

**Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München,**

**Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

**Identifikation für die Wirkung von  
Clozapin-relevanten Strukturen am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor**

Christine Hosp

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. G. K. Rammes, Ph.D. 2. Univ.- Prof. Dr. M. Göttlicher

Die Dissertation wurde am 21.07.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.04.2009 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Schizophrenie.....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	2
1.1.2 Ursachen.....	2
1.1.3 Beeinflussung des dopaminergen Systems durch den 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor.....	4
1.1.4 Das Neuroleptikum Clozapin .....	5
1.2 Der 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor .....	7
1.2.1 Klassifikation und Struktur.....	7
1.2.2 Verteilung der 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren im Gehirn .....	11
1.2.3 Heterogenität des 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptors.....	13
1.2.3.1 Rezeptor-Untereinheiten.....	13
1.2.3.2 Spleißvarianten .....	13
1.3 Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) .....	14
1.3.1 Struktur.....	14
1.3.2 Biosynthese und Abbau .....	15
1.3.3 Verteilung von Serotonin im Körper .....	16
1.3.4 Physiologische Serotoninwirkung .....	16
<b>2 FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>16</b>
<b>3 VERWENDETE GERÄTE, MEDIEN UND PUFFER .....</b>	<b>18</b>
3.1 Geräte .....	18
3.2 Computer und Auswertungssoftware .....	18
3.3 Gebrauchtwaren.....	18
3.4 Zelllinie und verwendete Plasmide.....	19
3.5 Reagenzien .....	19
3.6 Getestete Substanzen.....	20
3.7 Herstellen von Medien (unter sterilen Bedingungen).....	20

---

<b>4</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>22</b>
4.1.1	Passagieren von HEK 293-Zellen.....	22
4.1.2	Transfektion.....	23
4.1.2.1	Elektroporationsmethode.....	23
4.1.2.2	Durchführung der Elektroporation .....	23
<b>4.2</b>	<b>Molekularbiologie.....</b>	<b>24</b>
4.2.1	Herstellung des humanen und murinen 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors .....	24
4.2.2	Herstellung von Restriktionsenzymststellen im humanen und murinen 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor	24
4.2.3	Konstruktion der chimären 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptoren (Maus-Mensch).....	25
<b>4.3</b>	<b>Elektrophysiologie .....</b>	<b>27</b>
4.3.1	<i>Whole-Cell</i> -Konfiguration .....	28
4.3.2	Messprinzip .....	30
4.3.3	Transmitterapplikationssystem .....	30
4.3.4	Herstellung der Messelektrode und der Patch-Pipetten .....	32
4.3.5	Messarbeitsplatz ( <i>Setup</i> ).....	32
4.3.6	Versuchsaufbau .....	34
4.3.6.1	Applikationsmodus für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve von Serotonin .....	34
4.3.6.2	<i>Rundown</i> -Effekt.....	35
4.3.6.3	Applikationsmodus für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve von Clozapin .....	35
<b>4.4</b>	<b>Datenverarbeitung.....</b>	<b>36</b>
4.4.1	Datenaufzeichnung und -auswertung .....	36
4.4.2	Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurven .....	37
4.4.3	Statistische Datenauswertung .....	38
4.4.3.1	Dosis-Wirkungs-Kurven.....	38
4.4.3.2	Multiple Aktivierung des 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors.....	38
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1</b>	<b>Multiple Aktivierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors.....</b>	<b>45</b>
5.1.1	Amplitude.....	45
5.1.2	Ladung.....	47
5.1.3	Desensibilisierungseigenschaften des 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors.....	48
<b>5.2</b>	<b>Dosis-Wirkungs-Kurve von 5-HT an verschiedenen 5-HT<sub>3A</sub>- Rezeptoren .....</b>	<b>50</b>
5.2.1	Amplitude.....	50
5.2.2	Ladung.....	53

---

<b>5.3</b>	<b>Dosis-Wirkungs-Kurve von Clozapin an verschiedenen 5-HT<sub>3A</sub>- Rezeptoren.....</b>	<b>55</b>
5.3.1	Amplitude.....	55
5.3.2	Ladung.....	57
<b>5.4</b>	<b>Cheng-Prusoff-Gleichung .....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
<b>6.1</b>	<b>Bekannte Eigenschaften des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors Mensch-Maus.....</b>	<b>60</b>
<b>6.2</b>	<b>Konstruktion der Chimären.....</b>	<b>62</b>
<b>6.3</b>	<b>Affinität von Clozapin am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor in Abhängigkeit von Serotonin und der 5-HT<sub>3A</sub>- Rezeptorstruktur.....</b>	<b>62</b>
<b>6.4</b>	<b>Klinische Relevanz.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>75</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>77</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>78</b>

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoxazolpropionat
ANOVA	Analysis of Variance (statistischer Test)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary desoxyribonucleic acid)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
EC <sub>50</sub>	halbmaximal-effektive Konzentration (eines Agonisten)
EPMS	Extrapyramidalmotorisches System
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen Typ 293
HIAA	Hydroxyindolessigsäure
5-HT	Serotonin (5-Hydroxytryptamin)
h5-HT <sub>3</sub>	humaner 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor
m5-HT <sub>3</sub>	muriner 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor
IC <sub>50</sub>	halbmaximal-inhibitorische Konzentration (eines Antagonisten)
K	Kontrolle (10 $\mu$ M Serotonin)
K <sub>b</sub>	Bindungsaffinität des Antagonisten
M	molar (mol/l)
M1-M4	Transmembranhelices 1-4
MAO A	Monoaminoxidase A
max	Maximum
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
n	Anzahl der gewerteten Experimente
nACh-Rezeptor	nikotinerger Azetylcholin-Rezeptor
norm.	normalisiert
nH	Hill Koeffizient
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
SI	internationale Einheit (système international)
$\tau_{des1}/\tau_{des2}$	Zeitkonstante 1 und 2 der Desensibilisierung
U/min.	Umdrehungen pro Minute
ZNS	Zentralnervensystem

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

---

# 1 EINLEITUNG

Neuroleptika wirken über verschiedene Einflüsse auf Neurotransmittersysteme des zentralen Nervensystems. Gegenwärtig ist die Beeinflussung des Dopamin- und Serotoninsystems am besten untersucht. Nach aktuellem Erkenntnisstand scheinen sich hier die wichtigsten Prozesse abzuspielen (Laux, 2006, S.409).

Gemäß den pharmakologischen Eigenschaften und der chemischen Struktur lassen sich typische und atypische Neuroleptika unterscheiden. Die antipsychotische Wirkung der typischen Neuroleptika beruht vorrangig auf der Blockade von Dopamin-D<sub>2</sub> (und -D<sub>3</sub>)-Rezeptoren; dies verursacht jedoch extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen. Atypische Neuroleptika zeigen dagegen geringe bis keine extrapyramidalmotorischen Nebenwirkungen (Szegedi, 2006, S.80). Bei den atypischen Neuroleptika kommt neben der Blockade von Dopaminrezeptoren und anderer Rezeptoren insbesondere ein Antagonismus an 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren in Betracht. Dadurch wird die bessere extrapyramidalmotorische Verträglichkeit und das breitere Wirkprofil der atypischen Neuroleptika erklärt. „Die Kombination von postsynaptischer Dopamin-D<sub>2</sub>- und Serotonin-5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptorblockade wird ... zunehmend als sinnvoller Ansatz zur Entwicklung von »atypischen Neuroleptika« angesehen“. (Möller, 2008, S.300)

Aber auch der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonismus rückt zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses: In Tierversuchen und ersten klinischen Studien wurde für 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten eine anxiolytische und antipsychotische Wirkung nachgewiesen (Greenshaw, 1993, S.266ff., Barnes, 1999, S.1114). Clozapin, der „Prototyp“ der atypischen Neuroleptika, ist u.a. ein potenter kompetitiver Antagonist am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor (Thompson, 2006b, S.273). Es scheint möglich zu sein, dass Clozapin sein Wirkungsprofil besonders über den Antagonismus am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor entfaltet. Die Wirkungen und Nebenwirkungen von Clozapin könnten von der Potenz, mit der Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor bindet, abhängig sein.

In der vorliegenden Arbeit soll die Affinität von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor in Abhängigkeit von der Rezeptorstruktur untersucht werden.

## 1.1 Schizophrenie

Die Schizophrenie gehört zu den endogenen Psychosen. Diese sind durch psychopathisch beschreibbare Auffälligkeiten des Denkens, der Wahrnehmung und der Aktivität gekennzeichnet.

---

Therapeutisch relevant lassen sich die Symptome der Schizophrenie in zwei Gruppen einteilen:

1. Plus- oder Positivsymptomatik: z.B. Halluzinationen, Wahnvorstellungen.
2. Minus- oder Negativsymptomatik: z.B. Antriebsarmut, Affektverflachung, Verlust sozialer Kontakte.

### **1.1.1 Epidemiologie**

Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an Schizophrenie zu erkranken, liegt bei etwa 1%. Männer und Frauen sind gleich häufig davon betroffen. Die Erkrankung beginnt zumeist im frühen Erwachsenenalter (Möller, 2005, S.134, Reynolds, 2006, S.954). Schizophrene Kranke machen die größte Gruppe der stationären Einweisungen in psychiatrische Kliniken aus (30-40%). Zwei Drittel der dauerhospitalisierten Patienten in der Psychiatrie sind schizophren (Müller, 2004, S.303).

### **1.1.2 Ursachen**

Über die Ursachen der Psychosen sind bis heute nur Teilaspekte bekannt. Es häufen sich jedoch die Befunde, dass diese Erkrankungen auf Neurotransmitterstörungen zurückzuführen sind, z.B. auf Störungen im Stoffwechsel der aromatischen Monoamine Dopamin, Noradrenalin und Serotonin. Eine zumindest teilweise Wiederherstellung des gestörten Neurotransmittergleichgewichts ist durch Psychopharmaka möglich, die durch Interaktionen mit den physiologischen Überträgersubstanzen bzw. deren Rezeptoren in die nervale Regulation eingreifen (Mutschler, 2008, S.160).

Bei der Schizophrenie wird neben einer Änderung der GABAergen, glutamatergen, cholinergen und serotonergen Erregungsübertragung vor allem eine Störung des dopaminergen Systems angenommen (Mutschler, 2008, S.161, Widschwendter, 2005, S.533, Möller, 2008, S.261).

### **Dopaminhypothese der Schizophrenie**

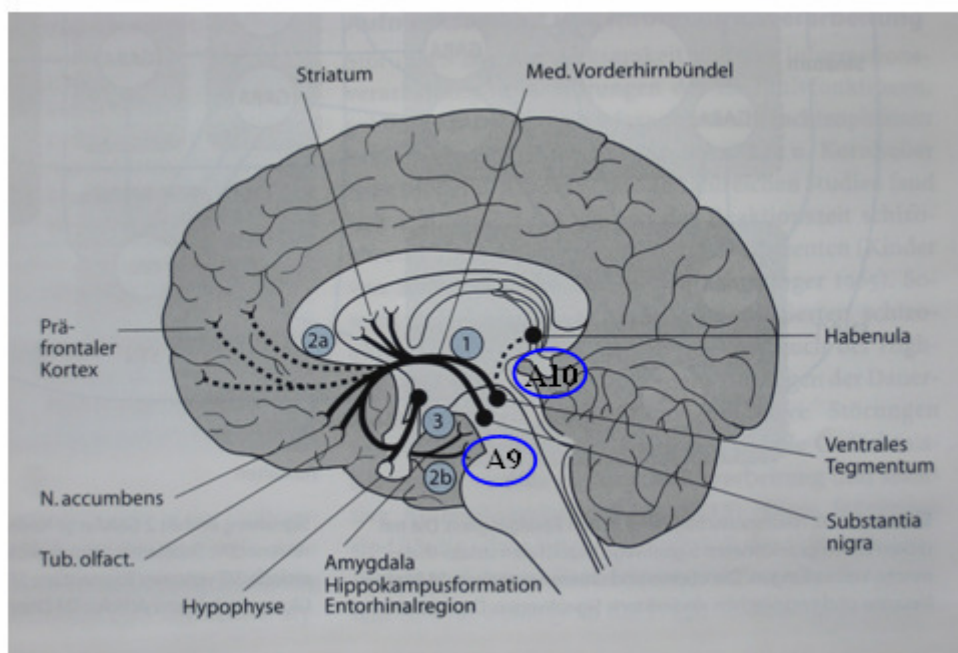
Die „Dopamin-Hypothese der Schizophrenie“, aufgestellt von Carlsson 1978, gründet auf der Beobachtung, dass Dopaminagonisten eine Psychose, ähnlich wie bei einer akuten paranoiden Schizophrenie, auslösen können (Carlsson, 1978, S.165ff.). Zunächst ging man bei der Dopaminhypothese davon aus, dass ein Überangebot von Dopamin die Erkrankung verursacht, später von einer Überempfindlichkeit dopaminergere Rezeptoren.



Heute geht man von einem Ungleichgewicht dopaminerger Bahnen (Abb. 1; Tab. 1) im Gehirn als mögliche Ursache für die Entstehung einer Schizophrenie aus. Man vermutet, dass eine dopaminerge Hyperaktivität (durch verstärkte Stimulation von Dopamin-D<sub>2</sub>-Rezeptoren) im mesolimbischen System (2b) die Positivsymptome hervorruft.

Für die Negativsymptome und kognitiven Störungen wird eine dopaminerge Hypoaktivität (durch verminderte Stimulation von Dopamin-D<sub>1</sub>-Rezeptoren) im mesokortikalen System (2a) angenommen (Möller, 2008, S.261, Widschwendter, 2005, S.S34, Schröder, 2006, S.353f.).

Typische Neuroleptika (Abschnitt 1.1.4) entfalten ihre Wirkung vornehmlich durch Antagonisierung von Dopamin-D<sub>2</sub>-Rezeptoren und beeinflussen vor allem die Positivsymptomatik. Die Negativsymptomatik wird wenig beeinflusst. Atypische Neuroleptika wirken dagegen günstig auf die Positiv- und Negativsymptomatik.



**Abb. 1: Wichtige dopaminerge Bahnsysteme des ZNS und ihre dopaminergen Ursprungskernareale A9 und A10 (modifiziert nach Möller, 2008, S.261, modifiziert nach Kasper, 2003, S.301)**

- ① = nigrostriataler Trakt
- ②a = mesokortikaler Trakt
- ②b = mesolimbischer Trakt
- ③ = tuberoinfundibulärer Trakt

**Tab. 1: Lokalisation und Funktion dopaminerger Neuronen im ZNS (modifiziert nach Kaschka, 2007, S.221)**

Bahn	Lokalisation und Projektionsgebiet	Funktion
1: nigrostriatale Bahn	Substantia nigra (A9 Projektionsgebiet) -> Striatum	Teil des EPMS; Hemmung thalamo-kortikaler Hemmungen der Motorik und Muskelspannung. Wird mit Nebenwirkungen der typischen Neuroleptika im EPMS in Verbindung gebracht.
2a + 2b: mesokortikale und mesolimbische Bahn	Ventrales Tegmentum (A10 Projektionsgebiet) -> präfrontaler Kortex und limbisches System (Amygdala, Nucl. accumbens, laterales Septum)	Aktivierung kognitiver Funktionen (Denken, Aufmerksamkeit, soziales Verhalten) und Stimulation psychischer Funktionen (Emotion, Belohnung). Von zentraler Bedeutung für Vermittlung anti-psychotischer Wirksamkeit.
3: tuberoinfundibuläre Bahn	Hypothalamus (Ncl. accumbens und Ncl. paraventricularis) -> Infundibulum und Hypophysenvorderlappen	Hemmung der Prolaktinfreisetzung. Typische Neuroleptika bewirken verstärkte Prolaktinfreisetzung.

### 1.1.3 Beeinflussung des dopaminergen Systems durch den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor

Als wesentlichste Komponente der antipsychotischen Wirkung der Neuroleptika gilt die Hemmung dopaminerger Neuronen der vom Tegmentum ausgehenden und zum Nucleus accumbens bzw. weiter zum frontalen Kortex ziehenden mesolimbisch-mesokortikalen Projektion (A10 Projektionsgebiet; Abb. 1, Kaschka, 2007, S.221).

Im Gegensatz zur nigrostriatalen dopaminergen Bahn ist die Dichte der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren im mesolimbisch-mesokortikalen System besonders hoch (Grant, 1995, S.158).

Verhaltensexperimente, neurochemische und elektrophysiologische Forschungsergebnisse konnten zeigen, dass 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren die Aktivität dopaminerger Neurone im mesolimbischen, mesokortikalen und nigrostriatalen System modulieren: So kommt es in Hirnschnitten der Ratte bei Aktivierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors zu einer gesteigerten Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens und Striatum (DeDeurwaerdère, 1998, S.6536, Blandina, 1988, S.349). 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten wiederum verminderten signifikant die Anzahl der spontan aktiven dopaminerger Neurone im Ventralen Tegmentum und in der Pars compacta der Substantia nigra sowie die Dopaminvermittelte Hyperaktivität des Nucleus accumbens (Sorensen, 1989, S.117f., Barnes, 1999, S.1117).

---

Clozapin, nicht aber die typischen Neuroleptika, wirkt als effektiver Antagonist an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, was die bevorzugte Interaktion mit dem mesolimbischen-mesokortikalen dopaminergen System und eine höhere Effizienz bei der Behandlung schizophrener Symptome erklären kann (Wang, 1996, S.7).

Die Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beeinflusst aber nicht nur die Freisetzung des Neurotransmitters Dopamin, sondern auch die Freisetzung von GABA, Glutamat, Serotonin selbst und Azetylcholin (Abschnitt 1.2.2; Barnes, 1999, S.1114ff., Grant, 1995, S. 157). Diese Neurotransmitter sind für die Pathogenese der Schizophrenie ebenfalls von Bedeutung.

#### **1.1.4 Das Neuroleptikum Clozapin**

Neuroleptika (Antipsychotika) sind Mittel der Wahl in der Therapie der Schizophrenie: Die Substanzen bessern die psychischen Symptome und beeinflussen dabei das Bewußtsein und die intellektuellen Fähigkeiten der Patienten nicht wesentlich (Mutschler, 2008, S.161). Allen Neuroleptika gemeinsam ist die Hemmung der produktiven Plusssymptomatik (Kaschka, 2007, S.219).

Die Neuroleptika werden eingeteilt in:

1. Typische Neuroleptika: z.B. Levomepromazin (Neurocil<sup>®</sup>), Sulpirid (Dogmatil<sup>®</sup>), Haloperidol (Haldol<sup>®</sup>).

Nach ihrer antipsychotischen Wirksamkeit teilt man die typischen Neuroleptika in hoch- und niedrigpotente Präparate ein. Hochpotente Neuroleptika zeigen eine hohe Affinität zu Dopamin-D<sub>2</sub>-Rezeptoren und verursachen damit häufig Nebenwirkungen im extrapyramidalmotorischen System (Schröder, 2006, S.380). Niedrigpotente Neuroleptika zeigen dagegen eine verhältnismäßig geringe Affinität zu den Dopamin-D<sub>2</sub>-Rezeptoren. Hochpotente Neuroleptika haben sich in der Akutbehandlung bewährt. Die meisten Patienten werden jedoch aufgrund der besseren Wirksamkeit und Verträglichkeit entweder schon primär oder im Anschluss an die Akutbehandlung auf atypische Neuroleptika ein- bzw. umgestellt.

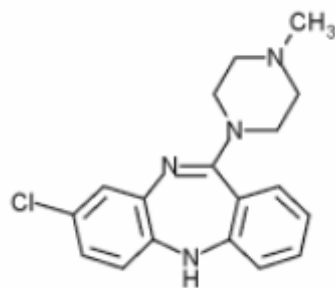
2. Atypische Neuroleptika: z.B. Clozapin (Leponex<sup>®</sup>), Olanzapin (Zyprexa<sup>®</sup>), Amisulprid (Solian<sup>®</sup>).

Die Entwicklung der atypischen Neuroleptika bedeutete einen großen Fortschritt in der Schizophrenietherapie. Denn im Gegensatz zu den typischen Neuroleptika verursachen sie keine oder nur schwache extrapyramidalmotorische Störungen und beeinflussen

---

auch die Minussymptomatik und die kognitiven Fähigkeiten günstig (Kaschka, 2007, S.229). „Die heute diskutierten Hypothesen zur Erklärung atypischer Eigenschaften beruhen daher meist auf der Annahme von »D<sub>2</sub>-Blockade plus zusätzliche Eigenschaft«.“ (Müller, 2008, S.613)

Wenn sämtliche Therapien mit anderen Neuroleptika nicht effizient genug sind oder nicht vertragen werden, wird eine Einstellung auf das atypische Neuroleptikum Clozapin (Abb. 2) empfohlen (Schröder, 2006, S.382, Mutschler, 2008, S.168).



**Abb. 2: Clozapin (Dibenzazepin-Derivat)**

1971 konnte mit der Entdeckung von Clozapin ein großer Fortschritt bei der Behandlung der Schizophrenie erzielt werden, da es keine EPMS-Störungen verursacht (Kaschka, 2007, S.229).

Wegen einer stark erhöhten Inzidenz für das Auftreten einer toxischen Agranulozytose wurde Clozapin zunächst vom Markt genommen. Heute wird das Medikament jedoch unter besonderen Auflagen (u.a. schriftliche Erklärung, regelmäßige Blutbildkontrollen) wieder eingesetzt. Jeder Patient muß individuell auf das Medikament eingestellt werden, da das Ansprechen auf Neuroleptika von Patient zu Patient unterschiedlich ist (Mutschler, 2008, S.168).

Clozapin ist ein Antagonist an dopaminergen, adrenergen, cholinergen, serotonergen und histaminergen Rezeptoren (Reynolds, 1992, S.119 ff., Möller, 2008, S. 299).

Die stärkste Affinität innerhalb der Serotoninrezeptoren hat Clozapin zum 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor (Reynolds, 1992, S.120).

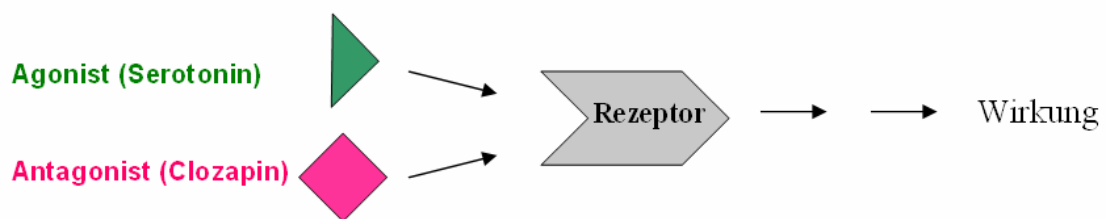
Clozapin ist aber auch ein potenter Antagonist am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor (Thompson, 2006b, S.273). Für selektiv wirkende 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten konnte in Tierversuchen und ersten klinischen Studien eine anxiolytische und antipsychotische Wirkung

---

nachgewiesen werden (Greenshaw, 1993, S.266ff., Barnes, 1999, S.1114). Die antagonistische Wirkung von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor scheint für die antipsychotische Wirkung von Clozapin eine wichtige Rolle zu spielen.

Atypische Neuroleptika, wie z.B. Clozapin und Olanzapin, sind auch geeignet für die Behandlung und zur Prophylaxe manischer Episoden und bipolarer Störungen (Remschmidt, 2000, S.I/12, Mutschler, 2008, S.185).

Die Wirkungsweise von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist kompetitiv-antagonistisch (Watling, 1990, S.470; Abb. 3).



**Abb. 3: Kompetitiv-antagonistische Wirkung von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor**

Der kompetitive Antagonismus ist dadurch charakterisiert, dass Antagonist und Agonist um dieselbe Rezeptorbindungsstelle konkurrieren. Der Antagonist wird reversibel an der spezifischen Bindungsstelle angelagert und kann durch den Agonisten „verdrängt“ werden. „Erst nach erfolgter Dissoziation konkurriert der Agonist mit dem Antagonisten um die erneute Besetzung des jetzt freien Rezeptors.“ (Lüllmann, 1999, S.9)

## 1.2 Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor

### 1.2.1 Klassifikation und Struktur

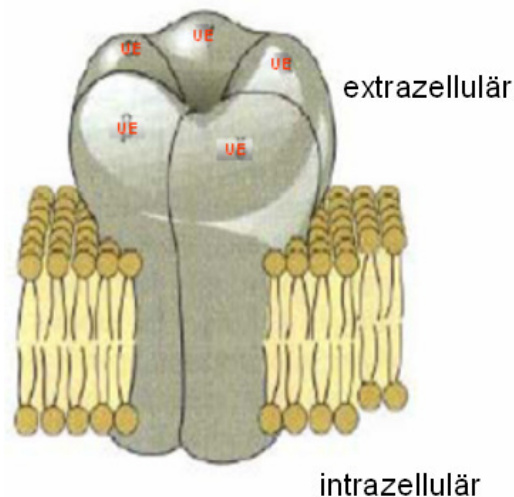
Die Systematik der Serotoninrezeptoren unterscheidet zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (5-HT<sub>1-2</sub>, 5-HT<sub>4-7</sub>) und dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor, der ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal ist. Die Serotoninrezeptoren werden derzeit in 7 Rezeptorfamilien mit 16 Rezeptorsubtypen eingeteilt (Rex, 2007, S.344; Tab. 2).

Tab. 2: Klassifizierung der Serotoninrezeptoren (Rex, 2007, S.343)

Rezeptorsuperfamilie	Rezeptor-Signal-Transduktion	Wirkung	Rezeptor-familie	Rezeptor-tyt
G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	cAMP	Hemmung	5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub>
				5-HT <sub>1B</sub>
				5-HT <sub>1D</sub>
				5-HT <sub>1e</sub>
				5-HT <sub>1F</sub>
	Phospholipase C	Stimulation	5-HT <sub>4</sub> 5-HT <sub>5</sub> 5-HT <sub>6</sub> 5-HT <sub>7</sub>	5-HT <sub>4</sub>
				5-HT <sub>5a</sub>
				5-HT <sub>5b</sub>
				5-HT <sub>6</sub>
				5-HT <sub>7</sub>
Phospholipase C	Stimulation	5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	
			5-HT <sub>2B</sub>	
			5-HT <sub>2C</sub>	
Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren		Öffnung	5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>3A</sub> 5-HT <sub>3B</sub> 5-HT <sub>3c</sub>

Nach Struktur und Funktion gehört der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wie der nAch-, Glyzin-, GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptor zur so genannten „Cys-loop“- Superfamilie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle (Rex, 2007, S.345, Thompson, 2006a, S.3615, Thompson, 2007, S.527). Gemeinsam ist diesen Rezeptoren, dass sie zwei Cysteinmoleküle im Abstand von 15 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne enthalten. Durch Ausbildung einer Disulfidbrücke bilden die Cysteinmoleküle eine charakteristische Schleife (loop; Abb. 6).

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor setzt sich aus fünf symmetrisch angeordneten Untereinheiten (UE) zusammen. Diese bilden in der Zellmembran eine zentrale Ionenpore (Rex, 2007, S.345, Thompson, 2006a, S.3615; Abb. 4).



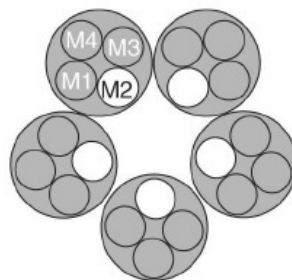
**Abb. 4: Modell des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors mit den fünf Untereinheiten (UE)**

Jede Untereinheit gliedert sich in einen extrazellulären, transmembranären sowie intrazellulären Abschnitt (Abb. 6).

Im extrazellulären, N-terminalen Abschnitt des Rezeptors befinden sich die Bindungsstellen für Serotonin. Diese Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der pharmakologischen Beeinflussung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors durch Serotonin-Agonisten und -Antagonisten (Thompson, 2007, S.527).

Die transmembranäre Domäne wird gebildet von den vier transmembranären  $\alpha$ -Helices M1-M4. M2  $\alpha$ -Helices jeder Untereinheit sind v.a. am Aufbau der Kanalpore beteiligt (Abb. 5). Bindet Serotonin an den Rezeptor, kommt es zu Konformationsänderungen und die Kanalpore öffnet sich (Lummiss, 2005, S.248). Aminosäuren, die sich in unmittelbarer Nähe der M2  $\alpha$ -Helices befinden, beeinflussen die Ionenselektivität des Rezeptors (Thompson, 2007, S.529, S.535).

Der kurze extrazellulär gelegene Abschnitt am C-terminalen Ende des Rezeptors gehört zur transmembranären Domäne (Thompson, 2007, S.527).



**Abb. 5: Aufsicht auf den Ionenkanal des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors.**

Die 5 Untereinheiten des Rezeptors mit ihren jeweiligen vier Transmembranhelices (M1-M4), M2 bildet den Ionenkanal (Thompson, 2007, S.529).

Intrazellulär, zwischen M3 und M4, befindet sich eine lange Rezeptorschleife, in der die Kanalleitfähigkeit geregelt wird und die Rezeptormodulation erfolgt (Thompson, 2007, S.530). Bei der Rezeptormodulation spielen Phosphorylierungen, vornehmlich von Serin- und Threoninresten, durch Proteinkinasen eine wichtige Rolle (van Hooft, 1995, S.10).

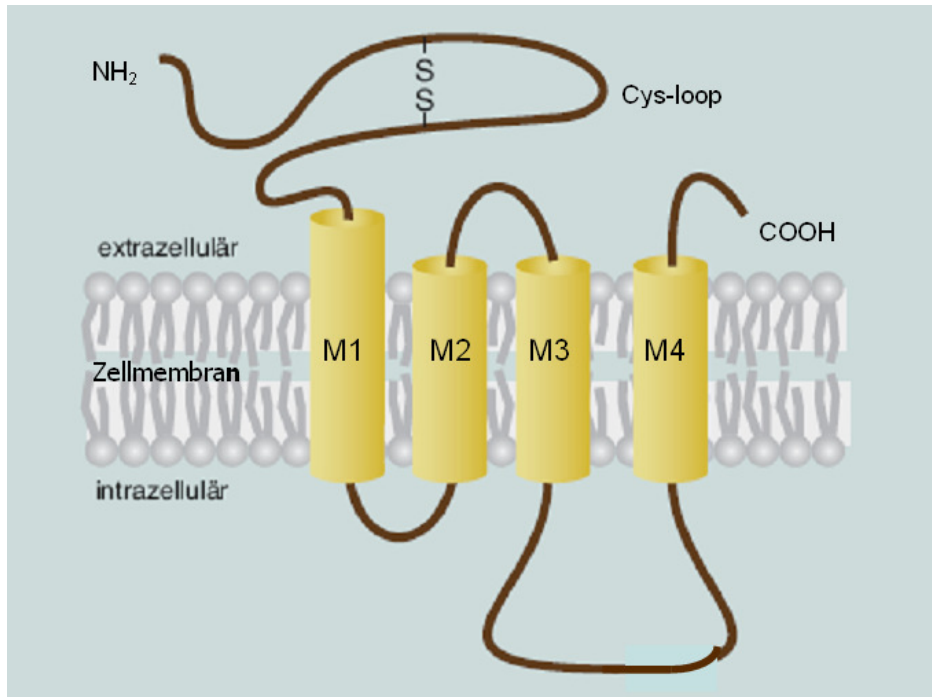


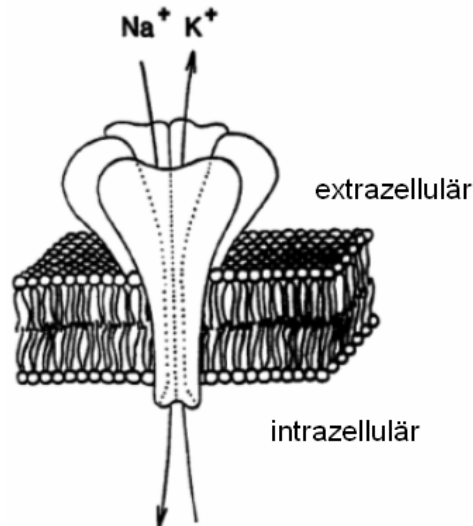
Abb. 6: Untereinheit des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors (modifiziert nach Rex, 2007, S.344).

M1-M4: transmembranäre  $\alpha$ -Helices; Cys-loop: Disulfidbrücke

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist ein ionotroper Rezeptor und v.a. für die monovalenten Kationen Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> permeabel (Brüss, 2000b, S.308, Jackson, 1995, S.453, Thompson, 2007, S. 527).

Elektrophysiologisch zeichnet er sich durch schnelle Aktivierung (innerhalb von 35ms), schnelle Desensibilisierung und Resensibilisierung aus (Jackson, 1995, S.448, Thompson, 2007, S.527, Hoyer, 2002, S.542, Brüss, 2000b, S.308). Im Vergleich zu anderen ionotropen Rezeptoren, wie dem AMPA-Rezeptor, der innerhalb von 10ms aktiviert wird, erfolgt die Aktivierung jedoch „langsam“ (Kuras, 2006, S.328). Bei Aktivierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors durch den natürlichen Agonisten Serotonin kommt es zu einer raschen Depolarisation der Zelle, welche v.a. durch Na<sup>+</sup>-Einstrom (in geringem Maße auch Ca<sup>2+</sup>-Einstrom) und K<sup>+</sup>-Ausstrom hervorgerufen wird (Thompson, 2007, S.527, Hoyer, 2002, S.542, Brüss, 2000b, S.308, Rex, 2007, S.326, Thompson, 2006a, S.3616; Abb. 7).





**Abb. 7: 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor (Na<sup>+</sup>-Einstrom und K<sup>+</sup>-Ausstrom) bei Agonistenaktivierung (modifiziert nach Malone, 1991, S.27)**

### 1.2.2 Verteilung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren im Gehirn

Die höchste Dichte von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren findet man im Hirnstamm in Gebieten, die an der Auslösung des Brechreflexes beteiligt sind, wie die Area postrema, Nucleus tractus solitarii und der dorsale Motorkern des Vagus (Thompson, 2006a, S.3615, Thompson, 2007, S.528, Chameau, 2006, S.574, Rex, 2007, S.345, Jackson, 1995, S.448/9, Barnes, 1999, S.1111). Eine Antagonisierung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in diesen Gebieten trägt zum antiemetischen Effekt von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten bei (Barnes, 1999, S.1111).

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in den Hinterhornganglien sind beteiligt an der Schmerzverarbeitung. Den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten wird deshalb eine antinozizeptive Wirkung, vergleichbar mit der von Lokalanästhetika, zugeschrieben (Rex, 2007, S.350).

Des Weiteren befinden sich die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in Hirngebieten, die zum limbischen System gehören, sowie in den oberflächlichen Schichten des Kortex (Barnes, 1999, S.1111). Das limbische System steuert das emotionale Verhalten und ist das Zentrum der Gefühle. Den anatomischen Strukturen werden folgende Funktionen zugeschrieben: Amygdala (Angstentstehung, Erregung, Lustempfinden), Hippocampus (Überführung von Gedächtnisinhalten von Kurzzeit- in Langzeitgedächtnis), Putamen und Nucleus caudatus (Willkürmotorik), Nucleus accumbens und ventrales Tegmentum (Suchtentstehung, Belohnung; Faerber, 2007, S.3, Grant, 1995, S.156). Die Lokalisation der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren im limbischen System, v.a in der Amygdala und im

Hippocampus, und die Wirkung von atypischen Neuroleptika an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren könnten für den antipsychotischen Effekt von Clozapin mitverantwortlich sein.

Beim Menschen findet sich in Putamen und Nucleus caudatus eine vergleichsweise höhere Rezeptordichte als in kortikalen Regionen, während es bei Nagern umgekehrt ist (Rex, 2007, S.345).

Darüber hinaus sind 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auch in der Substantia nigra (Planung und Beginn einer Bewegung) vorhanden.

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind neuronal sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert (Abb. 8). Postsynaptische 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vermitteln die schnelle synaptische Erregungsübertragung. Die Aktivierung präsynaptischer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beeinflusst die Freisetzung einer Vielzahl von Neurotransmittern: Dopamin, Glutamat, Serotonin, Cholezystokinin und GABA werden vermehrt freigesetzt. Die Freisetzung von Acetylcholin wird dagegen inhibiert (Barnes, 1999, S.1114ff., Thompson, 2007, S.528, van Hooft, 2000, S.605, Rex, 2007, S.346, Grant, 1995, S.157).

Abhängig von der Hirnregion kann man eine unterschiedliche Verteilung von prä- bzw. postsynaptisch lokalisierten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren nachweisen.

Im Hippocampus ist der Rezeptor vornehmlich postsynaptisch, in der Amygdala präsynaptisch lokalisiert (Thompson, 2006a, S.3616, Rex, 2007, S.345).

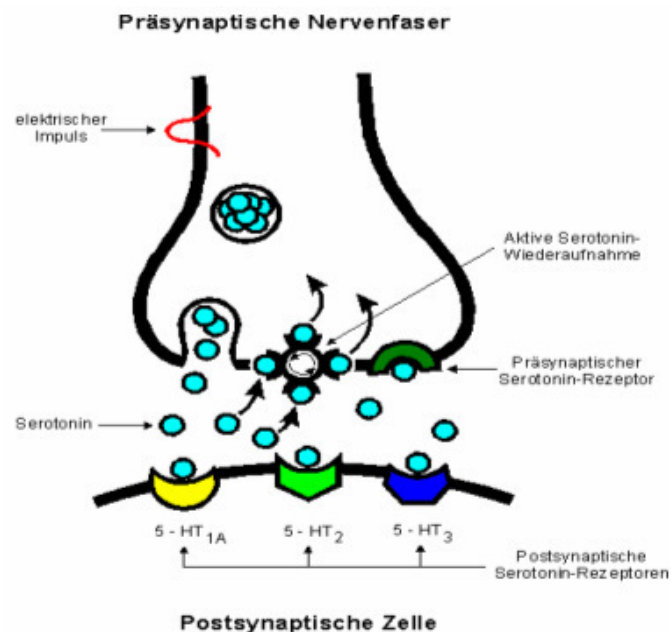


Abb. 8: Prä- und postsynaptisch lokalisierte 5-HT-Rezeptoren (Oehler, 2008, [http://www.dr-oehler.de/FG\\_Psychiatrie.htm](http://www.dr-oehler.de/FG_Psychiatrie.htm))

---

### 1.2.3 Heterogenität des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors

#### 1.2.3.1 Rezeptor-Untereinheiten

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor liegt in homomerer (5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor) oder heteromerer (5-HT<sub>3AB</sub>-Rezeptor) Anordnung vor. Beide Formen können im selben Neuron exprimiert sein (Morales, 2001, S.164). Die Gene für die A- und B-Untereinheit befinden sich auf Chromosom 11 (Barrera, 2005, S.12595).

Hinsichtlich der biophysikalischen Eigenschaften bestehen zwischen dem 5-HT<sub>3A</sub>- und dem 5-HT<sub>3AB</sub>-Rezeptor Unterschiede (Niesler, 2007, S.15). Die pharmakologischen Eigenschaften beider Rezeptorformen gleichen sich jedoch weitestgehend (Niesler, 2007, S.15, Thompson, 2006a, S.3625).

Die erstmals von Miyake und Belelli 1995 beschriebene humane 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit besteht aus 478 Aminosäuren (Belelli, 1995, S.1056, Miyake, 1995, S.410), die von Maricq 1991 identifizierte murine 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheit besteht aus 487 Aminosäuren (Maricq, 1991, S.434). Die Aminosäuresequenzen der humanen 3A-Untereinheit und der langen Form (siehe 1.2.3.2) der murinen 3A-Untereinheit stimmen zu 85% überein (Belelli, 1995, S.1056; Abb. 9).

Neben der A- und der B-Untereinheit wurden vor kurzem neue Untereinheiten beschrieben (5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> und 5-HT<sub>3E</sub> und die Isoform 5-HT<sub>3Ea</sub>; Niesler, 2007, S.9).

#### 1.2.3.2 Spleißvarianten

Die Heterogenität des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors wird neben der Existenz verschiedener Untereinheiten zusätzlich durch das Auftreten von Spleißvarianten erhöht. Bei der Maus existiert eine kurze und lange Form des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors (5-HT<sub>3As</sub> bzw. 5-HT<sub>3AI</sub> = 5-HT<sub>3A</sub>; Miquel, 1995, S. 480, Werner, 1994, S.233f.). Die Kurzform hat in der intrazellulären Schleife zwischen M3 und M4 sechs Aminosäuren (GSDLLP) weniger (Barnes, 1999, S.1110; Abb. 9).

Alternatives Spleißen der murinen 3A-Untereinheit führt nicht zu physiologisch relevanten funktionellen Unterschieden (van Hooft, 2000, S.606, Lankiewicz, 1998, S.202). Beide Formen können jede für sich funktionelle homomere 5-HT<sub>3A</sub>- = 5-HT<sub>3AI</sub>- bzw. 5-HT<sub>3As</sub>-Rezeptoren bilden (van Hooft, 1997, S.1318, Werner, 1994, S.239).

Im Gegensatz zur Maus fehlt beim Menschen die korrespondierende Spleißakzeptorstelle in Intron 8, die zur langen Form der 3A-Untereinheit führt. Es existiert nur eine korrespondierende kurze Form (h5-HT<sub>3A</sub>; Brüss, 2000b, S.312, Barnes, 1999, S.1111, Brüss 2000a, S.393, Werner, 1994, S.239, Miyake, 1995, S.407).

	Signalsequenz				
Mensch	MLLWVQALL	ALLPTLLAQ	GEARR...S	RNTTRPALLR	LSDYLLTNYR
Maus	MRLCTIPOVL L	ALFLSMLTAP	GESRRRRATO	EDTTPALLR	LSDHLLANYK
Mensch	KGVRPVRDWR	KPTTVSIDVI	VYAILNVDEK	NOVLTTYIWY	ROYWTDEFLO
Maus	KGVRPVRDWR	KPTTVSIDVI	MYAILNVDEK	NOVLTTYIWY	ROYWTDEFLO
Mensch	WNPEDFDNIT	KLSIPTDSIW	VPDILINEFV	DVGKSPNIPY	VYIRHQGEVQ
Maus	WTPEDFDNVT	KLSIPTDSIW	VPDILINEFV	DVGKSPNIPY	VYVHHRGEVQ
Mensch	NYKPLQVTA	CSLDIYNFPF	DVQNCSLTFT	SWLHTIQDIN	ISLWRLPEKV
Maus	NYKPLQLVTA	CSLDIYNFPF	DVQNCSLTFT	SWLHTIQDIN	ITLWRSPEEV
Mensch	KSDRSVFMNQ	GEWELLVLP	YFREFSMESS	NYYAEMKFYV	VIRRRPLFYV
Maus	RSDKSI FINQ	GEWELLEVP	OFKEFSIDIS	NSYAEMKFYV	IIRRRPLFYA
Mensch	VSLLLPISIFL	MVMDIVGFYL	PPNSGERVVSF	KITLLLGYSV	FLIIVSDTLP
Maus	VSLLLPISIFL	MVVDIVGFCL	PPDSGERVVSF	KITLLLGYSV	FLIIVSDTLP
Mensch	ATAIGTPLIG	VYFVVCMAIL	VISLAETIFI	VRLVHKODLQ	QPVPAWLRHL
Maus	AT-IGTPLIG	VYFVVCMAIL	VISLAETIFI	VRLVHKODLQ	RPVPDWLRHL
Mensch	VLERIAWLLC	LREQSTSQRP	PATSQATKTD	DCS-----A	MGNHCSHMGG
Maus	VLDRIAWILC	LGEQPMHRP	PATFQANKTD	DCSGSDLLPA	MGNHCSHVGG
Mensch	PODFEKSPRD	RCSPPPPPRE	ASLAVCGLLQ	ELSSIROFLE	KRDEIREVAR
Maus	PODLEKTPRG	RGSPLPPPRE	ASLAVRGLLQ	ELSSIRHFLE	KRDEMREVAR
Mensch	DWLRVGSVLD	KLLFHYLLA	VLAYSITLVM	LWSIWQOYA	
Maus	DWLRVGYVLD	RLLFHYLLA	VLAYSITLVT	LWSIWHYS	

Abb. 9: Aminosäuresequenz des humanen und murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors.

Rot: keine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz; C-C: Cys-loop; dunkelgrün: Schnittstellen von BstEII und SgrA1 (s. 4.2); M1-M4: transmembranäre Regionen; hellgrün: lange Form des murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors (Aminosäuresequenz GSDLLP); die Buchstaben stehen für die entsprechenden Aminosäuren (auf englisch).

### 1.3 Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT)

#### 1.3.1 Struktur

Serotonin wurde 1948 von Rappaport, Green und Page aus Rinderblut isoliert (Whitaker-Azmitia, 1999, S.5S). Es ist ein endogener monoaminer Neurotransmitter und der natürlich vorkommende Agonist am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor (Abb. 10).

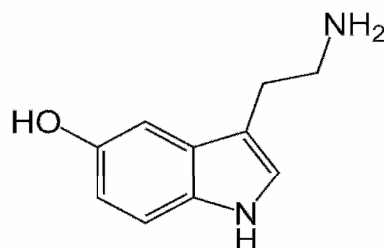


Abb. 10: Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT)

### 1.3.2 Biosynthese und Abbau

Serotonin wird aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan synthetisiert (Abb. 11). Nach Hydroxylierung und anschließender Decarboxylierung von Tryptophan wird Serotonin in Speichervesikel hineintransportiert. Neuronal freigesetztes Serotonin wird über einen Carrier, der sich in der Membran der serotoninerger Nervenendigung befindet, zurücktransportiert.

Anschließend erfolgt erneute Speicherung in den Vesikeln oder ein Abbau zu 5-Hydroxyindolessigsäure (HIAA) durch die Monoaminoxidase A (MAO A). Die Ausscheidung des Abbauprodukts erfolgt über den Harn (Lüllmann, 1999, S.98).

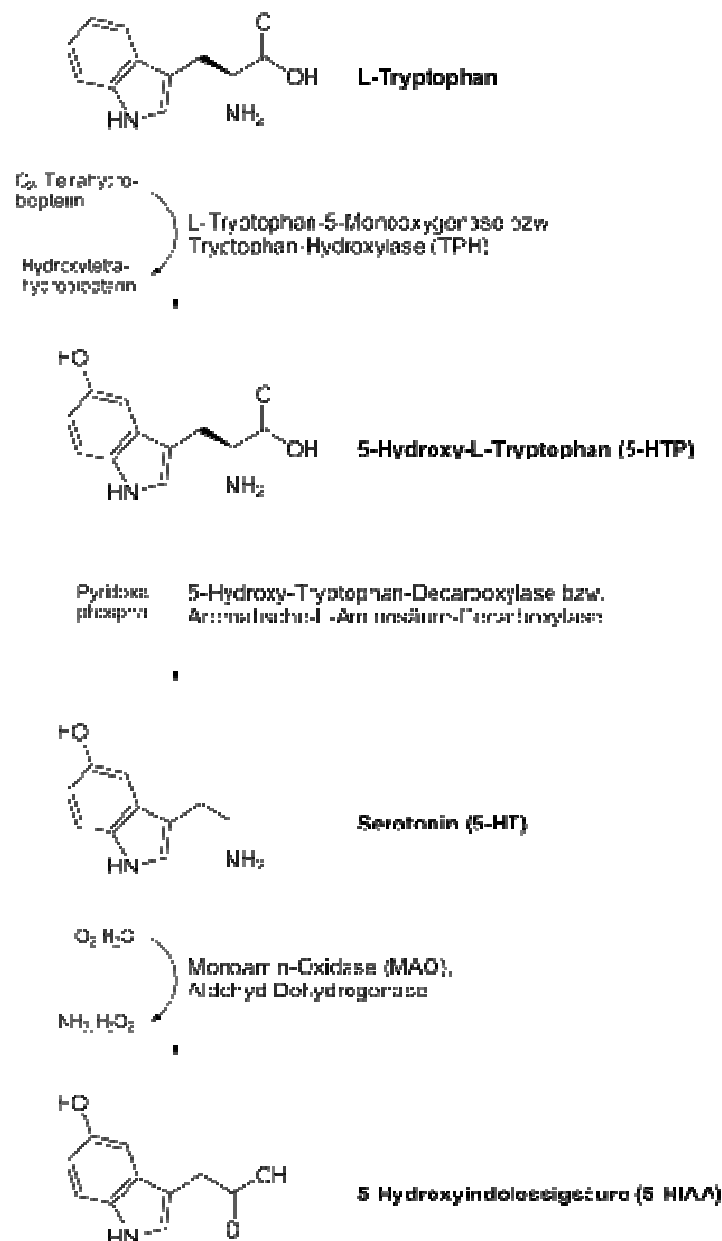


Abb. 11: Serotoninbiosynthese und -abbau

---

### **1.3.3 Verteilung von Serotonin im Körper**

„Die Gesamtmenge an Serotonin im menschlichen Körper beläuft sich auf 5-10mg.“ (Zetl, 2007, S.354) Zwischen 90-95% des körpereigenen Serotonins befinden sich im Magen-Darm-Trakt. Es kommt dort überwiegend in den enterochromaffinen Zellen vor. Nur zu einem kleinen Teil ist Serotonin in Neuronen des enterischen Nervensystems vorhanden (Rex, 2007, S.343, Tebbe, 2004, S.A937). Etwa 5% des Gesamtserotonins befindet sich in Thrombozyten, Mastzellen, peripheren Arterien und anderen inneren Organen. Im ZNS sind 1-5 % des gesamten Serotonins enthalten (Deutch, 2003, S. 176, Rex, 2007, S.343).

### **1.3.4 Physiologische Serotoninwirkung**

Serotonin beeinflusst eine Reihe von Funktionen: Im Gastrointestinaltrakt führt es zu einer Steigerung der gastrointestinalen Motilität. An der glatten Muskulatur der Blutgefäße bewirkt 5-HT eine Vaskonstriktion. Hierbei reagieren besonders die Nieren-, Intestinal- und Pulmonalarterien sowie die Venen empfindlich. Die Arterien der Skelettmuskulatur werden dagegen erweitert. Auf das Herz übt Serotonin einen positiv inotropen und chronotropen Einfluss aus. Des Weiteren fördert Serotonin die Thrombozytenaggregation und löst durch die Erregung von Nozizeptoren Schmerz aus. Im ZNS hat Serotonin u.a. einen Einfluss auf folgende Funktionen: Blutdruck, Körpertemperatur, Appetit, Schlaf-wach-Rhythmus, Schmerzperzeption, emotionales Verhalten, zentrales Belohnungssystem (s. 1.2.2; Porzig, 2007, S.157).

## **2 Fragestellung**

Bei der Schizophrenie kommt es zu einer Änderung in der GABAergen, glutamatergen, cholinergen, serotonergen und vor allem dopaminergen Erregungsübertragung (Mutschler, 2008, S.161, Widschwendter, 2005, S.S33, Möller, 2008, S.261). Im Gegensatz zu den atypischen Neuroleptika, wie z.B. Clozapin, wird die anti-psychotische Wirkung der typischen Neuroleptika vor allem durch den Antagonismus an Dopamin-D2-Rezeptoren hervorgerufen. Die Wirksamkeit von Clozapin weist auch auf die Bedeutung nichtdopaminerg Neurotransmittersysteme für die Behandlung und im Umkehrschluss auf die Symptomatik schizophrener Patienten hin (Schröder, 2006, S.354).

---

Clozapin wirkt antagonistisch an dopaminergen, adrenergen, cholinergen, histaminergen und serotonergen Rezeptoren (Reynolds, 1992, S.119 ff., Möller, 2008, S. 299). Die stärkste Affinität innerhalb der Serotoninrezeptoren hat Clozapin zum 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor (Reynolds, 1992, S.120). Clozapin ist aber auch ein potenter Antagonist am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor und wird erfolgreich in der Schizophrenietherapie eingesetzt (Thompson, 2006b, S.273, Watling, 1990, S.470). Die Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beeinflusst die Freisetzung der Neurotransmitter, die an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt sind (Barnes, 1999, S.1114ff.). Für Antagonisten am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wurde eine anxiolytische und antipsychotische Wirkung in Tierversuchen und ersten klinischen Studien nachgewiesen (Greenshaw, 1993, S.266ff., Barnes, 1999, S.1114). Antagonistische Effekte an serotonergen Rezeptoren, wie dem 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor, können die antidopaminerge Wirkung von vielen atypischen Neuroleptika verstärken (Schröder, 2006, S. 354). Eine Antagonisierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors könnte ebenfalls zur neuroleptischen Potenz von Clozapin beitragen.

Die Wirkung von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor kann durch eine Änderung der Aminosäuresequenz des Rezeptors selbst oder durch eine dadurch entstandene Modulation der Bindungsaffinität für Serotonin beeinflusst werden. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass eine Veränderung der Aminosäuresequenz am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor die Clozapin-vermittelten Wirkungen und Nebenwirkungen entweder abschwächt oder verstärkt.

Humane und murine 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren zeigten in Voruntersuchungen verschiedene Affinität von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor. Um die unterschiedliche Reagibilität auf Clozapin zwischen beiden Spezies in Abhängigkeit von der Rezeptorstruktur (Aminosäuresequenz) zu untersuchen, wurden fünf chimäre 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren konstruiert, die unterschiedliche Sequenzen sowohl des murinen als auch des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors beinhalten.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktion von Serotonin und Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor in Abhängigkeit von der Rezeptorstruktur genauer zu untersuchen.

---

## 3 VERWENDETE GERÄTE, MEDIEN UND PUFFER

### 3.1 Geräte

#### für Zellpräparation und Transfektion:

Brutschrank=Inkubator 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	Heraeus
Zentrifuge Primo	Heraeus
Elektoporationsgerät (Electro Cell Manipulator®600)	BTX Electroporation System, San Diego, USA
Sterilbank LaminAir® HB 2472	Heraeus

#### für Patch-Clamp-Methodik:

Pipettenziehgerät (DMZ Universalpuller)	Zeitz Instrumente, München
Verstärker EPC-9	HEKA, Lamprecht, Deutschland
Mikromanipulator	Eppendorf
inverses Mikroskop IMT-2	Olympus
UV-Lampe HBO 103W/2	Osram

### 3.2 Computer und Auswertungssoftware

Computer (Datenaufzeichnung und -auswertung)	MacintoshII
PulseFit 8,5 (Aufzeichnen der Stromkurven)	HEKA, Lamprecht, Deutschland
IgorPro 5,0 (Auswerten der Stromkurven)	Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA

### 3.3 Gebrauchtwaren

Spritzenfilter Rotilabo (0,22µm)	Roth
große Petrischale=Kulturschale (60,1 cm <sup>2</sup> )	TPP
kleine Petrischale=Kulturschale (22,1 cm <sup>2</sup> )	TPP
QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Katalognr.: 200518)
Patch-Pipetten aus Borosilikat (Øa 1,5mm, Øi 1,17mm)	Harvard Apparatus
Thetaglas (Øa 1,5mm, WS 0,23mm, MD 0,17mm, L 10cm)	Harvard Apparatus
Küvetten GenePlus	BioRad



---

### 3.4 Zelllinie und verwendete Plasmide

HEK 293-Zellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland
mRNA für humanen 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor	GenBank: Zugangsnummer M74425
mRNA für murinen 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor	GenBank: Zugangsnummer D49394

### 3.5 Reagenzien

#### flüssige Reagenzien:

antibiotische-antimykotische Lsg. (100x, flüssig)	Gibco
Aqua ad iniectabilia	Braun- Melsungen
DMEM (1x, flüssig)	Gibco
D-PBS (10x, flüssig)	Gibco
EBSS (1x, flüssig)	Gibco
FCS (fetales Kälberserum)	Gibco
30 min. bei 56 °C Hitze-inaktiviert.	
Pyruvatlösung (Natriumpyruvat MEM 100mM)	Gibco
Trypsin-EDTA (10x, flüssig)	Gibco

#### Reagenzien in Pulverform:

CaCl <sub>2</sub>	Merck
CsCl	Merck
D(+)-Glucose	Merck
EGTA	Sigma
HEPES	Sigma
K-Acetat	Riedel de Haen
K-ATP	Sigma
KCl	Sigma
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Sigma
MgSO <sub>4</sub>	Merck
NaCl	Merck
Tris GTP	Sigma

---

### 3.6 Getestete Substanzen

Serotonin	Sigma
Clozapin	Sigma

### 3.7 Herstellen von Medien (unter sterilen Bedingungen)

#### Kulturmedium

DMEM

+ 10% fetales Kälberserum

+ 1% Pyruvatlösung

+ 1% antibiotische-antimykotische Lösung (AB)

Das Kulturmedium wurde vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

#### Kulturmedium -AB (ohne Antibiotikazugabe)

DMEM

+ 10% fetales Kälberserum

+ 1% Pyruvatlösung

Das Kulturmedium wurde vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

#### Trypsinlösung

400ml pyrogenfreies H<sub>2</sub>O

+ 50ml EBSS

+ 50ml Trypsin-EDTA

und steril filtrieren.

Die Trypsinlösung wurde vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

#### PBS-Lösung

Für den Gebrauch wird D-PBS 1:10 mit pyrogenfreiem H<sub>2</sub>O verdünnt.

Die PBS Lösung wurde vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

#### Elektroporationspuffer

50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3H<sub>2</sub>O

20mM K-Acetat

pH-Wert auf 7,35 einstellen (mit CH<sub>3</sub>COOH) und steril filtrieren.

Der Elektroporationspuffer wurde vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

---

### **Magnesiumsulfatlösung**

1M MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

pH-Wert auf 6,7 einstellen (mit NaOH) und steril filtrieren.

Die Magnesiumsulfatlösung wurde vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

### **Extrazellulärlösung (EZ) = Messmedium**

140,00 mM NaCl

2,80 mM KCl

10,00 mM HEPES

5,60 mM D(+)-Glucose

pH-Wert auf 7,2 einstellen (mit NaOH) und steril filtrieren.

Das Messmedium ersetzt das Kulturmedium während der Messung und wurde für die Verdünnung der Serotonin- und Clozapinaliquots verwendet.

### **Intrazellulärlösung (IZ)**

130,00 mM CsCl

2,00 mM MgCl<sub>2</sub>

10,00 mM EGTA

10,00 mM HEPES

2,00 mM CaCl<sub>2</sub>

2,00 mM K-ATP

0,20 mM Tris GTP

10,00 mM D (+)-Glucose

pH-Wert auf 7,2 einstellen (mit CsOH) und steril filtrieren.

### **5-HT-Stocklösung**

10mM Serotonin in Aqua ad iniectabilia lösen,  
steril filtrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.

### **Clozapin-Stocklösung**

10mM Clozapin in Ethanol lösen,  
steril filtrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.

---

## 4 METHODEN

Alle folgenden Arbeiten, mit Ausnahme der elektrophysiologischen Ableitungen, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 4.1 Zellkultur

Die *Patch-Clamp*-Experimente wurden ausschließlich an Zellkulturen durchgeführt, weil dadurch Einflüsse auf den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor isoliert betrachtet werden können. Dies ist in Tiermodellen nicht möglich. Für die Durchführung von *Patch-Clamp*-Experimenten eignen sich besonders native humane embryonale Nierenzellen (HEK 293-Zellen). Sie sind einfach zu kultivieren und lassen sich leicht von der Zellkulturschale ablösen und transfizieren (Numberger, 1996, S.156).

Durch Transfektion können die HEK 293-Zellen den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor stabil oder transient exprimieren (siehe 4.1.2).

In der vorliegenden Arbeit wurden elektrophysiologische Messungen an HEK 293-Zellen durchgeführt, die den humanen bzw. den murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor stabil exprimieren (Maricq et al., 1991, S.432 ff. ; Miyake et al., 1995, S.407 ff.).

Des Weiteren wurden HEK 293-Zellen verwendet, welche chimäre 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (Maus-Mensch) transient exprimieren.

#### 4.1.1 Passagieren von HEK 293-Zellen

Sobald die kultivierten Zellen eine konfluente Zellschicht gebildet hatten, wurde das Kulturmedium entfernt und die Kultur mit 3ml PBS gewaschen. In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die Zellen mit 2ml Trypsinlösung vom Boden der Kulturschale abgelöst. Leichtes Erschüttern der Kulturschale beschleunigte den Ablösevorgang der adhärennten Zellen.

Anschließend wurden 3ml Kulturmedium in die Kulturschale gegeben und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen in einer Pipette vereinzelt. Die Zellsuspension wurde für 4 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Pellet in 1ml Kulturmedium resuspendiert.

In die vorbereiteten großen Petrischalen wurde 9ml Kulturmedium gegeben. Von der Zellsuspension wurde jeweils ein Drittel auf die neuen Kulturschalen verteilt und im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Zellen benötigten bei dieser Verdünnung 2-3 Tage um erneut eine konfluente Zellschicht zu bilden.

---

## **4.1.2 Transfektion**

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eine lebende eukaryotische Zelle (Numberger, 1996, S.156). Dafür gibt es verschiedene Möglichkeiten (z.B. Calciumphosphat-Methode, Transfektion mittels Liposomen, Transfektion mittels Viren, Elektroporation, Mikroinjektion; Numberger, 1996, S.154ff.).

### **4.1.2.1 Elektroporationsmethode**

Für die vorliegende Arbeit wurde die entsprechende Rezeptor-DNA, in Form von Plasmiden, mit Hilfe von Elektroporation in die Zellen eingebracht. Dabei wird dem Plasmid mittels eines kurzen Stromstoßes der Durchtritt durch die Zellwand ermöglicht. Plasmid pCDM8 diente als Transfektionsvektor für die cDNA der chimären 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren sowie für die cDNA des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors. Die cDNA des murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors enthielt Plasmid pCDM6xl.

Zellen, welche die chimären 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren exprimierten, wurden transient (ca. 20-40 h) mit der Elektroporationsmethode transfiziert. Die humanen und die murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren wurden dagegen stabil exprimiert.

Um die erfolgreiche transiente Transfektion zu überprüfen, wurde zusammen mit dem Plasmid ein fluoreszierendes Protein (GFP) als Expressionsmarker kotransfiziert. GFP fluoresziert unter Anregung mit UV-Licht (Wellenlänge: 460 nm) grün.

### **4.1.2.2 Durchführung der Elektroporation**

Die Elektroporation erfolgte 12-18 h vor den elektrophysiologischen Messungen.

Nachdem die Zellen einer großen Petrischale mit Hilfe von Trypsin abgelöst und zentrifugiert wurden, wurde das Pellet in 975µl Elektroporationspuffer und 25µl Magnesiumsulfatlösung resuspendiert. 800µl dieses Resuspensats wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und 5µg cDNA des chimären Plasmids sowie 3µg GFP-Plasmid (beides eisgekühlt) dazu pipettiert. Jeweils 400µl Resuspensat wurden in eine Küvette gegeben. (Die beiden Küvetten wurden vor Benutzung mit Ethanol gereinigt und luftgetrocknet.) Danach wurden die Küvetten nacheinander in das Elektroporationsgerät gesetzt. Die Zelltransfektion wurde bei 1000µF und 300 Volt durchgeführt. Von der elektroporierten Zellsuspension wurden 3 x 70µl, 3 x 80µl und 3 x 90µl in kleine Petrischalen pipettiert, in die jeweils 4ml Kulturmedium-AB vorgelegt worden war. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Experimente sollten die Zellen adhärent und einzeln sein.

---

## 4.2 Molekularbiologie

### 4.2.1 Herstellung des humanen und murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors

Für die Herstellung und später erfolgende Transfektion des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors wurde die bei Miyake 1995 beschriebene mRNA-Sequenz verwendet (Nukleotide 217-1663; Genbank-Zugriffsnummer: D49394; Miyake, 1995, S.407ff.). Die mRNA-Sequenz des murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors (Genbank-Zugriffsnummer: M74425) wurde erstmals von Maricq 1991 aufgeschlüsselt und diente bei der Konstruktion der murinen A-Untereinheit als Vorlage (Maricq, 1991, S.432ff.).

Die mRNA-Sequenz des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors wurde in cDNA umgeschrieben und zwischen die HindIII und XhoI Schnittstelle des Plasmidvectors pCDM8 eingefügt (Davies, 1999, S.362). Analog wurde beim murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor verfahren. Hierbei erfolgte die Klonierung jedoch in den Plasmidvector pCDM6xl (Maricq, 1991, S.433 ff.).

### 4.2.2 Herstellung von Restriktionsenzymchnittstellen im humanen und murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor

Um einmalig vorkommende Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme in den mRNA-Sequenzen des humanen und murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors zu erhalten, wurde bei der mRNA der humanen A-Untereinheit eine Schnittstelle für das Schneideenzym BstEII eingefügt. Diese Schnittstelle ist mit derjenigen identisch, die sich in der mRNA der murinen A-Untereinheit an Position 531 befindet. Zusätzlich wurde bei der mRNA der murinen A-Untereinheit eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym SgrA1 inseriert, welche der humanen mRNA-Sequenz an Position 935 entspricht. In die murine mRNA wurde an Position 1541 eine XhoI multicloning site eingebracht, welche der XhoI multicloning site im humanen Gen entspricht.

Alle Mutationen (Anmerkung: Durch Punktmutationen wurden die Schnittstellen in die jeweiligen mRNA-Sequenzen eingebracht.) wurden mit dem QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Alle durchgeführten Mutationen verhielten sich still, d.h. die ursprüngliche Funktion und Struktur der Rezeptoren änderte sich durch die Mutationen nicht.

Die für die Mutagenese verwendeten Primer Mo790SgrA1, Hu678BstEII und MoXhoI wurden nach der Kit Anleitung konstruiert.

(Anmerkung: Die Ziffern 790 und 678 beziehen sich auf die Nukleotidposition in der mRNA des murinen bzw. des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors).

### 4.2.3 Konstruktion der chimären 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (Maus-Mensch)

Die im vorherigen Abschnitt hergestellten mRNA-Abschnitte wurden in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend wurde sowohl mit der cDNA der humanen als auch der murinen A-Untereinheit folgender Verdau durchgeführt:

Für den Bau der Chimäre **HB1,2** mit **BstEII** und **HindIII**, für **SH1,1** mit **SgrA1** und **HindIII**, für **BS1,2** mit **SgrA1** und **BstEII**, für **SX5** mit **SgrA1** und **XhoI** und für **BX4** mit **BstEII** und **XhoI**. In Abbildung 12 sind die chimären 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren, die sowohl aus humaner als auch muriner A-Untereinheit bestehen, sowie der humane und der murine 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor dargestellt.

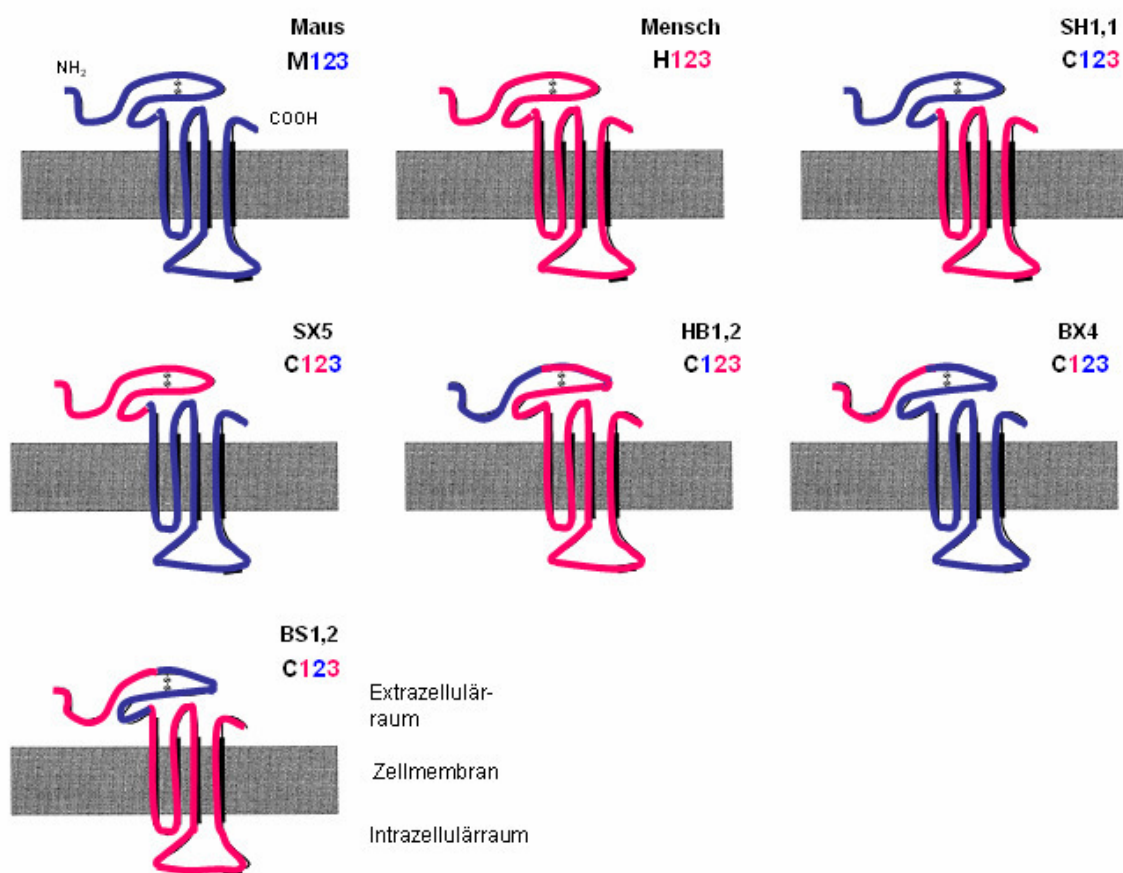


Abb. 12: 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren der Maus, des Menschen und der Chimären SH1,1, SX5, HB1,2, BX4 und BS1,2.

Rot: Rezeptorsequenz human; blau: Rezeptorsequenz murin; die verwendeten Zahlencodes 123 sind in Abbildung 14 und in dem dazugehörigen Text auf S.27 genauer erläutert.

Die verdauten Endprodukte wurden auf ein Agarosegel (1% oder 1,5%) aufgetragen. Die cDNA wurde anschließend durch ein handelsübliches Kit isoliert. Die verdauten murinen Fragmente wurden in die korrespondierenden, humanen Vector-Fragmente subkloniert (Abb. 13). Die chimären cDNAs wurden zu beiden Seiten sequenziert.

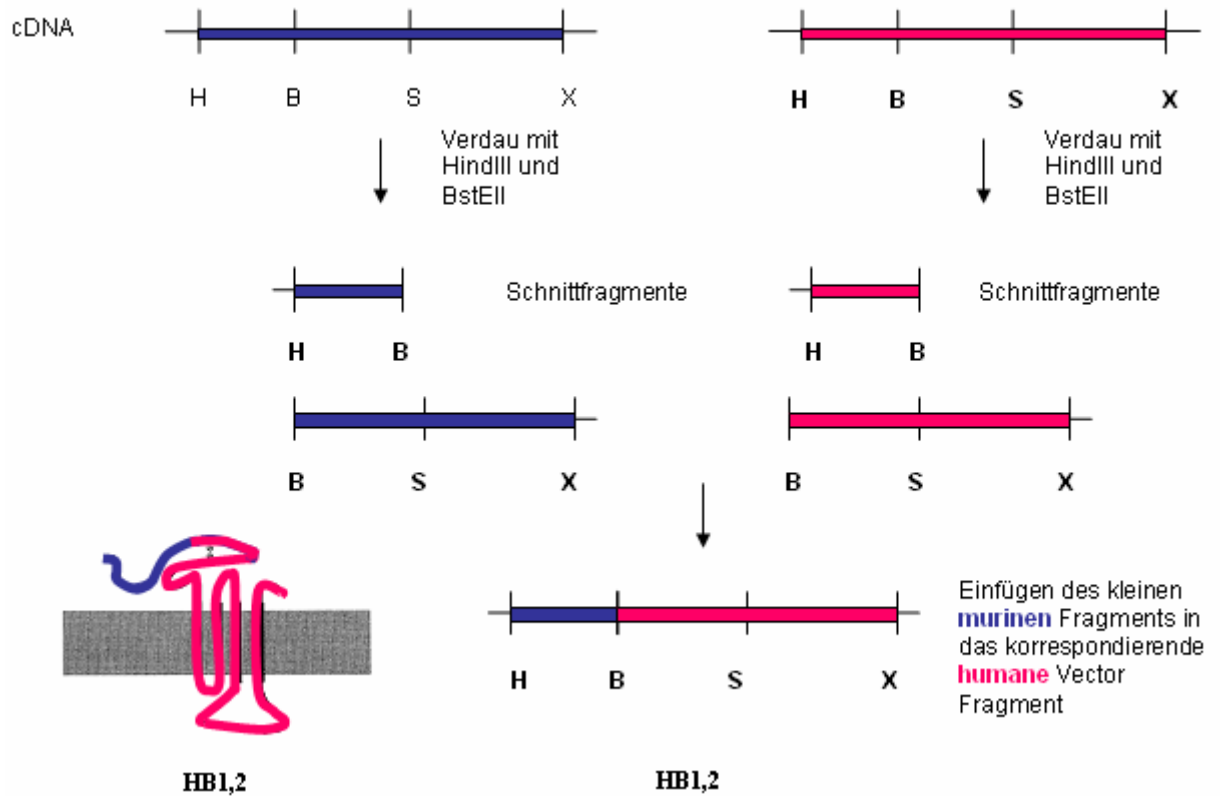


Abb. 13: Herstellung der chimären 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (am Beispiel von HB1,2) mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und BstEII.

H: HindIII, B: BstEII, S: SgrA1, X: XhoI



---

Um die Rezeptorabschnitte eindeutig im Text zu charakterisieren und der Spezies zuordnen zu können, werden folgende Bezeichnungen verwendet (Abb. 14):

A: Amino-terminales Ende des Rezeptors = Schnittstelle für HindIII

B: Schnittstelle für BstEII

C: Schnittstelle für SgrA1

D: Carboxy-terminales Ende des Rezeptors = Schnittstelle für XhoI

Die Ziffern 123 kodieren für die zwischen den Buchstaben liegenden Aminosäuresequenzen, wobei die Farbe die Spezies ausweist. Durch die Ziffern werden die Rezeptoren in 3 Abschnitte gegliedert. Die humane Sequenz wird rot, die murine blau dargestellt.

Der den Ziffern vorangestellte Buchstabe H steht für „human“, M für „murin“ und C für „chimär“.

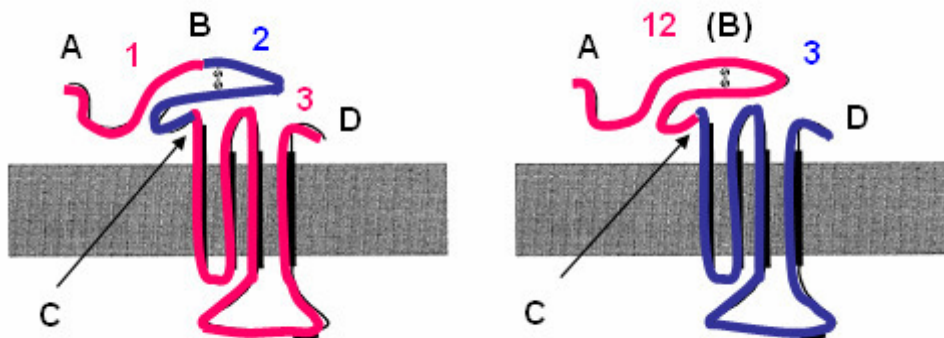


Abb. 14: Rezeptoren BS1,2 (linkes Bild) und SX5 (rechtes Bild) und ihre unterschiedlichen Abschnitte C123 bzw. C123.

Der den Ziffern vorangestellte Buchstabe C steht für „chimär“. Weitere Erläuterungen im dazugehörigen Text auf dieser Seite.

### 4.3 Elektrophysiologie

„Die *Patch-Clamp*-Technik ist heute eine der wichtigsten neurophysiologischen Arbeitsmethoden“. (Numberger, 1996, Vorwort)

Mit dieser Methode kann man Ionenströme messen, welche durch transmembranäre Ionenkanäle fließen. Für die Entwicklung der *Patch-Clamp*-Technik erhielten Erwin Neher und Bert Sakmann 1991 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

### 4.3.1 Whole-Cell-Konfiguration

Bei der *Patch-Clamp*-Technik unterscheidet man folgende Membran-Konfigurationen: Es gibt die *Whole-Cell*-, *Outside-out*-, *Inside-out*- und *Cell-attached*-Konfiguration (Abb. 15). Im Folgenden soll näher auf die *Whole-Cell*-Konfiguration eingegangen werden, da diese für die vorliegenden Fragestellungen als geeignete Technik gewählt wurde:

Mit der *Whole-Cell*-Konfiguration können Ganzzelleitungen durchgeführt werden. Dabei werden alle auf die Zelle wirkenden Ionenströme als Summenströme erfasst (Abb. 16). Zur Herstellung der *Whole-Cell*-Konfiguration (Abb. 17) wird die Patch-Pipette mit Hilfe eines Mikromanipulators auf die Zelle gesetzt. Durch Anlegen eines Unterdrucks an der Pipette erhält man zwischen Pipette und Zellmembran einen hohen Abdichtwiderstand im  $G\Omega$  Bereich (sog. *Giga-Seal*). Dieser Modus stellt die *Cell-attached*-Konfiguration dar. Nach erneutem Anlegen von Unterdruck durchbricht man die Zellmembran und es kommt zum Austausch des Zytoplasmas mit der Intrazellulärlösung der Pipette.

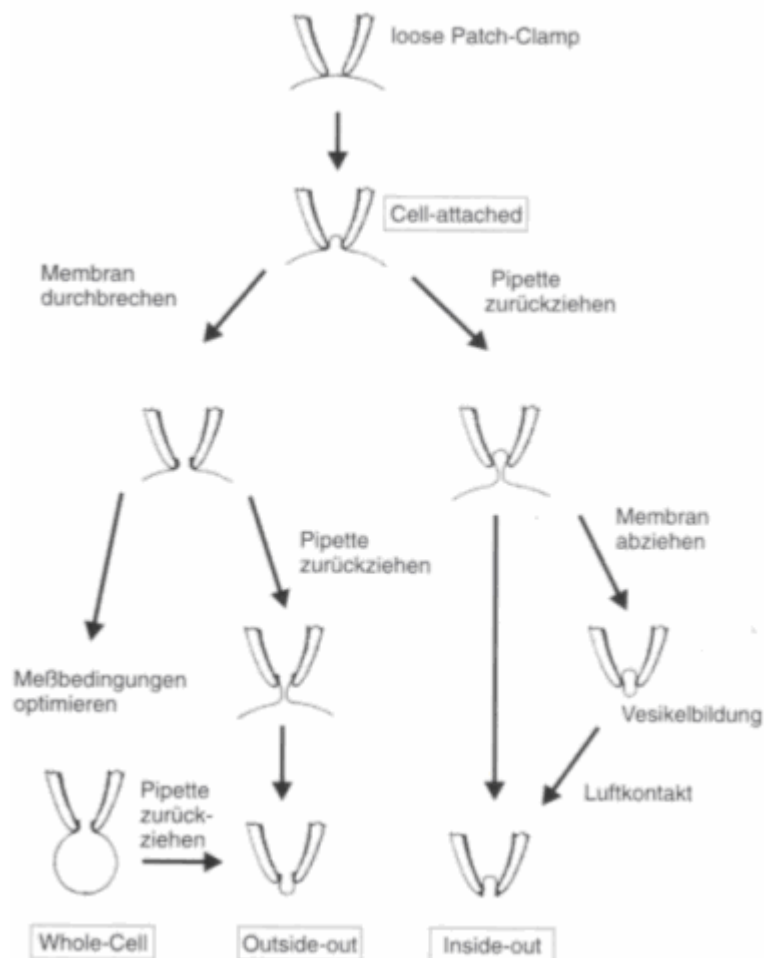


Abb. 15: Verschiedene Zell-Konfigurationen (Numberger, 1996, S. 82)

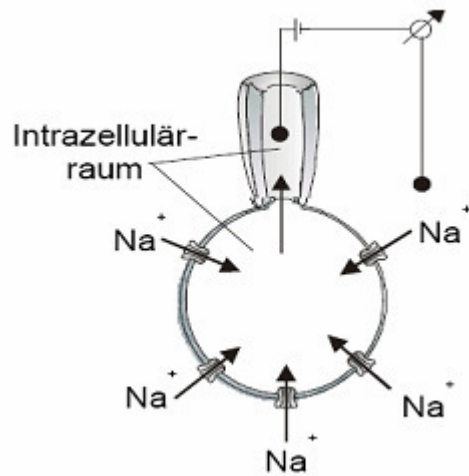


Abb. 16: Darstellung der *Whole-Cell*-Konfiguration und des  $\text{Na}^+$ -Einstroms in die Zelle bei 5-HT-Applikation (Tredt, 2004, S.24)

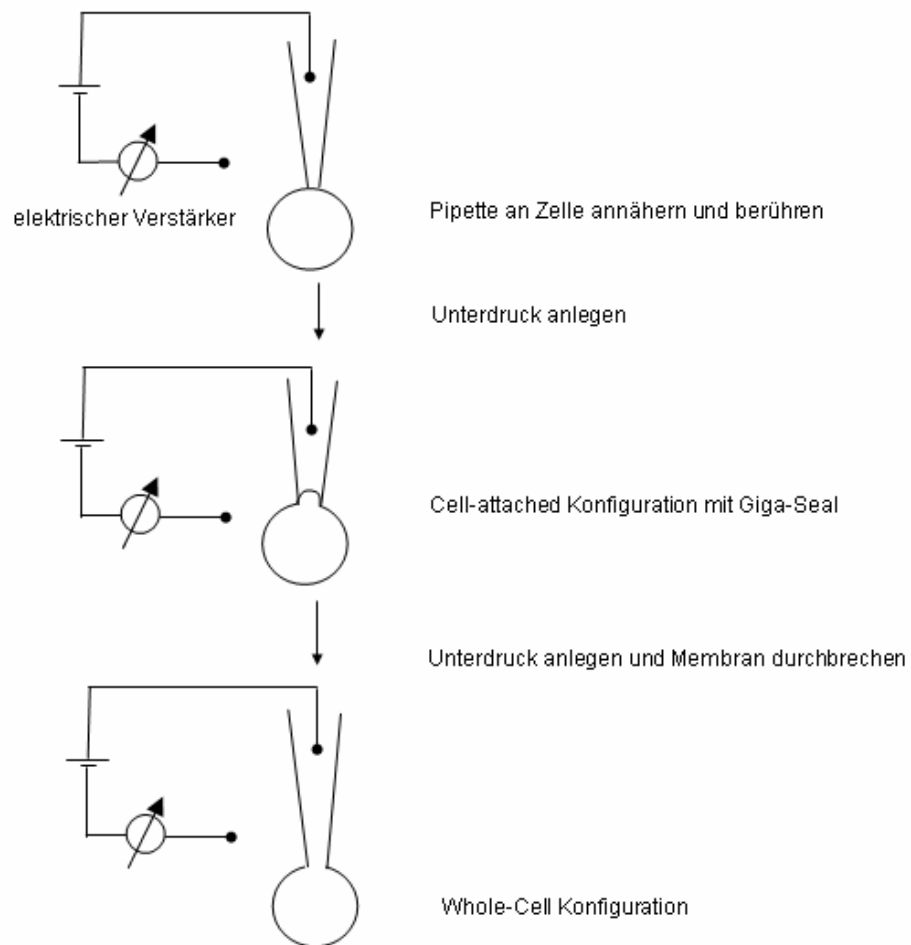


Abb. 17: Herstellung der *Whole-Cell*-Konfiguration (modifiziert nach Hamill, 1981, S.93)

---

### 4.3.2 Messprinzip

Während der Experimente wurde eine konstant gehaltene, negative Spannung von -50mV angelegt. Bei Ionenfluss über die Zellmembran kommt es zu einer Änderung des Membranpotentials (Numberger, 1996, S.86).

Ein Verstärker misst das bei Stromfluss sich verändernde Membranpotential und vergleicht es mit einer vorgegebenen Sollspannung. Um die Sollspannung während des transmembranären Ionenflusses „festzuklemmen“ (von engl. *to clamp*), also konstant zu halten, ist ein Kompensationsstrom nötig. Dieser Ausgleichsstrom wird aufgezeichnet (Numberger, 1996, S.67). Fließen positiv geladene Ionen in die Zelle, so wird diese depolarisiert. Um das Membranpotential konstant zu halten, ist ein entsprechender negativer Ausgleichsstrom nötig.

Gemäß internationaler Konvention erhält ein negativer Ausgleichsstrom ein negatives Vorzeichen und wird im Koordinatensystem nach unten aufgetragen. (Numberger, 1991, S.80). In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um den Einstrom von Na<sup>+</sup>-Ionen in die Zelle bei Aktivierung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren (Abb. 16).

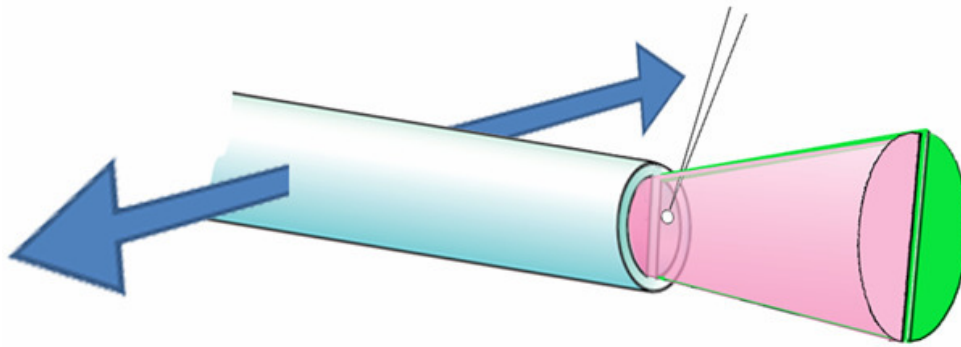
### 4.3.3 Transmitterapplikationssystem

Bei *Patch-Clamp*-Experimenten in vitro sollen die Verhältnisse und Signalprozesse in vivo möglichst genau nachgeahmt werden. Die Badlösung, welche die Zelle umgibt, entspricht dem Messmedium. Die in der Pipette befindliche Lösung stellt eine künstliche Intrazellulärlösung (IZ) dar.

Für Liganden-gesteuerte Ionenkanälen ist eine schnelle synaptische Transmitterfreisetzung typisch. Um die schnelle synaptische Transmitterfreisetzung an den Zellen zu simulieren, wurde bei dieser Arbeit die Applikation der Substanzen mit dem Thetaglas, einem schnellen Applikationssystem, durchgeführt (Numberger, 1996, S.37). Das Thetaglas ist ein Glasröhrchen mit einer Trennmembran, welche das Röhrchen der Länge nach in 2 Kompartimente teilt: Kompartiment 1 (Substanz) und 2 (Puffer; Abb. 18 und 19).

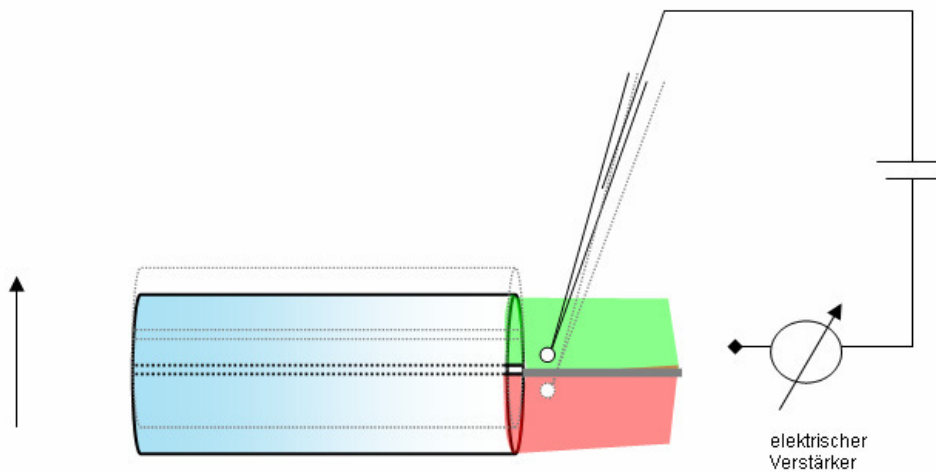
Durch einen Piezoantrieb konnten die aus dem Thetaglas strömenden, unterschiedlichen Lösungen in weniger als 1ms in die Nähe der untersuchten Zelle gebracht werden (Numberger, 1996, S.38).

Nach Erreichen der *Whole-Cell*-Konfiguration wurden die Zellen mit Hilfe des Mikromanipulators vom Boden abgelöst und vor die Öffnung des Piezo-gesteuerten Thetaglases geführt. Dabei durfte die Zelle die Extrazellulärlösung nicht verlassen.



**Abb. 18: Applikationssystem mit dem Thetaglas.**

**Kompartiment 1: Agonist bzw. Antagonist (rot); Kompartiment 2: Puffer (grün); (40s lang befindet sich die Zelle im Pufferstrom, dann fährt das Thetaglas zur Seite und die Zelle befindet sich für 2s im Agonisten-/Antagonistenstrom.)**



**Abb. 19: Applikationssystem von oben gesehen.**

**Bei laminaren Strömungsverhältnissen bilden die beiden Lösungen grün und rot ein Flüssigkeitsfilament mit exakter Grenze; grau gestrichelt dargestellt ist die Position des Thetaglases sowie der Pipette nach Bewegung des Thetaglases zur Seite.**

Die Lösungen aus Kompartiment 1 und 2 strömen innerhalb des Thetaglases durch eine Lamina getrennt voneinander und bilden nach dem Austreten eine exakte Flüssigkeitsgrenze (Abb. 19).

---

#### 4.3.4 Herstellung der Messelektrode und der Patch-Pipetten

Die Messelektrode bestand aus einem Silberdraht, der vor Gebrauch nach folgendem Verfahren chloriert wurde: Mehrere Silberdrähte wurden auf Vorrat in eine 0,1M HCL Lösung gegeben und bei 0,5 Volt über Nacht chloriert. Die chlorierten Silberdrähte wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

*Patch*-Pipetten wurden mit dem Pipettenziehgerät hergestellt und die Spitze mit Intrazellulärflüssigkeit gefüllt. Die bei den Experimenten verwendeten Pipetten hatten einen Widerstand von 4-6 M $\Omega$ .

#### 4.3.5 Messarbeitsplatz (*Setup*)

Gemessen wurde die relative Veränderung des Na<sup>+</sup>-induzierten Einwärtsstroms in der Zelle; und zwar durch verschiedene 5-HT-Konzentrationen und die Zugabe von verschiedenen Clozapinkonzentrationen. Um Strommessungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration durchzuführen, wurde die Patch-Pipette mit Hilfe eines Mikromanipulators auf die Zelle gesetzt. Durch einen am Pipettenhalter befindlichen Schlauch konnte ein Unterdruck an die Pipette angelegt werden. Nach Erreichen des *Giga-Seals* (Abschnitt 4.3.1) wurde eine während der Strommessungen konstant gehaltene Spannung von -50mV angelegt und die Zelle anschließend geöffnet (*Whole-Cell*-Konfiguration). Ein am Pipettenhalter befindlicher Verstärker registrierte das bei Strom-fluss sich verändernde Membranpotential und verglich es mit der Sollspannung -50mV. Der Kompensationsstrom (Abschnitt 4.3.2) wurde ermittelt und mit Hilfe des Programms HEKA 8.5 PulseFit aufgezeichnet.

Als Messelektrode diente ein chlorierter Silberdraht. Die Badelektrode (Referenzelektrode) befand sich im Messmedium und stand mittels eines Drahtes mit dem Verstärker in Verbindung. Über ein inverses Mikroskop konnten die Zellen betrachtet werden. Für die Messungen der chimären Rezeptoren wurden die Zellen unter UV-Licht betrachtet, welches das GFP grün fluoreszieren ließ, und somit eine Selektion der Zellen ermöglichte. Bei den stabil transfizierten Zellen (human und murin) war dies nicht nötig, da hier alle Zellen den Rezeptor (stabil) exprimierten (und keine Transfektion mit GFP stattfand).

Mit Hilfe des Thetaglases konnten die gepatchten Zellen mit Testsubstanz und Puffer appliziert werden. An das Thetaglas waren 12 Vorratsbehälter angeschlossen, die sich einzeln über ein Magnetventil steuern ließen. In Kompartiment 1 und in Kompartiment 2 endeten jeweils 6 Behälter.

Die Abbildungen 20 und 21 zeigen die Elemente des *Setups*:

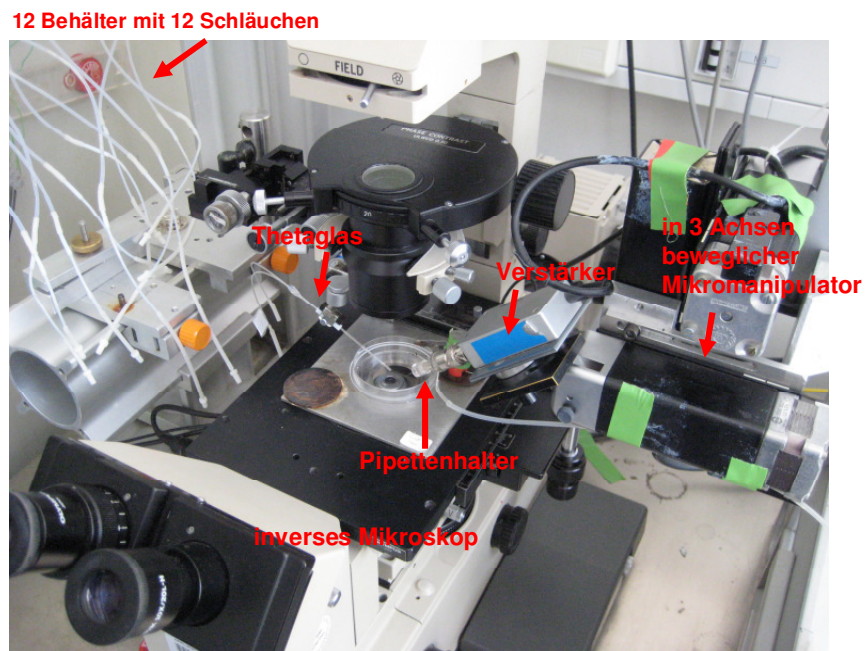


Abb. 20: *Setup*-Übersicht

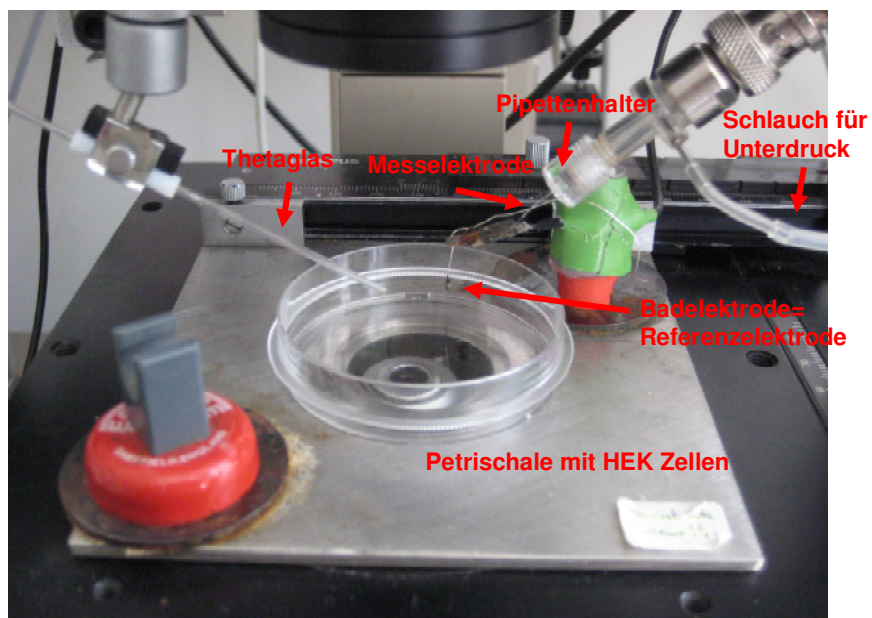


Abb. 21: Vergrößerte Darstellung des *Setups*: Thetaglas, Pipettenhalter, Verstärker, Badelektrode, Messelektrode

---

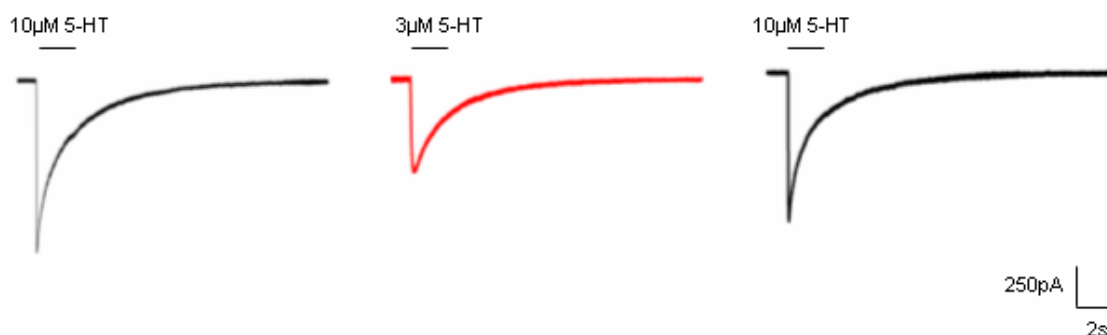
#### 4.3.6 Versuchsaufbau

Alle Messversuche wurden bei Raumtemperatur (20-22°C) vorgenommen.

##### 4.3.6.1 Applikationsmodus für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve von Serotonin

Für die 5-HT-Messreihe wurde durch das Kompartiment 2 Puffer appliziert und durch Kompartiment 1 verschiedene 5-HT Konzentrationen (100nM - 300µM). Alle 40s bewegte sich das Thetaglas für 2s zur Seite. Die Zelle befand sich dadurch alternierend für 40s in der Pufferlösung und für 2s in der Serotoninlösung. Dieser Applikationsrhythmus wurde während einer Messreihe stets beibehalten.

Zu Beginn der Messungen wurde 10µM 5-HT als Kontrolle appliziert, bis mindestens zwei Stromantworten stabil waren. Dann wurde die zu messende 5-HT-Konzentration appliziert und gewartet, bis erneut mindestens 2 Stromkurven identisch waren. Jeweils die letzten beiden stabilen Stromkurven pro Dosis wurden bei der Auswertung gemittelt und die Werte auf die Kontrollwerte vor und nach der jeweiligen Agonistenapplikation bezogen (Abb. 22).



**Abb. 22: Stromkurven des chimären Rezeptors C123.**

Der jeweiligen Serotoninapplikation vor- und nachgeschaltet war eine Kontrollapplikation von 10µM Serotonin; schwarze Stromkurve: 10µM 5-HT als Kontrolle; rote Stromkurve: 3µM 5-HT; die Linie über dem Stromverlauf repräsentiert die Applikation von 5-HT über 2s.

Für jede gemessene Konzentration wurden mindestens 5 Messwerte erhoben. Die pro Konzentration erhaltenen Werte für Amplitude und Ladung wurden gemittelt und zusammen mit dem Standardfehler (SEM) als Dosis-Wirkungs-Kurve aufgetragen.



#### 4.3.6.2 *Rundown*-Effekt

Bei Ionenkanälen kann man beobachten, dass über die Zeitdauer der Applikation der Stromfluss trotz gleichbleibender Konzentration des Agonisten abnimmt (Numberger, 1996, S.8). Diesen Effekt bezeichnet man als *Rundown*-Effekt (Abb. 23). Um die Signalabschwächung der Zelle während fortlaufender Applikation von 10 $\mu$ M Serotonin zu demonstrieren, wurden mindestens 23 Applikationen (Applikationsmodus: 40s Puffer, 2s 10 $\mu$ M Serotonin; Datenaufzeichnung 15 Minuten) durchgeführt.

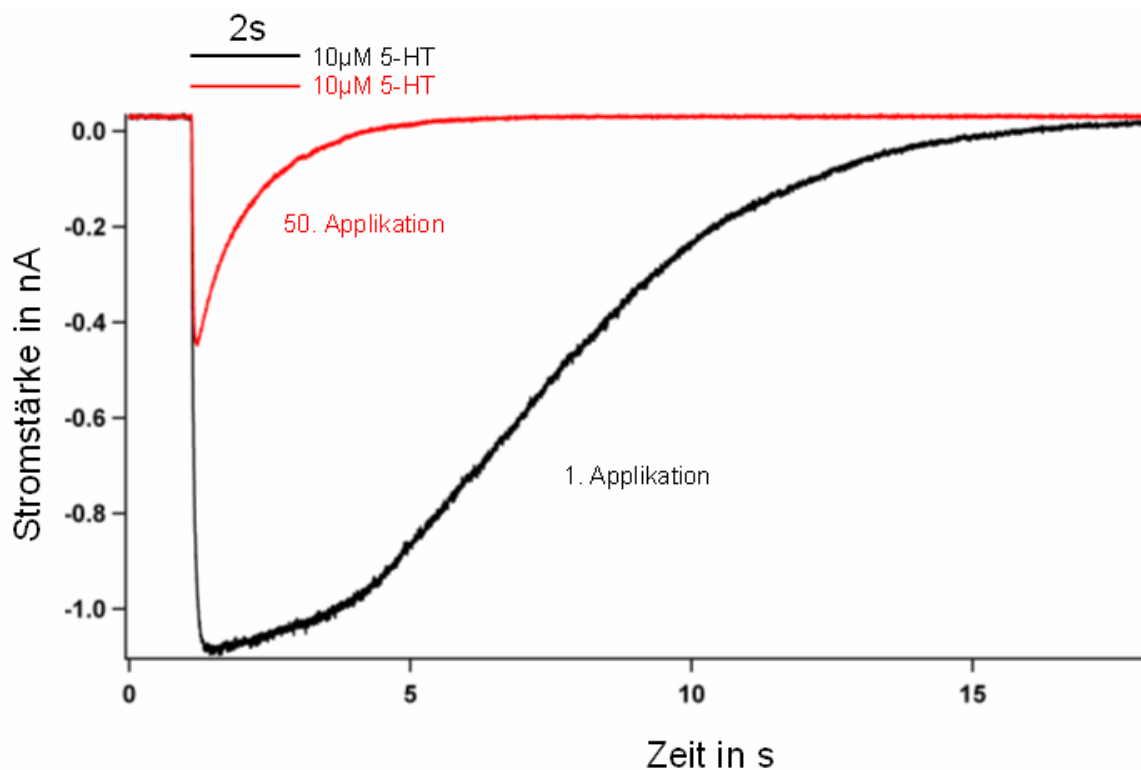


Abb. 23: *Rundown*-Effekt der Zelle (Rezeptor C123).

Schwarze Stromkurve: 1. Applikation von 5-HT, rote Stromkurve: 50. Applikation von 5-HT; die Linien über dem Stromverlauf repräsentieren die Applikation von 5-HT über 2s.

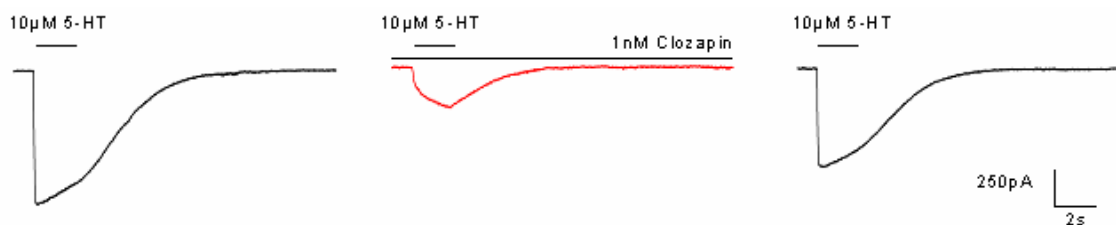
#### 4.3.6.3 Applikationsmodus für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve von Clozapin

Für die Erstellung der Clozapin Dosis-Wirkungs-Kurve wurde Clozapin in Konzentrationen von 100pM - 1 $\mu$ M appliziert.

Um bei den Versuchen die physiologisch dauerhaft extrazellulär vorhandene Clozapinkonzentration (z.B. bei medikamentöser Behandlung schizophrener Patienten) zu simulieren und die pulsatorische Freisetzung von Serotonin im Körper nachzuahmen, wurde die Zelle bei den Experimenten dauerhaft von Clozapin in verschiedenen

Dosierungen umgeben (Kompartiment 2: Clozapin). Serotonin wurde pulsatil in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  appliziert (Kompartiment 1:  $10\mu\text{M}$  5-HT + Clozapin).

Der jeweiligen Clozapinapplikation vor- und nachgeschaltet war eine Kontrollapplikation von  $10\mu\text{M}$  Serotonin. Abbildung 24 zeigt den Applikationsmodus für die Clozapinmessungen.



**Abb. 24: Applikationsmodus für die Clozapinmessreihe.**

Der jeweiligen Clozapinapplikation vor- und nachgeschaltet war eine Kontrollapplikation von  $10\mu\text{M}$  Serotonin; schwarze Stromkurve:  $10\mu\text{M}$  5-HT als Kontrolle (K1:  $10\mu\text{M}$  5-HT, K2: Puffer; jeweils ohne Clozapin); rote Stromkurve:  $1\text{nM}$  Clozapin +  $10\mu\text{M}$  5-HT (K1:  $1\text{nM}$  Clozapin +  $10\mu\text{M}$  5-HT, K2:  $1\text{nM}$  Clozapin); die obere Linie über dem Stromverlauf repräsentiert die Applikation von 5-HT über 2s, die untere Linie stellt die Clozapinapplikation dar und entfällt somit bei der Kontrolle.

Bei der Auswertung wurde wie bei der Serotoninmessreihe verfahren. Pro gemessener Clozapinkonzentration ( $100\text{pM}$  -  $1\mu\text{M}$ ) wurden mindestens 4 Messwerte erhoben. (Anmerkung: Bei **C123** wurden zusätzlich die Konzentration von  $5\text{pM}$  erhoben und bei **H123** zusätzlich  $10\mu\text{M}$  (jeweils:  $n=2$ )).

Die Werte für die Amplitude und die Ladung wurden gemittelt und mit den Standardfehlern als Dosis-Wirkungs-Kurve aufgetragen.

## 4.4 Datenverarbeitung

### 4.4.1 Datenaufzeichnung und -auswertung

Zur Aufzeichnung der Stromkurven wurde das Computerprogramm PulseFit, Version 8,5, verwendet. Die gemessenen Stromantworten wurden als Strom-Zeit-Diagramme aufgezeichnet. Die Auswertung der Stromkurven erfolgte mit dem Programm IgorPro, Version 5,0.

---

Folgende Daten wurden ermittelt und für die statistische Auswertung verwendet:

Amplitude = maximale Stromamplitude [pA]

Ladung = Ladungstransfer als Fläche unter der Stromkurve [pAs]

Plateau-Strom = Zustand des desensibilisierten Stromverlaufs am Ende der Agonistenapplikation [pA]

$\tau_{des1}$ ,  $\tau_{des2}$  = Zeitkonstanten der Desensibilisierung [ms]

Die Desensibilisierung ist typischerweise ein exponentieller Stromabfall in Anwesenheit des Agonisten und kann mono- als auch biphasisch verlaufen. Beim 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor setzt sich die Desensibilisierungsphase aus zwei Komponenten ( $\tau_{des1}$ ,  $\tau_{des2}$ ) zusammen und wird mit folgender biexponentiellen Funktion beschrieben:

$$I(t) = I_s + I_1 \exp(-t/\tau_{des1}) + I_2 \exp(-t/\tau_{des2})$$

$I_s$  = Steady-state-Strom;  $I_1$  und  $I_2$ : Komponenten des Stromabfalls

Die Zeitkonstante  $\tau$  gibt den Zeitraum an, den ein exponentiell absinkender Prozess braucht, um auf  $1/e$  (ca. 36,8 %) seines Ausgangswertes abzusinken.

Des Weiteren konnte man mit dem Programm IgorPro die EC<sub>50</sub>- bzw. IC<sub>50</sub>-Werte der Dosis-Wirkungs-Kurven ermitteln.

#### 4.4.2 Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurven

Für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden alle gemessenen Daten pro Konzentration gemittelt und zusammen mit dem Standardfehler (SEM) in ein Koordinatensystem mit logarithmischer Skaleneinteilung eingetragen.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mit folgender Gleichung ermittelt:

für Agonisten:  $I/I_{max} = \text{Agonist}^{nH} / (\text{Agonist}^{nH} + EC_{50}^{nH})$

für Antagonisten:  $I/I_{max} = \text{Antagonist}^{nH} / (\text{Antagonist}^{nH} + IC_{50}^{nH})$

$I$  entspricht der maximalen Stromamplitude unter der Konzentration des Agonisten bzw. Antagonisten;  $I_{max}$  der maximalen Stromamplitude der Kontrolle.

EC<sub>50</sub> bzw. IC<sub>50</sub> entsprechen der Agonisten- bzw. Antagonistenkonzentration bei halbmaximaler Stromamplitude.

$nH$  bedeutet Hillkoeffizient.

Bei der Serotoninmessreihe wurden die Messwerte auf die höchste gemessene Konzentration von 300 $\mu$ M Serotonin normalisiert. Bei dieser Konzentration war bei allen gemessenen Zellen das Maximum des möglichen Stromflusses erreicht worden. Gemittelte Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben.

---

### 4.4.3 Statistische Datenauswertung

#### 4.4.3.1 Dosis-Wirkungs-Kurven

Um die für jede Rezeptorgruppe gemessenen Daten statistisch miteinander vergleichen zu können, wurde für jede gemessene Zelle eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Aufgrund der schwierigen Messbedingungen war es nicht immer möglich, für jede Zelle eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit allen Konzentrationen zu erheben. Bei Zellen, bei denen keine ausreichende Anzahl an Konzentrationen gemessen werden konnte, wurden die fehlenden Werte durch Messwerte von anderen Zellen der gleichen Gruppe ergänzt. Dies war möglich, weil die vorgenommenen Kontrollmessungen (10µM 5-HT) in einem Bereich liegen, in dem es zu einem annähernd maximalen Stromfluss kommt. Die pro Zelle errechneten EC<sub>50</sub>- bzw. IC<sub>50</sub>-Werte wurden für die statistische Interpretation der Daten verwendet.

Als statistischen Test führten wir jeweils einen Bonferroni-Test als Oneway ANOVA (Oneway Analysis of Variance) mit einem Signifikanzniveau ≤0,05 durch.

Für die Graphiken wurde die Datenpunkte der jeweiligen Konzentrationen gemittelt und für die gemittelten Daten eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Für die Statistik aber wurde für jede einzelne Zelle eine DWK erstellt und die erhaltenen EC<sub>50</sub>- bzw. IC<sub>50</sub>-Werte gemittelt. Durch die unterschiedliche Erhebung kann es zwischen den statistischen Werten und den Graphiken zu Unterschieden kommen.

Gemittelte Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) angegeben.

$$\sigma_n = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

σ<sub>n</sub>: Standardfehler (SEM)

σ: Standardabweichung (SD)

n: Anzahl der Stichproben

$$\sigma_x = \sqrt{\text{Var}(X)}$$

σ<sub>x</sub>: Standardabweichung (SD)

Var: Varianz

X: Zufallsvariable X

#### 4.4.3.2 Multiple Aktivierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors

Für die Beurteilung des *Rundown*-Effekts wurde ein Bonferroni-Test (Signifikanzniveau ≤0,05) mit den jeweils 5 letzten Applikationen (22.-26. Applikation) pro Zelle durchgeführt. Anzahl der gemessenen Zellen pro Rezeptor: **H123**, **M123** n=4, **C123**, **C123** n=5, **C123** n=6, **C123** n=7, **C123** n=8.

---

## 5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Bedeutung die Rezeptorstruktur für die Affinität von Serotonin bzw. Clozapin am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor hat. Durch die Konstruktion von chimären (Maus-Mensch) 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren wurde versucht, die für die unterschiedlichen kinetischen Parameter beim murinen und humanen Rezeptor verantwortlichen Rezeptorabschnitte zu identifizieren.

Hierfür wurde die *Patch-Clamp*-Technik (*Whole-Cell-Modus*) gewählt. Die verwendeten klonierten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren wurden heterolog in HEK 293-Zellen exprimiert. Durch die Ionen-Zusammensetzung der Extrazellulärlösung (Messmedium) und Anlegen eines Membranpotentials von -50mV kam es bei Aktivierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Kanals hauptsächlich zu einem Na<sup>+</sup>-Einstrom in die Zelle.

### Charakterisierung der Stromantworten

Abbildung 25 zeigt eine typische Stromantwort des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors bei Applikation von Serotonin. Die Gabe von Serotonin führt v.a. zu einem Einstrom von Na<sup>+</sup>-Ionen und Ausstrom von K<sup>+</sup>-Ionen. Ein wichtiges Merkmal ist die Desensibilisierung des Rezeptors. Dieses Phänomen ist typisch für Liganden-gesteuerte Ionenkanäle und beschreibt das Erreichen eines inaktiven Zustandes, obwohl der Agonist weiterhin am Rezeptor gebunden ist (Jones, 1996, S.96, Rex, 2007, S.344); während der Dauer der Applikation kommt es deshalb zu einer Stromabnahme.

Die Rate der Desensibilisierung wird durch die Zeitkonstanten der Desensibilisierung  $\tau_{des1}$  bzw.  $\tau_{des2}$  in ms charakterisiert.

Der *Plateau*-Strom repräsentiert den Zustand des desensibilisierten Stromverlaufs am Ende der Agonistenapplikation. Er stellt normalerweise einen kontinuierlichen Stromfluss (*steady-state current*) dar. Aufgrund der Desensibilisierungseigenschaften des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors gibt es, unabhängig von der Zeitdauer der 5-HT-Applikation, keinen eindeutigen *Plateau*-Strom. Als „*steady-state current*“ wurden deshalb die letzten 10ms der 5-HT-Applikation festgelegt (Rammes, 2004, S. 849).

Nach Beendigung der Serotoninapplikation dissoziiert der Agonist vom Rezeptor und der Ionenkanal schließt sich (Deaktivierung des Kanals). Die Ladung stellt den Ladungstransfer dar und beschreibt den Ionenstrom, der über die Zeit geflossen ist. Sie entspricht der Fläche unter der Stromkurve; entsprechend ist die Einheit pAs. Die Ladung ist u.a. abhängig vom Grad der Desensibilisierung: je stärker die Desensibilisierung zunimmt, desto kleiner ist die Ladung und damit der Ladungstransfer.

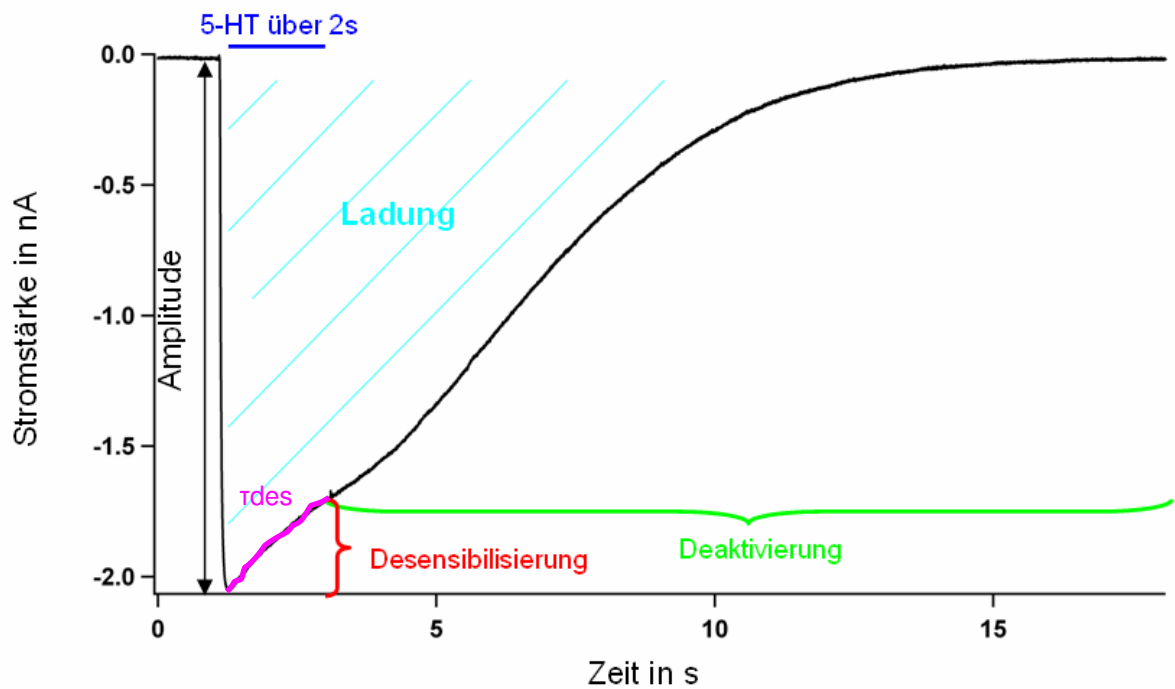
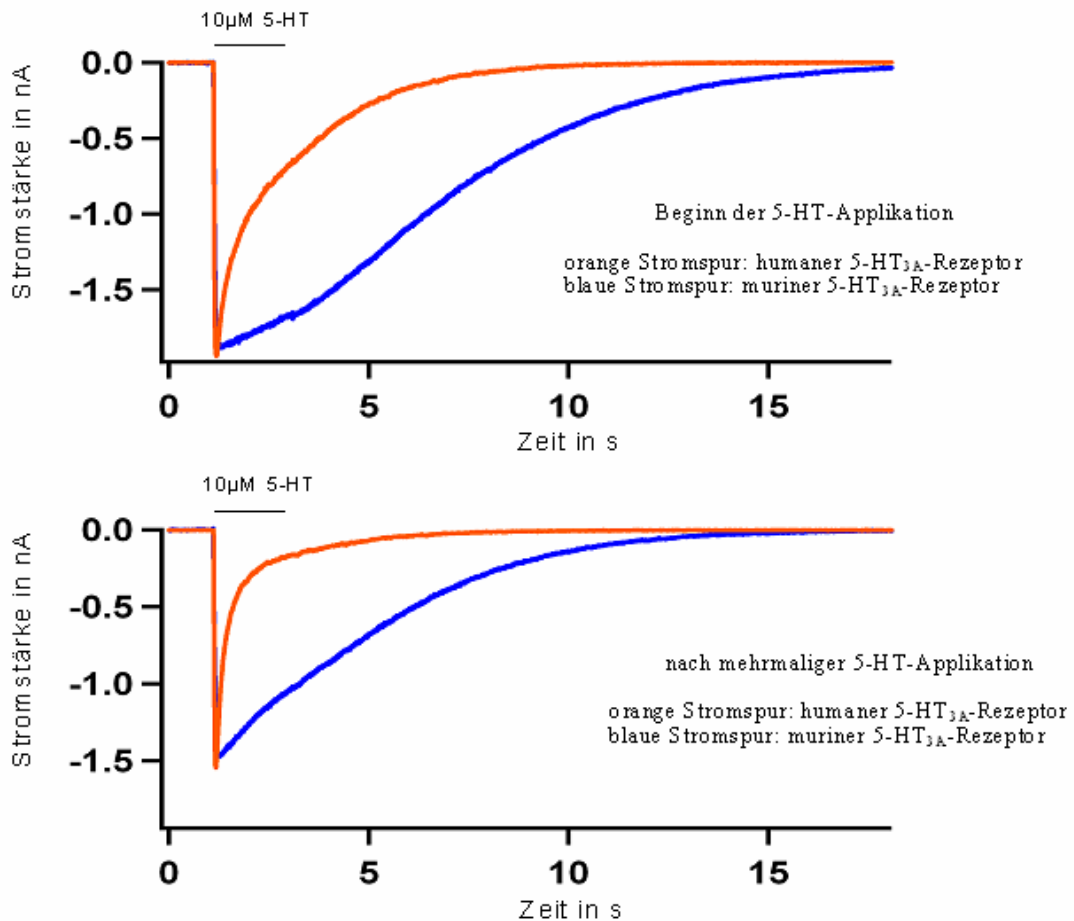


Abb. 25: Typische Stromantwort einer 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor exprimierenden HEK Zelle, incl. den Messparametern (eigene Messungen)

Zwei Rezeptoren können sich bei gleich großer Amplitude hinsichtlich der Ladung unterscheiden und umgekehrt. So zeigten der humane und der murine 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor in etwa gleich große Amplitude, unterschieden sich aber in der Ladung (Abb. 26). Bei dieser Arbeit wurden deshalb die Stromamplitude und die Ladung der verwendeten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren bestimmt.



**Abb. 26: Speziesspezifische Unterschiede in der Ladung bei gleich großer Amplitude. Obere Darstellung: Stromkurven zu Beginn einer mehrmaligen Serotoninapplikation. Untere Darstellung: Stromkurven nach mehrmaliger Applikation von Serotonin. Blaue Stromspur: muriner 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor. Orange Stromspur: humaner 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor.**

Abbildung 27 zeigt die speziesspezifische Abnahme der Amplitude und der Ladung während mehrmaliger Serotoninapplikation.

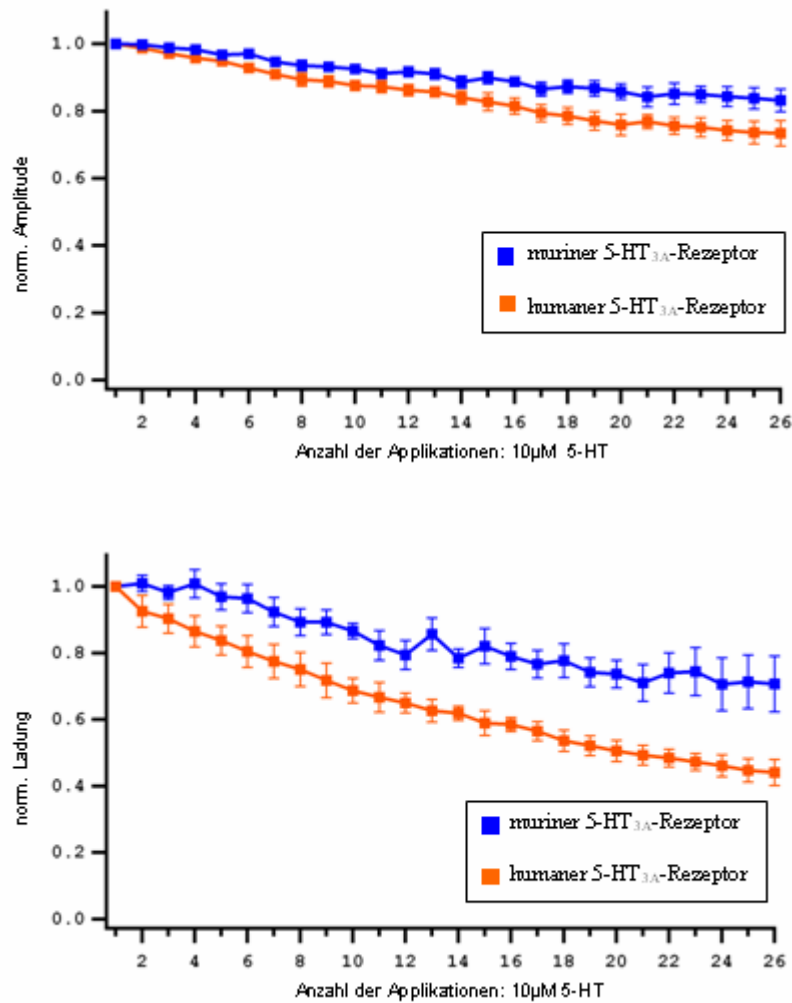
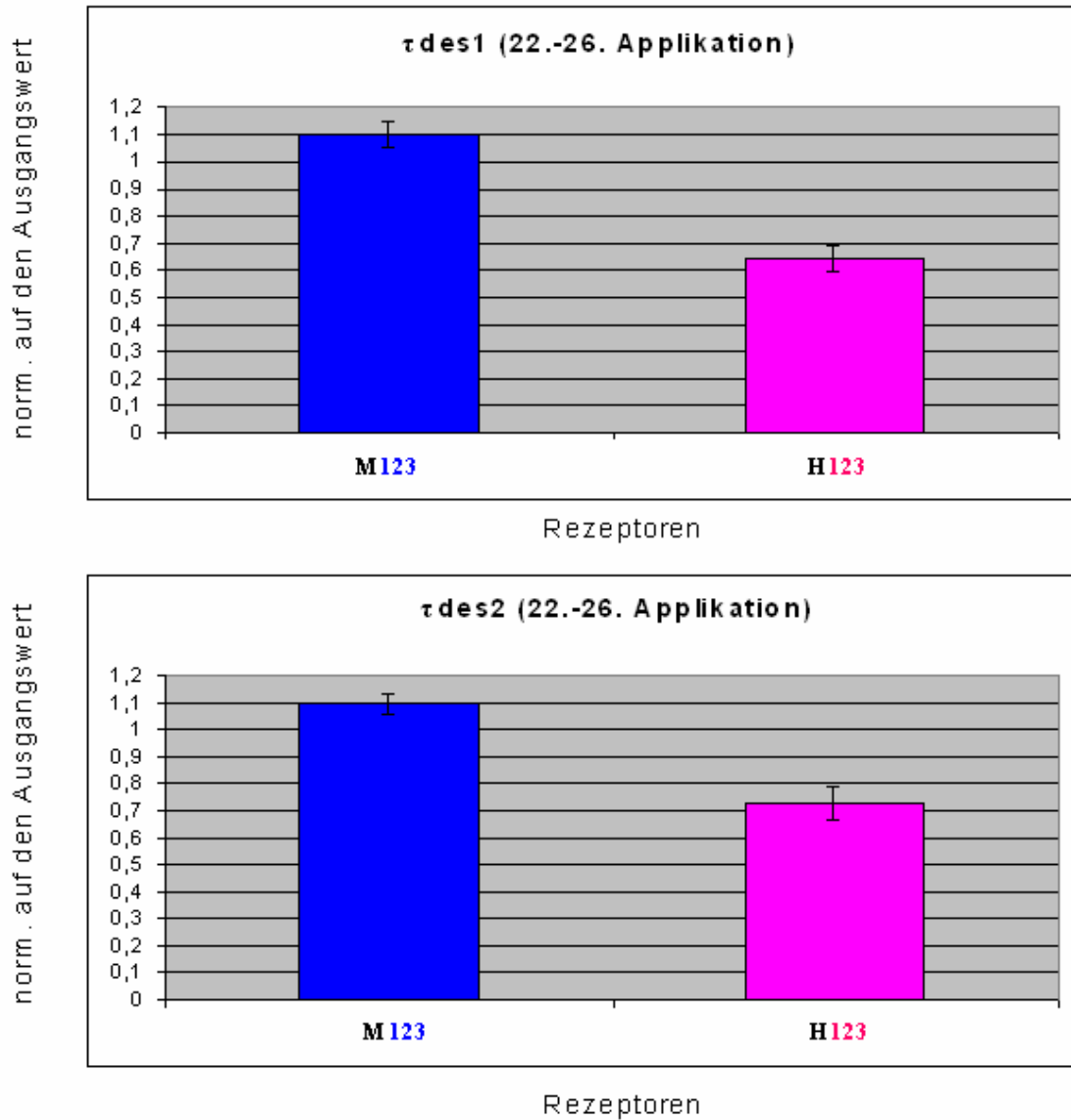


Abb. 27: Amplitude und Ladung des murinen (blau) und des humanen (orange) 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors über 26 Applikationen (entspricht 15 Minuten Datenaufzeichnung) von 5-HT. Abgebildet sind Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4.



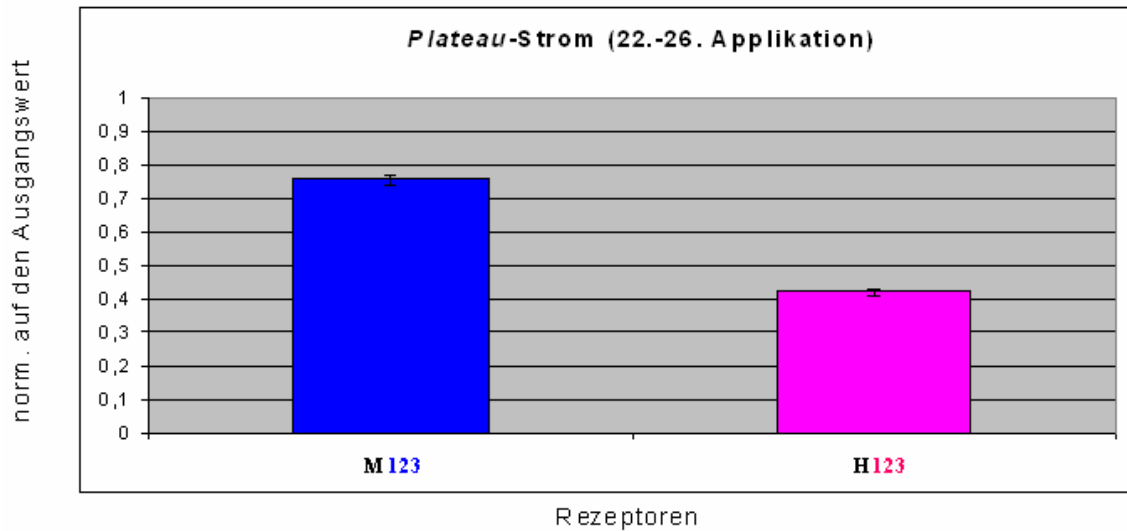
Nach mehrmaliger Aktivierung zeigte der humane 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor eine Beschleunigung der Desensibilisierungsrate und damit eine Abnahme der Zeitkonstanten  $\tau_{des1}$  und  $\tau_{des2}$ . Beim murinen Rezeptor kam es bei  $\tau_{des1}$  zu keiner signifikanten Veränderung ( $p= 0,061$ ), bei  $\tau_{des2}$  kam es sogar zu einer geringfügigen Zunahme ( $p= 0,049$ ; Abb. 28).



**Abb. 28: Die Zeitkonstanten  $\tau_{des1}$  und  $\tau_{des2}$  der Rezeptordesensibilisierung.**

Abgebildet sind Mittelwert  $\pm$  SEM der letzten 5 Applikationen;  $n=4$ .

Nach mehrmaliger Aktivierung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren kam es zu einer Steigerung der Desensibilisierung, ersichtlich an dem immer kleiner werdenden *Plateau*-Strom (Abb. 29).



**Abb. 29:** *Plateau*-Strom des murinen und des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors im Vergleich zum Ausgangswert.

Im Gegensatz zum murinen Rezeptor war die Abnahme des *Plateau*-Stroms beim humanen Rezeptor besonders ausgeprägt. Abgebildet sind Mittelwert  $\pm$  SEM der letzten 5 Applikationen; n=4.

## 5.1 Multiple Aktivierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors

Um die Zunahme der Rezeptordesensibilisierung in Folge mehrmaliger Applikationen von 10µM Serotonin aufzuzeigen, wurden mindestens 23 Applikationen (Applikationsmodus: 40s Puffer, 2s 10µM Serotonin; Datenaufzeichnung 15 Minuten) durchgeführt. Die Experimente wurden an humanen, murinen und chimären 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren durchgeführt.

### 5.1.1 Amplitude

In Abbildung 30 ist die Abnahme der Amplitude bei mehrmaliger Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren dargestellt.

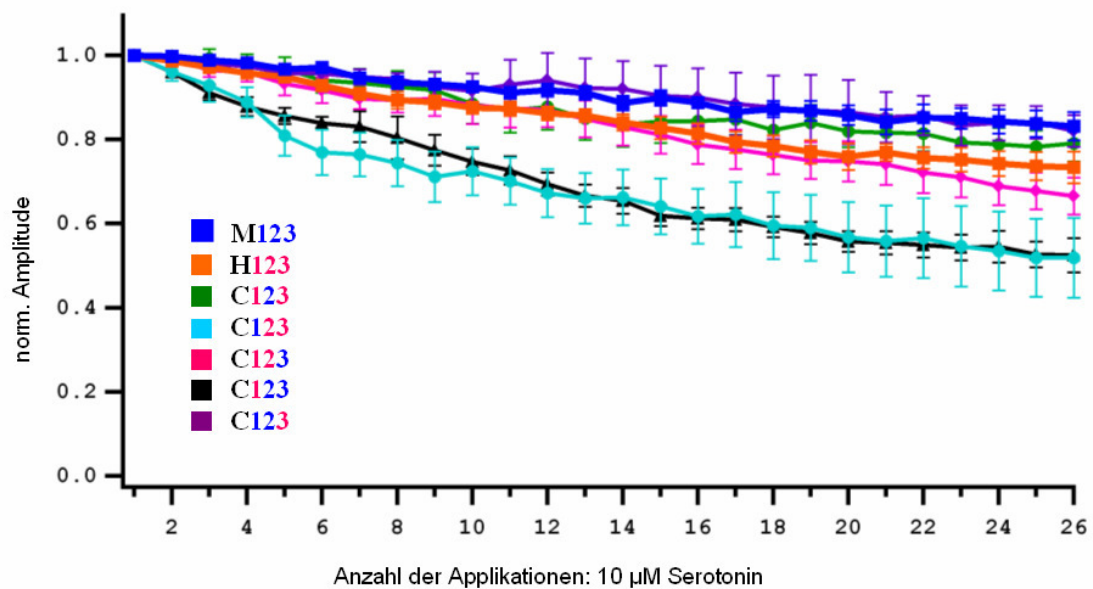


Abb. 30: Mehrfache Applikationen (mind. 23) von 10µM 5-HT an den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (normalisierte Amplitude).

Abgebildet sind Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4-8.

Abbildung 31 zeigt die Abnahme der Amplitude für jeden Rezeptor im Vergleich zum Ausgangswert.

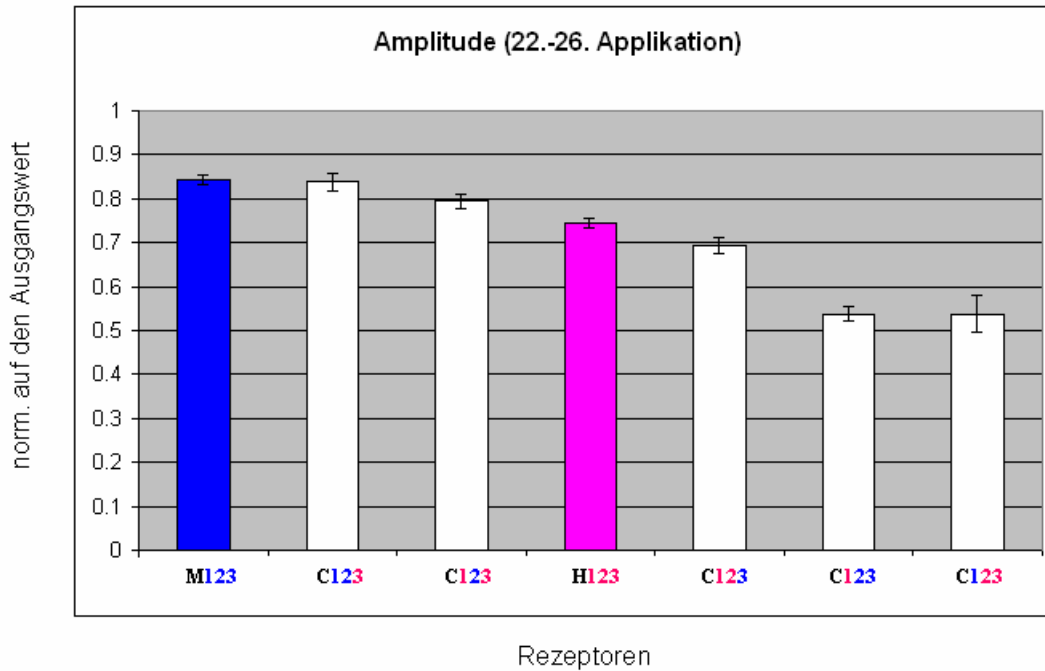


Abb. 31: Abnahme der Amplitude bei den getesteten Rezeptoren nach mehrmaliger Applikation von 5-HT.

Abgebildet sind Mittelwert  $\pm$  SEM der letzten 5 Applikationen; n=4-8.

Die Rezeptoren C123 und C123 unterschieden sich nicht. Sie unterschieden sich von den Rezeptoren M123, H123, C123, C123 und C123 (Tab. 3). Die Rezeptoren M123, H123, C123, C123 differierten nicht. C123 unterschied sich mit Ausnahme von Rezeptor H123 von allen Rezeptoren.

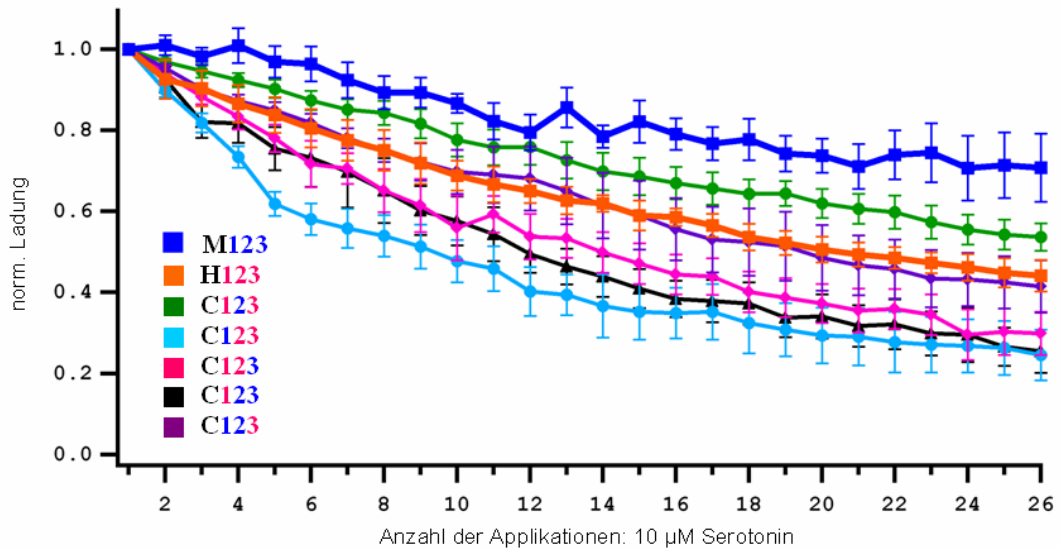
Tab. 3: Multiple Aktivierung der Serotoninrezeptoren (Amplitude).

Symbol “•“ bedeutet, es ist ein signifikanter Unterschied bei den jeweiligen Rezeptoren vorhanden.

Rezeptor	M123	C123	C123	H123	C123	C123	C123
M123							
C123							
C123							
H123							
C123	•	•	•				
C123	•	•	•	•	•		
C123	•	•	•	•	•		

## 5.1.2 Ladung

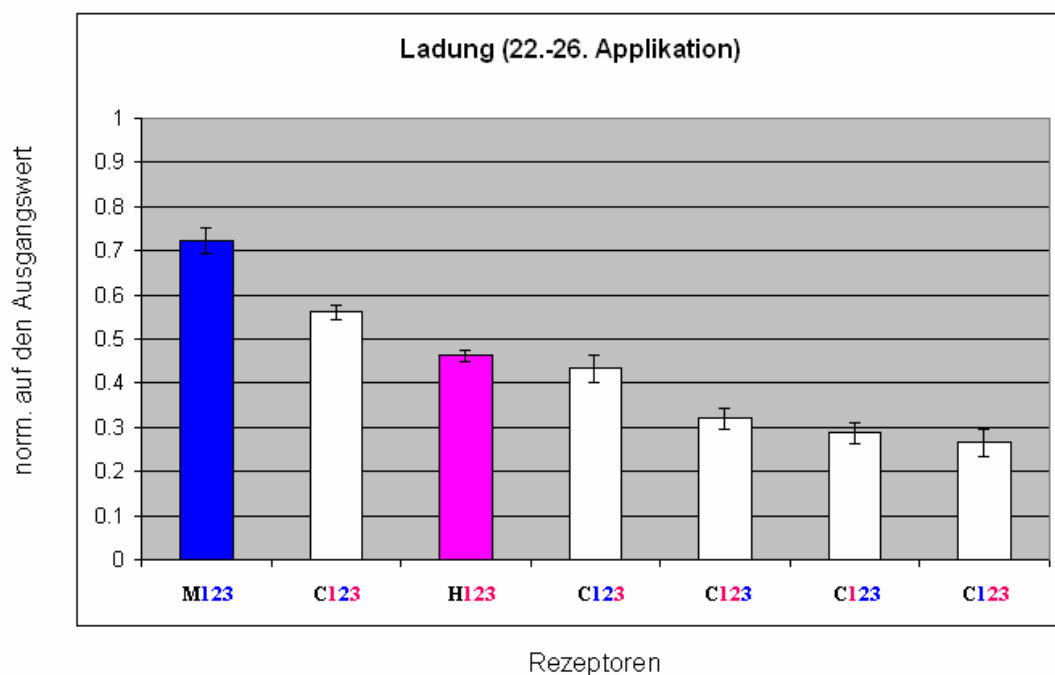
In Abbildung 32 ist die Abnahme der Ladung bei mehrmaliger Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren dargestellt.



**Abb. 32: Mehrfache Applikationen (mind. 23) von 10µM 5-HT an den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (normalisierte Ladung).**

Abgebildet sind Mittelwert ± SEM; n=4-8.

Abbildung 33 zeigt die Abnahme der Ladung für jeden Rezeptor im Vergleich zum Ausgangswert. Die Ladung nimmt im Vergleich zur Amplitude stärker ab (Abb.31).



**Abb. 33: Abnahme der Ladung nach mehrmaliger Applikation von 5-HT.**

Abgebildet sind Mittelwert ± SEM der letzten 5 Applikationen; n=4-8.

Der Rezeptor **M123** unterschied sich von allen Rezeptoren (Tab. 4). Die Rezeptoren **C123**, **C123** und **C123** differierten nicht, unterschieden sich aber von den übrigen Rezeptoren. **C123** unterschied sich nicht von **H123** und **C123**.

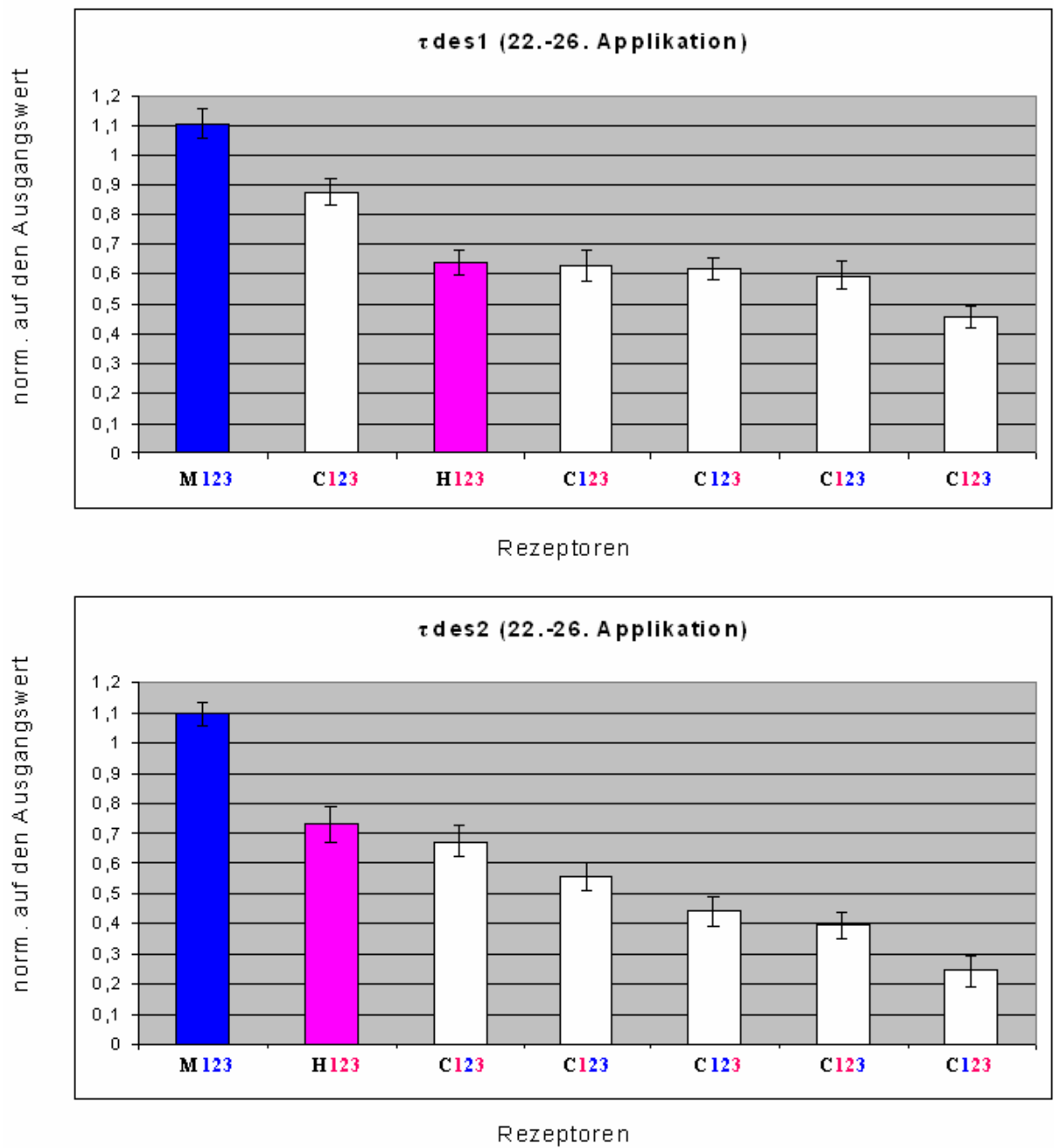
**Tab. 4: Multiple Aktivierung der Serotoninrezeptoren (Ladung).**

Symbol “•“ bedeutet, es ist ein signifikanter Unterschied bei den jeweiligen Rezeptoren vorhanden.

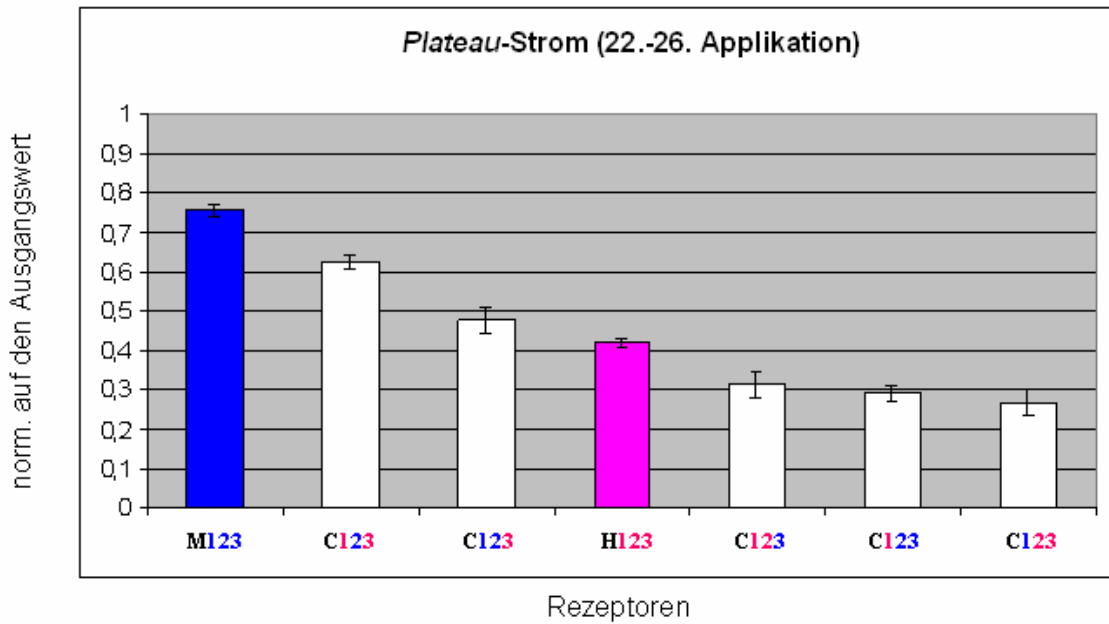
Rezeptor	<b>M123</b>	<b>C123</b>	<b>H123</b>	<b>C123</b>	<b>C123</b>	<b>C123</b>	<b>C123</b>
<b>M123</b>							
<b>C123</b>	•						
<b>H123</b>	•						
<b>C123</b>	•	•					
<b>C123</b>	•	•	•	•			
<b>C123</b>	•	•	•	•			
<b>C123</b>	•	•	•	•			

### 5.1.3 Desensibilisierungseigenschaften des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors

Die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren zeigten nach mehrmaliger Aktivierung eine Beschleunigung der Desensibilisierungsrate und damit eine Abnahme der Zeitkonstanten der Desensibilisierung  $\tau_{des1}$  und  $\tau_{des2}$ . Beim murinen Rezeptor kam es im Gegensatz zu allen anderen Rezeptoren nicht zu einer Beschleunigung der Desensibilisierungsrate (Abb. 34). Nach mehrmaliger Applikation von 5-HT nahm der *Plateau*-Strom bei allen getesteten Rezeptoren ab (Abb. 35).



**Abb. 34: Abnahme von  $\tau_{des1}$  und  $\tau_{des2}$  bei multipler Aktivierung der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren. Der murine 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zeigte dagegen keine Abnahme von  $\tau_{des1}$  und  $\tau_{des2}$ ; Abgebildet sind Mittelwert  $\pm$  SEM der letzten 5 Applikationen; n=4-8.**

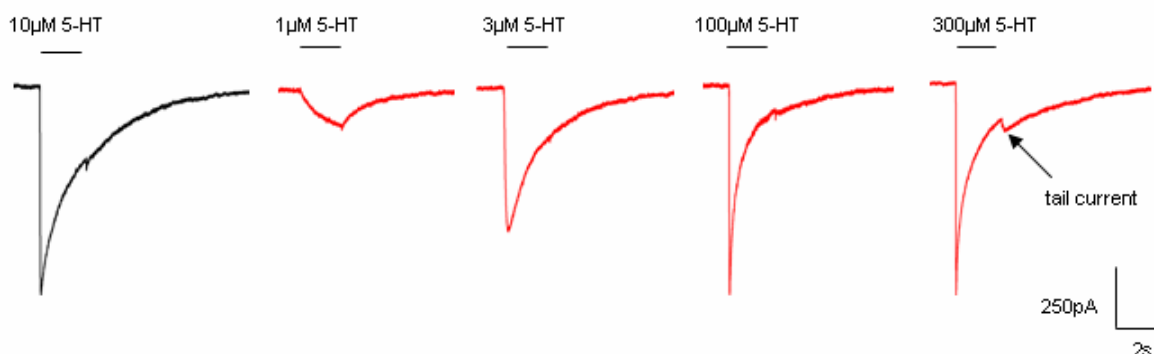


**Abb. 35:** *Plateau-Strom* der jeweiligen Rezeptoren im Vergleich zum Ausgangswert. Der *Plateau-Strom* nimmt bei multipler Aktivierung der Rezeptoren ab. Abgebildet sind Mittelwert  $\pm$  SEM der letzten 5 Applikationen;  $n=4-8$ .

## 5.2 Dosis-Wirkungs-Kurve von 5-HT an verschiedenen 5-HT<sub>3A</sub>- Rezeptoren

### 5.2.1 Amplitude

Um die unterschiedlichen Affinitäten von Serotonin zu den verwendeten Rezeptoren miteinander vergleichen zu können, stellten wir eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der applizierten 5-HT-Konzentration und der Rezeptor-Antwort auf. Hierzu wurde der Agonist in ansteigender Konzentration appliziert (Abb. 36).



**Abb. 36:** Wirkung verschiedenener 5-HT Konzentrationen auf den chimären Rezeptor C123. Schwarze Stromkurve: 10µM 5-HT (1. Kontrolle), rote Stromkurven: durch unterschiedliche Serotoninkonzentrationen hervorgerufene Stromkurven. Der Pfeil in der Abbildung zeigt den „tail current“ (genaue Erläuterung hierzu im folgenden Text).



Ein bei hohen Serotoninkonzentrationen auftretendes Phänomen ist der sogenannte *tail current* („Nach-Strom“): Bei Bindung des Agonisten erfolgt zunächst die Kanalöffnung, dann blockiert der Agonist die offenen Kanäle und es kommt zu einer Stromabnahme als Ausdruck der Desensibilisierung. Die Desensibilisierung erfolgt durch einen Agonist-induzierten Offenkanalblock. Nach Beendigung der Serotoninapplikation dissoziiert der Agonist vom Rezeptor und gibt den Kanal frei, was einen erneuten Stromfluss („Nach-Strom“) bewirkt (Hapfelmeier, 2003, S.1723).

Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 37) können die EC<sub>50</sub>-Werte der jeweiligen Rezeptoren ermittelt werden. Der EC<sub>50</sub>-Wert gibt an, bei welcher Agonistenkonzentration der halbmaximale Effekt am Rezeptor hervorgerufen wurde, und ist somit ein Maß für die Potenz des Agonisten.

Die für den murinen und humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor unter vergleichbaren Messbedingungen erhobenen Daten stimmen mit den Daten in der Literatur überein (Tab. 5).

**Tab. 5: EC<sub>50</sub>-Werte des murinen und humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors bei Applikation von Serotonin. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Messwerte unter vergleichbaren Messbedingungen erhoben; angegebene Werte auf eine Dezimale gerundet.**

(1: Lankiewicz, 1998, S.210 2: Davies, 1999, S.360 3: van Hooft, 1996, S.841 4: Hapfelmeier, 2003, S.1723 5: eigene Ergebnisse)

Amplitude	Maus 5-HT <sub>3A</sub> - Rezeptor	Mensch 5-HT <sub>3A</sub> - Rezeptor
Agonist	EC <sub>50</sub>	
5-HT	2,9 µM <sup>1</sup> 1,4 µM <sup>3</sup> (-70mV Haltepotential) 1,4 µM <sup>5</sup>	2,3 µM <sup>1</sup> 2,9 µM <sup>2</sup> (-60mV Haltepotential) 3,0 µM <sup>4</sup> (-30mV Haltepotential) 2,3 µM <sup>5</sup>

Die Dosis-Wirkungsbeziehung ist eine sigmoidal verlaufende Kurve.

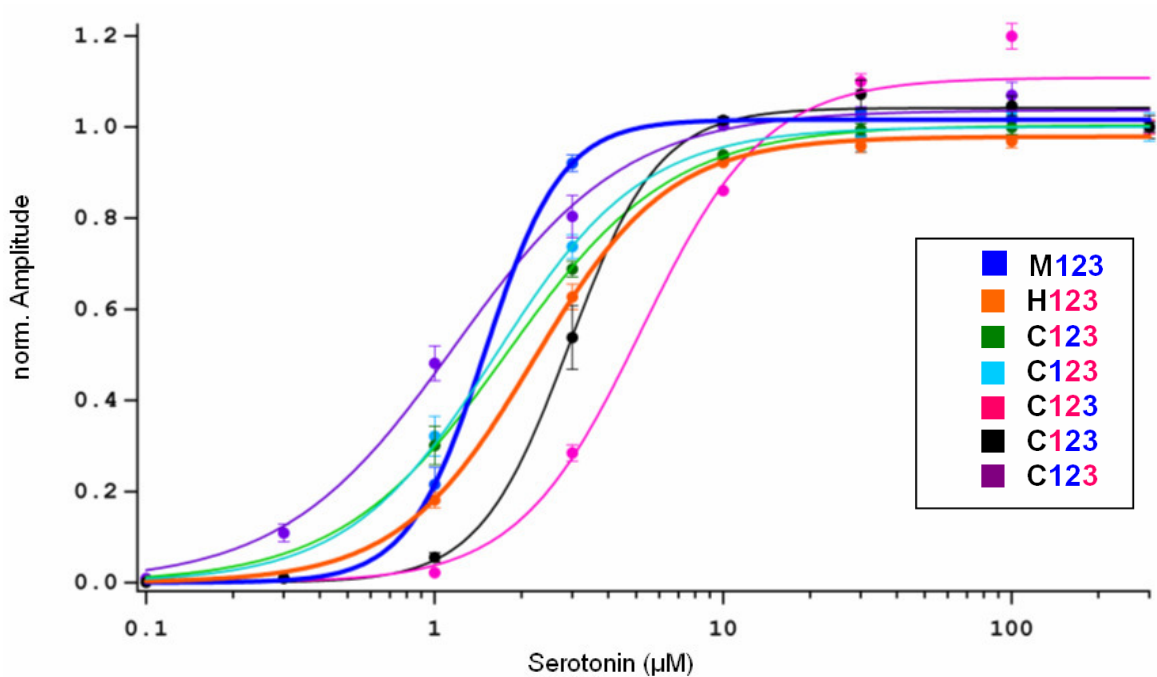


Abb. 37: Serotonin Dosis-Wirkungs-Kurven der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (normalisierte Amplitude). Messwerte auf 300µM Serotonin normalisiert. Abgebildet sind Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5-13.

Bei der statistischen Auswertung der Dosis-Wirkungsbeziehung für die Amplitude ergaben sich folgende EC<sub>50</sub>-Werte mit Standardfehlern (Tab. 6):

Tab. 6: EC<sub>50</sub>-Werte der Amplitude mit Standardfehlern (Werte auf 2 Dezimalen gerundet)

Amplitude	EC <sub>50</sub> -Werte (µM) $\pm$ SEM
C123	1.22 $\pm$ 0.20
M123	1.40 $\pm$ 0.10
C123	1.91 $\pm$ 0.26
C123	1.91 $\pm$ 0.16
H123	2.27 $\pm$ 0.16
C123	3.07 $\pm$ 0.32
C123	4.92 $\pm$ 0.19

Der Rezeptor **C123** unterschied sich hinsichtlich der Affinität von 5-HT zur Serotoninbindungsstelle signifikant von allen übrigen getesteten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (Tab. 7). Des Weiteren differierte der Rezeptor **C123** signifikant von **C123**, **M123** und **C123**, nicht aber von den anderen Rezeptoren.

Keine signifikanten Unterschiede bestanden zwischen folgenden 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren: **M123**, **H123**, **C123**, **C123** und **C123**.

Tab. 7: Serotonin-Amplitude.

Symbol “•“ bedeutet, es ist ein signifikanter Unterschied bei den jeweiligen Rezeptoren vorhanden.

Rezeptor	<b>C123</b>	<b>M123</b>	<b>C123</b>	<b>C123</b>	<b>H123</b>	<b>C123</b>	<b>C123</b>
<b>C123</b>							
<b>M123</b>							
<b>C123</b>							
<b>C123</b>							
<b>H123</b>							
<b>C123</b>	•	•					
<b>C123</b>	•	•	•	•	•	•	

### 5.2.2 Ladung

Bei der Auswertung der Dosis-Wirkungsbeziehung (Abb. 38) für die Ladung ergaben sich folgende EC<sub>50</sub>-Werte mit Standardfehlern (Tab. 8):

Tab. 8: EC<sub>50</sub>-Werte der Ladung mit Standardfehlern (Werte auf 2 Dezimalen gerundet)

Ladung	EC <sub>50</sub> -Werte (µM) ± SEM
<b>C123</b>	0.65 ± 0.02
<b>C123</b>	0.96 ± 0.06
<b>M123</b>	1.22 ± 0.13
<b>H123</b>	1.24 ± 0.08
<b>C123</b>	1.35 ± 0.12
<b>C123</b>	2.76 ± 0.26
<b>C123</b>	2.76 ± 0.08

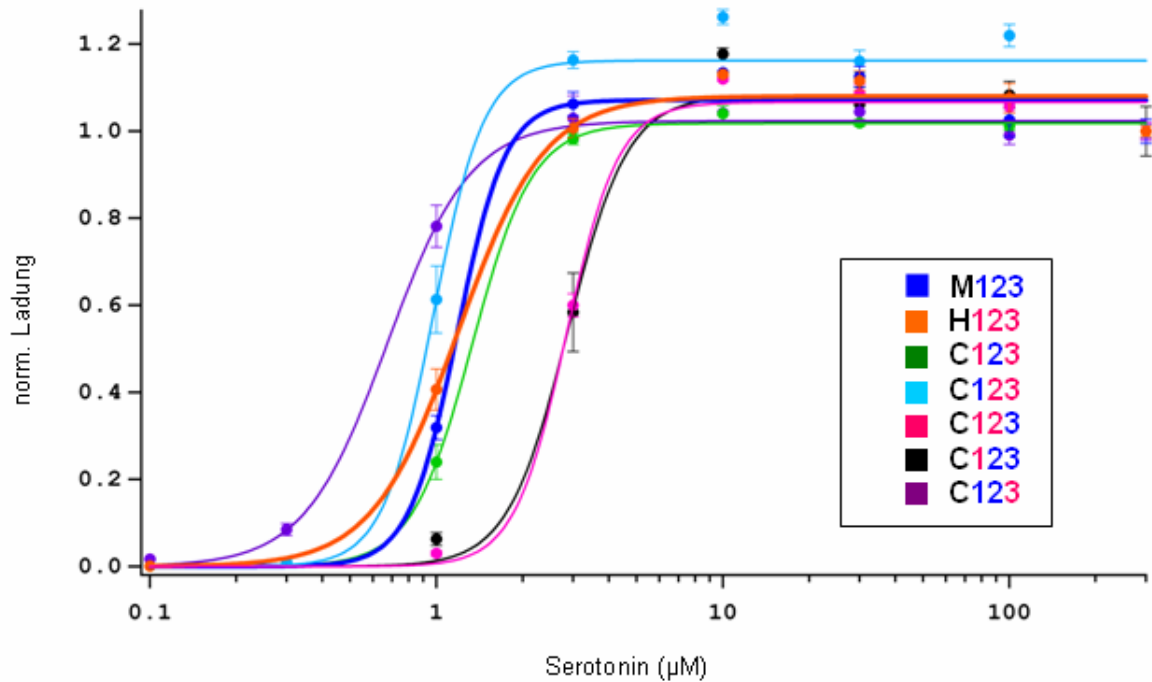


Abb. 38: Serotonin Dosis-Wirkungs-Kurven der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (normalisierte Ladung). Messwerte auf 300µM 5-HT normalisiert. Abgebildet sind Mittelwert ± SEM; n=5-13.

Die Chimären C123 und C123 unterschieden sich hinsichtlich der Affinität von 5-HT zur Serotoninbindungsstelle signifikant von allen anderen getesteten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (Tab. 9).

Keine signifikanten Unterschiede bestanden zwischen folgenden 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren: M123, H123, C123, C123 und C123.

Tab. 9: Serotonin-Ladung.

Symbol “•” bedeutet, es ist ein signifikanter Unterschied bei den jeweiligen Rezeptoren vorhanden.

Rezeptor	C123	C123	M123	H123	C123	C123	C123
C123							
C123							
M123							
H123							
C123							
C123	•	•	•	•	•		
C123	•	•	•	•	•		

## 5.3 Dosis-Wirkungs-Kurve von Clozapin an verschiedenen 5-HT<sub>3A</sub>- Rezeptoren

### 5.3.1 Amplitude

Analog zu den unter 4.3.6.1 geschilderten Serotoninmessungen führten wir Messungen mit dem am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor kompetitiv-antagonistisch wirkenden Clozapin durch. Die bisher in der Literatur vorhandenen Daten zur Amplitude sind in Tab. 10 aufgeführt:

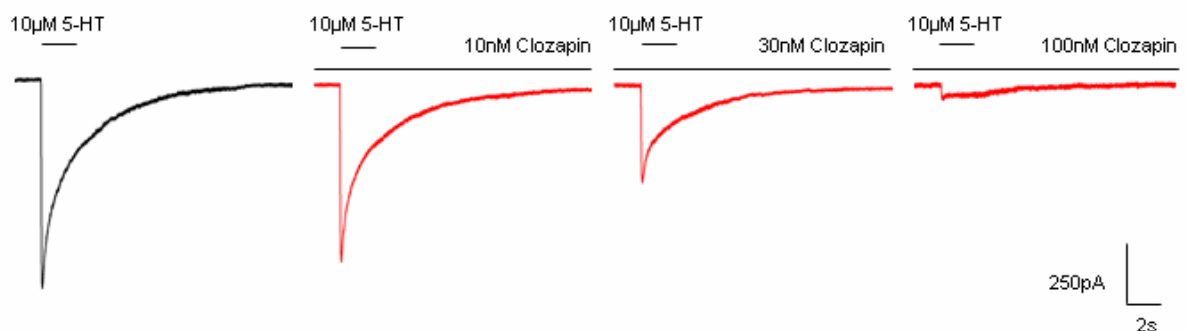
**Tab. 10: IC<sub>50</sub> -Werte des murinen und humanen 5-HT<sub>3A</sub>- Rezeptors bei Applikation von Clozapin.**

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Messwerte unter vergleichbaren Messbedingungen erhoben; angegebene Werte gerundet.

(1: Hermann, 1996, S.958; 2: Rammes, 2004, S. 853 3: eigene Ergebnisse)

Amplitude	Maus 5-HT <sub>3A</sub> - Rezeptor	Mensch 5-HT <sub>3A</sub> - Rezeptor
Antagonist	IC <sub>50</sub>	
Clozapin	11 nM <sup>1</sup> 9 nM <sup>3</sup>	680 nM <sup>2</sup> 74 nM <sup>3</sup>

Bei den Clozapinmessungen wurden jeweils 10µM 5-HT als Kontrolle zwischen die Clozapinapplikationen geschaltet. Der durch die Kontrolle induzierte Strom wurde auf 100% gesetzt. Durch Clozapin wurde der Kontrollstrom konzentrationsabhängig reduziert (Abb. 39).



**Abb. 39: Wirkung verschiedener Clozapinkonzentrationen auf den chimären Rezeptor C123. 5-HT induzierte Stromkurve ohne Clozapinapplikation (1. Kontrolle, schwarz) und mit Clozapinapplikation (rot).**

Um die in dieser Arbeit verwendeten Rezeptoren hinsichtlich der Potenz, mit der Clozapin am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor bindet, vergleichen zu können, wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der applizierten Clozapinkonzentration und der Rezeptor-Antwort erstellt (Abb. 40).

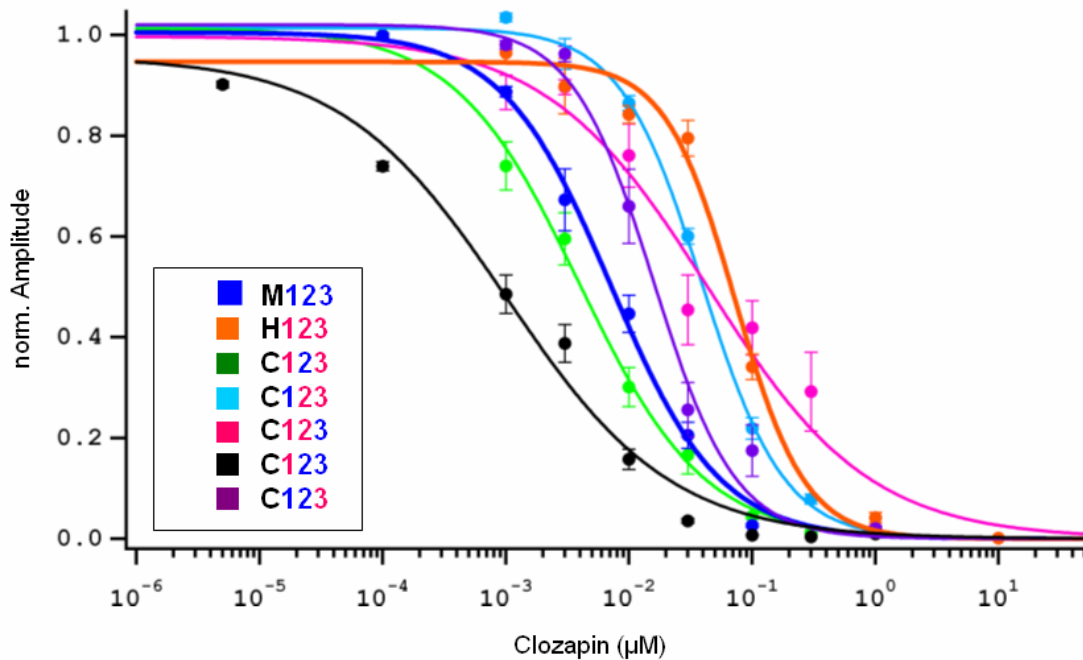


Abb. 40: Clozapin Dosis-Wirkungs-Kurven der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (normalisierte Amplitude). Die Daten wurden auf 10µM 5-HT normalisiert. Abgebildet sind Mittelwerte ± SEM; n=4-16.

Bei der Auswertung der Dosis-Wirkungsbeziehung für die Amplitude ergaben sich folgende IC<sub>50</sub>-Werte mit Standardfehlern (Tab. 11):

Tab. 11: IC<sub>50</sub>-Werte der Amplitude mit Standardfehlern (Werte auf 2 Dezimalen gerundet)

Amplitude	IC <sub>50</sub> -Werte (nM) ± SEM
<b>C123</b>	1.27 ± 0.00
<b>C123</b>	5.57 ± 0.00
<b>M123</b>	8.63 ± 0.00
<b>C123</b>	21.61 ± 0.00
<b>C123</b>	42.08 ± 0.00
<b>C123</b>	64.27 ± 0.06
<b>H123</b>	73.69 ± 0.01

Der durchgeführte Bonferronitest zeigte, dass der Rezeptor **H123** signifikant unterschiedlich war zu **C123**, **C123** und **M123** (Tab. 12). Er unterschied sich jedoch nicht von **C123**, **C123** und **C123**. **C123** unterschied sich wie der Rezeptor **H123** von **C123** und **C123**. **C123** und der Rezeptor **H123** differierten nicht. Keine signifikanten Unterschiede bestanden zwischen folgenden 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren: **C123**, **M123**, **C123**, **C123** und **C123**.

Tab. 12: Clozapin-Amplitude.

Symbol “•“ bedeutet, es ist ein signifikanter Unterschied bei den jeweiligen Rezeptoren vorhanden.

Rezeptor	<b>C123</b>	<b>C123</b>	<b>M123</b>	<b>C123</b>	<b>C123</b>	<b>C123</b>	<b>H123</b>
<b>C123</b>							
<b>C123</b>							
<b>M123</b>							
<b>C123</b>							
<b>C123</b>							
<b>C123</b>	•	•					
<b>H123</b>	•	•	•				

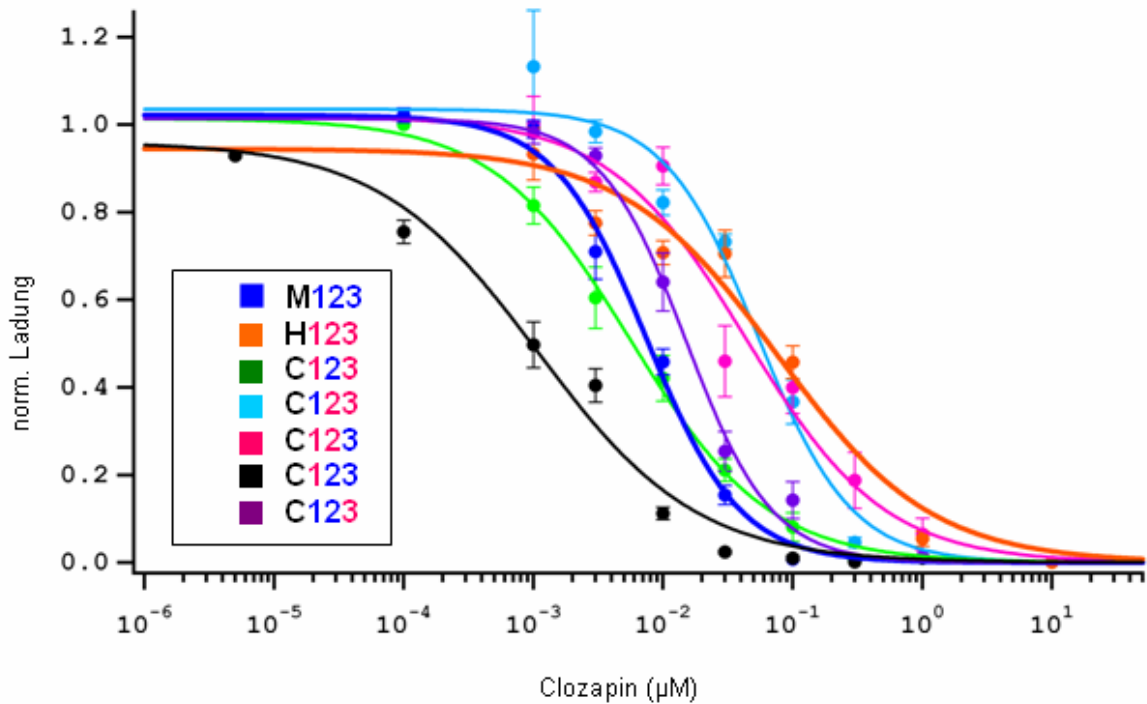
### 5.3.2 Ladung

Bei den Messungen der Ladung ergaben sich folgende IC<sub>50</sub>-Werte für Clozapin mit Standardfehlern (Tab. 13):

Tab. 13: IC<sub>50</sub>-Werte der Ladung mit Standardfehlern (Werte auf 2 Dezimalen gerundet)

Ladung	IC <sub>50</sub> -Werte (nM) ± SEM
<b>C123</b>	1.52 ± 0.00
<b>C123</b>	6.37 ± 0.00
<b>M123</b>	8.05 ± 0.00
<b>C123</b>	18.59 ± 0.00
<b>C123</b>	62.17 ± 0.01
<b>C123</b>	65.85 ± 0.01
<b>H123</b>	83.32 ± 0.02

Abbildung 41 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurven der Ladung.



**Abb. 41: Clozapin Dosis-Wirkungs-Kurven der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (normalisierte Ladung).**  
 Die Daten wurden auf 10µM 5-HT normalisiert. Abgebildet sind Mittelwert ± SEM; n=4-16.

Hierbei ergab sich, wie auch schon bei der Amplitude, ein signifikanter Unterschied des Rezeptors **H123** zu den Chimären **C123**, **C123** und dem Rezeptor **M123** (Tab. 14). Von den Rezeptoren **C123**, **C123** und **C123** unterschied sich der Rezeptor **H123** nicht signifikant. Keine signifikanten Unterschiede konnten bei den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren **C123**, **M123**, **C123**, **C123**, **C123** und **C123** festgestellt werden.

**Tab. 14: Clozapin-Ladung.**

Symbol “•” bedeutet, es ist ein signifikanter Unterschied bei den jeweiligen Rezeptoren vorhanden.

Rezeptor	<b>C123</b>	<b>C123</b>	<b>M123</b>	<b>C123</b>	<b>C123</b>	<b>C123</b>	<b>H123</b>
<b>C123</b>							
<b>C123</b>							
<b>M123</b>							
<b>C123</b>							
<b>C123</b>							
<b>C123</b>							
<b>H123</b>	•	•	•				



---

## 5.4 Cheng-Prusoff-Gleichung

Mit Hilfe der Bindungskonstante (= Inhibitionskonstante)  $K_b$  wird die Stärke der Wechselwirkung zwischen Protein (hier: 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor) und Ligand (hier: Clozapin) beschrieben.  $K_b$  hat die Dimension einer Konzentration mit der Einheit mol/l und gibt die Affinität eines Proteins zum Hemmstoff wieder. Je kleiner der  $K_b$ -Wert ist, desto stärker bindet der Ligand an das Protein. Oft wird statt des  $K_b$ -Wertes der  $IC_{50}$ -Wert angegeben. Erfahrungsgemäß verlaufen die beiden Größen in erster Näherung parallel (Böhm, 1996, S.95f.). Mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung kann man anhand des  $IC_{50}$ -Wertes des Antagonisten die tatsächliche Bindungsaffinität  $K_b$  von Clozapin berechnen (Tab. 15):

$$K_b = IC_{50}/(1+[Agonist]/EC_{50})$$

Die Formel gilt für kompetitiv wirkende Antagonisten (Cheng, 1973, S.3108).

Die in dieser Arbeit verwendete Agonistenkonzentration entsprach der bei den Messungen verwendeten Kontrollkonzentration von 10µM Serotonin.

Aus der Gleichung geht hervor, dass Clozapin mit in etwa gleich starker Affinität an die Rezeptoren **H123**, **C123** und **C123** (9,2 nM, 13,4nM und 5,8nM) bindet. Die Rezeptoren **M123**, **C123**, **C123** und **C123** zeigen eine in etwa gleich starke Affinität (0,9nM, 0,8nM, 0,3nM und 1,1nM) für Clozapin.

**Tab. 15: Mit der Cheng-Prusoff-Gleichung berechnete tatsächliche Bindungsaffinitäten von Clozapin für jeden Rezeptor und die Standarabweichungen des Mittelwertes ( $K_b$ -Werte auf 2 Dezimalen gerundet)**

Rezeptor	$K_b$ -Wert (nM)	+ SEM	- SEM
<b>C123</b>	0,3	0,0013	0,0005
<b>C123</b>	0,8	0,0008	0,0007
<b>M123</b>	0,9	0,0010	0,0008
<b>C123</b>	1,1	0,0014	0,0009
<b>H123</b>	9,2	0,0097	0,0086
<b>C123</b>	5,8	0,0061	0,0054
<b>C123</b>	13,4	0,0138	0,0131

---

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Bekannte Eigenschaften des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors Mensch-Maus

Die Aminosäuresequenzen des murinen und des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors stimmen zu 85% überein (Belelli, 1995, S. 1056). Deshalb ist die Maus für vergleichende pharmakologische Studien mit dem Menschen geeignet. Unterschiede in der Rezeptorkinetik dürften auf die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen zurückzuführen sein. So wird z.B. die Desensibilisierung von der Aminosäuresequenz des Rezeptors beeinflusst (Lobitz, 2001, S. 844).

Die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte und damit die pharmakologische Potenz von Serotonin zur Aktivierung des humanen und murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors stimmten gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (Lankiewicz, 1998, S. 210, Davies, 1999, S. 360, van Hooft, 1996, S. 841, Hapfelmeier, 2003, S.1723). Minimale Abweichungen von den in der Literatur angegebenen Werten könnten durch unterschiedlich zusammengesetzte Extra- und Intrazellulärlösungen und unterschiedlich angelegte Haltepotentiale verursacht sein.

Bisher gibt es nur wenige elektrophysiologische Studien zu Clozapin an murinen und humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren. Der IC<sub>50</sub>-Wert von Clozapin war beim murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor nahezu identisch mit dem bei Hermann (1996, S.958). Der IC<sub>50</sub>-Wert des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors lag ebenfalls, wie bei Rammes (2004, S. 853), im oberen nanomolaren Bereich. Somit wies dieser Rezeptor im Vergleich zu allen anderen getesteten Rezeptoren die geringste Affinität von Clozapin an der Serotoninbindungsstelle auf. Die IC<sub>50</sub>-Werte von Amplitude und Ladung (74nM bzw. 83nM) lagen beim humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor in einem Bereich, in dem Clozapin antipsychotisch wirkt (70 - 130nM; Seeman, 1997, S.PL207).

Im zeitlichen Verlauf des Experiments nahmen die Amplitude und die Ladung ab (Anm.: beim murinen Rezeptor nahm die Ladung geringfügig zu). Dieser *Rundown*-Effekt ist in der Literatur für Ionenkanäle beschrieben worden (Numberger, 1996, S. 149, Rammes 2004, S.849): Bei GABAergen Kanälen kann es während des Experiments zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Intrazellulärlösung kommen, die für die Aufrechterhaltung der Rezeptorantwort notwendig ist. Eine weitere Möglichkeit wäre die proteolytische Zerstörung des Kanals bei der *Whole-Cell*-Konfiguration. Beim 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor geht man davon aus, dass bei der *Whole-Cell*-Konfiguration zytoplasmatische Faktoren während der Messungen verlorengehen. Um

---

den *Rundown*-Effekt möglichst gering zu halten, wurde der Intrazellulärlösung ATP zugesetzt (Chen, 1990, S.211).

Die rasche Rezeptordesensibilisierung (Derkach, 1989, S. 706) ist eine für Ligandengesteuerte Ionenkanäle typische Eigenschaft. Sie nimmt bei häufiger Aktivierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors zu (Rammes, 2004, S.849). Diese Zunahme der Desensibilisierung von 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden: Die Zeitkonstanten  $\tau_{des1}$  und  $\tau_{des2}$  nahmen nach mehrmaliger Applikation ab und es kam damit zu einer Beschleunigung der Desensibilisierungsrate. Nur beim murinen Rezeptor konnte keine Beschleunigung der Desensibilisierungsrate beobachtet werden. Der *Plateau*-Strom, welcher die Desensibilisierung darstellt, nahm bei mehrmaliger Aktivierung der Rezeptoren ebenfalls ab. Da es beim murinen Rezeptor bei mehrmaliger Aktivierung nur zu einer geringfügigen Abnahme der Amplitude und des *Plateau*-Stroms kam (im Vergleich zu den übrigen Rezeptoren) und sogar eine geringfügige Zunahme der Zeitkonstanten  $\tau_{des2}$  der Desensibilisierung zu beobachten war (während die Zeitkonstante  $\tau_{des1}$  keine signifikanten Änderungen zeigte), war die Ladung größer als bei den übrigen getesteten Rezeptoren.

Sukzessive Aktivierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors führte zu einer deutlichen Reduktion des transmembranären Ladungstransfers mit nur geringem Effekt auf die Amplitude. Wie auch schon bei Lobitz dargelegt, können Stromkurven von 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren verschiedener Spezies (Maus, Meerschweinchen) gleich große Amplitude zeigen, sich jedoch wegen unterschiedlicher Desensibilisierungseigenschaften der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren in der Ladung voneinander unterscheiden (Lobitz, 2001, S. 844). Die Tertiär- und Quartärstruktur des gesamten Rezeptorproteins ist für den Zeitverlauf der Desensibilisierung verantwortlich (Eiselé, 1993, S.483). Durch die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit getesteten Rezeptoren veränderten sich die Desensibilisierungsrate sowie die Desensibilisierung.

Da weniger die Amplitude, sondern vielmehr der Flächeninhalt unter der Stromkurve und somit die Ladung die Veränderungen der Desensibilisierungseigenschaften beschreibt, ist der geeignetste Messparameter, die Rezeptoraktivität abzubilden, die Ladung. Daher wurden die verschiedenen Rezeptoren auch anhand der Ladung des Stromverlaufs verglichen.

Die Affinität von 5-HT an der Serotoninbindungsstelle zeigte für Maus und Mensch keinen signifikanten Unterschied. Hinsichtlich der Affinität von Clozapin an der Serotoninbindungsstelle gab es zwischen dem murinen und dem humanen 5-HT<sub>3A</sub>-

---

Rezeptor jedoch signifikante Unterschiede. Unterschiede in der Affinität von Clozapin zur Serotoninbindungsstelle scheinen also in der speziesspezifischen Aminosäuresequenz (und damit in der Rezeptorstruktur) der Rezeptoren begründet zu sein. Um herauszufinden, welche Aminosäuresequenzen bzw. welcher Abschnitt im 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor diese Unterschiede hervorrufen, wurden chimäre Rezeptoren aus humanen und murinen Rezeptoranteilen konstruiert.

## **6.2 Konstruktion der Chimären**

Es wurden fünf chimäre 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (Maus-Mensch) mit unterschiedlichen Schnittstellen konstruiert. Die Schneideenzyme HindIII und XhoI schnitten die cDNA des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors aus dem Plasmid aus. Die Schnittstellen von BstEII und SgrA1 befanden sich in der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Dort befinden sich auch die potentiellen Bindungsstellen der Agonisten und kompetitiven Antagonisten des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors. Die extrazelluläre Domäne ist der pharmakologische Hauptangriffspunkt (Thompson, 2007, S.527). Eine Veränderung der Rezeptorstruktur in diesem Bereich könnte die Bindung von Serotonin und Clozapin beeinflussen.

Im Transmembrankomplex des Rezeptors (Abschnitt **3**) gab es keine Schnittstellen, weil zunächst nur der Einfluß der Rezeptorstruktur in Abschnitt **1** und **2** auf die Affinität von Serotonin und Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor untersucht werden sollte. Die gewonnenen Daten erlauben auch Rückschlüsse, ob Abschnitt **3** bei der Bindung von Serotonin und Clozapin an den Rezeptor eine Modulatorfunktion hat.

## **6.3 Affinität von Clozapin am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor in Abhängigkeit von Serotonin und der 5-HT<sub>3A</sub>- Rezeptorstruktur**

Clozapin ist ein kompetitiver Antagonist am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor (Watling, 1990, S.470). Ein kompetitiver Antagonist wirkt dadurch, dass er mit dem Agonisten um die gemeinsame Bindungsstelle am Rezeptor konkurriert und damit die Agonisten-induzierte Wirkung unterbindet. Der Antagonist selbst aktiviert bei Bindung an den Rezeptor die dem Rezeptor zugeordnete Funktion nicht und hat somit keine intrinsische Aktivität (Hofmann, 2005, S.10).

Aus diesem Grund kann die Affinität von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor, in Abhängigkeit von der Rezeptorstruktur, nur im Zusammenhang mit der Bindung von Serotonin an den Rezeptor beurteilt werden. Die Wirkung von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-

---

Rezeptor kann durch eine Änderung der Aminosäuresequenz des Rezeptors selbst oder durch eine dadurch entstandene Modulation der Bindungsaffinität für Serotonin beeinflusst werden.

Rezeptoren, die keine signifikanten Abweichungen in der Affinität von Serotonin zur Serotoninbindungsstelle zeigten, sich aber hinsichtlich der Potenz von Clozapin zum 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor unterschieden, lassen den Schluß zu, dass bestimmte Aminosäuresequenzen im 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor die Potenz von Clozapin zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor modulieren:

Der Rezeptor **H123** differierte von den Rezeptoren **M123** und **C123**. Die Rezeptoren **M123** und **C123** unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Die Aminosäuresequenzen in Abschnitt **2** scheinen für die unterschiedliche Potenz von Clozapin zur Serotoninbindungsstelle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors verantwortlich zu sein. Enthält der Abschnitt **2** die murine Rezeptorsequenz des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors, dann besitzt Clozapin eine stärkere antagonistische Potenz, als wenn Abschnitt **2** die humane Aminosäuresequenz beinhaltet.

Untermauert wird diese Hypothese, wenn man die tatsächliche Bindungsaffinität von Clozapin an den jeweiligen Rezeptoren mit der Cheng-Prusoff-Gleichung berechnet, welche für kompetitiv wirkende Antagonisten gilt (Cheng, 1973, S.3108).

Rezeptoren, die in Abschnitt **2** die humane Aminosäuresequenz aufwiesen (**C123** und **C123**), zeigten eine vergleichbare Bindungsaffinität von Clozapin am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor ( $K_i$ -Werte: 13,4nM und 5,8nM) wie der humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor ( $K_i$ -Wert: 9,2nM). Bei Rezeptoren mit der murinen Aminosäuresequenz im Abschnitt **2** (**C123**, **C123** und **C123**) hatte Clozapin eine in etwa gleich starke Bindungsaffinität ( $K_i$ -Werte: 0,8nM, 0,3nM und 1,1nM) wie zum murinen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor ( $K_i$ -Wert: 0,9nM). Je kleiner der  $K_i$ -Wert ist, desto stärker bindet der Antagonist an den Rezeptor (Böhm, 1996, S.95). Clozapin bindet somit mit stärkerer Potenz an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren mit der murinen Aminosäuresequenz im Abschnitt **2** als an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren mit der humanen Aminosäuresequenz in Abschnitt **2**.

Aus obigen Ausführungen wird deutlich: Allein die Aminosäuresequenz in Abschnitt **2** scheint die antagonistische Potenz von Clozapin an der Serotoninbindungstelle zu beeinflussen. Die Beobachtungen decken sich mit der Tatsache, dass die extrazelluläre Domäne der pharmakologische Hauptangriffspunkt des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors ist (Thompson, 2007, S.527).

---

## 6.4 Klinische Relevanz

Niesler entdeckte im humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorgen natürlich vorkommende Sequenzvarianten, die bei Gesunden und bei schizophrenen Patienten vorhanden sind. Zusätzlich wurden zwei Mutationen beschrieben, die nur bei erkrankten Personen zu finden sind. Es wird angenommen, dass etwa 1% aller an Schizophrenie erkrankten Patienten Mutationen im 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorgen aufweisen. Die Sequenzvarianten könnten so die Wirksamkeit von antipsychotischen Medikamenten, wie z.B. Clozapin, beeinflussen (Niesler, 2001, S.25f.).

30-60% der Patienten sprechen nicht auf eine Therapie mit typischen Neuroleptika an (Iqbal, 2003, S.33). Für diese Patienten ist Clozapin ein Mittel der Wahl (Reynolds, 2007, S.953, Gutierrez, 2002, S.93). Unter der Therapie mit Clozapin sind regelmäßige Blutbildkontrollen durchzuführen, da es in ca. 1% zu einer Agranulozytose kommen kann (Reynolds, 2007, S.953). Weitere schwere Nebenwirkungen sind Herzstillstand und das Auftreten von zerebralen Krämpfen. Für gewöhnlich kommt es unter der Therapie mit Clozapin zu einer vorübergehenden Sedierung (44%), Hypersalivation (bis zu 80%), Gewichtszunahme, Anstieg der Leberenzyme (2%) und Harninkontinenz (1%). Inwiefern Clozapin durch Antagonisierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors die Nebenwirkungen (mit)bedingt, ist weitgehend unklar. Die sedierende Wirkung von Clozapin jedoch ist in der Antagonisierung von Adrenozeptoren, serotonergen und histaminergen Rezeptoren zu sehen (Kaschka, 2007, S.223).

Der Wirkspiegel von Clozapin im Liquor beträgt 70 - 130nM (Seeman, 1997, S. PL207). In diesem Konzentrationsbereich zeigt Clozapin antipsychotische Wirkung. Da das Ansprechen auf Neuroleptika von Patient zu Patient schwankt, ist eine individuelle Einstellung der Patienten erforderlich (Mutschler, 2008, S.163). Die individuell nötige Dosis eines Patienten kann abhängig sein von der Potenz, mit der Clozapin an der Serotoninbindungsstelle des Rezeptors bindet. Die Potenz wiederum wird wahrscheinlich beeinflusst von der Aminosäurezusammensetzung des Rezeptors.

Bei Clozapingabe kann es deshalb sinnvoll sein, im 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorgen schizophrener Patienten Mutationsanalysen durchzuführen. Patienten, bei denen die Aminosäurenkonstellation eine starke Affinität von Clozapin zum 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor vermuten lässt, sollten dementsprechend eine niedrigere Dosis an Clozapin erhalten. Dadurch würden Nebenwirkungen minimiert werden. Andererseits könnte ein Nichtansprechen auf die Therapie mit Clozapin an einer verminderten Affinität von Clozapin zum 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor liegen.

---

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Affinität von Clozapin zum 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor von der Aminosäuresequenz in Abschnitt 2 beeinflusst wird. Durch natürlich vorkommende Mutationen in diesem Bereich kann es zu einer verminderten oder verstärkten Affinität von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor kommen.

Dass der antipsychotische und anxiolytische Effekt von Clozapin auf die antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor zurückzuführen ist, wird von Squires kritisch betrachtet (Squires, 1999, S.659). Er führt diesen Effekt nicht auf die Blockade von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren zurück, sondern auf die Blockade von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Die Behauptung gründet auf [<sup>35</sup>S]TBPS-Bindungsstudien mit Ondansetron. Die verwendeten Ondansetron-Konzentrationen lagen im µM-Bereich. Diese Konzentrationen werden jedoch beim Menschen nicht in vivo erreicht. Der Wirkspiegel von Ondansetron im Liquor liegt im nM-Bereich (~8,9 – 52,5 nM = 2,6 – 15,4 ng/ml; Simpson, 1992, S.497). Demzufolge scheint die Antagonisierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren für die antipsychotische und anxiolytische Wirkung nicht relevant zu sein.

In Tierversuchen und ersten klinischen Studien konnte eine anxiolytische und antipsychotische Wirkung von selektiv wirkenden 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten gezeigt werden (Greenshaw, 1993, S.266ff., Barnes, 1999, S.1114). Der anxiolytische und antipsychotische Effekt erwies sich jedoch für die Behandlung der Schizophrenie nicht als therapeutisch ausreichend (Greenshaw, 1993, S. 267, Reynolds, 1992, S.120). Eine Monotherapie der Schizophrenie mit selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten scheint unwahrscheinlich, da an der Pathogenese der Schizophrenie viele Neurotransmittersysteme beteiligt sind. Die antagonistische Wirkung der atypischen Neuroleptika an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren kann jedoch zur neuroleptischen Potenz beitragen.

Die Bedeutung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorblockade durch Clozapin für die anxiolytische und antipsychotische Wirkung könnte beurteilt werden, wenn man bei Clozapingabe gleichzeitig einen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten verabreicht. Dieser könnte dann den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-antagonistischen Effekt von Clozapin aufheben und zu einer Änderung der Clozapinwirkung führen: In Mikrodialyse-Studien an lebenden Ratten wurde gezeigt, dass die zentrale Gabe eines 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten die Dopamin-ausschüttung im Nucleus accumbens steigert und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten diesen Effekt aufheben (Jiang, 1990, S.158f., Chen, 1991, S.356). Verbindet man diese

---

Tierexperimente mit verhaltenspharmakologischen Untersuchungen (z.B. black-white two compartment test, social interaction test, hyperlocomotion test, elevated plus maze test), so könnte die Bedeutung der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorblockade durch Clozapin für die antipsychotische und anxiolytische Wirkung festgestellt werden. Eine Clozapingabe sollte bei den Ratten eine Angstreduktion bewirken. Wenn die gleichzeitige Gabe von Clozapin und einem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten keine Angstreduktion bewirkt, könnte dies die Bedeutung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonismus für die antipsychotische und anxiolytische Wirkung von Clozapin untermauern.

Die von den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren erhobenen Daten wurden anhand der Ladung diskutiert, da dieser Messparameter sehr geeignet ist die Rezeptoraktivität abzubilden. Es kristallisierte sich heraus, dass die Aminosäuresequenz in Abschnitt **2** des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors die antagonistische Potenz von Clozapin an der Serotoninbindungstelle beeinflusst. Im humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorgen von Gesunden und schizophrenen Patienten sind natürlich vorkommende Sequenzvarianten bekannt. Dadurch kann es zu Unterschieden kommen hinsichtlich der Potenz, mit der Clozapin an den Rezeptor bindet, und damit auch zu individuell unterschiedlichen Wirkungen und Nebenwirkungen von Clozapin. Sequenzanalysen im 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorgen vor Therapieeinleitung mit Clozapin könnten die individuelle Dosisfindung für den Patienten erleichtern und somit die Therapie effektiver gestalten. Die Erforschung der Bedeutung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors für die antipsychotische und anxiolytische Wirkung von atypischen Neuroleptika ist wichtig für deren Weiterentwicklung. Tierexperimentelle Verhaltensversuche, gekoppelt mit pharmakologischen Experimenten, könnten weiter Aufschluss geben über die Rolle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors in der Schizophrenietherapie.



---

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Clozapin ist ein potenter Antagonist u.a. am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor und wird erfolgreich als atypisches Neuroleptikum in der Schizophrenietherapie eingesetzt. Bei der Schizophrenie wird neben einer Änderung der GABAergen, glutamatergen, cholinergen und serotonergen Erregungsübertragung vor allem eine Störung des dopaminergen Systems angenommen. Da der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor die mesolimbische und mesokortikale dopaminerge Aktivität moduliert, könnte er eine Bedeutung bei psychotischen Störungen aufweisen. Die Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren beeinflusst aber nicht nur das dopaminerge System, sondern auch weitere Neurotransmittersysteme, die ebenfalls an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt sind. In Tierversuchen und ersten klinischen Studien konnte für selektive 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten eine anxiolytische und antipsychotische Wirkung nachgewiesen werden.

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal und unterscheidet sich von allen anderen 5-HT-Rezeptoren, welche metabotrope Rezeptoren sind. Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor gliedert sich in einen extrazellulären, transmembranären und intrazellulären Abschnitt. Charakteristische Eigenschaft des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors ist seine schnelle Aktivierung bei Transmitterbindung (innerhalb von 35ms) und seine rasche Desensibilisierung. (Im Vergleich zu anderen ionotropen Rezeptoren wie dem AMPA-Rezeptor erfolgt die Aktivierung jedoch langsam.)

Bei Aktivierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors kommt es v.a. zum Einstrom von Na<sup>+</sup>-Ionen und Ausstrom von K<sup>+</sup>-Ionen. Mit der *Patch-Clamp*-Technik kann man diese Ionenströme messen.

Da Clozapin kompetitiv-antagonistisch am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wirkt, selbst aber keine intrinsische Aktivität besitzt, bedarf es einer vorherigen Aktivierung des Rezeptors durch Serotonin, um einen Effekt von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor sehen zu können. Es wurden daher Messreihen mit Serotonin und Clozapin durchgeführt.

Humane und murine 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren zeigten in Voruntersuchungen verschiedene Affinität von Clozapin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor. Um die unterschiedliche Reagibilität auf Clozapin zwischen beiden Spezies in Abhängigkeit von der Rezeptorstruktur (Aminosäuresequenz) zu untersuchen, wurden fünf chimäre 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren

---

konstruiert, die unterschiedliche Sequenzen sowohl des murinen als auch des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors beinhalteten.

Es konnte gezeigt werden, dass Aminosäuresequenzen im extrazellulären Abschnitt (Abschnitt **2**) des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors die antagonistische Potenz von Clozapin an der Serotoninbindestelle des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors beeinflussen. Diese Beobachtungen decken sich mit der Tatsache, dass die extrazelluläre Domäne des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors der pharmakologische Hauptangriffspunkt ist. Durch natürlich vorkommende Mutationen im Abschnitt **2** kann es zu einer verminderten oder verstärkten Affinität von Clozapin zum 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor kommen. Dadurch könnten die durch Clozapin vermittelten Wirkungen und Nebenwirkungen entweder abgeschwächt oder verstärkt werden. Bei Clozapingabe kann es deshalb sinnvoll sein, im 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorgen schizophrener Patienten Mutationsanalysen durchzuführen, um ein Ansprechen auf die Therapie zu verbessern.

---

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Barnes, N.M., Sharp, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38 (1999), 1083-1152
- Barrera, N.P., Herbert, P., Henderson, R.M., Martin, I.L., Edwardson, J.M. Atomic force microscopy reveals the stoichiometry and subunit arrangement of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102 (2005), 12595-12600
- 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 3A<sub>S</sub> receptor subunit. *Mol.Pharmacol.* 48 (1995), 1054-1062
- Böhm, H.-J., Klebe, G., Kubinyi, H. "Wirkstoffdesign", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996
- Brüss, M., Barann, M., Hayer-Zillgen, M., Eucker, T., Gothert, M., Bonisch, H. Modified 5-HT<sub>3A</sub> receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT<sub>3A</sub> receptor isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 362 (2000a), 392-401
- Brüss, M., Eucker, T., Gothert, M., Bonisch, H. Exon-intron organization of the human 5-HT<sub>3A</sub> receptor gene. *Neuropharmacology* 39 (2000b), 308-315
- Carlsson, A. Antipsychotic drugs, neurotransmitters and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 135 (1978), 165-173
- Chameau, P., van Hooft, J.A. Serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 326 (2006), 573-581
- Chen, Q.X., Stelzer, A., Kay, A.R., Wong, R.K. GABAA receptor function is regulated by phosphorylation in acutely dissociated guinea-pig hippocampal neurones. *J.Physiol* 420 (1990), 207-221
- Chen, J., Van Praag, H.M., Garnder, E.L. Activation of 5-HT<sub>3</sub> receptor by 1-phenylbiguanide increases dopamine release in the rat nucleus accumbens. *BrainRes.* 543 (1991), 354-357
- Cheng, Y.-C., Prusoff, W.H. Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973), 3099-3108
- Davies, P.A., Pistis, M., Hanna, M.C., Peters, J.A., Lambert, J.J., Hales, T.G., Kirkness, E.F. The 5-HT<sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397 (1999), 359-363
- Derkach, V., Surprenant, A., North, R.A. 5-HT<sub>3</sub> receptors are membrane ion channels. *Nature* 339 (1989), 706-709
- Deutch, A.Y., Roth R.H. Neurotransmitters. In: "Fundamental Neuroscience", Squire L.R., Bloom F.E., McConnell S.K., Roberts J.L., Spitzer N.C., Zigmond M.J., Academic Press, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2003, 2. Auflage, 163-196

---

Eiselé, J.-L., Bertrand, S., Galzi, J.-L., Devillers-Thiery, A., Bertrand, D. Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366 (1993), 479-483

Faerber, L., Drechsler, S., Ladenburger, S., Gschaidmeier, H., Fischer, W. The neuronal 5-HT<sub>3</sub> receptor network after 20 years of research - evolving concepts in management of pain and inflammation. *Eur.J.Pharmacol.* 560 (2007), 1-8

Gleixner, C., Müller, M., Wirth, S. "Neurologie und Psychiatrie", Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach, 2004/05, 4. Auflage

Grant, K.A. The role of 5-HT<sub>3</sub> receptors in drug dependence. *Drug Alcohol Depend.* 38 (1995), 155-171

Greenshaw, A.J. Behavioural pharmacology of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists: a critical update on therapeutic potential. *Trends Pharmacol.Sci.* 14 (1993), 265-270

Gutierrez, B., Arranz, M.J., Huezco-Diaz, P., Dempster, D., Matthiasson, P., Travis, M., Munro, J., Osborne, S., Kerwin, R.W. Novel mutations in 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>3B</sub> receptor genes not associated with clozapine response. *Schizophr.Res.* 58 (2002), 93-97

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. Improved *Patch-Clamp* techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391 (1981), 85-100

Hapfelmeier, G., Tredt, C., Haseneder, R., Zieglgansberger, W., Eisensamer, B., Rupprecht, R., Rammes, G. Co-expression of the 5-HT<sub>3B</sub> serotonin receptor subunit alters the biophysics of the 5-HT<sub>3</sub> receptor. *Biophys.J.* 84 (2003), 1720-1733

Hermann, B., Wetzel, C.H., Pestel, E., Zieglgansberger, W., Holsboer, F., Rupprecht, R. Functional antagonistic properties of clozapine at the 5-HT<sub>3</sub> receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 225 (1996), 957-960

Hofmann, F. Wirkungen von Pharmaka auf den Organismus: allgemeine Pharmakodynamik. In: "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie", Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. (Hrsg.), Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2005, 9. Auflage, 5-25

Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 71 (2002), 533-554

Iqbal, M.M., Rahman, A., Husain, Z., Mahmud, S.Z., Ryan, W.G., Feldman, J.M. Clozapine: A clinical review of adverse effects and management. *Ann.Clin.Psychiatry* 15 (2003), 33-48

Jackson, M.B., Yakel, J.L. The 5-HT<sub>3</sub> receptor channel. *Annu.Rev.Physiol* 57 (1995), 447-468

Jones, M.V., Westbrook, G.L. The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 19 (1996), 96-101

- 
- Jiang, L.H., Ashby, C.R., Kasser, R.J., Wang, R.Y. The effect of intraventricular administration of the 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist 2-methylserotonin on the release of dopamine in the nucleus accumbens: an in vivo chronocoulometric study. *BrainRes.* 513 (1990), 156-160
- Kaschka, W.P., Kretzschmar, R., Krieglstein, J., Rudolph, U. Sedativa, Hypnotika und Psychopharmaka. In: "Pharmakologie und Toxikologie", Estler, C.-J., Schmidt, H. (Hrsg.), Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 2007, 6. Auflage, 199-296
- Kasper, S., Neuroleptika/Antipsychotika. In: "Psychiatrie compact", Kasper, S., Volz, H.-P. (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2003, 1. Auflage, 301-314
- Kuras, A., Baginskas, A., Batuleviciene, V. Non-NMDA and NMDA receptors are involved in suprathreshold excitation of network of frog tectal neurons by a single retinal ganglion cell. *Neurosci.Res.* 54 (2006), 328-337
- Lankiewicz, S., Lobitz, N., Wetzel, C.H., Rupprecht, R., Gisselmann, G., Hatt, H. Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor cDNA and its splice variants from guinea pig. *Mol.Pharmacol.* 53 (1998), 202-212
- Laux, G., Dietmaier, O., "Praktische Psychopharmakotherapie", Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2006, 5.Auflage
- Lobitz, N., Gisselmann, G., Hatt, H., Wetzel, C.H. A single amino-acid in the TM1 domain is an important determinant of the desensitization kinetics of recombinant human and guinea pig alpha-homomeric 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *Mol.Pharmacol.* 59 (2001), 844-851
- Lüllmann, H., Mohr, K. "Pharmakologie und Toxikologie", Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999, 14. Auflage
- Lummis, S.C., Beene, D.L., Lee, L.W., Lester, H.A., Broadhurst, R.W., Dougherty, D.A. Cis-trans isomerization at a proline opens the pore of a neurotransmitter-gated ion channel. *Nature* 438 (2005), 248-252
- Malone, H.M., Peters, J.A., Lambert, J.J. Physiological and pharmacological properties of 5-HT<sub>3</sub> receptors - a patch clamp-study. *Neuropeptides* 19 Suppl (1991), 25-30
- Maricq, A.V., Peterson, A.S., Brake, A.J., Myers, R.M., Julius, D. Primary structure and functional expression of the 5HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254 (1991), 432-437
- Miquel, M.C., Emerit, M.B., Gingrich, J.A., Nosjean, A., Hamon, M., el, M.S. Developmental changes in the differential expression of two serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor splice variants in the rat. *J.Neurochem.* 65 (1995), 475-483
- Miyake, A., Mochizuki, S., Takemoto, Y., Akuzawa, S. Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor: heterogeneity in distribution and function among species. *Mol.Pharmacol.* 48 (1995), 407-416

- 
- Möller, H.-J. Schizophrenie. In: "Psychiatrie und Psychotherapie", Möller, H.-J., Laux, G., Deister, A. (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart, 2005, 3. Auflage, 134-161
- Möller, H.-J., Deister, A., Schaub, A., Riedel, M. Schizophrene Psychosen. In: "Psychiatrie und Psychotherapie", Möller, H.-J., Laux, G., Kapfhammer, H.-P. (Hrsg.), Springer Verlag, Heidelberg, 2008, 3. Auflage, Band 2, 253-356
- Morales, M., McCollum, N., Kirkness, E.F. 5-HT<sub>3</sub>-receptor subunits A and B are co-expressed in neurons of the dorsal root ganglion. J.Comp Neurol. 438 (2001), 163-172
- Müller, W.-E., Eckert, A. Psychopharmakotherapie-Pharmakologische Grundlagen. In: "Psychiatrie und Psychotherapie", Möller, H.-J., Laux, G., Kapfhammer, H.-P. (Hrsg.), Springer Verlag, Heidelberg, 2008, 3. Auflage, Band 1, 583-623
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. "Arzneimittelwirkungen", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2008, 9. Auflage
- Niesler, B., Walstab, J., Combrink, S., Moller, D., Kapeller, J., Rietdorf, J., Bonisch, H., Gothert, M., Rappold, G., Bruss, M. Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub>, and 5-HT<sub>3E</sub>. Mol.Pharmacol. 72 (2007), 8-17
- Niesler, B., Weiss, B., Fischer, C., Nothen, M.M., Propping, P., Bondy, B., Rietschel, M., Maier, W., Albus, M., Franzek, E., Rappold, G.A. Serotonin receptor gene HTR<sub>3A</sub> variants in schizophrenic and bipolar affective patients. Pharmacogenetics 11 (2001), 21-27
- Numberger, M., Draguhn, A. "Patch-Clamp-Technik", Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996
- Oehler, K.-U., (2008), Neuroleptika, [http://www.dr-oehler.de/FG\\_Psychiatrie.htm](http://www.dr-oehler.de/FG_Psychiatrie.htm), Stand: 15.06.2008
- Porzig, H., Engelhardt, S. Pharmaka mit Wirkung auf das vegetative Nervensystem. In: "Pharmakologie und Toxikologie", Estler, C.-J., Schmidt, H. (Hrsg.), Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 2007, 6. Auflage, 89-162
- Rammes, G., Eisensamer, B., Ferrari, U., Shapa, M., Gimpl, G., Gilling, K., Parsons, C., Riering, K., Hapfelmeier, G., Bondy, B., Zieglgansberger, W., Holsboer, F., Rupprecht, R. Antipsychotic drugs antagonize human serotonin type 3 receptor currents in a noncompetitive manner. Mol.Psychiatry 9 (2004), 846-858
- Remschmidt, H., Henninghausen, K., Clement, H.-W., Heiser, P., Schulz, E. Atypical neuroleptics in child and adolescent psychiatry. Eur.ChildAdolesc.Psychiatry 9 Suppl 11 (2000), I 9-19
- Rex, A., Bert, B., Fink, H. History and new developments. The pharmacology of 5-HT<sub>3</sub> antagonists. Pharm.Unserer Zeit 36 (2007), 342-353
- Reynolds, G.P. Developments in the drug treatment of schizophrenia. Trends Pharmacol.Sci. 13 (1992), 116-121

- 
- Reynolds, G.P. The impact of pharmacogenetics on the development and use of antipsychotic drugs. *Drug Discov.Today* 12 (2007), 953-959
- Schröder, J., Weisbrod, M. Schizophrene Psychosen. In "Lehrbuch der Psychiatrie und Psychotherapie", Rupprecht, R., Hampel, H.H. (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2006, 349-390
- Seeman, P., Kapur, S. Clozapine occupies high levels of dopamine D2 receptors. *Life Sci.* 60 (1997), PL207-216
- Simpson, K.H., Murphy, P., Colthup, P.V., Whelan, P. Concentration of ondansetron in cerebrospinal fluid following oral dosing in volunteers. *Psychopharmacol.* 109 (1992), 497-498
- Sorensen, S.M., Humphreys, T.M., Palfreyman, M.G. Effect of acute and chronic MDL 73,147EF, a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, on A9 and A 10 dopamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 163 (1989), 115-118
- Squires, R.F., Saederup, E. Clozapine's antipsychotic effects do not depend on blockade of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Neurochem.Res.* 24 (1999), 659-667
- Szegedi, A., Anghelescu, I.-G., Prinzipien der psychiatrischen Therapie. In "Lehrbuch der Psychiatrie und Psychotherapie", Rupprecht, R., Hampel, H.H. (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2006, 69-105
- Tebbe, J.J. Serotonin und Serotoninrezeptoren. *Deutsches Ärzteblatt* 101 (2004), A936-942
- Thompson, A.J., Lummis, S.C. 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Curr.Pharm.Des* 12 (2006a), 3615-3630
- Thompson, A.J., Sullivan, N.L., Lummis, S.C. Characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptor mutations identified in schizophrenic patients. *J.Mol.Neurosci.* 30 (2006b), 273-281
- Tredt, C.J. Die Kinetik des heteromeren 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors: Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik und Computersimulation. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität zu München (2004)
- van Hooft, J.A., Vijverberg, H.P. Phosphorylation controls conductance of 5-HT<sub>3</sub> receptor ligand-gated ion channels. *Receptors.Channels* 3 (1995), 7-12
- van Hooft, J.A., Vijverberg, H.P. 5-HT<sub>3</sub> receptors and neurotransmitter release in the CNS: a nerve ending story? *Trends Neurosci.* 23 (2000), 605-610
- Watling, K.J., Beer, M.S., Stanton, J.A., Newberry, N.R., Interaction of the atypical neuroleptic clozapine with 5-HT<sub>3</sub> receptors in the cerebral cortex and superior cervical ganglion of the rat. *European J. Pharmacol.* 182 (1990), 465-472
- Werner, P., Kawashima, E., Reid, J., Hussy, N., Lundstrom, K., Buell, G., Humbert, Y., Jones, K.A. Organization of the mouse 5-HT<sub>3</sub> receptor gene and functional expression of two splice variants. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 26 (1994), 233-241

---

Whitaker-Azmitia, P.M. The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 21 (1999), 2S-8S

Widschwendter, C.G., Fleischhacker, W.W. Pathophysiology of schizophrenia and its impact on pharmacotherapy. *Fortschr.Neurol.Psychiatr.* 73 Suppl 1 (2005), S32-S37

Zettl, H., Schubert-Zsilavecz, M., Siebert, C.D. From cocaine to innovative antiemetics. The medicinal chemistry of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. *Pharm.Unserer Zeit* 36 (2007), 354-361



---

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Wichtige dopaminerge Bahnsysteme des ZNS.....	3
Abb. 2: Clozapin (Dibenzazepin-Derivat) .....	6
Abb. 3: Kompetitiv-antagonistische Wirkung von Clozapin am 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor.....	7
Abb. 4: Modell des 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptors mit den fünf Untereinheiten .....	9
Abb. 5: Aufsicht auf den Ionenkanal des 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors .....	9
Abb. 6: Untereinheit des 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptors .....	10
Abb. 7: 5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor (Na <sup>+</sup> -Einstrom und K <sup>+</sup> - Ausstrom).....	11
Abb. 8: Prä- und postsynaptisch lokalisierte 5-HT-Rezeptoren .....	12
Abb. 9: Aminosäuresequenz des humanen und murinen 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors .....	14
Abb. 10: Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) .....	14
Abb. 11: Serotoninbiosynthese und -abbau .....	15
Abb. 12: 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptoren der Maus, des Menschen und der Chimären .....	25
Abb. 13: Herstellung der chimären 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptoren .....	26
Abb. 14: Rezeptoren BS1,2 und SX5 .....	27
Abb. 15: Verschiedene Zell-Konfigurationen .....	28
Abb. 16: Darstellung der <i>Whole-Cell</i> -Konfiguration .....	29
Abb. 17: Herstellung der <i>Whole-Cell</i> -Konfiguration .....	29
Abb. 18: Applikationssystem mit dem Thetaglas.....	31
Abb. 19: Applikationssystem von oben gesehen.....	31
Abb. 20: <i>Setup</i> -Übersicht.....	33
Abb. 21: Vergrößerte Darstellung des <i>Setups</i> .....	33
Abb. 22: Stromkurven des chimären Rezeptors <b>C123</b> .....	34
Abb. 23: <i>Rundown</i> -Effekt der Zelle .....	35
Abb. 24: Applikationsmodus für die Clozapinmessreihe .....	36
Abb. 25: Typische Stromantwort einer 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor exprimierenden HEK Zelle..	40
Abb. 26: Speziesspezifische Unterschiede in der Ladung bei gleicher Amplitude.....	41
Abb. 27: Amplitude und Ladung des murinen und humanen 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors .....	42
Abb. 28: Die Zeitkonstanten $\tau_{des1}$ und $\tau_{des2}$ der Rezeptordesensibilisierung. ....	43
Abb. 29: <i>Plateau</i> -Strom des murinen und des humanen 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptors .....	44
Abb. 30: Mehrfache Applikationen von 10 $\mu$ M 5-HT (norm.Amplitude) .....	45
Abb. 31: Abnahme der Amplitude nach mehrmaliger Applikation von 5-HT.....	46

---

Abb. 32: Mehrfache Applikationen von 10 $\mu$ M 5-HT (norm.Ladung) .....	47
Abb. 33: Abnahme der Ladung nach mehrmaliger Applikation von 5-HT.....	47
Abb. 34: Abnahme von $\tau_{des1}$ und $\tau_{des2}$ bei multipler Aktivierung der Rezeptoren....	49
Abb. 35: <i>Plateau</i> -Strom der jeweiligen Rezeptoren.....	50
Abb. 36: Wirkung verschiedenener 5-HT Konz. auf den chimären Rezeptor C123.....	50
Abb. 37: Serotonin Dosis-Wirkungs-Kurven der 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptoren (norm.Ampl.)....	52
Abb. 38: Serotonin Dosis-Wirkungs-Kurven der 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptoren (norm.Ladung) .	54
Abb. 39: Wirkung verschiedener Clozapinkonz. auf den chimären Rezeptor C123.....	55
Abb. 40: Clozapin Dosis-Wirkungs-Kurven der 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptoren (norm.Ampl.).....	56
Abb. 41: Clozapin Dosis-Wirkungs-Kurven der 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptoren (norm.Ladung)...	58

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Lokalisation und Funktion dopaminerger Neuronen im ZNS .....	4
Tab. 2: Klassifizierung der Serotoninrezeptoren .....	8
Tab. 3: Multiple Aktivierung der Serotoninrezeptoren (Amplitude) .....	46
Tab. 4: Multiple Aktivierung der Serotoninrezeptoren (Ladung).....	48
Tab. 5: EC <sub>50</sub> -Werte des murinen und humanen 5-HT <sub>3A</sub> - Rezeptors.....	51
Tab. 6: EC <sub>50</sub> -Werte der Amplitude mit Standardfehlern .....	52
Tab. 7: Serotonin-Amplitude .....	53
Tab. 8: EC <sub>50</sub> -Werte der Ladung mit Standardfehlern .....	53
Tab. 9: Serotonin-Ladung .....	54
Tab. 10: IC <sub>50</sub> -Werte des murinen und humanen 5-HT <sub>3A</sub> - Rezeptors .....	55
Tab. 11: IC <sub>50</sub> -Werte der Amplitude mit Standardfehlern .....	56
Tab. 12: Clozapin-Amplitude .....	57
Tab. 13: IC <sub>50</sub> -Werte der Ladung mit Standardfehlern .....	57
Tab. 14: Clozapin-Ladung .....	58
Tab. 15: Cheng-Prusoff-Gleichung.....	59

---

## 10 Lebenslauf

### Christine Hosp

Geburtsdatum, und -ort

19.07.1980 in München

#### Schulbildung

1987-1991

Volksschule Farinellstraße, München

1991-2000

Städtisches Luisengymnasium, München

#### Studium

##### Vorklinik

2000 –2002

Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

##### Klinik

2002- 2007

Klinischer Abschnitt an der Technischen Universität München

18. Mai 2007

Approbation als Ärztin

#### Famulaturen

Februar - März 2003

Unfallchirurgie, Schwabinger Krankenhaus, München

September - Oktober 2003

Dermatologie, Klinikum rechts der Isar, München

März - April 2004

Klinische Chemie, Klinikum rechts der Isar, München

Juli - August 2004

Thoraxchirurgie, Klinikum rechts der Isar, München

#### Praktisches Jahr

24. April- 11. August 2006

Dermatologie, Klinikum rechts der Isar, München

14. August - 1. Dezember 2006

Innere Medizin, Cornell Weill Medical College, New York/USA

4. Dezember - 23. März 2006/7

Chirurgie, Krankenhaus Bogenhausen, München

#### Forschung

November 2005-April 2008

experimentelle Doktorarbeit in der Abteilung für klinische Neuropharmakologie am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

Betreuer: Prof. Dr. G. Rammes (Klinik für Anaesthesiologie des Klinikums rechts der Isar, München)

#### Beruf

seit Mai 2008

Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Würzburg

---

## 11 Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. rer. nat. G. Rammes, der mir das Thema bereitstellte und durch wertvolle fachliche Anregungen und Diskussionen meine Arbeit bereicherte und mir motivierende Unterstützung und viele Hilfestellungen gab.

Herrn Prof. Dr. med. R. Rupprecht für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für wertvolle Ratschläge sowie für die Durchsicht dieser Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. B. Eisensamer für die Konstruktion und Überlassung der chimären 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und die fachliche Unterstützung in molekularbiologischen Fragen.

Herrn Dr. rer. nat. A. Yassouridis für die wertvolle Hilfestellung bei der statistischen Datenanalyse.

Herrn Prof. Dr. med. W. Zieglgänsberger für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und des Messarbeitsplatzes.

Frau C. Hilf, Frau C. Rewerts und Frau E.-M. Wagner für die technische Assistenz.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern benachbarter Arbeitsgruppen für anregende Gespräche und die gute Zusammenarbeit.