Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie

Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. M. Georgieff

Untersuchungen zur Hemmwirkung von Diphenhydramin an NMDA-Rezeptoren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Kathrin Zeller
Ellwangen
2012

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. O. Adolph
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. S. Grissmer
Tag der Promotion:	15.11.2013

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **I**

Abkürzungsverzeichnis **III**

1. Einleitung **1**

1.1 Ionotrope Glutamat-Rezeptoren 1

1.2 Der NMDA-Rezeptor 3

1.2.1 Aufbau 3

1.2.2 Physiologische Bedeutung 6

1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung 8

1.2.4 Antagonisten 9

1.3 Diphenhydramin 10

1.3.1 Wirkmechanismus 10

1.3.2 Anwendungsbereiche 10

1.3.3 Nebenwirkungen 11

1.4 Zielsetzung 11

2. Material und Methoden **13**

2.1 Zellkultur 13

2.1.1 Materialien 13

2.1.2 Kultivierung der TsA-Zellen 14

2.1.3 Transfektion 15

2.2 Patch-Clamp Messungen 16

2.2.1 Materialien 18

2.2.2 Vorbereitung der Substanzen 20

2.2.3 Herstellung der Patch-Pipetten 20

2.2.4 Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration 21

2.2.5 Substanzapplikation 22

2.2.6 Praktische Durchführung 25

2.3 Auswertung der Daten 25

2.4 Statistische Analyse 28

3. Ergebnisse **29**
3.1 NMDA Signale 29
3.1.1 Konzentrationswirkungskurve für NMDA 30
3.2 Hemmwirkung von Diphenhydramin 33
3.2.1 Eigenwirkung 33
3.2.2 Beispielmessung 34
3.2.3 Konzentrationswirkungskurven bei GluN2A und GluN2B 35
3.2.4 Hemmwirkung bei GluN2C und GluN2D 36
3.3 Einfluss der NMDA-Konzentration 41
3.4 Einfluss der Glycinkonzentration 43
3.5 Einfluss der Rezeptoraktivierung 46
3.6 Bestimmung der Zeitkonstanten τ_{on} und τ_{off} 51
3.7 Einfluss des Membranpotentials 55
3.8 Interaktion mit der Magnesium-Bindungsstelle 60
3.9 Hemmwirkung bei AMPA- und Kainat-Rezeptoren 62

4. Diskussion **65**
4.1 Allgemeine Parameter 65
4.2 Wirkmechanismus 67
4.3 Interaktion mit der Magnesium-Bindungsstelle 70
4.4 Kinetische Parameter 71
4.5 Bewertung des Blockmechanismus 72
4.6 Klinische Relevanz 73

5. Zusammenfassung **75**

6. Literaturverzeichnis **77**

Danksagung **87**

Lebenslauf **88**

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
[A]	Konzentration des Agonisten
Abb.	Abbildung
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
[B]	Konzentration des Blockers
$CaCl_2$	Calciumchlorid
D	Diphenhydramin
[D]	Diphenhydraminkonzentration
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
δ-Wert	Teil des transmembranären elektrischen Feldes, den der Blocker passiert hat um an seine Bindungsstelle zu gelangen
EC_{50}	halbmaximal effektive Konzentration
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
exp	exponentiell
EZ	Extrazellularlösung
F	Faraday Konstante
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GΩ	Gigaohm
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
I	Strom
I_B	Strom in Anwesenheit des Blockers
IC_{50}	halbmaximal wirksame Hemmkonzentration
I_D	Plateaustromamplitude der Diphenhydraminapplikation
I_K	Kontrollstrom
I_{KV}	Plateaustromamplitude der Kontrolle direkt vor der Diphenhydraminapplikation
I_{KN}	Plateaustromamplitude der Kontrolle direkt nach der Diphenhydraminapplikation
I_{max}	maximal gemessener Strom
I_P	Pipettenstrom (Klemmstrom)

I_{rel}	relativer Reststrom
IZ	Intrazellularlösung
KCl	Kaliumchlorid
K_D	Dissoziationskonstante
K-Gluconat	Kaliumgluconat
KOH	Kaliumhydroxid
k_{off}	Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion
k_{on}	Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion
$K_{(0)}$	Dissoziationskonstante für den Antagonisten bei 0 mV
K_V	Kontrollsignal vor Diphenhydraminapplikation
K_N	Kontrollsignal nach Diphenhydraminapplikation
ln	natürlicher Logarithmus
M	mol/l
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MΩ	Megaohm
MK-801	(+)-5-Methyl-10,11-Dihydro-5H-Dibenzo (a,d) Cyclohepten-5,10-Imin
MTSEA	2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid
n	Anzahl der gemessenen Zellen pro Konzentration
n	Hill-Koeffizient
nA	Nanoampère
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OPA	Operationsverstärker
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
p-Wert	Signifikanzwert, Irrtumswahrscheinlichkeit
R	Rückkopplungswiderstand
R	Gaskonstante
T	absolute Temperatur
τ	Tau
τ_{off}	off-Zeitkonstante
τ_{on}	on-Zeitkonstante

u	Anteil des potentialunabhängigen Blocks
V	Volt
V	Membranpotential
V^e	Potentialdifferenz, die eine e-fache Änderung des Blocks ergibt
V_H	Haltepotential
V_P	Pipettenpotential
V_V	Spannung am Ausgang des Opreationsverstärkers
z	Ladung
Zn^{2+}	Zinkion

1. Einleitung

Der Informationsaustausch innerhalb eines vielzelligen Organismus erfolgt über verschiedene Mechanismen. Eine wichtige Rolle dabei spielen u.a. Ionenkanäle. Hierbei handelt es sich um Membranproteine, die die Zellmembran durchdringen und eine zentrale Pore bzw. Kanal ausbilden. Befindet sich ein Ionenkanal im offenen Zustand, können Ionen die für sie ansonsten undurchlässige Zellmembran durchqueren. Abhängig davon wie das Öffnen eines Ionenkanals gesteuert wird, werden die Ionenkanäle in weitere Klassen unterteilt. Bei den potentialgesteuerten Ionenkanälen erfolgt die Öffnung des Ionenkanals bei Änderungen des Membranpotentials. Bei einem ligandengesteuerten Ionenkanal hingegen erfolgt dies nach Bindung eines für den jeweiligen Ionenkanal spezifischen Liganden. Fehlfunktionen innerhalb solcher Rezeptoren können zu einer ständigen Überaktivierung oder auch Unteraktivierung von Rezeptoren führen. Die dadurch bedingte übergesteigerte oder mangelnde Informationsweiterleitung kann Ursache vieler Erkrankungen sein. Gerade im Bereich des zentralen Nervensystems scheint dieser Sachverhalt eine tragende Rolle zu spielen. Vor allem Fehlfunktionen von NMDA-Rezeptoren, welche eine große Bedeutung im Bereich des Lernens und des Gedächtnis haben, scheinen bei der Entstehung neurologischer Erkrankungen sehr wichtig zu sein (Kalia et al. 2008). Mögliche Therapieansätze dieser Erkrankungen sind daher mitunter solche, welche den NMDA-Rezeptor als Ziel einer medikamentösen Therapie haben. So kann z.B. eine Überfunktion des NMDA-Rezeptors mittels NMDA-Rezeptor-Antagonisten, die den NMDA-Kanal blockieren, therapiert werden (Krystal et al. 2003).

1.1 Ionotrope Glutamat-Rezeptoren

Schnelle exzitatorische Erregungsübertragung im zentralen Nervensystem findet hauptsächlich über Glutamat-Rezeptoren statt. Diese werden weiter in metabotrope und ionotrope Glutamat-Rezeptoren unterteilt. Metabotrope Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren, über die weitere Second-Messenger-Kaskaden aktiviert werden. Ionotrope Rezeptoren sind Liganden-gesteuerte-Rezeptoren, die

einen Ionenkanal beinhalten. Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren werden anhand ihrer jeweils spezifischen Liganden in weitere vier Subtypen unterteilt (Gielen 2010). Man unterscheidet, wie in Abbildung 1 dargestellt, AMPA (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propion-säure)-Rezeptoren, NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren, Kainat-Rezeptoren und δ-Rezeptoren (Collingridge et al. 2009, Traynelis et al. 2010). Ionotrope Glutamat-Rezeptoren befinden sich im Gehirn in synaptischen Bahnen, die sehr häufig verwendet werden und somit stets depolarisiert und aktiviert werden. Sie unterliegen daher einer ständigen synaptischen Plastizität und scheinen vor allem im Bereich des Lernens, des Gedächtnis und der Schmerzvermittlung notwendig zu sein. Ebenso sollen diese Rezeptoren eine wichtige Rolle bei vielen neurologischen Erkrankungen haben (Bliss and Collingridge 1993, Woolf and Salter 2000, Olney 2003).

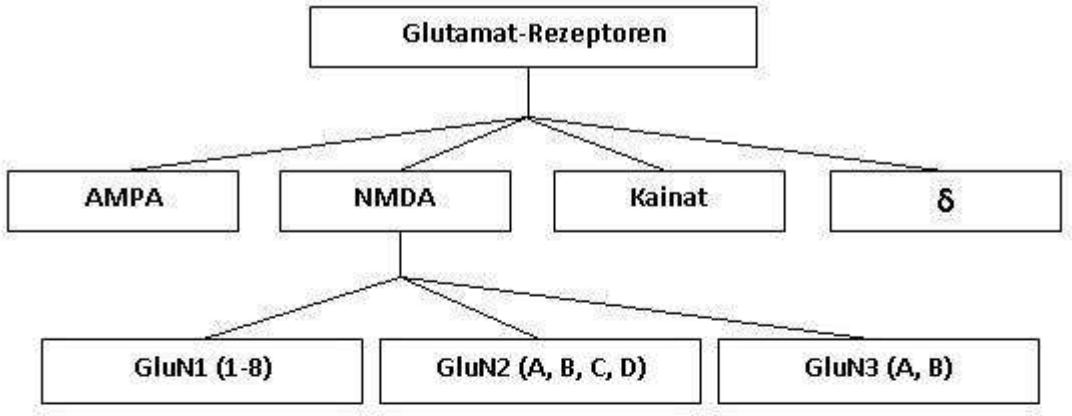

Abb. 1: Einteilung der Glutamat-Rezeptoren. Die Glutamat-Rezeptoren werden in AMPA (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure)-Rezeptoren, NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren, Kainat-Rezeptoren und δ-Rezeptoren unterteilt. Die NMDA-Rezeptoren werden aus drei Untereinheiten gebildet, bei denen wiederum mehrere Subtypen (GluN1 (1-8), GluN2 (A-D), GluN3 (A-B)) bekannt sind.

1.2 Der NMDA-Rezeptor

1.2.1 Aufbau

NMDA-Rezeptoren sind heteromere Rezeptoren, die aus vier Untereinheiten aufgebaut sind. Diese Untereinheiten können in drei Gruppen eingeteilt werden: GluN1, GluN2 und GluN3 (Abb. 1). Jede dieser Untereinheiten besitzt wiederum weitere Subtypen (Traynelis et al. 2010, Flores-Soto et al. 2012). Es sind bei GluN1 acht verschiedene Splice-Varianten (1-8), bei GluN2 vier Subtypen (A, B, C, und D) und bei GluN3 zwei Subtypen (A und B) bekannt (Loftis et al. 2003). Je nach Kombination der Subtypen entstehen unterschiedliche Rezeptoren. Funktionelle NMDA-Rezeptoren sind aus zwei GluN1-Untereinheiten und aus entweder zwei GluN2-Untereinheiten, aus zwei GluN3-Untereinheiten oder aus einer Kombination aus GluN2- und GluN3-Untereinheiten aufgebaut (Abb. 2) (Ulbrich and Isacoff 2008). Die meisten Rezeptoren coexprimieren allerdings zwei GluN1- und zwei GluN2-Untereinheiten. Rezeptoren, die nur aus GluN1- oder nur aus GluN2- oder nur aus GluN3-Untereinheiten bestehen, sind nicht funktionstüchtig (Dingledine et al. 1999, Noh et al. 2009, Yao and Mayer 2006). Zahlreiche Studien unterstützen die Theorie, dass in mehreren Regionen des ZNS triheteromere Rezeptoren vorkommen, bei denen die GluN1-Untereinheit mit zwei verschiedenen GluN2-Untereinheiten kombiniert ist (Jones and Gibb 2005, Lu et al. 2006, Brothwell et al. 2008).

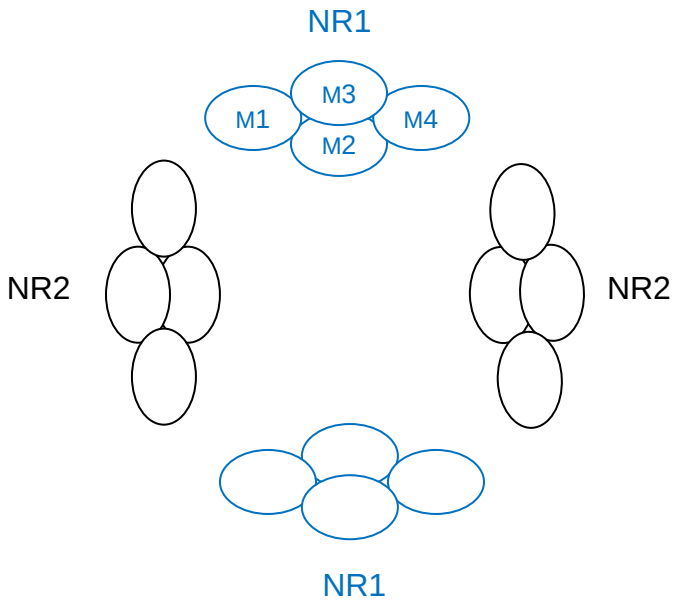

Abb. 2: Exemplarische Darstellung des Aufbaus eines NMDA-Rezeptors. Die meisten NMDA-Rezeptoren sind aus zwei GluN1-Untereinheiten und zwei GluN2-Untereinheiten aufgebaut. Jede Rezeptoruntereinheit besteht aus den Transmembrandomänen M1, M3 und M4 sowie der membranären Reentry-Schleife M2. Die vier korrespondierenden M2-Schleifen und M3-Transmembrandomänen eines Rezeptors formen die Kanalpore.

Jede Untereinheit des NMDA-Rezeptors besteht aus einer extrazellulären aminoterminalen Domäne, einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären carboxyterminalen Domäne (Abb. 3).

Die extrazellulär gelegene aminoterminale Domäne besitzt eine regulatorische Funktion. Sie ist wichtig für die Offenwahrscheinlichkeit, die Deaktivierung, die Desensitivierung und die Regulation der Untereinheiten-Anordnung (Krupp et al. 1998, Gielen et al. 2009, Yuan et al. 2009). Außerdem besitzt sie Bindungsstellen für zweiwertige Kationen, wie z.B. Zn^{2+}, und für negative allosterische Modulatoren (Traynelis et al. 2010). Neben diesen Funktionen soll sie auch noch die Eigenschaften der Untereinheit-spezifischen Kanalporen bestimmen (Paoletti 2011).

Die extrazellulär gelegene Ligandenbindungsdomäne besteht aus zwei Aminosäuresegmenten, S1 und S2, die zwischen dem aminoterminalen Ende der

Transmembrandomäne M1 und der Verbindungsschleife zwischen der Transmembrandomäne M3 und M4 gelegen sind. In der Spalte zwischen S1 und S2 befindet sich die Agonistenbindungsstelle, die je nach Untereinheit Glycin, D-Serin, Glutamat oder NMDA bindet. Die Glutamat- bzw. NMDA-Bindungsstelle befindet sich innerhalb der GluN2-Untereinheit. Die Glycin-Bindungsstelle ist innerhalb der GluN1-Untereinheit lokalisiert. Zum Aktivieren des Rezeptors muss sowohl der Agonist (NMDA bzw. Glutamat) als auch der Coagonist (Glycin) gleichzeitig gebunden sein (Du et al. 2005, Sobolevsky et al. 2009, Labrie et al. 2010, Szakács et al. 2012).

Die transmembranäre Domäne besteht aus drei Transmembrandomänen (M1, M3 und M4) sowie einer kleinen membranären Reentry-Schleife (M2). Die vier korrespondierenden M2-Schleifen eines Rezeptors bilden die engste Stelle der Kanalpore, die entsprechenden M3-Transmembrandomänen formen die äußere Kanalpore, die bei nicht aktivierten Rezeptoren verschlossen ist. Die gesamte Kanalpore bildet den Ionenkanal, der nicht-selektiv für Kationen wie Kalium, Natrium und Calcium permeabel ist. Am carboxyterminalen Ende der Transmembrandomäne M3 ist in allen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors das hochkonservierte SYTANLAAF-Motiv gelegen, welches aus einer bestimmten Abfolge von neun Aminosäuren besteht. Dieses SYTANLAAF-Motiv scheint eine wichtige Rolle in der Kanalfunktion zu spielen (Wollmuth and Sobolevsky 2004, Sobolevsky et al. 2009, Yuan et al. 2005).

Die intrazellulär gelegene carboxyterminale Domäne ist die vielfältigste aller vier Domänen. Sie variiert innerhalb der Rezeptoruntereinheiten in der Sequenz und in der Länge enorm. Diese Domäne enthält eine Bindungsstelle für intrazelluläre Proteine, wie z.B. den Ca^{2+}/Calmodulin-Komplex in der GluN1-Untereinheit. Zudem hat die carboxyterminale Domäne eine wichtige Funktion in der post-translationalen Modifizierung, der Regulation der Degradierung und der Weiterleitung der Signale in die Zelle (Ataman et al. 2007, Paoletti 2011, Horak and Wenthold 2009, Krupp et al. 1998).

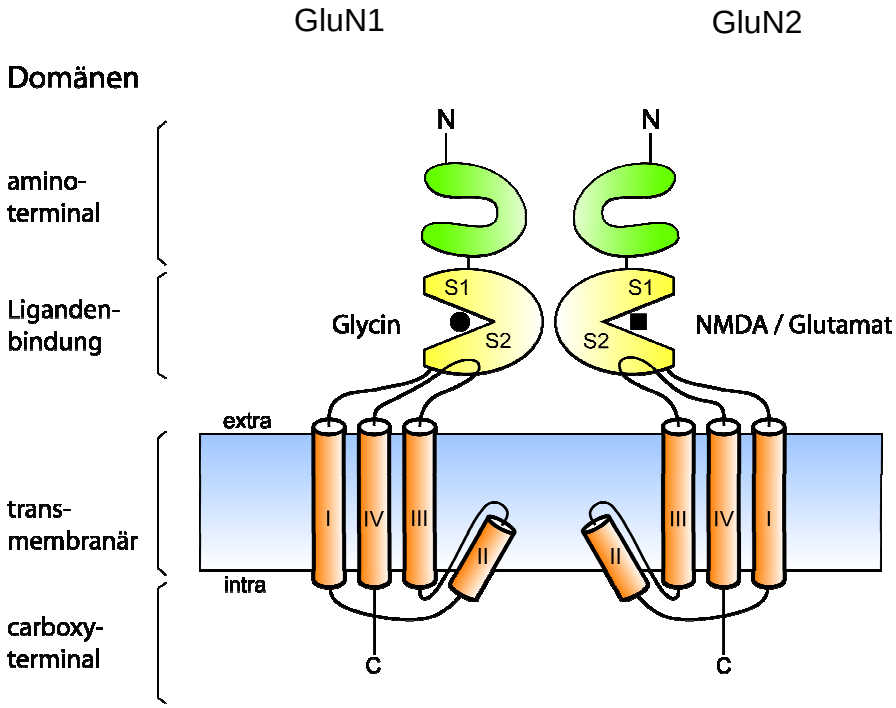

Abb. 3: Schematische Darstellung der Untereinheiten GluN1 und GluN2 des NMDA-Rezeptors. Jede Untereinheit des NMDA-Rezeptors besteht aus einer extrazellulären aminoterminalen Domäne, einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären carboxyterminalen Domäne. Die Ligandenbindungsdomäne besteht aus zwei Aminosäuresegmenten, S1 und S2, die zwischen dem aminoterminalen Ende der Transmembrandomäne M1 und der Verbindungsschleife zwischen der Transmembrandomäne M3 und M4 gelegen sind. In der Spalte zwischen S1 und S2 befindet sich die Agonistenbindungsstelle, die bei der GluN2-Untereinheit NMDA bzw. Glutamat und bei der GluN1-Untereinheit Glycin binden kann. Zum Aktivieren des Rezeptors muss sowohl der Agonist (NMDA bzw. Glutamat) als auch der Coagonist (Glycin) gleichzeitig gebunden sein. Die vier korrespondierenden M2-Schleifen und M3-Transmembrandomänen eines Rezeptors formen die Kanalpore.

1.2.2 Physiologische Bedeutung

Die NMDA-Rezeptoren besitzen eine große Bedeutung in der normalen Funktion des zentralen Nervensystems. Gerade dieser Subtyp der Familie der ionotropen Glutamat-Rezeptoren ist wichtig für viele physiologische und pathologische Prozesse im Gehirn. Aktivierte NMDA-Rezeptoren sind permeabel für alle

Kationen, insbesondere aber für Calciumionen. Eben dieser hohe Calcium-einstrom bei Rezeptoraktivierung ist notwendig für die synaptische Plastizität, die vor allem im Bereich der Entwicklung, des Lernens und des Gedächtnis‘ eine wichtige Rolle spielt (Flores-Soto et al. 2012). Allerdings führt ein zu hoher intrazellulärer Calciumspiegel zum Zelltod. Aus diesem Grund ist der Magnesium-block, der den NMDA-Rezeptor bei negativem Membranpotential blockiert, hier sehr wichtig. Er verhindert nämlich einen übermäßigen Calciumeinstrom in die Zelle und damit eine intrazelluläre Calciumakkumulation (Kotermanski et al. 2009, Szakács et al. 2012). Eine Überexprimierung bestimmter Rezeptoruntereinheiten, wie z.B. der GluN2B-Untereinheit, soll das Lernen und das Gedächtnis verbessern (Tang et al. 1999, 2001, Cao et al. 2007). Aber nicht nur im Bereich des Lernens und des Gedächtnis spielt der NMDA-Rezeptor eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Schmerzvermittlung. Insbesondere die GluN2B-Untereinheit soll durch maladaptive Plastizität innerhalb der neuronalen Schmerzbahnen bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen von Bedeutung sein. Daher könnte ein NMDA-Rezeptor-Antagonist ein nützliches Medikament in der Behandlung chronischer neuropathischer Schmerzen sein (Klein et al. 2008, Vasquez et al. 2012). Im Hinblick auf die akute Analgesie und Sedierung ist bereits seit mehr als 40 Jahren ein NMDA-Rezeptor-Antagonist im klinischen Einsatz. Unter den heutzutage verwendeten Anästhetika besitzt Ketamin immer noch eine Sonder-stellung. Es induziert eine dissoziative Anästhesie, bei welcher unter Erhalt der Spontanatmung und der Schutzreflexe eine vollkommene Schmerzfreiheit und Sedierung eintritt. (Hempelmann und Kuhn 1997). Zudem hat es durch die zusätzliche Sympathikusstimulation einen kreislaufstabilisierenden Nebeneffekt. Allerdings treten darunter auch unerwünschte Wirkungen auf, wie z.B. eine verlängerte und psychotrope Aufwachphase, in der es zu unangenehmen Träumen und Pseudohalluzinationen kommen kann. Dies kann allerdings durch die Coapplikation eines Benzodiazepins minimiert werden (Hempelmann und Kuhn 1997).

1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung

Die NMDA-Rezeptor-Aktivierung kann auf zwei unterschiedliche Weisen von statten gehen. Eine phasische Aktivierung des Rezeptors, entstanden durch eine in Abständen auftretende kurze, aber starke Glutamat-Ausschüttung in den synaptischen Spalt, steht einer tonischen Aktivierung gegenüber. Diese soll unter pathologischen Bedingungen auftreten, wenn eine geringe aber dafür ständige Glutamat-Konzentration im synaptischen Spalt vorhanden ist (Petrovic et al. 2005). Eine generelle, phasische oder tonische Überaktivierung des NMDA-Rezeptors im Gehirn durch exzitatorische Aminosäuren, wie Glutamat, kann die Zerstörung von Neuronen bedingen, und somit in der Pathogenese neurologischer Erkrankungen von Bedeutung sein. Insbesondere bei der Entstehung eines hypoxischen Hirnschadens, z.B. bedingt durch einen Schlaganfall oder ein Schädel-Hirn-Trauma, oder bei der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. bei Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Morbus Huntington oder der amyotrophen Lateralsklerose, scheint die Exzitotoxizität des NMDA-Rezeptors eine wichtige Rolle zu spielen (Chen and Lipton 2006). So besteht zum Beispiel bei der Behandlung von Alzheimer- oder Parkinson-Patienten bereits ein möglicher Therapieansatz in der Anwendung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten, wie Memantin oder Amantadin (Lo and Grossberg 2011, Sawada et al. 2010).

Zudem scheint der NMDA-Rezeptor im Bereich der psychiatrischen Erkrankungen ebenfalls eine wichtige Rolle zu haben. Eine NMDA-Rezeptor-Dysfunktion (im Bereich der Glycin-Bindungsstelle) und somit eine Unterfunktion in der NMDA-Rezeptor vermittelten Neurotransmission soll zur Entstehung der Schizophrenie mit beitragen. Daher könnte eine Coagonistensubstitution mit Glycin oder D-Serin oder ein Glycin-Transporter-Inhibitor ein möglicher Therapieansatz bei der Behandlung von Schizophreniepatienten sein (Labrie et al. 2010, Tsai et al. 2010, de Bartolomeis et al. 2012). Auch bei der Behandlung von endogenen, schweren Depressionen könnten NMDA-Rezeptor-Antagonisten in Zukunft von Bedeutung sein. Die Behandlung von Patienten mit therapieresistenten Depressionen mittels Ketamin-Infusionen zeigt eine schnell einsetzende, eindeutige antidepressive Wirkung. Daher wäre ein möglicher Therapieansatz eine kurzzeitige NMDA-

Rezeptor-Antagonisierung zur Überbrückung der Wirklatenz der eigentlichen Antidepressiva (Berman et al. 2000, Mathew et al. 2009, Zarate et al. 2006, Szakács et al. 2012).

1.2.4 Antagonisten

Ein Forschungsziel in der Medizin ist es, geeignete Medikamente zu entwickeln, die einer Überfunktion des NMDA-Rezeptors entgegen wirken. Durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten ist es möglich, den NMDA-Rezeptor zu blockieren und somit Erkrankungen positiv zu beeinflussen. Mittlerweile wurden schon zahlreiche solcher neuroprotektiv wirkenden Medikamente in Studien getestet. Viele wurden aber aufgrund ihres Nebenwirkungsprofils und ihrer geringen Rezeptorselektivität für die klinische Anwendung nicht zugelassen.

Im Allgemeinen können NMDA-Rezeptor-Antagonisten anhand ihrer Interaktionsweise am NMDA-Rezeptor pharmakologisch in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Kompetitive Rezeptor-Antagonisten binden an der Ligandenbindungsstelle des Agonisten NMDA bzw. des Coagonisten Glycin. Nicht kompetitive Antagonisten interagieren an so genannten allosterischen Bindungsstellen. Diese allosterischen Bindungsstellen können sich außerhalb oder innerhalb der Kanalpore befinden. Liegt die Bindungsstelle im Ionenkanal, kann es sich um einen Offenkanalblocker handeln, wenn die Blockade des Kanals dessen Aktivierung voraussetzt. Für die therapeutische Intervention extremer NMDA-Rezeptor-Überaktivierung sind vor allem solche Offenkanalblocker gesucht, denen ein unkompetitiver Antagonismus zugrunde liegt. Ein wesentliches Kennzeichen des unkompetitiven Antagonismus ist, dass die Hemmung mit steigender Agonistenkonzentration zunimmt. Dies hat zur Folge, dass die Rezeptor-Blockade bei hoher pathologischer Rezeptoraktivierung stärker ausfällt, wohingegen die normale physiologische Neurotransmission weniger beeinträchtigt werden sollte (Chen and Lipton 2006).

1.3 Diphenhydramin

Diphenhydramin ist ein H_1-Rezeptor-Antagonist und gehört zur Gruppe der Antihistaminika. Ursprünglicherweise wurde es als Antiallergikum entwickelt. Heutzutage wird es aber hauptsächlich nur noch als Hypnotikum/Sedativum und Antiemetikum verwendet (Karow und Lang-Roth 2010). Die Strukturformel von Diphenhydramin ist in Abbildung 4 dargestellt.

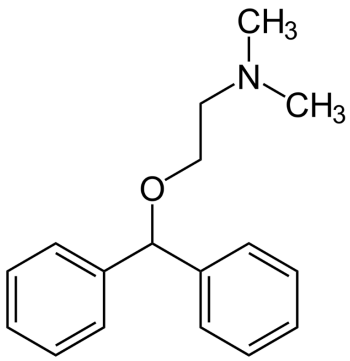

Abb. 4: Strukturformel von Diphenhydramin (=2-Benzhydryloxy-*N*,*N*-dimethyl-ethylamin)

1.3.1 Wirkmechanismus

Diphenhydramin ist ein kompetitiver Antagonist von Histamin an H_1-Rezeptoren. Es hat eine antiallergische, antiemetische und sedative Wirkung. Aufgrund seiner nur geringen H_1-Rezeptor-Selektivität hat es zudem aber auch anticholinerge, antiserotoninerge und antiadrenerge Eigenschaften (Karow und Lang-Roth 2010).

1.3.2 Anwendungsbereiche

Diphenhydramin wird heutzutage aufgrund seiner antiemetischen Wirkung als Antiemetikum in der Therapie der Übelkeit und des Erbrechens eingesetzt. Vor allem im Bereich der Kinetosen (Reisekrankheit) wird es vermehrt eingesetzt. Zudem kommt es als Bestandteil in der fixen Arzneistoffkombination Dimen-

hydrinat vor, das ebenfalls als Antiemetikum zum Einsatz kommt. Als eigentlicher Histaminantagonist wird Diphenhydramin nur noch in der Notfallmedizin bei der symptomatischen Therapie eines anaphylaktischen Schocks eingesetzt. Darüber hinaus wird Diphenhydramin aufgrund seiner ZNS-dämpfenden und sedierenden Wirkung vor allem für die kurzzeitige Behandlung von Einschlaf- und Durchschlafstörungen eingesetzt.

1.3.3 Nebenwirkungen

Mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Diphenhydramin sind ZNS-Dämpfung mit Sedierung, Hypotension mit Reflextachykardie, Appetitzunahme, Mundtrockenheit, Photophobie, Sehstörungen, QT-Verlängerung, Harnverhalt, gastrointestinale Beschwerden und Glaukomanfall (Karow und Lang-Roth 2010). Bei missbräuchlich hoher Dosierung kann Diphenhydramin außerdem halluzinogen und delirant wirken, was bis hin zu einem Rauschzustand mit totalem Realitätsverlust führen kann.

1.4 Zielsetzung

Neben dem Einsatz als Antiemetikum, wird Diphenhydramin heutzutage im klinischen Alltag aufgrund seiner sedierenden Eigenschaft vor allem bei Schlafstörungen verwendet. Obwohl es bereits seit Jahren im klinischen Einsatz ist, ist der eigentliche Wirkmechanismus von Diphenhydramin, der dieser sedierenden Eigenschaft zugrunde liegt nicht geklärt. Bei ähnlichen sedierenden Arzneistoffen, wie z.B. Ketamin, ist bekannt, dass sie mit NMDA-Rezeptoren interagieren (Hempelmann und Kuhn 1997, Irifune et al. 1992). Da der NMDA-Rezeptor eine große Bedeutung bei der Sedierung, der Anästhesie und der Analgesie hat, wurde in der vorliegenden Arbeit getestet, ob die sedierende Eigenschaft von Diphenhydramin durch eine Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor zustande kommen könnte.

Die prinzipielle NMDA-antagonistische Eigenschaft von Diphenhydramin wurde bereits in Voruntersuchungen festgestellt. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, die Hemmwirkung im Detail zu untersuchen. Hierzu zählten u.a. Untersuchungen zur Untereinheitenselektiviät, Interaktion mit ausgewählten Rezeptorzuständen, kinetische Parameter, Potentialabhängigkeit und mögliche Interaktionen mit anderen ionotropen Glutamat-Rezeptoren.

Zur praktischen Durchführung dieser Experimente wurde die Patch-Clamp-Technik, eine elektrophysiologische Untersuchung zur Messung von Ionenströmen an Zellmembranen, an NMDA-transfizierten TsA-Zellen herangezogen.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Materialien

Geräte:

Sterilbank mit Flowsystem HERASAFE (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Inkubator BBD 6220 (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Zellen:

TsA201, abstammend von HEK-293 (ATCC#CRL1537)

DNA:

Tabelle 1: Auflistung der für die Transfektion verwendeten cDNAs mit Angabe des Vektors und der Herkunft. Die Nomenklatur erfolgte nach Alexander et al. 2011, Weigt et al. 2008 und Stern-Bach et al. 1998.

DNA	Vektor	Herkunft
GluN1-1a	pcis	Kuhse, Ulm, Deutschland
GluN1_A652C	pcis	eigene Mutagenese
GluN2A	pcis	Kuhse, Ulm, Deutschland
GluN2B	pcis	Kuhse, Ulm, Deutschland
GluN2C	pRK7	Herb, Heidelberg, Deutschland
GluN2D	pRK7	Herb, Heidelberg, Deutschland
GluR1(L497Y)	pcDNA3	Stern-Bach, Jerusalem, Israel
GluR6	pBSKS(+)	Kubel, Kalifornien, USA
GFP	pECFP-N1	Grissmer, Ulm, Deutschland

Medium:

D-MEM (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)

Penicillin (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)

Streptomycin (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)

L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

10 % fetales Kälberserum (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)

Lösungen:

PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

Reagenzien:

Accutase (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

Transfektions Kit (jetPei) (PeqLab, Erlangen, Deutschland)

Ketamin (Tocris, Köln, Deutschland)

AP5 (Tocris, Köln, Deutschland)

Polyornithin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

2.1.2 Kultivierung der TsA-Zellen

Die verwendete Zelllinie TsA201 stammt von der menschlichen embryonalen Nieren-Zelllinie HEK-293 (ATCC#CRL1537) ab, welche ein T-Antigen gegen das Simian-40-Virus (Affenvirus) exprimiert. Die Zellen wurden bei 37°C in einem Inkubator in einer mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 befeuchteten Atmosphäre in einem D-MEM-Medium (=Dulbecco's modified Eagle medium; ergänzt mit 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin) mit 10 % fetalem Kälberserum auf Polyornithin-beschichteten konventionellen 35 mm Petrischalen kultiviert. Nach mehreren Tagen wurden die Zellen dann im Verhältnis 1:5 oder 1:10 gesplittet. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml PBS (=Phosphatgepufferte Salzlösung) gespült, mit Hilfe von Accutase vereinzelt und anschließend wieder neu ausgesät.

2.1.3 Transfektion

Bei der Expression der GluN2A- oder GluN2B-Untereinheiten wurden diese mit dem Wildtyp GluN1-1a kombiniert. Für die Expression der GluN2C- oder GluN2D-Untereinheiten wurden diese mit einer mutierten GluN1-Untereinheit (GluN1_A652C) kombiniert. Bei der GluN1_A652C ist die Aminosäure Alanin an Position 652 durch Cystein ersetzt. Die Aminosäure A652 befindet sich an Position 7 des SYTANLAAF-Motivs in der Transmembrandomäne M3. AMPA- bzw. Kainat-Rezeptoren wurden aus Homomeren von GluR1 bzw. GluR6 hergestellt. Zur Detektion der transfizierten Zellen wurde eine Cotransfektion mit GFP (green fluorescent protein) durchgeführt. Die Identifizierung der GFP-positiven Zellen erfolgte mit UV-Licht.

Die Transfektion erfolgte mit dem jetPei TM Kit nach Angaben des Herstellers:

Hierzu wurden in 2 Reaktionsgefäße je 100 µl NaCl (150 mM) vorgelegt. In den einen Ansatz wurde je 1 µg cDNA der jeweiligen Untereinheit und 0,5 µg GFP pipettiert. Zum anderen Ansatz wurden 6 µl jetPei TM hinzugefügt. Nachdem beide Ansätze kurz gevortext wurden, wurde Ansatz 2 in Ansatz 1 überführt und erneut für 10 Sekunden gevortext. Anschließend wurde der vereinigte Ansatz für 30 Minuten stehen gelassen. Währenddessen wurden die Zellen vorbereitet. Zuerst wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und 1,5 ml neues Medium zugefügt. Nun wurde der vorbereitete Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen verteilt. Hernach wurden die Zellen wieder in den Inkubator verbracht. Nach 3-4 Stunden wurde den Ansätzen, bei denen NMDA-Rezeptoren exprimiert wurden, die Blocker Ketamin und AP5 in einer Konzentration von je 200 µM zugegeben. Dies war notwendig um eine ständige Aktivierung der neu eingeführten Kanäle zu verhindern, da die verwendeten Kulturmedien die entsprechenden Aminosäuren (Glutamat und Glycin) in ausreichender Konzentration enthielten. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Accutase-Behandlung erneut vereinzelt und auf zwei bis drei neue Petrischalen aufgeteilt. Nach einer einstündigen Inkubation konnten die Zellen dann zum Messen verwendet werden.

2.2 Patch-Clamp Messungen

Die Patch-Clamp-Technik ist eine elektrophysiologische Untersuchungsmethode, die es ermöglicht, Ionenströme über die Zellmembran zu erfassen. Der Aufbau des verwendeten Messplatzes ist in Abb. 5 dargestellt.

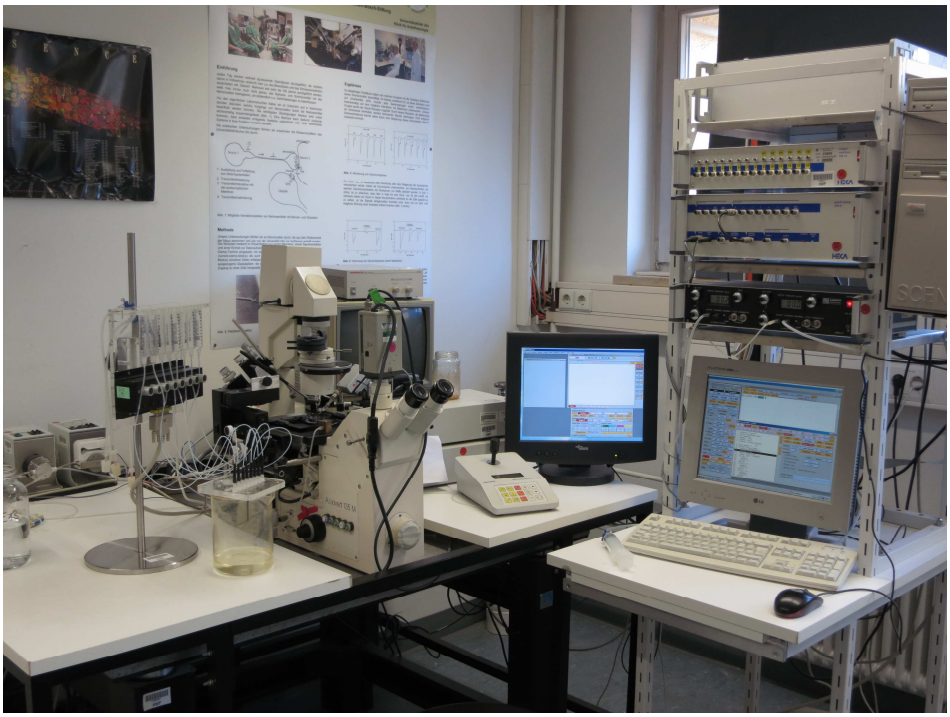

Abb. 5: Messplatz für die elektrophysiologischen Messungen. Zu sehen sind von links nach rechts ein Substanz-Applikationssystem, ein Mikroskop mit einer UV-Beleuchtung, ein Pipettenhalter mit Mikromanipulator, ein Verstärker und ein Computer.

Eine Voraussetzung für die Messungen der Ionenströme ist das Vorhandensein einer Spannungsklemme, welche das exakte Einstellen einer vom Benutzer definierten Membranspannung, das so genannte Haltepotential, ermöglicht. Somit können Abweichungen vom vorgegebenen Haltepotential durch eine den elektrischen Strom liefernde Verstärkereinheit kompensiert werden. Im so genannten Vorverstärker, der sich nahe der Patch-Pipette befand, ist der dazu

verwendete Schaltkreis untergebracht, der im wesentlichen aus einem Operationsverstärker und einem Rückkopplungswiderstand besteht (Abb. 6).

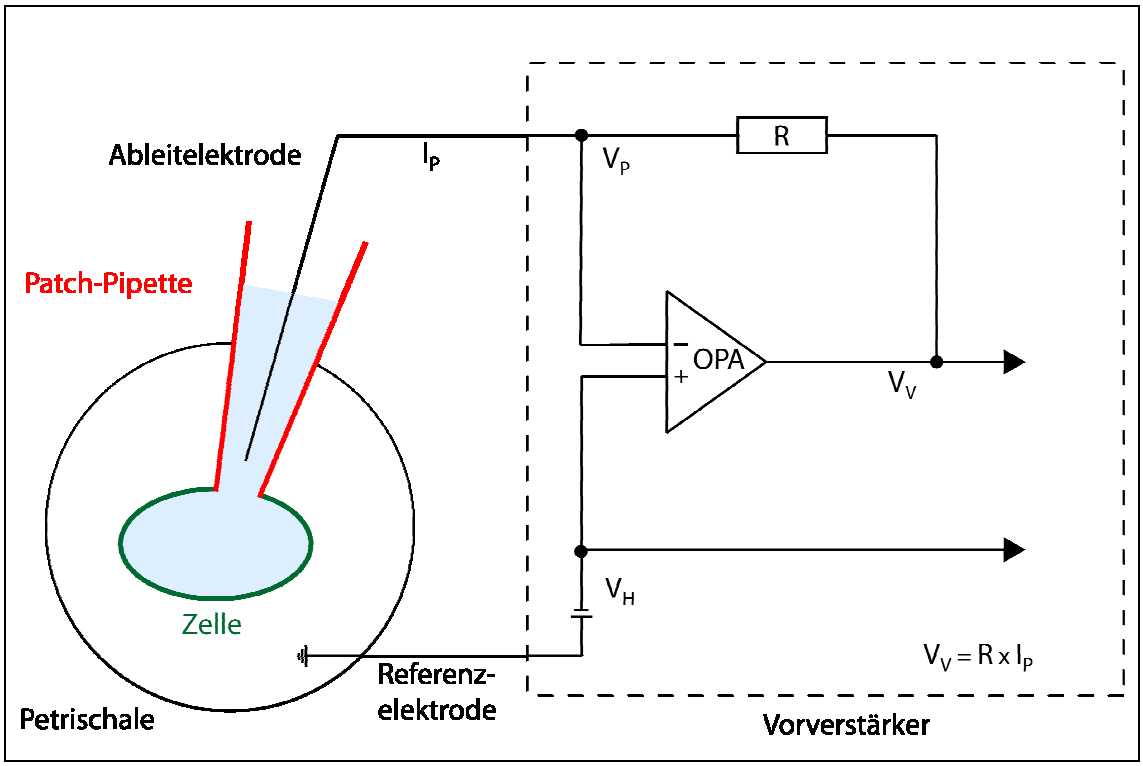

Abb. 6: Vereinfachte Darstellung des Prinzips der Spannungsklemme. An den Eingängen des Operationsverstärkers liegen das Pipettenpotential und das Haltepotential an. Der Ausgang des Operationsverstärkers ist über den Rückkopplungswiderstand mit der Ableitelektrode verbunden. Besteht nun eine Differenz zwischen dem Pipetten- und dem Haltepotential, wird die Spannung am Ausgang des Operationsverstärkers verstärkt. Diese Spannung, die proportional zu der Potentialdifferenz an den Eingängen ist, führt nun dazu, dass ein zu der Potentialdifferenz proportionaler Strom (Klemmstrom) durch den Rückkopplungswiderstand über die Ableitelektrode fließt. Dieser Strom lässt sich aus der Spannung und dem Rückkopplungswiderstand berechnen ($I_P = V_V / R$). Somit wird die Potentialdifferenz zwischen Pipetten- und Haltepotential aufgehoben und die vom Benutzer eingestellte Membranspannung aufrechterhalten. V_P Pipettenpotential, V_H Haltepotential, V_V Spannung am Ausgang des Opreationsverstärkers, R Rückkopplungswiderstand, I_P Pipettenstrom (Klemmstrom), OPA Operationsverstärker.

2.2.1 Materialien

Arbeitsunterlage:

Pressluftgefederter Tisch (TMC, Peabody, Massachusetts, USA)

Mikroskop:

Axiovert 135 M (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland)

Fluoreszenzeinheit:

UV-Lampe HBO, 70 Watt (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Applikationssystem:

Vorratsgefäße (Spritzen) (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Magnetklemmventile (Sirai, Sasbach, Deutschland)

Applikationseinheit mit 4- oder 8-Zulaufkanälen (Eigenbau)

Ventilsteuerung, TIDA-Software (HEKA, Lambrecht, Deutschland)

Mikromanipulator DC 3-K (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland)

Drucksteuereinheit MPCU-3 (Lorenz, Lindau, Deutschland)

Pumpen:

Schlauchpumpen Reglo Analog (Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz)

Membranpumpe Reglo Z (Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz)

Verstärker:

EPC-9 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Deutschland)

Computer:

handelsüblicher PC

Software:

TIDA 5.24 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Deutschland)

Mircrosoft Office Excel und Word 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland)

SigmaPlot 10.0 (Systat Softaware, Inc., San José, California, USA)

Elektrodenziehgerät:

DMZ-Universal-Puller (Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland)

Patch-Pipetten:

Borosilikat-Glaspipetten GB150-TF10 (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland)

Mikromanipulator:

PatchMan (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Reagenzien:

DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Diphenhydramin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Glutamat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

NMDA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Glycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Magnesium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

MTSEA (Toronto Research Chemicals, Inc., North York, Canada)

Lösungen:

Tabelle 2: Die für die Messungen verwendeten Lösungen. Die Intrazellularlösungen (IZ) dienten als Pipettenlösungen, die Extrazellularlösungen (EZ) als Badlösungen.

	IZ 1	**IZ 2**	**EZ 1**	**EZ 2**
NaCl (mM)			140	145
KCl (mM)	140		2,7	2,7
K-Gluconat (mM)		140		
$MgCl_2$ (mM)	2	2		
$CaCl_2$ (mM)		1	1,5	0,3
Glucose (mM)			6	6
EGTA (mM)	2	10		
ATPx2Na (mM)	2	2		
HEPES (mM)	10	10	12	12
pH	7,2	7,2	7,3	7,3

Die pH-Einstellung erfolgte mittels einer NaOH-Lösung für die Extrazellularlösung bzw. mittels einer KOH-Lösung für die Intrazellularlösung. Die Osmolarität der Extra- und Intrazellularlösungen schwankte zwischen 290 und 320 mOsm.

2.2.2 Vorbereitung der Substanzen

Die meisten Substanzen wurden als hochkonzentrierte Stocklösungen in aqua dest angesetzt und bei -20°C portioniert aufbewahrt. Die für die Messungen benötigten Reagenzien wurden für jeden Versuchsaufbau neu aufgetaut und nach entsprechender Verdünnung in die Vorratsgefäße eingefüllt. MTSEA wurde täglich frisch angesetzt (Stocklösung 200 mM) und für die Anwendung auf 0,4 mM verdünnt.

2.2.3 Herstellung der Patch-Pipetten

Mithilfe des DMZ-Universal-Pullers wurden die Patch-Pipetten aus den Borosilikat-Glaspipetten in einem mehrstufigen Prozess gezogen. Um die teflonbeschichtete Ableitelektrode (ein chlorierter Silberdraht) nicht zu beschädigen, wurde die hintere Pipettenöffnung unter Zuhilfenahme eines Bunsenbrenners geglättet. Danach wurde die Glaspipette mit einer Intrazellularlösung gefüllt. Zuerst wurde die Pipettenspitze mithilfe von Unterdruck gefüllt. Dieser wurde erzeugt mit Hilfe einer handelsüblichen Spritze, die über einen Schlauch mit der hinteren Pipettenöffnung verbunden war. Die restliche Füllung erfolgte durch die hintere Pipettenöffnung anhand eines Mikroloaders. Zuletzt wurde die Pipettenspitze noch kurz in 2% Dimethylsilan getaucht um das Sealing zu erleichtern und um das Hintergrundrauschen zu verkleinern. Die fertig befüllte Patch-Pipette wurde so an die Halterung des Vorverstärkers angebracht, dass die Ableitelektrode (chlorierter Silberdraht) in die Pipettenlösung hineinragte, wodurch die elektrische Verbindung von Pipettenlösung zum Vorverstärker hergestellt wurde.

2.2.4 Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration

Zu Beginn der Experimente wurden die Elektroden, bestehend aus chloriertem Silberdraht, positioniert. Die Referenzelektrode befand sich in der mit Extrazellularlösung gefüllten Petrischale, die Ableitelektrode in der mit Intrazellularlösung gefüllten Patch-Pipette. Die Zellen befanden sich ebenfalls in der Petrischale. Vor Eintauchen der hergestellten Patch-Pipette in die Extrazellularlösung wurde an dieser ein Überdruck von ca. 10 cm H_2O angelegt um störende Partikel von der Pipettenspitze fern zu halten. Nach dem Eintauchen zeigten die Elektroden einen Widerstand zwischen drei und fünf MΩ. Mit Hilfe des Mikroskops und dem Mikromanipulator wurde nun die Patch-Pipette so nahe an die Zellmembran einer zuvor ausgewählten grün fluoreszierenden Zelle herangeführt, dass zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran ein Abdichtwiderstand („Gigaseal“) im GΩ-Bereich ausgebildet wurde. Dieser Pipettenwiderstand konnte anhand eines Testpulses in Form einer Rechteckspannung bestimmt werden. Das Erreichen dieser Cell-Attached-Konfiguration wurde unterstützt durch das Anlegen eines Unterdrucks zwischen -10 und -30 cm H_2O an die Pipettenspitze, wodurch die Zellmembran an die Spitze der Pipette angesogen wurde. Anschließend wurde ein Haltepotential von -80 mV eingestellt. Um nun Ionenströme an der Zellmembran messen zu können, musste erst eine Whole-Cell-Konfiguration erreicht werden (Abb. 7). Dies gelang durch das Anlegen von weiterem Unterdruck (durchschnittlich 100 cm H_2O) oder durch kurze elektrische Impulse. Dabei wurde das Membranstück unterhalb der Pipettenspitze aufgerissen und eine elektrische Verbindung der Lösung im Pipetteninneren mit dem Inneren der Zelle hergestellt. Nach einer kurzen Äquilibrierungszeit war die intrazelluläre Ionenzusammensetzung mit der jeweiligen Pipettenlösung identisch. Nun waren Stromableitungen von der gesamten Zellmembran möglich.

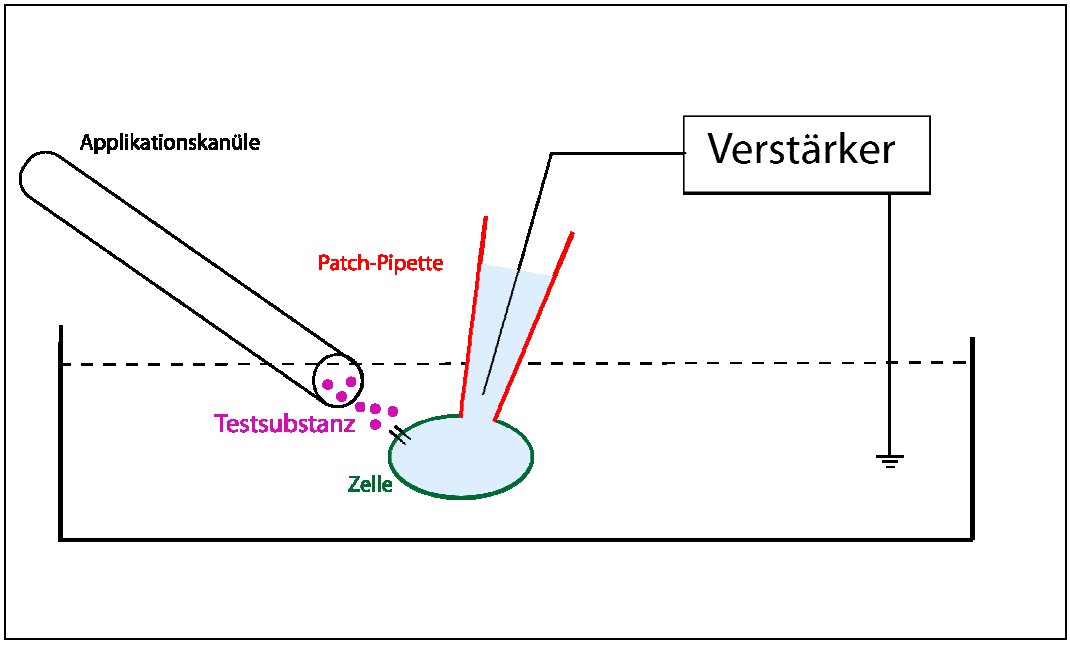

Abb. 7: Die Whole-Cell-Konfiguration. Die ausgewählte, grün fluoreszierende Zelle befindet sich in der mit Extrazellularlösung gefüllten Petrischale. Die Patch-Pipette sitzt der Zellmembran auf. Das Membranstück unterhalb der Pipette ist aufgerissen und legt sich von innen an die Pipettenwand an. Eine elektrische Verbindung der Lösung im Pipetteninneren mit dem Inneren der Zelle ist hergestellt. Somit ist nun eine Stromableitung von der gesamten Zellmembran möglich. Als Elektroden, über die ein Vorverstärker angeschlossen war, dienten zwei chlorierte Silberdrähte, die sich zum einen als Referenzelektrode in der Extrazellularlösung und zum anderen als Ableitelektrode in der Intrazellularlösung der Patch-Pipette, welche dem Zellinneren entsprach, befanden. Über die Applikationskanüle wurden die Substanzen, wie z.B. der Agonist, an die zu untersuchende Zelle angespült.

2.2.5 Substanzapplikation

Um ein gleichmäßiges und schnelles Anfluten der Substanzen zu gewährleisten, wurden Spritzpumpen, Zufluss regulierende Klemmventile und eine elektronische Ventilsteuerung mittels der TIDA-Software verwendet. Die vorbereiteten Substanzen wurden in die Spritzen eingefüllt. Über einen Teflonschlauch waren die Spritzen mit einer 4-Kanal- bzw. 8-Kanal-Applikationskanüle verbunden, in deren distalem Teil sich die Substanzzuflüsse vereinten (Abb. 8). Die Spitze der Applikationskanüle wurde gegenüber der Absaug- und Überlaufkanüle unter

Zuhilfenahme eines 3-Achs-Mikromanipulators ca. 50-100 µm vom Messfeld entfernt in die Messkammer eingebracht. Die TIDA-Software erlaubte das freie Wählen der Applikationsreihenfolge und der Öffnungsdauer der insgesamt vier bzw. acht Kanäle im zeitlichen Verlauf. Durch eine Steuerungseinheit war es zudem möglich, jedes einzelne Ventil manuell zu bedienen. Der Substanzzufluss durch die Teflonschläuche wurde durch Magnetklemmventile geregelt. Die Kontroll- und Testsubstanzen wurden mit einem Zustrom von 1 ml/min eingespült. Um eine konstante Flussrate der Substanzen zu gewährleisten, wurden die Spritzpumpen mit einem Drucksteuersystem (MPCU-3) verbunden, welches einen konstanten Druck von 10-12 cm H_2O auf die Spritzpumpen ausübte.

Um permanent ein frisches Medium und eine kontinuierliche Durchströmung der Messkammer mit Badlösung zu gewährleisten, wurde während der Messungen kontinuierlich die Extrazellularlösung über eine Schlauchpumpe und eine Zulaufkanüle, die am Rand der Petrischale eingeleitet wurde, mit einem Zustrom von 4,5 ml/min erneuert. Um ein Überlaufen der Petrischale zu verhindern, wurde gegenüber der Applikationskanüle ca. 300 µm vom Messfeld entfernt eine zweiläufige Absaug- und Überlaufkanüle angebracht, die kontinuierlich die Extrazellularlösung und die Testsubstanzen absaugte um eine Akkumulation von zugeführten Substanzen und Zellmetaboliten zu verhindern (Abb. 8). Die applizierten Substanzen erreichten somit fast nur ausschließlich ein Volumen mit einer Grundfläche von ungefähr 300 µm x 100 µm innerhalb des Messgefäßes, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass die Testsubstanzen einen Kontakt zu den restlichen sich in der Petrischale außerhalb des Messfeldes befindenden Zellen hatten. Die Absaugkanüle saugte kontinuierlich am Boden der Petrischale knapp oberhalb des Schalenbodens 1ml/min über eine Membranpumpe ab. Die Überlaufkanüle war etwas höher positioniert. Sie befand sich an der Flüssigkeitsoberfläche und saugte somit nur den Überstand über eine Schlauchpumpe ab, was ein gleich bleibendes Volumen von ca. 2 ml in dem Messgefäß gewährleistete.

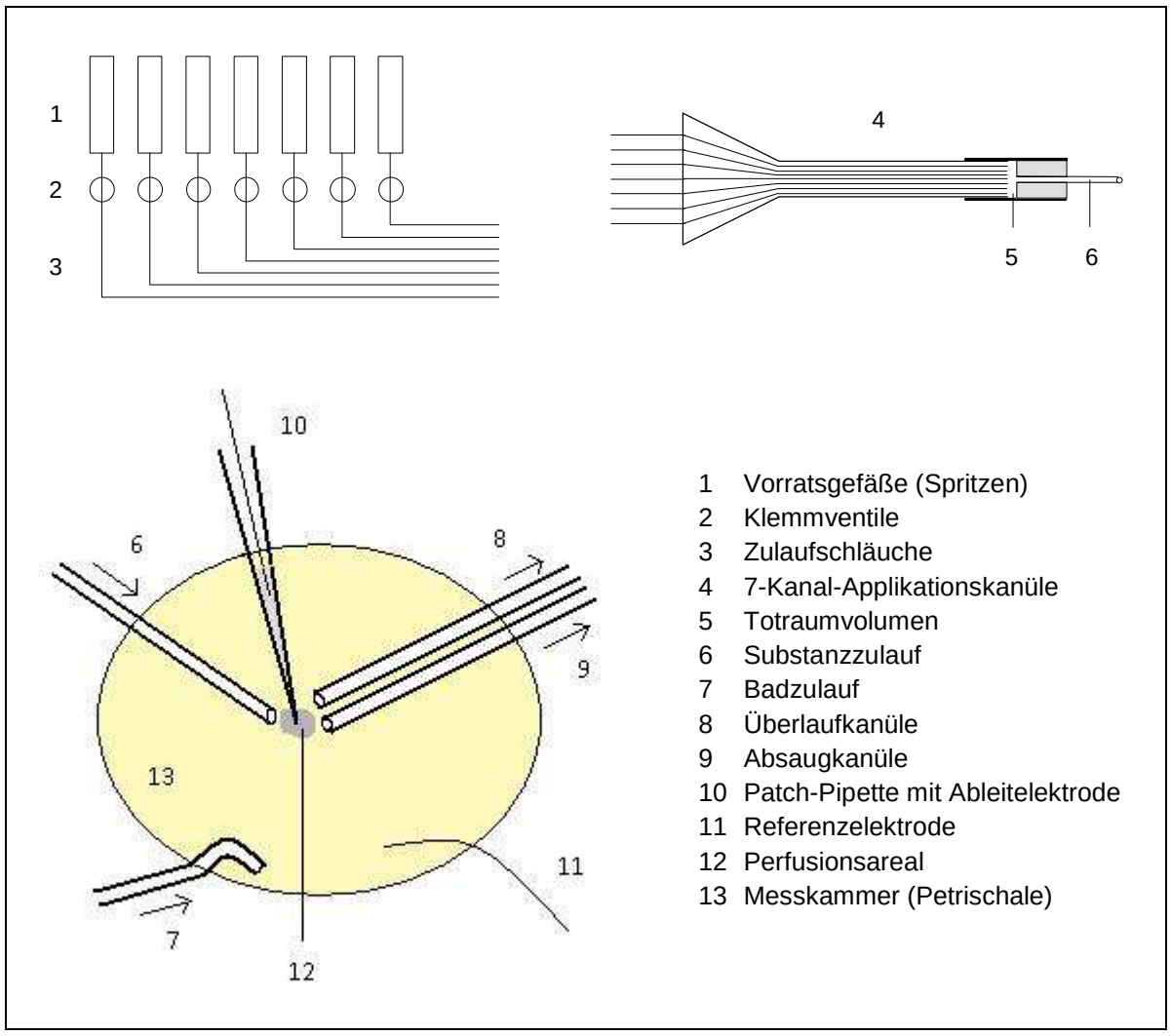

Abb. 8: Schematische Darstellung des Applikationssystems und der Messkonfiguration. Oben ist das Applikationssystem dargestellt. Links sind die Vorratsgefäße (1) mit den Zufluss regulierenden Klemmventilen (2) und den Zulaufschläuchen (3) für die zu applizierenden Substanzen zu sehen. Rechts ist die Applikationskanüle (4) abgebildet, in der die Zulaufschläuche münden. Unten links ist die Messkonfiguration dargestellt. Über den Substanzzulauf (6) wird die zu testende Substanz mit einem Zustrom von 1 ml/min in das Perfusionsareal (12) appliziert, in der sich die ausgewählte Zelle befindet, deren Membran über die Patch-Pipette (10) perforiert wurde. In der Patch-Pipette ist die Ableitelektrode positioniert. Die Referenzelektrode (11) befindet sich am Rand der Petrischale in der Badlösung. Ebenfalls am Rand der Petrischale liegt der Badzulauf (7), durch den permanent frisches Medium und ein kontinuierliches Durchströmen der Messkammer (13) mit einem Zustrom von 4,5 ml/min gewährleistet ist. Gegenüber dem Substanzzulauf ist die Absaugkanüle (9), die kontinuierlich 1 ml/min absaugt, und die Überlaufkanüle (8) positioniert, die den Überstand an der Flüssigkeitsoberfläche absaugt.

2.2.6 Praktische Durchführung

Die Zellen wurden 1-2 Tage nach Transfektion für die Experimente verwendet. Vor Beginn und während der Messungen wurden die Zellen kontinuierlich mit Extrazellularlösung gespült. Durch die Zuhilfenahme der UV-Lampe konnten die erfolgreich transfizierten Zellen anhand der grünen Fluoreszenz ermittelt werden. Die Membranströme wurden in der Whole-Cell-Konfiguration mittels eines EPC-9 Verstärkers und der TIDA-Software aufgezeichnet. Alle Ströme wurden durch einen 1 kHz Bessel Lowpass Filter gefiltert und bei Raumtemperatur, bei einem Haltepotential von -80 mV, wenn nicht gesondert vermerkt, sowie in einer Frequenzrate von 1 bis 3 kHz aufgenommen.

2.3 Auswertung der Daten

Die gemessenen Membranströme wurden im Anschluss an die Experimente mittels Tida-Software ausgemessen und in Mircrosoft Office Excel 2003 weiter bearbeitet. Das Anpassen der verschiedenen Gleichungen (s.u.) an die gemessenen Daten erfolgte mit SigmaPlot 10.0.

Berechnung der Aktivierungskurven

Der Berechnung der Aktivierungskurven liegt die Hill-Gleichung zu Grunde. Es wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\mathbf{I = I_{max}/(1+ (EC_{50}/[A])^{n})} \qquad \mathbf{(1)}$$

([A]) ist die Konzentration des Agonisten, (EC_{50}) ist diejenige Konzentration des Agonisten, die einen halbmaximalen Strom ergibt ($I_{max}/2$), (I_{max}) ist der maximal gemessene Strom, (I) ist der bei einer bestimmten Konzentration des Agonisten gemessene Strom und (n) ist der Hill-Koeffizient.

Berechnung der Hemmkurven

Für die Berechnung der Hemmwirkung von Diphenhydramin wurde als Kontrollwert (I_K) die Amplituden des Plateaustroms vor (I_{KV}) und nach (I_{KN}) der Diphenhydraminapplikation gemittelt.

$$I_K = (I_{KV} + I_{KN})/2 \quad (2)$$

Die Berechnung der Hemmkurven erfolgte ebenfalls mit einer Hill-Gleichung. Es wurde folgende Gleichung verwendet:

$$I_B/I_K = 1 / (1 + ([B]/IC_{50})^n) \quad (3)$$

(IC50) ist diejenige Konzentration des Antagonisten, die eine halbmaximale Hemmung ergibt, ([B]) ist die Konzentration des Blockers, (I_B) ist der Strom in Anwesenheit des Blockers, (I_K) ist der Kontrollstrom und (n) ist der Hill-Koeffizient.

Berechnung der kinetischen Parameter

Für die Bestimmung der Zeitkonstanten τ_{on} und τ_{off} wurden über die TIDA-Software den Stromsignalen bei Antagonistenapplikation und den Kontrollsignalen nach Antagonistenapplikation einzelne (bei einfachen off-rates) oder doppelte (bei off-rates mit zwei Zeitkonstanten) exponentielle Fits angepasst. Die Ratenkonstanten k_{on} und k_{off} wurden jeweils aus den in Abbildung 25 reziprok dargestellten Zeitkonstanten ermittelt. Der k_{on} Wert entspricht der Geradensteigung der $1/\tau_{on}$ Werte, der k_{off}-Wert entspricht dem Y-Achsenabschnitt der Geradenanpassung für die $1/\tau_{off}$ -Werte.

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante, welche eine Aussage über die Affinität einer Substanz zu einem Rezeptor macht, wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$K_D = k_{off}/k_{on} \quad (4)$$

(K_D) ist die Dissoziationskonstante, (k_{on}) die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion und (k_{off}) die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion.

Berechnung der Potentialabhängigkeit

Für die Berechnung der Potentialabhängigkeit wurde das Woodhull-Modell herangezogen.

$$I_B/I_K = 1/(1+[B]/K_{(0)}*\exp(-z\delta FV/RT)) \quad (5)$$

(I_B) und (I_K) sind die Ströme in An- und Abwesenheit des Blockers. ([B]) ist die Konzentration des Antagonisten Diphenhydramin. ($K_{(0)}$) ist die berechnete Dissoziationskonstante für den Antagonisten bei einem Potential von 0 mV. Die weiteren Terme bedeuten: (z) steht für die Ladung des Antagonisten (hier +1); (δ) gibt den Teil des transmembranären elektrischen Feldes an, den der Blocker passiert hat um an seine Bindungsstelle zu gelangen; δ ist ein Maß dafür, wie tief eine Substanz in eine Kanalpore eindringt. (F) steht für die Faraday-Konstante, (*V*) für das Membranpotential in Volt, (*R*) für die Gaskonstante und (T) für die absolute Temperatur.

Obige Gleichung (5) geht davon aus, dass der komplette Block potentialabhängig erfolgt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass mit dieser Gleichung die erhobenen Daten nicht optimal angefittet werden konnten. Da ein Teil des Blockes möglicherweise in potentialunabhängiger Weise erfolgte, wurde Gleichung (5) entsprechend abgeändert um dieser Situation gerecht zu werden. Der Anteil des potentialunabhängigen Blocks ist hier durch den Parameter (u) widergegeben.

$$I_B/I_K = (1-u)/(1+[B]/K_{(0)}*\exp(-z\delta FV/RT)) \quad (6)$$

Obwohl die erhobenen Daten mit dieser Gleichung auf den ersten Blick besser beschrieben werden konnten, stellte der ermittelte δ-Wert einen potentialunabhängigen Anteil des Blocks wieder in Frage. Daher wurde eine weitere Auswertung herangezogen, bei der Gleichung (5) in invertierter und linearisierter Form dargestellt wurde. Dies erlaubte eine bessere Abschätzung darüber, ob und wann sich eine Potentialabhängikeit ändert. Hierbei wird der natürliche Logarithmus von ($\ln(I_K/I_B - 1)$) gegen das Membranpotential aufgetragen (Donevan et al. 1992).

$$\ln(I_K/I_B - 1) = \ln([B]/K_{(0)}) - z\delta F/RT \times V \qquad (7)$$

Bei dieser Darstellung ergibt sich die Potentialabhängigkeit des Blocks (V^e) aus dem reziproken Wert der Geradensteigung, die mit linearer Regression ermittelt wird.

Die Berechnung des δ-Wertes (z=1) erfolgt anhand folgender Beziehung:

$$z\delta = (RT/F)/V^e \qquad (8)$$

Die in Gleichung (6, 7, 8) verwendeten Abkürzungen haben dieselbe Bedeutung wie oben beschrieben. V^e bezeichnet die Potentialdifferenz in Volt, die eine e-fache Änderung des Blocks ergibt.

2.4 Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz wurde überprüft mittels Varianzanalyse (ANOVA), wenn mehrere Gruppen miteinander verglichen wurden, oder mittels gepaartem t-Test, wenn zwei Ergebnisse direkt miteinander verglichen wurden. Bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 NMDA Signale

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Diphenhydramin auf NMDA-Rezeptoren untersucht. Für die Experimente wurden klonierte Rezeptoren verwendet, die in HEK-293 Zellen exprimiert wurden. Insgesamt wurden 1091 Messungen an 313 Zellen durchgeführt; die meisten davon mit den Rezeptor-untereinheiten GluN1/GluN2A. Sämtliche Experimente wurden in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung gemessen, da in der Regel NMDA-Rezeptoren bei negativem Membranpotential durch Magnesiumionen blockiert sind. D.h. selbst in Anwesenheit der Agonisten öffnet der Kanal nicht oder nur wenig. Erst bei gleichzeitiger ausreichender Depolarisation wird der Magnesiumblock überwunden. In magnesiumfreier Extrazellularlösung besteht dieser Block nicht, wodurch der Rezeptor auch bei negativem Membranpotential durch die Applikation der beiden Agonisten NMDA und Glycin aktiviert werden kann. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Messungen mit 50 µM NMDA und 10 µM des Coagonisten Glycin durchgeführt. Beide Konzentrationen liegen weit über der halbmaximal wirksamen Konzentration und erzielen somit eine nahezu vollständige Aktivierung des Rezeptors mit ausreichend großem Stromsignal, welches sich meist zweiphasig darstellte (Abb. 9). Den Anfang machte ein sehr schneller und großer Spitzenstrom, welchem ein schnell desensitivierendes Signal folgte, das sich letztendlich auf einem geringeren Plateauwert stabilisierte. Jedoch waren nicht alle Experimente identisch, es zeigte sich eine gewisse Variabilität. So gab es zum Beispiel ein paar wenige Messungen, bei denen kein Spitzenstrom zu beobachten war, es stellte sich gleich ein Plateauwert ein. Bei anderen wiederum wollte sich der Plateauwert in der zu messenden Zeit überhaupt nicht einstellen. Das Signal nahm auch bei längerer Agonistenapplikation kontinuierlich ab. Unter den Standardbedingungen (50 µM NMDA/10 µM Glycin) variierte der Plateauwert zwischen 181 pA und 1879 pA. Der Mittelwert für die GluN1/GluN2A Untereinheiten lag bei 772 ± 498 pA (n=32).

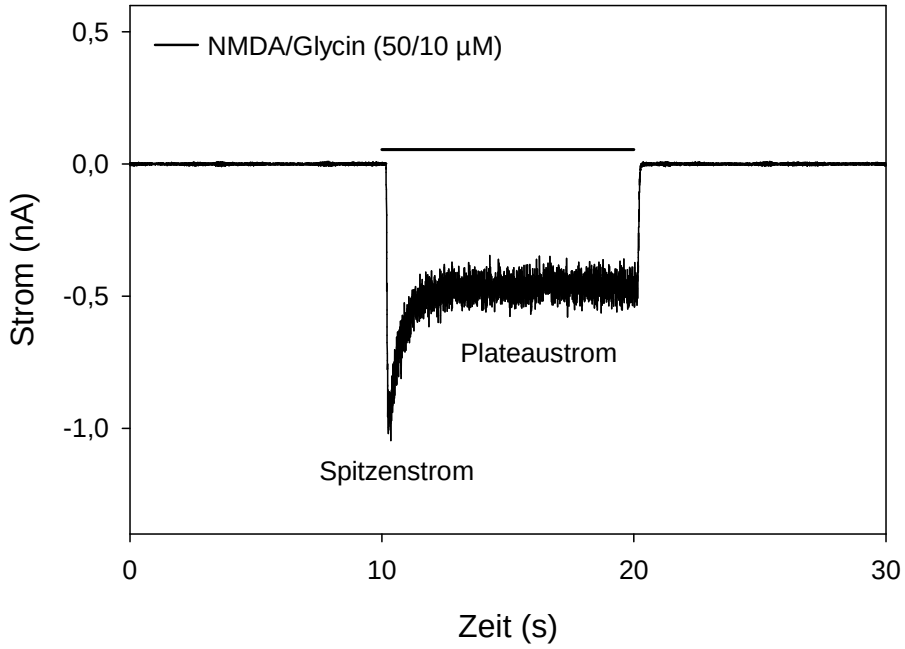

Abbildung 9: Beispielmessung für einen NMDA-induzierten Ionenstrom. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf eines typischen Signals, das durch Zugabe von 50 µM NMDA und 10 µM Glycin für 10 Sekunden entstanden ist. Unmittelbar nach Agonistenapplikation nimmt der Strom sehr schnell zu und erreicht einen Maximalwert (Spitzenstrom). Mit weiterer Agonistenapplikation wird der Strom wieder kleiner und nimmt dann einen konstanten Wert an (Plateaustrom). Die Messung wurde bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt. Die Zeit ist in Sekunden (s) und die Stromamplitude in Nanoampère (nA) aufgetragen.

3.1.1 Konzentrationswirkungskurve für NMDA

Für die NMDA-Konzentrationswirkungskurve wurde zunächst ein Messprotokoll mit aufsteigenden Konzentrationen von 0,3 bis 300 µM NMDA entworfen. Dabei war mit zunehmender NMDA-Konzentrationen, bei konstanter Glycinkonzentration von 10 µM, ein kontinuierlich größer werdender Plateaustrom zu beobachten (Abb. 10 A). Bei 0,3 µM NMDA war ein durchschnittlicher Strom von 9,2 ± 9,2 pA zu erkennen, bei 300 µM NMDA von 982,3 ± 536,1 pA (*n*=16). Da bei diesem Messprotokoll aufgrund technischer Gegebenheiten keine weiteren NMDA-Konzentrationen zusätzlich gemessen werden konnten, wurde ein weiteres Protokoll mit NMDA-Konzentrationen bis 1000 µM erstellt, um zu sehen, wie sich das NMDA-Signal bei noch größeren Konzentrationen verhält. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten, wurde aber bei der Konzentrationssteigerung von

100 auf 1000 µM NMDA lediglich nur noch der Spitzenstrom größer, der Plateaustrom selbst änderte sich nicht mehr signifikant (*n*=13; Abb. 10 B). Wie aus den Beispielmessungen hervorgeht, sind die Abstände zwischen den einzelnen Agonistenapplikationen nicht immer gleich lang. Damit sich die Rezeptoren nach Substanzappplikation wieder ausreichend erholen konnten, war es bei kleineren Konzentrationen (0,3 oder 1 µM NMDA) ausreichend nur für 30 Sekunden mit Puffer zu spülen; bei größeren Konzentrationen (300 oder 1000 µM NMDA) musste für 60 Sekunden gespült werden.

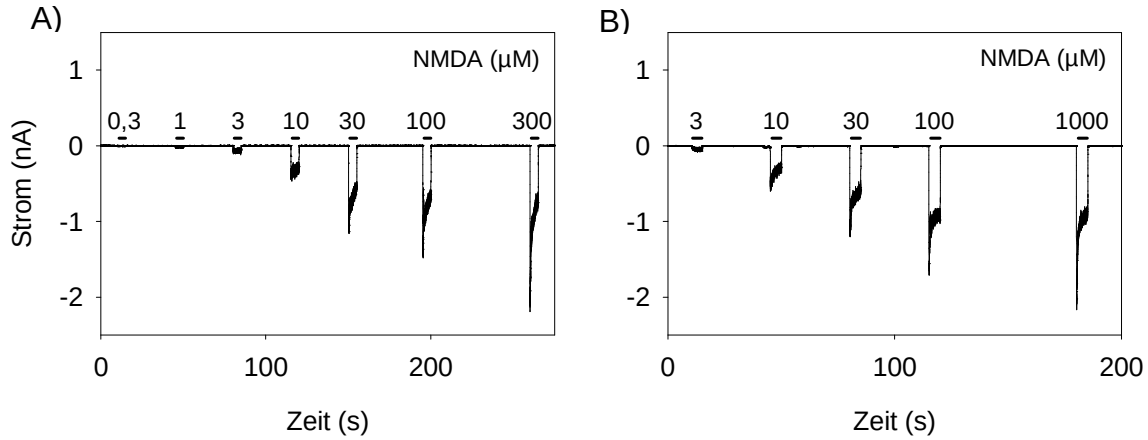

Abbildung 10: Stromsignale bei unterschiedlichen NMDA-Konzentrationen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf (s) der Stromsignale (nA) bei Applikation von NMDA im Konzentrationsbereich von 0,3 bis 300 µM (A) und von 3 bis 1000 µM (B). Die Glycinkonzentration wurde bei 10 µM konstant gehalten. Die Agonisten NMDA und Glycin wurden für jeweils 5 Sekunden appliziert. Zwischen den einzelnen Applikationen wurde für mindestens 30 Sekunden mit Puffer gespült. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt.

Aus den gemessenen Stromsignalen der unterschiedlichen MNDA-Konzentrationen wurde zunächst eine Konzentrationswirkungskurve für den Bereich von 0,3 bis 300 µM erstellt. Hierzu wurden die einzelnen Signale normiert. Als Bezugspunkt dienten die Werte für 300 µM, die den Wert 1 erhielten. Aus diesem Grund ist bei dem normalisierten Plateaustrom für 300 µM auch keine Standardabweichung dargestellt. Die NMDA-Signale der übrigen Konzentrationen wurden anschließend auf diesen Wert bezogen. Für die Erweiterung der Konzentrationswirkungskurve auf 1000 µM NMDA wurden die jeweiligen Werte von 100 µM

NMDA als neuer Bezugspunkt verwendet. Die Konzentrationswirkungskurve zeigt den in Abb. 11 dargestellten Verlauf. Die Stromsignale nehmen mit steigender Konzentration von 0,3 bis 300 µM NMDA kontinuierlich zu. Das Signal bei 1000 µM NMDA fällt allerdings bereits wieder leicht ab. Aus den dargestellten Werten wurde nun für NMDA mit Hilfe der Hill-Gleichung die halbmaximal effektive Konzentration (EC_{50} = 18,3 ± 1,5 µM) sowie der Hill-Koeffizient (n = 1,2) berechnet.

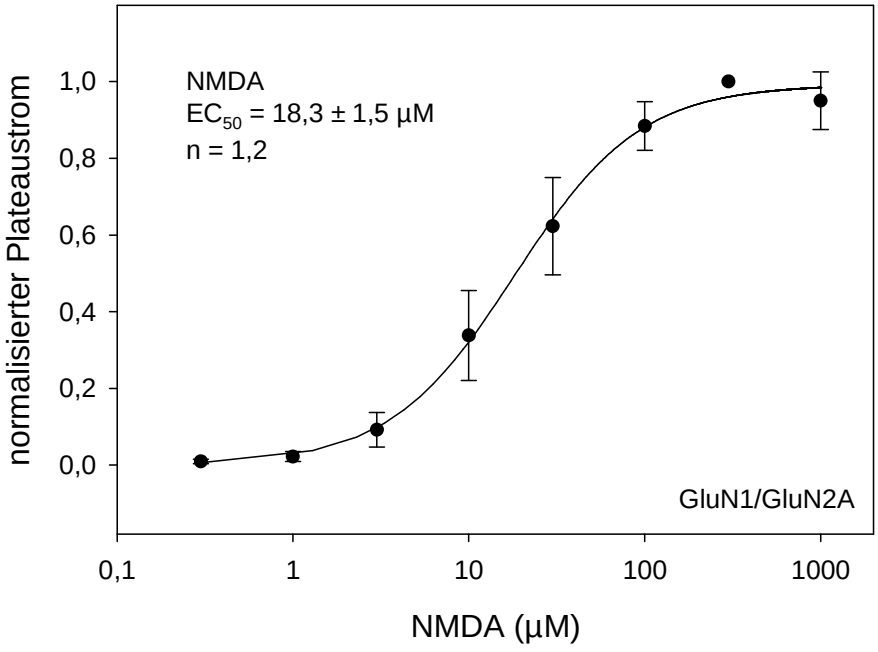

Abbildung 11: NMDA-Konzentrationswirkungskurve für den Wildtyp GluN1/GluN2A. Dargestellt ist der auf 1 normierte Plateaustrom in Abhängigkeit der NMDA-Konzentration. NMDA wurde im Bereich von 0,3 bis 1000 µM variiert, wobei die Glycinkonzentration bei 10 µM konstant gehalten wurde. Die Daten wurden auf die Stromamplitude normiert, die für 300 µM NMDA erreicht worden war. Diese entspricht somit 100 Prozent und besitzt daher selbst keine Standardabweichung. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt. Die vertikalen Balken zeigen die Standardabweichungen an.

3.2 Hemmwirkung von Diphenhydramin

3.2.1 Eigenwirkung

Um zu sehen, ob Diphenhydramin auch in Abwesenheit der Agonisten eine Wirkung am Rezeptor zeigt, wurde Diphenhydramin in einer Konzentration von 30 µM allein ohne gleichzeitige Applikation von NMDA und Glycin appliziert. Darunter war kein Stromfluss zu beobachten (I < 4 pA; *n*=7). Es war lediglich zu erkennen, dass sich die „Null-Linie“ des Stromes minimal verbreiterte (Abb. 12).

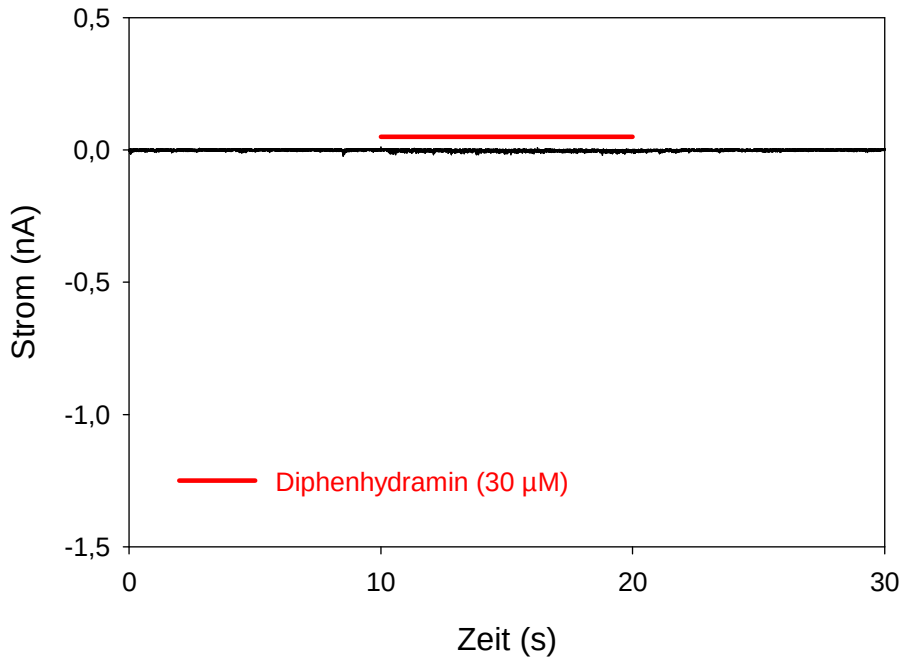

Abbildung 12: Eigenwirkung von Diphenhydramin. Dargestellt ist die Applikation von 10 Sekunden Puffer, 10 Sekunden Diphenhydramin (30 µM) und 10 Sekunden Puffer. Die Messung wurde bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt. Aufgetragen wurde das Stromsignal (nA) gegen die Zeit (s). Es wurde die gleiche Skalierung der Y-Achse wie in Abb. 13 verwendet.

3.2.2 Beispielmessung

Um ein geeignetes Messprotokoll für die Bestimmung der Diphenhydramin-hemmung anzufertigen, wurden zunächst einige Probemessungen mit Diphenhydramin durchgeführt um einen Eindruck davon zu bekommen wie stark Diphenhydramin hemmt. Das Protokoll umfasste zunächst 2 Kontrollwerte für NMDA um zu überprüfen ob das Kontrollsignal einen konstanten Wert annimmt. Darauf folgte dann die Kombinationszugabe von Agonist und Diphenhydramin (33 µM). Zum Schluss erfolgten nochmals eine oder zwei Agonistenapplikationen. Die Substanzen wurden jeweils für 10 Sekunden appliziert; dazwischen wurde für 30 Sekunden mit Puffer gespült (Abb. 13). Wenn 2 Kontrollwerte nach der Diphenhydraminapplikation appliziert worden waren, war zudem zu beobachten, dass sich der Spitzenstrom des ersten Kontrollwertes nach Diphenhydramin-zugabe meist noch nicht ganz erholt hatte. Dies war meistens erst bei dem zweiten Kontrollwert der Fall (ohne Abb.). Im Gegensatz dazu war aber der Plateaustrom bereits schon bei dem ersten Kontrollwert nach der Diphen-hydraminzugabe vollständig erholt. Da sich die Wirkung von Diphenhydramin nicht unmittelbar, sondern zeitabhängig entwickelte, wurde beschlossen, nur die Wirkung auf den Plateaustrom auszuwerten. Somit wurde ein Kontrollwert nach der Antagonistenapplikation als ausreichend betrachtet. Für die Auswertung wurden, wie in Abb. 13 dargestellt, die Amplituden der Plateauströme der Diphenhydraminapplikation (I_D) sowie der Kontrollen direkt vor und nach der Diphenhydraminapplikation (I_{KV}, I_{KN}) herangezogen. Grund dafür, dass die Antagonistenapplikation gleich in Relation zu zwei Kontrollen gesetzt wurde, war, dass bei mehreren NMDA-Applikationen hintereinander ein leichter run-down der Signale zu beobachten war, zudem die Diphenhydraminhemmung aber nach einer Kontrolle bereits schon wieder vollständig erholt war. Die Hemmwirkung von Diphenhydramin wurde dann anhand folgender Formel bestimmt: relativer Reststrom $(I_{rel}) = I_D / ((I_{KV} + I_{KN}) / 2)$.

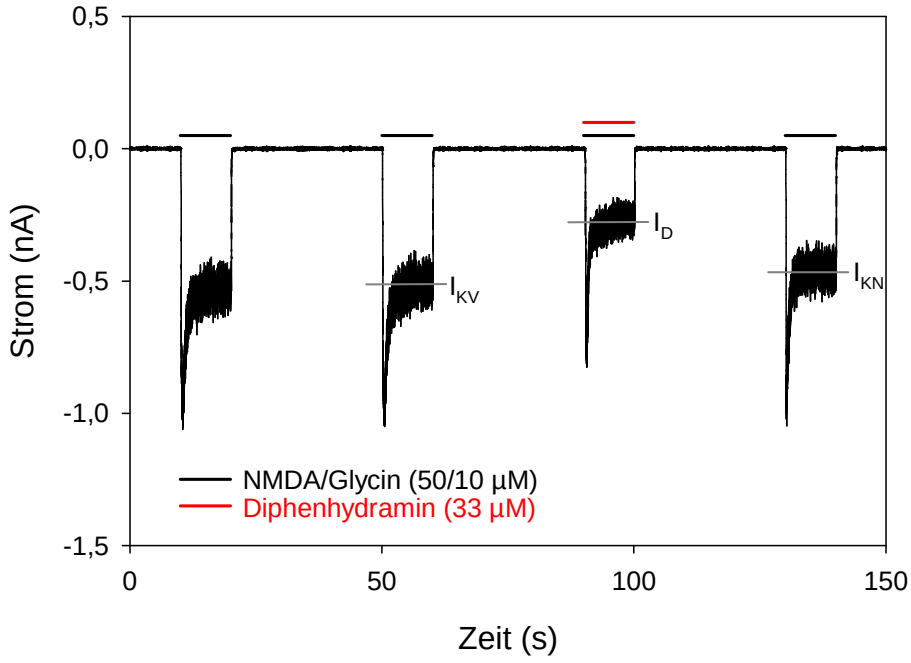

Abbildung 13: Beispielmessung der Hemmwirkung von Diphenhydramin. Die Substanzen, NMDA (50 µM) + Glycin (10 µM) ± Diphenhydramin (33 µM), wurden jeweils für 10 Sekunden appliziert. Dazwischen wurde für 30 Sekunden mit Puffer gespült. Die Messung wurde bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Amplituden der Plateauströme herangezogen (waagrechte graue Linien). I_D beschreibt die Plateaustromamplitude der Coapplikation von Agonist und Diphenhydramin, I_{KV} die des Kontrollsignals direkt vor und I_{KN} die des Kontrollsignals direkt nach der Coapplikation von Agonist und Diphenhydramin. Aufgetragen ist das Stromsignal (nA) gegen die Zeit (s).

3.2.3 Konzentrationswirkungskurven bei GluN2A und GluN2B

Im Folgenden wurden für die Rezeptoruntereinheitenkombinationen GluN1/ GluN2A und GLuN1/GluN2B Konzentrationswirkungskurven für Diphenhydramin im Bereich von 1 bis 300 µM bei einem Haltepotential von -80 mV erstellt (Abb. 14). Bei beiden Rezeptorwildtypen nahm der Strom mit steigender Konzentration von Diphenhydramin kontinuierlich ab. Der Verlauf der beiden Kurven ist ähnlich, wobei die Kurve für den Wildtyp GluN1/GluN2B (*n*=7) etwas flacher verlief als die für den Wildtyp GluN1/GluN2A *(n=6).* Bei der kleinsten Diphenhydraminkonzentration (1 µM) nahm der Strom bei GluN1/GluN2A um durchschnittlich 6,5 ± 4,0 % und bei GluN1/GluN2B um 11,8 ± 3,4 % gegenüber der Kontrolle ab. Bei der größten Konzentration (300 µM) entwickelte sich bei GluN1/GluN2A eine

durchschnittliche Hemmung von 92,7 ± 3,9 % und bei GluN1/GluN2B von 91,1 ± 3,0 %. Die Datenauswertung anhand der Hill-Gleichung ergab für GluN1/GluN2A eine halbmaximal wirksame Hemmkonzentration (IC_{50}) von 24,4 ± 2,1 µM mit einem Hill-Koeffizienten (n) von 0,86. Die entsprechenden Werte für GluN1/ GluN2B waren IC_{50} = 24,6 ± 2,7 µM und n = 0,73.

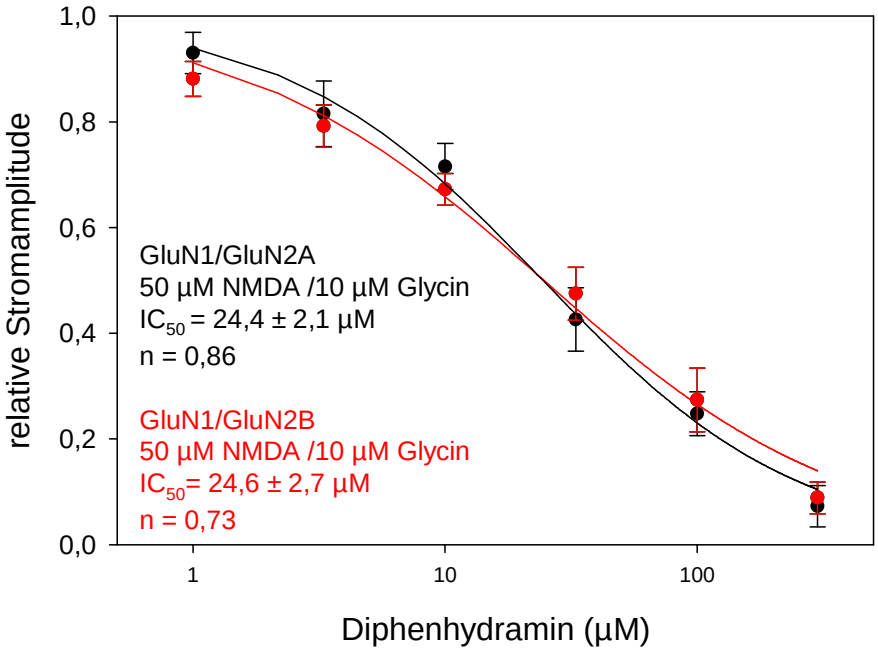

Abbildung 14: Konzentrationswirkungskurven von Diphenhydramin für die Rezeptor-wildtypen GluN1/GluN2A und GluN1/GluN2B. Dargestellt ist die auf 1 normierte relative Stromamplitude in Abhängigkeit der Diphenhydraminkonzentration im Bereich von 1 bis 300 µM. Die NMDA- bzw. Glycinkonzentration wurde bei 50 bzw. 10 µM konstant gehalten. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an den Rezeptoruntereinheitenkombinationen GluN1/GluN2A und GluN1/GluN2B durchgeführt. Die vertikalen Balken stellen die Standardabweichungen dar.

3.2.4 Hemmwirkung bei GluN2C und GluN2D

Um insgesamt zu beurteilen, ob die Wirkung von Diphenhydramin von der Rezeptoruntereinheit abhängig ist, sollten auch Messungen mit den Untereinheiten GluN2C und GluN2D durchgeführt werden. Es ist jedoch nicht gelungen verwertbare Ergebnisse mit diesen Rezeptoruntereinheiten zu erzielen,

da Rezeptoren mit diesen Untereinheiten eine sehr geringe Offenwahrscheinlichkeit aufweisen, wodurch für die Erstellung von Konzentrationswirkungskurven zu kleine Stromsignale resultieren. Daher wurden die Messungen an GluN2C und GluN2D in Kombination mit einer mutierten und modifizierten GluN1-Untereinheit durchgeführt. Wird nämlich bei der GluN1-Untereinheit die Aminosäure Alanin an Position 7 des SYTANLAAF-Motivs in der Transmembrandomäne 3 durch Cystein ersetzt (GluN1_A652C) und anschließend in Gegenwart der Agonisten das Thiol-modifizierende Reagenz MTSEA appliziert, entstehen dauerhaft geöffnete Kanäle. Auf diese Weise sollten dann auch bei diesen Untereinheiten Signale mit ausreichender Stromamplitude generiert werden können. Für die Experimente wurde ebenfalls eine magnesiumfreie, aber calciumärmere Extrazellularlösung (0,3 mM) verwendet. Die verminderte Calciumkonzentration sollte zusätzlich zu einer Steigerung der Signalamplitude beitragen. Um zu prüfen, ob die Mutation und Modifikation per se einen Einfluss auf die Hemmwirkung von Diphenhydramin hat, wurde auch die GluN2A Untereinheit mit GluN1_A652C kombiniert. Für die Modifikation wurde MTSEA (0,4 mM) für 60 Sekunden appliziert (ohne Abb.). Anschließend wurde auf magnesiumhaltige Lösung (5 mM) gewechselt um die Kanäle wieder zu schließen (Abb. 15). Daraufhin wurde das Messprotokoll mit einer 10 Sekunden langen Agonistenapplikation gestartet. Es folgten für jeweils 10 Sekunden die Kombinationszugaben von Agonist und Antagonist mit Diphenhydraminkonzentrationen von 10, 33 und 100 µM. Danach folgte nochmals eine Agonistenapplikation für 10 Sekunden (Abb. 15). Zum Schluss wurden die Kanäle erneut mit Magnesium geschlossen (Abb. 15). Die Durchführung dieser Experimente erwies sich jedoch z.T. als relativ schwierig, da die Zellen häufig vor Ende eines Messdurchlaufes kaputt gingen. Zudem waren die Stromamplituden der einzelnen Rezeptoruntereinheiten unerwarteterweise sehr variabel. Die Zellen der Kontroll-Untereinheit GluN2A waren relativ stabil und zeigten auch sehr große Stromamplituden, durchschnittlich 4047 ± 2332 pA (n=6). Bei den Zellen der Untereinheit GluN2C betrug die durchschnittliche Stromamplitude 1364 ± 523 pA. Möglicherweise ist hier die Modifikation nicht so gut gelungen (n=5). Dennoch gingen sie gut zu messen. Sie waren sehr stabil und hielten mehrere Messungen hintereinander durch. Die Zellen der Untereinheit GluN2D waren noch schlechter modifiziert. Es zeigte sich lediglich noch ein durchschnittlicher Strom von 444 ±

403 pA (*n*=8). Diese Zellen waren schlecht zu messen und hielten nicht lange durch.

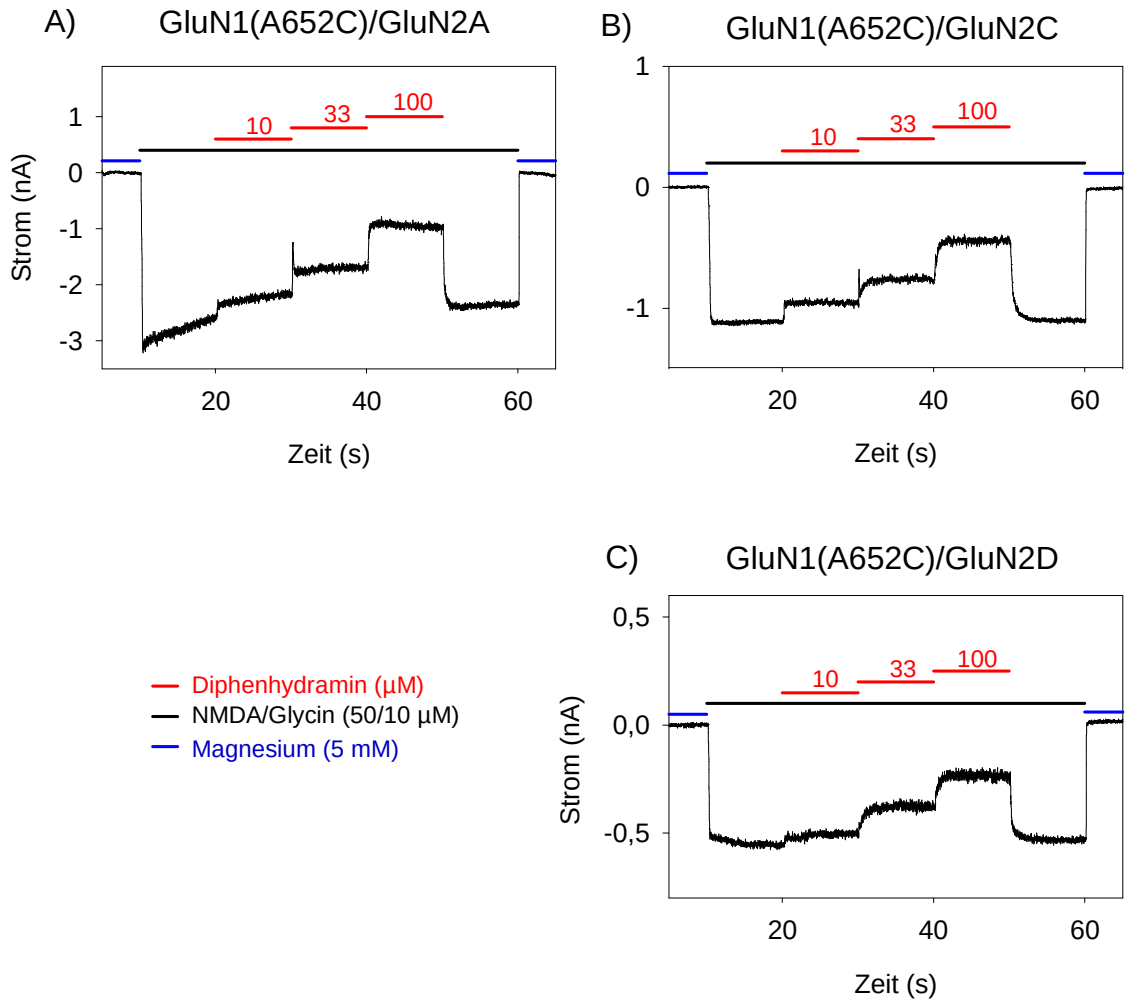

Abbildung 15: Hemmwirkung von Diphenhydramin bei GluN2A, GluN2C und GluN2D in Kombination mit GluN1(A652C). Das eigentliche Messprotokoll startete mit einer 10 Sekunden langen Agonistenapplikation. Danach folgten für jeweils 10 Sekunden Kombinationszugaben von Agonist und Antagonist mit drei unterschiedlichen Diphenhydraminkonzentrationen. Zuletzt folgte nochmals eine Agonistenapplikation für 10 Sekunden. Die Konzentrationen von NMDA und Glycin wurden bei 50 µM und 10 µM konstant gehalten, die Diphenhydraminkonzentrationen variierten zwischen 10, 33 und 100 µM. Die zuvor durch MTSEA modifizierten und dadurch dauerhaft geöffnete Kanäle wurden vor Beginn und nach Ende des Messprotokolls durch Magnesiumapplikation geschlossen. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien, aber calciumärmeren (0,3 mM) Extrazellularlösung an den Mutationen GluN1(A652C)/GluN2A (A), GluN1(A652C)/GluN2C (B) und GluN1(A652C)/GluN2D (C) durchgeführt. Aufgetragen wurde das Stromsignal (nA) gegen die Zeit (s).

Es hat sich gezeigt, dass die Mutation und die Modifikation einen erheblichen Einfluss auf die Hemmwirkung von Diphenhydramin haben, da die Hemmung bei GluN1(A652C)/GluN2A deutlich geringer ausfiel, als beim entsprechenden Wildtyp. Somit war kein direkter Vergleich unter den verschiedenen Untereinheiten möglich. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse, die mit der mutierten und modifizierten GluN1-Untereinheit in Kombination mit GluN2A, GluN2C oder GluN2D erzielt wurden, so ist festzustellen, dass die Hemmwirkung von Diphenhydramin bei allen drei Rezeptorkombinationen in etwa gleich stark war (Abb. 16). Die entsprechenden Hemmwerte für die Rezeptoruntereinheiten waren bei GluN2A, GluN2C und GluN2D bei 10 µM Diphenhydramin 11,4 ± 4,0 %, 14,5 ± 4,4 % und 11,2 ± 3,5 %, bei 33 µM Diphenhydramin betrug die Hemmung 25,9 ± 9,2 %, 30,6 ± 3,8 % und 28,7 ± 4,8 % und bei 100 µM Diphenhydramin lag die Hemmung bei 53,2 ± 13,1 %, 56,7 ± 3,7% und 54,0 ± 7,5 %. Die nach der Hill-Gleichung berechnete IC_{50} lag bei den einzelnen Untereinheiten bei 89,6 ± 5,7 µM (*n*=5), 76,2 ± 4,4 µM (*n*=6) und 84,7 ± 3,6 µM (*n*=8). Im Vergleich dazu zeigte sich bei dem Wildtyp GluN1/GluN2A eine Hemmung von 28,5 ± 4,4 %, 57,4 ± 6,0 % und 75,2 ± 4,1 % (bei 10, 33 und 100 µM Diphenhydramin). Die IC_{50} betrug 24,4 ± 2,1 µM (*n*=6).

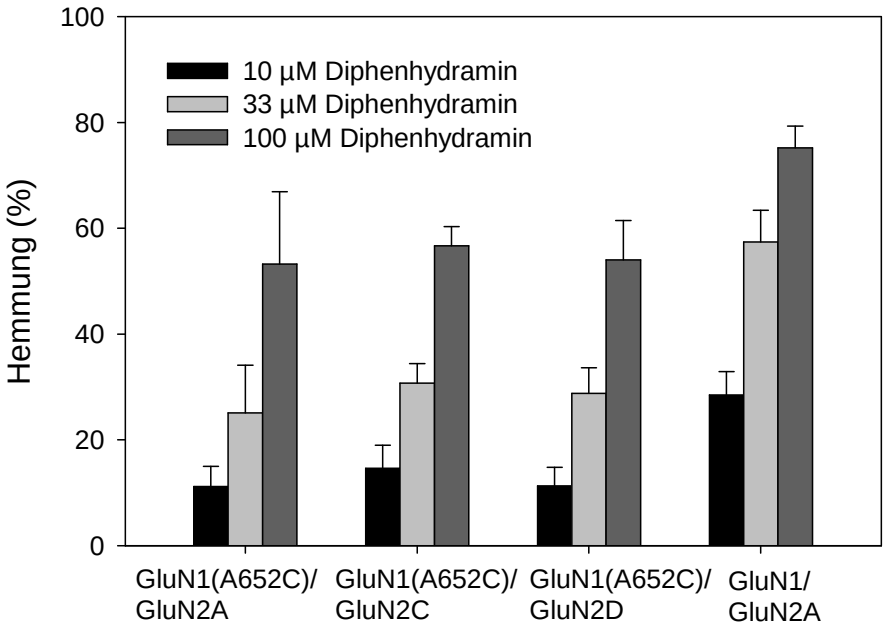

Abbildung 16: Hemmwirkung von Diphenhydramin bei verschiedenen GluN2-Untereinheiten in Kombination mit GluN1-Mutante (A652C) und GluN1/GluN2A Wildtyp. Dargestellt ist die Hemmwirkung in Prozent bei 10, 33 und 100 µM Diphenhydramin auf die Rezeptoruntereinheitenkombinationen GluN1(A652C)/GluN2A, GluN1(A652C)/GluN2C, GluN1(A652C)/GluN2D und GluN1/GluN2A. Die NMDA- und Glycinkonzentrationen wurden bei 50 und 10 µM konstant gehalten. Die dünnen vertikalen Balken stellen die Standardabweichungen dar. Die Messungen der Mutationen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien, aber calciumärmeren (0,3 mM) Extrazellularlösung an den Mutationen GluN1(A652C)/GluN2A, GluN1(A652C)/GluN2C, GluN1(A652C)/GluN2D durchgeführt. Die Messung des Wildtyps wurde bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt.

Wirkung von Diphenhydramin in Abwesenheit der Agonisten

Obwohl bei permanent geöffneten Ionenkanälen kein Agonist erforderlich ist um den Kanal zu aktivieren, kann die Wirkung eines Blockers nach MTSEA-Modifikation dennoch davon abhängen, ob bei den Messungen ein Agonist vorhanden ist oder nicht. Ob dies auch für Diphenhydramin zutrifft, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurde ein weiteres Messprotokoll entworfen, bei dem die Kanäle durch den Wechsel von Magnesiumionen auf Puffer geöffnet wurden. Nun wurde für 10 Sekunden Diphenhydramin (100 µM) appliziert. Hernach wurde wieder auf Puffer und dann auf Magnesiumlösung gewechselt. Im Einzelnen war in Kombination mit GluN1(A652) bei GluN2A die Hemmwirkung um 7 % kleiner

(*n*=5), bei GluN2C um 9 % größer und bei GluN2D um 2 % kleiner (*n*=8) als bei den entsprechenden Untersuchungen mit Agonist. Es hat sich somit gezeigt, dass die Hemmwirkung von Diphenhydramin nicht wesentlich davon abhängt, ob die Untersuchungen in An- oder Abwesenheit der Agonisten durchgeführt werden.

3.3 Einfluss der NMDA-Konzentration

In diesem Kapitel wurde untersucht, ob die Hemmwirkung von Diphenhydramin von der NMDA-Konzentration abhängt. Die Experimente dazu wurden als Einzelmessungen durchgeführt, die bereits in Kapitel 3.2.2 genauer erläutert wurden. Unter den Standardbedingungen wurde als geeignete Diphenhydramin-konzentration mit 30 µM die ungefähr halbmaximal wirksame Konzentration ausgewählt. Aus den Messdaten wurde dann eine Konzentrationswirkungskurve erstellt, die zusammen mit der NMDA-Konzentrationswirkungskurve aus Kapitel 3.1 in eine gemeinsame Abbildung eingezeichnet wurde. Die Konzentrations-wirkungskurve für NMDA + Diphenhydramin zeigte im Gegensatz zu der für NMDA einen etwas verzögerten Anstieg und eine um etwa die Hälfte tiefer liegende Sättigungsgrenze (Abb. 17). Aus der Konzentrationswirkungskurve für NMDA + Diphenhydramin ließ sich für NMDA mit Hilfe der Hill-Gleichung eine halbmaximal effektive Konzentration (EC_{50}) von 14,6 ± 1,7 µM und ein Hill-Koeffizient (n) von 1,3 berechnen (*n*=7). Diese Werte stimmen gut mit den ermittelten Werten in Abwesenheit von Diphenhydramin (EC_{50} = 18,3 ± 1,5 µM; n = 1,2) überein. Da die Hemmwirkung mit zunehmender Agonistenkonzentration nicht abnahm und zudem die halbmaximale Aktivierung des Rezeptors nicht verändert wurde, wirkt Diphenhydramin am NMDA-Rezeptor als nicht-kompetitiver Antagonist.

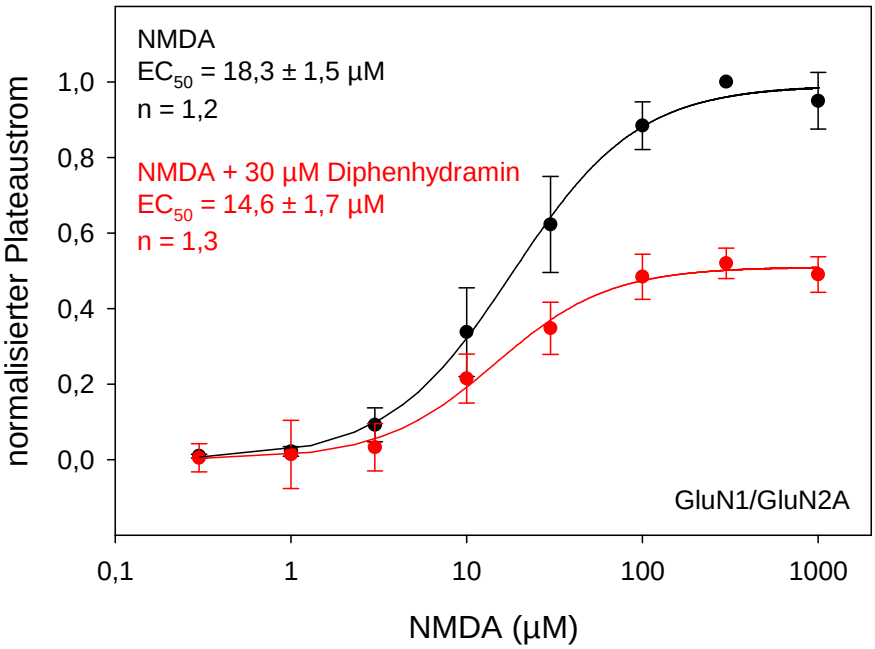

Abbildung 17: Konzentrationswirkungskurven für NMDA in An- und Abwesenheit von Diphenhydramin. Dargestellt ist der auf 1 normierte Strom in Abhängigkeit der NMDA-Konzentration. NMDA wurde im Bereich von 0,3 bis 1000 µM variiert, wobei die Glycin- bzw. Diphenhydraminkonzentration bei 10 bzw. 30 µM konstant gehalten wurde. Die Daten der NMDA-Konzentrationswirkungskurve wurden auf die Stromamplitude normiert, die für 300 µM NMDA erreicht worden waren. Diese entspricht somit 100 Prozent und besitzt daher selbst keine Standardabweichung. Die Experimente wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt. Die vertikalen Balken zeigen die Standardabweichungen an.

Da aus Abbildung 17 nicht ersichtlich wurde, ob möglicherweise ein unkompetitiver Antagonismus vorliegt, bei dem die Hemmwirkung des Blockers mit steigender Agonistenkonzentration zunimmt, wurden die Daten nochmals auf andere Weise dargestellt. Unter Einbeziehung aller Daten nahm, wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, mit zunehmender Agonistenkonzentration die Hemmwirkung von Diphenhydramin zu. Allerdings war der Kurvenverlauf nur gering ansteigend. Würde der erste Wert bei 0,3 mM NMDA aufgrund der sehr kleinen Konzentration und der dadurch bedingten schwierigen Auswertung von kleinen Stromsignalen außer Acht gelassen werden, würde die Zunahme der Hemmwirkung deutlich schwächer ausfallen. Im Allgemeinen war die Hemmwirkung bei den kleinen Agonistenkonzentrationen (0,3-3 µM) schwer zu messen bzw. die extrem kleinen Stromsignale nur ungenau auszuwerten, weshalb auch aufgrund der sehr

heterogenen Ergebnisse nochmals nachgemessen wurde. Doch die nachgemessenen Daten waren ähnlich. Die Frage nach einem unkompetitiven Antagonismus kann somit aus den Daten nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

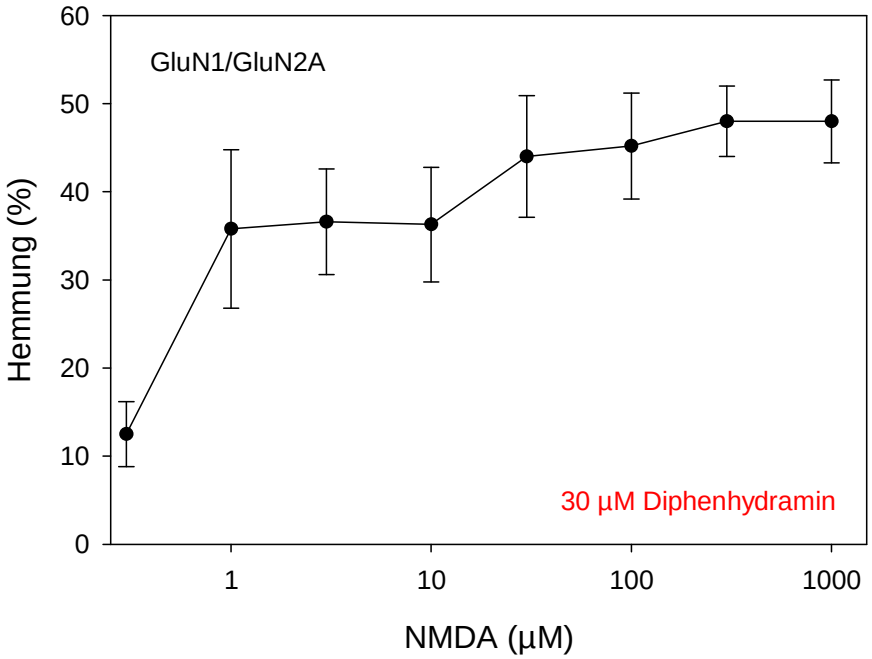

Abbildung 18: Einfluss der NMDA-Konzentration auf die Hemmwirkung von Diphenhydramin. Aufgetragen wurde die Hemmung (%) gegen die NMDA-Konzentration (µM). NMDA wurde im Bereich von 0,3 bis 1000 µM variiert, die Glycin- bzw. Diphenhydraminkonzentration wurde bei 10 bzw. 30 µM konstant gehalten. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt. Die vertikalen Balken geben die Standardabweichungen an.

3.4 Einfluss der Glycinkonzentration

In gleicher Weise, wie für die Glutamat-Bindungsstelle, wurde im Folgenden untersucht, ob Diphenhydramin mit der Glycin-Bindungsstelle interagiert. Um dies beantworten zu können, wurden Einzelmessungen mit 50 µM NMDA als Agonisten, mit 30 µM Diphenhydramins als Antagonisten und mit vier verschiedenen Glycinkonzentrationen (0,3, 1, 10 und 100 µM) als Coagonisten durchgeführt. Dem 10 Sekunden langen Kontrollsignal folgte gleich im Anschluss eine Kombinationszugabe von Agonist und Diphenhydramin für 20 Sekunden.

Anschließend kam nochmals ein Kontrollsignal für ebenfalls 20 Sekunden (Abb. 19). Zur Auswertung wurden alle gemessenen Daten herangezogen, ausschließlich derer, deren Signale <50 pA betrugen und deren Kontrollsignale (vor und nach Diphenhydraminapplikation) um >15 % differierten.

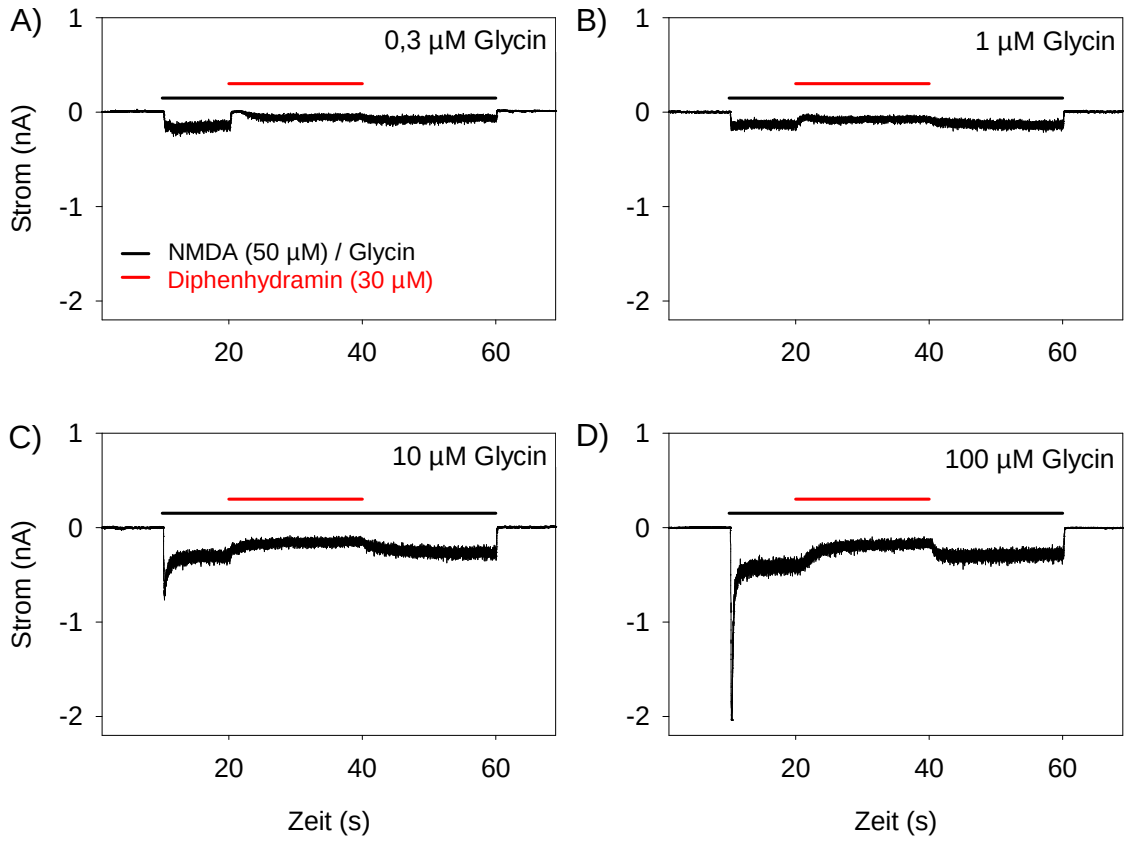

Abbildung 19: Einfluss der Glycinkonzentration auf die Hemmwirkung von Diphenhydramin. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf (s) der Stromsignale (nA) bei Applikation jeweils unterschiedlicher Glycinkonzentrationen: 0,3 µM (A), 1 µM (B), 10 µM (C) und 100 µM (D). Die NMDA- bzw. Diphenhydraminkonzentration wurde bei 50 bzw. 30 µM konstant gehalten. Das Messprotokoll startete mit einem 10 Sekunden langen Kontrollsignal. Anschließend folgte die Kombinationszugabe von Agonist und Diphenhydramin für 20 Sekunden. Zuletzt wurde nochmals ein Kontrollsignal für 20 Sekunden generiert. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt.

Bei den Experimenten wurde beobachtet, dass mit ansteigender Glycinkonzentration im Allgemeinen der Strom, sowohl im Hinblick auf den Spitzenstrom, als auch auf den Plateauwert, stetig zunahm. In Bezug auf die Hemmwirkung des Diphenhydramins war allerdings mit steigender Glycinkonzentration keine Veränderung der Hemmwirkung sichtbar (Abb. 20). Der relative Reststrom variierte zwischen 51,2 ± 8,2 % (bei 100 µM Glycin) und 58,7 ± 3,8 % (bei 1 µM Glycin) (*n*=8). Bei 0,3 µM Glycin war die Hemmung größer als bei 1 und 10 µM Glycin. Aufgrund dieser variablen Ergebnisse wurde mit Hilfe statistischer Tests die Irrtumswahrscheinlichkeit dieser Ergebnisse berechnet. Mit einem p-Wert von > 0,05 sind die Daten statistisch nicht signifikant verschieden. Da die Hemmwirkung nicht mit der Glycinkonzentration variiert, ist es unwahrscheinlich, dass Diphenhydramin über die Glycin-Bindungsstelle mit dem NMDA-Rezeptor interagiert.

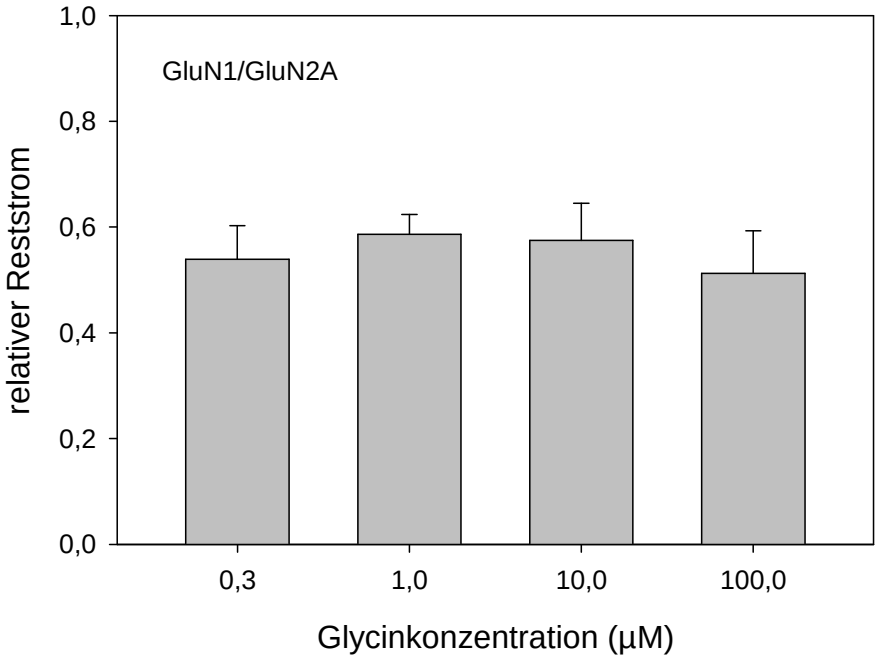

Abbildung 20: Einfluss der Glycinkonzentration auf die Hemmwirkung von Diphenhydramin beim Wildtyp GluN1/GluN2A. Dargestellt ist der auf 1 normierte Reststrom in Abhängigkeit der Glycinkonzentration. Die NMDA- bzw. Diphenhydraminkonzentration wurde bei 50 bzw. 30 µM konstant gehalten, die Glycinkonzentration variierte zwischen 0,3, 1, 10 und 100 µM. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt. Die vertikalen Balken stellen die Standardabweichungen dar.

3.5 Einfluss der Rezeptoraktivierung

Um zu sehen, ob die Interaktion von Diphenhydramin mit dem NMDA-Rezeptor gebrauchsabhängig (use-dependent) ist, wurden verschiedene Messprotokolle angefertigt, bei denen 11 Applikationen in Folge appliziert wurden. Das erste Protokoll bestand lediglich aus Kontrollsignalen (50 µM NMDA + 10 µM Glycin). Bei dem zweiten Protokoll wurde zusätzlich von Signal drei bis sechs Diphenhydramin coappliziert (Abb. 21). Bei den ersten Experimenten wurden die Substanzen für jeweils eine Sekunde appliziert, bei weiteren Messungen für jeweils zwei Sekunden. Damit sich die Rezeptoren ausreichend erholen konnten, wurde zwischen den einzelnen Applikationen jeweils für 30 Sekunden mit Puffer gespült. Bei den Messungen wurde die Diphenhydraminkonzentration auf 100 µM festgelegt, um eine deutliche Hemmung zu erhalten, was wiederum eine leichtere Auswertung ermöglichte.

Unter repetitiver Stimulation mit den Agonisten zeigten sich in etwa konstant bleibende Plateauwerte von durchschnittlich 845 ± 386 pA (n=7). Eine geringe Desensitivierung der Signale war gelegentlich zu beobachten. Unter der zusätzlichen repetitiven Stimulation mit Diphenhydramin zeigte sich eine rapide Entwicklung der Diphenhydraminhemmung, was sich in einer raschen Abnahme der Plateauwerte widerspiegelte. Bei der ersten Diphenhydraminapplikation war zwar der Spitzenstrom noch nahezu ungehemmt, der Plateaustrom ließ allerdings schon eine deutliche Hemmung erkennen (Abb. 21 E). Das zweite Signal unter Diphenhydraminapplikation wies dann bereits die maximale Hemmung, die unter 100 µM Diphenhydramin eintrat, mit durchschnittlich 60,6 ± 6,2 % auf (n=7). Bei der dritten und vierten Applikation vergrößerte sich die Hemmung nicht mehr, sie nahm gelegentlich wieder minimal ab. Nach Wegnahme des Antagonisten wurde der Ausgangswert unmittelbar wieder erreicht (n=7; Abb. 22).

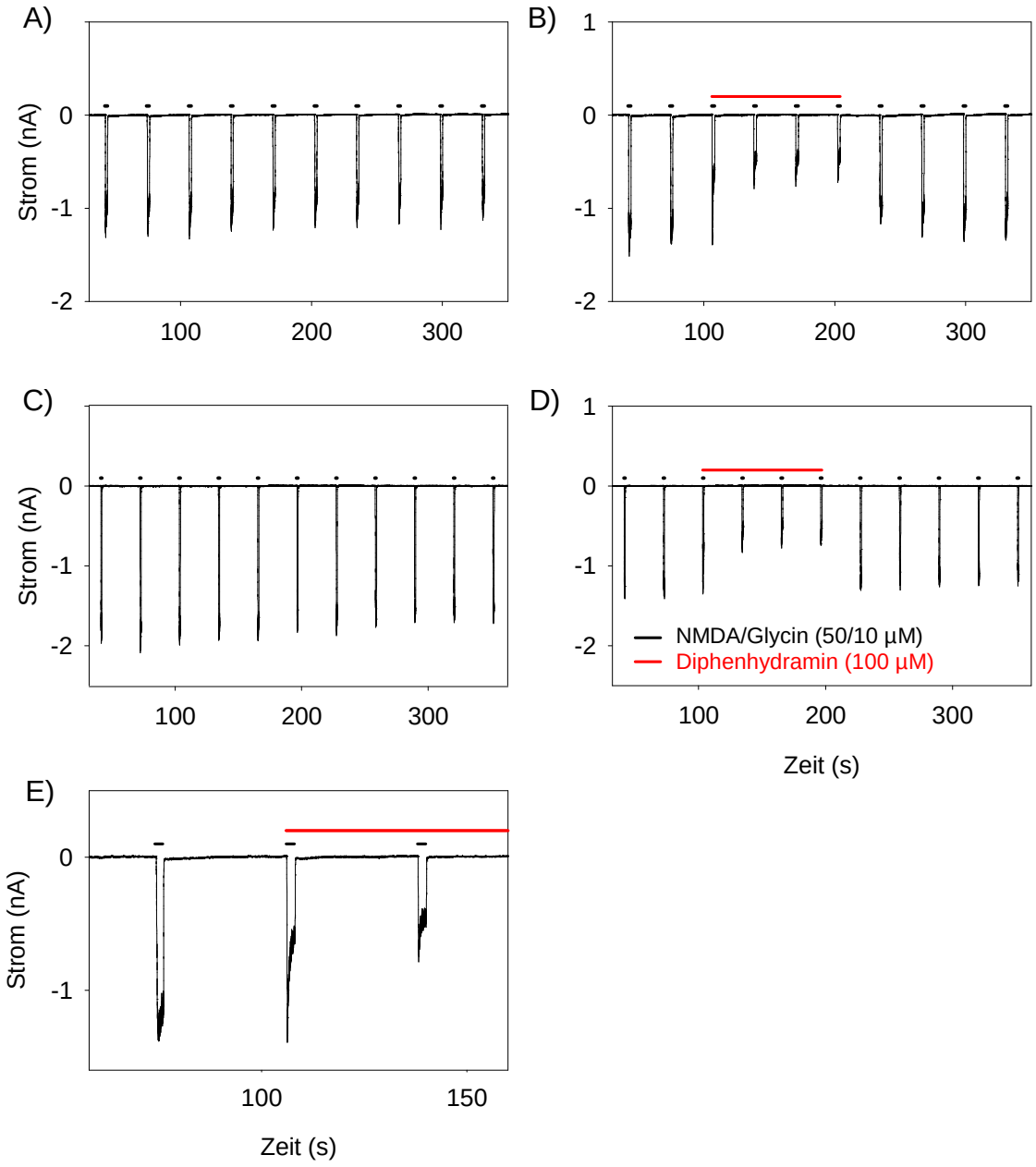

Abbildung 21: Untersuchungen zur gebrauchsabhängigen Wirkung von Diphenhydramin. Dargestellt ist die Kontrollmessreihe NMDA + Glycin (A, C) im Vergleich zur Messreihe mit Diphenhydramin (B, D), das von Signal drei bis sechs durchgehend appliziert wurde. Schaubild A und B bzw. C und D sind jeweils an der gleichen Zelle gemessen worden. Die NMDA-, Glycin- bzw. Diphenhydraminkonzentration wurde bei 50, 10 bzw. 100 µM konstant gehalten. Die Substanzen wurden 11-mal für jeweils eine (C, D) oder für zwei (A, B, E) Sekunden appliziert. Zwischen den einzelnen Applikationen wurde jeweils für 30 Sekunden mit Puffer gespült. Schaubild E stellt zur besseren Darstellung der Entwicklung der Diphenhydraminhemmung die Applikationen drei bis fünf des Schaubilds B vergrößert dar. Das elfte Signal in Schaubild A und B wurde aufgrund einer Störgröße nicht mit abgebildet. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt. Aufgetragen wurde das Stromsignal (nA) gegen die Zeit (s).

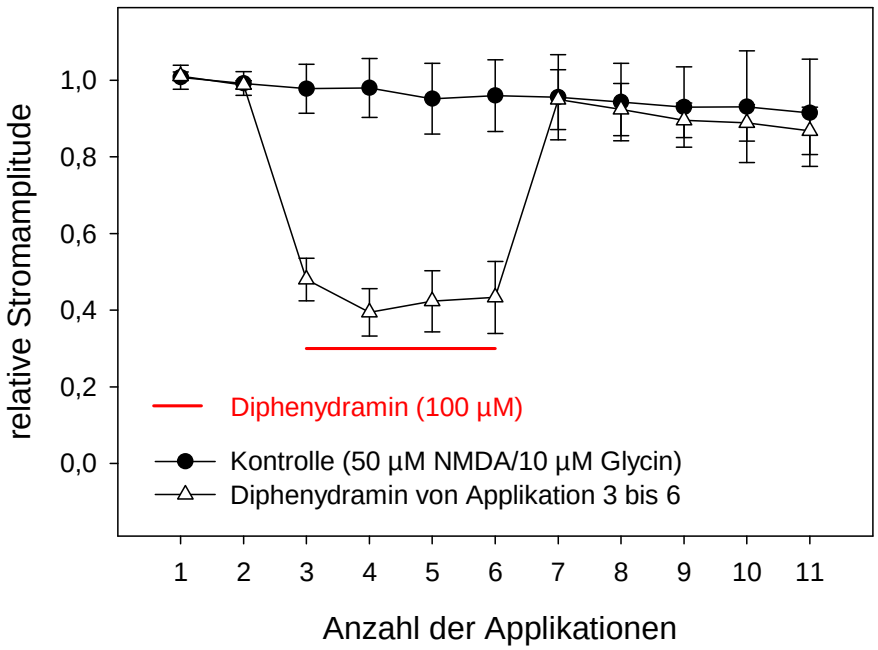

Abbildung 22: Einfluss der Rezeptoraktivierung auf die Hemmwirkung von Diphenhydramin. Aufgetragen wurde die relative Stromamplitude gegen die Anzahl der Applikationen. Dargestellt ist die Kontrollmessreihe NMDA + Glycin (schwarze Symbole) im Vergleich zur Messreihe mit Diphenhydramin (weiße Symbole). Die NMDA-, Glycin- bzw. Diphenhydraminkonzentration wurde bei 50, 10 bzw. 100 µM konstant gehalten. Für die Auswertungen wurde der Mittelwert der Plateauströme der Applikationen 1 und 2 als Bezugswert herangezogen, auf den die restlichen Werte im Anschluss bezogen wurden. Die vertikalen Balken zeigen die Standardabweichungen an. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt.

Die eben beschriebene Entwicklung der Hemmwirkung von Diphenhydramin, mit schnellem Anstieg der Hemmwirkung auf die maximale Hemmung innerhalb nur zweier Applikationen könnte auf einen gebrauchsabhängigen Mechanismus (use-dependence) hinweisen (Abb. 22). Bei einem solchen Mechanismus tritt die Wirkung einer Substanz nicht sofort und vollständig ein, sondern nimmt in Abhängigkeit der Rezeptoraktivierung zu. Eine kontinuierliche Zunahme der Hemmwirkung über mehrere Rezeptoraktivierungen hinweg ist jedoch nicht zu erkennen. Würde man gar die erste Coapplikation der Agonisten mit Diphenhydramin bei den Auswertungen außer Acht lassen, würden die Messergebnisse eher für eine gebrauchsunabhängige Hemmwirkung von Diphenhydramin sprechen. Um endgültig klären zu können, ob die Hemmwirkung von Diphenhydramin von der Gegenwart der Agonisten abhängig ist oder ob

Diphenhydramin auch in Abwesenheit der Agonisten mit dem NMDA-Rezeptor interagiert, sollten weitere Experimente durchgeführt werden, bei denen die Hemmwirkung nach Co- und Präapplikation von Diphenhydramin miteinander verglichen werden.

Wenn Diphenhydramin nur in Anwesenheit der Agonisten mit dem NMDA-Rezeptor interagiert, sollte eine Präinkubation von Diphenhydramin keinen Einfluss auf den Stromamplitudenverlauf eines Kontrollsignals bzw. einer nachfolgenden Coapplikation von Agonist und Diphenhydramin haben. Um dies zu testen, wurden nun weitere Messungen durchgeführt, bei denen jeweils zwei Vergleichsprotokolle erstellt wurden. Wie in Abbildung 23 (A,C) zu sehen, beinhaltete der erste Versuchsansatz zwei Kontrollsignale hintereinander, zwischen denen entweder für 30 Sekunden nur Puffer oder aber für 10 Sekunden Puffer und dann für 20 Sekunden 100 µM Diphenhydramin appliziert wurde. Es ist zu erkennen, dass der Diphenhydraminvorlauf keinen wesentlichen Einfluss auf das nachfolgende Kontrollsignal hatte. Auch bei Diphenhydraminvorlauf unterschied sich die zweite Kontrolle nicht wesentlich von der ersten. Bei einem zweiten Versuchsansatz wurde nun geprüft ob die Hemmwirkung bei Co- oder Präapplikation von Diphenhydramin einen anderen Verlauf nimmt (Abb. 23 B,D). Wenn Diphenhydramin mit dem Rezeptor auch in Abwesenheit der Agonisten interagiert, würde man erwarten, dass bei Präapplikation von Diphenhydramin die volle Hemmwirkung unmittelbar bei Rezeptoraktivierung vorhanden wäre. Es ist jedoch klar zu erkennen, dass der zeitliche Verlauf der Hemmung bei beiden Vorgehensweisen (Coapplikation und Präapplikation) identisch ist. Demzufolge kann man davon ausgehen, dass Diphenhydramin in Abwesenheit der Agonisten nicht mit dem NMDA-Rezeptor interagiert. Somit liegt sehr wahrscheinlich eine gebrauchsabhängige Hemmwirkung von Diphenhydramin vor.

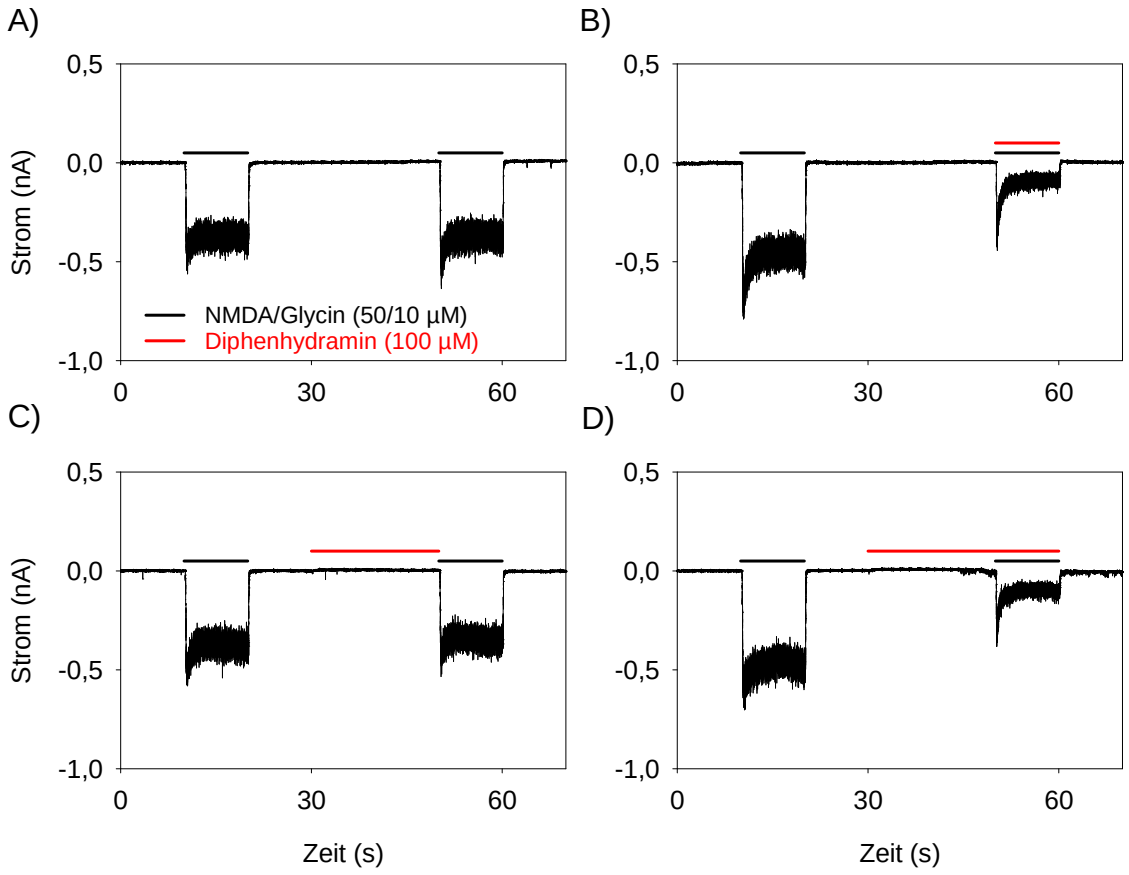

Abbildung 23: Einfluss des Diphenhydraminvorlaufs auf die Hemmwirkung von Diphenhydramin. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf (s) der Stromsignale (nA) ohne (A, B) und mit Diphenhydraminvorlauf (C, D). Der erste Versuchsansatz beinhaltete zwei Kontrollsignale, zwischen denen entweder für 30 Sekunden nur Puffer (A) oder aber für 10 Sekunden Puffer und dann für 20 Sekunden Diphenhydramin zusätzlich appliziert wurde (C). Bei einem zweiten Versuchsansatz folgte einem Kontrollsignal eine Coapplikation (Agonist + Diphenhydramin). Dazwischen wurde entweder wieder für 30 Sekunden mit Puffer gespült (B), oder erst für 10 Sekunden mit Puffer und dann für 20 Sekunden mit Diphenhydramin (D). Bei C wurde zwischen dem Diphenhydraminvorlauf und dem nachfolgenden Kontrollsignal aus technischen Gründen für 200 ms Puffer eingespült, um sicher zu gehen, dass kein Diphenhydraminrückstand im Applikationssystem war. Die NMDA-, Glycin- bzw. Diphenhydraminkonzentration wurde bei 50, 10 bzw. 100 µM konstant gehalten. Die Messungen wurden in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt.

3.6 Bestimmung der Zeitkonstanten τ_{on} und τ_{off}

Im folgenden Kapitel wurden Messungen zur Ermittlung der Zeitkonstanten τ_{on} und τ_{off} durchgeführt. Diese Zeitkonstanten geben Auskunft darüber, wie schnell eine Hemmsubstanz an den Rezeptor bindet bzw. wie schnell sie wieder davon abdissoziiert. Um den zeitlichen Verlauf der Diphenhydraminwirkung optimal beschreiben zu können, sollten die Rezeptoren bei alleiniger Agonistenapplilkation nach Möglichkeit keine zeitlichen Veränderungen der Signalamplitude aufweisen. Um vor allem die Rezeptordesensitivierung zu minimieren, wurde der Agonist NMDA in einer kleinen Konzentration (5 µM) eingesetzt. Außerdem wurden die Experimente in einer calciumarmen Extrazellularlösung (0,3 mM) durchgeführt. Die Versuchsprotokolle bestanden aus Einzelmessungen mit Diphenhydramin-konzentrationen von 33, 100 und 300 µM. Nach einem 10 Sekunden langen Kontrollsignal (nur Agonist) wurde Diphenhydramin für 20 Sekunden coappliziert. Danach folgte nochmals ein Kontrollsignal für ebenfalls 20 Sekunden um ausreichend Zeit für die Erholungsphase zur Verfügung zu stellen (Abb. 24).

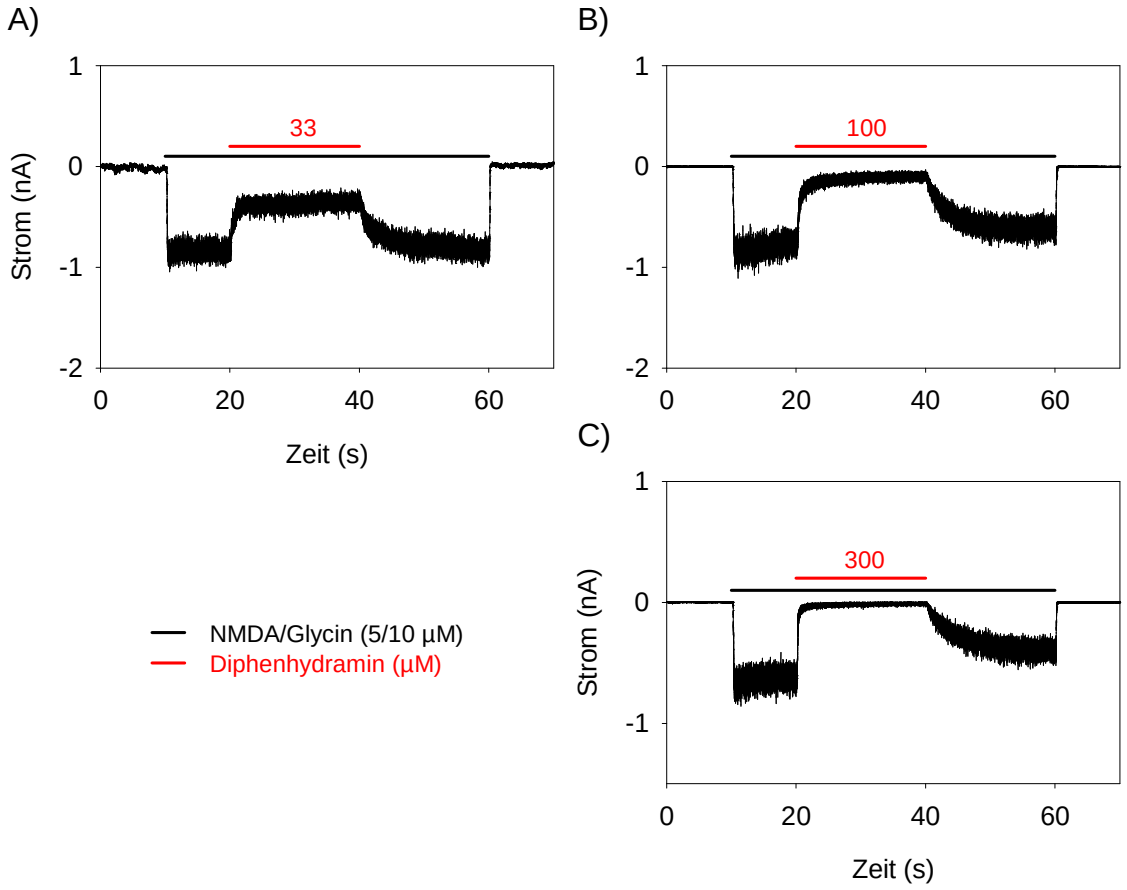

Abbildung 24: Beispielmessungen für die Auswertung der Zeitkonstanten τ_{on} und τ_{off}. Dargestellt sind Beispielmessungen für die Diphenhydraminkonzentrationen 33 µM (A), 100 µM (B) und 300 µM (C). Die NMDA- und Glycinkonzentrationen wurden bei 5 und 10 µM konstant gehalten. Nach einem 10 Sekunden langen Kontrollsignal aus NMDA und Glycin wurde Diphenhydramin für 20 Sekunden coappliziert. Danach folgte nochmals ein Kontrollsignal für ebenfalls 20 Sekunden. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien, aber calciumärmeren (0,3 mM) Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt. Aufgetragen wurde das Stromsignal (nA) gegen die Zeit (s).

Der zeitliche Verlauf der Stromabnahme, $\tau_{on,}$ bei Coapplikation von Agonist und Diphenhydramin korrelierte mit der eingesetzten Diphenhydraminkonzentration. Die Daten ließen sich hinreichend genau mit einer Zeitkonstante beschreiben, wobei die Hemmung mit steigender Antagonistenkonzentration schneller eintrat. Die Zeitkonstanten variierten zwischen 0,84 ± 0,22 s bei 33 µM Diphenhydramin, 0,48 ± 0,16 s bei 100 µM Diphenhydramin und 0,16 ± 0,04 s bei 300 µM Diphenhydramin (*n*=6). Die Werte für τ_{off} waren unabhängig von der Diphenhydraminkonzentration. Im Einzelnen lagen die Werte hier bei 2,29 ± 0,55 s für 33 µM, bei 2,47 ± 0,44 s für 100 µM und bei 2,58 ± 0,57 s für 300 µM Diphenhydramin (*n*=5). Für die Bestimmung der Ratenkonstanten wurden die reziproken Werte der Zeitkonstanten herangezogen (Abb. 25). Dazu wurde eine Geradenanpassung an die Werte von $1/\tau_{on}$ bzw. $1/\tau_{off}$ vorgenommen. Der Wert für k_{on} wurde aus der Steigung von $1/\tau_{on}$ ermittelt (k_{on} = 20 650 $M^{-1}*s^{-1}$). Der Wert für k_{off} ergab sich aus dem Y-Achsenabschnitt von $1/\tau_{off}$ (k_{off} = 0,446 s^{-1}). Berechnet man aus diesen kinetischen Daten die halbmaximal wirksame Hemmkonzentration von Diphenhydramin anhand der Gleichung $K_D = k_{off}/k_{on,}$ so ergibt sich ein Wert von 21,5 µM. Dieser Wert stimmt relativ gut mit demjenigen überein, der auch bei der Hemmung des stationären Stroms berechnet wurde (IC_{50} = 24,4 ± 2,1 µM). Die Standardabweichungen für $1/\tau_{on}$ und $1/\tau_{off}$ waren bei höheren Diphenhydraminkonzentrationen aufgrund der Darstellungsweise als Kehrwert größer, als bei kleineren Konzentrationen. Bei $1/\tau_{off}$ waren die Standardabweichungen durch die Darstellungsweise so klein, dass sie überhaupt nicht mehr zu erkennen waren.

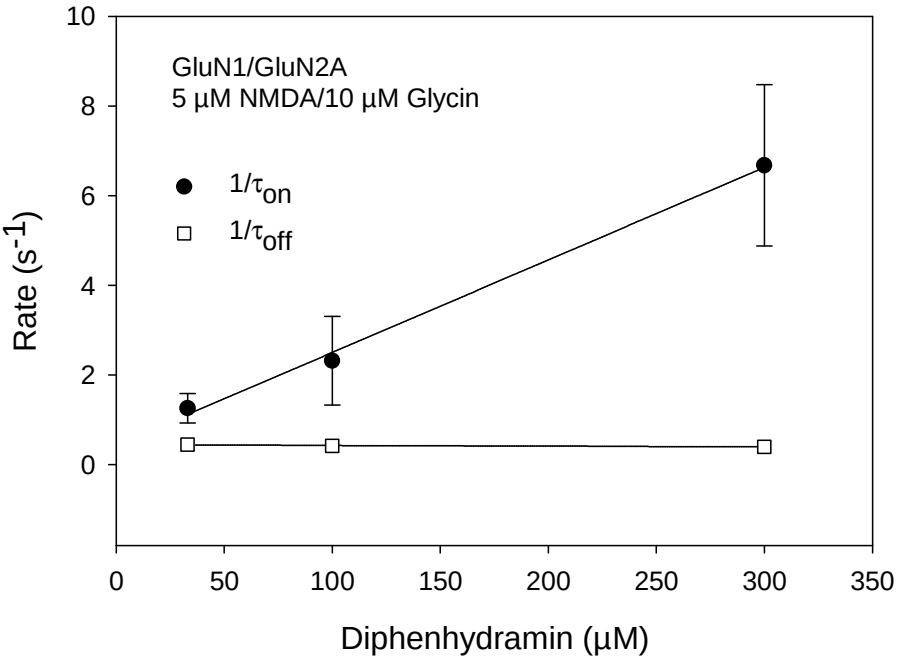

Abbildung 25: Bestimmung der Ratenkonstanten k_{on} und k_{off} aus den Zeitkonstanten τ_{on} und τ_{off}. Dargestellt sind die reziproken Werte der Zeitkonstanten τ_{on} und τ_{off} in Abhängigkeit der Diphenhydraminkonzentration im Bereich von 33 bis 300 µM. Die NMDA- und Glycinkonzentrationen wurden bei 5 und 10 µM konstant gehalten. Die als vertikale Balken dargestellten Standardabweichungen für $1/\tau_{on}$ und $1/\tau_{off}$ waren bei höheren Diphenhydraminkonzentrationen aufgrund der Darstellungsweise als Kehrwert größer, als bei kleineren Konzentrationen. In der Regel besaßen aber die größeren Konzentrationen kleinere Standardabweichungen, da sie besser zu messen und auszuwerten waren und somit einheitlichere Werte ergaben. Bei $1/\tau_{off}$ waren die Standardabweichungen durch die Darstellungsweise so klein, dass sie überhaupt nicht mehr zu erkennen waren, da sie von der Kurvendarstellung überlagert wurden. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien, aber calciumärmeren (0,3 mM) Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt.

3.7 Einfluss des Membranpotentials

Da der Hemmung des NMDA-Rezeptors durch Diphenhydramin ein nicht-kompetitiver Mechanismus zugrunde liegt, können bislang nur die Agonistenbindungsstellen als Interaktionsstelle ausgeschlossen werden. Im Folgenden sollte nun geprüft werden, ob sich die Interaktionsstelle möglicherweise in der Kanalpore selbst befindet. Ein wichtiges Kriterium hierfür ist, ob die Hemmwirkung von Diphenhydramin vom Membranpotential abhängig ist. Bei Substanzen, die innerhalb der Kanalpore binden, liegt ein potentialabhängiges Verhalten vor, wobei die Hemmwirkung im Allgemeinen mit zunehmend positiverem Potential abnimmt. Um dies zu testen wurden Einzelmessungen in An- und Abwesenheit von Diphenhydramin über einen Spannungsbereich von -140 mV bis +40 mV durchgeführt. Wie in Abb. 26 dargestellt, wurde vor und nach der 10 Sekunden langen Kombinationszugabe aus Agonist und 100 µM Diphenhydramin jeweils für 10 Sekunden ein Kontrollsignal appliziert. Die Messungen an den Enden des Spannungsbereiches waren nicht leicht durchzuführen, da die Zellen in sehr negativen und positiven Bereichen relativ empfindlich und instabil waren. Deswegen gelangen bei -140 und -120 mV vollständige Messungen an nur zwei bzw. drei verschiedenen Zellen. Bei den restlichen Potentialen konnten jeweils sechs unterschiedliche Zellen gemessen werden. Das Stromsignal der Kombinationszugabe wurde dieses Mal bei der Auswertung nur auf das Kontrollsignal nach der Diphenhydraminapplikation bezogen.

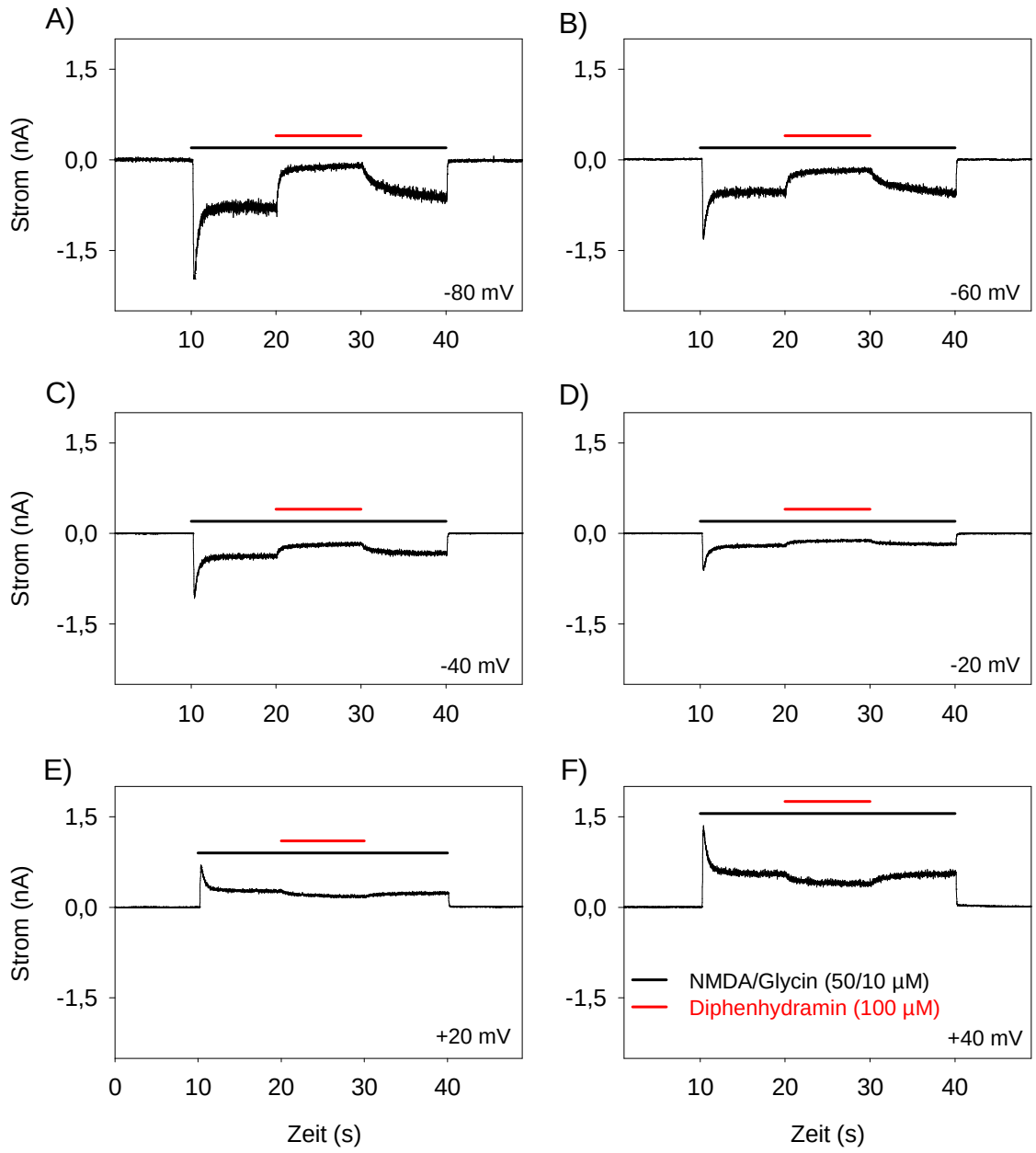

Abbildung 26: Einfluss des Membranpotentials auf die Hemmwirkung von Diphenhydramin. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf (s) der Stromsignale (nA) in Abhängigkeit des Membranpotentials. Abgebildet sind Messungen bei -80 mV (A), -60 mV (B), -40 mV (C), -20 mV (D), +20 mV (E) und +40 mV (F). Die NMDA-, Glycin- bzw. Diphenhydraminkonzentration wurde bei 50, 10 bzw. 100 µM konstant gehalten. Vor und nach der 10 Sekunden langen Diphenhydraminzufuhr wurde jeweils für 10 Sekunden ein Kontrollsignal appliziert. Die Messungen wurden in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt.

Bei den Experimenten war zu beobachten, dass sich die Hemmwirkung von Diphenhydramin über den gesamten untersuchten Membranpotentialbereich veränderte. Mit ansteigendem Membranpotential nahm der Reststrom bei der Diphenhydraminapplikation kontinuierlich von 4,0 ± 2,1 % bei – 140 mV auf 83,6 ± 13,7 % bei + 40 mV zu bzw. die Hemmwirkung entsprechend ab (Abb. 27 A). Die Standardabweichungen im Bereich von -80 mV bis +40 mV waren relativ groß, sie lagen durchschnittlich bei 15 %. Die Messergebnisse streuten hier ziemlich weit. Die Standardabweichungen in sehr negativen Bereichen von -140 mV bis -100 mV waren wiederum extrem klein, durchschnittlich 2,5 %. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass sich die Bindungsstelle für Diphenhydramin sehr wahrscheinlich innerhalb der Kanalpore befinden muss. Hier schließt sich nun die Frage an, wie tief Diphenhydramin in die Kanalpore eindringt. Bei idealen Messwerten kann dies mit der sogenannten Woodhull-Gleichung (Gleichung (5)) berechnet werden. Hierbei wird u.a. ein δ-Wert berechnet, der ein Maß dafür ist, wie tief ein Blocker in eine Pore eindringt. Der Wert von δ kann zwischen 0 (oberflächliche, potential-unabhängige Interaktion) und 1 (komplette Durchdringung der Membran) variieren. Wenn die entsprechende Fit-Routine auf diese gemessenen Daten angewandt wird, resultiert bei einer angenommenen Ladung von z = 1 ein δ von 0,73. Wie in Abbildung 27 A zu erkennen ist, beschreibt die gefittete Kurve (rote Linie) die Daten jedoch nicht optimal. Da sich die Hemmwirkung im positiven Bereich möglicherweise weniger oder evtl. überhaupt nicht mehr potentialabhängig ändert, wurde der Fit mit einer Gleichung wiederholt, die auch einen potential-unabhängigen Teil im positiven Potentialbereich zulässt (blaue Linie; Gleichung (6)). Auf den ersten Blick passt dieser Fit wesentlich besser zu den gemessenen Daten. Allerdings resultiert nun für δ ein Wert von größer 1 (δ = 1,09). Da die Ladung von Diphenhydramin nicht größer als 1 werden kann, würde dies bedeuten, dass an der Hemmung möglicherweise 2 Moleküle von Diphenhydramin beteiligt sind. Dies wiederum würde aber bei der Erstellung der Konzentrations-wirkungskurve einen Hill-Koeffizienten von etwa 2 voraussetzen. Der berechnete Hill-Koeffizient liegt jedoch nahe bei 1. Aufgrund der oben beschriebenen Unsicherheit bei der Auswertung der Daten (hohe Standardabweichungen) könnte der Verlauf der Potentialabhängigkeit auch geringfügig anders verlaufen. Aus diesem Grund wurde für die gemessenen Daten eine weitere Auswertung

herangezogen. Dazu wurde eine linearisierte Darstellung gewählt (Abb. 27 B). Aus dieser Darstellung geht hervor, dass die Daten im Potentialbereich von -140 bis -20 mV ideal auf einer Geraden liegen und die Werte im positiven Bereich davon abweichen. Die Auswertung der potentialabhängigen Wirkung von Diphenhydramin wurde daher auf diesen Potentialbereich begrenzt, woraus ein δ-Wert von 0,88 resultierte.

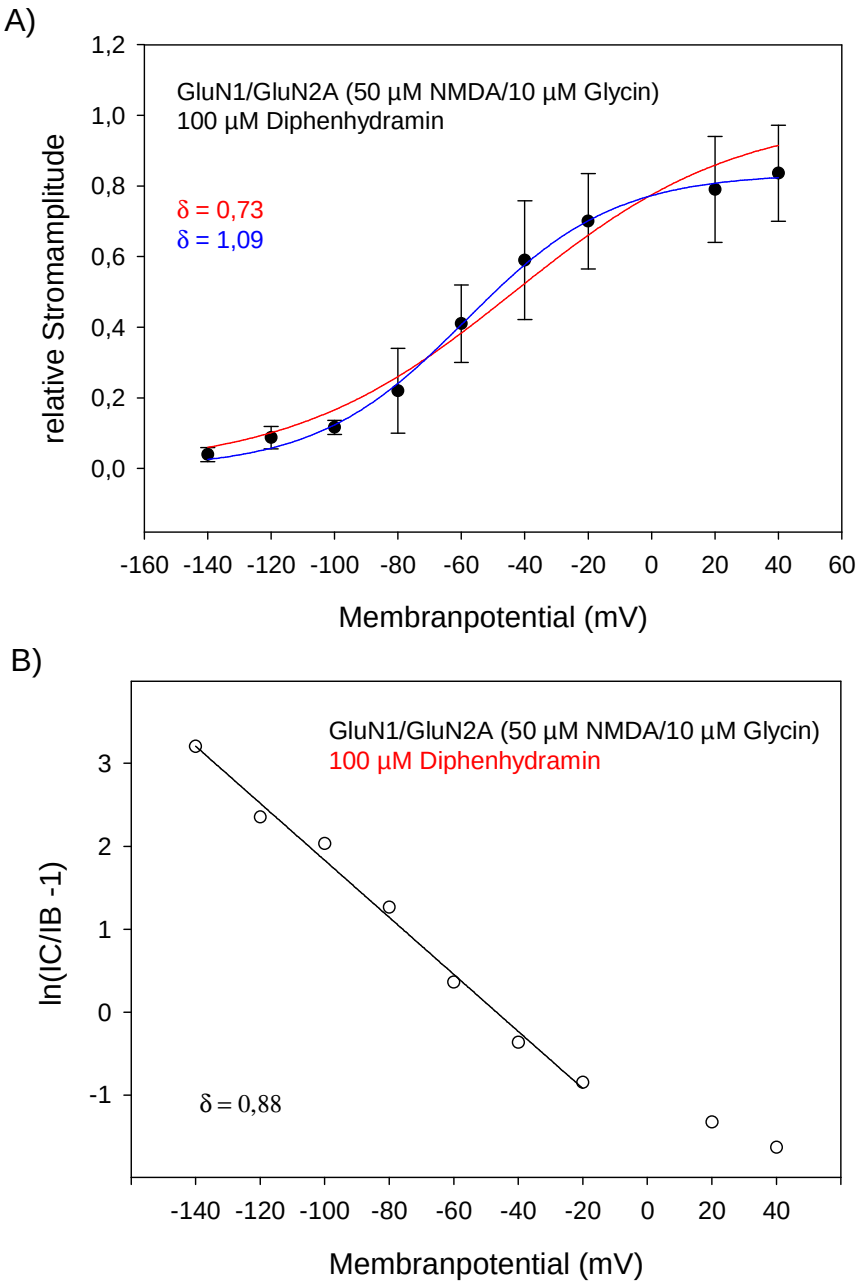

Abbildung 27: Einfluss des Membranpotentials auf die Hemmwirkung von Diphenhydramin. In A dargestellt ist die auf 1 normierte Stromamplitude in Abhängigkeit des Membranpotentials im Bereich von -140 bis +40 mV. Die vertikalen Balken geben die Standardabweichungen an. Die δ–Werte wurden hier aus den Werten des gesamten Potentialbereichs ermittelt. B zeigt die linearisierte Darstellung der in A dargestellten Werte im Bereich von -140 mV bis +40 mV. Hier war zu erkennen, dass sich die Potentialabhängigkeit der Diphenhydraminhemmung bei positiven Potentialen anders verhält, als bei negativen Potentialen. Daher wurde der δ-Wert hier nur aus den Werten des Potentialbereichs von -140 mV bis -20 mV bestimmt. Die NMDA-, Glycin- bzw. Diphenhydraminkonzentration wurde bei 50, 10 bzw. 100 µM konstant gehalten. Die Messungen wurden in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt.

3.8 Interaktion mit der Magnesium-Bindungsstelle

Die Eindringtiefe von Diphenhydramin in die Kanalpore ergab mit $\delta = 0{,}88$ einen hohen Wert, was darauf hindeutet, dass Diphenhydramin sehr tief in die Kanalpore eindringt. Aufgrund der beschriebenen Unsicherheiten bei der Auswertung der Daten konnte dies jedoch nicht sicher geklärt werden. Da Magnesiumionen ähnlich hohe δ-Werte aufweisen, sollte im Folgenden geprüft werden, ob Magnesiumionen und Diphenhydramin möglicherweise um eine gemeinsame Bindungsstelle konkurrieren. Um eine Aussage hierüber treffen zu können, wurden 3 verschiedene Protokolle angefertigt (Abb. 28). Sämtliche Messungen wurden mit in einer magnesiumfreien und calciumarmen (0,3 mM) Extrazellularlösung durchgeführt. Um konstante Signalamplituden zu erreichen wurde der Agonist NMDA in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt. Diphenhydramin wurde in einer Konzentration von 100 µM und Magnesiumionen in einer Konzentration von 5 mM getestet. Zur Datenauswertung wurden die off-Zeitkonstanten (τ_{off}) herangezogen, da sich beide Substanzen in dieser Hinsicht sehr stark unterscheiden. Der τ_{off} Wert für Magnesiumionen lag bei 111 ± 9,6 ms (*n*=9) und derjenige für Diphenhydramin bei 1,69 ± 0,67 s.

Für den Fall, dass beide Blocker eine gemeinsame Bindungsstelle in der Kanalpore besitzen, würde ein Magnesiumvorlauf die Interaktion von Diphenhydramin mit dieser Bindungsstelle verhindern. Demzufolge würde die off-Zeitkonstante der Kombinationsapplikation mit derjenigen von Magnesium übereinstimmen. In dem Fall, dass Diphenhydramin an einer anderen Bindungsstelle als das Magnesiumion bindet, würde ein Magnesiumvorlauf die Interaktion von Diphenhydramin mit dieser Bindungsstelle nicht verhindern. Demzufolge würde die off-Zeitkonstante der Kombinationsapplikation der off-Zeitkonstante von Diphenhydramin entsprechen.

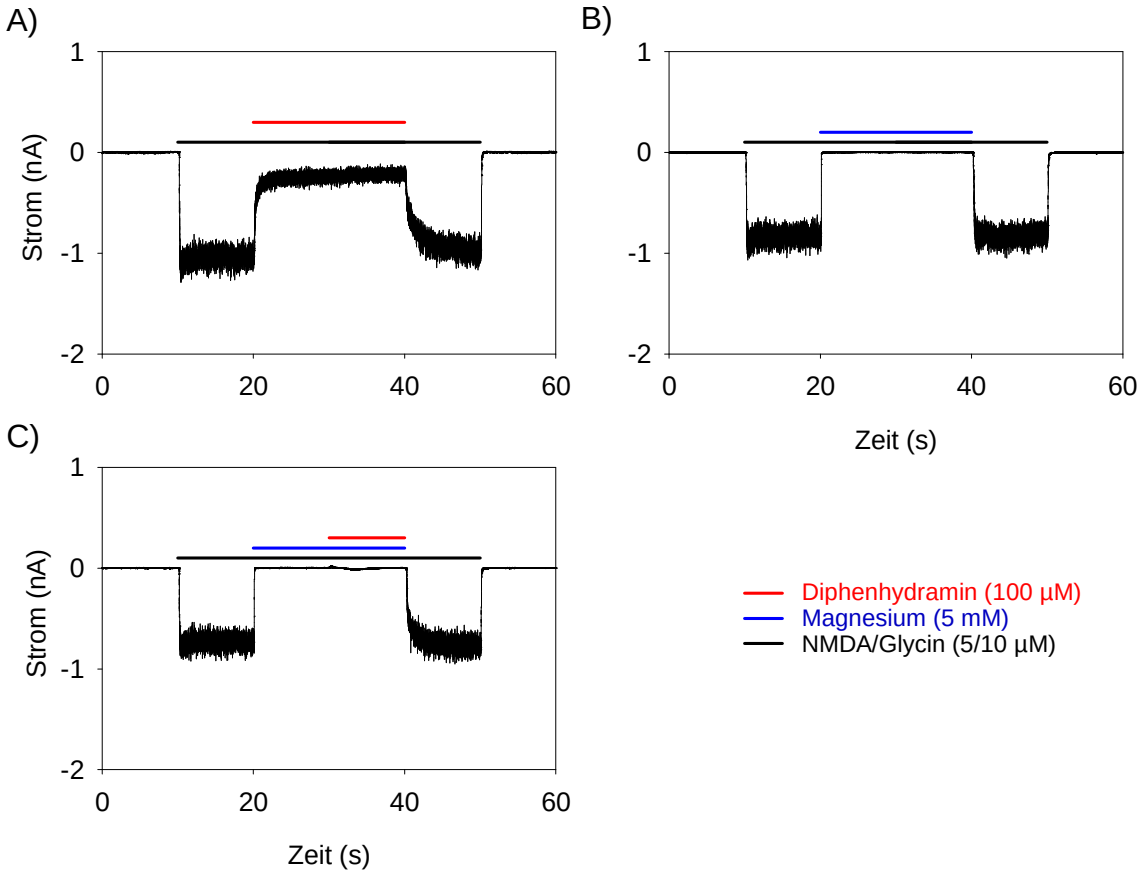

Abbildung 28: Untersuchungen zur Interaktion von Diphenhydramin mit Magnesiumionen um eine gemeinsame Bindungsstelle. In kontinuierlicher Gegenwart der Agonisten (NMDA/Glycin, 5/10 µM) wurden die Antagonisten entweder allein (100 µM Diphenhydramin (A) oder 5 mM Magnesiumionen (B)) oder in Kombination (C) appliziert. Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien, aber calciumärmeren (0,3 mM) Extrazellularlösung an dem Wildtyp GluN1/GluN2A durchgeführt. Aufgetragen wurde das Stromsignal (nA) gegen die Zeit (s).

Wie aus Abbildung 28 C ersichtlich ist, hat dieser Ansatz kein eindeutiges Ergebnis erbracht. Vielmehr musste der Verlauf der Erholung nach der Kombinationszugabe von Magnesiumionen und Diphenhydramin mit zwei Zeitkonstanten beschrieben werden. Die beiden Zeitkonstanten 111 ± 24,7 ms und 1,73 ± 0,50 s entsprachen in etwa den erwarteten Werten aus den Einzelzugaben der Antagonisten, wobei der Anteil der schnellen Zeitkonstante mit einer Gewichtung von 65,6 ± 8,4 % überwog. Diese Daten legen nahe, dass Magnesiumionen und Diphenhydramin möglicherweise über die gleiche oder zumindest über räumlich benachbarte Stellen mit dem NMDA-Rezeptor interagieren.

3.9 Hemmwirkung bei AMPA- und Kainat-Rezeptoren

Um zu untersuchen, ob Diphenhydramin selektiv mit NMDA-Rezeptoren interagiert oder ob es die anderen ionotropen Glutamat-Rezeptoren ebenfalls beeinflusst, wurden die Messungen auf AMPA- und Kainat-Rezeptoren ausgeweitet. Da aus früheren Experimenten bekannt war, dass bei diesen Rezeptoren aufgrund einer schnellen Rezeptordesensitivierung zumeist nur sehr kleine Stromsignale zu erfassen sind, wurden hierfür wiederum nicht-desensitivierende Rezeptoren verwendet. Im Falle der AMPA-Rezeptoren handelte es sich um die Rezeptor-mutante GluR1_L497Y und bei den Kainat-Rezeptoren wurden die GluR6-Rezeptoren für 10 min mit Concanavalin A (0,4 mg/ml) behandelt. Um möglichst große Signale zu erhalten, wurde der Agonist Glutamat in einer Konzentration von 200 µM eingesetzt. Anhand der Wirkung bei NMDA-Rezeptoren wurden für diese Untersuchungen zwei Konzentrationen von Diphenhydramin (30 und 300 µM) ausgewählt. Die kleinere Konzentration (30 µM) ergab bei NMDA-Rezeptoren in etwa eine halbmaximale Hemmung und die größere eine nahezu vollständige Hemmung. Für die Messungen wurden die in Abbildung 29 dargestellten Protokolle verwendet. Die Experimente an den AMPA-Rezeptoren waren relativ einfach. Die Zellen waren sehr stabil und lieferten z.T. sehr große Signale (bis 6 nA). Die Messungen an den Kainat-Rezeptoren hingegen waren schwieriger, da die Zellen weniger stabil waren. Zudem waren die Signale darunter sehr klein (max. bis 2 nA). Bei der Auswertung der Diphenhydraminhemmwirkung wurde die Stromamplitude während der Diphenhydraminapplikation auf die Signalamplitude unmittelbar vor der Coapplikation bezogen.

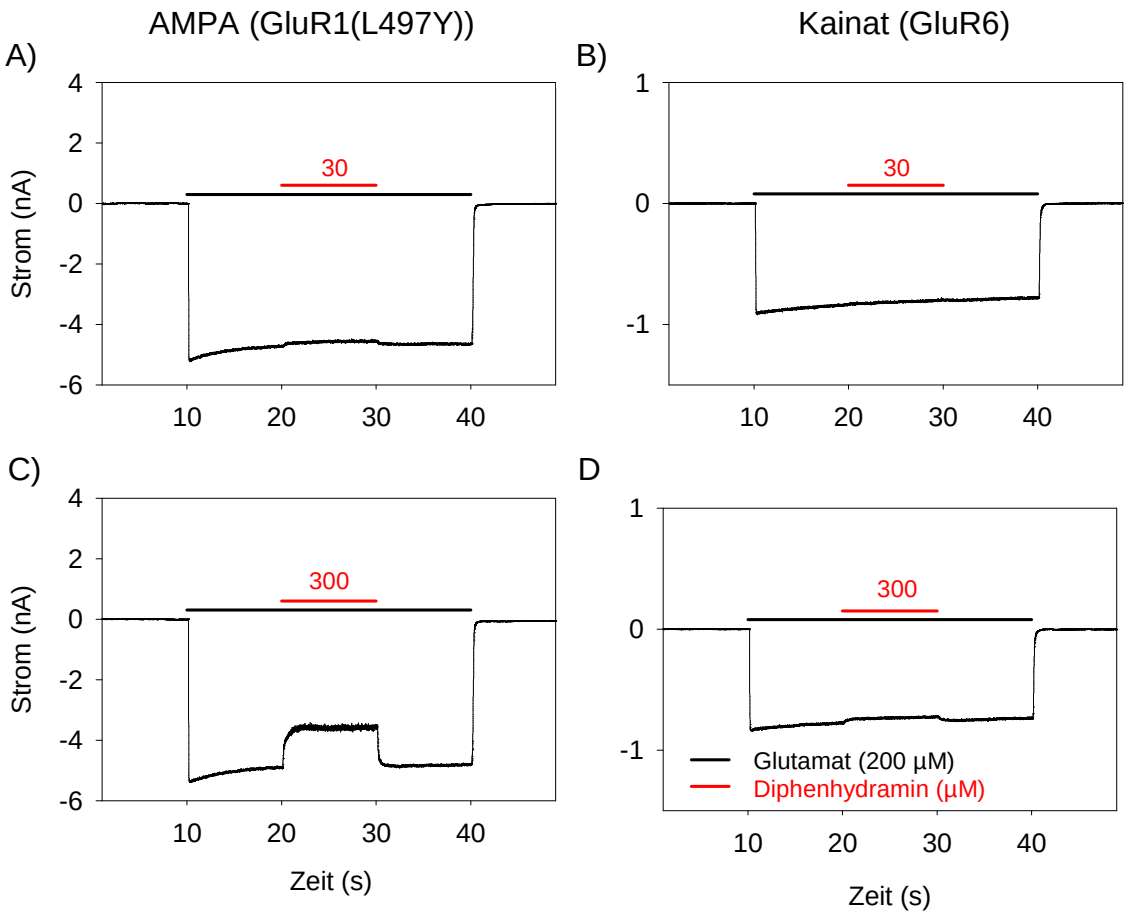

Abbildung 29: Hemmwirkung von Diphenhydramin bei AMPA-Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren. Die Messprotokolle starteten mit einem 10 Sekunden langen Kontrollsignal (200 µM Glutamat). Daraufhin wurde für 10 Sekunden zusätzlich Diphenhydramin appliziert. Zum Schluss folgte nochmals ein Kontrollsignal für 10 Sekunden. Zur Testung der Diphenhydraminhemmung wurden zwei verschiedene Konzentrationen an Diphenhydramin ausgewählt: die ungefähr halbmaximal wirksame Hemmkonzentration (30 µM) (A, B) und eine relativ große Konzentration (300 µM) mit fast maximaler Hemmung bei NMDA-Rezeptoren (C, D). Die Messungen wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien und calciumarmen (0,3 mM) Extrazellularlösung an AMPA- (A, C) und Kainat-Rezeptoren (B, D) durchgeführt. Aufgetragen wurde das Stromsignal (nA) gegen die Zeit (s).

Wie in Abbildung 30 dargestellt, war bei den AMPA-Rezeptoren eine geringe Diphenhydraminhemmung sichtbar. Bei 30 µM Diphenhydramin lag sie durchschnittlich bei 5,8 ± 3,6 % (*n*=9) und bei 300 µM Diphenhydramin durchschnittlich bei 19,0 ± 13,8 % (*n*=7). Im Gegensatz dazu waren bei den Kainat-Rezeptoren wesentlich geringere Hemmungen sichtbar. Unter 30 µM Diphenhydramin war augenscheinlich keine Hemmung festzustellen. Die Auswertung ergab eine durchschnittliche Hemmung von 3,7 ± 1,7 % (*n*=8). Bei 300 µM lag die Hemmung bei durchschnittlich 6,9 ± 2,1 % (*n*=8). Diese Ergebnisse zeigten, dass Diphenhydramin bei Nicht-NMDA-Rezeptoren nur eine geringe Wirkung hat. Somit wirkt Diphenhydramin innerhalb der ionotropen Glutamat-Rezeptoren vorzugsweise an NMDA-Rezeptoren.

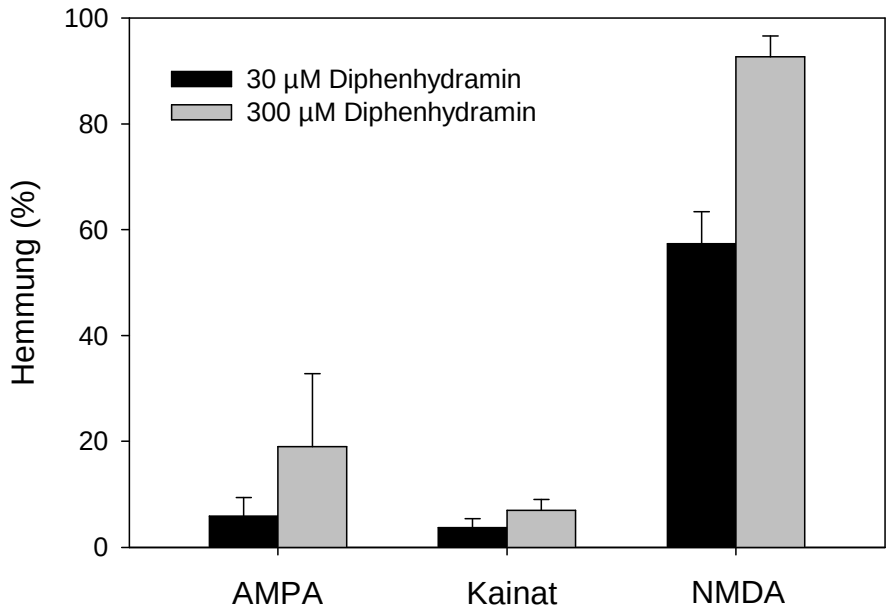

Abbildung 30: Hemmwirkung von Diphenhydramin bei ionotropen Glutamat-Rezeptoren im Vergleich. Dargestellt ist die relative Hemmwirkung (%) von 30 und 300 µM Diphenhydramin auf AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren. Zur Testung der Diphenhydraminhemmung wurden zwei verschiedene Konzentrationen an Diphenhydramin ausgewählt: die ungefähr halbmaximal wirksame Hemmkonzentration (30 µM) und eine relativ große Konzentration (300 µM) mit fast maximaler Hemmung der NMDA-Rezeptoren. Die Agonisten waren bei den Nicht-NMDA-Rezeptoren 200 µM Glutamat, bei den NMDA-Rezeptoren 50 µM NMDA und 10 µM Glycin. Die Messungen der Nicht-NMDA-Rezeptoren wurden bei -80 mV in einer magnesiumfreien, aber calciumarmen (0,3 mM), die Messungen der NMDA-Rezeptoren bei -80 mV in einer magnesiumfreien Extrazellularlösung durchgeführt. Die vertikalen, dünnen Balken stellen die Standardabweichungen dar.

4. Diskussion

Diphenhydramin wird seit vielen Jahren im klinischen Alltag verwendet. Neben dem Gebrauch als Antiemetikum und Antiallergikum wird Diphenhydramin vor allem auch als Sedativum bei Schlafstörungen eingesetzt. Die antiallergische, antiemetische und auch die sedierende Eigenschaft von Diphenhydramin wird auf eine kompetitive Interaktion mit H_1-Rezeptoren zurückgeführt. Ob der sedierenden Eigenschaft möglicherweise weitere Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren zugrunde liegen, ist bislang wenig erforscht. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Frage systematisch nachgegangen. Es wurde gezeigt, dass Diphenhydramin auch ein Antagonist für NMDA-Rezeptoren ist. Wie diese Interaktion zustande kommt, wird ausführlich beschrieben.

4.1 Allgemeine Parameter

Grundlegende Untersuchungen eines NMDA-Antagonisten beinhalten Kenndaten wie halbmaximal wirksame Hemmkonzentration (IC_{50}), kompetitive bzw. nicht-kompetitive Interaktion und Untereinheitenselektivität.

Vergleicht man die in den Experimenten ermittelte halbmaximal wirksame Hemmkonzentration von Diphenhydramin (IC_{50} = 24,4 µM) mit anderen NMDA-Rezeptor-Antagonisten, so ist festzustellen, dass es eine weniger starke Wirkung hat, als viele andere Substanzen. Die IC_{50} des sehr potenten Offenkanalblockers MK-801 beträgt beispielsweise 0,58 µM (Sharma et al. 1998). Die IC_{50} von Memantin, welches heutzutage bereits in der Therapie von Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson eingesetzt wird, liegt bei 1,2 µM (Hellweg et al. 2012, Li et al. 2011, Chen and Lipton 1997). Im Vergleich dazu gibt es aber auch Substanzen, die eine noch geringere Wirkung aufweisen als Diphenhydramin. So beträgt z.B. die IC_{50} des selektiven GluN2B-Antagonisten, Ro 25-6981, ungefähr 50 µM (Cahusac et al. 2005).

Die Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass die Hemmwirkung von Diphenhydramin durch eine nicht-kompetitive Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor zustande kommt. Ein kompetitiver Antagonismus kann ausgeschlossen werden,

da die Hemmwirkung von Diphenhydramin mit zunehmender Agonisten-konzentration nicht abnimmt und zudem die halbmaximale Aktivierung des Rezeptors in Gegenwart von Diphenhydramin nicht verändert wird. Dies betrifft sowohl die Bindungsstelle für den Agonisten NMDA als auch für den Coagonisten Glycin. Diphenhydramin unterscheidet sich somit von LY235959, D-AP5 und R-CPP, die selektiv mit der Glutamat-Agonisten-Bindungsstelle interagieren und von 5,7-Dichlorkynureisäure und GW468816, die selektiv mit der Glycin-Coagonisten-Bindungsstelle wechselwirken (Bicca et al. 2011, Evins et al. 2005, Cahusac et al. 2005).

Diphenhydramin wirkt bei allen GluN2-Untereinheiten in etwa gleich stark. Es unterscheidet sich somit von Substanzen, die untereinheitenselektiv wirken. So hemmen z.B. Zinkionen oder 3-chloro-4-fluoro-*N*-[(4-{[2-(phenylcarbonyl)-hydrazino]carbonyl}phenyl)methyl] benzenesulfonamide selektiv die GluN2A-Untereinheit (Paoletti et al. 2000, Bettini et al. 2010). Ifenprodil und Ro 25-6981 sind Antagonisten, welche vorzugsweise mit der Untereinheit GluN2B interagieren (Vasquez et al. 2012, Kim et al. 2012, Li et al. 2011, Kew et al. 1996). Im Vergleich dazu ist QNZ46 [(E)-4-(6-methoxy-2-(3-nitrostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)-benzoic acid] eine Substanz, die hauptsächlich GluN2C- und GluN2D-selektiv wirkt (Hansen et Traynelis 2011). Diese untereinheitenselektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten wirken vorzugsweise über die aminoterminale Domäne des Rezeptors. Da Diphenhydramin nicht zwischen den einzelnen GluN2-Untereinheiten unterscheidet, ist es eher unwahrscheinlich, dass die Interaktion über die aminoterminale Domäne zustande kommt. Ein weiterer Hinweis hierzu kommt aus den Untersuchungen mit den Rezeptor-Mutanten. Die in dieser Arbeit verwendeten mutierten und modifizierten NMDA-Rezeptoren sind insensitiv für allosterische Modulatoren, wie z.B. Zn^{2+} oder extrazelluläre Protonen, die über die aminoterminale Domäne wirken (Yuan et al. 2005). Diphenhydramin kann im Gegensatz dazu die mutierten und modifizierten Rezeptoren blockieren, was eine Interaktion über die aminoterminale Domäne eher unwahrscheinlich macht. Allerdings ist die Hemmwirkung gegenüber dem Wildtyp um ca. das 3-fache vermindert. Vergleichbares findet man auch für die Offenkanalblocker Memantin oder MK-801. Beide Substanzen weisen bei den mutierten und modifizierten Rezeptoren eine um Faktor 2 reduzierte Wirkung auf (Yuan et al. 2005).

4.2 Wirkmechanismus

Obwohl die zuvor beschriebenen Untersuchungen nicht dahingehend ausgelegt waren, zu untersuchen, ob Diphenhydramin ein Offenkanalblocker ist, haben diese gezeigt, dass Diphenhydramin unter den gegebenen Bedingungen Gemeinsamkeiten in der Wirkung mit Offenkanalblockern aufweist. Offenkanalblocker sind im Allgemeinen durch mehrere Eigenschaften gekennzeichnet. Sie setzen sich in eine zuvor geöffnete Kanalpore, wodurch ihre Wirkung an eine Rezeptoraktivierung gekoppelt ist (gebrauchsabhängige Wirkung, use-dependence). Wenn die Wirkstärke zudem mit der Agonistenkonzentration zunimmt, liegt neben dem nichtkompetitiven zusätzlich ein unkompetitiver Wirkmechanismus vor. Außerdem ist die Wirkung von Offenkanalblockern im Allgemeinen vom Membranpotential abhängig.

Die Untersuchung der gebrauchsabhängigen Wirkung (use-dependence) von Diphenhydramin hat sich als schwierig erwiesen, da keine kontinuierliche Zunahme der Hemmwirkung über mehrere Rezeptoraktivierungen hinweg zu beobachten war, wie es bei einer klassischen use-dependence der Fall ist. Die Hemmung war bereits nach zwei Rezeptoraktivierungen maximal und bei dem ersten nachfolgenden Kontrollsignal bereits wieder aufgehoben (Abb. 22). Diese eher schwache Gebrauchsabhängigkeit kann am ehesten verglichen werden mit der von Memantin oder Ketamin. Bei Memantin tritt die maximale Hemmung unter vergleichbaren Versuchsbedingungen nach ca. zwei Antagonistenapplikationen ein. Aufgehoben ist die Hemmung nach ungefähr fünf Kontrollsignalen nach Memantinwegnahme (Parsons et al. 1993). Im Gegensatz dazu besteht bei MK-801 und Dextrorphan eine sehr starke use-dependence, welche in mehreren Schritten abläuft. Die maximale Hemmung tritt bei MK-801 erst bei der 10. Coapplikation von Agonist und Antagonist ein. Nach Wegnahme von MK-801 ist selbst nach 10 Kontrollen das Stromsignal immer noch nicht erholt (Parsons et al. 1993).

Da bei Diphenhydramin keine eindeutige, sondern nur eine geringe use-dependence besteht, wurde zudem die Hemmwirkung von Diphenhydramin nach Prä- und Coapplikation des Antagonisten miteinander verglichen, um eine Abhängigkeit von der Rezeptoraktivierung sicherer beurteilen zu können. Da die

Präapplikation von Diphenhydramin keinen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Diphenhydraminhemmwirkung bzw. auf das nachfolgende Kontrollsignal hatte (Abb. 23), konnte schließlich davon ausgegangen werden, dass eine gebrauchsabhängige Wirkung von Diphenhydramin vorliegen muss und dass Diphenhydramin in Abwesenheit des Agonisten nicht mit dem Rezeptor interagiert. Der gleiche Sachverhalt liegt auch bei MK-801 vor. Es findet vor Kanalöffnung keine Interaktion des Antagonisten mit dem Rezeptor statt. Somit entwickelt die Substanz ihre Hemmwirkung gebrauchsabhängig, erst nachdem der Rezeptor mittels Agonist geöffnet wurde (Huettner and Bean 1987). Im Gegensatz dazu ist beispielsweise die Hemmwirkung von Promethazin nicht auf die Anwesenheit eines Agonisten angewiesen. Die Präinkubation mit dem Antagonisten reduziert den nachfolgenden Kontrollstrom, was darauf hindeutet, dass Promethazin gebrauchsunabhängig, also ohne Rezeptoraktivierung interagiert (Adolph et al. 2012). Ein wieder anderer Mechanismus, von dem sich Diphenhydramin unterscheidet, liegt dem Memantin zugrunde. Dieser Blocker wirkt sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Agonisten. Allerdings ist bei letzterem die halbmaximal wirksame Hemmkonzentration wesentlich höher und die Entwicklung der Hemmung um einiges langsamer. Daher wird angenommen, dass Memantin sowohl über die Kanalpore, als auch über einen hydrophilen Weg durch die Membran an die Bindungsstelle gelangt (Sobolevsky et al. 1998).

Ob der Diphenhydraminhemmung auch ein unkompetitiver Wirkmechanismus zugrunde liegt, konnte aus den Experimenten nicht sicher abgeleitet werden. Unter Einbeziehung aller Daten nimmt mit zunehmender Agonistenkonzentration die Hemmwirkung von Diphenhydramin zu, was für einen unkompetitiven Antagonismus sprechen würde. Allerdings war der Kurvenverlauf nur gering ansteigend (Abb. 18). Würde der erste Wert bei 0,3 µM NMDA aufgrund der sehr kleinen Konzentration und der dadurch bedingten schwierigen Auswertung von kleinen Stromsignalen außer Acht gelassen werden, würde die Zunahme der Hemmwirkung deutlich schwächer ausfallen. Ein Anstieg der Hemmung um nur ca. 5 bis 10 Prozent, im Gegensatz zu ca. 30 Prozent, wenn der erste Wert mit einbegriffen wird, wäre nicht so aussagekräftig. Aufgrund dessen könnte der unkompetitive Antagonismus von Diphenhydramin, vor allem bei höheren NMDA-Konzentrationen, doch wieder bezweifelt werden. Vergleicht man die Daten von

Diphenhydramin (44 % Hemmung bei 30 µM NMDA und 48 % Hemmung bei 300 µM NMDA) mit anderen unkompetitiven Antagonisten, ist festzustellen, dass die Hemmwirkung bei diesen wesentlich stärker von der Agonistenkonzentration abhängt. Bei NEU [2-hydroxy-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluoromethyl-benzylamino)-benzoic acid] beträgt beispielsweise die Hemmung bei 30 µM NMDA 54 % und bei 300 µM NMDA 66 % (Noh et al. 2009). Die Hemmwirkung von bis(propyl)-cognitin liegt bei 30 µM NMDA bei ca. 37 % und bei 300 µM NMDA bei ungefähr 48 % (Luo et al. 2010). Im Gegensatz dazu ist aber der unkompetitive Antagonismus von Memantin ebenfalls, wie bei Diphenhydramin, nur gering ausgeprägt. Bei 30 µM NMDA beträgt die Hemmung 82 % und bei 300 µM 85% (Chen et al. 1992). Die Frage nach einem unkompetitiven Antagonismus kann somit aus den Daten nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Die Wirkung von Diphenhydramin nimmt mit positiver werdendem Membranpotential ab und scheint im positiven Potentialbereich potentialunabhängig zu sein. Ob die Hemmwirkung insgesamt vom Membranpotential abhängig ist, oder ob es zusätzlich eine potentialunabhängige Wirkung gibt, kann nicht endgültig beurteilt werden. Sicher gezeigt werden konnte aber, dass die Wirkung von Diphenhydramin im Bereich von -140 bis -20 mV stark potentialabhängig ist. Somit unterscheidet sich Diphenhydramin auf jeden Fall von NEU, einem Sulfasalazin-Derivat [2-hydroxy-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluoromethyl-benzylamino)-benzoic acid], das potentialunabhängig wirkt (Noh et al. 2009). Im Vergleich dazu zeigt sich bei bekannten Offenkanalblockern eine potentialabhängige Wirkung, die sich auch in den positiven Potentialbereich erstreckt. Bei Memantin ist diese Abhängigkeit vom Membranpotential sehr stark, bei MK-801 fällt sie schwächer aus (Parsons et al. 1993). Neben diesen Substanzen gibt es auch noch welche, die sowohl potentialabhängig, als auch potentialunabhängig wirken und somit eventuell der Potentialabhängigkeit von Diphenhydramin am ehesten entsprechen. Vor allem langkettige N-Alkyl Diamine zeigen im negativen Bereich eine starke potentialabhängige Wirkung, im positiven Bereich hingegen wirken sie potentialunabhängig (Subramaniam et al. 1994).

4.3 Interaktion mit der Magnesium-Bindungsstelle

Eine Interaktion des Diphenhydramins mit der bedeutendsten Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors innerhalb der Kanalpore, der Magnesium-Bindungsstelle, kann vermutet werden. Dies lässt sich aus der relativen Übereinstimmung der δ-Werte schlussfolgern, welche ein Maß dafür sind, wie tief eine Substanz in die Kanalpore eindringt. Für Magnesiumionen liegt dieser Wert bei 0,78 (Sobolevsky and Yelshansky 2000). Für Diphenhydramin nimmt δ für den Potentialbereich von -140 bis +40 mV den Wert 0,73 an. Allerdings könnte im positiven Potentialbereich, wie bereits oben aufgeführt, die Diphenhydraminhemmung auch potentialunabhängig sein (Abb. 27). Deshalb wurde die Ermittlung des δ-Wertes auf Daten aus dem Potentialbereich von -140 bis -20 mV begrenzt. Der δ-Wert beträgt hier 0,88. Aufgrund weiterer Untersuchungen ist anzunehmen, dass Diphenhydramin mit Magnesiumionen nicht vollständig, sondern nur zu einem großen Teil um die gleiche Bindungsstelle konkurriert. Die off-Zeitkonstanten geben zu erkennen, dass ein Magnesiumvorlauf die Diphenhydraminhemmung weder völlig unterbindet, noch vollkommen unbeeinträchtigt lässt (Abb. 28), was der Fall wäre, wenn Diphenhydramin mit Magnesiumionen um eine gemeinsame Bindungsstelle entweder vollständig konkurriert oder aber überhaupt nicht. Die Messergebnisse könnten daher auch so interpretiert werden, dass Diphenhydramin und Magnesiumionen nicht unbedingt um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, sondern dass beide unterschiedliche, aber sich überlagernde oder gegenseitig beeinflussende Bindungsstellen besitzen.

Vergleicht man die Wirkung von Diphenhydramin mit Magnesiumionen an der Mutation, ist zu sehen, dass Magnesiumionen sowohl auf die modifizierten Rezeptoruntereinheiten, als auch auf die nicht-modifizierten Wildtypen die gleiche Hemmwirkung haben (Yuan et al. 2005). Im Gegensatz dazu zeigt Diphenhydramin bei den MTSEA-modifizierten Rezeptoruntereinheiten eine geringere Hemmung, als bei den Wildtypen. Andererseits hemmt aber Diphenhydramin, wie auch Magnesiumionen, den aktivierten Rezeptor nach MTSEA-Modifikation in An- und Abwesenheit des Agonisten in etwa gleich stark (Yuan et al. 2005). Im Vergleich dazu gibt es andere Offenkanalblocker, wie z.B. MK-801, die bei den MTSEA-modifizierten Rezeptoruntereinheiten zwar generell eine geringere

Hemmung, als bei den Wildtypen bewirken, zudem aber den aktivierten Rezeptor nach MTSEA-Modifikation in Abwesenheit des Agonisten stärker hemmen als in Anwesenheit (Yuan et al. 2005). Trotz dieser, dem Magnesium nicht entsprechenden Eigenschaften wird angenommen, dass MK-801 an die gleiche Bindungsstelle bindet, wie Magnesiumionen (Yuan et al. 2005, Huettner and Bean 1998). Demzufolge kann die Frage nach einer Konkurrenz von Diphenhydramin mit Magnesiumionen um die gleiche Bindungsstelle immer noch nicht sicher beantwortet werden. Angenommen werden kann aber, dass sich die Bindungsstelle von Diphenhydramin innerhalb der Kanalpore befinden und in relativer Nähe zur Magnesiumbindungsstelle liegen muss.

4.4 Kinetische Parameter

Bei den Auswertungen war zu sehen, dass die on-Zeitkonstante abhängig von der Diphenhydraminkonzentration war, die off-Zeitkonstante hingegen nicht. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Assoziationsaffinität mit steigender Diphenhydraminkonzentration größer wird, die Dissoziationsaffinität jedoch unabhängig von der Diphenhydraminkonzentration konstant bleibt. Der K_D-Wert (21,5 µM), welcher anhand der Zeitkonstanten ermittelt wurde, stimmt relativ gut mit der IC_{50} (24,4 µM) überein. Vergleichbares findet man auch bei den Substanzen ARL 15896AR, S(+)-des-Glycine Remacemid und Memantin. Die K_D-Werte entsprechen in etwa den IC_{50}-Werten, was bedeutet, dass die gesamte Hemmung auf die Blockade der Kanalpore zurückzuführen ist (Bresink et al. 1996, Subramaniam et al. 1996, Mealing et al. 1997). Wenn sich die Hemmwirkung allein durch die Blockade der Kanalpore erklären lässt, ist es auch eher unwahrscheinlich, dass es neben der potentialabhängigen noch eine potentialunabhängige Hemmung gibt. Ganz anders verhalten sich R(+)-Remacemid, NEU [2-hydroxy-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluoromethyl-benzylamino)-benzoic acid] und Amantadin. Hier ist der K_D-Wert wesentlich größer als der IC_{50}-Wert. Dies bedeutet, dass die Hemmung der Kanalpore nur einen Teil der Gesamthemmung darstellt. Bei all diesen Substanzen liegt eine potentialunabhängige Hemmwirkung vor, die sich entweder über den gesamten

Potentialbereich, oder nur über einen Teilbereich erstreckt (Subramaniam et al. 1996, Noh et al. 2009, Blanpied et al. 2005).

Die kinetischen Eigenschaften von Diphenhydramin sind am ehesten mit denen von Memantin oder Promethazin vergleichbar (Parsons et al. 1993, Adolph et al. 2012). Die Ratenkonstanten k_{on} und k_{off} betragen bei Memantin 288 000 $M^{-1}*s^{-1}$ und 0,2 s^{-1} und bei Diphenhydramin 20 650 $M^{-1}*s^{-1}$ und 0,4 s^{-1}. Auch ist die on-Zeitkonstante von Memantin, im Gegensatz zu der off-Zeitkonstante, von der Blockerkonzentration abhängig. Die Rezeptoraffinität von Memantin (K_D = 0,69 µM) liegt ebenfalls im µM-Bereich und ist somit relativ niedrig (Parsons et al. 1993). Im Vergleich dazu unterscheidet sich Diphenhydramin deutlich von MK-801, welches wesentlich langsamere kinetische Parameter aufweist. Die on-Zeitkonstanten variieren für MK-801 zwischen 24,0 s (bei 2 µM) und 8,1 s (bei 10 µM). Die on-Zeitkonstanten für Diphenhydramin liegen im Gegensatz dazu im Millisekundenbereich (0,16 s – 0,84 s). Die off-Zeitkonstante beträgt für MK-801 92 min (Huettner and Bean 1998). Für Diphenhydramin liegt sie im Sekundenbereich (ca. 2,4 s). Auch ist Diphenhydramin von solchen Substanzen abzugrenzen, die noch wesentlich schnellere kinetische Parameter besitzen. Magnesium hat beispielsweise eine on-Zeitkontante von 9 ms und eine off-Zeitkonstante von 137 ms (Sobolevsky 1999).

4.5 Bewertung des Blockmechanismus

Generell besitzen Offenkanalblocker günstige pharmakologische Eigenschaften, da ihre Hemmwirkung mit steigender Agonistenkonzentration und Rezeptoraktivierung zunimmt, was sehr günstig ist bei einer exzessiven, pathologischen Rezeptoraktivierung durch erhöhte Agonistenkonzentrationen (Chen and Lipton 2006). Dadurch sollten Offenkanalblocker eine physiologische synaptische Transmission nur sehr gering bis überhaupt nicht beeinträchtigen (Planells-Cases et al. 2002). Neben diesem beschriebenen unkompetitiven Hemmmechanismus und der Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Rezeptoraktivierung (use-dependence) besitzen Offenkanalblocker, wie bereits beschrieben, zudem noch eine Abhängigkeit der Hemmwirkung von dem Membranpotential (Parsons et al.

1993, Noh et al 2009). Dies bedeutet, dass mit zunehmender Depolarisation die Hemmwirkung immer geringer wird. Derartige Potentialwerte treten aber vor allem unter pathologischen Bedingungen auf. Das heißt wiederum, dass die Potential-abhängigkeit eines Offenkanalblockers eher eine nachteilige, ungünstigere pharmakologische Eigenschaft ist.

Ob Diphenhydramin nun als ein Offenkanalblocker bezeichnet werden kann, ist hier nicht sicher zu sagen. Die Abhängigkeit der Diphenhydraminhemmwirkung von der Rezeptoraktivierung und dem Membranpotential unterstützt die Theorie eines Offenkanalblockers. Ob der Diphenhydraminhemmung zudem auch noch ein unkompetitiver Antagonismus zugrunde liegt, konnte aus den Experimenten nicht sicher abgeleitet werden. Dazu wären weitere Messungen nötig, die allerdings aufgrund der sehr kleinen NMDA-Konzentrationen relativ schwierig durchzuführen und auszuwerten sind.

Weitere positive Eigenschaft von Diphenhydramin sind zudem die schnellen Zeitkonstanten τ_{on} und τ_{off} und die daraus resultierende relativ niedrige Rezeptoraffinität. Dadurch sollten z.B. psychotrope Effekte, welche vor allem bei Antagonisten mit hoher Rezeptoraffinität auftreten, in abgeschwächter Form vorkommen (Planells-Cases et al. 2002).

4.6 Klinische Relevanz

Diphenhydramin ist sehr gut wasserlöslich und wird daher nach oraler Gabe schnell und meist vollständig resorbiert (>90 %). Allerdings unterliegt es anschließend einem ausgeprägten First-Pass-Effekt, weshalb die absolute Bioverfügbarkeit von Diphenhydramin stark reduziert ist (um durchschnittlich 28 bis 60 %) (Davatz 26.04.2012). Nach Aufnahme wird es im Organismus rasch verteilt. Es hat die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und dadurch direkt im zentralen Nervensystem zu wirken. Durch die fast vollständige Bindung von Diphenhydramin an Plasmaeiweiße (durchschnittlich 85 bis 99 %) befindet sich zwar die Substanz trotz des relativ hohen Verteilungsvolumen (3 bis 4 l/kg) hauptsächlich im Plasma, ihre absolute Verfügbarkeit wird aber durch diese hohe

Proteinbindung nochmals drastisch gesenkt (Davatz 26.04.2012). Der maximale Plasmaspiegel nach einmaliger oraler Einnahme von 50 mg Diphenhydramin liegt somit, je nach Autor, nach durchschnittlich 2 bis 2,3 Stunden bei 30 bis 150 ng/ml, was einer Konzentration von 0,12 bis 0,59 µM entspricht (Laux et al. 1995, Davatz 26.04.2012). Diese Konzentration ist allerdings wesentlich geringer, als die in der vorliegenden Arbeit ermittelte halbmaximal wirksame Hemmkonzentration (ca. 24 µM), was eine Sedierung durch Wirkung am NMDA-Rezeptor bezweifeln lässt. Nach Sadiq und Mitarbeiter ist aber bei Ratten die ungebundene Diphenhydraminkonzentration im Gehirn 5-fach höher als im Blutplasma, was auf einen größtenteils aktiven Transportmechanismus über die Blut-Hirn-Schranke hindeutet (Sadig et al. 2011). Dennoch liegt die zentrale ungebundene und damit wirksame Diphenhydraminkonzentration deutlich unter der IC_{50}. Allerdings ist nicht gesagt, dass dieser Sachverhalt einfach ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden kann. Die zentrale Diphenhydraminkonzentration kann hier eventuell um einiges höher sein. Es gibt viele klinische Studien, die eine sedierende Wirkung von Diphenhydramin aufzeigen (Glass et al. 2003, Tu et al. 2006, Cengiz et al. 2006, Erdur et al. 2012). Zudem wird Diphenhydramin heutzutage aufgrund seiner doch relativ starken sedierenden Eigenschaft bereits bei Schlafstörungen im klinischen Alltag eingesetzt. Dass die sedierende Eigenschaft von Diphenhydramin ausschließlich auf den H_1-Rezeptor-Antagonismus beruht, ist nicht anzunehmen, denn andere ZNS-gängige H_1-Rezeptor-Antagonisten der 1. Generation weisen zwar eine Sedierung mit leichter ZNS-Dämpfung auf, sie ist aber bei weitem nicht so stark wie bei Diphenhydramin (Karow und Lang-Roth 2010). Deshalb ist es nicht unwahrscheinlich, dass der NMDA-Rezeptor-Antagonismus an der doch relativ stark sedierenden Wirkung von Diphenhydramin, trotz geringer Plasmakonzentrationen, mitbeteiligt ist. Aus diesem Grund wäre es noch interessant zu untersuchen, ob die geringer sedierenden H_1-Rezeptor-Antagonisten der 1. Generation den NMDA-Rezeptor weniger stark beeinflussen als Diphenhydramin.

5. Zusammenfassung

Diphenhydramin wird bereits seit Jahren im klinischen Alltag vor allem als Sedativum bei Schlafstörungen eingesetzt. Ob die sedierende Wirkung allein durch die Interaktion mit H1-Rezeptoren zustande kommt, oder ob weitere Rezeptoren beteiligt sind, ist bislang unklar. Da N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren u.a. eine wichtige Rolle bei der Sedierung spielen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob die sedierende Eigenschaft von Diphenhydramin mitunter auf einen NMDA-Rezeptor-Antagonismus zurück geführt werden kann.

Da bereits schon in Voruntersuchungen die NMDA-antagonistische Wirkung von Diphenhydramin festgestellt wurde, war es nun Ziel dieser Arbeit, die Hemmwirkung am NMDA-Rezeptor im Detail zu untersuchen. Zur praktischen Durchführung dieser Experimente wurden heterolog exprimierte NMDA-Rezeptoren mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass Diphenhydramin NMDA-Rezeptor-induzierte Ionenströme auf nicht-kompetitive Weise und nicht untereinheitenselektiv hemmt. Eventuell wirkt Diphenhydramin sogar als Offenkanalblocker, denn es besteht eine Abhängigkeit von der Rezeptoraktivierung (use-dependence) und von dem Membranpotential, zumindest im negativen Potentialbereich. Ob allerdings zudem ein unkompetitiver Wirkmechanismus vorliegt, konnte aus den Experimenten nicht sicher abgeleitet werden. Die Hemmwirkung kommt dadurch zustande, dass Diphenhydramin den Ionenkanal blockiert, indem es mit der Magnesium-bindungsstelle oder einer dazu nahe gelegenen Stelle innerhalb der Kanalpore interagiert. Diphenhydramin wirkt hauptsächlich auf NMDA-Rezeptoren. Die anderen ionotropen Glutamat-Rezeptoren (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA) und Kainat) werden wenig beeinflusst.

Zusammenfassend kann die sedierende Eigenschaft von Diphenhydramin mitunter auf den NMDA-Rezeptor-Antagonismus zurückgeführt werden. Allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig, um die klinische Relevanz von Diphenhydramin als Sedativum bzw. Hypnotikum noch genauer zu erfassen.

Eventuell könnte Diphenhydramin sogar, wie andere NMDA-Rezeptor-Antagonisten, eine Rolle bei der Analgesie oder der Neuroprotektion spielen.

6. Literaturverzeichnis

1. Adolph O, Köster S, Georgieff M, Georgieff EM, Moulig W, Föhr KJ: Promethazine inhibits NMDA-induced currents - New pharmacological aspects of an old drug. Neuropharmacol. 63: 280-291 (2012)

2. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA: Guide to Receptors and Channels (GRAC). 5th edition, Br J Pharmacol. 164: 1-324 (2011)

3. Ataman ZA, Gakhar L, Sorensen BR, Hell JW, Shea MA: The NMDA receptor NR1 C1 region bound to calmodulin: structural insights into functional differences between homologous domains. Structure. 15: 1603-1617 (2007)

4. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH: Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. Biol Psychiatry. 47: 351–354 (2000)

5. Bettini E, Sava A, Griffante C, Carignani C, Buson A, Capelli AM, Negri M, Andreetta F, Senar-Sancho SA, Guiral L, Cardullo F: Identification and Characterization of Novel NMDA Receptor Antagonists Selective for NR2A- over NR2B-Containing Receptors. J Pharmacol Exp Ther. 335: 636-644 (2010)

6. Bicca MA, Figueiredo CP, Piermartiri TC, Meotti FC, Bouzon ZL, Tasca CI, Medeiros R, Calixto JB: The selective and competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, (-)-6-phosphonomethyl-deca-hydroisoquinoline-3-carboxylic acid, prevents synaptic toxicity induced by amyloid-β in mice. Neuroscience. 192: 631-641 (2011)

7. Blanpied TA, Clarke RJ, Johnson JW: Amantadine inhibits NMDA receptors by accelerating channel closure during channel block. J Neurosci. 25: 3312-3322 (2005)

8. Bliss TV, Collingridge GL: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature. 361: 31-39 (1993)

9. Bresink I, Benke TA, Collett VJ, Seal AJ, Parsons CG, Henley JM, Collingridge GL: Effects of memantine on recombinant rat NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. Br J Pharmacol. 119: 195-204 (1996)

10. Brothwell SL, Barber JL, Monaghan DT, Jane DE, Gibb AJ, Jones S: NR2B- and NR2D-containing synaptic NMDA receptors in developing rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. J Physiol. 586: 739-750 (2008)

11. Cahusac PM, Senok SS, Hitchcock IS, Genever PG, Baumann KI: Are unconventional NMDA receptors involved in slowly adapting type I mechanoreceptor responses? Neuroscience. 133: 763-773 (2005)

12. Cao X, Cui Z, Feng R, Tang YP, Qin Z, Mei B, Tsien JZ: Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. Eur J Neurosci. 25: 1815-1822 (2007)

13. Cengiz M, Baysal Z, Ganidagli S: Oral sedation with midazolam and diphenhydramine compared with midazolam alone in children undergoing magnetic resonance imaging. Paediatr Anaesth.16: 621-626 (2006)

14. Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, Lipton SA: Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. J Neurosci. 12: 4427-4436 (1992)

15. Chen HS, Lipton SA: Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. J Physiol. 499: 27-46 (1997)

16. Chen HS, Lipton SA: The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. J Neurochem. 97: 1611-1626 (2006)

17. Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M: A nomenclature for ligand-gated ion channels. Neuropharmacology. 56: 2-51 (2009)

18. Davatz ZRR: http://de.oddb.org/de/drugs/fachinfo/uid/121645 (26.04.2012)

19. de Bartolomeis A, Sarappa C, Magara S, Iasevoli F: Targeting glutamate system for novel antipsychotic approaches: Relevance for residual psychotic

symptoms and treatment resistant schizophrenia. Eur J Pharmacol. 682: 1-11 (2012)

20. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF: The glutamate receptor ion channels. Pharmacol Rev. 51: 7-61 (1999)

21. Donevan SD, Jones SM, Rogawski MA: Arcaine blocks N-methyl-D-aspartate receptor responses by an open channel mechanism: whole-cell and single-channel recording studies in cultured hippocampal neurons. Mol Pharmacol. 41: 727-735 (1992)

22. Du M, Reid SA, Jayaraman V: Conformational changes in the ligand-binding domain of a functional ionotropic glutamate receptor. J Biol Chem. 280: 8633–8636 (2005)

23. Erdur B, Tura P, Aydin B, Ozen M, Ergin A, Parlak I, Kabay B: A trial of midazolam vs diphenhydramine in prophylaxis of metoclopramide-induced akathisia. Am J Emerg Med. 30: 84-91 (2012)

24. Evins AE, Pachas G, Mischoulon D, Urbanoski K, Carlini S, Sousa J, Bentley K, Rigotti NA, Nino-Gomez J, Loebl T, Janes AC, Kaufman MJ, Fava M: A double-blind, placebo-controlled trial of the NMDA glycine site antagonist, GW468816, for prevention of relapse to smoking in females. J Clin Psychopharmacol. 31: 597-602 (2011)

25. Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, González-Castañeda RE, Beas-Zarate C: Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. Neurologia. 27: 301-310 (2012)

26. Gielen M, Siegler Retchless B, Mony L, Johnson JW, Paoletti P: Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. Nature. 459: 703-707 (2009)

27. Gielen M: Molecular operation of ionotropic glutamate receptors: proteins that mediate the excitatory synaptic neurotransmission. Med Sci (Paris). 26: 65-72 (2010)

28. Glass JR, Sproule BA, Herrmann N, Streiner D, Busto UE: Acute pharmacological effects of temazepam, diphenhydramine, and valerian in healthy elderly subjects. J Clin Psychopharmacol. 23: 260-268 (2003)

29. Hansen KB, Traynelis SF: Structural and Mechanistic Determinants of a Novel Site for Noncompetitive Inhibition of GluN2D-Containing NMDA Receptors. J Neurosci. 31: 3650-3661 (2011)

30. Hellweg R, Wirth Y, Janetzky W, Hartmann S: Efficacy of memantine in delaying clinical worsening in Alzheimer's disease (AD): responder analyses of nine clinical trials with patients with moderate to severe AD. Int J Geriatr Psychiatry. 27: 651-656 (2012)

31. Hempelmann G, Kuhn DFM: Klinischer Stellenwert des S-(+)-Ketamin. Anaesthesist. 46: 3-7 (1997)

32. Horak M, Wenthold RJ: Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. J Biol Chem. 284: 9683-9691 (2009)

33. Huettner JE, Bean BP: Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: Selective binding to open channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 85: 1307-1311 (1998)

34. Irifune M, Shimizu T, Nomoto M, Fukuda T: Ketamine-induced anesthesia involves the N-methyl-D-aspartate receptor-channel complex in mice. Brain Res. 596: 1-9 (1992)

35. Jones S, Gibb AJ: Functional NR2B- and NR2D-containing NMDA receptor channels in rat substantia nigra dopaminergic neurons. J Physiol. 569: 209-221 (2005)

36. Kalia LV, Kalia SK, Salter MW: NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. Lancet Neurol. 7: 742-755 (2008)

37. Karow T, Lang-Roth R: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 18. Auflage, Karow/Lang: 359-363 (2010)

38. Kew JNC, Trube G, Kemp JA: A novel mechanism of activity-dependent NMDA receptor antagonism describes the effect of ifenprodil in rat cultured cortical neurons. J Physiol. 497: 761-772 (1996)

39. Kim Y, Cho HY, Ahn YJ, Kim J, Yoon YW: Effect of NMDA NR2B antagonist on neuropathic pain in two spinal cord injury models. Pain. 153: 1022-1029 (2012)

40. Kotermanski SE, Wood JT, Johnson JW: Memantine binding to a superficial site on NMDA receptors contributes to partial trapping. J Physiol. 587: 4589-4603 (2009)

41. Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL: N-terminal domains in the NR2 subunit control desensitization of NMDA receptors. Neuron. 20: 317-327 (1998)

42. Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R: NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. Psychopharmacology (Berl). 169: 215-233 (2003)

43. Labrie V, Roder JC: The involvement of the NMDA receptor D-serine/glycine site in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. Neurosci Biobehav Rev. 34: 351-372 (2010)

44. Laux G, Klotz U, Klieser E, Hohagen F, Heininger K, Wildmann J, Hajak G, de Vry J, Volz H-P, Voderholzer U, Tkaczik J, Sieghart W, Sieb JP, Rüther E, Miretzky A, Greuel JM, Wurthmann C, Haefely W, Fritze J, Fleischhacker WW, Berger M, Bongartz U, Broich K, Classen W, Dietmaier O, Hartmann H, Glaser T, Hänsel R. Herausgeber: Riederer P, Laux G, Pöldinger W: Psychopharmaka. Ein Therapie-Handbuch: Band 2: Tranquilizer und Hypnotika. Springer Wien: 335-342 (1995)

45. Li W, Zhao JH, Sun SG, Zhang JW, Suo AQ, Ma MM: [Clinical rehabilitative effect of memantine on cognitive and motor disorders in patients with Parkinson's disease]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 91: 301-303 (2011) [Article in Chinese]

46. Li YH, Wang J, Zhang G: Involvement of synaptic NR2B-containing NMDA receptors in long-term depression induction in the young rat visual cortex in vitro. Chin J Physiol. 54: 190-195 (2011)

47. Lo D, Grossberg GT: Use of memantine for the treatment of dementia. Expert Rev Neurother. 11: 1359-1370 (2011)

48. Loftis JM, Janowsky A: The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. Pharmacol Ther. 97: 55-85 (2003)

49. Lu C, Fu Z, Karavanov I, Yasuda RP, Wolfe BB, Buonanno A, Vicini S: NMDA receptor subtypes at autaptic synapses of cerebellar granule neurons. J Neurophysiol. 96: 2282-2294 (2006)

50. Luo J, Li W, Zhao Y, Fu H, Ma DL, Tang J, Li C, Peoples RW, Li F, Wang Q, Huang P, Xia J, Pang Y, Han Y: Pathologically Activated Neuroprotection via Uncompetitive Blockade of *N*-Methyl-D-aspartate Receptors with Fast Off-rate by Novel Multifunctional Dimer Bis(propyl)-cognitin. J Biol Chem. 285: 19947-19958 (2010)

51. Mathew SJ, Murrough JW, aan het Rot M, Collins KA, Reich DL, Charney DS: Riluzole for relapse prevention following intravenous ketamine in treatment-resistant depression: a pilot randomized, placebo-controlled continuation trial. Int J Neuropsychopharmacol. 13: 71-82 (2009)

52. Mealing GA, Lanthorn TH, Small DL, Black MA, Laferriere NB, Morley P: Antagonism of N-methyl-D-aspartate-evoked currents in rat cortical cultures by ARL 15896AR. J Pharmacol Exp Ther. 281: 376-383 (1997)

53. Noh J, Lee E, Chung J: The novel NMDA receptor antagonist, 2-hydroxy-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluoromethyl-benzylamino)-benzoic acid, is a gating modifier in cultured mouse cortical neurons. J Neurochem. 109: 1261-1271 (2009)

54. Olney JW: Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. Curr Opin Pharmacol. 3: 101-109 (2003)

55. Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, Neyton J: Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. Neuron. 28: 911-925 (2000)

56. Paoletti P: Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. Eur J Neurosci. 33: 1351-1356 (2011)

57. Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J, Lodge D: Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonism by Memantine (1-Amino-3,5Dimethyladamantan). Neuropharmacology. 32: 1337-1350 (1993)

58. Petrovic M, Horak M, Sedlacek M, Vyklicky L Jr: Physiology and pathology of NMDA receptors. Prague Med Rep. 106: 113-136 (2005)

59. Planells-Cases R, Montoliu C, Humet M, Fernández AM, García-Martínez C, Valera E, Merino JM, Pérez-Payá E, Messeguer A, Felipo V, Ferrer-Montiel A: A Novel N-Methyl-d-aspartate Receptor Open Channel Blocker with in Vivo Neuroprotectant Activity. J Pharmacol Exp Ther. 302: 163-173 (2002)

60. Sadiq MW, Borgs A, Okura T, Shimomura K, Kato S, Deguchi Y, Jansson B, Björkman S, Terasaki T, Hammarlund-udenaes M: Diphenhydramine active uptake at the blood–brain barrier and its interaction with oxycodone in vitro and in vivo. J Pharm Sci. 100: 3912-3923 (2011)

61. Sawada H, Oeda T, Kuno S, Nomoto M, Yamamoto K, Yamamoto M, Hisanaga K, Kawamura T: Amantadine for dyskinesias in Parkinson's disease: a randomized controlled trial. PLoS One. 5: 15298 (2010)

62. Sharma TA, Carr AJ, Davis RS, Reynolds IJ, Hamilton AD: Aromatic analogs of arcaine inhibit MK-801 binding to the NMDA receptor. Bioorg Med Chem Lett. 8: 3459-3464 (1998)

63. Sobolevsky AI, Koshelev SG, Khodorov BI: Interaction of memantine and amantadine with agonistunbound NMDA-receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurons. J Physiol. 512: 47-60 (1998)

64. Sobolevsky AI: Two-component blocking kinetics of open NMDA channels by organic cations. Biochim Biophys Acta. 1416: 69-91 (1999)

65. Sobolevsky AI, Yelshansky MV: The trapping block of NMDA receptor channels in acutely isolated rat hippocampsal neurons. J Physiol. 526: 493-506 (2000)

66. Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E: X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. Nature. 462: 745-756 (2009)

67. Stern-Bach Y, Russo S, Neuman M, Rosenmund C: A point mutation in the glutamate binding site blocks desensitization of AMPA receptors. Neuron. 21: 907-918 (1998)

68. Subramaniam S, Donevan SD, Rogawski MA: Hydrophobic interactions of n-alkyl diamines with the N-methyl-D-aspartate receptor: voltage-dependent and -independent blocking sites. Mol Pharmacol. 45: 117-124 (1994)

69. Subramaniam S, Donevan SD, Rogawski MA: Block of the N-methyl-D-aspartate receptor by remacemide and its des-glycine metabolite. J Pharmacol Exp Ther. 276: 161-168 (1996)

70. Szakács R, Janka Z, Kálmán J: The “blue” side of glutamatergic neurotransmission: NMDA receptor antagonists as possible novel therapeutics for major depression. Neuropsychopharmacol. 14: 29-40 (2012)

71. Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ: Genetic enhancement of learning and memory in mice. Nature. 401: 63-69 (1999)

72. Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ: Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. Neuropharmacology. 41: 779-790 (2001)

73. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R: Glutamate receptor ion

channels: structure, regulation, and function. Pharmacol Rev. 62: 405-496 (2010)

74. Tsai GE, Lin PY: Strategies to enhance N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in schizophrenia, a critical review and meta-analysis. Curr Pharm Des. 16: 522-537 (2010)

75. Tu RH, Grewall P, Leung JW, Suryaprasad AG, Sheykhzadeh PI, Doan C, Garcia JC, Zhang N, Prindiville T, Mann S, Trudeau W: Diphenhydramine as an adjunct to sedation for colonoscopy: a double-blind randomized, placebo-controlled study. Gastrointest Endosc. 63: 87-94 (2006)

76. Ulbrich MH, Isacoff EY: Rules of engagement for NMDA receptor subunits. Proc Natl Acad Sci U S A. 105: 14163-14168 (2008)

77. Vasquez C, Sánchez M, Herrera J, Quintero G: Reduction of inflammatory pain in female rats after NR2B NMDA cortical antagonism. Psicothema. 24: 296-301 (2012)

78. Weigt HU, Adolph O, Georgieff M, Georgieff EM, Föhr KJ: Evidence that Xenon does not produce open channel blockade of the NMDA receptor. J Neurophysiol. 99: 1983-1987 (2008)

79. Wollmuth LP, Sobolevsky AI: Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. Trends Neurosci. 27: 321-328 (2004)

80. Woolf CJ, Salter MW: Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science. 288: 1765-1769 (2000)

81. Yao Y, Mayer ML: Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. J Neurosci. 26: 4559-4566 (2006)

82. Yuan H, Erreger K, Dravid SM, Traynelis SF: Conserved structural and functional control of N-methyl-D-aspartate receptor gating by transmembrane domain M3. J Biol Chem. 280: 29708-29716 (2005)

83. Yuan H, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Traynelis SF: Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. J Neurosci. 29: 12045-12058 (2009)

84. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK: A randomized trial of an N-methyl-d-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. Arch Gen Psychiatry. 63: 856-864 (2006)

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich jederzeit tatkräftig unterstützt, mir immer wieder Mut gemacht und letztendlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle ist hier PD Dr. rer. biol. hum. Karl J. Föhr zu nennen, der mir dieses Thema bereitgestellt und somit ermöglicht hat, die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe, bei stets angenehmer Arbeitsatmosphäre, durchzuführen. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich und stand mir geduldig und verständnisvoll bei jeder Schwierigkeit mit Rat und Tat zur Seite.

Außerdem möchte ich PD Dr. med. Oliver Adolph für die gute Betreuung danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Margot Autenrieth-Kronenthaler für die ausgezeichnete Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowohl im Labor, als auch bei den Zellkulturen, sowie für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer und wichtigster Dank gilt aber vor allem meinen Eltern, die mir mein Studium und somit auch diese Doktorarbeit ermöglicht haben. Des Weiteren möchte ich mich bei ihnen und vor allem auch bei meinem Freund dafür bedanken, dass sie stets an mich geglaubt und mich jederzeit, im Besonderen beim Anfertigen dieser Doktorarbeit, unterstützt haben. Ich schätze mich glücklich, sie an meiner Seite zu haben.

Lebenslauf

	Persönliche Daten
Name	Kathrin Zeller
Geburtsdatum und -ort	22.10.1987 in Ellwangen
	Schulische Ausbildung
1994 - 1998	Grundschule Abtsgmünd
1998 - 2007	Kopernikus Gymnasium Wasseralfingen
06/2007	Abitur
	Studium
10/2007	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Ulm
10/2007-09/2009	Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums
09/2009	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2009-09/2013	Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums
11/2013	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Abschluss	Approbierte Ärztin