Agonisten von den Kanälen einen erneuten Stromfluss ("Nach-Strom") bewirkt. Dieser Nach-Strom kommt also durch Aufhebung des Offenkanalblocks zustande.

2.1.2. Desensitisierung und Resensitisierung

Der Begriff Desensitisierung beschreibt die Konformationsänderung eines aktivierten Rezeptors, die das Schließen des Kanals und zusätzlich eine vorübergehende Unempfindlichkeit des Rezeptors gegenüber dem Agonisten bewirkt. Desensitisierung ist eine typische funktionelle Eigenschaft von ligandengesteuerten Ionenkanälen. Man geht davon aus, dass sie eine schnelle Inaktivierung von Ionenkanälen auch unter längerdauernder Anwesenheit des Agonisten ermöglicht und somit die Dauer synaptischer Antworten limitiert.

Die Resensitisierung beschreibt den Übergang der desensitisierten Kanäle zurück in einen aktivierbaren Zustand. Je nach Art des Ionenkanals beträgt die Resensitierungszeit Sekundenbruchteile bis viele Sekunden (Van Hooft & Vivjerberg, 1996; Heckmann & Dudel, 1997). Diese Resensitierungszeit reguliert somit die Antwortfähigkeit einer Synapse auf repetitive Stimulation (Huganir et al., 1986 ; Huganir & Greengard, 1990). Das bedeutet, je kürzer die Resensitierungszeit eines Rezeptors ist, desto höherfrequente Inputs können von

einer Synapse übertragen werden. Demnach sind Desensitisierung und Resensitisierung womöglich wichtige Mechanismen der Kurzzeit-Regulation der synaptischen Übertragungsstärke (synaptische Effizienz).

2.1.3. Beschreibung der Rezeptorkinetik

Um die Kinetik der funktionellen Übergänge eines Ionenkanals, wie z.B. Aktivierung, Öffnung, Desensitisierung und Resensitisierung zu beschreiben, kann man ein Reaktionsschema mit Übergangsraten erstellen. Nach der „*Three-State-Kinetic-Theory*“ (del Castillo, 1957) geht ein Ionenkanal, 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 ist der Kanal für die jeweiligen kanalspezifischen Ionen durchlässig. Der Übergang von Zustand R nach RA wird als „*binding*“ bezeichnet. Die darauffolgende Isomerisierung zum offenen Zustand (O) nennt man „*gating*“ (Abb. 2.2).

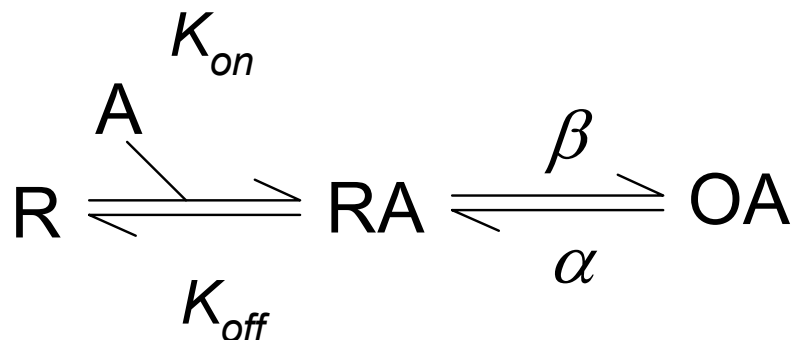


Abb. 2.2 Vereinfachtes Reaktionsschema eines ligandengesteuerten Ionenkanals. Ausgehend vom Ruhezustand (R) geht der Ionenkanal unter Bindung des Agonisten (A) in den gebundenen Zustand (RA) über. Dieser Zustand kann schließlich unter Änderung der Konformation in den offenen Zustand (OA) übergehen. Die Kinetik der Agonisten-Bindung („*binding*“) wird durch die Assoziations- und Dissoziationskonstanten K_{on}/K_{off} bestimmt. Die Raten α und β bestimmen die Öffnungskinetik des Kanals („*gating*“). Die physikalische Einheit der Raten α , β und K_{off} ist 1/s. Die Einheit der Assoziationskonstante K_{on} (1/mol s) ist Ausdruck der Konzentrationsabhängigkeit. In dem abgebildeten Schema sind zur Vereinfachung keine zusätzlichen möglichen Zustände (Desensitisierung, Blockade etc.) angegeben.

Je nach Agonist und Ionenkanal können auch mehrere Bindungsschritte zur Öffnung des Ionenkanals notwendig sein (Coloquhoun, 1981). Die Anzahl der Bindungsschritte lässt sich anhand des Hill-Koeffizienten der Dosiswirkungsbeziehung zwischen Agonist und induzierter Stromantwort abschätzen. Das dargestellte, vereinfachte Reaktionsschema kann durch zusätzliche mögliche Zustände (z.B. Blockierung, Desensitisierung) erweitert werden. Darüber hinaus sind auch unterschiedliche Offenzustände (unterschiedliche Öffnungsdauer, unterschiedliche Ionenleitfähigkeit) denkbar (Coloquhoun, 1981; Coloquhoun, 1985).

2.2. Der 5-HT₃-Rezeptor

Unter den Serotonin-Rezeptoren unterscheidet man derzeit 7 verschiedene Untergruppen (5-HT₁₋₇), die insgesamt 14 strukturell und pharmakologisch unterschiedliche Subtypen bilden. Die verschiedenen Serotonin-Rezeptoren sind an Inhibition und Exzitation innerhalb des zentralen und peripheren Nervensystems beteiligt und steuern darüber hinaus das endokrine System, die Hämatopoese und das Immunsystem. Die meisten Serotonin-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte (metabotrope) Rezeptoren, deren Signaltransduktion über einen *second messenger* reguliert wird. Demgegenüber ist der 5-HT₃-Rezeptor ein ionotroper, also ein ligandengesteuerter Ionenkanal (Barnes & Sharp, 1999).

Die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren führt zu einer erhöhten Aktivität viscerosaffektiver Neurone (Übelkeit), zu einer verminderten synaptischen Ausschüttung von Acetylcholin und Noradrenalin und zu einer vermehrten synaptischen Ausschüttung von GABA und Dopamin (Hüther & Rüther, 2000). Beim 5-HT₃-Rezeptor fungiert das glykosilierte N-Terminal als Bindungsstelle für Serotonin (Eiselé et al., 1993). Die Aktivierung des 5-HT₃-Rezeptors unter Bindung des Agonisten erfolgt gegenüber anderen ionotropen Rezeptoren vergleichsweise langsam (Waxham, 1999). Der Ionenkanal des 5-HT₃-Rezeptors ist kationenselektiv, überwiegend für die monovalenten Ionen Na⁺ und K⁺, aber auch für die divalenten Kationen Ca²⁺ und Mg²⁺ (Yang, 1990; Hargreaves et al., 1994; Barnes & Sharp, 1999).

Der Agonist Serotonin bewirkt nach der Kanal-Öffnung die Desensitisierung der Rezeptoren. Die Desensitisierung kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Durch

Ersatz des 4'Lysin-Rests der TM₂-Domäne bzw. des Leu²⁸⁶ im TM₂-Segment durch andere Aminosäuren kann beim 5-HT₃-Rezeptor die Desensibilisierung verstärkt bzw. abgeschwächt werden (Yakel et al., 1993; Gunthorpe et al., 2000). Auch die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und der Differenzierungsstatus der Zellen beeinflussen die Rezeptor-Desensibilisierung (Shao et al., 1991; Lobitz et al., 2001).

2.2.1. Die Untereinheiten des 5-HT₃-Rezeptors

Derzeit kennt man drei verschiedene Untereinheiten des 5-HT₃-Rezeptors: 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B} und 5-HT_{3C}. Die 1991 aus Neuralgewebe der Maus (1995 aus Humangewebe) klonierte 5-HT_{3A}-Untereinheit besteht aus 487 Aminosäuren (56 kD). Die Sequenz ähnelt der anderer ligandengesteuerter Ionenkanäle (Azetylcholin-, GABA_A- und Glycin-Rezeptoren). Diese haben alle eine Cystein-Schleife in der N-terminalen Domäne (Mariat et al., 1991; Belelli et al., 1995).

Den 5-HT_{3A}-Rezeptor von Maus und Meerschweinchen gibt es in zwei Splicevarianten, eine Langform (5-HT_{3Al}) und eine Kurzform (5-HT_{3AS}), bei der sechs Aminosäuren in der großen intrazellulären Schleife fehlen. Die Kurzform überwiegt um das 4-6 -fache. Der Rezeptor kann an verschiedenen intrazellulären Stellen phosphoryliert werden. Eine dieser Phosphorylierungsstellen ist bei der Kurzform nicht vorhanden. Allerdings konnten bisher keine physiologischen Unterschiede zwischen den beiden Varianten nachgewiesen werden. Diese Splicevarianten gibt es im humanen Genom nicht (Werner et al., 1994; Barnes & Sharp, 1999).

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 homopentameres 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. Einige funktionelle Unterschiede zwischen nativen 5-HT₃-Rezeptoren und den heterolog exprimierten homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptoren gaben jedoch Anlass zur Vermutung, dass die nativen Rezeptoren einen zusätzlichen Faktor, möglicherweise eine noch unbekanntes Untereinheit, enthalten (van Hooft et al., 1997). Im Jahr 1999 wurde schließlich

diese Untereinheit, die sog. 5-HT_{3B}-Untereinheit, aus menschlichem Gewebe (Davies et al., 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 heteropentameres 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 einige biophysikalische Unterschiede auf. Der 5-HT_{3AB}-Rezeptor besitzt beispielsweise eine wesentlich höhere Einzelkanal-Gesamt-Leitfähigkeit, wobei die Leitfähigkeit für Ca²⁺ bei diesem Kanal geringer ist (Davies et al., 1999). Somit könnte eine differentielle Koexpression der 5-HT_{3B}-Untereinheit bei nativen 5-HT₃-Rezeptoren die unterschiedlichen Befunde hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften erklären (Yang et al., 1992; Hussy et al., 1994; Fletcher & 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).

2.2.2. Verteilung der 5-HT₃-Rezeptoren in Hirnarealen

Die Region mit der höchsten Dichte an 5-HT₃-Rezeptoren liegt im hinteren vagalen Komplex des Hirnstamms. Dieses mit der Physiologie des Brechreiz 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. In der Area postrema und im Nucleus tractus solitarius wurde allerdings keine für den 5-HT₃-Rezeptor kodierende mRNA nachgewiesen. Dies lässt auf eine präsynaptische Lokalisation der Rezeptoren schließen (Pratt & Bowery, 1989).

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-Rezeptor-Konzentrationen (Parker et al., 1996; Barnes & Sharp, 1999).

Innerhalb des Hippocampus findet sich 5-HT₃-Rezeptor-mRNA insbesondere in GABAergen Interneuronen (oft zusammen mit Cholezystokinin-mRNA). Dies könnte bedeuten, dass die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren die Freisetzung von GABA beeinflusst. Dadurch würden 5-HT₃-Rezeptoren über eine Erregung GABAerger Interneurone indirekt Kortexneurone hemmen (Tecott et al., 1993). Diese 5-HT₃-Rezeptoren finden sich aber nur in einer bestimmten Gruppe von GABAergen Interneuronen (die das Ca²⁺-Bindungsprotein Calbidin enthalten) innerhalb der Hippocampusregionen CA1-CA3 (Morales et al., 1996; McMahon & Kauer, 1997). Auch innerhalb der Basalganglien exprimieren GABAerge Interneurone 5-HT₃-Rezeptoren (Steward et al., 1993).

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

Weiterhin lassen sich präsynaptisch und postsynaptisch lokalisierte 5-HT₃-Rezeptoren unterscheiden. Die Aktivierung präsynaptischer 5-HT₃-Rezeptoren des Striatums erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration (Rondé & Nichols, 1998). Postsynaptische 5-HT₃-Rezeptoren hippocampaler Interneurone werden bei negativen Membranpotenzialen durch Ca²⁺-Ionen blockiert (McMahon & Kauer, 1997). Ob die Signaltransduktion durch den Ca²⁺-Einstrom über die 5-HT₃-Rezeptor-Kanäle oder durch spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle erfolgt, ist noch nicht bekannt (van Hooft & Vijverberg, 2000).

2.2.3. Physiologie und Pharmakologie

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) wurde bereits vor über 50 Jahren im Serum entdeckt (Rapport, 1949). Die Benennung des Transmitters erfolgte aufgrund seiner zunächst erkannten Funktion als Vasokonstriktor. Die Biosynthese von 5-HT geht von Tryptophan aus (Abb. 2.3). Neben 5-HT ist auch Dopamin ein endogener Transmitter des 5-HT₃-Rezeptors. Die Affinität von 5-HT zur Transmitter-Bindungsstelle am 5-HT₃-Rezeptor ist im Vergleich zu einigen nicht natürlichen Agonisten relativ gering. (Nejt et al., 1986). Neben der Aktivierung von 5-HT-Rezeptoren ist 5-HT ein partieller Agonist an α_2 -Adrenorezeptoren (Allgaier et al., 1995; Schlicker et al., 1994). Weiterhin verstärkt 5-HT die Freisetzung von

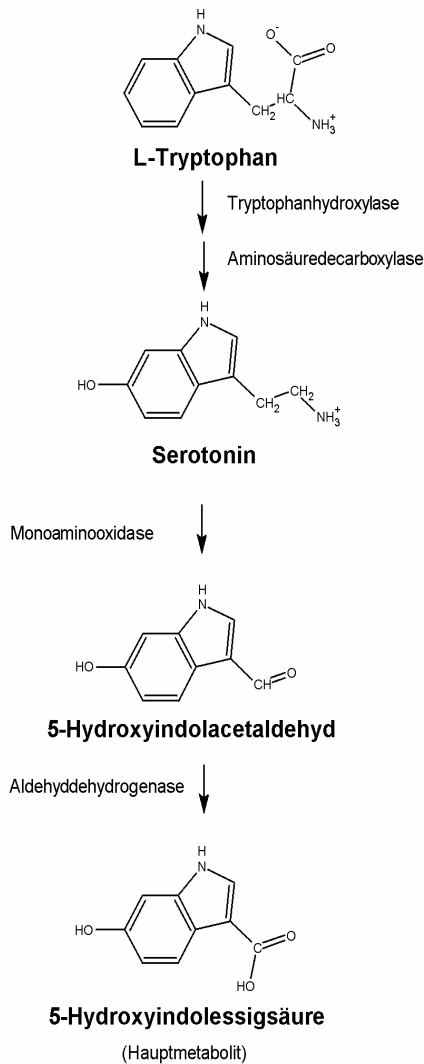


Abb. 2.3: Biometabolismus des Neurotransmitters 5-HT: Synthese aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan durch Hydroxylierung am Indolring und anschließender Decarboxylierung. Der Abbau erfolgt über die mitochondriale Monoaminoxidase A zu 5-Hydroxyazetaldehyd und anschließender Dehydrierung zu 5-Hydroxyindolazetat (Ausscheidung/d: 10-40 μmol). (modifiziert nach Löffler & Petrides, 1998)

Dopamin. Dies erfolgt nicht durch die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren, sondern ist möglicherweise die Folge einer erhöhten präsynaptischen 5-HT-Aufnahme durch Dopamin-Rezeptoren (Schmidt & Black, 1989; Yi et al., 1991; Campbell & McBride, 1995).

Es gibt neben 5-HT weitere, z.T. nicht natürliche 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten, wie 2-Methyl-5-HT, 1-Phenylbiguanid (PBG), Methylcyclophenylbiguanid (mCPBG).

Wie potent der jeweilige Agonist auf den 5-HT₃-Rezeptor wirkt, hängt von Spezies und von der Untereinheiten-Zusammensetzung ab (Tabelle 2.1).

Die Agonisten 5-HT und 2-Me-5-HT wirken dosisabhängig und mit ähnlicher Potenz am homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor, sind aber am heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptor unterschiedlich potent (Davies et al., 1999, Brown et al., 1998). Große Speziesunterschiede zeigen die beiden Agonisten PBG und mCPBG am 5-HT₃-Rezeptor. So wirkt mCPBG bei Mäuserezeptoren viel potenter als bei Meerschweinchenrezeptoren (Davies et al., 1999). Obwohl der Agonist PBG bei den 5-HT₃-Rezeptoren der Ratte und der Maus als Agonist wirkt, ist er bei den 5-HT₃-Rezeptoren des Meerschweinchens völlig wirkungslos (Lankiewicz et al., 1998). In Tabelle 2.1 sind einige Agonisten und Antagonisten des 5-HT₃-Rezeptors mit der entsprechenden halbmaximalen effektiven (EC₅₀) bzw. inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) aufgelistet.

	Maus	human		Meerschweinchen	
	5-HT _{3A}	5-HT _{3A}	5-HT _{3AB}	5-HT _{3A} GP ₁	5-HT _{3A} GP _s
Agonisten	EC ₅₀				
5-HT	2,9 µM ² 1,4 µM ⁵	2,9 µM ¹ 2,3 µM ² 3,0 µM ⁷	6,0 µM ¹ 25,0 µM ⁷	2,9 µM ²	3,8 µM ²
2-Me-5-HT	2,3 µM ²	4,1 µM ¹ 2,8 µM ²	12,1 µM ¹	2,7 µM ²	2,5 µM ²
PBG	12,5 µM ²	41,2 µM ²		> 1000 µM ²	>1000 µM ²
mCPBG	0,55 µM ² 0,4 µM ⁵	2,5 µM ¹ 1,9 µM ²	2,1 µM ¹	13,3 µM ²	15,1 µM ²
Antagonisten	IC ₅₀				
Metoclopramid	0,11 µM ² 25,1 nM ⁶	0,29 µM ²		3,4 µM ²	5,6 µM ²
Pentobarbital		127 µM ³			
Methohexital		95 µM ³			
Ondansetron	~0,25 nM ⁶	103 pM ⁴			
Tubocurarin	~0,85 nM ⁶	2,8 µM ⁴ 3,4 µM ¹	14,2 µM ¹		
Cocaine	~7,9 µM ⁶	459 nM ⁴			

Tab 2.1: Agonisten und Antagonisten am 5-HT₃-Rezeptor von Mensch, Maus und Meerschweinchen. ¹Davies et al., 1999; ²Lankiewicz et al. 1998; ³Barann et al., 2000; ⁴Brown et al., 1998; ⁵van Hooft & Vivjerberg, 1996; ⁶Malone et al., 1991; ⁷eigene Ergebnisse

Wenig bekannt ist bisher über die Bedeutung des 5-HT₃-Rezeptors in der Psychopharmakologie. Einige Neuroleptika und Antidepressiva haben eine inhibitorische Wirkung am 5-HT₃-Rezeptor (Tab. 2.2). Möglicherweise wirken 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten auch anxiolytisch (Jones & Piper, 1994). Die antagonistische Wirkung von Clozapin am 5-HT₃-Rezeptor spricht für die postulierte antipsychotische Wirkung von 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten (Costall & Naylor, 1994a, Brunello et al, 1995). Die cholinerge Wirkung von 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten soll auch zur Verbesserung von kognitiven Leistungen beitragen (Costall & Naylor, 1994b).

Substanzklasse	Präparat	Mechanismus	Effekt am 5-HT ₃ -Rezeptor	
Neuroleptika - „hochpotente“	Flupentixol (Fluanxol [®])	nicht-kompetitiv ¹	inhibitorisch	
	Haloperidol (Haldol [®])	nicht-kompetitiv ¹	inhibitorisch	
	- „niedrigpotente“	Levomepromazin (Neurocil [®])	nicht-kompetitiv ¹	inhibitorisch
- „atypische“	Risperidon (Risperidal [®]) Clozapin (Leponex [®])	nicht-kompetitiv ¹ Kompetitiv ²	inhibitorisch inhibitorisch	
Antidepressiva - trizyklische	Desipramin (Pertofran [®])	nicht-kompetitiv ³	inhibitorisch	
	Imipramin (Tofranil [®])	nicht-kompetitiv ⁴	inhibitorisch	
	- tetrazyklische	Mirtazapin (Remergil [®])	Kompetitiv ³	inhibitorisch
	- selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer	Fluoxetin (Fluctin [®])	nicht-kompetitiv ³	inhibitorisch
	- selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer	Reboxetin (Edronax [®])	nicht-kompetitiv ³	inhibitorisch
- Monoaminoxidase-A Hemmer (reversibel)	Moclobemid (Aurorix [®])		Kein ³	

Tab 2.2: Darstellung des Wirkmechanismus einiger Psychopharmaka. ¹Rammes et al., eingereicht ; ²Hermann et al. 1996 ; ³Eisensamer et al., 2003 ; ⁴Fan, 1994

Darüber hinaus beeinflussen auch andere Pharmaka 5-HT₃-Rezeptor-Antworten. Volatile Anästhetika (Methoxyfluran > Enfluran > Halothan > Isoflurane) verstärken 5-HT₃-Rezeptor-Antworten bereits unterhalb klinisch relevanter Konzentration. Auch die Alkohole Ethanol, Methanol und Butanol verstärken bereits in niedrigen Konzentrationen die agonistische Wirkung von Serotonin (Machu & Harris, 1994; Jenkins et al. 1996).

2.3. Die Patch-Clamp Technik

Ionenkanäle sind für die Aufrechterhaltung und Veränderung von Membranpotentialen zuständig. Die Untersuchung von Leitfähigkeit, Kinetik und Pharmakologie von spannungs- und ligandengesteuerten membranständigen Ionenkanälen wird durch die Patch-Clamp Technik ermöglicht. Dabei wird mit der Spitze einer sehr fein ausgezogenen Glaspipette

entweder eine ganze Zelle (sogenannte Whole-cell Patch) oder nur ein kleines Membranstück (patch = "Flicken") aufgenommen (Hamill et al., 1981). Dabei wird die Pipettenöffnung durch die Zelle bzw. durch das jeweilige Membranstück verschlossen und bildet dort eine elektrische Barriere. Die mit der Pipette verbundene Verstärker-Apparatur registriert den Ionenfluss, der die membranständigen Ionenkanäle passiert.

Diese Methode wurde erst in den 70er Jahren von Erwin Neher und Bert Sackman am Max-Planck-Institut in München entwickelt und stellt ein spezielles Voltage-Clamp-Verfahren (Spannungsklemme) dar. Mit dieser Apparatur werden Veränderungen des Membranpotenzials ausgeglichen, indem an der Spannungsklemme ein Kompensationsstrom erzeugt wird, der dem transmembranären Strom entgegengerichtet ist. Dabei wird das Membranpotenzial 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 (Numberger & Draguhn, 1996).

Die Unterdrückung und Filterung von Stör- und Rausch-Signalen stellt die eigentliche technische Schwierigkeit der Patch-Clamp-Technik dar. Wichtig ist, dass zwischen Zellmembran und Pipettenspitze ein hoher elektrischer Abdichtwiderstand besteht. Durch Anlegen eines Unterdrucks im Pipetteninneren kann ein Abdichtwiderstand im $G\Omega$ -Bereich („Giga-seal“) erzeugt werden. So kann man bei ausreichender Reduzierung des Rausch-Signals Ionenströme im pico-Ampere-Bereich registrieren (Numberger & Draguhn, 1996).

2.3.1. Verschiedene Patch-Clamp-Konfigurationen

Man kann bei der Patch-Clamp-Technik je nach Fragestellung oder experimentellen Bedingungen unterschiedliche Membran-Konfigurationen verwenden. So unterscheidet man die Whole-Cell-, Outside-out-, Inside-out- und Cell-attached- Konfiguration. Die Konfigurationen sind sehr unterschiedlich in ihren Eigenschaften, Vor- und Nachteilen und auch für die Vorgehensweise des jeweiligen Versuchs.

Bei der Whole-Cell-Konfiguration (Abb. 2.4 A) hat die Messelektrode einen direkten Kontakt zum Intrazellulärraum einer ganzen Zelle (daher "Whole-Cell"). So ist es möglich alle auf der Zelle ablaufenden elektrischen Vorgänge als Summationsströme aufzuzeichnen. In Abb. 2.4 A ist als Beispiel ein Summenstrom aus Einzelkanalströmen von ca. einigen

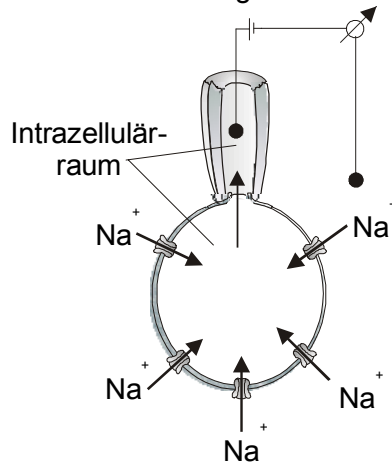
Tausend 5-HT_{3A}-Rezeptoren dargestellt. Dieser Strom besteht bei den gewählten experimentellen Bedingungen aus einem Na⁺-Ionenfluss. Der Strom entspricht einem Einwärtsstrom, der nach den üblichen Konventionen ein negatives Vorzeichen hat.

Zum Erfassen und Aufzeichnen von Antworten einzelner Kanäle, verwendet man die Outside-Out- oder Inside-Out-Konfiguration. Hierbei wird von einer am Boden der Kultur-Schale anhaftenden Zelle ein Membran-Flicken (Patch) förmlich herausgerissen. Dieser Flicker bildet durch die Membranspannung eine Art Halbvesikel um die Pipettenspitze (vgl. Abb. 2.4 C). Diese Technik eignet sich besonders zur Single-Channel-Ableitung, da sich unter der Pipettenspitze nur noch sehr wenige Ionenkanäle befinden. (Die Inside-Out-Konfiguration unterscheidet sich von der Outside-Out-Konfiguration dadurch, dass hier die extrazelluläre Zellmembranseite dem Pipetteninneren zugewandt ist. Der Inside-Out-Konfiguration wird in den nachfolgenden Experimenten nicht verwendet.)

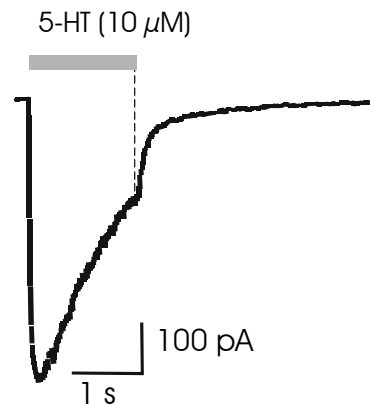
So wird bei der Single-Channel-Ableitung im Vergleich zur Whole-Cell-Ableitung das Öffnen und Schließen individueller Kanäle aufgezeichnet. Diese Signale werden in einem rechteckigen Kurvenverlauf aufgenommen. Die Grundlinie entspricht einem Zustand, bei dem der Kanal geschlossen ist (Zeitsummutation über die Grundlinie = Geschlossenzeit). Sobald der Strom auf ein höheres Niveau springt, spricht man vom Offenniveau, bei dem Ströme durch den Kanal fließen (Zeitsummutation über das Offenniveau = Offenzeit) (Numberger & Draguhn, 1996).

Eine weitere Möglichkeit zur Aufnahme von Einzelkanalströmen ist die Cell-Attached-Konfiguration (s. Abb. 2.4 B). Bei dieser Konfiguration, die eine Vorstufe zur Ganzzelleableitung darstellt, werden Single-Channel-Aufnahmen an einer intakten Zelle durchgeführt. Vorteilhaft ist dabei, dass die Intrazellulärflüssigkeit nicht verändert wird und die Kanäle können noch immer durch zelleigene Enzyme und Second-messenger Systeme beeinflusst werden können. Außerdem bleibt bis auf das kleine Membranstück unterhalb der Pipette das zelleigene Membranpotenzial erhalten. An dieser Stelle entspricht das Membranpotenzial dem Ruhemembranpotenzial (ca. -60 mV) der Zelle abzüglich dem angelegten Pipettenpotenzial (z.B. +30 mV), also -90 mV (Numberger & Draguhn, 1996). Das Zelläußere ist in dieser Konfiguration dem Pipetteninneren zugewandt, so dass Ströme, die in die Zelle hinein fließen, aus der Pipette heraus fließen, und damit auch diese Ströme von der Nulllinie aus gesehen nach oben aufgezeichnet werden. Dazu muss zusätzlich ein positives Potenzial angelegt werden (Numberger & Draguhn, 1996).

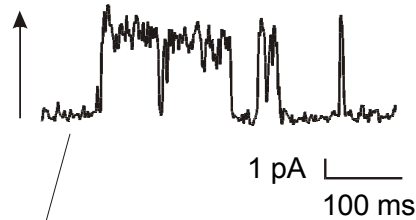
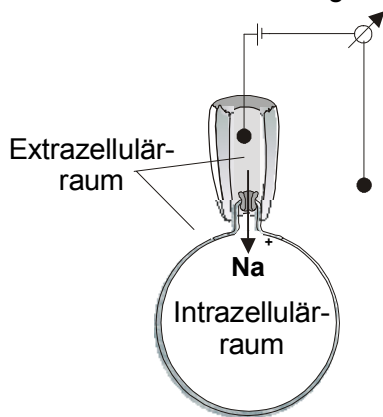
A: Whole-Cell-Konfiguration



Stromantworten:



B: Cell-Attached-Konfiguration



Nulllinie

C: Outside-Out-Konfiguration

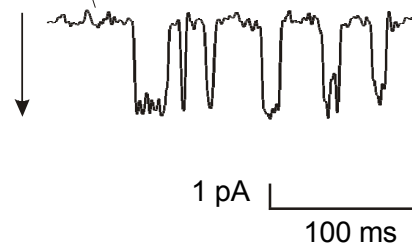
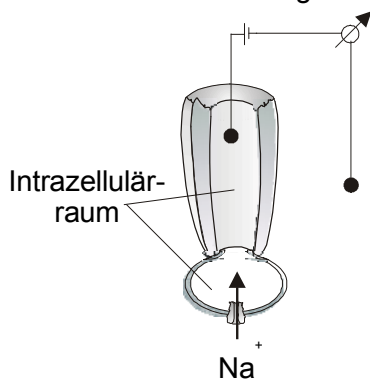


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen und die dazugehörige Stromantwort jeweils am Beispiel einer Serotonin-Applikation an Zellen mit 5-HT_{3AB} -Rezeptoren. **A** zeigt eine Whole-Cell-Konfiguration. Hier werden alle auf der Zelle befindlichen Kanäle erfasst (Summenstrom). **B** Bei der Cell-Attached-Konfiguration werden nur Ströme der Kanäle registriert, die sich direkt unter der Pippettenspitze befinden. Die Kanalöffnungen werden bei der Aufzeichnung nach oben abgebildet. **C** zeigt die Outside-Out-Konfiguration. Die aufgezeichneten Ströme werden nach unten abgebildet.

2.3.2. Applikationsverfahren

Die Zelle oder Zellmembran, die sich an der Pipettenspitze befindet, stellt ein Modell für die postsynaptische Membran bzw. für das postsynaptische Neuron dar. Die umgebende Badlösung entspricht dabei dem Milieu des synaptischen Spaltes. Die besondere Schwierigkeit besteht nun darin, auch für die Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt ein geeignetes Modell zu schaffen. So wird beispielsweise im synaptischen Spalt einer GABAergen Synapse ein sehr schneller (< 1 ms) GABA-Gradient erzeugt (Maconochie et al., 1994; Jones und Westbrook, 1995). Aufgrund Diffusion und Wiederaufnahme in die Präsynapse fällt dieser Gradient innerhalb von Millisekunden wieder ab (Clements, 1996). Um im Rahmen von Patch-Clamp-Untersuchungen ligandengesteuerter Ionenkanäle eine derart schnelle Transmitterfreisetzung mit Bildung kurzer Transmittergradienten nachzuahmen, wurden verschiedene langsame und schnelle Perfusions- bzw. Applikationsverfahren entwickelt.

Bei den ursprünglichen langsameren Verfahren wird die Transmitterlösung schwerkraftgetrieben über Schlauchsysteme appliziert; ein Lösungswechsel erfolgt innerhalb von Sekunden bis Minuten unter Austausch der gesamten Badlösung. Diese Verfahren sind zur Erfassung der schnellen Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik ligandengesteuerter Ionenkanäle wenig geeignet (Numberger & Draguhn, 1996).

Bei schnelleren Applikationssystemen, wie z. B. beim „U-Tube“-Verfahren (siehe Abb. 2-11) wird hingegen ein vollständiger Lösungswechsel in der Umgebung der Zelle binnen etwa 100 ms ermöglicht (Numberger & Draguhn, 1996). Die sehr schnelle Aktivierung ionotroper Kanäle innerhalb weniger Millisekunden kann man dadurch jedoch nicht beurteilen, da es zu einer Limitierung der zeitlichen Auflösung durch die Transmitteranflutung kommt. Im Anschluss erfolgt die Entfernung des Transmitters passiv durch Abdiffusion. Daher wird die

U-tube

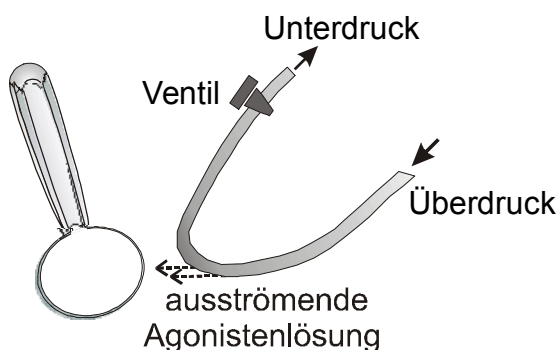


Abb. 2.5: Bei dem „U-Tube-Verfahren“ strömt die Agonistenlösung durch ein U-förmiges Glasrohr und wird bei Ventilschluss durch eine zentrale Öffnung appliziert (Abb. modifiziert nach Numberger & Draguhn, 1996).

Inaktivierung der transmitterinduzierten Ionenströme nicht durch die spezifische Inaktivierungskinetik der Ionenkanäle, sondern vor allem durch die Abflutungsgeschwindigkeit des Transmitters bestimmt. 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 piezogesteuerte Applikationssystem entwickelt (Franke et al., 1987), mit dem Austauschzeiten der Flüssigkeiten von weniger als 100 μ s erreicht werden können (nähere Erläuterung in Kap. 4.2.4).

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 (McCray & Trentham, 1989). Die Desapplikation des Transmitters erfolgt aber durch passive Abdiffusion.

2.3.3. Heterologe Expressionssysteme

Zur Untersuchung von Ionenkanälen mit einer ganz bestimmten Untereinheitenzusammensetzung werden heterologe Expressionssysteme benötigt. 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 exprimieren kann (Numberger & Draguhn, 1996). Die Kulturzelllinie HEK 293 ist neben *Xenopus laevis* Oozyten, Mausfibroblasten und HeLa-Zellen eine häufig verwendete Kulturzelllinie aufgrund einfacher Kultivierungs- und Transfektionseigenschaften (Numberger & Draguhn, 1996).

Bei der Anwendung eines heterologen Expressionssystem geht man wie folgt vor: Zunächst muss das zu untersuchende Protein kloniert werden, d. h. die zugehörige mRNA wird detektiert, cDNA umgeschrieben und anschließend in Plasmide eingebaut, die als Transfektionsvektoren dienen. 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 wenige Tage exprimiert. Dagegen kann bei stabiler Transfektion das Protein dauerhaft exprimiert werden, da seine DNA in das Genom in die Zelllinie eingebaut wird. Stabile Transfektion kann z. B. durch einen Selektionsdruck erreicht werden (Numberger & Draguhn, 1996).

Die Zellmembran stellt eine Barriere für die Transfektion dar, da die DNA die Zellmembran überwinden muss, 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 eingeschleust werden (Petrides, 1997a). Die sog. „Genkanone“ ist eine Methode, bei der die Zellen mit DNA-beladenen Goldpartikeln „beschossen“ werden (Yang et al., 1990). Bei der Elektroporation wird die Zellmembran in einem elektrischen Feld vorübergehend für die Plasmide durchlässig. Diese Methode wurde für unsere Versuche verwendet (Numberger & Draguhn, 1996).

Die in dieser Arbeit verwendeten HEK 293-Zellen, die in nativer Form keine 5-HT₃-Rezeptoren exprimieren, wurden zur Expressierung des 5-HT_{3AB}-Rezeptors mit Hilfe von Elektroporation transient transfiziert (Details s. Kap. 4.1.).

3. Fragestellung

Neuronale Mechanismen, die durch den 5-HT₃-Rezeptor vermittelt werden, gewinnen zunehmend klinische und pharmakologische Bedeutung. Dieser Ionenkanal ist beispielsweise am Chemotherapie-induzierten Erbrechen beteiligt. Bestimmte 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten, wie Ondansetron und Tropisetron, werden als Antiemetika eingesetzt (Jones & Blackburn, 2002). Die 5-HT₃-Rezeptoren spielen zudem im Schmerzgeschehen eine wichtige Rolle (Kiefel et al., 1992; Ali et al., 1996). Einige neuere Antidepressiva haben als selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) ihren Wirkort an präsynaptischen Serotonintransportern (Hüther & Rüther, 2000). Nach neuesten Erkenntnissen hemmen verschiedene Antidepressiva zudem die Aktivität des 5-HT₃-Rezeptors (Eisensamer et al., 2003). Die hierfür verantwortlichen Wirkmechanismen sind jedoch bislang unbekannt. Dies liegt u.a. daran, dass man Quartärstruktur und Biophysik der 5-HT₃-Rezeptoren noch kaum kennt.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die kinetischen Eigenschaften des heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptors zu untersuchen. Dieser in HEK 293-Zellen heterolog exprimierte Kanal dient hierbei als Modell für native 5-HT₃-Rezeptoren. Als Modell für die synaptische Transmitterfreisetzung verwenden wir eine Piezo-gesteuerte Vorrichtung zur schnellen Transmitterapplikation. Dadurch erreichen wir eine hohe zeitliche Auflösung der Transmitter-induzierten Ströme. Diese Rezeptor-vermittelten Antworten stellen ein Modell für serotonerge synaptische Antworten dar. Sie erlauben zudem die Beurteilung verschiedener biophysikalischer Eigenschaften des 5-HT_{3AB}-Rezeptors. Dazu gehören die Aktivierungskinetik sowie die Desensibilisierung und Deaktivierung der Rezeptoren. Diese Mechanismen sollen anhand eines kinetischen Modells beschrieben und mit denen des bisher untersuchten homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptors verglichen werden. Dieser ebenfalls heterolog exprimierte Rezeptor diente bislang als 5-HT₃-Rezeptor-Modell, dessen physiologische Relevanz seit der Klonierung der 5-HT_{3B}-Rezeptor-Untereinheit als begrenzt gilt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen die Funktionsweise von 5-HT₃-Rezeptoren *in situ* aufklären helfen.

4. Methodik

4.1. Zellkultur und Rezeptorexpression

Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) werden in einem Minimal-Essential-Medium (MEM) kultiviert. Dieses wird mit 4 mM L-Glutamin, 10% fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin supplementiert (FKS und MEM: s. Anhang). Die Inkubation der Zellkulturen erfolgt in Petrischalen (100 x 20 mm) bei 5% CO₂, 95% Luft, 37°C und 100% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubationsschrank (Haeraeus). Unter sterilen Bedingungen wird dreimal wöchentlich das alte Medium entfernt, die adhären Zellen werden mit 3 ml PBS-Puffer (Rezeptur, s. Anhang) gewaschen, mit 2 ml Trypsinlösung (100 µg/ml) vom Boden der Petrischalen losgelöst und nach 1-2 min mit 3 ml MEM resuspendiert. Nach Zentrifugation (4 min, 1200 U/min) wird der Überstand vollständig entfernt und die Zellen werden in 10 ml MEM pro Schälchen (20x100 mm) unter Halbierung der Zellkonzentration ausgesät.

Die 5-HT_{3AB}-Rezeptoren werden durch Transfektion transient (für ca. 20-40 h) exprimiert. Dies erfolgt durch Elektroporation 12-18 Stunden vor den Patch-Clamp-Experimenten. Das Plasmid pCDM8 mit cDNA für die humane 5-HT_{3A}- bzw. 5-HT_{3B}-Untereinheit (5-HT_{3A}-Untereinheit: Nukleotide 217-1663; Genbank-Zugriffsnummer: D49394; 5-HT_{3B}-Untereinheit: Nukleotide 55-1393 Genbank-Zugriffsnummer: AF080582) dient als Transfektionsvektor. Eine weitere cDNA für GFP (grün fluoreszierendes Protein) wird als Expressionsmarker cotransfiziert. Zellen, die unter Anregung (460 nm) grün fluoreszieren, exprimieren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auch einen funktionellen 5-HT₃-Rezeptor.

Zur Transfektion werden die HEK 293-Zellkulturen einer Petrischale nach Waschen mit PBS-Puffer, nach Ablösen mit Trypsin und Abzentrifugieren (1000 U/min, 4 min) in 1950 µl Elektroporationspuffer und 50 µl Magnesiumsulfatlösung (genaue Zusammensetzung beider Lösungen: siehe Anhang) wieder resuspendiert. 400 µl dieser Zellsuspension werden mit je 6 µg GFP-Plasmid und 3 µg der Plasmide für die Rezeptoruntereinheiten versetzt. Abhängig vom Transfektionserfolg der vorangegangenen Elektroporation erfolgt die Elektroporation bei 350 V und 1 mF. Je 80-120 µl der elektroporierten Zellsuspension werden

in Petrischalen (35 x 10 mm) gegeben und bis zur Durchführung der Experimente bei 5% CO₂, 95% Luft, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 37° C inkubiert.

Nach der Inkubation exprimierten 5-30% der transfizierten Zellen das im Zytoplasma gelöste GFP. Stromantworten durch den Agonist Serotonin wurden an über 50% der grün fluoreszierenden Zellen induziert. Die Kinetik der 5-HT₃-Rezeptor-vermittelten Ströme von HEK 293-Zellen mit oder ohne ko-exprimiertem GFP unterschied sich nicht. Eine Lösung ohne Agonist löste keine Zellantworten aus. Nicht transfizierte HEK 293-Zellen induzierten ebenfalls keine Stromantworten.

4.2. Elektrophysiologie

4.2.1. Allgemeines

Zur Durchführung der Experimente wurde das MEM durch Extrazellulärlösung (Rezeptur: siehe Anhang) ersetzt. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (20-23° C) durchgeführt. Gemessen wurden Agonist-induzierte Einwärtsströme in der Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzelleableitung) und Single-Channel-Aufnahmen in der Outside-Out-Konfiguration.

Zur Herstellung der Patch-Pipetten werden Glaspipetten-Rohlinge aus Borosilikat verwendet (Innendurchmesser 1,17 mm, Außendurchmesser 1,5 mm; GC150TF-10, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, UK). Die Messelektroden werden mit einem Elektrodenziehgerät im Zweizugverfahren hergestellt. Zuerst wird die Pipette durch eine Glühwendel in der Mitte angeschmolzen und dabei um ca. 1 cm ausgezogen). In einem zweiten Schritt erfolgt ein weiteres Auseinanderziehen, bis die Pipette an der dünnsten Stelle reißt. Zuletzt werden die ausgezogenen Enden noch mit der Glühwendel hitzepoliert.

Für Single-Channel-Aufnahmen wird jede Pipette zur Verringerung des Hintergrundrauschens mit der hydrophoben Substanz Sylgard[®] 184 (Dow Corning) beschichtet und bei 150° C 15 Minuten lang getrocknet.

Die zwei entstandenen Pipetten werden mit Intrazellulärlösung (Rezeptur: siehe Anhang) gefüllt und haben dann einen seriellen Widerstand von 4-9 MΩ.

4.2.2. Die Whole-Cell-Konfiguration

Bei der Patch-Clamp-Technik unterscheidet man verschiedene Messkonfigurationen. Bei der Whole-Cell-Konfiguration werden Stromantworten aller Ionenkanäle der gesamten Zellmembran erfasst. Um diese Konfiguration zu erreichen, wird zunächst die Pipettenspitze unter Mikroskopsicht vorsichtig an die Zellmembran einer am Schälchenboden adhärenen Zelle herangeführt. Bei Berührung der Zellmembran verringert sich der serielle Pipettenwiderstand. Dies wird dadurch deutlich, dass sich die Stromantwort eines über die Pipettenöffnung angelegten Spannungspuls von 1 mV verkleinert. Durch Ausüben eines Sogs auf das Pipetteninnere wird die Zellmembran in die Pipettenöffnung ein Stück weit eingezogen. In diesem Moment hat man die sogenannte Cell-Attached-Konfiguration erreicht. Dabei sinkt Stromfluss durch die Pipettenspitze, der durch die Kommandospannung erzeugt wird, 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 perforiert und damit die Whole-Cell-Konfiguration hergestellt. Dies kann man anhand der Lade- und Entladeströme der nun als Kondensator wirkenden Zellmembran (sogenannte kapazitive Artefakte) sehen. Dabei soll der hohe Abdichtwiderstand zwischen Pipettenspitze und Zellmembran erhalten bleiben. Liegt dieser Widerstand im GΩ-Bereich spricht man vom sog. Giga-seal.

Mit Hilfe des Patch-Clamp-Verstärkers (Axopatch 200b) legt man nun eine Clamp-Spannung an. Diese 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 mit einem Tiefpassfilter (2 kHz) gefiltert. Als Software wird pClamp 6.0 von Axon Instruments Inc. (Foster City, CA, USA) verwendet.

4.2.3. Single-Channel-Ableitung

Im Gegensatz zu Rezeptor-Antworten, die in der Whole-Cell-Konfiguration aufgezeichnet werden, sind Einzelkanal-Ströme (Single-Channel) wesentlich kleiner. Sie können daher stärker durch Artefakte, wie elektrisches Brummen oder Rauschen, verfälscht sein. Dies stellt höhere Anforderungen an die Messapparatur, insbesondere hinsichtlich einer Verringerung des sog. kapazitiven Rauschens. Man erreicht dies dadurch, indem man einen hohen Abdichtwiderstand (Seal) zwischen Pipette und Membran-Patch erzielt und damit Leckströme vermeidet.

5-HT₃-Rezeptor-vermittelte Single-Channel-Ströme werden durch Applikation von 5-HT evoziert. Die Aufzeichnung erfolgt in Outside-Out-Konfiguration bei -50 mV oder in Cell-Attached-Konfiguration bei +30 mV mittels 'Axopatch 200B' Patch-Clamp-Verstärker (pClamp 6.0 Software, Tiefpassfilter 1 kHz, Digitalisierungsrate 10 kHz).

Die Histogramme der Amplituden der aufgezeichneten Single-Channel-Ströme zeigen eine einfache Gauß-Verteilung. Die mittlere Offenzeit der Kanäle (Dauer der Single-Channel-Ströme) wird anhand einer monoexponentiellen Marquardt-Verteilung der Offenzeiten innerhalb einer Messung ermittelt. Für diese Berechnung wird eine minimale "Eventdauer" (Öffnungszeit) von 2,4 ms eingesetzt.

4.2.3.1. Die Outside-Out-Konfiguration

Eine Outside-Out-Konfiguration erhält man, wenn man nach Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration die Pipette langsam axial zurückzieht. Die Zelle muss dabei am Schälchenboden anhaften. Dabei wird der an der Pipette anhaftende Membranbereich dünn ausgezogen. Reißt dieser "Faden" ab, bildet sich im günstigen Fall ein die Pipettenöffnung verschließendes Membranstück, der Flicker (Patch). Ist diese Abdichtung auch elektrisch dicht (Giga-seal) und weist die Membranaußenseite nach außen, spricht man von einem Outside-Out-Patch.

Wie bei der Whole-Cell-Ableitung werden in Outside-Out-Konfiguration Einwärtsströme aufgezeichnet, die nach der Vorzeichen-Konvention nach unten abgebildet sind (Abb. 2.4).

4.2.3.2. Die Cell-Attached-Konfiguration

Bei dieser Messanordnung wird lediglich die zum Erreichen einer Whole-Cell-Konfiguration notwendige Membran-Perforation unterlassen. Da man auf die Zelle "aufsetzt", füllt man die Pipette mit Extrazellulärflüssigkeit, die den Transmitter enthält. Dieser aktiviert Rezeptoren, die sich unter der Pipettenöffnung befinden (Abb. 2.4). Allerdings sind dafür zehnfach bis hundertfach höhere Agonistenkonzentrationen (verglichen mit Whole-Cell- oder Outside-Out-Ableitungen) notwendig. Das könnte u.a. daran liegen, dass die Transmitterlösung nicht an der Membran vorbeiströmt, wie in der Whole-Cell- oder Outside-Out-Anordnung, sondern mit ihr nur in Kontakt steht.

4.2.4. Das piezogesteuerte Applikationssystem

Als ligandengesteuerter Ionenkanal hat der 5-HT₃-Rezeptor die Eigenschaft, dass er nach Aktivierung durch einen Agonisten innerhalb von 10-200 Millisekunden vom geschlossenen in den offenen Zustand übergeht. Um solch schnelle Prozesse experimentell erfassen zu können, wird ein Applikationssystem benötigt, welches den Lösungswechsel in kürzerer Zeit vornimmt als die Zeitkonstante der schnellsten Zustandsänderung, die beschrieben werden soll (Numberger und Draguhn, 1996). Das von uns verwendete schnelle Applikationssystem (Abb. 4.1), mit dem bei Outside-out-Patches Applikations- und Desapplikationszeiten von unter 100 µs erreicht werden können (Franke, 1987), kommt daher eine besondere Bedeutung zu.

Bei diesem Applikationssystem ist ein an einem Piezokristall befestigt (Abb. 4.1). Durch dieses Polyethylenröhrchen fließt schwerkraftgetrieben die sogenannte Hintergrundlösung. Innerhalb dieses Röhrchens fließt mit noch höherer Geschwindigkeit die Agonistenlösung aus einer dünnen Glaskapillare druckgetrieben in gleicher Richtung. Unter laminaren Strömungsverhältnissen bildet sich dabei das sogenannte Flüssigkeitsfilament mit scharfer Abgrenzung zur Hintergrundlösung.

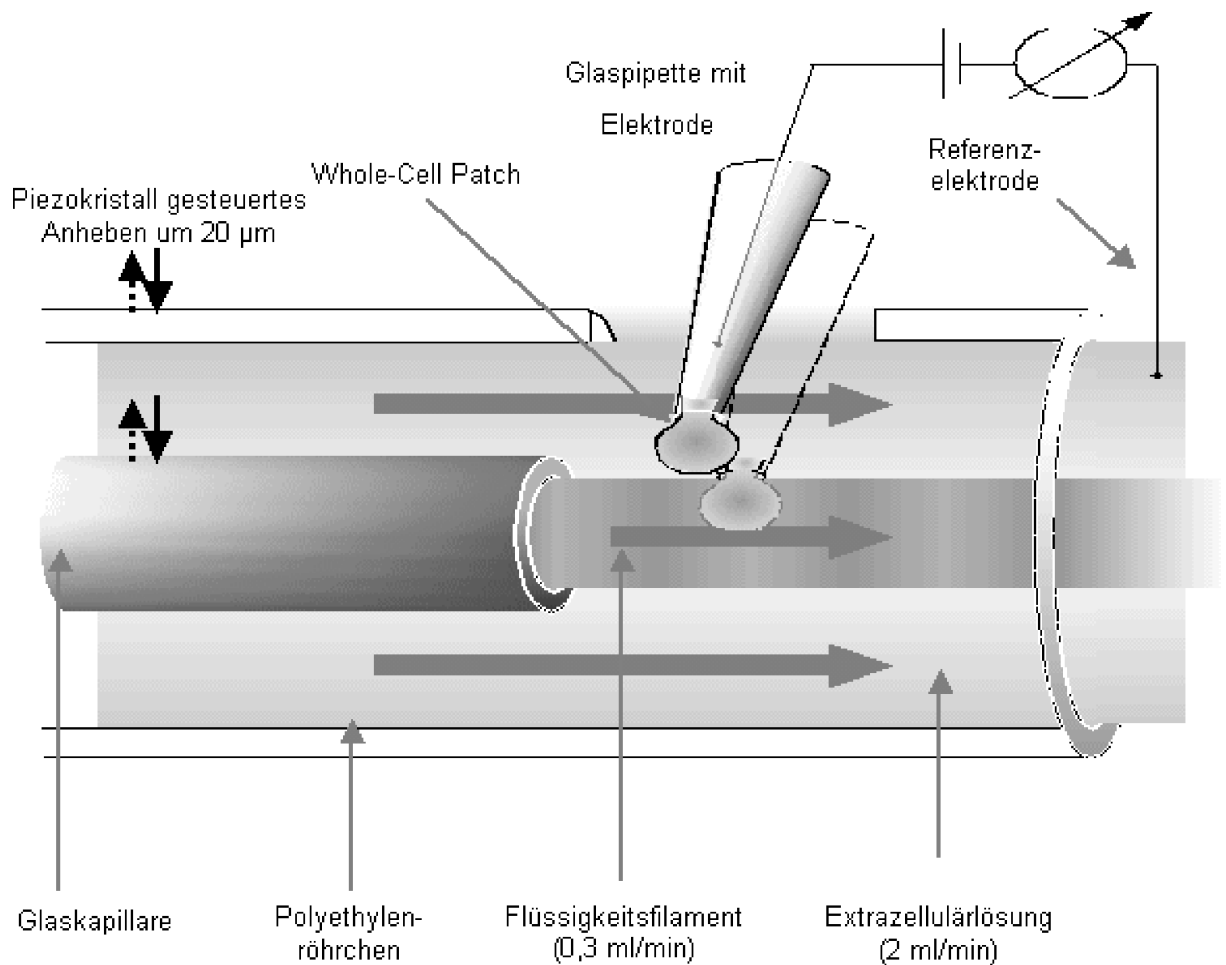


Abb. 4.1: Das an einem Piezokristall befestigte Applikationssystem wird bei Aktivierung dieses Kristalls $20\ \mu\text{m}$ nach oben in Richtung der platzierten Zelle bewegt und nun für die Dauer einer variablen Applikationszeit (meist $1,5\ \text{s}$) von der jeweiligen zu applizierenden Substanz umspült.

Diese Grenze wird sichtbar gemacht durch Anfärbung der Agonistenlösung mit Lissamingrün. Unter Binokularsicht kann die jeweilige Zelle an diese Grenze platziert werden. Bei Aktivierung des Piezokristalls bewegt sich das Flüssigkeitsfilament um $20\ \mu\text{m}$ 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 $1,5\ \text{Sekunden}$.

Um eine vollständige Resensibilisierung der 5-HT₃-Rezeptoren gewährleisten zu können werden zwischen den Einzelpulsen Pausen von 30-45 s Dauer eingehalten. Es werden jeweils mindestens zwei stabile einzelne Stromantworten gemittelt.

Die Glaskapillare ist mit einer Kammer verbunden, die aus zwei voneinander getrennten, dicht abgeschlossenen Tanks besteht. Dabei enthält ein Tank die Kontrolllösung, d.h. den Transmitter alleine, der andere Tank enthält zusätzlich die zu untersuchende Substanz. Durch manuelle Umschaltung wird das Flüssigkeitsfilament wahlweise von einem der beiden Tanks gespeist.

Single-Channel Aufnahmen finden entweder im Cell-Attached Modus (s. Kap. 4.2.3.2.) oder im Outside-Out Modus (s. Kap. 4.2.3.1.) statt, bei dem die Aufnahmen unter Dauerapplikation der zu untersuchenden Substanz zusammen mit Kontrolllösung erzielt wurden.

4.2.5. Verwendete Lösungen

Serotonin-Lösung (=5-Hydroxytryptamin-Hydrochlorid, 5-HT):

Zur Herstellung der 5-HT-Lösung wird zunächst aus Serotonin in Pulverform eine 5-HT-Stammlösung (10^{-1} M in aqua dest.) angesetzt und eingefroren. In einer Verdünnungsreihe mit Extrazellulärlösung kann die jeweils gewünschte 5-HT Konzentration hergestellt werden.

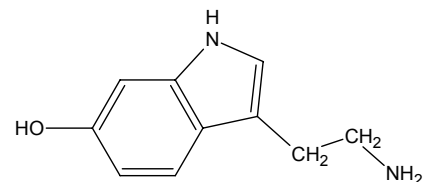


Abb. 4.2: Strukturformel von Serotonin, MG: 212,7 g/mol

Methylcyclophenhybiguanidlösung (=mCPBG):

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

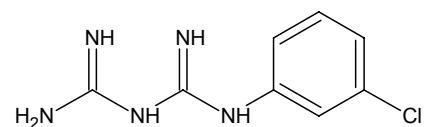


Abb. 4.3 Strukturformel von mCPBG (MG: 248,11 g/mol)

Intrazellulärlösung:

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

Extrazellulärlösung:

Die sog. Extrazellulärlösung ist dem physiologischen Extrazellulärmilieu in Ionen-Zusammensetzung, pH und Osmolarität nachempfunden (genaue Zusammensetzung: siehe Anhang).

4.3. Datenanalyse

Die Stromaufzeichnung der 5-HT-induzierten Ströme erfolgte durch einen Rechnergesteuerten Patch-Clamp-Verstärker (Axopatch 200B) mittels pClamp 6.0 Software (Digitalisierungsrate: 10 kHz (Digidata 1200 A/D Converter) / Tiefpass-Eckfrequenz: 2 kHz). Die Ströme wurden auf einer Festplatte gespeichert und anschließend erfolgte die Auswertung mit AxoGraph 3 Software. Die gemessenen Stromantworten werden dabei als Strom-Zeit-Diagramme aufgezeichnet. Die Messgrößen maximale Stromamplitude (peak) und Stromanstiegszeit (10-90% rise time) werden mit Hilfe von Detektionsalgorithmen computergestützt (Axograph software for MacOS) ermittelt. Bei der Analyse können weitere Parameter bestimmt werden:

- Zeitkonstante der Desensibilisierung

Die Desensibilisierung von Rezeptor-Kanälen ist typischerweise ein exponentieller Stromabfall in Anwesenheit des Agonisten. Diese kann man mittels exponentiellen Fittings (AxoGraph© Software, s. 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.

Dosis-Wirkungs-Kurven werden mit folgender Gleichung erstellt:

$$I/I_{\max} = A^{nH} / (A^{nH} + EC_{50}^{nH})$$

I entspricht der maximalen Stromamplitude unter der Konzentration A des Agonisten, I_{\max} der maximalen Stromamplitude, EC_{50} der Agonistenkonzentration bei halbmaximaler Stromamplitude und nH entspricht dem Hillkoeffizienten.

Gemittelte Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

4.4. Das kinetische Modell

Die Rezeptor-vermittelten Ströme wurden mit der speziellen Software „Bioq – Modeling Biochemical Reactions“, Version 2.0 (Parnas & Parnas Neurobiology Lab, Hebrew University, Jerusalem, Israel) simuliert. Durch die Berechnung von Differentialgleichungssystemen kann man hierbei ein kinetisches Reaktionsschema für den Ionenkanal aufstellen und Ratenkonstanten für die einzelnen Hin- bzw. Rückreaktionen einsetzen. Die Software berechnet und stellt die Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Zustände (offen, geschlossen) im Zeitverlauf dar. Der Verlauf der Offenzustände ist demnach als simulierter Ionenstrom zu verstehen. Bei Verwendung eines stimmigen Reaktionsschemas zeigt sich in Verbindung mit passenden Raten eine gute Übereinstimmung des simulierten mit dem gemessenen Ionenstrom und das entworfene Reaktionsschema kann als kinetisches Modell für den untersuchten Ionenkanal angesehen werden.

5. Ergebnisse

5.1. Kinetische Eigenschaften des durch 5-HT aktivierten 5-HT_{3AB}-Rezeptors

In der ersten Versuchsreihe wurden in HEK 293-Zellen heterolog exprimierte humane 5-HT_{3AB}-Rezeptoren durch 5-HT (verschiedene Konzentrationen) aktiviert. An den evozierten und aufgezeichneten Rezeptor-Antworten lassen sich verschiedene kinetische Eigenschaften des Ionenkanals ablesen, die sich anhand eines kinetischen Modells beschreiben lassen. Die Ionenströme kann man dann mit dem erstellten Modell simulieren. Die Raten-Konstanten innerhalb des Reaktionsschemas passt man dadurch an, dass man den simulierten an den gemessenen Ionenstrom angleicht.

Die Abb. 5.1 zeigt eine typische Stromantwort von 5-HT_{3AB}-Rezeptoren auf die Applikation von 30 μ M 5-HT (Whole-Cell-Konfiguration). Es handelt sich um einen

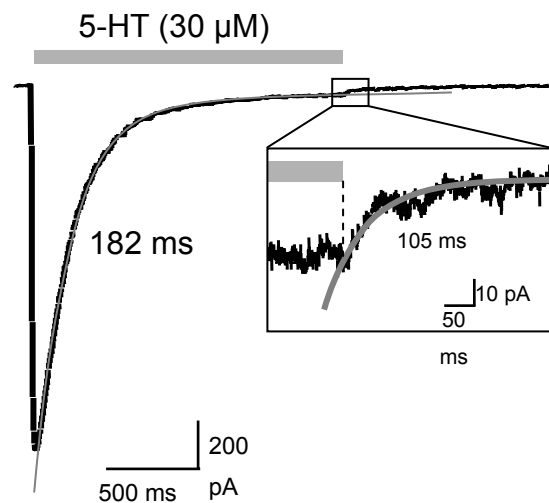


Abb. 5.1: Beispiel einer 5-HT_{3AB}-Rezeptor-Antwort.

Einwärtsstrom, der per Konvention nach unten aufgetragen ist. Die Applikation des Transmitters ist durch einen grauen Balken gekennzeichnet. Zunächst steigt der Strom rasch an und bildet einen Peak. Den Stromabfall in Anwesenheit des Transmitters nennt man

Desensibilisierung. Beim 5-HT_{3AB}-Rezeptor folgt die Desensibilisierung typischerweise einem mono-exponentiellen Verlauf, den man mit einer Zeitkonstante beschreibt (im angegebenen Beispiel 182 ms). Die dünne graue Linie zeigt die idealisierte Exponentialkurve.

Am Ende der Transmitterapplikation kommt es zur Deaktivierung der Rezeptor-Kanäle (vergrößert im Inset). Dieser Stromabfall kommt durch Dissoziation der Transmittermoleküle von den Rezeptoren zustande und lässt sich ebenfalls durch eine monoexponentielle Funktion beschreiben (Zeitkonstante 105 ms).

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen 5-HT-Konzentration und den Parametern der Stromantwort (Aktivierungs-Zeit, Peak, Desensibilierungs-Zeit, Deaktivierungs-Zeit) bildet die Grundlage für die Raten-Konstanten im Reaktionsschema. Das kinetische Schema, das die 5-HT_{3AB}-Rezeptor-Antworten unter Berücksichtigung dieser Dosis-Wirkungs-Beziehung am besten beschreibt, ist in Abb. 5.2 gezeigt. Hierbei ist die Rezeptor-Desensibilisierung als Isomerisierung vom aktiven (offenen) in einen inaktiven Zustand dargestellt.

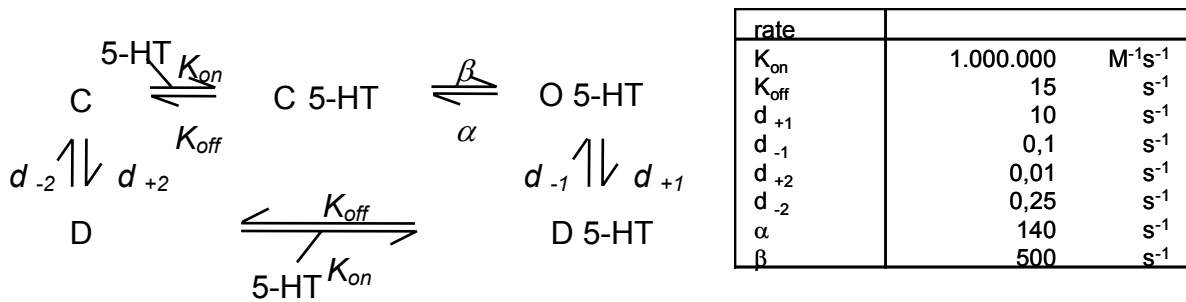


Abb. 5.2: Der Rezeptor kann im Ruhezustand (C) durch ein 5-HT-Molekül aktiviert werden (C 5-HT) und schließlich öffnen (O 5-HT). Diese bidirektionalen Reaktionen werden von den Assoziations- und Dissoziationskonstanten (K_{on}/K_{off}) und von den „gating“-Raten (α/β) bestimmt. Durch Änderung des Isomerisierungszustands geht der offene Zustand (O 5-HT) unter Einfluss des gebundenen Agonistenmoleküls in einen desensibilisierten (gebundenen) Zustand (D 5-HT) über. Von diesem kann das 5-HT Molekül wieder abdissoziieren (D) und schließlich durch Übergang zum offenen-ungebundenen Zustand (C) resensibilisieren.

Die Abb. 5.3 zeigt einen anhand des Modells (Abb. 5.2) simulierten 5-HT_{3AB}-Rezeptor-Strom (Auftragung des Zeitverlaufs des Offenzustands *O* 5-HT).

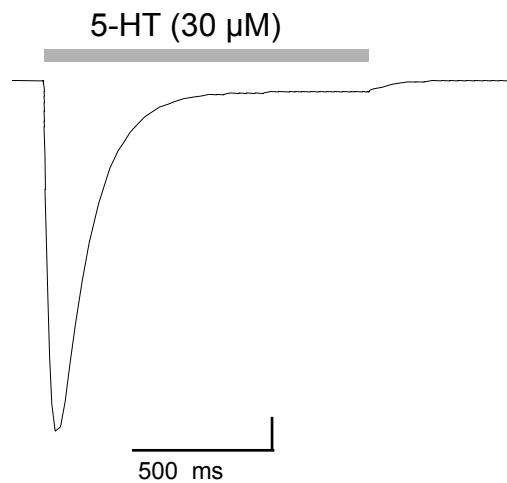


Abb. 5.3: Der simulierte 5-HT_{3AB}-Rezeptor-Strom ähnelt dem gemessenen. Die 5-HT-Konzentration und die Dauer der Applikation wurden hierbei virtuell nachvollzogen.

Nicht alle Raten-Konstanten lassen sich aus den experimentell gewonnenen Whole-Cell-Strömen ableiten. Die Rate α (140 s^{-1}) ließ sich als Kehrwert der mittleren Dauer (7 ms) der Single-Channel-Ströme abschätzen. Die Rate β grenzt man durch 'Versuch und Irrtum' beim Modellieren ein.

Die Single-Channel-Ableitungen (Abb. 5.4) wurden in Outside-Out-Konfiguration unter Applikation von $10 \mu\text{M}$ 5-HT gewonnen. Die Amplitudenhistogramme der 5-HT_{3AB}-Rezeptor-vermittelten Single-Channel-Ströme waren einfach-normal-verteilt (keine verschiedenen Kanalleitfähigkeiten, ohne Abbildung). Die Offenzeithistogramme ergaben in einer einfachen Marquardt-Verteilung (ohne Abbildung) die mittlere Offenzeit von 7 ms.

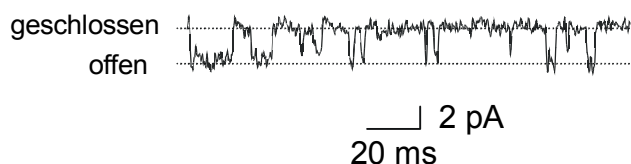


Abb. 5.4: Ausschnitt einer repräsentativen Spur mit 5-HT_{3AB}-Rezeptor-vermittelten Single-Channel-Strömen ($10 \mu\text{M}$ 5-HT, -60 mV Clamp-Potenzial).

5.2. Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zur Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden 5-HT_{3AB}-Rezeptor-vermittelte Whole-Cell-Ströme durch unterschiedliche 5-HT-Konzentrationen (1 – 1000 μ M) evoziert.

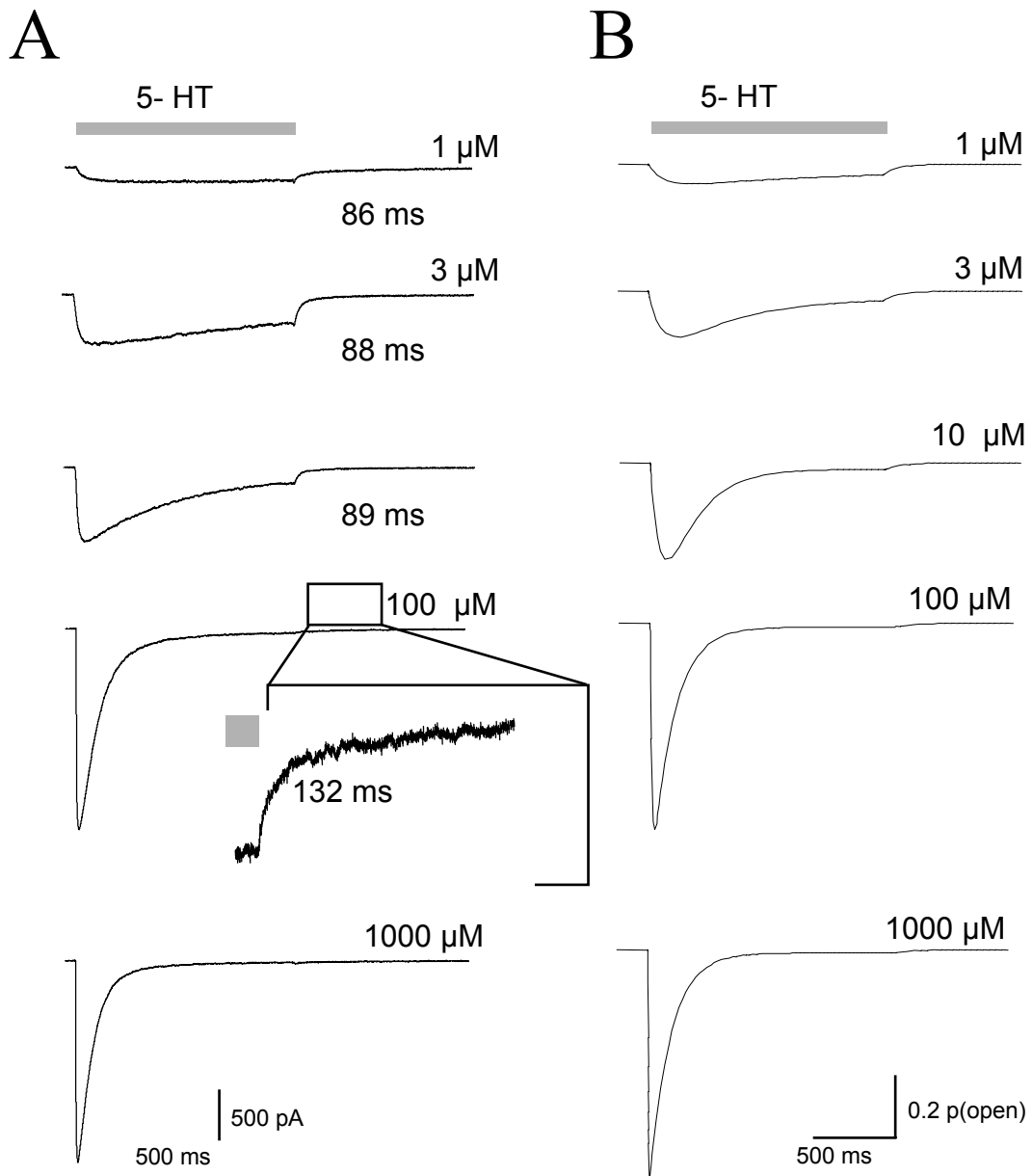


Abb. 5.5: Gemessene (A) und simulierte (B) 5-HT_{3AB}-Rezeptor-vermittelte Whole-Cell-Ströme unter ansteigenden 5-HT-Konzentrationen. Angabe der Zeitkonstanten der Rezeptor-Deaktivierung (leichte Zunahme unter Erhöhung der 5-HT-Konzentration).

Abb. 5.6 zeigt die Dosis-Wirkungs-Beziehung (gemessen und simuliert) für die Stromamplitude ($EC_{50} = 25 \pm 4 \mu\text{M}$, Hill-Koeffizient = $0,9 \pm 0,1$), die Aktivierungs-Zeit (10-90%-Stromanstiegszeit, *rise time*) und die Zeitkonstante der Deaktivierung. Hier zeigt sich eine klare Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation. Insbesondere die leichte Zunahme der Deaktivierungs-Zeit zeigte sich in der Simulation auch.

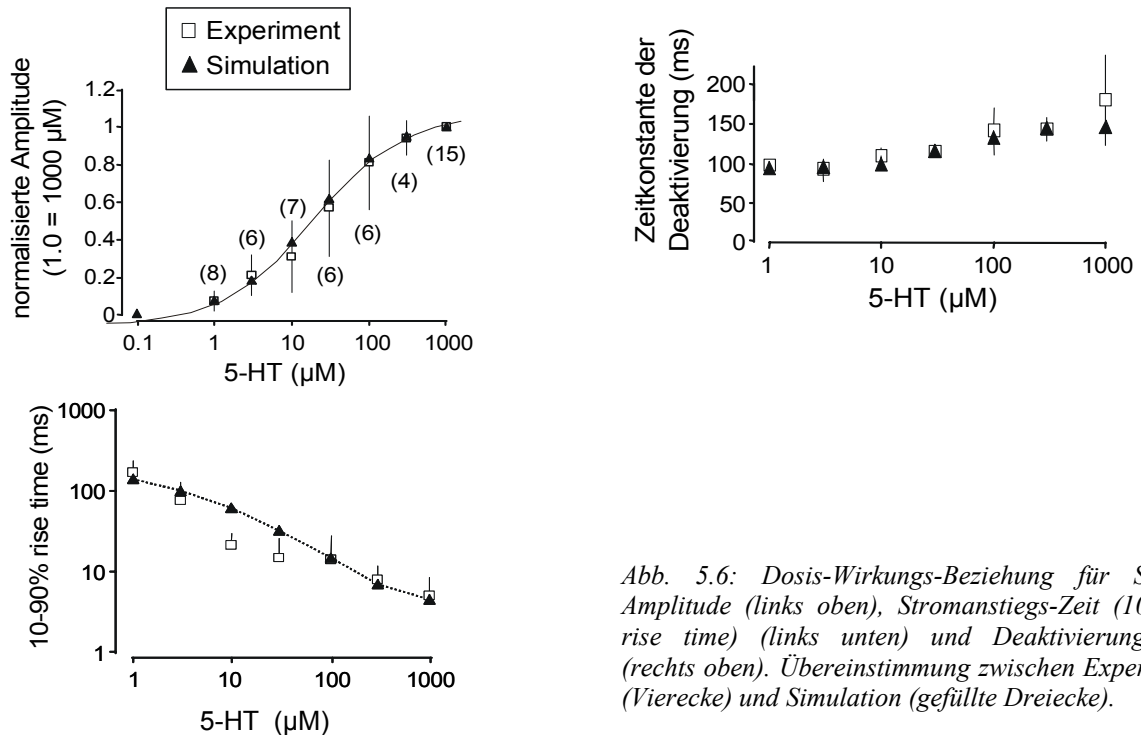


Abb. 5.6: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Strom-Amplitude (links oben), Stromanstiegs-Zeit (10-90% rise time) (links unten) und Deaktivierungs-Zeit (rechts oben). Übereinstimmung zwischen Experiment (Vierecke) und Simulation (gefüllte Dreiecke).

5.3. Erholungskinetik nach Desensibilisierung

Resensibilisierung bezeichnet den Übergang desensibilisierter Rezeptoren in einen wieder aktivierbaren Zustand. Diese Erholungskinetik könnte die Übertragungsstärke und die Überleitungsrate einer Synapse maßgeblich steuern. Ist beispielsweise die Inputfrequenz einer Synapse hoch und die Resensibilisierungszeit der postsynaptischen Rezeptoren lang, können die präsynaptischen Inputs nicht 1:1 auf die Postsynapse übergeleitet werden. In einem solchen Fall würde die Synapse die Funktion eines Tief-Pass-Filters erfüllen.

Um die Resensibilisierungskinetik der 5-HT_{3AB}-Rezeptoren zu untersuchen, wurde 5-HT (100 μM) in Doppel-Pulsen mit unterschiedlichen Intervallen appliziert (Abb. 5.7 A, Abb. 5.8). Hierbei zeigte sich, dass die Erholung der Stromantwort auf >50% bzw. >95% 3 s bzw. >95% 3 s bzw.

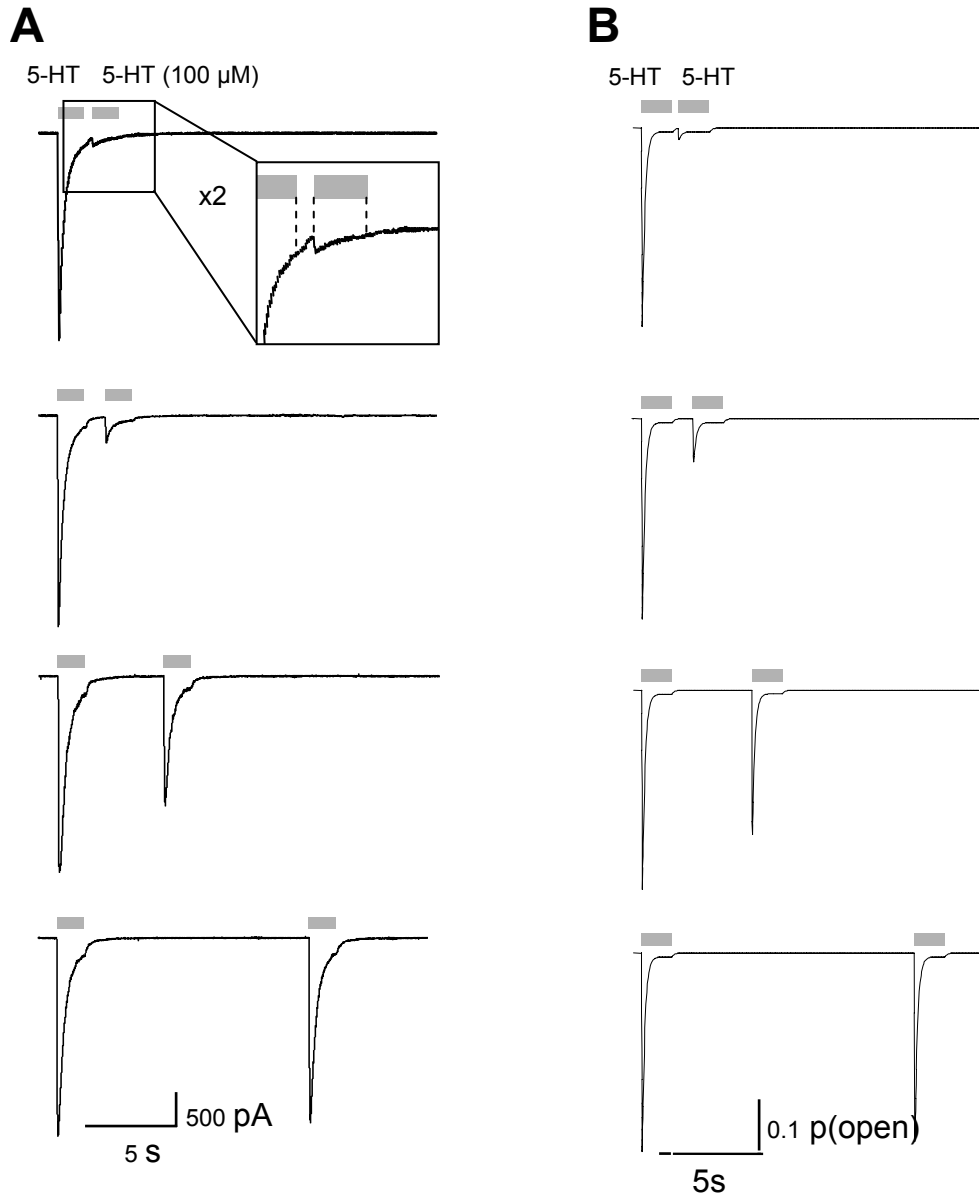


Abb. 5.7: 5-HT_{3AB}-Rezeptor-vermittelte Ströme unter Applikation von Transmitter-Doppel-Pulsen (100 μM 5-HT) unterschiedlicher Intervalle zur Darstellung der Resensibilisierungskinetik der Rezeptoren. (A) Experiment (B) Simulation. Jeder Transmitter-Puls ist durch einen grauen Balken dargestellt.

12 s dauerte. Es fällt auf, dass die heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptoren unter den gleichen experimentellen Bedingungen deutlich schneller resensibilisieren als die homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptoren (Erholung in 7s bzw. 25s) (Hapfelmeier et al., 2003). Offensichtlich halbiert also die 5-HT_{3B}-Untereinheit die Resensibilisierungszeit des Rezeptors.

Anhand des kinetischen Modells lässt sich die experimentell ermittelte Resensibilisierungskinetik des 5-HT_{3AB}-Rezeptors simulieren (Abb. 5.7 B, Abb. 5.8).

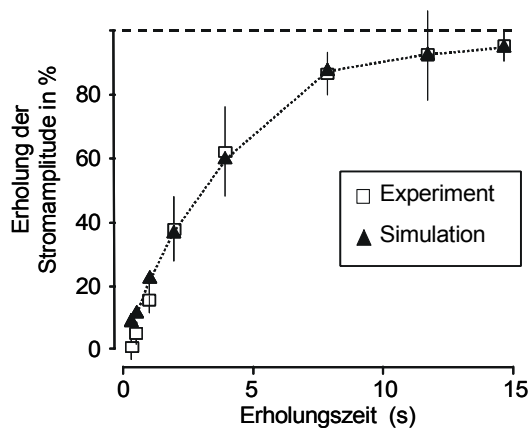


Abb. 5.8: Aus 5 separaten Experimenten gemittelte Resensibilisierungskinetik (Vierecke) im Vergleich zur Simulation (gefüllte Dreiecke).

5.4. Die kurze Agonisten-Applikation

Ein entscheidender Mechanismus der synaptischen Übertragung ist die Transmitterausschüttung aus der präsynaptischen Terminale. Hierbei kommt es im synaptischen Spalt zu einem raschen Anstieg der Transmitter-Konzentration. Dieser "Transmitter-Puls" aktiviert post- und/oder präsynaptisch lokalisierte Rezeptoren.

Die maximale Konzentration und der Zeitverlauf von synaptisch freigesetztem 5-HT sind nicht bekannt. Man kann aber davon ausgehen, dass es sich um einen kurzen Puls (< 50 ms) handelt. Es ist zudem anzunehmen, dass die maximale 5-HT-Konzentration über der EC₅₀ für die 5-HT₃-Rezeptor-Aktivierung liegt.

Im Experiment mit heterolog exprimierten 5-HT_{3AB}-Rezeptoren ahmen wir die vermeintliche synaptische Situation nach, indem wir 100 μM 5-HT in kurzen Pulsen applizieren. Wir reduzieren die Dauer der 5-HT-Applikation schrittweise von 1500 ms auf 10 ms.

Je kürzer der 5-HT-Puls wird, desto geringer wird der Anteil des Stromabfalls, der durch Desensibilisierung verursacht wird. Gleichzeitig wird der Anteil des Stromabfalls, der durch Deaktivierung zustande kommt, größer. Nach dem 20 ms- bzw. 10 ms-Puls besteht der Stromabfall fast ausschließlich aus Rezeptor-Deaktivierung. Dieser Befund lässt sich auch in der Simulation anhand des kinetischen Modells nachvollziehen (Abb. 5.9).

Gleichzeitig verringert sich mit Verkürzung des 5-HT-Pulses die Zeitkonstante der Deaktivierung (Abb. 5.9 A), ein Befund, den auch die simulierten Ströme zeigen (Abb. 5.9 B). Je weniger Rezeptoren also nach Aktivierung in den desensibilisierten Zustand übergehen, desto schneller erfolgt die Deaktivierung der Rezeptor-Antwort nach Dissoziation des Transmitters. Dieser Mechanismus, der auch für GABA_A-Rezeptor-vermittelte Antworten beschrieben ist (Jones & Westbrook, 1995), könnte den Zeitverlauf postsynaptischer Ströme beeinflussen.

Ein weiterer Befund, den man ebenfalls bei den simulierten Strömen sieht, ist, dass sich unter Verkürzung des 5-HT-Pulses von 20 ms auf 10 ms die Amplitude der Antwort verkleinert (Abb. 5.9 unten). Das hängt damit zusammen, dass die Stromantworten bei der 5-HT-Konzentration von 100 µM eine mittlere Stromanstiegszeit (10-90% rise time) von 14 ± 5 ms haben. Bei einem nur 10 ms langen 5-HT-Puls kann die Stromantwort ihren Peak also nicht erreichen.

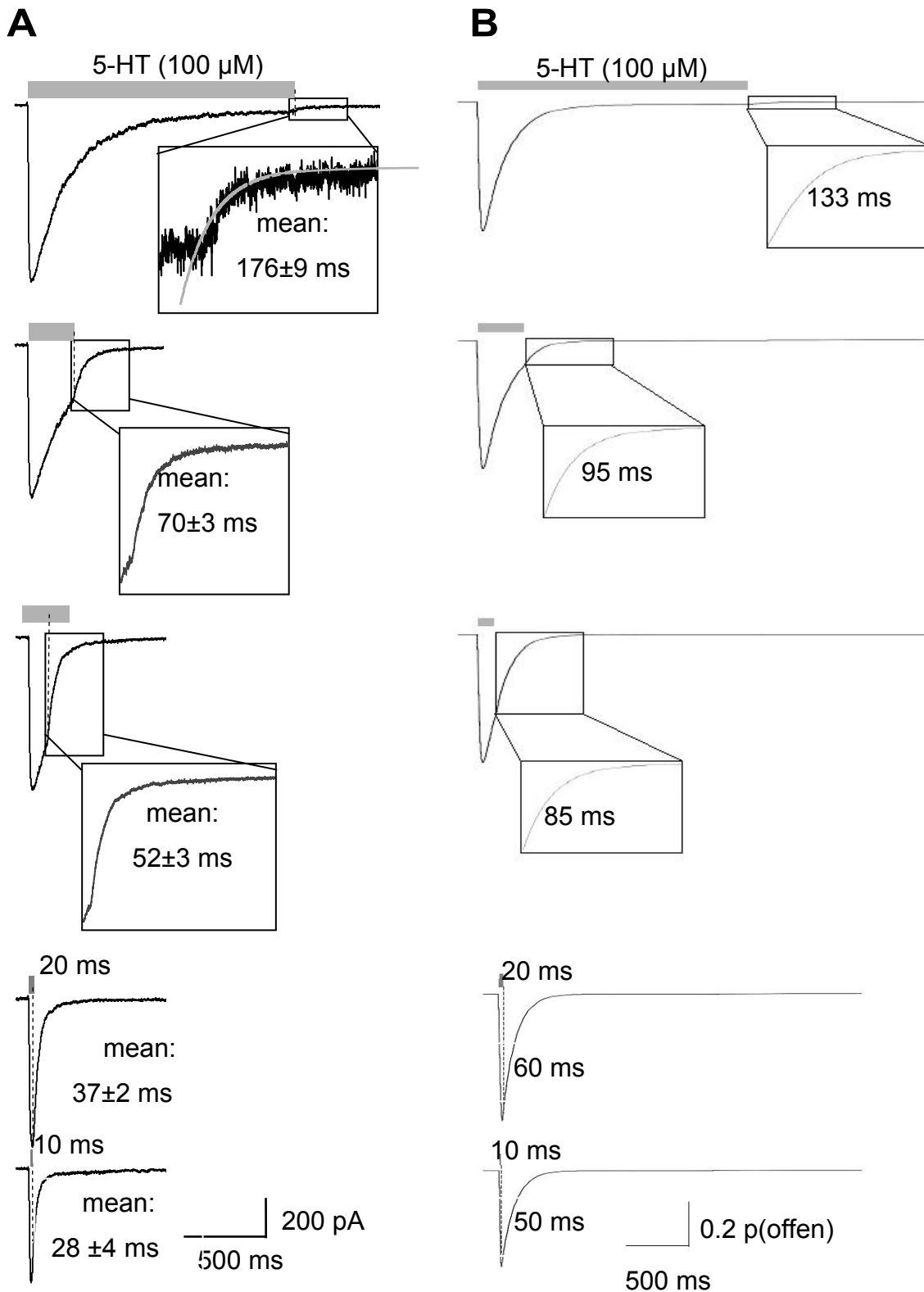


Abb. 5.9: 5-HT_{3AB}-Rezeptor-vermittelte Stromantworten unter schrittweiser Verkürzung des 5-HT-Pulses (100 μ M) von 1500 ms auf 10 ms. (A) Experiment (B) Simulation.

5.5. Die Strom-Spannungs-Beziehung der Rezeptoraktivierung durch 5-HT

Die 5-HT_{3AB}-Rezeptor-Ströme zeigen bei einem Haltepotenzial über 30 mV eine leichte Einwärts-Gleichrichtung (Abb. 5.10 A). Bei den homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptoren ist der Befund ähnlich (Hapfelmeier et al., 2003). Die Kinetik der 5-HT-induzierten Ströme ist jedoch Spannungs-unabhängig (Abb. 5.10 A, Inset).

Der selektive 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Y-25130 (10 nM) reduzierte die 5-HT_{3AB}-Rezeptor-vermittelte Stromantwort deutlich (Abb. 5.10 B).

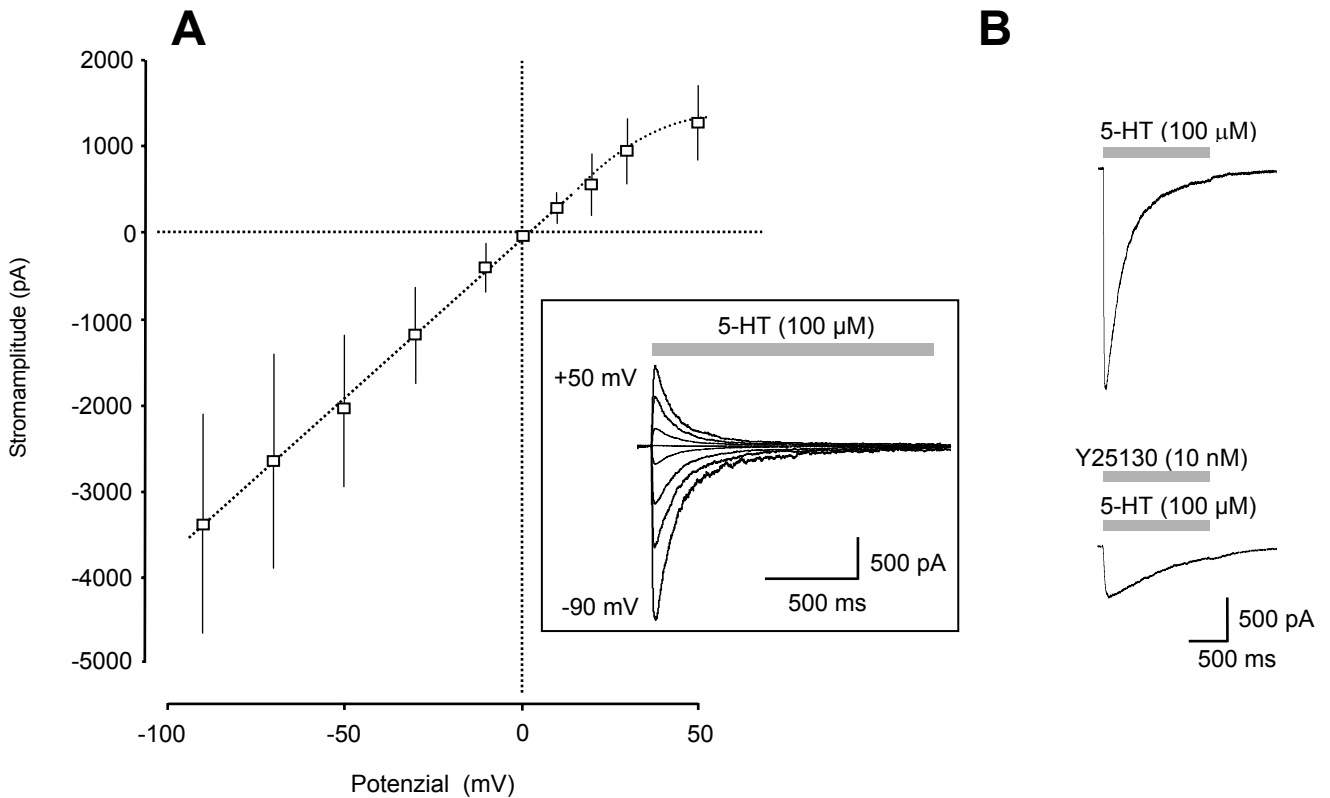


Abb. 5.10: **(A)** Strom-Spannungs-Beziehung der 5-HT_{3AB}-Rezeptor-vermittelten Antworten ($n = 3$). Das Inset zeigt Ströme einer repräsentativen Messung. **(B)** Verminderung eines 5-HT_{3AB}-Rezeptor-vermittelten Stroms durch den selektiven 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Y25130 (10 nM).

5.6. Die 5-HT₃-Rezeptoraktivierung durch mCPBG

Methylcyclophenylbiguanid ist ein selektiver nicht-natürlicher 5-HT₃-Rezeptor-Agonist (Kilpatrick et al., 1990). Dieser wurde bisher zur selektiven Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren, v.a. in Hirnschnittpräparaten, eingesetzt. Beim nativen 5-HT₃-Rezeptor der Maus zeigte sich, dass sich nach Rezeptor-Aktivierung durch mCPBG gegenüber 5-HT die Resensibilisierungszeit verlängert. Außerdem wurde über deutlich ausgeprägte Nachströme (tailcurrents) bei Transmitterdesapplikation berichtet (Van Hooft & Vijverberg, 1996). Dies ist ein typischer Befund für einen Offen-Kanal-Block.

Da der Offen-Kanal-Block, den wir unter 5-HT an homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptoren beobachteten (Hapfelmeier et al., 2003), möglicherweise unter mCPBG verstärkt auftritt, applizierten wir mCPBG an homomere und heteromere 5-HT₃-Rezeptoren.

5.6.1. Aktivierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors durch mCPBG

Die Abbildung 5.11 A zeigt typische Stromantworten von 5-HT_{3A}-Rezeptoren auf die Applikation verschiedener Konzentrationen des selektiven 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten mCPBG. Dabei zeigte sich eine glockenförmige Dosis-Wirkungskurve. Dies bedeutet, dass bei höheren Konzentration von mCPBG die Stromantworten des 5-HT₃-Rezeptors wieder abnahmen. Die Desapplikation von mCPBG bewirkte deutliche „Nach“-Ströme (erneuter Stromfluss nach Desapplikation des Agonisten) (Abb. 5.11 A).

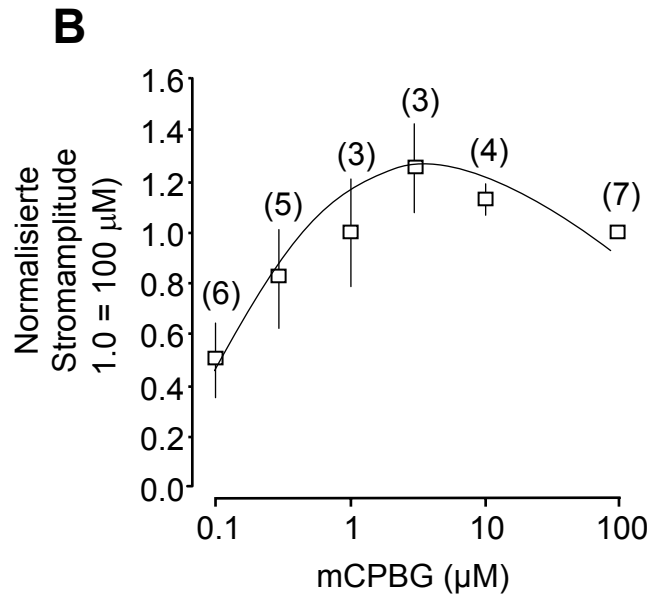
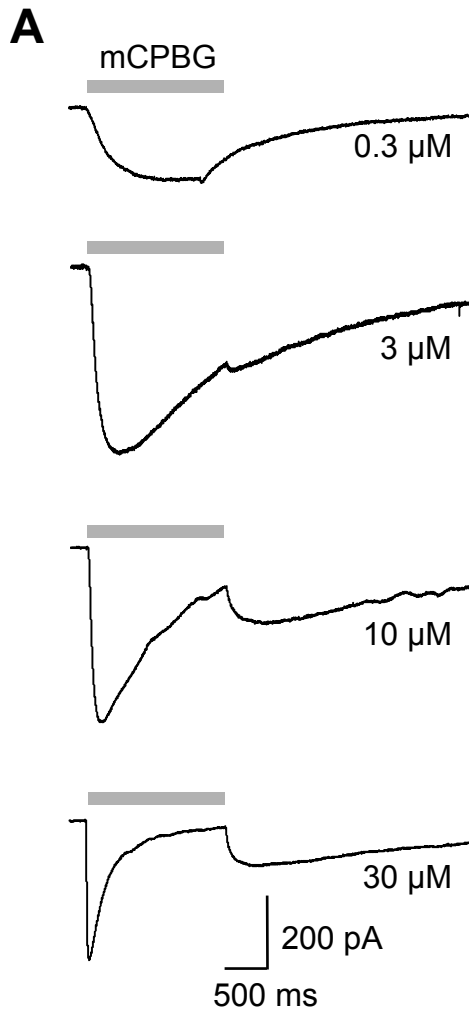


Abb. 5.11: mCPBG, ein potenter 5-HT₃-Rezeptor Agonist wurde an 5-HT_{3A}-Rezeptoren im Whole-Cell Modus appliziert. (A) zeigt vier repräsentative Spuren einer Zelle. (B) Zunehmende Konzentrationen von mCPBG zeigten eine glockenförmige Dosis-Wirkungskurve. Die Anzahl der jeweiligen Messungen ist in Klammern angegeben.

Zur Untersuchung der Resensibilisierungskinetik wurden mCPBG-Doppel-Pulse appliziert. Die Abbildung 5.12 zeigt, dass die Rezeptor-Resensibilisierung relative langsam war: Die Erholung der Stromantwort auf >50% (>95%) dauerte 20 s (50 s) (vergl. 5-HT: >95%, 25s).

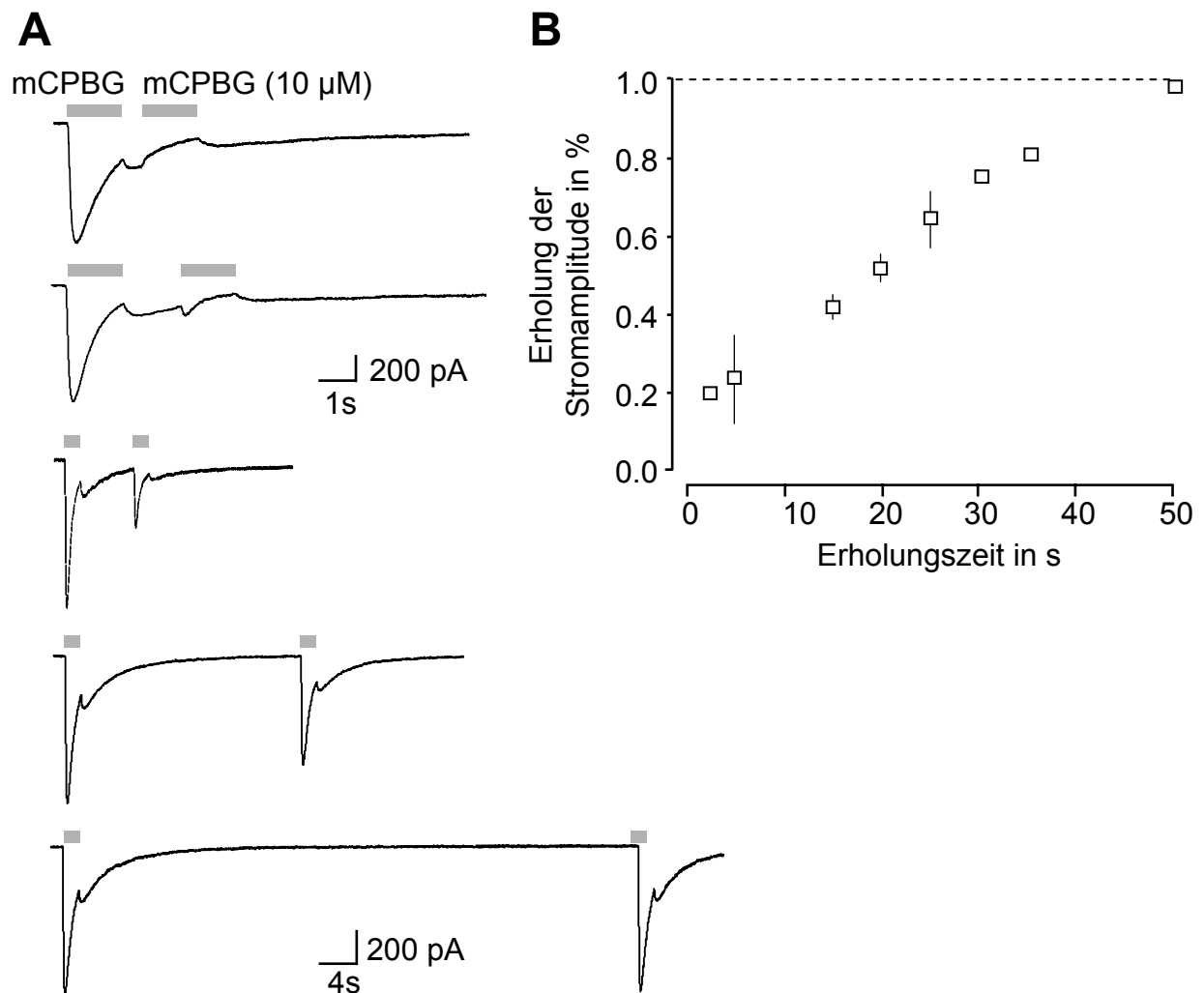


Abb. 5.12: (A) Repetitive Pulse von 10 μ M mCPBG wurden appliziert, um den Zeitverlauf der Erholung von der Desensibilisierung zu untersuchen. (B) Die Erholung der mCPBG induzierten Antwort auf >50% (>95%) dauerte 20 s (50 s) (untere Abbildung; n=3).

5.6.2. Aktivierung des 5-HT_{3AB}-Rezeptors durch mCPBG

mCPBG evozierte auch an 5-HT_{3AB}-Rezeptoren Stromantworten (Abb. 5.13). Bei hohen mCPBG-Konzentrationen (100 μ M) zeigte sich erstaunlicherweise ein Nach-Strom. Die Applikation von 5-HT in derselben Konzentration induzierte keinen Nach-Strom (Abb. 5.13 A). Offenbar induziert mCPBG am 5-HT_{3AB}-Rezeptor einen Offen-Kanal-Block. Die

Auslösung der Nach-Ströme war Spannungs-unabhängig und zeigte keine Rektifizierung (Abb. 5.13 B). Dies lässt einen Spannungs-unabhängigen Offenkanal-Block von 5-HT_{3AB}-Rezeptoren durch mCPBG vermuten.

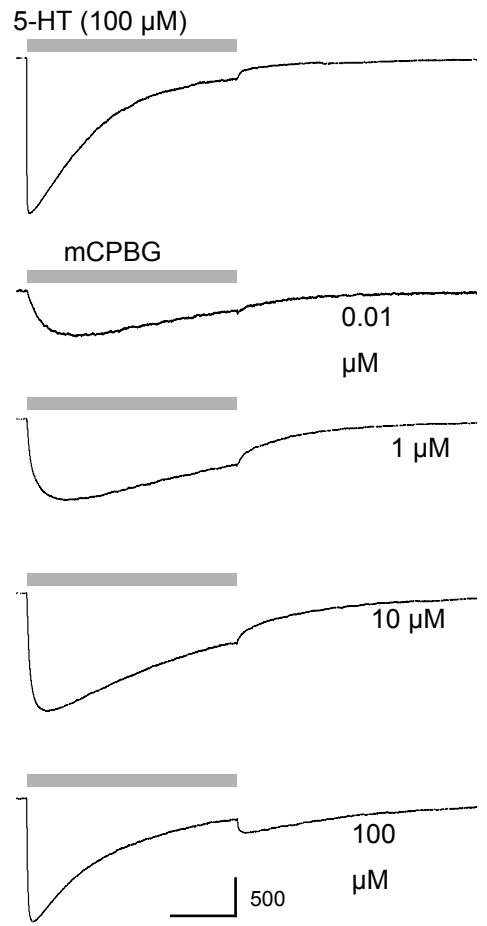
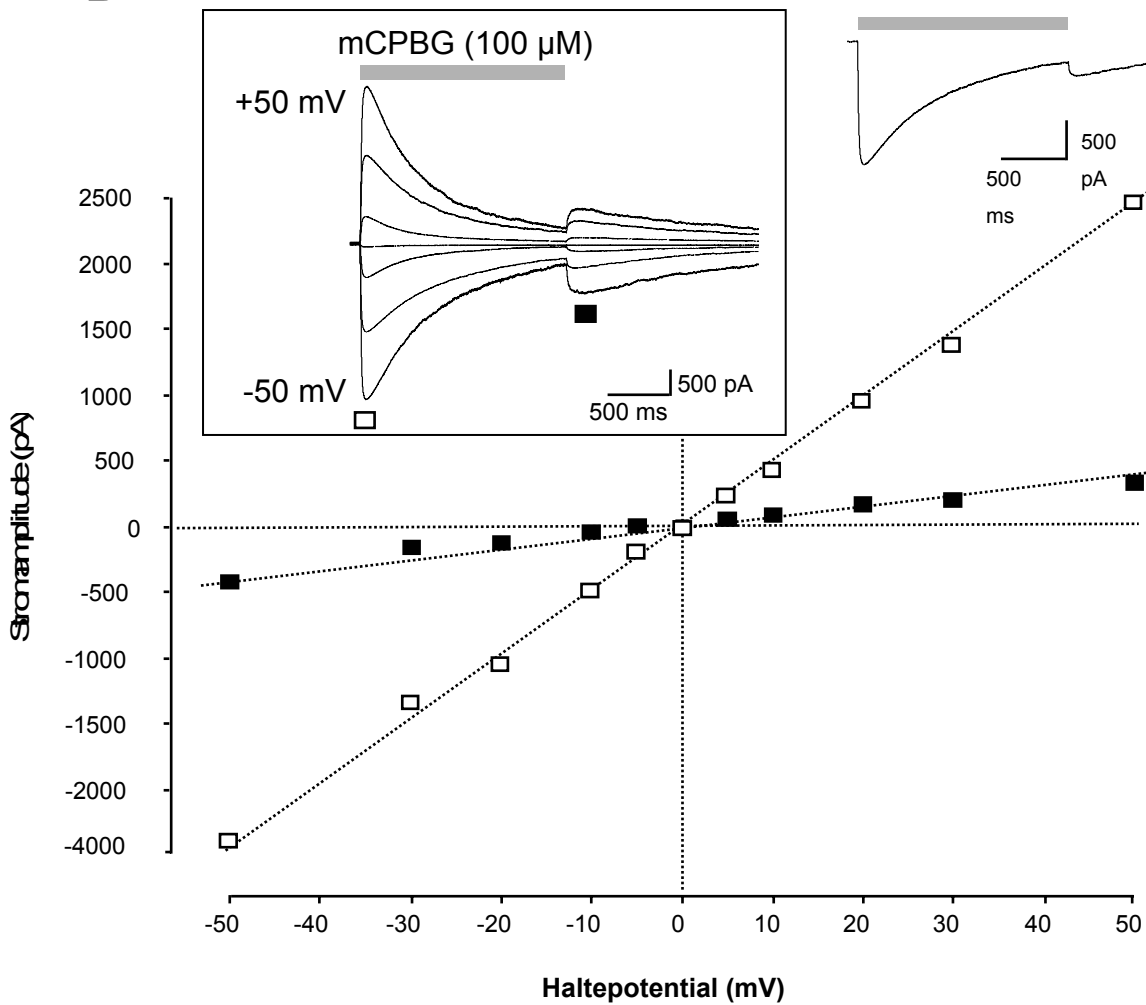
A**B**

Abb. 5.13.: (A) mCPBG-induzierte Stromantworten. Hohe mCPBG-Konzentrationen (100 μM) bewirken einen Nach-Strom. 5-HT (100 μM) induzierte keinen Nach-Strom (oberste Spur). (B) Strom-Spannungsbeziehung für mCPBG-induzierte Ströme an 5-HT_{3AB}-Rezeptoren.

6. Diskussion

Wir untersuchten Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken von heteromeren humanen 5-HT_{3AB}-Rezeptoren, die in HEK 293-Zellen exprimiert wurden. Die Ergebnisse verglichen wir mit schon zuvor von uns durchgeführten Untersuchungen an homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptoren.

Die durch HEK 293-Zellen exprimierten 5-HT_{3AB}- und 5-HT_{3A}-Rezeptoren sind ähnlich leitfähig für Na⁺ und K⁺, der 5-HT_{3AB}-Rezeptor hat aber eine niedrigere Ca²⁺-Kanal Leitfähigkeit als der 5-HT_{3A}-Rezeptor (Davies et al, 1999). Extrazelluläre Ca²⁺-Ionen verstärken die Desensitisierung (Brown et al., 1998; Mariq et al., 1991; Yakel, 1992; Lobitz et al, 2001). Um beide Rezeptoren besser vergleichen zu können, wurde der Einfluss von Ca²⁺ auf die Desensitisierung durch die Verwendung einer Ca²⁺-freien Extrazellulärlösung eliminiert.

6.1. Die Desensitisierung des 5-HT_{3AB}-Rezeptors

Desensitisierung definiert den Übergang eines Ionenkanals von einem aktiven in einen inaktiven Zustand unter Agonistenanwesenheit. Im Experiment kann die Desensitisierung als Stromabfall während Agonisten-Applikation beobachtet werden. Dieser Stromabfall folgt typischerweise einer Exponentialfunktion mit nur einer Zeitkonstante. Somit desensitisiert der 5-HT_{3AB}-Rezeptor offenbar monophasisch. Bei Desapplikation des Agonisten 5-HT zeigten sich keine Nach-Ströme, auch nicht unter hohen Konzentrationen. Deshalb schlossen wir einen Offen-Kanal-Block als relevanten Mechanismus der Desensitisierung aus.

Ausgehend von den aufgezeichneten Rezeptor-Strömen stellten wir ein kinetisches Reaktionsschema für den Ionenkanal auf. Die Grundlage dieses Reaktionsschemas war das „klassische“ Modell der Desensitisierung (Franke et al, 1993; Jones & Westbrook, 1995; Heckmann & Dudel, 1997). Die Desensitisierung wird durch Hin- und Rückraten ($d_{+1} = 10 \text{ s}^{-1}$ / $d_{-1} = 0,1 \text{ s}^{-1}$) beschrieben. Bei der Resensitisierung dauert die Erholung der Stromantwort auf >95% 12 s. Dies kann in einem linearen Reaktionsschema mit der Desensitierungs-Rückrate

($d_{-1} = 0,1 \text{ s}^{-1}$) nicht erreicht werden, die Erholung der Stromantwort würde (simuliert) mehr als 60 s dauern. Daher gingen wir von einem zirkulären Reaktionsschema aus. Die nun schnellere Resensibilisierung wird v.a. durch die Raten ($d_{+2} = 0,01 \text{ s}^{-1}$ / $d_{-2} = 0,25 \text{ s}^{-1}$) vom ungebunden-desensibilisierten Zustand (D) zum geschlossen-aktivierbaren Zustand (R) bestimmt.

Mit unserem 5-HT_{3AB}-Rezeptor-Modell (Abb. 5.2) konnten Aktivierungs-, Desensibilisierungs-, Deaktivierungs-, und Resensibilisierungskinetiken der 5-HT-induzierten Ströme sehr gut simuliert werden. In der Simulation und im Experiment verlängern desensibilisierte Zustände die Rezeptorantworten durch Verlangsamung der Kanaldeaktivierung (Abb. 5.9). Es ist möglich, dass dieser hinauszögernde Effekt, der bereits für GABA_A-Rezeptoren gezeigt wurde (Jones & Westbrook, 1995), auch die 5-HT₃-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission beeinflusst.

6.2. Vergleich der Eigenschaften von 5-HT_{3A}- und 5-HT_{3AB}-Rezeptoren

Der 5-HT_{3AB}-Rezeptor und der von uns schon zuvor untersuchte 5-HT_{3A}-Rezeptor haben einige Gemeinsamkeiten. So zeigen sowohl 5-HT_{3A}-, als auch 5-HT_{3AB}-Rezeptor-Ströme eine leichte Einwärts-Gleichrichtung. Der selektive 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Y-25130 reduziert die Stromantworten beider Rezeptoren deutlich.

Allerdings unterscheiden sich beide Rezeptoren aber auch eindeutig in einigen kinetischen Eigenschaften. So löst die Desapplikation von 5-HT bei 5-HT_{3AB}-Rezeptoren keinen Nach-Strom aus. Dieser Nach-Strom ist ein typisches Zeichen für die Umkehr eines Offen-Kanal-Blocks, der die Desensibilisierung beim 5-HT_{3A}-Rezeptor bewirkt.

Der 5-HT_{3AB}-Rezeptor zeigt auf DNA-Ebene und funktionell große Ähnlichkeiten mit dem Azetylcholinrezeptor. So kann die Desensibilisierung am besten mit dem „klassischen“ Modell der Desensibilisierung beschrieben werden. Tab. 6.1 fasst Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Rezeptoren zusammen.

	5-HT _{3A} -Rezeptor	5-HT _{3AB} -Rezeptor
Rezeptoraktivierung durch 5-HT	EC ₅₀ 3±0,6 µM	EC ₅₀ 25±4 µM
	Hill 1,8±0,3	Hill 0,9±0,1
10-90% rise time (10 µM 5-HT)	38±13 ms	21±9 ms
Angenommener Desensibilisierungsmechanismus	Agonisten induzierter Offen-Kanal Block	„klassische“ Desensibilisierung
Erholung von der Desensibilisierung (auf >95%)	25 s	12 s
Inhibition durch Y-25130	Ja	Ja
Spannungsabhängigkeit der Kinetiken	Nein	Nein

Tab. 6.1: Vergleich der kinetischen Eigenschaften des 5-HT_{3A}-Rezeptor und des 5-HT_{3AB}-Rezeptors

6.3. Der Effekt von mCPBG auf 5-HT₃-Rezeptoren

Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Offen-Kanal-Block-Eigenschaft, die bei 5-HT_{3A}-Rezeptoren schon für den physiologischen Agonist 5-HT gezeigt wurde (Hapfelmeier et al. 2003), bei mCPBG noch stärker ausgeprägt ist. Höhere Konzentrationen von mCPBG reduzierten die Stromantwort der 5-HT_{3A}-Rezeptoren. Dies zeigte sich in einer glockenförmigen Dosis-Wirkungskurve (s. auch Abb. 5.11).

Interessanterweise war die Resensibilisierungszeit der mCPBG-aktivierten 5-HT_{3A}-Rezeptor-Ströme signifikant länger als die Resensibilisierungszeit der 5-HT-aktivierten Rezeptoren (Hapfelmeier et al., 2003). Dies wurde bereits für native 5-HT₃-Rezeptoren der Maus gezeigt (Van Hooft & Vijverberg, 1996).

In dieser Studie erwies sich mCPBG auch als potenter Agonist der heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptoren. Bei höheren mCPBG-Konzentrationen wurden zudem spannungsunabhängige Nach-Ströme beobachtet (s. Abb. 5.13). Daraus kann man folgern, dass mCPBG

- im Gegensatz zu 5-HT - zusätzlich eine Offen-Kanal-Blockierung am 5-HT_{3AB}-Rezeptor bewirkt. Somit ist der Mechanismus der 5-HT₃-Rezeptoren-Desensibilisierung sowohl von der Untereinheiten-Zusammensetzung als auch vom Agonisten abhängig.

7. Zusammenfassung

Der 5-HT₃-Rezeptor gewinnt zunehmend pharmakologische Bedeutung, z.B. hinsichtlich der Wirkmechanismen von Antidepressiva. Diese wirken u.a. als 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten oder hemmen die präsynaptische Serotonin-Wiederaufnahme. Darüber hinaus werden 5-HT₃-Antagonisten in der Therapie des Zytostatika-induzierten Erbrechens eingesetzt. 5-HT₃-Rezeptoren haben auch eine Bedeutung im Schmerzgeschehen.

Die Beurteilung der Interaktion eines Pharmakons mit einem Rezeptor-gekoppelten Ionenkanal erfordert die Kenntnis über die Rezeptorkinetik. Deshalb untersuchten wir die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik des heteromeren 5-HT₃-Rezeptors. Der in HEK 293-Zellen exprimierte 5-HT_{3AB}-Rezeptor diente als Modell für den nativen Rezeptor.

Anhand der Rezeptor-vermittelten Antworten ermittelten wir die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik des 5-HT_{3AB}-Rezeptors. Zu deren Beschreibung erstellten wir ein Reaktionsschema. Dieses verdeutlicht insbesondere die Unterschiede zwischen dem homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor und dem heteromeren 5-HT_{3AB}-Rezeptor. Beim 5-HT_{3AB}-Rezeptor erfolgt die Desensibilisierung als „klassische“ Desensibilisierung, beim homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor durch einen Offen-Kanal-Block. Darüber hinaus sind 5-HT_{3A}-Rezeptoren und 5-HT_{3AB}-Rezeptoren unterschiedlich sensitiv für den Agonisten 5-HT und zeigen eine unterschiedliche Resensibilisierungszeit. Der 5-HT₃-Rezeptor-spezifische Agonist mCPBG bewirkt hingegen bei 5-HT_{3A}- und 5-HT_{3AB}-Rezeptoren einen Offen-Kanal-Block. Dies bedeutet, dass der Desensibilisierungs-Mechanismus nicht nur von der Quartärstruktur des Rezeptors, sondern auch vom Agonisten bestimmt wird.

Funktionelle Unterschiede zwischen heterolog exprimierten und nativen 5-HT₃-Rezeptoren konnten lange nicht erklärt werden und man machte unbekannte zelluläre Faktoren dafür verantwortlich (van Hooft et al., 1997). Erst die Entdeckung der 5-HT_{3B}-Rezeptoruntereinheit (Davies et al., 1999) legte nahe, dass der native 5-HT₃-Rezeptor ein Heteromer aus 5-HT_{3A}- und 5-HT_{3B}-Untereinheiten ist. Man nimmt auch an, dass sowohl homomere als auch heteromere 5-HT₃-Rezeptoren in sensorischen Neuronen exprimiert werden (Morales et al., 2001). Dadurch gewinnen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen unterschiedlichen Eigenschaften homomerer und heteromerer Rezeptoren zusätzlich an Bedeutung. Zudem könnten unsere Ergebnisse dazu beitragen, Interaktionen zwischen Pharmaka und dem 5-HT₃-Rezeptor besser zu verstehen.

8. Literaturverzeichnis

- Ali Z., Wu G., Kozlov A., Barasi S.: The role of 5HT₃ in nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. *Neurosci Lett.* 208(3) (1996) 203-7
- Allgaier C., Warnke P., Stangl A.P., Feuerstein T.J.: Effects of 5-HT receptor agonists on depolarization-induced [³H]-noradrenaline release in rabbit hippocampus and human neocortex. *Br J Pharmacol* 116 (1995) 1769-1774
- Barann M., Meder W., Dorner Z., Büss M., Bönisch H., Göthert M., Urban B.W.: Recombinant human 5-HT_{3A} receptors in outside-out patches of HEK 293 cells: basic properties and barbiturate effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362 (2000) 255-265
- Barnes N.M., Sharp T.: A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38 (1999) 1083-1152
- Belelli D., Balcarek J.M., Hope A.G., Peters J.A., Lambert J.J., Blackburn T.P.: Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3AS receptor subunit. *Mol Pharmacol* 48 (1995) 1054-1062
- Boess F.G., Beroukhim R., Martin I.L.: Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor. *J Neurochem* 64 (1995) 1401-1405
- Brady C.A., Stanford I.M., Ali I., Lin L., Williams J.M., Dubin A.E., Hope A.G., Barnes N.M.: Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT_{3A} receptors versus heteromeric 5-HT_{3A/3B} receptors. *Neuropharmacology* 41 (2001) 282-284
- Brown A.M., Hope A.G., Lambert J.J., Peters J.A.: Ion permeation and conduction in a human recombinant 5-HT₃ receptor subunit (h5-HT_{3A}). *J Physiol* 507 (1998) 653-665

- Brunello N., Masotto C., Steardo L., Markstein R., Racagni G.: New insights into the biology of schizophrenia through the mechanism of action of clozapine. *Neuropharmacol* 13 (1995) 177-213
- Campbell A.D., McBride W.J.: Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 51 (1995) 835-842
- Clements J.D.: Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci* 19 (1996) 163-171
- Colquhoun D., Hawkes A.G.: On the stochastic properties of single ion channels. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 211 (1981) 205-235
- Colquhoun D., Sakmann B.: Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J Physiol* 369 (1985) 501-557
- Costall B., Naylor R.J.: 5-HT₃ receptor antagonism and schizophrenia. In: 5-Hydroxytryptamine₃ receptor antagonists. King F.D., Jones B.J., Sanger G.J. (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton (1994a) 183-201
- Costall B., Naylor R.J.: 5-HT₃-receptor antagonists in the treatment of cognitive disorders. In: 5-Hydroxytryptamine₃ receptor antagonists. King F.D., Jones B.J., Sanger G.J. (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton (1994b) 203-219
- Davies P.A., Pistis M., Hanna M.C., Peters J.A., Lambert J.L., Hales T.G., Kirkness E.F.: The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397 (1999) 359-363
- del Castillo J., Katz B.: Interaction at endplate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 146 (1957) 369-381

- Eiselé J.-L., Bertrand S., Galzi J.-L., Devillers-Thiery A., Changeux J.P., Bertrand D.: Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366 (1993), 479-483
- Eisensamer B., Rammes G., Gimpl G., Shapa M., Ferrari U., Hapfelmeier G., Bondy B., Ziegelgänsberger W., Holsboer F., Rupprecht R.: Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT₃) receptor. *Mol Psychiatry*, im Druck
- Fan P.: Inhibition of the 5-HT₃ receptor-mediated current by the protein kinase inhibitor, H-7. *Brain Res* 649 (1994), 310-312
- Fletcher S., Barnes N.M.: Desperately seeking subunits: are native 5-HT₃ receptors really homomeric complexes? *Trends Pharmacol Sci* 19 (1998) 212-215
- Franke C., Hatt H., Dudel J.: Liquid filament switch for ultra-fast exchanges of solutions at excised patches of synaptic membrane of crayfish muscle. *Neurosci Lett* 77 (1987) 199-204
- Franke C., Parnas H., Hovav G., Dudel J.: A molecular scheme for the reaction between acetylcholine and nicotinic channels. *Biophys J* 64 (1993) 339-356
- Green T., Stauffer K.A., Lummis S.C.R.: Expression of recombinant homo-oligomeric 5-hydroxytryptamine₃ receptors provides new insights into their maturation and structure. *J Biol Chem* 270 (1995) 6056-6061
- Greger, R.: Membranpotential. In: "Lehrbuch der Physiologie", Klinke, R., Silbernagl, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996, 2. Auflage, 47-58
- Gunthorpe M.J., Peters J.A., Gill C.H., Lambert J.J., Lummis S.C.: The 4'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 (2000) 187-198

- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.: Improved patch-clamp techniques for high resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391 (1981) 85-100
- Hanna M.C., Davies P.A., Hales T.G., Kirkness E.F.: Evidence for expression of heteromeric serotonin 5-HT₃ receptors in rodents. *J Neurochem* 75 (2000) 240-247
- Hapfelmeier G., Tredt C., Haseneder R., Zieglgänsberger W., Eisensamer B., Rupprecht R. and Rammes G.: Co-expression of the 5-HT_{3B} serotonin receptor subunit alters the biophysics of the 5-HT₃ receptor. *Biophys J* 84 (2003) 1720-1733
- Hargreaves A.C., Lummis S.C.R., Taylor C.W.: Ca²⁺ permeability of cloned and native 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *Mol Pharmacol* 46 (1994) 1120-1128
- Heckmann M., Dudel J.: Desensitization and resensitization kinetics of glutamate receptor channels from *Drosophila* larval muscle. *Biophys J* 72 (1997) 2160-2169
- Hermann B., Wetzel C.H., Pestel E., Zieglgänsberger W., Holsboer F., and Rupprecht R.: Functional antagonistic properties of clozapine at the 5-HT₃ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 225 (1996) 957-60
- Huganir R.L., Delcour A.H., Greengard P., Hess G.P.: Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature* 321 (1986) 774-776
- Huganir R.L., Greengard P.: Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron* 5 (1990) 555-567
- Hussy N., Lukas W., Jones K.A.: Functional properties of a cloned 5-hydroxytryptamine ionotropic receptor subunit: comparison with native mouse receptors. *J Physiol* 481 (1994) 311-323
- Hüther G, Rüter E: *Das serotonerge System*. UNI-MED Verlag AG, Bremen 1. Auflage, (2000)

- Imoto K., Busch C., Sakmann B., Mishina M., Konno T., Nakai J., Bujo H., Mori Y., Fukuda K., Numa S.: Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature*, 335 (1988) 645-648
- Jenkins A., Franks N.P., Lieb W.R.: Actions of general anaesthetics on 5-HT₃ receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 117 (1996) 1507-1515
- Jones B.J., Blackburn T.P.: The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* 71 (2002) 555-568
- Jones B.J., Piper D.C.: 5-HT₃ receptor antagonists in anxiety. In: 5-Hydroxytryptamine₃ receptor antagonists. King FD, Jones BJ, Sanger GJ (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton (1994) 155-181
- Jones M.V., Westbrook G.L.: Desensitized states prolong GABA_A channel responses to brief agonist applications. *Neuron* 15 (1995) 181-191
- Jones M.V., Westbrook G.L.: The impact of receptor desensitization on the fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 19 (1996) 96-101
- Kiefel J.M., Cooper M.L., Bodnar R.J.: Serotonin receptor subtype antagonists in the medial ventral medulla inhibit mesencephalic opiate analgesia. *Brain Res.* 597(2) (1992) 331-338
- Kilpatrick, G.J., Butler A., Burridge J., and Oxford A. W.: 1-(m-chlorophenyl)-biguanide, a potent high affinity 5-HT₃ receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 182 (1990) 193-197
- Klinke R.: Erregungsübertragung in Zellverbänden. In: "Lehrbuch der Physiologie", Klinke, R., Silbernagl, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996b, 2. Auflage, 59-78

- Koyama S., Matsumoto N., Kubo C., Akaike N.: presynaptic 5-HT₃ receptor-mediated modulation of synaptic GABA release in the mechanically dissociated rat amygdala neurons *J Physiol* 529 (2000) 373-383
- Lambert J.J., Peters J.A., Hales T.G., Dempster J.: The properties of 5-HT₃ receptors in clonal cell lines studied by patch-clamp techniques. *Br J Pharmacol* 97 (1989) 27-40
- Lankiewicz S., Lobitz N., Wetzel C.H.R., Rupprecht R., Gisselmann G., Hatt H.: Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine₃ receptor cDNA and its splice variants from guinea pig. *Mol Pharmacol* 53 (1998) 202-212
- Legendre P., Ali D.W., Drapeau P.: Recovery from open channel block by acetylcholine during neuromuscular transmission in zebrafish. *J Neurosci* 20 (2000) 140-148
- Lobitz N., Gisselmann G., Hatt H., Wetzel C.H.: 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 (2001) 844-851
- Löffler G.: Replikation und Gentechnik. In: *Biochemie und Pathobiochemie*, Löffler G., Petrides P.E. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1997, 5. Auflage:205-237
- Machu T.K., Harris A.: Alcohols and anesthetics enhance the function of 5-hydroxytryptamine₃ receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 271 (1994) 898-905
- MacMahon L.L., Kauer J.A.: Hippocampal interneurons are excited via serotonin-gated ion channels. *J Neurophysiol* 78 (1997) 2493-2502
- Maconochie D.J., Zempel J.M., Steinbach J.H.: How quickly can GABA_A receptors open? *Neuron* 12 (1994) 61-71

- Malone H.M., Peters J.A., Lambert J.J.: Physiological and pharmacological properties of 5-HT₃ receptors - a patch clamp study. *Neuropeptides* 19 Suppl (1991) 25-30
- Mariq A.V., Peterson A.S., Brake A.J., Myers R.M., Julius D.: Primary structure and functional expression of the 5-HT₃ Receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254 (1991) 432-437
- McCray J.A., Trentham D.R.: Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 18 (1989) 239-70
- McMahon L.L., Kauer J.A.: Hippocampal interneurons are Excited via serotonin-gated ion channels. *J Neurophysiol* 78 (1997) 2493-2502
- Morales M., Battenberg E., Lecea L., Bloom F.E.: The type 3 serotonin receptor is expressed in a subpopulation of GABAergic neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Brain Res* 731 (1996) 199-202
- Morales M., McCollum N., Kirkness E.F.: 5-HT₃-Receptor subunits A and B are co-expressed in neurons of the dorsal root ganglion. *J Comp Neurol* 438 (2001) 163-172
- Nejt H.C., Vijverberg H.P.M., Bercken Van Den J.: The Dopamine response in mouse neuroblastoma cells is mediated by serotonin 5-HT₃ Receptors. *Eur J Pharmacol* 127 (1986) 271-274
- Numberger M., Draguhn A.: *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford, 1996, 1.Auflage
- Ortells M.O., Lunt G.G.: Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 18 (1995) 121-127

- Parker R.M., Barnes J.M., Ge J., Barber P.C., Barnes N.M.: Autoradiographic distribution of [³H]-(*S*)-zacopride-labelled 5-HT₃ receptors in human brain. *J Neurol Sci* 144 (1996) 119-127
- Petrides P.E.: Gendiagnostik und Getherapie. In: „Biochemie und Pathobiochemie“, Löffler G., Petrides P.E. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1997a, 5. Auflage, 317-355
- Petrides P.E.: Nervengewebe. In: "Biochemie und Pathobiochemie", Löffler G., Petrides P.E. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1997b, 5. Auflage, 971-993
- Pratt G.D., Bowery N.G.: The 5-HT₃ receptor ligand [3H]BRL 43694 binds to presynaptic sites in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neuropharmacology* 28 (1989) 1367-1376
- Rammes G., Eisensamer B., Ferrari U., Shapa M., Gimpl G., Holsboer F., Hapfelmeier G., Ziegelgänsberger W., Rupprecht R.: Antipsychotic drugs antagonise human serotonin type 3 (5-HT₃) receptor currents in a non-competitive manner. eingereicht
- Rapport M.M.: Serum vasoconstrictor (serotonin) V. The precence of creatinine in the complex. A proposed structure of the vasoconstrictor pricipile. *J Bio Chem* 180 (1949) 961-969
- Rondé P., Nichols R.A.: High calcium permeability of serotonin 5-HT₃ receptors on presynaptic nerve terminals from rat striatum. *J Neurochem* 70 (1998) 1094-1103
- Schlicker E., Kathmann M., Exner H.J., Detzner M., Göthert M.: The 5-HT₃ receptor agonist 1-(*m*-chlorophenyl)-biguanide facilitates noradrenaline release by blockade of α_2 -adrenoceptors in the mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349 (1994) 20-24
- Schmidt C.J., Black C.K.: The putative 5-HT agonist phenylbiguanid induces carrier-mediated release of dopamine. *Eur J Pharmacol* 167 (1989) 309-310

- Shao X.M., Yakel Y.L., Jackson M.B.: Differentiation of NG108-15 cells alters channel conductance and desensitization kinetics of the 5-HT₃ receptor. *J Neurophysiol* 65 (1991) 630-638
- Steward L.J., Bufton K.E., Hopkins P.C., Davies W.E., Barnes N.M.: Reduced levels of 5-HT₃ receptor recognition sites in the putamen of patients with Huntington's disease. *Eur J Pharmacol* 242 (1993) 137-143
- Sun Y., Olson R., Horning M., Armstrong N., Mayer M., Gouaux E.: Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* 417 (2002) 245-253
- Tecott L.H., Mariq A.V., Julius D.: Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Neurobiology* 90 (1993) 1430-1434
- Unwin N.: Neurotransmitter Action: Opening of Ligand-Gated Ion Channels. *Cell* 72 Suppl (1993) 31-41
- van Hooft J.A., Kreikamp A.P., Vijverberg P.M.: Native Serotonin 5-HT₃ receptors expressed in *Xenopus* Oocytes differ from homopentameric 5-HT₃ receptors. *J Neurochem* 69 (1997) 1318-1321
- van Hooft J.A., Vijverberg H.P.M.: 5-HT₃ receptors and neurotransmitter release in the CNS: a nerve ending story? *Trends Neurosci* 23 (2000) 605-610
- van Hooft J.A., Vijverberg H.P.M.: Selection of distinct conformational states of the 5-HT₃ receptor by full and partial agonists. *Br J Pharmacol* 117 (1996) 839-846
- Waxham N.M.: Neurotransmitter Receptors. In: *Fundamental Neuroscience* Zigmond M.J., Bloom F.E., Landis S.C., Roberts J.L., Squire L.R. Academic Press (1999) 235-267

- Werner P., Kawashima E., Reid J., Hussy N., Lundstrom K., Buell G. Humbert Y.: Organization of the mouse 5-HT₃ receptor gene and functional expression of two splice variants. *Brain Res Mol Brain* 26 (1994) 233-241
- Yakel J.L.: 5-HT₃ receptors as cation channels, in *Central and Peripheral 5-HT₃ Receptors*. Hamon M ed, (1992) 103-128, Academic Press, London
- Yakel J.L., Lagrutta A., Adelman J.P., North R.A.: Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 5030-5033
- Yang J.: Ion permeation through 5-hydroxytryptamine-gated channels in neuroblastoma N18 cells. *J Gen Physiol* 96 (1990) 1177-1198
- Yang J., Mathie A., Hille B.: 5-HT₃ receptor channels in dissociated rat superior cervical ganglion neurons. *J Physiol* 448 (1992) 237-256
- Yang N.S., Burkholder J., Roberts B., Martinell B., McCabe D.: In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990) 9568-9572
- Yi S.J., Gifford A.N., Johnson K.M.: Effect of cocaine and 5-HT₃ receptor antagonists on 5-HT-induced dopamine release from rat striatal synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 199 (1991) 185-189

9. Anhang

9.1. Verwendete Lösungen

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland, bezogen.

Minimum Essential Medium (10MEM), Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland:

	(mg/l)		(mg/l)
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	264	Aminosäuren:	
KCl	400	L-Arginin-HCl	126
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200	L-Cystin	24
NaCl	6800	L-Histidin HCl x H ₂ O	42
NaHCO ₃	200	L-Isoleucin	52
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	158	L-Leucin	52
D-Glucose	1000	L-Lysin x HCl	73
Phenolrot	10	L-Methionin	15
		L-Phenylalanin	32
Vitamine:		L-Threonin	48
D-Ca Pantothenat	1,0	L-Tryptophan	10
Cholinchlorid	1,0	L-Tyrosin	10
Folsäure	1,0	L-Valin	46
i-Inositol	2,0		
Nikotinamid	1,0		
Pyridoxal-HCl	1,0		
Riboflavin	0,10		
Thiamin-HCl	1,0		

Phosphat Buffered Saline (PBS)-Puffer: pH 7,3

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

Elektroporationspuffer: pH 7,35 (eingestellt mit CH₃COOH)

	(mM)
KH ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O	50
K-Acetat	20

Magnesiumsulfatlösung: pH 7,67 (eingestellt mit NaOH)

MgSO₄ x 7 H₂O 0,1 M

Extrazellulärlösung: pH 7,35 (eingestellt mit NaOH), Osmolarität: 340 mOsm/l

	(mM)
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

Intrazellulärlösung: pH 7,3 (eingestellt mit KOH), Osmolarität: 340 mOsm/l

	(mM)
KCl	140
MgCl ₂	2,0
EGTA	11
HEPES	10
Glucose	10

Weitere Chemikalien:

DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland

9.2. Zellkultur

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

9.3. Verbrauchsmittel

Zellpräparation und Transfektion:

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

Patch-Clamp-Technik:

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

9.4. 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

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 A/D Converter Digidata 1200	Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA

¹ American Type Culture Collection

EDV-Umgebung:

Power Macintosh 7200/90

Vektra Pentium PC

pClamp 6.0 Software

AxoGraph 3 Software

SigmaStat 2.03 Software

Bioq 2.0 Software

Apple Computer, Cupertino, CA, USA

Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA

Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA

Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA

SPSS Science, Chicago, IL, USA

Parnas & Parnas Neurobiology Lab, Hebrew University,
Jerusalem, Israel,<http://www.ls.huji.ac.il/~parnas/Bioq/bioq.html>

10. Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. R. Rupprecht für die Überlassung des Themas, sowie für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. G. Hapfelmeier für die Unterstützung beim wissenschaftlichen Arbeiten, für die hervorragende Betreuung und die Ansprechbarkeit in allen Belangen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Ziegelgänsberger für die Hilfe und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Rainer Haseneder für die Unterstützung bei jeglichen technischen Problemen, bei Auswertungen und graphischen Darstellungen.

Herrn Sebastian Schmidt für die Hilfe bei der Auswertung der Daten.

11. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Christian Jürgen Tredt

Wohnort: Schießstättberg 51
85072 Eichstätt

Geburtstag und –ort: 06.04.1977 in Eichstätt

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Eltern: Rainer Tredt, Studiendirektor a.D.
Ingrid Tredt, Hausfrau

1983 – 1987 Grundschole am Graben in Eichstätt

1987 – 1992 Gabrieli-Gymnasium Eichstätt

06/1996 Abitur

01/1997 Eintritt in die Bundeswehr

1997 – 1999 Studium der Humanmedizin in Regensburg (Vorklinik)

1999 – 2002 Studium der Humanmedizin an der TU München (Klinik)

10/2002 – 02/2003 1. Teil des Praktischen Jahres / Chirurgie: Alexandra Hospital,
Singapur

2/2003 – 05/2003 2. Teil des Praktischen Jahres / Anästhesie, Klinik für
Anästhesiologie, Klinikum Rechts der Isar, München

06/2003 – 09/2003 3. Teil des Praktischen Jahres / Innere Medizin, Klinikum
Barmherzige Brüder, München