

**Untersuchungen zu den inhibitorischen
Wirkungen von Curcumin- und Psoralen-
Derivaten auf den lymphozytären
Kaliumkanal Kv1.3**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Anja Wernekenschnieder

Kiel 2003

Referent:

Prof. Dr. W. Hänsel

Korreferent:

Prof. Dr. D. Heber

Tag der mündlichen Prüfung:

09., 12. und 15.12.03

Zum Druck genehmigt:

Kiel, 17.12.03

Prof. Dr. W. Depmeier
(Dekan)

1	Einleitung	1
1.1	Ionenkanäle	1
1.1.1	Allgemeiner Aufbau und Funktionen	1
1.1.2	Kaliumkanäle	2
1.1.3	Spannungsabhängige Kaliumkanäle	5
1.2	Das Immunsystem	7
1.2.1	Überblick über die Komponenten des Immunsystems	7
1.2.2	Immunsuppressiva	13
1.2.3	Calciumabhängige Signaltransduktionswege während der Aktivierung von T-Lymphozyten	15
1.3	Curcuminoide	25
1.4	Psoralene	27
2	Zielsetzung	29
3	Strukturen	30
3.1	Curcuminoide	30
3.2	Psoralene	32
4	Elektrophysiologie	34
4.1	Ein Überblick über die Patch-clamp-Technik	34
4.1.1	Die Entwicklung der Patch-clamp-Technik	34
4.1.2	Konfigurationen	36
4.2	Zellkultur	38
4.2.1	Materialien und Geräte	38
4.2.2	Zelllinien	38
4.2.3	Kulturbedingungen	40
4.3	Das Patch-clamp-Experiment	42
4.3.1	Materialien und Geräte	42
4.3.2	Aufbau des Messplatzes	42
4.3.3	Lösungen	43
4.3.4	Vorbereitungen	45
4.3.5	Messbedingungen und Pulsprotokolle	46
4.3.6	Auswertung	47
4.4	Ergebnisse und Diskussion der Patch-clamp-Untersuchungen	52
4.4.1	Allgemeines	52

Inhaltsverzeichnis

4.4.2 Curcuminoide	52
4.4.3 Psoralene	61
4.5 Bestimmung der Wiederfindungsraten im Patch-clamp-Experiment	73
4.5.1 Materialien und Geräte	73
4.5.2 Methodenbeschreibung	73
4.5.3 Ergebnisse und Diskussion	76
5 Fluoreszenzanisotropie	80
5.1 Überblick über die Fluoreszenzanisotropie	80
5.1.1 Das Prinzip	80
5.1.2 Die Anwendungen	84
5.1.3 Aufbau und Eigenschaften von Membranen	85
5.1.4 Diphenylhexatrien	90
5.2 Durchführung der Experimente	92
5.2.1 Material und Geräte	92
5.2.2 Herstellung der Untersuchungslösungen	92
5.2.3 Aufnahme der Schmelzkurven	97
5.3 Ergebnisse und Diskussion	100
5.3.1 Lösungsmiteleinfluss	100
5.3.2 Curcuminoide als Fluoreszenzsonde	102
5.3.3 DPH als Fluoreszenzsonde	108
5.3.4 Curcuminoide und DPH als Fluoreszenzsonde	120
6 Zusammenfassung	125
7 Literaturverzeichnis	128
8 Anhang	141
8.1 Curcuminoide	144
8.1.1 L-929-Zellen	144
8.1.2 N1E-115-Zellen	148
8.2 Psoralene	154
8.2.1 L-929-Zellen	154
8.2.2 N1E-115-Zellen	157

Abkürzungsverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

Die Entwicklung von geeigneten Therapiemöglichkeiten bei Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose oder der Psoriasis ist ein wichtiges Ziel der pharmazeutischen Forschung. Bei vielen dieser Autoaggressionserkrankungen ist eine bestimmte Gruppe der weißen Blutkörperchen, die sogenannten T-Lymphozyten, an der Pathogenese beteiligt. Mechanismen, die eigentlich der Abwehr von Fremdstoffen dienen, richten sich dabei gegen körpereigene Strukturen. Das Ziel einer potentiellen Therapie ist die Unterdrückung dieser fehlgeleiteten Mechanismen.

Für die Aktivität der T-Lymphozyten spielen verschiedene Ionenkanäle, die Kaliumionen leiten, eine entscheidende Rolle. Die gezielte Blockade dieser Kanäle stellt eine neue Strategie für die Entwicklung von Immunsuppressiva dar. Daher ist die Beeinflussung des spannungsabhängigen lymphozytären Kv1.3-Kanals, dem in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zukommt, das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit.

Eine ausführliche Abhandlung zu Kaliumkanälen, dem Immunsystem und den Zusammenhängen zwischen beiden findet sich im folgenden Teil der Einleitung. Ebenso wird ein kurzer Überblick über Curcumin- und Psoralenderivate gegeben, die im Rahmen dieser Arbeit auf ihre inhibitorische Wirkung am Kv1.3-Kanal untersucht wurden.

1.1 Ionenkanäle

1.1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktionen

Die Plasmamembran von Zellen ist im Inneren extrem lipophil und daher undurchlässig für die hydrophilen Ionen. Der Energieaufwand, der nötig ist, um die Hydrathülle der Ionen für den Durchtritt durch die Membran zu entfernen, ist extrem groß. Da dennoch ein Ionentransport beobachtet wird, begannen zahlreiche Untersuchungen, um den zugrundeliegenden Mechanismus zu ergründen. Dabei entwickelten sich vielfältige Modellvorstellungen über die Art und Weise des Transports, z.B. durch einfache Löcher in der Lipidmembran oder über Carrier. Heute weiß man, dass Ionen durch meist hochselektive Kanäle von einer Seite der Membran auf die andere gelangen. Ionenkanäle sind membrandurchspannende

Einleitung

Proteine mit einer durchgehenden, wassergefüllten Pore. Die Ionen durchqueren diese Pore passiv, ohne Energieverbrauch. Die Triebkraft für den Durchtritt ist elektrochemisch und damit abhängig von der elektrischen Potentialdifferenz über der Membran und dem chemischen Konzentrationsgradienten des entsprechenden Ions. Diese Triebkraft bestimmt die Richtung des Ionenstroms. Ionenkanäle sind mit Selektivitätsfiltern ausgestattet, die jeweils nur einer oder wenigen Ionenarten den Durchtritt ermöglichen. Die durchquerenden Ionen müssen meist ihre Hydrathülle abstreifen, um durch die Pore zu gelangen. Um den damit verbundenen Energieaufwand zu kompensieren, befinden sich in dem Selektivitätsfilter polare Aminosäurereste wie zum Beispiel Carboxylgruppen, die während des Durchtritts für kurze Zeit die Rolle der Hydrathülle übernehmen. Diese Reste sind so angeordnet, dass in der Regel nur bestimmte Ionen exakt in diesen Filter hinein passen, da bei anderen Ionen die Hydrathülle nicht so gut von dem Selektivitätsfilter imitiert werden kann [Armstrong, 1998]. Manchmal finden in dem Filter auch noch einige Wassermoleküle Platz, so dass nicht die komplette Hydrathülle abgelöst werden muss [Koester und Siegelbaum, 1996].

Ionenkanäle befinden sich in allen Zellen, erregbaren wie nicht erregbaren. Meist sind die Kanäle aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt. Ihre Aktivierung erfolgt durch Bindung von Liganden, Änderung des Membranpotentials, der Temperatur oder des Drucks. Sie erfüllen vielfältige Aufgaben wie beispielsweise die Initiation und Weiterleitung elektrischer Signale, Kontrolle des Ruhemembranpotentials und des Zellvolumens.

1.1.2 Kaliumkanäle

Der Mensch besitzt mindestens 80 verschiedene Gene für Kaliumkanäle. Diese Kanäle sind immer aus mehreren α -Untereinheiten aufgebaut und können darüber hinaus noch regulatorische β -Untereinheiten besitzen. Kaliumkanäle lassen sich aufgrund des Aufbaus ihrer α -Untereinheiten in drei Superfamilien unterteilen [Wei et al., 1996; Coetzee et al., 1999]. Die α -Untereinheiten sind membrandurchspannende Proteine, das heißt, sie bestehen aus einer langen Aminosäurekette, deren N- und C-terminale Enden sich im Zellinneren befinden. Die erste Gruppe zeichnet sich durch sechs transmembranäre Segmente (TM) S1 bis S6 und eine Pore (P) aus (Abb. 1.1). Man bezeichnet sie auch als die 6TM1P-Familie. Zu ihr gehören die spannungs- und die calciumabhängigen Kaliumkanäle. Die Porenregion befindet sich zwischen S5 und S6. Das Segment S4 übernimmt in den spannungsabhängigen Kanälen die Rolle des Spannungssensors und enthält zu diesem Zweck zahlreiche

positiv geladene Aminosäuren. Der funktionsfähige Kanal entsteht durch Zusammenlagerung von vier solcher α -Untereinheiten, und stellt damit ein Tetramer dar. Es können auch verschiedene Untereinheiten einer Subfamilie zusammentreten, was die Kanalvielfalt noch erhöht.

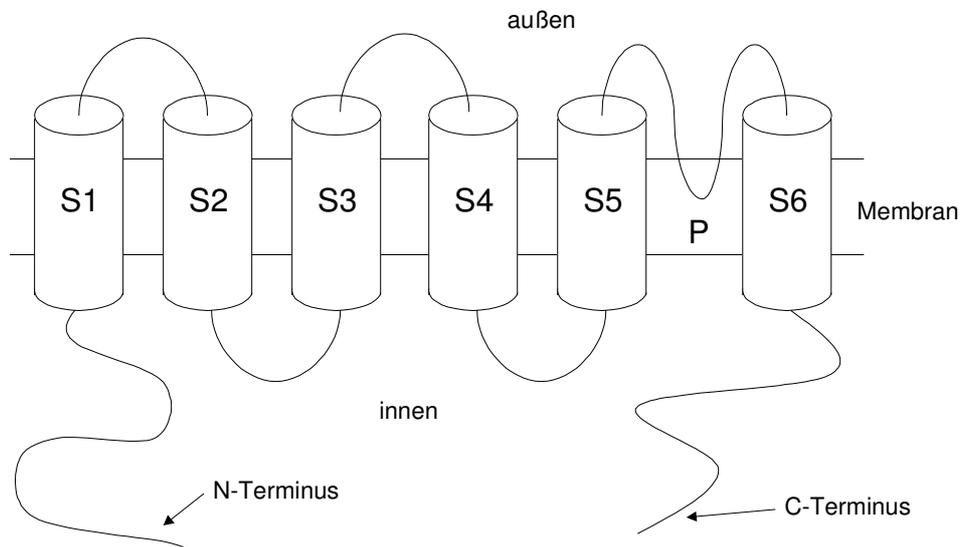


Abb. 1.1: Die α -Untereinheit der 6TM1P-Familie.

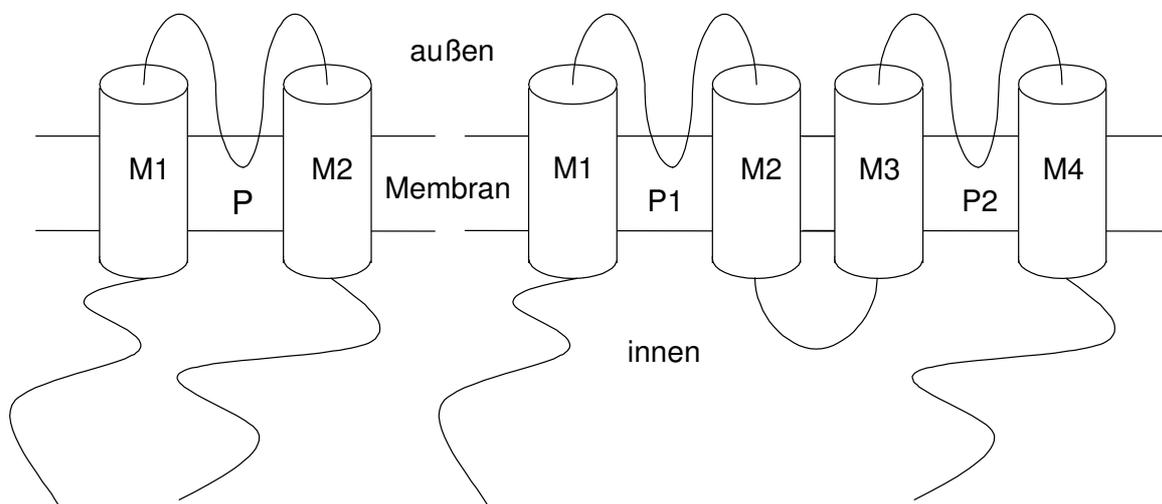


Abb. 1.2: Die α -Untereinheit der 2TM1P-Familie (links) und der 4TM2P-Familie (rechts).

Die zweite Familie besitzt zwei membrandurchspannende Segmente M1 und M2 und eine Pore (Abb. 1.2) und wird daher mit 2TM1P abgekürzt. Zu ihr gehören die sogenannten inward rectifier Kaliumkanäle (Kir). Auch hier bilden sich Tetramere. Bei der dritten Familie bestehen die Untereinheiten aus vier transmembranären

Einleitung

Abschnitten und zwei Poren (Abb. 1.2). Diese 4TM2P-Untereinheiten lagern sich zu Dimeren zusammen. Daneben wurden noch Kanäle mit 8TM2P-Untereinheiten beobachtet. Sie besitzen eine Pore P1 zwischen S5 und S6 und die zweite Pore P2 zwischen S7 und S8. Jede dieser Familien besitzt verschiedene Subfamilien mit unterschiedlich vielen Mitgliedern. Die Zuordnung zu den verschiedenen Subfamilien erfolgt aufgrund von Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz. Besonders die Porenregion ist hochkonserviert, was bedeutet, dass alle Kaliumkanäle eine fast identische Aminosäuresequenz in diesem Bereich aufweisen. Daneben besitzen die verschiedenen Kanäle eine oftmals große speziesübergreifende Homologie [Salkoff et al., 1992].

Die Kanalpore und der Selektivitätsfilter

Die Porenregion ist zugleich verantwortlich für die Selektivität der Kaliumkanäle, sie stellt den Selektivitätsfilter dar. Die Gestalt der Pore und damit des Selektivitätsfilters konnte beschrieben werden, nachdem die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des KcsA-Kaliumkanals aus *Streptomyces lividans* gelang [Doyle et al., 1998]. Neben den Ausmaßen und der Form dieser Kanalpore konnte auch gezeigt werden, dass sich im Selektivitätsfilter zwei Kaliumionen aufhalten, die vermutlich dazu dienen, durch abstoßende Kräfte die Anziehungskraft zwischen den polaren Aminosäuren des Filters und den durchquerenden Kaliumionen zu überwinden, damit diese nicht in der Pore stecken bleiben. Aber bereits zuvor hatte man eine gute Vorstellung über den Aufbau der Kanalpore. Aiyar et al. stellten Mutationen eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (Kv1.3) und Mutationen verschiedener Peptidtoxine dar und untersuchten jeweils die Stärke der Interaktion [Aiyar et al., 1996]. Aus den Ergebnissen konnten dann Rückschlüsse auf die Gestalt der Pore gezogen werden.

Channelopathien

Im Rahmen der intensiven Forschung auf dem Gebiet von Ionenkanälen wird bei immer mehr Erkrankungen entdeckt, dass diese auf eine Fehlfunktion verschiedener Kanäle zurückzuführen sind. Man bezeichnet sie als Channelopathien. Davon betroffen sind Kaliumkanäle ebenso wie Calcium- und Natriumkanäle, spannungsabhängige ebenso wie ligandengesteuerte. Auch die betroffenen Organe zeigen eine große Vielfalt (Nervensystem, Herz, Niere,...). Genauere Informationen lassen sich zahlreichen Übersichtsartikeln entnehmen [Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999; Shieh et al., 2000; Kullmann, 2002].

1.1.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Bei den spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv) sind mittlerweile 12 verschiedene Subfamilien bekannt, Kv1 bis Kv12. Vier davon, Kv1 bis Kv4, wurden zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gefunden und Shaker, Shab, Shaw und Shal genannt [Butler et al., 1989; Wei et al., 1990]. Die Subfamilien enthalten jeweils mehrere Mitglieder. In der Shaker-Familie Kv1 kennt man heute sieben verschiedene Kanalproteine, Kv1.1 bis Kv1.7.

Spannungssensor

Verantwortlich für die Spannungssensitivität ist das transmembranäre Segment S4 [Papazian et al., 1991]. Dieses Strukturmerkmal teilen sich die spannungsabhängigen Kaliumkanäle mit spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanälen. Der Spannungssensor weist bei all diesen Kanälen an jeder dritten oder vierten Position eine basische und damit unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Aminosäure (Arginin oder Lysin) auf. Eine Depolarisation der Zellmembran bewirkt eine Bewegung des S4-Segments und damit verbunden die Öffnung der Kanalpore. Der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt. Man vermutet eine 180°-Drehung des S4-Segments entlang seiner Achse [Cha et al., 1999; Glauner et al., 1999], die sich aufgrund der physikalischen Verbindung über das S5- auf das S6-Segment überträgt. Dieses rückt daraufhin leicht zur Seite und gibt die Pore frei (ausführliche Übersicht bei [Bezanilla, 2000]). Eventuell ist auch eine leichte Translationsbewegung sowie eine Veränderung der Neigung des Spannungssensors beteiligt (Übersicht bei [Bezanilla, 2002]).

Inaktivierung

Mit Inaktivierung wird der Übergang des spannungsabhängigen Kanals von einem offenen, leitenden in einen geschlossenen, nicht-leitenden Zustand bei anhaltender Depolarisation bezeichnet. Für diesen Vorgang existieren verschiedene Möglichkeiten. Es gibt eine schnelle N-Typ-Inaktivierung, für die ein Teil des N-Terminus der Kanäle verantwortlich ist [Hoshi et al., 1990]. Man spricht hier auch vom „ball-and-chain“-Prinzip, bei dem ein Teil des N-Terminus einem Ball gleich die Pore von innen verschließt. Diese Art der Inaktivierung lässt sich daher durch Blockade der inneren Pore, beispielsweise durch interne Tetraethylammoniumionen (TEA), unterdrücken [Choi et al., 1991]. Die gleiche Wirkung wird auch durch Mutationen zwischen dem S4- und dem S5-Segment erzielt [Isacoff et al., 1991], was darauf hindeutet, dass dies der Bindungsort des Balles ist. Kanäle, die diese schnelle Art der Inaktivierung zeigen, werden als A-Typ-Kanäle bezeichnet.

Einleitung

Daneben kennt man die langsamere C-Typ-Inaktivierung. Hier ist kein Ball beteiligt, sondern eine Konformationsänderung im Bereich des S6-Segments und der Porenregion, welche die Pore von außen verschließt (Übersicht bei [Rasmusson et al., 1998]). Diese Art der Inaktivierung lässt sich durch externes TEA verlangsamen [Choi et al., 1991]. Kanäle, die diesem langsamen Inaktivierungstyp unterliegen, werden verzögerte Gleichrichter (delayed rectifier) genannt.

Weiterhin wurde eine U-Typ-Inaktivierung beschrieben, die wie die C-Typ-Inaktivierung langsam verläuft. Allerdings erfolgt die Erholung aus dem inaktivierten Zustand deutlich schneller [Klemic et al., 2001]. Den Namen verdankt sie ihrer charakteristischen U-förmigen Beziehung zwischen Inaktivierung und Spannung. Die zugrundeliegenden Strukturänderungen der Kanäle sind noch nicht bekannt, aber die sogenannte T1-Domäne am N-terminalen Ende scheint beteiligt zu sein [Kurata et al., 2002].

Assoziierte Moleküle

Kaliumkanäle können mit anderen Molekülen assoziiert vorliegen, müssen es aber nicht. Man kennt bisher mindestens drei Familien von β -Untereinheiten (Übersicht bei [Pongs et al., 1999]), die an Kv-Kanäle binden, Kv β 1 bis Kv β 3. Diese Bindung erfolgt auf der zytoplasmatischen Seite der α -Untereinheiten am N-terminalen Ende [Sewing et al., 1996] im Verhältnis 1:1. β -Untereinheiten können die Kinetik der Kanäle sowie das Ausmaß der Kanalexpression beeinflussen.

Mittlerweile hat man noch das Protein KChAP (**K**⁺ **ch**annel-**a**ssociated **p**rotein) entdeckt, das scheinbar weniger dauerhaft als die β -Untereinheiten sowohl an den N-Terminus der α - als auch an den C-Terminus der β -Untereinheiten binden kann. Die Kanalkinetik wird dabei nicht beeinflusst, wohl aber die Expression [Wible et al., 1998; Kuryshev et al., 2000].

1.2 Das Immunsystem

1.2.1 Überblick über die Komponenten des Immunsystems

Das Immunsystem der Wirbeltiere ist für die Abwehr von Fremdstoffen zuständig, die dem Organismus schaden könnten. Es wird dabei von den physikalischen Barrieren des Körpers unterstützt, die das erste Hindernis für eindringende Mikroorganismen darstellen. Dazu zählt man zum Beispiel die Hornschicht der Haut, die Magensäure und die natürliche mikrobielle Flora vieler Schleimhäute. Die potentiell pathogenen Fremdstoffe umfassen Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten und deren toxische Stoffwechselprodukte. Manchmal ist auch der Einsatz gegen endogene Strukturen nötig, zum Beispiel gegen entartete Zellen. Dabei spielt die Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst eine entscheidende Rolle.

Die Immunabwehr setzt sich aus zwei verschiedenen Komponenten zusammen. Bei Kontakt mit einem Fremdstoff kommt zuerst die sogenannte angeborene Immunität zum Einsatz. Diese reagiert sofort, aber nicht spezifisch. Sie richtet sich gegen alle Fremdstoffe mit gleicher Intensität und kann dabei sogar den Wirtskörper selber schädigen. Dieser Teil der Immunantwort ist hochkonserviert und findet sich bereits bei niederen Tieren. Er erfasst hauptsächlich extrazelluläre Pathogene. Die erworbene oder adaptive Immunität dagegen reagiert erst mit einer Latenzzeit von Tagen oder sogar Wochen. Sie wirkt spezifisch gegen bestimmte Antigene und weist eine Gedächtnisfunktion auf. Diese Art der Abwehr findet sich nur bei höheren Tieren und ist eher gegen intrazelluläre Pathogene gerichtet. Die angeborene und die erworbene Immunabwehr ergänzen sich und greifen an vielen Punkten ineinander. Wenn beispielsweise die angeborene Immunität eine Infektion nicht alleine beenden kann, verhindert sie deren Ausuferung, bis die adaptive Immunantwort erfolgen kann. In jedem der beiden Zweige kann man weiterhin zwischen zellulärer und humoraler Abwehr unterscheiden.

Die zelluläre Immunabwehr wird von Leukozyten, den weißen Blutkörperchen, getragen. Diese entwickeln sich wie die anderen Blutzellen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der sogenannten pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Die Abbildung 1.3 zeigt eine Übersicht der von dieser Stammzelle ausgehenden Entwicklung der immunkompetenten Zellen.

Einleitung

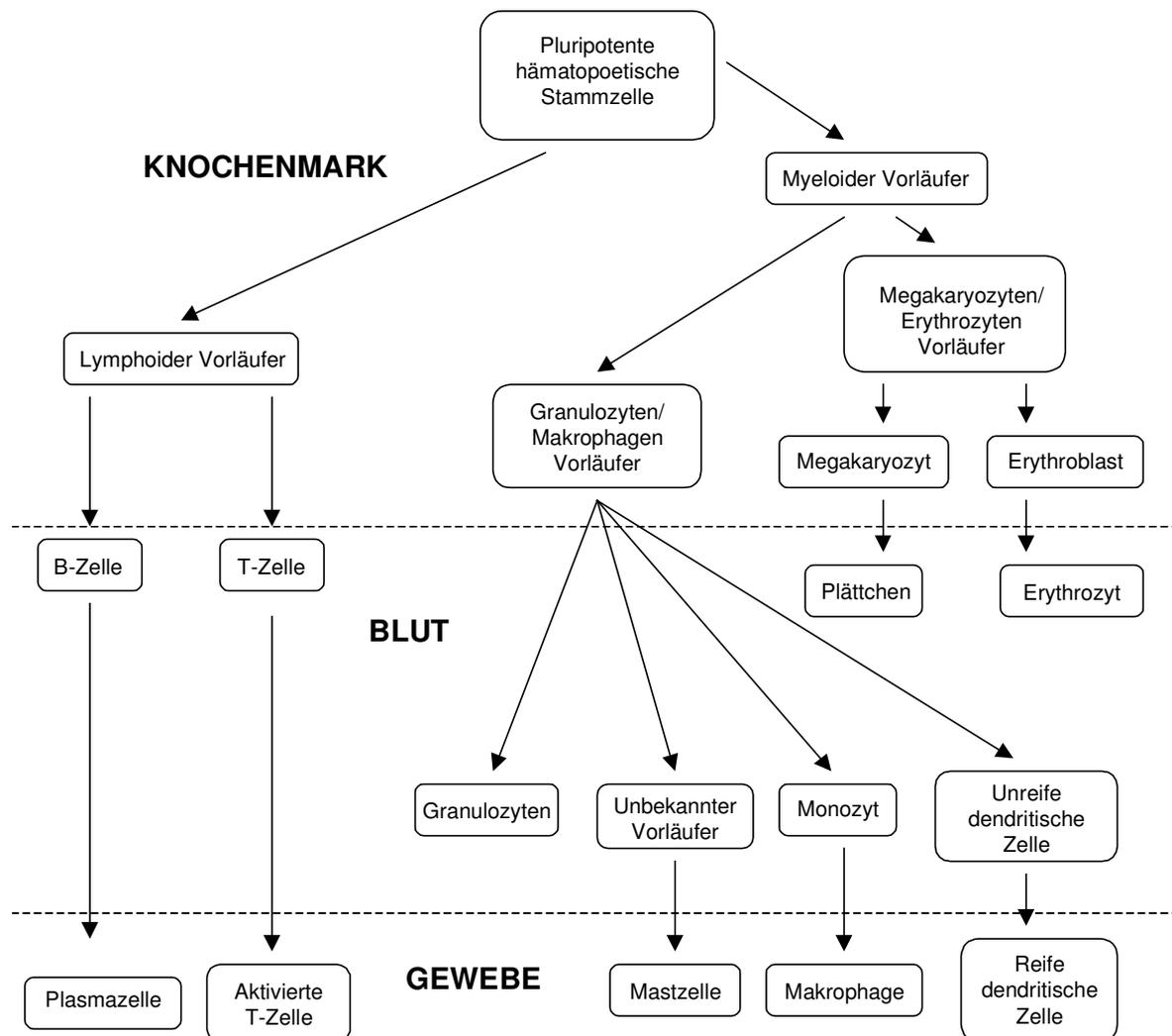


Abb. 1.3: Entwicklung der immunkompetenten Zellen (nach [Janeway et al., 2001]).

Im Knochenmark bilden sich aus dieser Stammzelle ein lymphoider und ein myeloider Vorläufer. Aus dem myeloiden Vorläufer entstehen unter anderem die für das Immunsystem wichtigen neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten und die unreifen dendritischen Zellen, die im Blut zirkulieren.

Die lymphoide Vorläuferzelle differenziert weiter in B- und T-Lymphozyten. Die T-Zellen verlassen das Knochenmark, um die endgültige Reife im Thymus zu erlangen, die B-Zellen verbleiben für diesen Prozess im Knochenmark. Bereits während dieser ersten Entwicklungsphase werden die Lymphozyten, die sich gegen körpereigene Strukturen richten, durch Apoptose, den programmierten Zelltod, ausgeschaltet. Sowohl der Thymus als auch das Knochenmark zählen zu den primären lymphatischen Organen, in denen die Lymphozyten heranreifen. Die sekundären

lymphatischen Organe umfassen in erster Linie die Milz, die Lymphknoten und die sogenannten Schleimhaut-assoziierten Lymphgewebe. Ihre Aufgabe ist jeweils das Herausfiltern von Antigenen im Blut, im Gewebe und auf Epithelien. Auf diese Weise treffen die Lymphozyten, die ständig zwischen Blut und Lymphe zirkulieren, innerhalb kürzester Zeit auf die in den sekundären lymphatischen Geweben festgehaltenen und adäquat dargebotenen Antigene.

Die angeborene Immunität

An der unspezifischen humoralen Immunabwehr ist in erster Linie das Komplementsystem beteiligt. Es besteht aus mindestens 20 Serum-Glykoproteinen, die nach unterschiedlichen Arten der Aktivierung einer Kaskade proteolytischer Reaktionen unterliegen. Auslöser dieser Kaskade sind Antigen-Antikörper-Komplexe oder Polysaccharid-Strukturen, die viele Mikroorganismen an ihrer Oberfläche aufweisen. Als Folge dieser Reaktionen entstehen zahlreiche Endprodukte mit verschiedenen Wirkungen. Es bilden sich transmembranäre Poren, die den Zelltod der pathogenen Mikroorganismen durch osmotische Zytolyse hervorrufen. Einige der Substanzen bewirken die sogenannte Opsonisierung, das heißt, sie besetzen die Oberfläche der als fremd erkannten Organismen und erleichtern so weiteren Immunzellen den Angriff. Andere wirken als Anaphylotoxine, welche die Gefäßpermeabilität erhöhen, und wieder andere als chemotaktische Substanzen, die weitere Abwehrzellen herbeirufen. All diese Vorgänge bewirken gemeinsam eine lokale Entzündungsreaktion.

Weitere Komponenten der unspezifischen Immunabwehr sind Akute-Phase-Proteine, Interferone und Lysozym. Akute-Phase-Proteine sind verschiedenste Enzyme und werden bei gewebeschädigenden Reizen vermehrt in der Leber gebildet, um die Folgen dieser Schädigung zu beseitigen. Interferone sind Proteine, die von Fibroblasten, Monozyten und Lymphozyten gebildet werden. Sie haben ein breites Wirkungsspektrum und beeinflussen besonders die virale Replikation. Lysozym wird beim Zerfall von Phagozyten freigesetzt und kann die Zellwand vieler Bakterien zerstören.

Die zellvermittelte unspezifische Immunabwehr wird von Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen getragen. Die unreifen dendritischen Zellen halten sich überwiegend in den Geweben auf. Dort erkennen sie Pathogene anhand häufig vorkommender Muster an der Oberfläche von fremden Organismen und binden diese. Sie nehmen die Mikroorganismen in sich auf, indem sie diese mit Membranausläufern umschließen. Diesen Vorgang nennt man Phagozytose. Danach erfolgt die Zerstörung der Pathogene durch

Einleitung

Verschmelzen mit Vesikeln, die verschiedenste zelltoxische Substanzen enthalten. Durch diesen Prozess werden die dendritischen Zellen aktiviert. Sie verlassen das Gewebe, wandern in die Lymphknoten und reifen dabei. Dort präsentieren sie den T-Lymphozyten einen Teil des aufgenommenen Pathogens als wirksames Antigen und aktivieren so die adaptive Immunabwehr. Weiterhin produzieren die reifen dendritischen Zellen Zytokine, die neben dem adaptiven auch den angeborenen Zweig des Immunsystems aktivieren. Zytokine sind Proteine, die Aktivierung, Teilung, Apoptose und Beweglichkeit sowohl der sezernierenden Zellen selbst als auch anderer Zellen beeinflussen. Sie wirken über spezifische Rezeptoren. Die dendritischen Zellen sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen.

Makrophagen entstehen aus Monozyten, wenn diese aus dem Blut in das Gewebe wandern, und gehören ebenfalls zu den phagozytierenden und antigenpräsentierenden Zellen. Sie erkennen fremde Organismen nach dem gleichen Prinzip wie die dendritischen Zellen. Auch sie schütten bei Kontakt mit Fremdstoffen verschiedene Zytokine aus. Dazu gehören unter anderem Chemokine, die chemotaktisch wirken und neutrophile Granulozyten und weitere Monozyten aus dem Blut in das Gewebe rufen und dort festhalten.

Die Neutrophilen sind die wichtigsten Phagozyten der angeborenen zellulären Abwehr. Die Makrophagen und die neutrophilen Granulozyten bezeichnet man auch als Entzündungszellen. Die eosinophilen Granulozyten vollziehen keine Phagozytose, enthalten aber Vesikel mit Substanzen, die nach Freisetzung toxisch auf andere Zellen wirken. Sie sind hauptsächlich an der Abwehr von Parasiten beteiligt. Basophile Granulozyten sind eher selten und übernehmen im Blut die gleichen Aufgaben wie Mastzellen, die aus unbekanntem Vorläuferzellen durch die Einwanderung ins Gewebe entstanden sind. Beide Zellarten enthalten Granula mit verschiedensten Mediatoren, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen.

Die natürlichen Killerzellen sind im Gegensatz zu den bisher erwähnten Zellen nicht aus dem myeloiden, sondern dem lymphoiden Vorläufer entstanden. Anders als die T- und B-Zellen besitzen sie jedoch keine spezifischen Rezeptoren für Antigene. Sie zirkulieren im Blut und greifen vor allem von Viren infizierte und Tumorzellen an.

Die erworbene Immunität

Die humorale adaptive Immunabwehr wird von den Antikörpern (Immunglobulinen) vermittelt, die von aktivierten B-Zellen produziert werden. B-Lymphozyten erkennen spezifisch vollständige Antigene und benötigen keine antigenpräsentierenden Zellen, die kleine Teile des Fremdstoffes an ihrer Oberfläche tragen. Der Kontakt zu einem

Antigen erfolgt über einen spezifischen B-Zell-Rezeptor, der einem membrangebundenen Antikörper entspricht. Dieser Kontakt aktiviert die B-Lymphozyten und sie beginnen, sich zu teilen und differenzieren schließlich zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, den Effektorzellen der B-Lymphozyten. Für diese Aktivierung ist meist neben dem Antigenkontakt auch die Hilfe aktivierter T-Lymphozyten notwendig. Eine bestimmte B-Zelle produziert jeweils nur Immunglobuline, die das bestimmte Antigen binden, für das ihr B-Zell-Rezeptor spezifisch ist. Jeder Mensch verfügt über mindestens 10^{10} verschiedene Antikörper. B-Zellen können Teile der Antigene, die sie zuvor nach Kontakt mit ihrem Rezeptor aufgenommen haben, den T-Zellen präsentieren. B-Lymphozyten erfassen wie die angeborene Immunabwehr hauptsächlich Antigene, die außerhalb von Zellen vorkommen, wie zum Beispiel Bakterien, T-Zellen eher die innerhalb von infizierten Zellen produzierten Antigene, wie beispielsweise bei Virusinfektionen.

Die ausgeschütteten Antikörper binden spezifisch an eine bestimmte Antigenstruktur und wirken auf drei verschiedenen Wegen. Sie sind in der Lage, Mikroorganismen oder deren toxische Produkte zu binden und ihnen so den Zugang zu körpereigenen Zellen zu verwehren und sie zu neutralisieren. Auf diese Weise können sich die Mikroorganismen noch immer vermehren. Hier setzt die zweite Folge der Antikörperbindung ein. Phagozyten erkennen die Antikörperstrukturen, nehmen die besetzten Organismen auf und zerstören sie. Dieser Prozess ist hilfreich bei Fremdstoffen, die von den phagozytierenden Zellen ohne diesen Besatz mit Antikörpern nicht erkannt werden. Ein dritter Effekt ist die Aktivierung des Komplementsystems mit den bereits beschriebenen Folgen.

T-Lymphozyten

Für die zelluläre adaptive Immunantwort sind T-Lymphozyten zuständig. Um sie zu aktivieren, sind antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen und Makrophagen unerlässlich, da T-Lymphozyten anders als die B-Lymphozyten nicht das gesamte Antigen erfassen können, sondern nur einen ca. 8 bis 9 Aminosäuren enthaltenden Teil von diesem. Jede T-Zelle kann nur ein ganz bestimmtes Antigen erkennen. Es existieren ca. 10^8 verschiedene T-Zell-Rezeptoren mit verschiedenen Spezifitäten. Nach der Phagozytose verdauen die antigenpräsentierenden Zellen die aufgenommenen Pathogene bis zu einem gewissen Grad und bringen dann kleine Bruchstücke davon an ihre Oberfläche, und zwar gebunden an HLA-Proteine (**h**umane **L**eukozyten-**A**ntigene) (im Englischen MHC, **m**ajor **h**istocompatibility **c**omplex). Man unterscheidet zwei Arten von HLA-Proteinen. HLA-Moleküle der Klasse I werden von allen kernhaltigen Zellen gebildet und spielen eine entscheidende Rolle bei der generellen Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst.

Einleitung

Unterschiede in diesen HLA-Molekülen der Klasse I sind beispielsweise verantwortlich für die Abstoßung von Transplantaten. HLA-Moleküle der Klasse II finden sich nur auf antigenpräsentierenden Zellen. Die Phagozyten wandern nach Aufnahme eines Fremdstoffes für die Antigenpräsentation in die Lymphknoten. Dort gelingt die Aktivierung des T-Lymphozyten nur, wenn dieser gleichzeitig mit dem für seinen T-Zell-Rezeptor (TZR) spezifischen präsentierten Antigen das richtige körpereigene HLA-Molekül erkennt (Abb. 1.4). Als Folge dieses Kontaktes unterbricht der T-Lymphozyt seine Wanderung, wächst und beginnt sich zu teilen. Die neu entstandenen Zellen differenzieren zu verschiedenen Effektorzellen, die dann entweder zum Ort des pathogenen Geschehens wandern, wo sie infizierte Zellen zerstören, oder in den Lymphknoten verbleiben, um B-Zellen zu aktivieren.

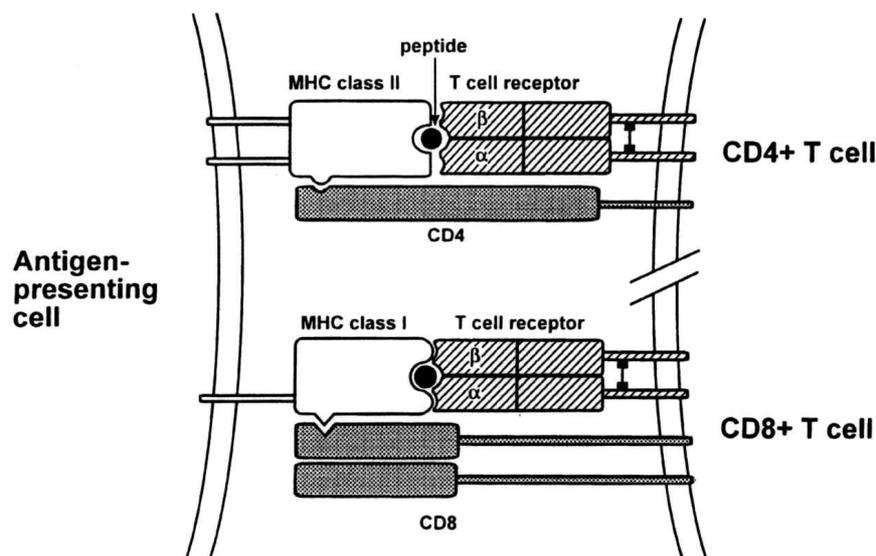


Abb. 1.4: Antigenerkennung bei T-Zellen (aus [Hohlfeld, 1997]).

Die vor der Bildung von Effektorzellen notwendige Zellteilung der T- und B-Lymphozyten erklärt die Latenzzeit, mit der die adaptive Immunantwort einsetzt. Die meisten der Effektorzellen sowohl der B- als auch der T-Lymphozyten begehen Apoptose, nachdem die Pathogene beseitigt sind. Einige wenige überleben jedoch und fungieren als Erinnerungszellen, die bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Fremdstoff für eine deutlich schnellere und effektivere Immunantwort sorgen. Sie verbleiben in den Lymphknoten. Auf diesen Erinnerungszellen basieren Schutzimpfungen.

Effektor-T-Zellen

Während der Reifung der T-Lymphozyten differenzieren diese zu zytotoxischen T-Zellen (Tc0) oder zu T-Helfer-Zellen (Th0). Die Helfer-Zellen exprimieren den CD4-Co-Rezeptor auf ihrer Oberfläche, der an HLA-Moleküle der Klasse II bindet. Die

zytotoxischen Zellen besitzen den CD8-Co-Rezeptor und binden damit an HLA-Moleküle der Klasse I.

Bei Stimulation von Th0-Zellen entwickeln sich Th1- und Th2-Zellen, die sich in ihrer Zytokin-Sekretion unterscheiden. Th1-Zellen produzieren neben Interleukin-2 (IL-2), das die T-Zell-Proliferation beschleunigt und die Zytotoxizität von Tc-Zellen erhöht, auch Interferon γ (INF γ), das Makrophagen aktiviert und die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen stimuliert. Sie spielen daher eine große Rolle in der Abwehr von intrazellulären Pathogenen, sind aber auch am Geschehen bei Autoimmunerkrankungen beteiligt. Th2-Zellen sezernieren Interleukin-4, 5, 6 und 10, was in erster Linie die Antikörper-Produktion unterstützt, aber auch zum Wachstum der eosinophilen Granulozyten führt. Th2-Zellen sind daher bei Allergien beteiligt.

Aus Tc0-Zellen entwickeln sich Tc1- und Tc2-Zellen, die sich ebenfalls anhand der von ihnen sezernierten Zytokine unterscheiden lassen. Die genaue Rolle der beiden Subtypen ist noch nicht vollständig geklärt. Die zytotoxischen Zellen bilden in Zielzellen Perforine und lösen auch auf andere Arten den programmierten Zelltod (Apoptose) aus.

1.2.2 Immunsuppressiva

Obwohl das Immunsystem für das Überleben der Wirbeltiere unerlässlich ist, kann es manchmal notwendig sein, die Immunabwehr zumindest teilweise auszuschalten. Dies ist der Fall bei Transplantationen, da es ansonsten zu einer Abstoßung des als fremd erkannten Organs kommt. Ein weiteres Einsatzgebiet der Immunsuppressiva sind die Autoimmunerkrankungen, bei denen sich das Immunsystem gegen körpereigene Strukturen richtet und diese zerstört. Dabei ist es deutlich schwieriger, eine bereits begonnene Immunantwort bei einer Autoaggressionserkrankung zu bremsen, als die Entstehung einer solchen gegen ein Fremd-Transplantat zu verhindern.

Man unterteilt die bisher vorhandenen Immunsuppressiva in vier Gruppen: Entzündungshemmende Corticosteroide, Zytostatika, Substanzen, die Einfluss auf die Signalweiterleitung in T-Lymphozyten nehmen, und Lymphozytenantikörper. Sie alle haben ein breites Wirkungsspektrum und damit auch viele nicht erwünschte Nebenwirkungen.

Einleitung

Corticosteroide

Corticosteroide wie das Prednison binden an intrazelluläre Rezeptoren, die dann in den Zellkern wandern und dort die Transkription vieler Gene beeinflussen. Daraus resultieren zahlreiche Effekte, die letztlich alle eine entzündliche Reaktion unterdrücken. Dazu zählen zum Beispiel die verminderte Produktion von Zytokinen, Leukotrienen und Prostaglandinen. Diesen positiven stehen als negative Wirkungen unter anderem Gewichtszunahme, Flüssigkeitsretention und diabetische Effekte gegenüber.

Zytostatika

Die zytostatischen Immunsuppressiva sind ursprünglich für die Krebstherapie entwickelt worden. Sie hemmen die DNA-Synthese und haben daher Einfluss auf alle sich teilenden Gewebe. Daraus ergibt sich auch das Nebenwirkungsspektrum mit Haarausfall, Schädigung der Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes und Mangel an verschiedenen Blutzellen. Eingesetzt werden in erster Linie Azathioprin, ein Antimetabolit der Purinsynthese, und Cyclophosphamid, eine alkylierende Substanz.

Lymphozyten beeinflussende Substanzen

Verbindungen, die hauptsächlich in die Signaltransduktion des Lymphozyten eingreifen, wie Cyclosporin A (CsA), FK506 (Tacrolimus) und Rapamycin (Sirolimus), haben bereits ein etwas günstigeres Nebenwirkungsprofil. Alle drei Verbindungen sind aus Mikroorganismen isoliert worden und binden in T-Lymphozyten an intrazelluläre Proteine, sogenannte Immunophiline. Die dabei entstehenden Komplexe interagieren mit verschiedenen Signaltransduktionswegen während der T-Zell-Aktivierung und verhindern diese. Cyclosporin A und Tacrolimus hemmen die calciumabhängige Phosphatase Calcineurin, Rapamycin bindet an eine Protein-Kinase namens mTOR (**m**ammalian **t**arget **o**f **r**apamycin). Beide Angriffspunkte beeinflussen letztlich die Transkription im Zellkern. Obwohl diese Verbindungen eine deutliche Präferenz für Lymphozyten aufweisen, bleiben sie nicht ohne Wirkung auf andere Zellen. Sie sind nephrotoxisch, cardiotoxisch und rufen reversible Leberschäden hervor.

Antikörper

Ein weiterer Ansatz zur gezielten Immunmodulation ist die Behandlung mit Antikörpern. Dafür steht ein Antilymphozytenserum zur Verfügung, das eine Vielzahl gegen Lymphozyten gerichtete Antikörper enthält. Mittlerweile sind auch monoklonale Antikörper vorhanden, zum Beispiel CD3-Antikörper, die gezielt an das CD3-Molekül binden, das mit den T-Zell-Rezeptoren vergesellschaftet ist, aber auch Antikörper gegen andere Co-Rezeptoren der Lymphozyten. Auf diese Weise ist es

möglich, die T-Lymphozyten nicht zu vernichten, wie es das Antilymphozytenserum tut, sondern sie nur zu inaktivieren und so eine unerwünschte Immunantwort zu unterdrücken. Eine Gefahr besteht in allergischen Reaktionen des Wirtskörpers auf die Fremdeiweiße. Das Antilymphozytenserum kann darüber hinaus eine ausgeprägte Lymphozytopenie hervorrufen.

Alle verfügbaren Immunsuppressiva verhindern nicht nur die unerwünschten Immunreaktionen, sondern immer auch die erwünschten und notwendigen, so dass ein Mensch unter immunsuppressiver Therapie stets generell abwehrgeschwächt ist. Daher ist die Suche nach einem selektiveren Arzneistoff ein vorrangiges Ziel in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und der Verhinderung der Transplantatabstoßung.

Für weitergehende Informationen über Aufbau, Funktion und Beeinflussung des Immunsystems sei auf die Lektüre der hier verwendeten Quellliteratur verwiesen [Janeway et al., 2001; Parkin und Cohen, 2001].

1.2.3 Calciumabhängige Signaltransduktionswege während der Aktivierung von T-Lymphozyten

Die Zusammenhänge, die in diesem Kapitel vorgestellt werden, sind, soweit es nicht anderweitig kenntlich gemacht ist, einigen neueren Übersichtsarbeiten entnommen [Janeway et al., 2001; Lewis, 2001; Cahalan et al., 2001].

Die drei Wege der Signalweiterleitung

Die Aktivierung der T-Lymphozyten durch Antigene verläuft über eine Vielzahl hochkomplizierter Signaltransduktionswege. Der erste Schritt dabei ist die Bindung des Komplexes aus Antigen und HLA-Molekül einer antigenpräsentierenden Zelle an den T-Zell-Rezeptor (TZR) eines Lymphozyten. Der TZR selbst ist mit einer ganzen Reihe anderer funktioneller Strukturen vergesellschaftet, welche die Signalweiterleitung ermöglichen. Über eine Kaskade verschiedener Reaktionen gelangt die Information von der Zellmembran in das Zellinnere und schließlich in den Zellkern, wo aktivierte Transkriptionsfaktoren das Ablesen verschiedener Gene ermöglichen. Die Antigen-Bindung aktiviert zunächst zahlreiche rezeptor-assoziierte Tyrosinkinassen (TK), die durch Phosphorylierung ihrer Zielstrukturen dann verschiedenste Wirkungen ausüben. Man unterscheidet drei generelle Signalwege, die zur T-Zell-Aktivierung beitragen. Eine grobe Übersicht der Vorgänge findet sich in Abbildung 1.5.

Einleitung

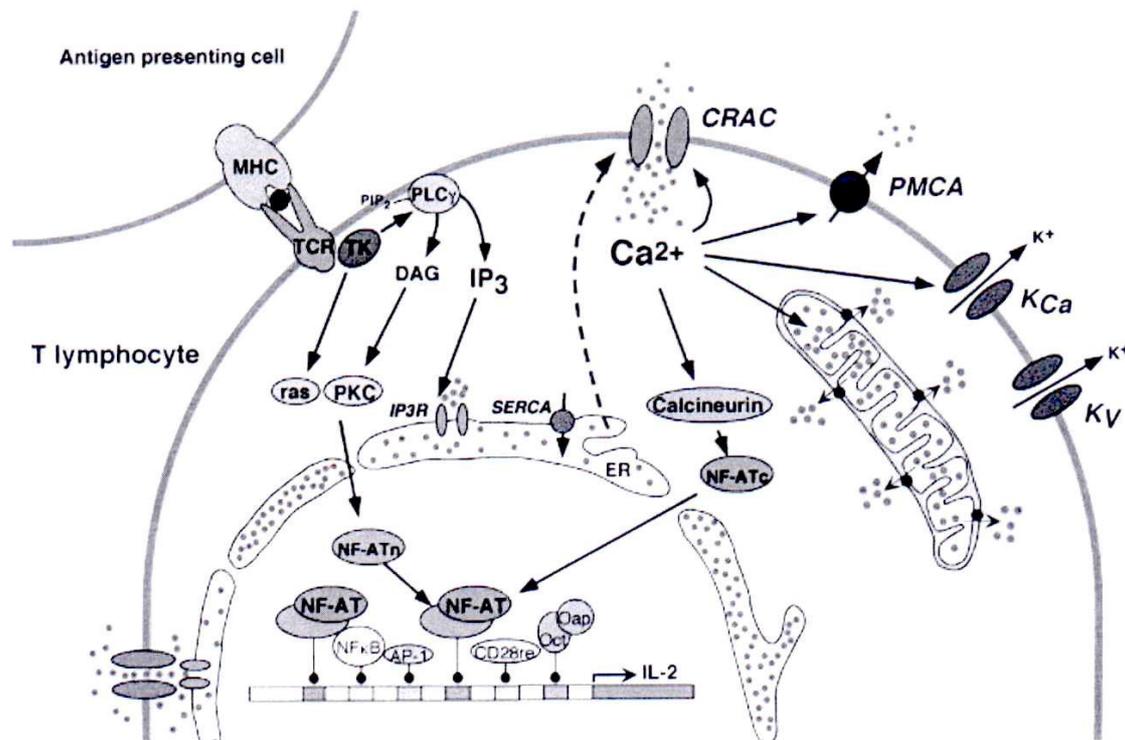


Abb. 1.5: Calciumabhängige Signaltransduktionswege der T-Zelle (aus [Lewis, 2001]); Erklärung im Text.

Zwei der Wege beginnen mit der Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ). Diese spaltet in der Membran vorhandenes Phosphoinositoldiphosphat (PIP $_2$) in Diacylglycerol (DAG) und 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP $_3$). PLC γ verstärkt das Signal, da jedes Molekül PLC γ mehrere Moleküle IP $_3$ und DAG produzieren kann. Das DAG verbleibt in der Membran und bewirkt in Anwesenheit von Calcium die Aktivierung der Proteinkinase C-Familie (PKC), die dann den Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert. NF κ B liegt im Ruhezustand der Zelle in einem Komplex mit dem inhibitorischen Protein I κ B vor, was den Zutritt zum Zellkern verhindert. Die Phosphorylierung dieses inhibitorischen Proteins bewirkt die Dissoziation des Komplexes, und das freie NF κ B kann in den Zellkern gelangen und dort verschiedene Gene aktivieren.

Das IP $_3$ bindet an Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und bewirkt so die Calciumfreisetzung aus diesem Zellkompartiment. Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert die calciumabhängige Phosphatase Calcineurin. Diese dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT (**n**uclear **f**actor of **a**ctivated **T** cells) und ermöglicht dem Molekül damit den Zutritt zum Zellkern. Dort vorhandene Kinasen können NFAT erneut phosphorylieren und damit aus dem Zellkern befördern. Damit dies nicht geschieht, werden kernständige Kinasen durch andere Signale während der T-Zell-Aktivierung gehemmt, so dass NFAT seine regulatorischen Aufgaben erfüllen kann.

Der dritte Weg in den Zellkern, ausgehend von der ersten Stimulation der verschiedenen Kinasen nach Antigenkontakt, ist die Aktivierung des ras-Proteins, das einen entscheidenden Einfluss auf das Zellwachstum besitzt. Das kleine GTP-bindende Protein (G-Protein) ist aktiv, wenn es GTP enthält, und wird inaktiviert, wenn das GTP durch Abspaltung einer Phosphatgruppe in GDP umgewandelt wird. In der Regel liegt ras im inaktivierten Zustand vor und wird jeweils nur kurzfristig aktiviert. Eine Mutation dieses Proteins kann zu unkontrolliertem Wachstum führen. Das ras-Protein wird durch Einwirken der Kinasen zum TZR gebracht und dort aktiviert, wo es neben vielen anderen Effekten die sogenannte MAP-Kinase-Kaskade (**mitogen-activated protein**) initiieren kann, die direkt zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern führt. MAP-Kinasen sind beispielsweise beteiligt an der Aktivierung von Fos, einem Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 (**activator protein 1**).

Die Rolle des Calciums

Das Calcium spielt in dem Aktivierungsprozess eine besondere Rolle, da es neben dem Calcineurin auch noch andere calciumabhängige Enzyme aktiviert. Für die vollständige Aktivierung des T-Lymphozyten muss ein hoher intrazellulärer Calciumspiegel für ca. ein bis zwei Stunden aufrecht erhalten werden. Danach verläuft der Aktivierungsprozess antigenunabhängig. Die hohe Calciumkonzentration ist notwendig, um beispielsweise NFAT im Zellkern zu halten und die Produktion zahlreicher Zytokine zu gewährleisten. Den Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Calciumsignal und der NFAT-vermittelten Genexpression untersuchten unter anderem Negulescu et al., die herausfanden, dass sich die Expression bei oszillierenden Signalen mit steigender Amplitude und Frequenz erhöht, dass aber auch einfache Plateaus in der Lage sind, NFAT zu aktivieren [Negulescu et al., 1994].

Wie bereits beschrieben, bindet nach Antigenkontakt entstehendes IP_3 an Rezeptoren auf dem ER und öffnet so Calciumkanäle, durch die große Mengen von Calcium ins Zytosol gelangen, was zusätzlich eine weitere Aktivierung der Freisetzung aus dem ER bewirkt. Die interne Calciumkonzentration steigt dadurch sehr schnell auf ca. 500 nM an, fällt aber auch innerhalb von ca. 100 s wieder auf ca. 100 nM ab. Das aus dem ER freigesetzte Calcium triggert einen weiteren und viel größeren Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum, indem es sogenannte CRAC-Kanäle (**calcium release-activated calcium**) öffnet. Dieser Einstrom ermöglicht auch das Wiederauffüllen des ER. Das Gen, das für den CRAC-Kanal codiert, ist noch nicht identifiziert. Auch Blocker dieses Kanals sind kaum bekannt und die wenig vorhandenen wirken nicht sehr selektiv.

Einleitung

Der CRAC-Kanal

Es gibt auch in anderen Zellen eine Reihe von solchen SOC (store-operated channel), aber der CRAC-Kanal zeichnet sich durch seine unter physiologischen Bedingungen hohe Selektivität für Calcium aus. In Abwesenheit von Calcium und anderen divalenten Kationen leitet der CRAC-Kanal auch monovalente Ionen wie zum Beispiel Natrium. Diese Eigenschaft hat man sich bei vielen Kanaluntersuchungen zunutze gemacht, denn die Leitfähigkeit des CRAC-Kanals für Calcium ist aufgrund der hohen Affinität des Calciums zu dem Selektivitätsfilter der Kanalpore zu klein, um Einzelkanaluntersuchungen durchzuführen. Mit Natrium ist dies problemlos möglich [Kerschbaum und Cahalan, 1999]. Dabei wurde festgestellt, dass sich während der Aktivierung der Strom durch die CRAC-Kanäle einer T-Zelle stufenweise erhöht, wobei jede Erhöhung einem zusätzlichen geöffneten Kanal entspricht. Dies spiegelt ein Alles-oder-Nichts-Prinzip wieder: Die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle steigt sprunghaft von nahezu 0 auf nahezu 1 [Kerschbaum und Cahalan, 1999]. Das gilt auch für die Reaktion auf IP_3 : Oberhalb einer gewissen Schwelle öffnen alle CRAC-Kanäle. Die Deaktivierung des Kanals erfolgt beim Wiederauffüllen des ER. Daneben existieren noch zwei Möglichkeiten der Kanal-Inaktivierung, zum einen schnell durch lokale Anhäufung von Calcium, zum anderen durch dauerhaftes Entleeren des ER durch Thapsigargin, ein pflanzliches Sesquiterpenlacton. Dieser letzte Prozess bewirkt eine langsame Inaktivierung um ca. 50%. Die Mitochondrien sind in der Lage, die Inaktivierung der CRAC-Kanäle zu verhindern und so den für die vollständige T-Zell-Aktivierung notwendigen hohen Calciumspiegel über längere Zeit aufrecht zu erhalten.

Der genaue Mechanismus der Aktivierung liegt noch im Dunkeln. Es scheint sich dabei um einen lokalen Prozess zu handeln. Es gibt die Theorie eines kleinen Überträgerstoffes namens CIF (calcium influx factor), der bei Calciumausstrom aus dem ER freigesetzt wird, zum CRAC-Kanal diffundiert und diesen aktiviert. Ein zweites Modell besagt, dass der CRAC-Kanal erst durch ER-Entleerung mithilfe von Vesikeln in die Plasmamembran gebracht wird. Die dritte diskutierte Annahme geht davon aus, dass der IP_3 -Rezeptor physikalisch direkt mit dem CRAC-Kanal gekoppelt ist. Eine bei der Calciumfreisetzung aus dem ER auftretende Konformationsänderung des IP_3 -Rezeptors würde auf den CRAC-Kanal übertragen werden und diesen öffnen. Für alle drei Modelle finden sich experimentelle Befunde, welche die jeweilige Theorie unterstützen, aber auch solche, die ihr widersprechen. Obwohl die Zahl der CRAC-Kanäle in ruhenden T-Zellen relativ gering ist, sind sie dennoch in der Lage, genügend Calcium in die Zelle zu bringen, um die weitere Signaltransduktion aufrecht zu erhalten. Dies lässt sich aus verschiedenen Parametern wie Zellgröße, Membranpotential, Leitfähigkeit und externer

Calciumkonzentration berechnen [Fomina et al., 2000]. Calcium gelangt aufgrund einer elektrischen Triebkraft in des Zellinnere. Durch den Einstrom der Kationen von außen wird die Membran depolarisiert und die Triebkraft für den weiteren Einstrom immer kleiner. Der Vorgang ist selbstlimitierend. Um den Einstrom dennoch über längere Zeit zu gewährleisten, besitzt der T-Lymphozyt Kaliumkanäle, durch die bei Öffnung Kaliumionen die Zelle verlassen und so der Membrandepolarisation entgegenwirken. Bei diesen Kanälen handelt es sich zum einen um den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3, der aufgrund der beginnenden Depolarisation öffnet, und zum anderen um den calciumabhängigen Kaliumkanal IKCa1, der durch die steigende intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert wird.

Calcium-Clearance

Um die Dauer und die Gestalt des Calciumsignals in T-Zellen zu kontrollieren, sind neben calciumfreisetzenden Prozessen auch Mechanismen der Calciumaufnahme wichtig. Dafür ist in erster Linie die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) zuständig, die das Calcium zurück in den Extrazellulärraum pumpt. Sie wird sofort bei steigender intrazellulärer Calciumkonzentration durch die Bindung von Calcium an ihre Transportfunktion aktiviert. Ab einer bestimmten Schwellenkonzentration steigert sich die Aktivität noch einmal um ein Vielfaches. Die PMCA verfügt über ein autoinhibitorisches C-terminales Ende, das durch Bindung von Ca^{2+} -Calmodulin gehemmt wird. Diese Eigenschaften sprechen der ATPase einen großen Beitrag an der Gestaltung des Calciumsignals zu. Neben der PCMA wird Calcium auch noch durch einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch aus der Zelle hinaus befördert. Die Sarco-Endoplasmatisches Retikulum- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) pumpt Calcium vom Zytosol zurück ins ER. Damit spielt sie eine große Rolle beim Wiederauffüllen des ER, leistet aber kaum einen Beitrag, um die ursprüngliche niedrige Calciumkonzentration im Zellinneren wieder herzustellen. Die Expressionsrate der Pumpe wird bei Aktivierung des T-Lymphozyten verändert.

Mitochondrien sind in der Lage, Calcium aufgrund ihres extrem negativen Membranpotentials aufzunehmen und dann langsam wieder abzugeben. Auf diese Weise wirken sie als Puffer. Die Calciumaufnahme erhöht in den Mitochondrien die Produktion von NADH und ATP, was als Vorbereitung auf die Aktivierung der Zelle gesehen werden kann. Die enorme Wichtigkeit der Mitochondrien für das Aktivierungsgeschehen der T-Zellen zeigt sich bei Zugabe von Substanzen, die durch Depolarisation der Mitochondrien deren Calciumaufnahme verhindern. Die Calciumkonzentration im Zytosol sinkt innerhalb kurzer Zeit drastisch ab und der Transkriptionsfaktor NFAT kann nur in geringerem Ausmaße im Zellkern gehalten werden [Hoth et al., 2000]. Die Abnahme des intrazellulären Calciums geht dabei

Einleitung

einher mit vermindertem Strom durch den CRAC-Kanal. Es zeigt sich, dass die Mitochondrien in der Lage sind, die calciumabhängige Inaktivierung des CRAC-Kanals durch Calciumaufnahme zu verhindern. Dieser Prozess spielt sich vermutlich nur lokal an den Kanälen ab, in deren Nähe meist Mitochondrien zu finden sind [Hoth et al., 2000].

Die Form des Calciumsignals als Antwort auf die Stimulation des TZR kann sehr stark variieren. Kurzfristig ansteigende Calciumkonzentrationen sind ebenso zu beobachten wie langanhaltende Plateaus, oszillierende Signale oder Kombinationen aus diesen Komponenten. Hervorgerufen werden diese Effekte durch das Zusammenspiel von Calciumfreisetzung und –wiederaufnahme unter Beteiligung vom ER, von CRAC-Kanälen, der PMCA und vermutlich auch der Aktivität der Kaliumkanäle. Je nach Art des Calciumsignals können unterschiedliche Antworten der T-Zelle erreicht werden. Niedrige Plateaus langer Dauer aktivieren zum Beispiel eher NFAT, kurzanhaltende Spikes eher NF κ B.

Der Kv1.3-Kanal

Dieser delayed-rectifier-Kanal kommt wie die anderen Kv-Kanäle nur in relativ wenigen Zellarten vor. Kv1.3 wird hauptsächlich in Lymphozyten exprimiert und daneben noch in Milz, Thymus, Niere, Lunge, Gehirn und in Fibroblasten [Grissmer et al., 1990; Chandy und Gutman, 1995]. Eine weitere Besonderheit des Kv1.3-Kanals ist die Tatsache, dass er in Lymphozyten als Homotetramer vorliegt [Grissmer et al., 1990], während er in den anderen Zellen in Heterotetramere eingebunden wird. Ein Angriff auf die Kv1.3-Struktur wird daher Lymphozyten deutlich mehr beeinflussen als andere Gewebe.

Auf dem Gebiet der Blockade spannungsabhängiger Kanäle im Allgemeinen und des Kv1.3-Kanals im Besonderen haben sich vor allem Peptid-Toxine hervor getan, die in erster Linie aus Skorpiongiften isoliert wurden. Beispiele hierfür sind Charybdo-, Kalio-, und Margatoxin. Sie vermögen die verschiedenen Kanäle im pico- bis nanomolaren Bereich zu blockieren (Übersicht bei [Chandy et al., 2001]). Ein Problem stellt die oft zu geringe Selektivität gegenüber anderen Kanälen dar. Durch gezielte Mutation des Seeanemonen-Toxins ShK erhielt man über den Austausch einer einzigen Aminosäure ShK-Dap²², das mit einem EC₅₀-Wert von 23 pM nicht nur eine beachtliche Potenz zur Kv1.3-Blockade aufweist, sondern darüber hinaus auch eine exzellente Selektivität von >100 gegenüber anderen Kanälen [Kalman et al., 1998]. Mit diesem Handwerkszeug können die Auswirkungen der Unterdrückung des Stromes durch den Kv1.3-Kanal untersucht werden, ohne andere Ionenkanäle zu beeinflussen.

Im Hinblick auf Kosten und Stabilität der Toxine und deren umständliche Applizierbarkeit als mögliche Arzneistoffe wurden zahlreiche niedermolekulare Stoffe synthetisiert und am Kv1.3-Kanal getestet. Substanzen mit völlig unterschiedlichen Strukturelementen sind in der Lage, den Kv1.3-Strom im nanomolaren Bereich zu unterdrücken: Dihydrochinoline wie WIN 17317-3 [Hill et al., 1995] und CP-339,818 [Nguyen et al., 1996], Triterpene wie Correolid [Felix et al., 1999; Koo et al., 1999], Piperidine wie UK-78,282 [Hanson et al., 1999] und Cyclohexanone [Schmalhofer et al., 2002]. Diese Verbindungen zeigen alle eine relativ geringe Selektivität oder weisen andere Probleme auf, die einen potentiellen Einsatz als Therapeutikum unwahrscheinlich erscheinen lassen.

Bereits vor fast zwanzig Jahren wurde die Bedeutung der Kv1.3-Kanäle für die Aktivierung von T-Zellen erkannt. DeCoursey et al. zeigten, dass verschiedene Substanzen, die den spannungsabhängigen delayed-rectifier Kaliumkanal in humanen T-Lymphozyten blockieren, auch die PHA(Phytohämagglutinin)-induzierte Zellteilung konzentrationsabhängig mit vergleichbarer Potenz zu unterdrücken vermögen [DeCoursey et al., 1984]. Als Nachweis dieser verminderten Mitogenese wurde der verringerte Einbau von ³H-Thymidin verwendet. Noch im gleichen Jahr bewiesen Chandy et al., dass solche Substanzen neben dem Thymidineinbau auch die Protein- und IL-2-Synthese nach Stimulation reduzieren [Chandy et al., 1984]. Dieser delayed-rectifier-Kaliumkanal wurde später als Kv1.3 identifiziert [Slaughter et al., 1996]. Später wurde erkannt, dass die Blockade des Kv1.3-Kanals nicht nur in vitro sondern auch in vivo immunologische Reaktionen unterdrückt. Mit Margatoxin (MgTX) als Kv1.3-Blocker wurde in Minischweinen die DTH (delayed-type hypersensitivity), eine allergische Reaktion des Types IV, ähnlich effektiv verhindert wie durch FK506 [Koo et al., 1997]. Man kam zu dem Schluss, dass der Kv1.3-Kanal in ruhenden T-Zellen das Ruhemembranpotential aufrecht erhält, sowohl in humanen [Leonard et al., 1992] als auch in denen von Minischweinen [Koo et al., 1997]. Die wichtige Rolle dieses Kanals für das Ruhemembranpotential zeigt sich auch bei stabiler Expression in Ovarialzellen des Hamsters [Defarias et al., 1995]: Das Potential der Hamsterzellen verschiebt sich dabei von -5 mV auf -50 mV. Eine Blockade des Kv1.3-Kanals durch zum Beispiel MgTX hat die Depolarisation der Membran zur Folge [Leonard et al., 1992; Defarias et al., 1995]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte mit Kaliotoxin (KTX) zeigen, dass die Kv1.3-Blockade nicht nur die IL-2-, sondern auch die Interferonproduktion in T-Zellen hemmt [Beeton et al., 2001a]. Darüber hinaus wird der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration verhindert. All das sind deutliche Hinweise darauf, dass eine Blockade des spannungsabhängigen lymphozytären Kaliumkanals die Aktivierung und Teilung der T-Zellen unterdrückt. Dies zeigt sich auch im Falle der experimentellen autoimmunen

Einleitung

Enzephalomyelitis (EAE). Die EAE ist ein Tiermodell für die Multiple Sklerose (MS), eine demyelinisierende Autoimmunerkrankung mit T-Zell-Beteiligung. Ein betroffenes Autoantigen bei der Pathogenese ist das myelinbasierte Protein (MBP). EAE kann durch adoptiven Transfer von MBP-spezifischen T-Zellen in Lewis-Ratten ausgelöst werden. Eine Vorbehandlung der injizierten Zellen mit KTX oder die gleichzeitige Gabe von KTX an die Ratten führt zu einem leichteren Verlauf der Erkrankung. Weitere in vivo-Untersuchungen bestätigten dieses Ergebnis. Auch wenn das KTX den Lewis-Ratten erst nach Ausbruch der ersten Symptome verabreicht wurde, verlief die Krankheit kürzer, leichter und seltener tödlich [Beeton et al., 2001a].

Der IKCa1-Kanal

Für die Calciumsensitivität dieses Kanals ist Calmodulin (CAM) verantwortlich, ein Protein mit vier Bindungsstellen für Calciumionen. Das CAM ist bereits in calciumfreier Form relativ fest an das C-terminale Ende einer jeden α -Untereinheit des IKCa1-Kanals gebunden. Bei einer Bindung von mindestens zwei Calciumionen an das CAM kommt es zur Konformationsänderung des Moleküls, die sich auf das Kanalprotein überträgt. Um den Kanal zu öffnen, müssen die CAM-Moleküle aller vier Untereinheiten Calcium binden [Fanger et al., 1999].

Ein selektiver Blocker des IKCa1-Kanals steht mit TRAM 34 zur Verfügung. Diese Verbindung wurde von dem Antimykotikum Clotrimazol abgeleitet, das den calciumabhängigen Kaliumkanal im nanomolaren Bereich blockiert, aber auch das P450-Enzym CYP3A4. TRAM 34 wirkt sogar noch etwas besser als Clotrimazol und hat keinen Einfluss mehr auf P450-Enzyme [Wulff et al., 2000].

Auch der calciumabhängige Kaliumkanal IKCa1 spielt eine Rolle bei der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten. Bei gezielter Blockade des IKCa1-Kanals durch TRAM 34 wird der Calciumeinstrom infolge eines aktivierenden Reizes verhindert [Fanger et al., 2001]. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass IKCa1-Blockade durch Clotrimazol die Proliferation von T-Lymphozyten und die $\text{INF}\gamma$ -Produktion unterdrückt [Jensen et al., 1999].

Veränderungen des Kanalbesatzes bei Aktivierung

Es zeigte sich, dass als Folge der T-Zell-Stimulation die beiden Kaliumkanäle in unterschiedlichem Ausmaß hochreguliert werden. Khanna et al. fanden eine Zunahme an mRNA für Kv1.3 um das 1,3-fache, für IKCa1 sogar um das 14,6-fache [Khanna et al., 1999]. Dieser deutliche Unterschied erklärt die Tatsache, dass IKCa1-blockierende Substanzen die Stimulation von ruhenden T-Zellen weniger stark

beeinflussen als die von voraktivierten [Khanna et al., 1999]. Ähnliche Ergebnisse erhielten Ghanshani et al. [Ghanshani et al., 2000].

Beeton et al. fanden in T-Zellen von mit MBP stimulierten Lewis-Ratten verschiedene Untergruppen von T-Lymphozyten [Beeton et al., 2001b]. Sie unterschieden ruhende T-Zellen mit ca. 1 bis 10 Kv1.3- und ca. 10 bis 20 IKCa1-Kanälen, akut aktivierte mit ca. 200 Kv1.3- und ca. 325 IKCa1-Kanälen und schließlich chronisch aktivierte Zellen mit ca. 1500 Kv1.3- und nur noch 20 bis 100 IKCa1-Kanälen. Diese verschiedenen Phänotypen erklären, warum die Kv1.3-spezifische Blockade durch ShK-Dap²² zwar die erneute Stimulation chronisch aktivierter T-Lymphozyten zu verringern mag, der IKCa1-spezifische Blocker TRAM 34 hingegen kaum. Die Kombination beider Substanzen bewirkt eine stärkere Unterdrückung als die Gabe von ShK-Dap²² alleine. In ruhenden und akut aktivierten T-Zellen dreht sich das Verhalten um, hier bewirkt ShK-Dap²² wenig, TRAM 34 hingegen verringert die Proliferation deutlich. Bei der EAE werden durch MBP chronisch aktivierte T-Zellen eingesetzt, daher verwundert es nicht, dass bei Vorbehandlung mit ShK-Dap²² die Erkrankung weniger schwerwiegend verlief als bei Einsatz von TRAM 34. Auch bei Gabe nach Auftreten der Symptome wirkte ShK-Dap²² deutlich besser.

In neuesten Untersuchungen wurde dieser unterschiedliche Kanalbesatz auch bei humanen T-Zellen gefunden [Wulff et al., 2003]. Das menschliche Blut weist verschiedene Typen von T-Lymphozyten auf. Es gibt naive T-Zellen, die noch nicht durch Antigenkontakt aktiviert wurden, daneben finden sich zentrale Gedächtniszellen (T_{CM} , central memory cells) und Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM} , effector memory cells). Bei Aktivierung verhalten sich naive und T_{CM} -Zellen ähnlich und regeln die Anzahl der IKCa1-Kanäle deutlich hoch, während die Zahl der Kv1.3-Kanäle sich kaum verändert. Die T_{EM} -Zellen dagegen weisen eine Hochregulation der Kv1.3-Kanäle auf bei nur leicht erhöhter Anzahl an IKCa1-Kanälen. Aus naiven T-Lymphozyten entwickeln sich durch wiederholte Stimulation T_{EM} -Zellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die aktivierten myelin-spezifischen T-Lymphozyten von MS-Patienten den gleichen Phänotyp aufweisen wie aktivierte T_{EM} -Zellen, also über eine sehr hohe Anzahl von Kv1.3-Kanälen verfügen. T-Zellen dieser Patienten mit anderer Spezifität dagegen regulieren bei Aktivierung IKCa1 hoch. Die Aktivierung von T_{EM} -Zellen wird durch potente Blockade des Kv1.3-Kanals mittels ShK ca. zehnfach besser verhindert als die Aktivierung von naiven oder T_{CM} -Zellen. Bei diesen beiden Zellpopulationen erfolgt auch nur eine vorübergehende Unterdrückung der Proliferation, denn aufgrund der Stimulation kommt es trotz der Kv1.3-Blockade zu einer vermehrten Expression von IKCa1, so dass bei erneuter Stimulation die Aktivierung Kv1.3-unabhängig und daher auch in Anwesenheit von ShK verläuft

Einleitung

[Wulff et al., 2003]. Damit wird deutlich, dass die Blockade des Kv1.3-Kanals die gezielte Ausschaltung chronisch aktivierter T-Zellen ermöglicht, während die Aktivierung anderer T-Lymphozyten nicht beeinflusst wird. Damit sind Substanzen, die gezielt den Kv1.3-Kanal zu blockieren vermögen, hoffnungsvolle potentielle nebenwirkungsarme Arzneistoffe für die Behandlung von MS und anderen Autoimmunerkrankungen, bei denen chronisch aktivierte T-Zellen zum pathogenen Geschehen beitragen. Generell scheinen weder IKCa1- noch Kv1.3-Blocker eine akute Toxizität aufzuweisen.

1.3 Curcuminoide

„Curcumin“ bezeichnet in der Regel ein Substanzgemisch, das aus dem Rhizom von *Curcuma longa* oder *Curcuma xanthorrhiza* gewonnen wird. Es enthält die Curcuminoide Curcumin, Monodesmethoxycurcumin und Bisdesmethoxycurcumin (Abb. 1.6). Neben dem Einsatz als Gewürz (Curry) und Lebensmittelfarbstoff ist seit langem seine positive Wirkung auf den Gallenfluss bekannt, und es findet daher Anwendung in Chologoga. Dabei wird fast ausschließlich *Curcuma xanthorrhiza* verwendet, da diese kein Bisdesmethoxycurcumin enthält. Dieser Verbindung wird nachgesagt, sie habe cholesteresehemmende Eigenschaften, aber zahlreiche Studien belegen das Gegenteil [Siegers et al., 1997; Deters et al., 1999].

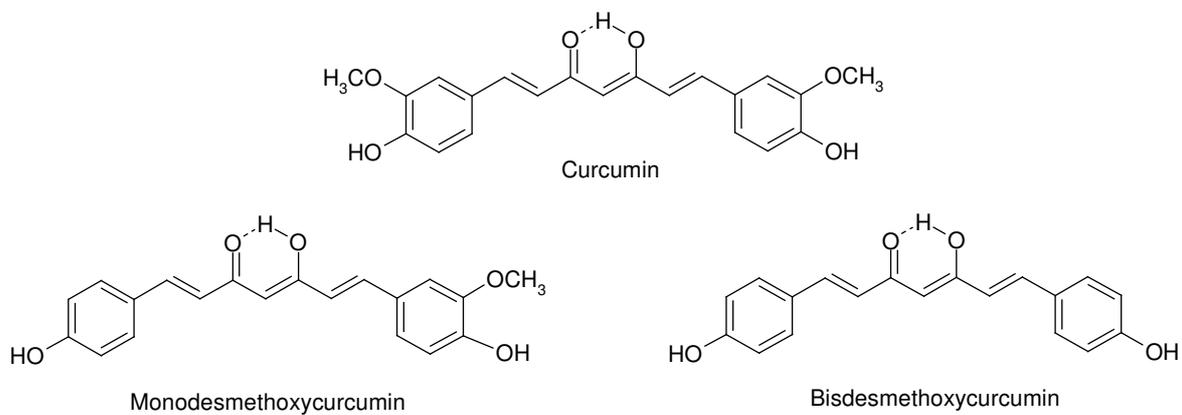


Abb. 1.6: Strukturen der Inhaltsstoffe des Substanzgemisches Curcumin.

Darüber hinaus scheint Curcumin eine große Vielfalt weiterer pharmakologischer Effekte zu besitzen (Übersichten bei [Ammon und Wahl, 1990; Araújo und Leon, 2001]). Bereits früh wurde von der anti-inflammatorischen Wirkung der Reinsubstanz Curcumin in akuten sowie chronischen Modellen berichtet [Srimal und Dhawan, 1973], wobei der Mechanismus lange Zeit im Dunkeln blieb. Heute vermutet man eine Hemmung der Cyclooxygenase-2(COX-2)-Expression und -Funktion als Ursache [Zhang et al., 1999]. Die Hemmung der COX-2 könnte unter anderem auch an der viel berichteten antikanzerogenen Wirkung beteiligt sein [Goel et al., 2001]. Curcumin ist in der Lage, das Wachstum von Kolonkrebiszellen zu verringern [Goel et al., 2001] und Apoptose in humanen Leukämiezellen auszulösen [Kuo et al., 1996]. Auch die beobachtete Hemmung der Lipoxygenase-1 (LOX-1) [Began et al., 1998] könnte zur antikanzerogenen Wirkung beitragen. Bekannt sind weiterhin umfassende antioxidative Effekte des Curcumins, die sich in Radikalfängereigenschaften äußern [Sreejayan und Rao, 1996]. Damit ist das Curcumin auch in der Lage, die

Einleitung

Lipidperoxidation ungesättigter Fettsäuren zu verhindern [Pulla Reddy und Lokesh, 1992]. Die antioxidativen zusammen mit den anti-inflammatorischen Effekten sind vermutlich auch verantwortlich für die vielversprechenden Wirkungen auf Morbus Alzheimer im Tiermodell [Lim et al., 2001]. Curcumin vermag Zellen vor β -Amyloid-Plaques zu schützen [Park und Kim, 2002].

Weiterhin wurde von Effekten gegen Nematoden berichtet, wobei es hier scheinbar auf eine synergistische Wirkung verschiedener Curcuminoide ankommt [Kiuchi et al., 1993], gegen *Leishmania amazonensis* [Gomes et al., 2002] und sogar gegen HIV [Li et al., 1993].

Mittlerweile wird versucht, auf molekularer Ebene die Ursachen für die verschiedenen beobachteten Curcumin-Wirkungen zu finden. Es ist gezeigt worden, dass Curcumin scheinbar die NF κ B-Aktivierung nach verschiedenen Reizen in humanen myeloiden Zellen [Singh und Aggarwal, 1995], in murinen Makrophagen [Kang et al., 1999] und in intestinalen Epithelzellen der Ratte [Jobin et al., 1999] zu verhindern mag. Der Mechanismus dieser Hemmung ist noch nicht bekannt. Fest steht lediglich, dass es zu keiner Bindung des Curcumins an NF κ B kommt.

Curcumin besitzt eine ganze Reihe positiver Eigenschaften, ohne bisher toxische Wirkung gezeigt zu haben. Den Verzehr curryhaltiger Speisen könnte man demnach nur empfehlen. Das Problem besteht allerdings in der geringen Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme [Wahlström und Blennow, 1978]. Auch die intravenöse Applikation bringt kaum eine Verbesserung, da ein Großteil des Curcumins im Rahmen eines first-pass-Effektes metabolisiert wird. Die Metaboliten scheinen jedoch zumindest in Bezug auf die anti-inflammatorischen Effekte weniger wirksam zu sein [Ireson et al., 2001].

Das Curcumin selber erscheint so wenig geeignet als Therapeutikum, aber es bleibt die Hoffnung, ein Derivat zu finden, das bei gleichen positiven Effekten eine günstigere Pharmakokinetik aufweist.

1.4 Psoralene

Die Geschichte der kaliumkanalblockierenden Psoralene geht auf eine mündliche Überlieferung zurück. Es wurde berichtet, dass man in Südamerika mit wässrigen Extrakten der Gartenraute (*Ruta graveolens*) Verbesserungen in der Symptomatik von MS-Kranken erreicht hatte. An einem kleinen Kollektiv von Freiwilligen konnte dieser Erfolg wiederholt werden [Bohuslavizki et al., 1993]. Diese wässrigen Extrakte waren zudem in der Lage, die Kaliumströme des Ranvierschen Schnürringes myelinisierter Axone des Krallenfrosches *Xenopus laevis* zu blockieren [Bautz et al., 1989]. Daraufhin wurde ein Zusammenhang zwischen der Wirkung an Kaliumkanälen und der Wirkung bei der MS vermutet, da das 4-Aminopyridin, das ebenfalls für eine verbesserte Symptomatik bei MS-Erkrankten sorgt, ebenfalls kanalblockierende Eigenschaften besitzt. Daher begann man, in der Gartenraute nach den verantwortlichen Inhaltsstoffen zu suchen. Bei der Testung von Benzofuranen erwies sich das 5-Methoxypsoralen (Bergapten) (Abb. 1.7) als die wirksamste Substanz an dem Kaliumstrom des Axons [Bohuslavizki et al., 1993]. Der Natriumstrom wurde kaum beeinflusst.

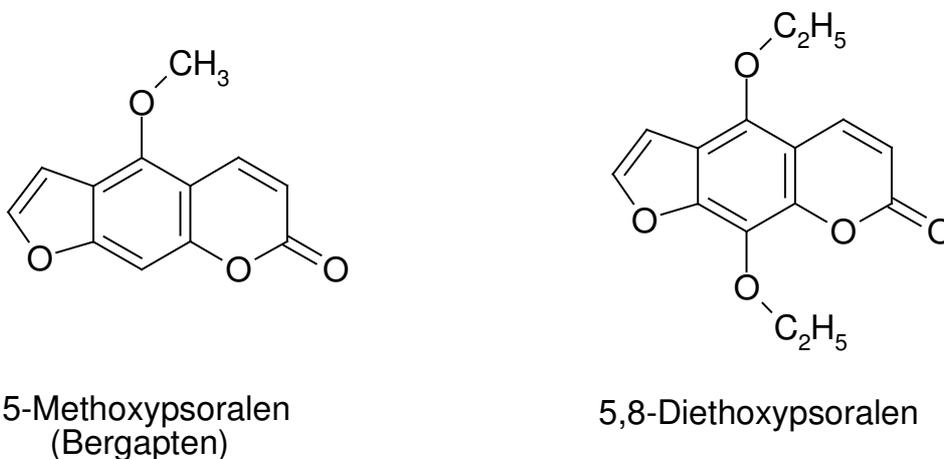
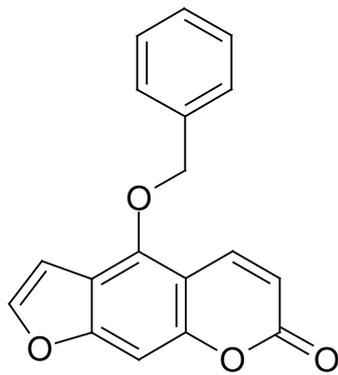
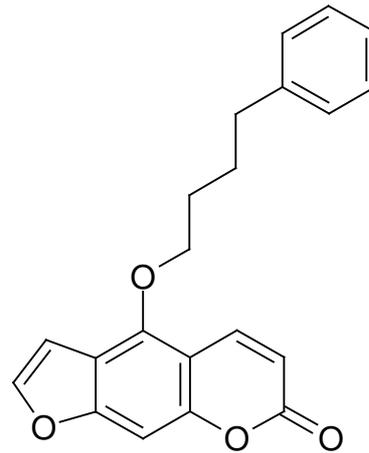


Abb. 1.7: Strukturen des 5-Methoxy- und des 5,8-Diethoxypsoralens.

Ein großer Nachteil der Psoralene bezüglich eines Einsatzes als Therapeutikum liegt in der Phototoxizität der Verbindungen (Übersicht bei [Averbeck, 1989]). Im Rahmen umfangreicher Synthesen konnten Strukturen erzeugt werden, die nach wie vor kaliumkanalblockierende Eigenschaften aufweisen, aber nur noch geringe bis keine Phototoxizität zeigen. Zu diesen Verbindungen gehört zum Beispiel das 5,8-Diethoxypsoralen (Abb. 1.7). Diese Substanz wurde nicht nur am Froschaxon untersucht, sondern auch gezielt an einzelnen Shaker-Kanälen [Wulff, 1998].



5-Benzyloxypsoralen



5-(4-Phenylbutoxy)psoralen

Abb. 1.8: Strukturen des 5-Benzyloxy- und 5-(4-Phenylbutoxy)psoralens.

Während des weiteren Screenings verschiedener Psoralene erwies sich das 5-Benzyloxypsoralen (Abb. 1.8) als besonders wirksam an Kaliumkanälen. Eine halbmaximale Blockade des Kv1.3-Stroms wurde durch 270 nM erzeugt [Herzog, 2000]. Aufgrund dieses sehr vielversprechenden Ergebnisses wurden weitere 5-Phenylalkoxy-psoralene dargestellt und an diesem Kanal getestet. Das 5-(4-Phenylbutoxy)psoralen (Abb. 1.8) erreicht die halbmaximale Kv1.3-Blockade bereits bei 2,9 nM und stellt damit den bisher potentesten nicht-peptidischen Blocker des Kv1.3-Kanals dar [Vennekamp, 2002].

2 Zielsetzung

In jüngster Zeit kristallisiert sich immer mehr heraus, wie wichtig potente und untoxische Blocker des Kv1.3-Kanals für die Therapie von Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose sein könnten [Wulff et al., 2003].

Psoralene sind schon länger für ihre inhibitorischen Effekte auf den Kv1.3-Kanal bekannt [Herzog, 2000; Vennekamp, 2002]. In dieser Arbeit sollten einige weitere Psoralen-Derivate auf ihre blockierende Wirkung am Kv1.3-Kanal und Selektivität gegenüber anderen Ionenkanälen untersucht werden. Soweit möglich, sollten Struktur-Wirkungs-Beziehungen diskutiert werden.

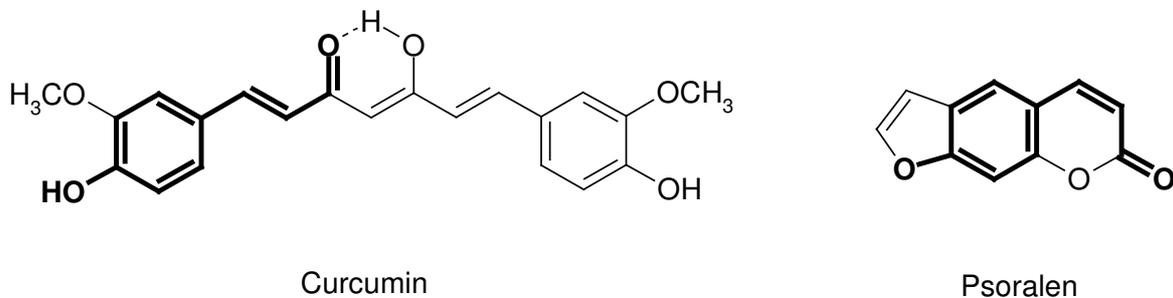


Abb. 2.1: Strukturen des Curcumins und des Psoralens unter Heraushebung des gemeinsamen Strukturelements.

Man kann bei Curcuminoiden und Psoralenen ein gemeinsames Strukturelement erkennen (Abb. 2.1). Diese Ähnlichkeit lässt eine ähnliche Wirkung als möglich erscheinen. Des Weiteren verfügt das Curcumin über eine Reihe immunologischer Effekte (siehe Kap. 1.3). Aufgrund der Beteiligung des Kv1.3-Kanals am immunologischen Geschehen sollte überprüft werden, ob Curcumin und einige Derivate diesen lymphozytären Kaliumkanal zu blockieren vermögen. Zugleich sollten erste Experimente zur Bestimmung der Selektivität gegenüber anderen Kanälen durchgeführt werden.

Während dieser Experimente wurden Effekte beobachtet, die auf membranverändernde Wirkungen der Curcuminoide hindeuteten. Diese Effekte wurden daher an Modell-Membranen (Liposomen) mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen genauer untersucht.

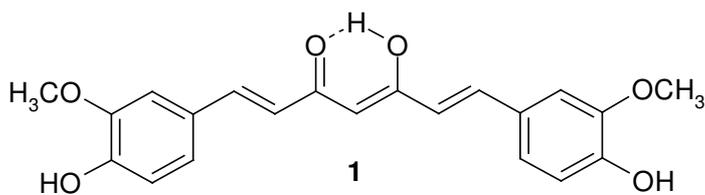
3 Strukturen

3.1 Curcuminoid

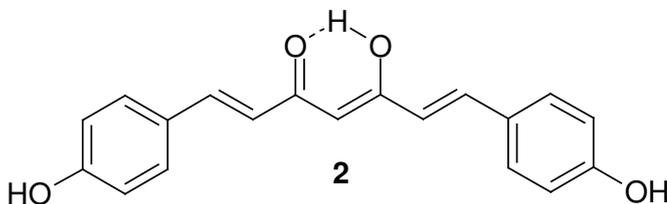
Die untersuchten Curcumin-Derivate **1** bis **9** wurden von Herrn Dr. Jens Kruse synthetisiert [Kruse, 2003] und freundlicherweise für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Das Naturstoffgemisch „Curcumin“, im Folgenden als **Curcumin** bezeichnet, enthält neben der chemischen Substanz Curcumin (Verbindung **1**) noch Bisdesmethoxycurcumin (Verbindung **2**) und Monodesmethoxycurcumin. Es wurde von Roth bezogen (Nr. 9469.1).

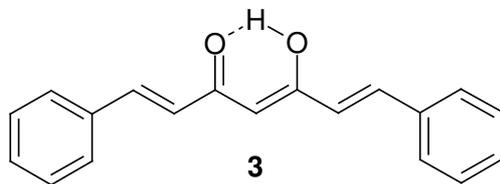
Die Substanz **10** wurde von Lancaster bezogen (Nr. 8507).



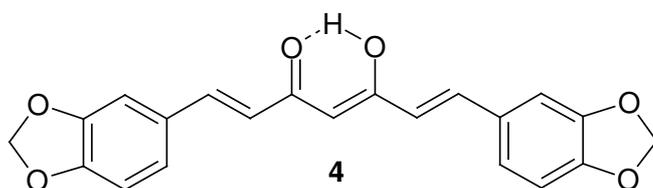
5-Hydroxy-1,7-bis(4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on
(Curcumin)



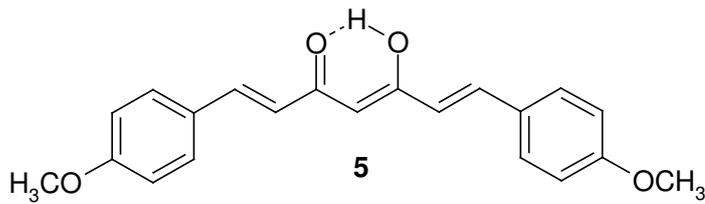
5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on
(Bisdesmethoxycurcumin)



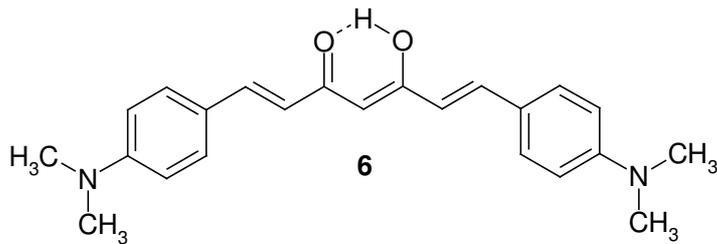
1,7-Diphenyl-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on



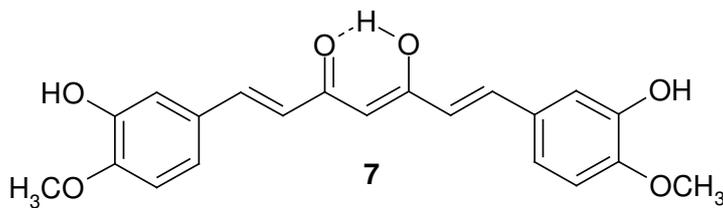
1,7-Bis(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on



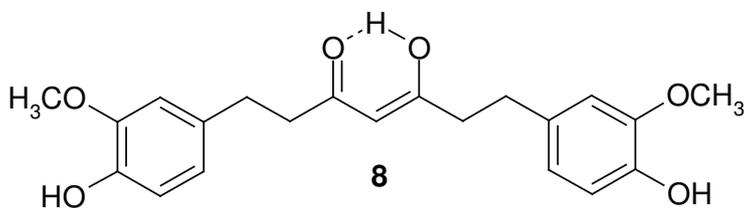
5-Hydroxy-1,7-bis(4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on



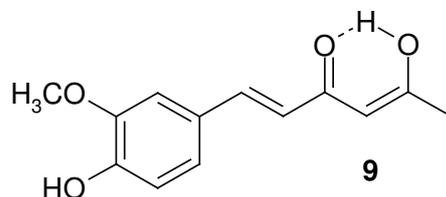
1,7-Bis(4-dimethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on



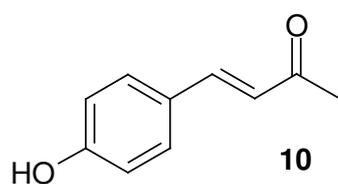
5-Hydroxy-1,7-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (Isocurcumin)



5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-hept-4-en-3-on (Tetrahydrocurcumin)



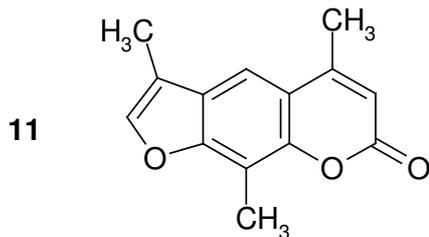
5-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4-hexadien-3-on



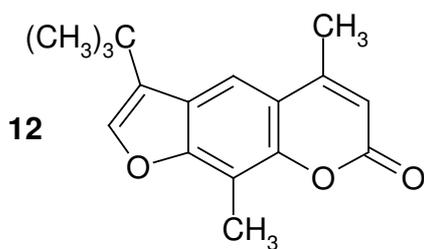
4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on (4-Hydroxybenzylidenacetone)

3.2 Psoralene

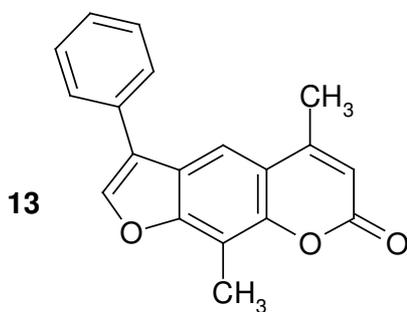
Die Psoralene wurden von Herrn Dr. Paul Körner synthetisiert [Körner, 2002 und 2003] und freundlicherweise für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.



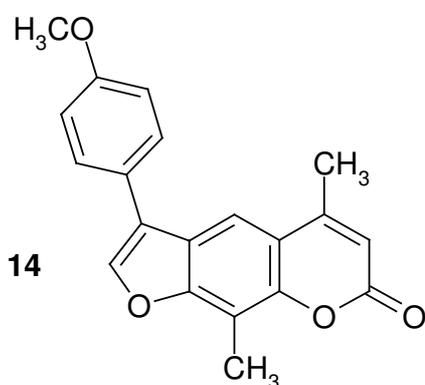
3,5,9-Trimethyl-7*H*-furo[3,2-*g*]-1-benzopyran-7-on



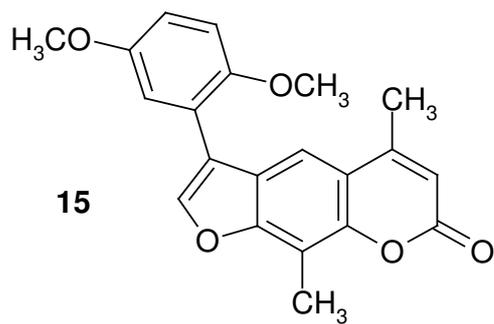
5,9-Dimethyl-3-(1,1-dimethylethyl)-7*H*-furo[3,2-*g*]-1-benzopyran-7-on



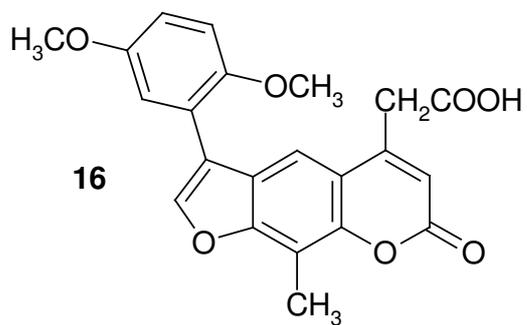
5,9-Dimethyl-3-phenyl-7*H*-furo[3,2-*g*]-1-benzopyran-7-on



3-(4-Methoxyphenyl)-5,9-dimethyl-7*H*-furo[3,2-*g*]-1-benzopyran-7-on



3-(2,5-Dimethoxyphenyl)-5,9-dimethyl-*7H*-furo[3,2-*g*]-1-benzopyran-7-on



5-Carboxymethyl-3-(2,5-dimethoxyphenyl)-9-methyl-*7H*-furo[3,2-*g*]-1-benzopyran-7-on

4 Elektrophysiologie

4.1 Ein Überblick über die Patch-clamp-Technik

4.1.1 Die Entwicklung der Patch-clamp-Technik

Erste Experimente an Ionenkanälen

Die Patch-clamp-Technik ist die heute wohl meistgenutzte Methode der Elektrophysiologie und wird zur Untersuchung von Ionenkanälen eingesetzt.

In den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts begannen Experimente, welche die Vorgänge in elektrisch erregbaren Zellen während eines Aktionspotentials genauer untersuchen sollten. Hiermit beschäftigten sich unter anderem Cole und Curtis, die herausfanden, dass die Membranleitfähigkeit während eines Aktionspotentials stark ansteigt und die elektromotorische Kraft sinkt [Cole und Curtis, 1939]. In den Jahren danach gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen, vollständige Aktionspotentiale mithilfe von intrazellulären Mikroelektroden aufzuzeichnen. Da kleinere Zellen das Einstechen der Elektroden meist nicht überlebten, war dies nur bei sehr großen Zellen möglich. Hierbei wurde erstmals gezeigt, dass sich das im Ruhezustand negative Membranpotential während des Aktionspotentials nicht nur 0 mV nähert, sondern sogar zu positiven Werten überschießt. Bei all diesen Untersuchungen wurde ein Strom injiziert und die daraus folgende Spannungsänderung gemessen.

Die Voltage-clamp-Technik

Gegen Ende der vierziger und Anfang der fünfziger Jahre wurde die sogenannte Voltage-clamp-Technik, die „Spannungsklemme“, entwickelt. Sie erlaubte erstmals, das Membranpotential einer Zelle zu kontrollieren (auf eine bestimmte Spannung zu „klemmen“). Auf diese Weise können gezielte Impulse durch Spannungsänderung gesetzt und die resultierenden Ströme der Zelle erfasst werden, ohne dass sich das Membranpotential durch diese Ströme verändert. Zusätzlich werden die störenden kapazitiven Ladeströme soweit verringert, dass ausschließlich die Ionenströme durch die Membran gemessen werden.

Die Voltage-clamp-Technik basiert auf einem negativen Rückkopplungsmechanismus. Das Membranpotential wird dabei ständig gemessen und mit dem vorgegebenen Sollwert verglichen. Bei Abweichungen wird ein Kompensationsstrom

injiziert, der eine dem Ionenstrom entgegengesetzte Richtung aufweist, aber die gleiche Größe besitzt. Auf diese Weise kann das Membranpotential konstant gehalten werden.

Hodgkin und Huxley führten eine große Anzahl von Untersuchungen mit der Voltage-clamp-Technik durch und zeigten, dass ein Aktionspotential durch zwei voneinander unabhängige Stromkomponenten generiert wird. Darüber hinaus entwickelten sie mathematische Gleichungen, die das Verhalten von Ionenkanälen sehr gut beschreiben, obwohl man zu diesem Zeitpunkt noch keine Vorstellung von der Natur solcher Kanäle hatte [Hodgkin und Huxley, 1952].

Die Patch-clamp-Technik

Die Voltage-clamp-Methode erlaubte lange Zeit nur die gleichzeitige Beobachtung vieler Kanäle, da das Hintergrundrauschen dieser Technik viel zu groß war, um Ströme durch einzelne Kanalproteine zu erfassen. Neher und Sakmann verringerten dieses Rauschen, indem sie die Messelektrode mit einer fein ausgezogenen, elektrolytgefüllten Glaspipette umgaben, die dann vorsichtig auf die Zelle aufgesetzt wurde. So entstand ein hoher Abdichtwiderstand (Seal = Verschluss) zwischen Pipette und Zelle, und ein kleiner Bereich der Membran (Patch = Flicken) wurde elektrisch isoliert. Mithilfe dieser Patch-clamp-Technik gelang ihnen die erste Einzelkanalableitung [Neher und Sakmann, 1976].

Die nächsten Jahre der Forschung erreichten eine weitere Verringerung des Rauschens. Es wurde festgestellt, dass sich der Abdichtwiderstand zwischen der Patchpipette und der Zelle um mehrere Größenordnungen steigern ließ, wenn man immer frische Pipetten verwendete und beim Kontakt mit der Zelle einen leichten Unterdruck anlegte. Der sogenannte Sealwiderstand erreicht jetzt Werte bis 100 G Ω , weswegen man heute von Gigaseals spricht [Neher, 1982; Hamill et al., 1981]. Dabei nähert sich die Membran der Glaspipette bis auf wenige Ångström. Die genauen Hintergründe dieser engen Verbindung sind bis heute nicht geklärt.

Aufgrund der eingesetzten extrazellulären Mikroelektroden sind nun auch Ganzzellmessungen an sehr kleinen Zellen möglich, die das Einstechen der vorher verwendeten intrazellulären Elektroden nicht überlebten.

Nobelpreise

Die Bedeutung dieser Entwicklungsgeschichte kann man auch an der Zahl der Nobelpreise für Medizin und Physiologie ermessen, die den beteiligten Personen in diesem Zusammenhang verliehen wurden. 1963 ging dieser an Eccles, Hodgkin und Huxley „für ihre Entdeckungen über den Ionen-Mechanismus, der sich bei der Erregung und Hemmung in den peripheren und zentralen Bereichen der Nervenzellenmembran abspielt“. Sieben Jahre später, 1970, bekamen Katz, von

Elektrophysiologie

Euler und Axelrod diese Auszeichnung „für ihre Entdeckungen der Signalsubstanzen in den Kontaktorganen der Nervenzellen und der Mechanismen für ihre Lagerung, Freisetzung und Inaktivierung“. 1991 dann wurde der Nobelpreis für Medizin und Physiologie an Neher und Sakmann verliehen „für ihre Entwicklung einer Methode zum direkten Nachweis von Ionenkanälen in Zellmembranen zur Erforschung der Signalübertragung innerhalb der Zelle und zwischen den Zellen“ (Quelle: <http://www.dhm.de/lemo/html/kaiserreich/wissenschaft/nobelpreis/medizin/>). Und vor Kurzem ist Agre und MacKinnon der Nobelpreis für Chemie 2003 zugesprochen worden für ihre „Entdeckungen bezüglich der Kanäle in Zellmembranen“, die ohne die Patch-clamp-Technik so nicht möglich gewesen wären.

Viele Werke geben einen ausführlicheren Einblick in die Geschichte der Patch-clamp-Technik [Hille, 1992; Numberger und Draguhn, 1996; Teisseyre, 2001].

4.1.2 Konfigurationen

Die Patch-clamp-Technik erlaubt verschiedene Messkonfigurationen. Diese sind zur Veranschaulichung in Abbildung 4.1 aufgeführt.

Hat man durch die oben beschriebene Annäherung zwischen Pipette und Zelle einen Gigaseal erzeugt, so spricht man von einer cell-attached-Konfiguration. Man kann bereits in diesem Zustand Patch-clamp-Messungen durchführen. Wesentlich häufiger wird jedoch die whole-cell-Konfiguration eingesetzt, zu der man gelangt, wenn man ausgehend von dem cell-attached-Zustand die Membran unter der Pipette durch vorsichtiges Saugen zerreißt. Auf diese Weise erhält man einen leitenden Zugang in das Zellinnere und kann während der Experimente die Ströme aller Kanäle einer Zelle untersuchen. Zu erwähnen ist, dass man in dieser Konfiguration zwar eine definierte, aber keine physiologische Zusammensetzung des Zellinneren erreicht, da sich die Pipettenlösung innerhalb kurzer Zeit mit dem viel kleineren Volumen des Zytoplasmas vermischt.

Für Einzelkanaluntersuchungen wird mit Membran-Patches, also kleinen Membranstücken, gearbeitet. Hierbei unterscheidet man zwei Möglichkeiten: Die outside-out- und die inside-out-Konfiguration. Zur ersteren gelangt man, wenn man im whole-cell-Modus die Pipette langsam von der Zelle wegzieht. Dabei reißt ein Teil der Membran ab und schließt sich wieder als Vesikel über der Pipette, ohne dass der Sealwiderstand dabei nennenswert abnimmt. In diesem Fall tritt die Zellaußenseite in Kontakt mit der Badlösung. Für den inside-out-Zustand geht man von der cell-attached-Konfiguration aus und zieht ebenfalls vorsichtig die Pipette von der Zelle

ab. Dabei reißt man ein kleines Stück Membran aus der Zelle. Auch hier bildet sich ein Vesikel an der Pipette ohne Änderung des Widerstandes. Allerdings bekommt jetzt die Zellinnenseite Kontakt zur Badlösung. Ein weiterer Vorteil dieser Patches neben der Möglichkeit der Einzelkanalableitung besteht darin, dass man zu untersuchende Substanzen mithilfe der Badlösung wahlweise an die Außen- oder die Innenseite der Membran bringen kann.

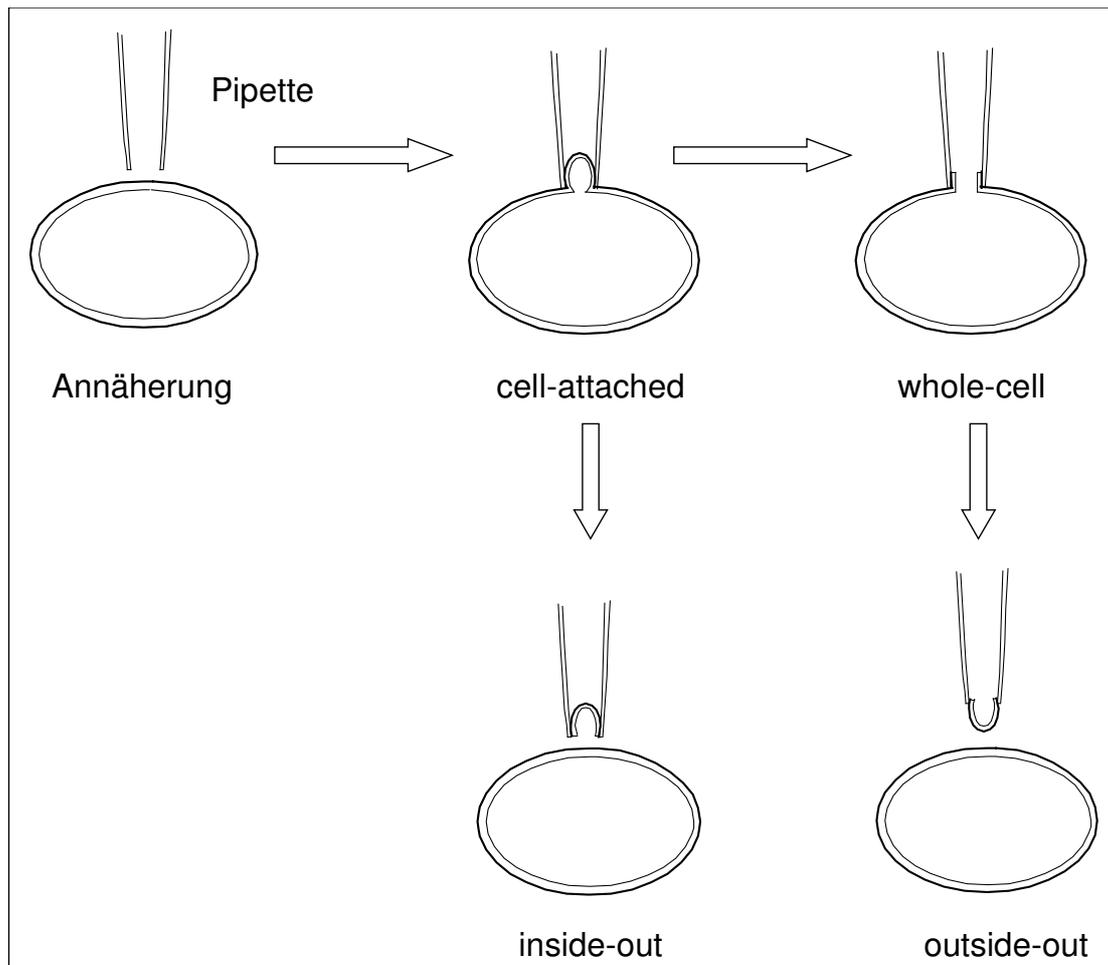


Abb. 4.1: Die Messkonfigurationen der Patch-clamp-Technik.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Materialien und Geräte

Gewebekulturflaschen 25 cm ² , belüftet, Nr. 83.1810.002	Sarstedt
Gewebekulturschälchen, 35 x 10 mm, Nr. 83.1800	Sarstedt
Serologische Pipetten 5 ml, Nr. 86.1253.001	Sarstedt
Serologische Pipetten 10 ml, Nr. 86.1254.001	Sarstedt
Accu-jet [®] Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Gefrierröhrchen 2 ml, Nr. 430 289	Corning, USA
Einfrierbehälter für Zellkulturen, Nr. 5100-0001	Nalge Nunc International, USA
Halter für Gefrierröhrchen, Nr. 5015-0002	Nalge Nunc International, USA
Sicherheitswerkbank Klasse 2 Herasafe, Typ HS 12	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator Function Line, Typ BB 16	Heraeus, Hanau
Inverses Mikroskop CK2	Olympus, Hamburg
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Nr. D-6046	Sigma
Fetales Kälberserum (FBS), Nr. F-2442	Sigma
Trypsin-EDTA-Lösung (1x), Nr. T3924	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Nr. D-8537	Sigma
Genitacin-Lösung, Nr. G7034	Sigma
Kanamycin-Lösung, Nr. K0129	Sigma

Alle weiteren verwendeten Chemikalien besaßen mindestens p.a.-Qualität und wurden von Merck oder Fluka bezogen.

4.2.2 Zelllinien

L-929-Zellen

Für die Patch-clamp-Untersuchungen wurden zwei verschiedene Zellarten verwendet. Zum einen kam die murine Gewebsfibroblastenzelllinie L-929 zum Einsatz, die stabil mit dem Gen für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 der Maus, mKv1.3, transfiziert wurde. Diese stellte freundlicherweise Herr Prof. Dr. S. Grissmer, Abteilung Angewandte Physiologie der Universität Ulm, zur Verfügung. Die L-929-Zellen wurden als Wirtszellen ausgewählt, weil sie scheinbar selbst keine

spannungsabhängigen Kaliumkanäle besitzen [Grissmer et al., 1994], die Messungen an den transfizierten Kv1.3-Kanälen verfälschen könnten.

N1E-115-Zellen

Zum anderen wurde die murine Neuroblastomzelllinie N1E-115 verwendet, die von Herrn Prof. Dr. B. Hamprecht, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen, stammt. Diese Zelllinie ist ein adrenerger Klon des Maus-Neuroblastoms C-1300 [Amano et al., 1972]. Die Zellen verfügen über eine ganze Reihe verschiedener Ionenkanäle. Es existiert ein calciumaktivierbarer, nichtselektiver Kationenkanal, der ähnlich gute Durchlässigkeiten für Natrium, Kalium, Lithium und Cäsium aufweist [Yellen, G., 1982]. Daneben kommen calciumabhängige Kaliumkanäle vor, die sogenannten SKCa- und BKCa-Kanäle [Leinders und Vijverberg, 1992].

Weiterhin wurden spannungsabhängige Ionenkanäle wie der Natriumionenkanal des Typs II gefunden [Hirsh und Quandt, 1996], der nach Goldin als Nav1.2 zu bezeichnen ist [Goldin, 1999]. Daneben konnte ein spannungsabhängiger Calciumstrom nachgewiesen werden [Moolenaar und Spector, 1979]. Narahashi et al. differenzierten diesen Strom in zwei Komponenten (Typ I und Typ II) [Narahashi et al., 1985]. Quandt gelang die Aufnahme der Ströme durch mindestens zwei spannungsabhängige Kaliumkanäle, die nicht von der Calciumkonzentration beeinflusst werden [Quandt, 1988]. Einen dieser beiden Ströme konnten schon Moolenaar und Spector erfassen [Moolenaar und Spector, 1979]. Darüber hinaus wurde die mRNA für Kv3.1 [Quandt, 1996] und für Kv1.4 und Kv2.1 gefunden [Quandt, persönliche Mitteilung, 1998].

Die calciumabhängigen Kanäle benötigen Calcium im Intrazellulärraum zur Aktivierung und sollten bei der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten niedrigen Calciumkonzentration daher keine Rolle spielen. Dasselbe gilt für den Strom durch die spannungsabhängigen Calciumkanäle, der bei geringen Calciumkonzentrationen sehr klein und daher nicht messbar ist [Moolenaar und Spector, 1979]. Von der Vielfalt der möglichen Ströme der Neuroblastomzellen wurden daher nur die rein spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle erfasst. Die N1E-115-Zellen dienten aus diesem Grund der Bestimmung der Selektivitäten für die gewünschte Wirksamkeit am Kv1.3-Kanal gegenüber der unerwünschten Wirksamkeit an anderen spannungsabhängigen Kalium- oder Natriumkanälen.

4.2.3 Kulturbedingungen

Beide Zellarten wachsen adhärent, das heißt, sie haften an dem Boden der Kulturflaschen.

Kultur

Die verwendeten Zellen wurden in DMEM unter Zusatz von 10% Kälberserum („Medium“ meint im folgenden immer Medium mit 10% Serum) in feuchter Atmosphäre bei 36,5°C und 5% CO₂ kultiviert. Zweimal pro Woche erfolgte ein Passagieren der Zellen. Dazu wurde das Medium mit sterilen Einmalpipetten entfernt und die verbleibende Zellschicht auf dem Boden der Kulturflaschen vorsichtig mit ca. 2 bis 3 ml Puffer gewaschen. Anschließend wurde ca. 1 ml Trypsin dazugegeben, um die Zellen vom Boden zu lösen. Nach kurzer Einwirkzeit konnten die Zellen dann mit einigen Millilitern Medium aufgenommen werden. Von dieser Suspension wurde nur ein Teil in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium überführt, um die Zellzahl zu reduzieren. Bei sehr schlechtem Wachstum wurde die gesamte Suspension verwendet. Zum Schutz vor mikrobiellem Befall wurden den Neuroblastomzellen jeweils 25 µg/ml Kanamycin zugesetzt, den L-929-Zellen 300 µg/ml Genitacin. Das Füllvolumen der Kulturflaschen betrug 10 ml.

Zellen für die Patch-clamp-Messungen

Für die Patch-clamp-Experimente wurden einige Tropfen der Zellsuspension in 2 ml Medium in Kulturschälchen ausgesät, bei den L-929-Zellen ebenfalls unter Zusatz des Antibiotikums. Diese Schälchen mussten vor Beginn der Versuche mindestens vier Stunden im Brutschrank lagern, damit sich die Zellen wieder am Boden anheften konnten. Danach waren die Zellen maximal drei Tage lang für Messungen einsetzbar.

Einfrieren

Bei gutem Wachstum und guten Eigenschaften in den Patch-clamp-Experimenten, das heißt bei leichter Sealbildung und guter Stabilität des Seals und des Stromes, wurde ein Teil der Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen in Medium mit 10% DMSO in ein Gefrier Röhrchen überführt und dieses in einen speziellen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter gebracht, der auf Eis vorgekühlt war. Dieses Behältnis wurde für mindestens vier Stunden in einer Kühltruhe bei –80°C gelagert, wobei die Zellsuspension bei einer Kühlrate von 1°C pro Minute abkühlte. Anschließend wurden die Gefrier Röhrchen in geeigneten Haltern in flüssigen Stickstoff überführt. Auf diese Weise war eine langfristige Lagerung der Zellen möglich.

Auftauen

Die aufgetauten Kulturen zeigten nach bestimmter Zeit eine deutliche Verschlechterung der Eigenschaften im Patch-clamp-Experiment, meist nach maximal einem halben Jahr. Dann wurde ein Gefrier Röhrchen aus dem Vorrat vorsichtig aufgetaut und der Inhalt mit Medium in eine Kulturflasche überführt. Nach 24 Stunden musste ein Mediumwechsel erfolgen, um das DMSO aus der Kultur zu entfernen. Einsetzbar für Untersuchungen waren die neu aufgetauten Zellen nach zwei bis sechs Wochen.

4.3 Das Patch-clamp-Experiment

4.3.1 Materialien und Geräte

Passive Schwingungsdämpfer SLM-3A	Newport, USA
Styroporblöcke zur Schwingungsdämpfung	
Granitplatte, Masse ca. 250 kg	
Faraday-Käfig	Pharmazeutisches Institut, Kiel
Inverses Mikroskop CK2	Olympus, Hamburg
Inverses Mikroskop IX50	Olympus, Hamburg
Power Supply Unit TH3	Olympus, Hamburg
Verstärkersystem EPC-9	HEKA Elektronik, Lambrecht
Software Pulse / Pulsefit, Version 8.50	HEKA Elektronik, Lambrecht
Software Graph Pad Prism™	
Peristaltikpumpe Reglo-Digital, ISM834	Ismatec, Wertheim
Pumpenschlauch, Silikon, SC 0114, ID: 1,65 mm	Ismatec, Wertheim
Mikromanipulator ONW-131	Narishige, Japan
Grobmanipulator ONM-1	Narishige, Japan
Pipettenhalter	HEKA Elektronik, Lambrecht
Silberdraht, rein, D: 0,5 mm	Juwelier Schmidt, Kiel
Sterilfilter Filtropur S 0,2, Nr. 83.1826.001	Sarstedt
Pipettenziehgerät PIP 5	HEKA Elektronik, Lambrecht
Poliergerät Microforge CPM-2	HEKA Elektronik, Lambrecht
pH-Meter 605	Metrohm, Schweiz
Halbautomatisches Mikroosmometer	Knauer, Berlin
Borosilikatglas-Kapillaren ohne Filament, Meterware AD: 1,5 mm, ID: 1,35 mm, Nr. 1141150	Hilgenberg, Malsfeld
Agar, Nr. 05040	Fluka

Alle weiteren verwendeten Chemikalien besaßen mindestens p.a.-Qualität und wurden von Merck oder Fluka bezogen.

4.3.2 Aufbau des Messplatzes

Der Kontakt zwischen Zelle und Patchpipette ist äußerst empfindlich gegenüber Erschütterungen. Aus diesem Grunde wurde der Messplatz schwingungsgedämpft

unter Verwendung einer Granitplatte aufgebaut, die über passive, luftgefüllte Schwingungsdämpfer auf Styroporblöcken gelagert war. Darauf stand ein inverses Mikroskop mit einer Aussparung für die Zellkulturschälchen auf dem Mikroskoptisch. Das Herzstück der Anlage waren Haupt- und Vorverstärker, die verantwortlich für die Aufnahme, Filterung und Verstärkung der Stromsignale waren. Am Vorverstärker war zugleich der Pipettenhalter befestigt. Beide zusammen ließen sich über einen mechanischen Grob- und einen hydraulischen Mikromanipulator bewegen. Zusätzlich wies der Pipettenhalter einen Schlauchanschluss auf, über den man mithilfe einer Einmalspritze Über- oder Unterdruck an die Pipette anlegen konnte. Die Verstärker wurden über einen Computer mit geeigneter Software gesteuert. Der Rechner diente zugleich dazu, die Messsignale aufzuzeichnen und auszuwerten. Neben dem Mikroskoptisch befand sich eine pulsationsarme peristaltische Pumpe zum Austausch der Flüssigkeit im Zellschälchen. Da bereits das 50 Hz-Brummen der normalen Netzspannung zu Störsignalen führt, befanden sich Mikroskop und Vorverstärker in einem Faraday-Käfig. Sowohl die Bad- als auch die Messelektrode bestanden aus chloridiertem Silberdraht.

Eine ausführlichere Abhandlung zum Aufbau eines Messplatzes findet sich bei Numberger und Draguhn [Numberger und Draguhn, 1996] sowie in den Arbeiten von Herzog und Möller [Herzog, 2000; Möller, 2000].

4.3.3 Lösungen

Für die Experimente wurde zum einen eine interne Lösung zum Befüllen der Pipetten benötigt und zum anderen eine externe Badlösung für das Zellschälchen. Die letztere wurde auch als Lösungsmittel für die zu testenden Substanzen verwendet. Alle verwendeten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und unmittelbar vor dem Gebrauch steril filtriert, da eventuell enthaltene Partikel die Patchpipette verstopfen können. Aus Gründen der Arbeitserleichterung wurden für die Herstellung der Pufferlösungen zum Teil konzentrierte Stammlösungen (NaCl 5 M, KCl 1 M, CaCl₂ 1 M, MgCl₂ 1 M, HEPES 0,5 M) eingesetzt, die im Kühlschrank mehrere Wochen haltbar waren.

Externe Lösungen

Für die L-929-Zellen wurde extern eine N-Ringer-Lösung verwendet, für die N1E-115-Zellen eine modifizierte Lösung nach Quandt, beide eingestellt mit 2 M-Natronlauge auf pH 7,4. Die Osmolarität sollte jeweils 290 bis 330 mosm/l betragen und wurde stichprobenartig überprüft. Die N-Ringer-Lösung konnte

Elektrophysiologie

problemlos einige Wochen im Kühlschrank gelagert werden, während die glucosehaltige Quandt-Lösung zur Verkeimung neigte und weniger haltbar war. Die Zusammensetzung der externen Lösungen ist in Tabelle 4.1 aufgeführt.

	Lösung nach Quandt (N1E-115)	N-Ringer-Lösung (L-929)
NaCl	125 mM	160 mM
KCl	5,5 mM	4,5 mM
CaCl ₂	1,5 mM	2,0 mM
MgCl ₂	2,0 mM	1,0 mM
Glucose	25,0 mM	-
HEPES	5,0 mM	5,0 mM

Tab. 4.1: Zusammensetzung der externen Lösungen.

Interne Lösungen

Die internen Lösungen besaßen einen pH von 7,2, eingestellt mit 1 M-Kalilauge, und eine Osmolarität um 280 mosm/l. Sie wurden in kleine Eppendorfgefäße abgefüllt, im Gefrierschrank aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut. Die genaue Zusammensetzung der internen Lösungen findet sich in Tabelle 4.2.

	N1E-115	L-929
KF	120 mM	120 mM
KCl	10 mM	20 mM
NaCl	10 mM	-
HEPES	10 mM	10 mM
EGTA	10 mM	10 mM

Tab. 4.2: Zusammensetzung der internen Lösungen.

Messlösungen

Die zu untersuchenden Verbindungen wurden in DMSO gelöst und dann mit der Badlösung auf die gewünschten Konzentrationen so verdünnt, dass immer ein DMSO-Gehalt von 5% vorlag. Daher wurde die externe Lösung zum Spülen der Zellen vor der Verwendung ebenfalls mit 5% DMSO versetzt, um den Zellen mit und ohne Substanz das gleiche Milieu zu bieten.

Aufgrund der recht hohen Lipophilie der Substanzen und den zum Teil notwendigen hohen Konzentrationen wurde bei der Herstellung der Verdünnungen darauf geachtet, dass beim Zugeben des Puffers bereits die maximale Menge

Lösungsvermittler anwesend war, was ein Ausfallen der Substanz verhinderte oder zumindest verzögerte.

4.3.4 Vorbereitungen

Aus einem vorbereiteten Zellschälchen wurde das Medium abgenommen, mit 2 ml externer Lösung gewaschen und dann mit weiteren 2 ml aufgefüllt. An dem Schälchen wurden dann in der vorgesehenen Aussparung des Mikroskoptisches die zuvor mit externer Lösung durchspülten Pumpenschläuche befestigt.

Die beiden Silberdrahtelektroden wurden in regelmäßigen Abständen neu chloridiert, also mit Silberchlorid überzogen, indem je ein Silberdraht als Anode mit einem Platinnetz als Kathode in eine 0,1 N-Salzsäurelösung gebracht und an eine Gleichspannungsquelle angeschlossen wurde. Eine Elektrolysezeit von ca. 30 Sekunden war ausreichend zur Erzeugung eines gut sichtbaren Überzugs aus Silberchlorid.

Agarbrücke

Da das Potential einer Silber-Silberchlorid-Elektrode von der Chloridionenkonzentration abhängig ist, musste diese konstant gehalten werden. Damit das auch während der Perfusion verschiedener Lösungen gelang, wurde für die Badelektrode eine sogenannte Agarbrücke hergestellt. Dazu wurden ca. 3% Agar in Badlösung aufgekocht und die noch heiße Lösung in eine Eppendorfspitze gefüllt. Nach dem Abkühlen wurden beide Enden abgeschnitten und die Spitze mit dem gelierten Agar über den Silberdraht der Badelektrode gestülpt. Die Agarbrücke wurde nur einen Tag verwendet.

Patchpipetten

Die Glaspipetten für die Messelektrode wurden aus Meterware hergestellt, die in Rohlinge geeigneter Länge geschnitten wurde. Aus diesen Rohlingen wurden dann mithilfe des Pipettenziehgerätes in zwei Schritten je zwei Patchpipetten gezogen und anschließend mit der Microforge an einem inversen Mikroskop hitzepolier. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Messungen gegenüber Staubpartikeln wurden die Pipetten abgedeckt gelagert und nur am Tag der Herstellung verwendet.

Für jedes Experiment wurde eine neue Glaspipette verwendet. Sie musste mit interner Lösung gefüllt werden, indem zuerst die Spitze kurz in die Flüssigkeit getaucht wurde. Durch Kapillarkräfte füllte sich so die vorderste Spitze der Pipette (tip-filling). Anschließend wurde vom offenen Ende mit einer geeigneten Spritze weiterer Puffer zugegeben und die Pipette so einige Millimeter hoch gefüllt (back-

Elektrophysiologie

filling). Eventuell vorhandene Luftblasen mussten sorgfältig herausgeklopft werden, bevor die Pipette über die Messelektrode gestülpt wurde.

Sealbildung

Vor dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung musste ein leichter Überdruck angelegt werden, damit die Spitze nicht verstopfte. Durch einen Testimpuls des EPC-9 (10 mV über 2 ms) konnte der Widerstand der Pipette aus dem gemessenen Strom berechnet werden. Dieser betrug zwischen 2 M Ω und 5 M Ω . Das Offset-Potential wurde sofort nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung abgeglichen und noch einmal unmittelbar vor der Berührung zwischen Zelle und Pipette.

Beim Annähern an die Zelle nahm der Widerstand langsam zu. Der Überdruck wurde dabei verringert, um die Zelle nicht zu schädigen. Nach Kontakt mit der Membran wurde sogar ein leichter Unterdruck appliziert, um die Ausbildung eines Gigaseals zu erleichtern. War dieser etabliert, wurde das Haltepotential auf -80 mV gesetzt und durch vorsichtiges Saugen die whole-cell-Konfiguration erreicht.

Notwendiges Vorgehen nach Abschluss eines Experiments

Nach dem Perfundieren substanzhaltiger Lösung musste für das nächste Experiment ein neues Zellschälchen verwendet werden, da sich die meisten Verbindungen durch Spülen mit externer Lösung nicht wieder auswaschen ließen. Zwischen zwei Experimenten wurden die Schläuche mit Methanol gespült, um zu vermeiden, dass Substanzreste, die sich im Schlauchinneren abgelagert hatten, im folgenden Experiment wieder freigesetzt wurden. Damit die Zellen keinen Kontakt zum Methanol bekamen, wurden die Schläuche anschließend noch mit bidestilliertem Wasser gespült.

4.3.5 Messbedingungen und Pulsprotokolle

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden in der whole-cell-Konfiguration durchgeführt. Die Kapazitäten der Pipette und der Zelle, die bei Spannungsänderung zu unerwünschten kapazitiven Ladeströmen führen, wurden automatisch kompensiert. Der Serienwiderstand, der dem Widerstand zwischen dem Pipetten- und dem Zellinneren entspricht, ist für die Patch-clamp-Messungen von zentraler Bedeutung. Er sollte nicht größer sein als ca. 25 M Ω und sich während eines Experimentes nicht verändern (± 3 M Ω). Er wurde bei den L-929-Zellen zu 80% kompensiert, bei den N1E-115-Zellen aufgrund ihrer Größe nur zu 50%, jeweils mit einer Zeitkonstante von 100 μ s. Zur Kompensation des Leckstromes wurde ein p/10-Protokoll gefahren. Vor jedem Messpuls wurden dafür 10 Leckpulse alternierender

Polarität gesetzt, deren Amplitude lediglich 10% der Amplitude des Messpulses entsprach, und die resultierenden Ströme gemessen. Der Leckstrom wurde als Summe der Beträge der Ströme errechnet und von dem resultierenden Strom der folgenden Hauptmessung abgezogen. Da der Leckstrom dem Ohmschen Gesetz gehorcht, steigt er mit größer werdender Spannung linear an. Die Addition von 10 Messwerten bei 10% der Pulsamplitude ergibt daher den Leckstrom während des Messpulses, ohne jedoch wie dieser die spannungsabhängigen Kanäle zu aktivieren. Die Signale wurden mit einem Bandpass gefiltert, bestehend aus einem Bessel-4-Pol-Filter von 2,8 kHz und einem Bessel-3-Pol-Filter von 10 kHz.

Messpulse

Die Stimulation der spannungsabhängigen Ionenkanäle erfolgte ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV. Dies entspricht in etwa dem Ruhemembranpotential der Zellen.

Die Kv1.3-Kanäle der L-929-Zellen wurden mit einem Impuls über 200 ms auf $+40$ mV stimuliert. Zwischen zwei Pulsen wurde eine Wartezeit von 30 Sekunden eingehalten.

Bei den Neuroblastomzellen wurde zur Stimulation eine Pulsfolge eingesetzt: Zuerst für 100 ms auf 0 mV zur Aktivierung der Natriumkanäle und sofort danach für 100 ms auf $+40$ mV zur Aktivierung der Kaliumkanäle. Dazwischen erfolgte kurz eine Rückkehr auf das Haltepotential von -80 mV. Vor dem nächsten Doppelpuls wurde eine Wartezeit von einer Minute eingehalten.

Ablauf eines Experimentes

Vor der Aufnahme der eigentlichen Messung wurde solange wiederholt mit je 16 ml externer Lösung gespült (entspricht einem achtfachen Austausch der Badlösung), bis die Zelle stabil erschien und sich Strom, Seal- und Serienwiderstand nicht mehr veränderten. Dann wurde der Kontrollwert aufgenommen. Anschließend wurden je 16 ml der verschiedenen Konzentrationen in aufsteigender Reihenfolge nacheinander perfundiert und vermessen, ohne zwischenzeitliches Auswaschen der Substanzen, denn viele der untersuchten Verbindungen ließen sich auch mit großen Volumina externer Lösung nicht wieder ausspülen.

4.3.6 Auswertung

Aus den aufgenommenen Stromkurven wurden verschiedene Parameter berechnet. Der Natriumstrom (Na), der nur bei den N1E-115-Zellen vorhanden war, wurde als das Maximum des Einwärtsstromes zwischen 0,3 ms und 5 ms des Impulses

Elektrophysiologie

ermittelt, der Kaliumpeakstrom (K_{peak}) an den N1E-115-Zellen als Maximum des Auswärtsstromes zwischen 3 ms und 20 ms, an den L-929-Zellen zwischen 0,6 ms und 40 ms. Der Kaliumendstrom (K_{end}) wurde als Mittelwert des Auswärtsstromes zwischen 95 ms und 99,5 ms bei den Neuroblastomzellen und zwischen 190 ms und 199 ms bei den Fibroblasten bestimmt. Die Abbildungen 4.2 und 4.3 veranschaulichen dies. Abbildung 4.2 zeigt den typischen Kv1.3-Strom mit der charakteristischen Abnahme des Stromes während des Messimpulses aufgrund der langsamen Inaktivierung.

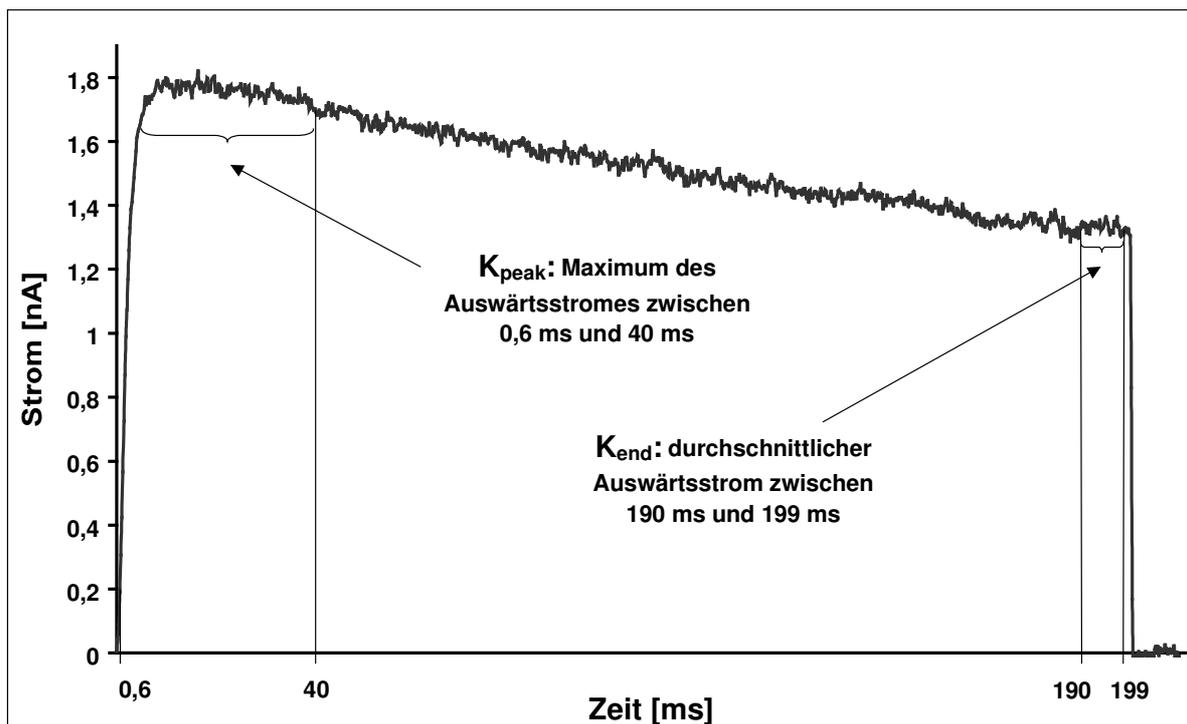


Abb. 4.2: Veranschaulichung der Stromermittlung am Kv1.3-Kanal anhand eines typischen Stromverlaufs; Impulslänge 200 ms.

Abbildung 4.3 zeigt das charakteristische Bild bei Messungen an den N1E-115-Zellen mit dem schnell einsetzenden und ebenso schnell inaktivierenden Natriumeinstrom und dem etwas langsameren kaum inaktivierenden Kaliumausstrom.

Im Folgenden werden die Ströme abgekürzt mit Na, K_{peak} und K_{end} .

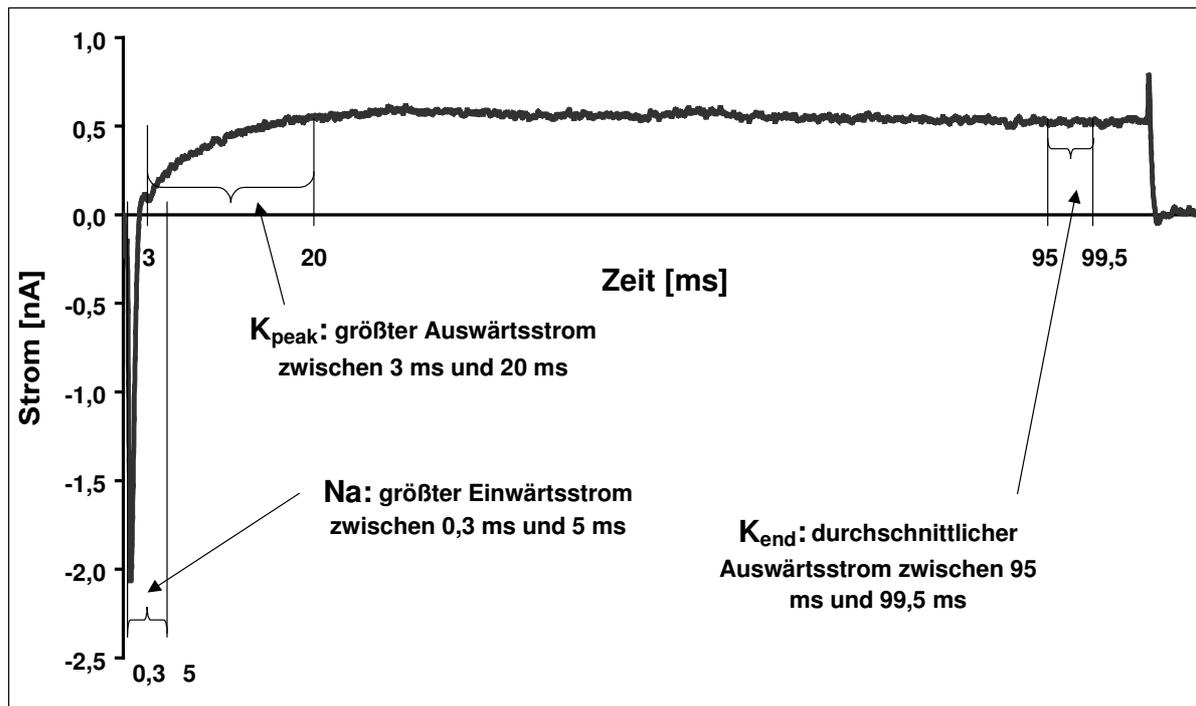


Abb. 4.3: Veranschaulichung der Stromermittlung an den N1E-115-Zellen anhand eines typischen Stromverlaufs; Impulslänge 100 ms.

Bestimmung des Gleichgewichtsstromes

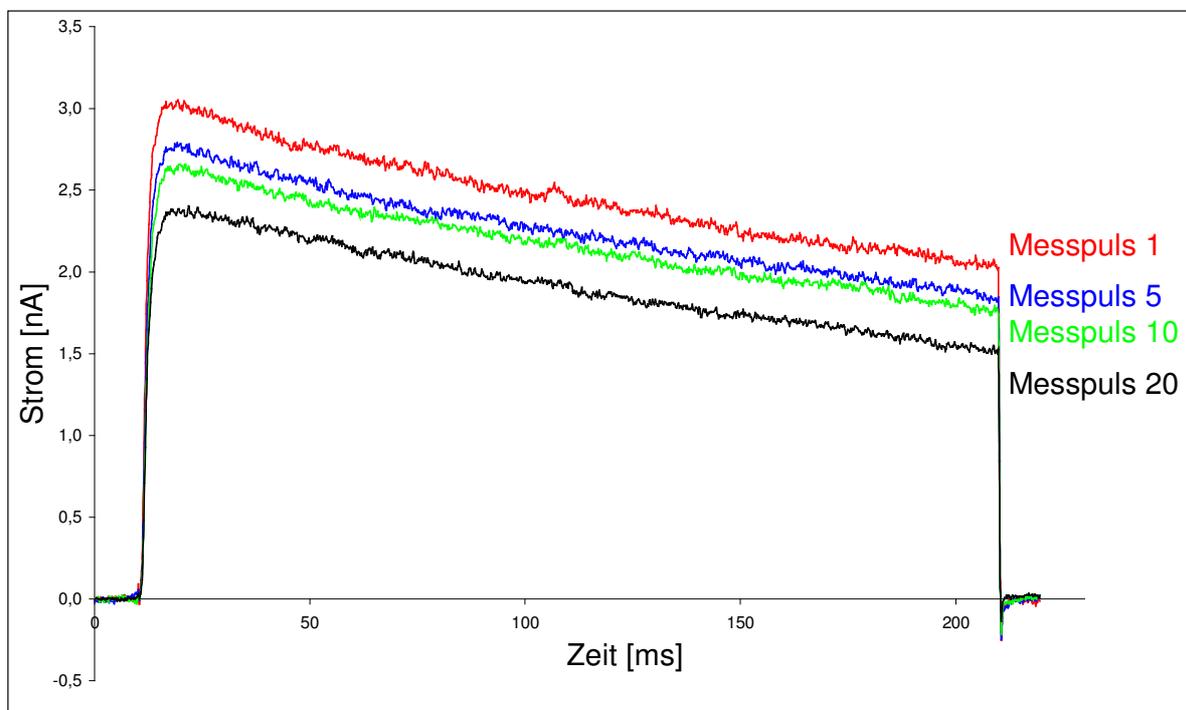


Abb. 4.4: Verhalten des Kv1.3-Kanals während 20 Messpulsen ohne Substanzeinwirkung (use-dependence).

Elektrophysiologie

Es sollte jeweils die Größe des Stromes erfasst werden, nachdem die Substanzen ihre volle Wirkung entfaltet hatten, also nach der Gleichgewichtseinstellung, im sogenannten steady state. Dies war daran zu erkennen, dass sich der Strom bei weiteren Messimpulsen kaum noch veränderte. Bei den L-929-Zellen wurde das bei Aufnahme von 20 Strom-Zeit-Kurven pro Konzentration erreicht, bei den N1E-115-Zellen genügte neun. Dieser Unterschied liegt in der kumulativen Inaktivierung begründet, die der Kv1.3-Kanal zeigt: Der Strom nimmt bei repetitiven Impulsen immer weiter ab (Abb. 4.4). Dieser Effekt hängt zusammen mit der selbst nach 30 Sekunden Wartezeit zwischen zwei Messimpulsen nicht vollständig abgeschlossenen Erholung der Ionenkanäle aus dem inaktivierten Zustand und wird use-dependence genannt.

Berechnung der prozentualen Blockade

Es wurden jeweils die letzten fünf Messwerte gemittelt. Der Strom des Kontrollwertes wurde als 100% gesetzt und die prozentuale Minderung des Stromes durch die verschiedenen Konzentrationen darauf bezogen berechnet:

$$E = \frac{I_{\text{Kontrolle}} - I_{\text{Konzentration}}}{I_{\text{Kontrolle}}}$$

E ist hierbei der bewirkte Effekt, in diesem Fall die erreichte prozentuale Blockade, $I_{\text{Kontrolle}}$ stellt den ermittelten Strom des Kontrollwertes dar und $I_{\text{Konzentration}}$ den Strom bei einer bestimmten Substanzkonzentration.

Erzeugung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Die so erhaltenen Werte können mithilfe des Programms Graph Pad Prism™ in eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve umgesetzt werden, aus welcher der EC₅₀-Wert, die Konzentration der Substanz, die eine halbmaximale Blockade bewirkt, bestimmt wird. Der EC₅₀-Wert dient dann dem Vergleich von Wirksamkeiten und der Bestimmung von Selektivitäten. Der EC₅₀-Wert wurde jeweils aus mindestens drei Experimenten mit mindestens drei Konzentrationen ermittelt. Meist wurden deutlich mehr Werte verwendet. Sowohl die Anzahl der eingesetzten Datenpunkte als auch die Anzahl der durchgeführten Experimente sind in den Ergebnistabellen aufgezeigt. Für die Wirkung einer bestimmten Substanz auf einen bestimmten Ionenstrom einer bestimmten Zelllinie wurde jeweils nur ein einziger EC₅₀-Wert ermittelt, in dessen Berechnung alle prozentualen Blockaden aus den verschiedenen Experimenten eingingen.

Graph Pad Prism™ führt mit den experimentellen Daten eine nichtlineare Regression durch und erzeugt eine sigmoidale Kurve mit variabler Steigung gemäß der folgenden Formel:

$$E = E_{\min} + \frac{E_{\max} - E_{\min}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^{\text{Hillkoeffizient}}}$$

Dabei stellt E den Effekt dar, also die prozentuale Blockade, und c die Konzentration in mol/l. Der Hillkoeffizient ist ein Maß für die Steilheit der Kurve und wird wie der EC₅₀-Wert während der Kurvenanpassung von der Software ermittelt. Als Konstanten wurden dabei ein minimaler Effekt E_{min} von 0% und ein maximaler Effekt E_{max} von 100% vorgegeben.

Die Selektivitäten wurden berechnet als Quotienten der EC₅₀-Werte jeweils zweier zu vergleichender Ströme.

4.4 Ergebnisse und Diskussion der Patch-clamp-Untersuchungen

4.4.1 Allgemeines

Sowohl bei den Experimenten mit den Curcuminoiden als auch mit den Psoralen-Derivaten traten immer wieder Schwierigkeiten auf, die eine routinemäßige Auswertung der Messergebnisse verhinderten. Daher wurden einige Einzelwerte bei der Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven nicht berücksichtigt oder gleich null gesetzt. Im Anhang finden sind alle Rohdaten sowie eine genaue Erklärung des Vorgehens beim Überarbeiten der Daten. Die nicht für die Kurvenanpassung verwendeten oder umgewandelten Werte sind entsprechend kenntlich gemacht.

4.4.2 Curcuminoide

Patch-clamp-Messungen an L-929- und N1E-115-Zellen

Von allen untersuchten Curcumin-Derivaten wurden komplette Konzentrations-Wirkungs-Kurven sowohl an den Fibroblasten als auch an den Neuroblastomzellen aufgenommen. Dazu wurden, wie schon beschrieben, verschiedene Konzentrationen nacheinander auf die Zellen gespült. Exemplarisch sind in Abbildung 4.5 die resultierenden Stromkurven eines Experiments der Verbindung **2** am Kv1.3-Kanal dargestellt. Man erkennt gut den mit steigender Substanzkonzentration abnehmenden Strom. Eine Übersicht der ermittelten EC_{50} -Werte für alle Substanzen gibt Tabelle 4.3.

Problematik

Die Schwierigkeiten sind auf das nicht ideale Verhalten der Curcuminoide während der Patch-clamp-Experimente zurückzuführen. Dieses Verhalten findet seine Ursache zum einen in den chemischen Eigenschaften der Substanzen, zum anderen in zusätzlichen physiologischen Effekten der Curcumin-Derivate auf das komplexe Untersuchungsobjekt Zelle. Die Chemie der Curcuminoide bedingt die zum Teil geringe Stabilität und Löslichkeit der Verbindungen unter den herrschenden Bedingungen, die physiologischen Wirkungen beeinflussen den Abdichtwiderstand zwischen Zelle und Pipette sowie weitere Parameter während der Stromerfassung.

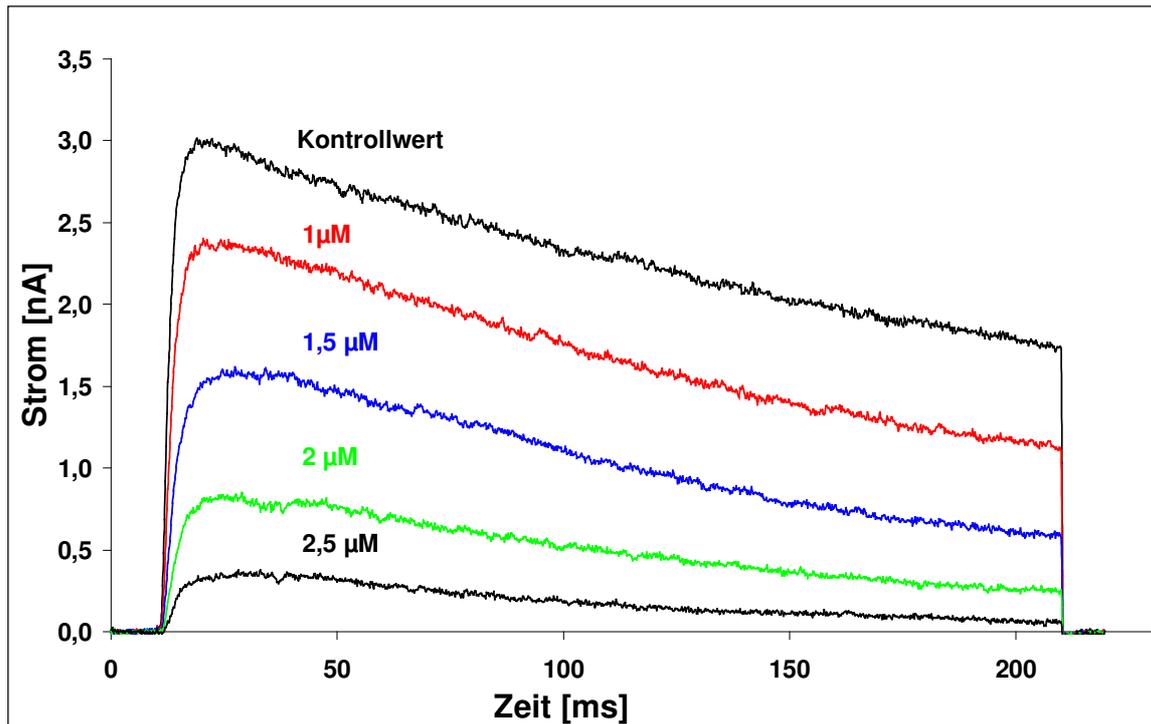


Abb. 4.5: Resultierende Ströme im steady state (Gleichgewichtszustand) an L-929-Zellen nach Perfusion verschiedener Konzentrationen der Verbindung 2.

Stabilität wässriger Curcuminoid-Lösungen

Es ist bekannt, dass sich Curcumin und viele seiner Derivate besonders in wässriger alkalischer Lösung schnell zersetzen [Tønnesen und Karlsen, 1985 a und b; Kruse, 2003]. Eine Ausnahme stellen die Verbindungen **4** und **7** dar [Kruse, 2003]. Eine Überprüfung zeigte, dass diese Zersetzung, wenn auch langsamer, auch in reinem DMSO stattfindet. Daher wurde jeden Tag eine neue Stammlösung der zu untersuchenden Verbindung hergestellt. Die Verdünnung mit Pufferlösung erfolgte immer erst unmittelbar vor der Perfusion.

Löslichkeit der Curcuminoide

Die hohe Lipophilie der Curcuminoide machte es nötig, mit 5% DMSO einen sehr hohen Anteil an Lösungsvermittler zu verwenden. Aber auch damit ließen sich bei einigen Verbindungen höhere Konzentrationen nicht oder nur kurze Zeit stabilisieren, ohne dass es zu einem mikro- oder sogar makroskopisch sichtbaren Ausfällen der Substanzen kam. Dieser Niederschlag trat für eine bestimmte Verbindung nicht immer bei der gleichen Konzentration auf. Dies könnte zum einen durch die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit bedingt sein, denn die verwendeten Lösungen wurden nicht temperiert. Zum anderen ist es denkbar, dass das DMSO in der Lage war, eine übersättigte Lösung eine unvorhersagbare Zeit lang in einem metastabilen Zustand zu halten. Die schlechte Löslichkeit führte bei den lipophilen

Elektrophysiologie

Verbindungen **3**, **4**, **5** und **6** trotz des Lösungsvermittlers zumindest bei höheren Konzentrationen zum Teil zu Trübungen und Niederschlägen während der Messungen. Die so ermittelten EC₅₀-Werte sind daher teilweise vorsichtig zu behandeln und wurden bei der Bewertung der Wirksamkeit nicht berücksichtigt. Sie sind in Tabelle 4.3 durch ein hochgestelltes „a“ markiert.

Verbindung	L-929		N1E-115		
	K _{peak}	K _{end}	Na	K _{peak}	K _{end}
Curcumin	8 (26/5)	5 (27/5)	19 (17/4)	10 (17/4)	9 (16/4)
1	7 (22/5)	5 (23/5)	20 (27/6)	12 (22/6)	9 (21/6)
2	1 (23/6)	1 (22/6)	4 (20/4)	3 (19/4)	2 (19/4)
3	34^a (21/5)	4 (21/5)	46^a (31/7)	18^a (21/7)	6 (19/7)
4	101^{a, b} (19/4)	57^{a, b} (19/4)	89^{a, b} (22/7)	76^{a, b} (23/7)	48^{a, b} (21/7)
5	8 (22/6)	7 (22/6)	67^{a, b} (16/7)	35 (27/7)	31 (27/7)
6	28 (19/5)	21 (19/5)	61^{a, b} (15/5)	15 (16/5)	13 (16/5)
7	2 (17/5)	2 (17/5)	18^{b, c} (6/5)	212^{b, c} (5/5)	45^{b, c} (6/5)
8	17 (26/5)	11 (26/5)	79^b (17/5)	20 (17/5)	14 (16/5)
9	106^b (20/4)	75^b (20/4)	120^b (24/5)	98 (23/5)	66 (24/5)
10	83^b (20/5)	69^b (24/5)	218^b (23/5)	90^b (22/5)	102^b (26/5)

Tab. 4.3: EC₅₀-Werte der untersuchten Curcuminoide in µM. Darunter sind jeweils die Anzahl n der Datenpunkte, die zur Berechnung der EC₅₀-Werte verwendet wurden, und die Anzahl m der Experimente, aus denen diese Datenpunkte resultierten, in Klammern angegeben (n/m). ^a: Löslichkeitsprobleme; ^b: extrapolierte Werte, berechneter EC₅₀-Wert ist größer als höchste getestete Konzentration; ^c: Sealzerstörung; Erklärung im Text.

Extrapolationen

Von den Curcuminoide **1** bis **8** und **Curcumin** wurde aufgrund der Löslichkeitsprobleme in keinem Fall eine höhere Konzentration als 50 µM eingesetzt. Bei den

Verbindungen **9** und **10** mit Curcumin-Partialstruktur wurden zumindest an den N1E-115-Zellen noch 100 μ M getestet. Einen Überblick über die eingesetzten Konzentrationen der verschiedenen Verbindungen und die damit erzielten Blockaden gibt der Anhang.

Je nach Wirksamkeit war es daher oft nicht möglich, den gesamten Wirkungsbereich von 0% bis 100% Blockade mit Messwerten abzudecken, manchmal zeigte selbst die höchste Konzentration, die sich noch in Lösung hielt, nicht einmal eine Stromverminderung um 50%. Dies war der Fall bei den schlechter wirksamen partiellen Curcuminoiden **9** und **10**, aber auch bei Verbindung **4**. Weiter trat dieses Problem mit den Substanzen **5**, **6** und **8** bei der Bestimmung der Blockade des Natriumstromes auf. Konzentrations-Wirkungs-Kurven konnten dann nur durch Extrapolation weit über den letzten experimentell ermittelten Wert hinaus erstellt werden, wie es in Abbildung 4.6 exemplarisch dargestellt ist. Dies ist eine Vorgehensweise, die zu großen Fehlern führen kann. Es wurde versucht, diese Fehler durch eine größere Anzahl von Messungen im unteren Wirkungsbereich zu minimieren. Daher wurden auch bei diesen Verbindungen EC_{50} -Werte bestimmt, um sie mit denen der anderen Substanzen vergleichen zu können. Diese Werte sind allerdings von größerer statistischer Unsicherheit, was sich in größeren Vertrauensbereichen für die EC_{50} -Werte äußert (nicht angegeben). Die extrapolierten EC_{50} -Werte sind in Tabelle 4.3 mit einem hochgestellten „b“ gekennzeichnet.

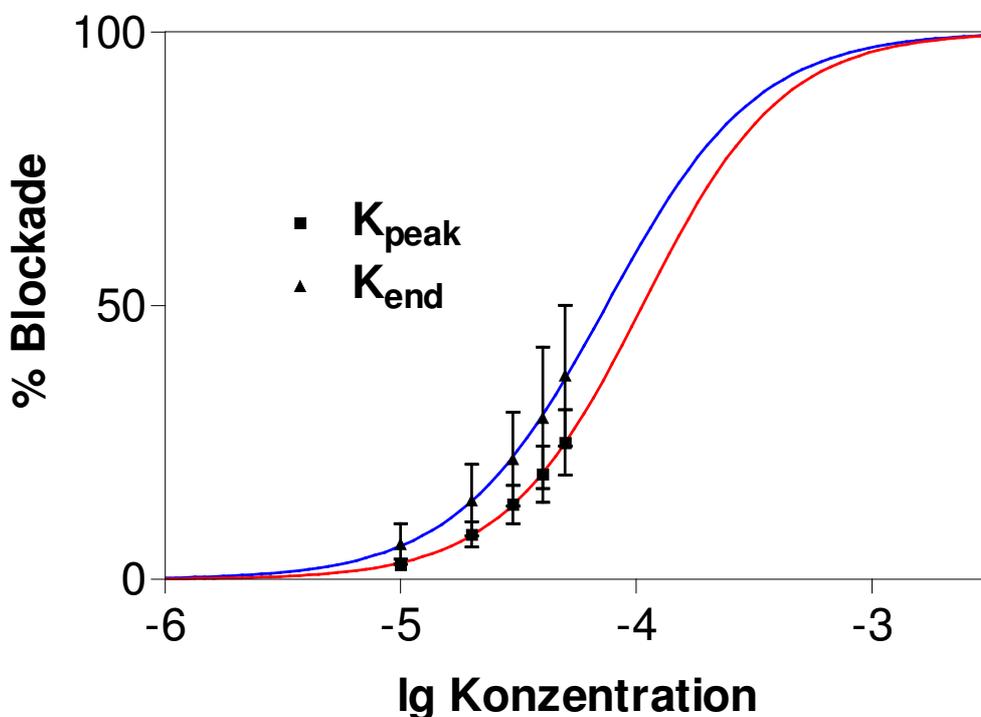


Abb. 4.6: Extrapolation von Konzentrations-Wirkungs-Kurven am Beispiel der Verbindung **9** an L-929-Zellen. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar (standard error of the mean).

Elektrophysiologie

Sealzerstörung

Im Laufe der Experimente stellte sich zusätzlich heraus, dass eine Vielzahl der Curcuminoide den engen Zusammenhalt zwischen Zellmembran und Glaspipette, der einen Seal ausmacht, aufzulockern vermögen. Dies äußerte sich durch Sinken des Sealwiderstandes bis hin zum totalen Zusammenbruch desselben. Dieses Phänomen trat nicht immer erst bei höheren Konzentrationen auf, bei denen man eventuell eine Schädigung der Membran durch auskristallisierende Substanzpartikel für diesen Vorgang verantwortlich machen könnte. Dieser Effekt war bei fast allen Curcuminoiden in unterschiedlicher Ausprägung zu beobachten, bei der hydrierten Substanz **8** allerdings erst im hohen Konzentrationsbereich. Die Verbindung **4** stellte hier ebenso eine Ausnahme dar wie die Substanzen **9** und **10** mit partieller Curcuminoidstruktur. Alle drei Verbindungen beeinflussten den Abdichtwiderstand kaum.

Besonders beeinträchtigt wurden die Messungen an den N1E-115-Zellen, bei denen auch meist höhere Konzentrationen eingesetzt wurden. Extrem auffällig war hier die Verbindung **7**, bei welcher der Seal bei 10 μM immer zusammenbrach. Aus diesem Grunde war die Substanz an den N1E-115-Zellen kaum zu untersuchen. Die hier ermittelten EC_{50} -Werte sind in Tabelle 4.3 mit einem hochgestellten „c“ markiert, um das wiederholte abrupte Zusammenbrechen des Sealwiderstandes zu kennzeichnen. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass dieses Zusammenbrechen des Abdichtwiderstandes auch bei anderen Verbindungen auftrat, allerdings nicht in dieser Häufigkeit und deutlich langsamer.

Sinkende Blockaden

Manchmal ergab sich beim Vermessen einer Lösung ein größerer Strom als zuvor bei der geringer konzentrierten, also eine mit höherer Konzentration wieder abnehmende Blockade. Hin und wieder entstanden dabei sogar negative Werte, der Strom wurde nach Substanzperfusion größer als beim Kontrollwert. Dies wurde bei den niedrigsten Konzentrationen als 0% Blockade aufgefasst und der normalen Messungenauigkeit zugeschrieben. Diese Werte sind im Anhang durch runde Klammern kenntlich gemacht. Trat dieser Effekt erst bei höheren Konzentrationen ein, nachdem bereits eine positive Blockade vorheriger Lösungen gemessen wurde, dann stellte sich die Frage nach der Ursache. Auch hier könnte man das Ausfallen von Substanzen anführen, wodurch eine bestimmte maximale Konzentration in der Badlösung nicht überschritten werden konnte. Aber dieser Effekt trat auch bei Substanzen auf, die im untersuchten Konzentrationsbereich keine Löslichkeitsprobleme zeigten. Der Grund ist in diesen Fällen vermutlich vielmehr der schon beschriebene sinkende Sealwiderstand. Eine sich verringernde Abdichtung zwischen Pipette und Zelle führt zu größeren Leckströmen. Werden diese zu hoch,

dann können sie nicht mehr adäquat kompensiert werden. Dies bewirkt besonders bei kleinen zu messenden Strömen Fehler, die so gravierend sein können, dass der Strom nicht nur größer wird als bei der vorangegangenen kleineren Konzentration, sondern sogar größer als der Kontrollstrom. Auch dieses Problem trat aufgrund der höheren eingesetzten Konzentrationen hauptsächlich an den Neuroblastomzellen auf. Am häufigsten war dieser Effekt bei den Verbindungen **1**, **3** und **5** zu beobachten.

Die sinkenden Blockadewerte bei steigenden Konzentrationen wurden ebenfalls bei der Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven nicht berücksichtigt. Das genaue Vorgehen dabei ist im Anhang erläutert.

All diese beschriebenen Vorgänge machten die Untersuchung der Curcuminoide mithilfe der Patch-clamp-Technik zu einem schwierigen Unterfangen und führten dazu, dass bei einigen Substanzen die EC_{50} -Werte nur unter Vorbehalt ermittelt werden konnten (siehe Tab. 4.3).

Bewertung der Kv1.3-Kanalblockade

Bei der Bewertung der Wirksamkeit auf den Kaliumpeakstrom des Kv1.3-Kanals wurden die Verbindungen **3** und **4** nicht berücksichtigt, da sie sich im notwendigen Konzentrationsbereich nicht in Lösung hielten. Es ist festzustellen, dass die Curcuminoide mit phenolischen OH-Gruppen (**2**, **7**, **1**, **Curcumin** und **8**) die beste Wirkung aufweisen. Die hydrierte Verbindung **8** zeigt dabei eine schwächere Wirkung als die vollständig ungesättigten und auch eine schwächere Wirkung als Substanz **5** mit Methoxy-Substitution am Ring. Die partiellen Curcuminoide **9** und **10** weisen eine deutlich schlechtere Blockadewirkung am Kv1.3-Kanal auf als die übrigen Substanzen. Die dimethylamino-substituierte Verbindung **6** scheint besser an den spannungsabhängigen Kaliumkanälen der Neuroblastomzellen zu wirken als am Kv1.3-Kanal.

Bestimmung und Bewertung der Selektivitäten

Die Messungen an den N1E-115-Zellen dienen in erster Linie der Bestimmung der Selektivitäten für den Kv1.3-Kanal gegenüber anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen und einem spannungsabhängigen Natriumkanal. Diese lassen sich einfach berechnen als Quotient aus den jeweiligen EC_{50} -Werten an den verschiedenen Kanälen und dem EC_{50} -Wert an Kv1.3 (siehe Tab. 4.4). Aus den Daten der Patch-clamp-Experimente lassen sich auch noch einige weitere Selektivitäten berechnen, die alle in Tabelle 4.4 gezeigt sind.

Elektrophysiologie

Man kann beobachten, dass der Kaliumendstrom sowohl an den N1E-115- wie auch an den L-929-Zellen stärker geblockt wird als der Kaliumpeakstrom oder doch zumindest etwa gleich gut. Dies ist sowohl an den EC_{50} -Werten in Tabelle 4.3 abzulesen als auch an den Selektivitäten in den ersten beiden Spalten der Tabelle 4.4.

Verbindung	$K_{peak}(L-929) / K_{end}(L-929)$	$K_{peak}(N1E) / K_{end}(N1E)$	$K_{peak}(N1E) / K_{peak}(L-929)$	$K_{end}(N1E) / K_{end}(L-929)$	$Na(N1E) / K_{peak}(L-929)$	$Na(N1E) / K_{peak}(N1E)$
Curcumin	2	1	1	2	2	2
1	1	1	2	2	3	2
2	1	2	3	2	4	1
3	9 ^b	3 ^b	1 ^b	2	1 ^b	3 ^b
4	2 ^{a, b}	2 ^{a, b}	1 ^{a, b}	1 ^{a, b}	1 ^{a, b}	1 ^{a, b}
5	1	1	4	4	8 ^{a, b}	2 ^{a, b}
6	1	1	1	1	2 ^{a, b}	4 ^{a, b}
7	1	5 ^{a, c}	106 ^{a, c}	23 ^{a, c}	9 ^{a, c}	0 ^{a, c}
8	2	1	1	1	5	4
9	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
10	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	3 ^a	2 ^a

Tab. 4.4: Errechnete Selektivitäten der Curcuminoide; K_{peak} : EC_{50} -Wert für den Kaliumpeakstrom in μM ; K_{end} : EC_{50} -Wert für den Kaliumendstrom in μM ; Na: EC_{50} -Wert für den Natriumstrom in μM ; ^a: Löslichkeitsprobleme; ^b: extrapolierte Werte, berechneter EC_{50} -Wert ist größer als höchste getestete Konzentration; ^c: Sealzerstörung (siehe Tab. 4.3).

Die Präferenz für den Kv1.3-Kanal gegenüber anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen liegt sowohl für den Peak- wie auch für den Endstrom bei Faktor 1 bis 4 (Spalte drei und vier) und ist damit nur sehr schwach ausgeprägt. Den guten Werten der Verbindung **7** darf man keinen Glauben schenken, da sie sich an den N1E-115 Zellen nur bis maximal 10 μM vermessen ließ, und so stark extrapolierte Werte ergab, die mit großen Fehlern behaftet sein dürften. Vergleicht man bei den Verbindungen mit einer Selektivität von 1 gegenüber den spannungsabhängigen Kaliumkanälen der Neuroblastomzellen jeweils die beiden EC_{50} -Werte, so stellt man fest, dass die Substanzen **6** und **9** an den N1E-115-Zellen sogar noch besser wirksam sind als am Kv1.3-Kanal. Bei der Verbindung **9** sind die prozentualen Unterschiede der EC_{50} -Werte an den verschiedenen Kaliumkanälen zu vernachlässigen. Bei Verbindung **6** jedoch sind diese Unterschiede wesentlich deutlicher. Ein Grund dafür könnte in der Ringsubstitution liegen, denn die Substanz **6** ist die einzige Verbindung, die einen Stickstoff enthält. Damit unterscheidet sich

diese Substanz zweifelsohne in ihrer Basizität von den übrigen Substanzen, was unter Umständen das abweichende Verhalten dieser Verbindung erklären könnte. Aus den schon beschriebenen Gründen wird auch hier auf die Ergebnisse für die Curcuminoide **3** und **4** nicht näher eingegangen.

Die Selektivität gegenüber spannungsabhängigen Natriumkanälen in Spalte fünf erreicht Werte zwischen 1 und 5, eventuell 8, wenn man Verbindung **5** trotz der Löslichkeitsprobleme berücksichtigt, und ist damit nicht besonders stark ausgeprägt. Auch eine eindeutige Bevorzugung der Blockade der Kalium- anstelle der Natriumkanäle an der Neuroblastomzelllinie lässt sich nicht feststellen. Die Selektivitäten betragen 1 bis 4 (Spalte sechs).

Für die Blockade des spannungsabhängigen Natriumkanals der Neuroblastomzellen weisen alle Substanzen einen größeren EC_{50} -Wert auf als für die Blockade der anderen untersuchten Ionenströme, mit Ausnahme der Verbindungen **4** und **7**, bei denen aber die schon aufgeführten Effekte verantwortlich sein dürften.

Die untersuchten Verbindungen zeigen allesamt keine besonders hohe Selektivität. Aus diesem Grunde wurde darauf verzichtet, weitere Selektivitätsuntersuchungen an anderen Kanälen vorzunehmen. Als Vergleich, welche Selektivitäten bei Verwendung der beiden genannten Zelllinien erreicht werden können, sei Vennekamp zitiert. Sie fand für die von ihr untersuchten Psoralenderivate Werte zwischen 8 und 483 für die Selektivität gegenüber den spannungsabhängigen Natriumkanälen, und Werte zwischen 6 und 310 für die Kaliumkanäle der N1E-115-Zellen [Vennekamp, 2002].

Membranverändernde Wirkungen

Der beschriebene Effekt, dass die Curcuminoide den Sealwiderstand zu verringern bzw. sogar zu zerstören vermögen, könnte in einer membranverändernden Wirkung der Curcumin-Derivate begründet liegen. Diese könnte dazu führen, dass die Zellmembran nicht mehr so fest an der Glaspipette haftet. Diese Membranwirkung könnte darüber hinaus auch Ursache für die kanalblockierenden Eigenschaften dieser Verbindungen sein.

In der Literatur wurde bereits berichtet, dass Curcumin ähnliche Veränderungen der Zellmembran herbeiführen kann wie die Apoptose [Jaruga et al., 1998a]. Mit Untersuchungen an Erythrozyten, die aufgrund des fehlenden Zellkernes keiner Apoptose unterliegen, wurde aber gezeigt, dass diese Vorgänge apoptose-unabhängig ablaufen [Jaruga et al., 1998b]. Daher wurden die Curcumin-Derivate später in dieser Arbeit auf membranverändernde Wirkungen untersucht.

Elektrophysiologie

Lipophilie

Die Blockade von Ionenkanälen kann durch unspezifische Membraneffekte aufgrund einer gewissen Lipophilie hervorgerufen werden. Die Tabelle 4.5 zeigt die log P-Werte der Verbindungen **1** bis **7** bei pH 7,4 [Kruse, 2003]. Die Substanzen mit phenolischen OH-Gruppen (**1**, **2** und **8**) weisen deutlich geringere log P-Werte auf (2,66 bis 2,85) als die übrigen Verbindungen (log P > 4). Das **Curcumin** wird eine ähnliche Lipophilie besitzen wie die Substanzen **1** und **2**, da beide in dem Naturstoffgemisch enthalten sind. Von den Verbindungen **8** bis **10** liegen keine Daten vor.

Verbindung	log P
1	2,78 ± 0,10
2	2,66 ± 0,10
3	4,91 ± 0,09
4	4,53 ± 0,09
5	4,79 ± 0,09
6	5,36 ± 0,09
7	2,85 ± 0,10

Tab. 4.5: log P-Werte der Verbindungen 1 bis 7 bei pH 7,4 (aus [Kruse, 2003]).

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ermessen, dass die kanalblockierende Wirkung der Curcuminoide trotz eventuell vorhandener membranbeeinflussender Wirkungen nicht allein auf diese zurückzuführen ist. Denn in diesem Fall sollten die lipophilsten Verbindungen den größten Effekt an den Ionenkanälen zeigen. Doch die Curcumin-Derivate, die sich in den Patch-clamp-Untersuchungen als am wirksamsten erwiesen haben, sind gerade die Substanzen, die über phenolische OH-Gruppen und damit eine vergleichsweise geringe Lipophilie verfügen.

Immunologische Wirkungen von Curcumin

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde entdeckt, dass Curcumin (Verbindung **1**) scheinbar die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB in einigen Zellarten verhindern kann. Kang et al. zeigten dies für murine Makrophagen [Kang et al., 1999]. Eine andere Arbeitsgruppe wies kürzlich die Existenz von Kv1.3 als vermutlich einzigem spannungsabhängigen Kaliumkanal in humanen Alveolar-Makrophagen nach und fand heraus, dass dieser verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials ist [Mackenzie et al., 2003]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die virenvermittelte Aktivierung peritonealer Makrophagen von

Mäusen, die unter Beteiligung von NF κ B verläuft, von der intrazellulären Calciumkonzentration abhängt [Mogensen et al., 2003].

Auch in intestinalen Ratten-Epithelzellen wurde die inhibitorische Wirkung des Curcumins auf NF κ B beobachtet [Jobin et al., 1999]. Interessanterweise fanden Grunnet et al. vor kurzem, dass Kv1.3 im Nieren- und Kolon-Epithel von Kaninchen die am häufigsten vorkommende Kv-Untereinheit darstellt [Grunnet et al., 2003]. Untersuchungen an einer humanen Epithelzelllinie zeigten, dass die lokalen Entzündungsreaktionen, die Salmonella typhimurium auslöst, auf einer durch calciumabhängige NF κ B-Aktivierung bewirkten Interleukin-8-Sekretion beruhen [Gewirtz et al., 1999].

Die Zellarten, in denen Curcumin die Aktivierung von NF κ B verhindert, scheinen sowohl den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3, als auch einen calciumabhängigen Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors zu besitzen. Es wäre daher möglich, dass der Kv1.3-Kanal in diesen Zellen, ähnlich wie in T-Lymphozyten, notwendig ist, um eine genügend lange Zeit eine hohe intrazelluläre Calciumkonzentration aufrecht zu erhalten und damit die Aktivierung und Wirkung von NF κ B zu ermöglichen.

4.4.3 Psoralene

Patch-clamp-Messungen an L-929- und N1E-115-Zellen

Auch von den untersuchten Psoralen-Derivaten wurden jeweils komplette Konzentrations-Wirkungs-Kurven an beiden Zelllinien erstellt. Eine Übersicht der erhaltenen EC₅₀-Werte gibt Tabelle 4.6.

Problematik

Die Psoralene wiesen eine höhere Löslichkeit als die Curcuminoide auf. Nur selten hielten sich 50 μ M, die höchste getestete Konzentration, nicht bis zum Ende der Messung in Lösung. Ein Überblick über die eingesetzten Konzentrationen und die damit erreichten Blockaden findet sich im Anhang.

Allerdings verhielten sich auch einige Psoralene nicht ideal im Patch-clamp-Experiment und zeigten interessante Effekte während der Messungen. Die dadurch beeinflussten Ergebnisse sind in den entsprechenden Tabellen gekennzeichnet. Das genaue Verhalten der Verbindungen ist im Folgenden erklärt.

Elektrophysiologie

Sinkende Blockaden

Aufgrund der bereits erwähnten kumulativen Inaktivierung des Kv1.3-Kanals sinkt der Strom mit jedem Impuls weiter ab, sowohl bei der Aufnahme des Kontrollwertes, als auch nach Perfusion substanzhaltiger Lösung. Bei Verbindung **14** trat jedoch immer wieder der Fall ein, dass der Strom während der ersten zehn bis fünfzehn Messimpulse sank, dann aber wieder anstieg (Abb. 4.7). Dadurch wurden die ermittelten Blockaden geringer.

Verbindung	L-929		N1E-115		
	K _{peak}	K _{end}	Na	K _{peak}	K _{end}
11	13 (18/7)	4 (18/7)	163 (19/6)	20 (19/6)	7 (17/6)
12	4 (19/5)	1 (20/5)	14 (18/5)	15 (16/5)	6 (15/5)
13	1 (23/6)	1 (23/6)	35 (19/4)	6 (18/4)	2 (20/4)
14	142^a (19/8)	22^a (19/8)	336^a (12/5)	212^a (10/5)	44^a (15/5)
15	0,7 (22/6)	0,6 (18/5)	651^a (17/6)	7 (14/6)	3 (14/6)
16	2 (16/5)	2 (16/5)	n. b.	n. b.	n. b.

Tab. 4.6: EC₅₀-Werte der untersuchten Psoralene in µM. Darunter sind jeweils die Anzahl n der Datenpunkte, die zur Berechnung der EC₅₀-Werte verwendet wurden, und die Anzahl m der Experimente, aus denen diese Datenpunkte resultierten, in Klammern angegeben (n/m). ^a: extrem geringe Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, Erklärung im Text; n. b.: nicht bestimmt.

Eine Erklärung könnte in der schlechten Löslichkeit liegen. Bei der Perfusion einer metastabil übersättigten Lösung würde zunächst eine bestimmte hohe Konzentration an den Kanal gelangen und dort Wirkung zeigen. Würde die Verbindung nach einiger Zeit (noch nicht sichtbar) auszufallen beginnen, so könnten im Rahmen einer Gleichgewichtseinstellung auch Moleküle wieder vom Kanal oder der Membran entfernt werden. Ein auftretender Niederschlag könnte sogar in der Lage sein, weitere Moleküle an seiner Oberfläche zu adsorbieren. Am Kanal würde so eine geringere Konzentration vorliegen, die eine geringere Wirksamkeit zeigt. Der Strom würde wieder steigen. Dass es nicht unmöglich ist, einmal an den Kanal oder die Membran gebundene Moleküle wieder abzulösen, zeigen Spülvorgänge am Ende der Experimente, bei denen sich die Substanzen teilweise auswaschen ließen und der Strom wieder anstieg.

Dieses Ansteigen des Kaliumendstromes zeigte sich aber auch bei Konzentrationen, bei denen keine Löslichkeitsprobleme auftraten. Gleichzeitig war bei vielen Verbindungen zu beobachten, dass sich die Blockade mit steigender Konzentration der perfundierten Lösungen nur minimal vergrößerte, woraus sehr flache Konzentrations-Wirkungs-Kurven resultierten.

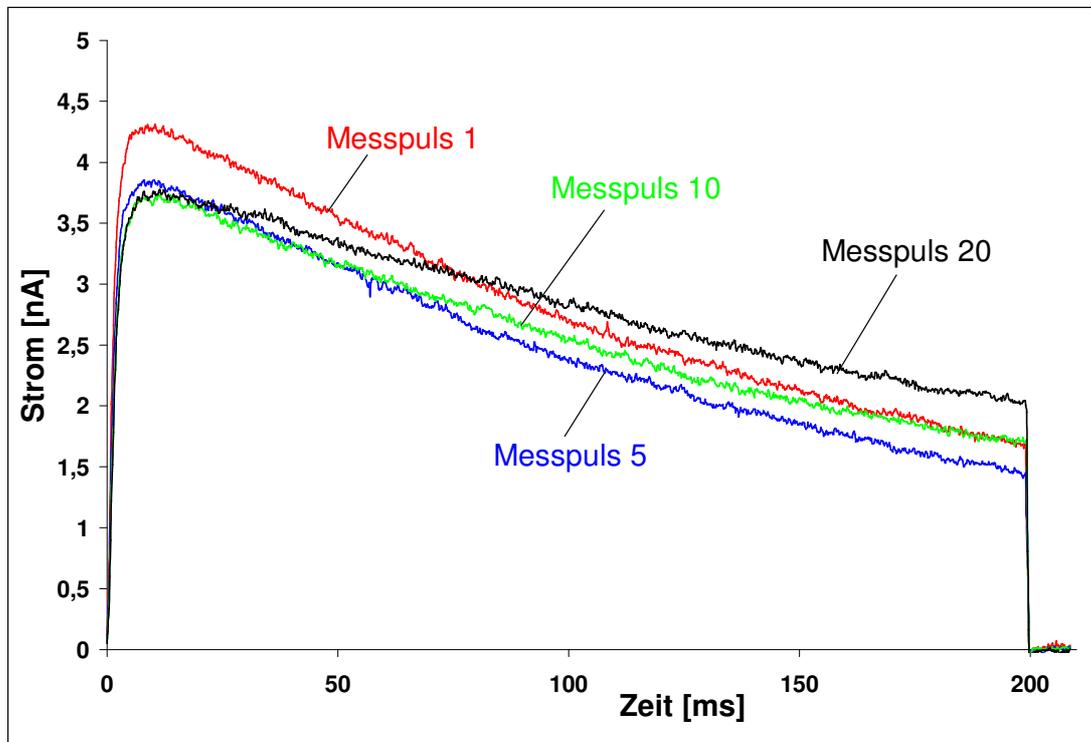


Abb. 4.7: Verhalten des Stroms durch den Kv1.3-Kanal unter Einwirkung von Verbindung 14.

Der Konzentrationsbereich, in dem die Blockadewerte nur noch minimal anstiegen, war für die einzelnen Verbindungen an den N1E-115- bzw. den L-929-Zellen jeweils in etwa identisch. Dieser Effekt trat in der Reihenfolge von Verbindung **11** zu Verbindung **15** bei zunehmend kleineren Konzentrationen auf: Die Substanz **11** zeigte dieses Problem erst bei ca. 25 μM , die Verbindungen **12** bis **14** bereits bei ca. 10 μM und Substanz **15** sogar schon bei ca. 5 μM . Genauere Angaben sind hier nicht möglich, weil im Rahmen der Patch-clamp-Experimente nur bestimmte Konzentrationen vermessen wurden. Die Verbindung **16** ist bis 10 μM am Kv1.3-Kanal untersucht worden und zeigte bis zu dieser Konzentration keine Probleme. Allerdings ist zu erwähnen, dass die damit erreichte blockierende Wirkung bereits so groß war, dass ein weiterer Anstieg der Blockadewerte auch bei sich ideal verhaltenden Substanzen nur noch langsam verlaufen würde und eventuelles ungewöhnliches Verhalten nicht mehr zu erkennen wäre.

Kaum steigende Blockaden an den L-929-Zellen

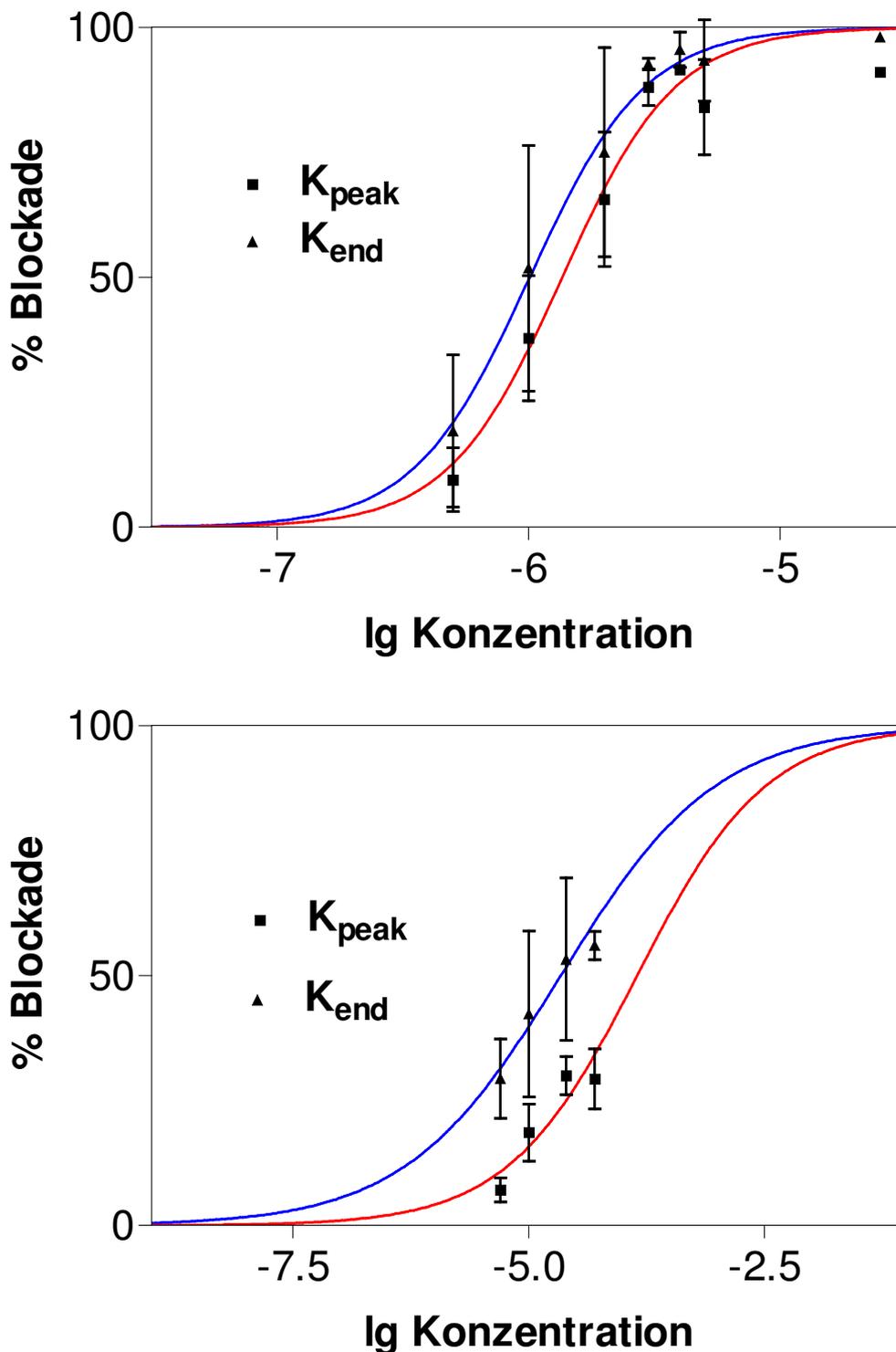


Abb. 4.8: Konzentrations-Wirkungs-Kurven an den L-929-Zellen; oben Verbindung 13, steil; unten Verbindung 14, flach. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar (standard error of the mean).

Die Messungen an den Mausfibroblasten wurden wesentlich weniger von diesem Geschehen beeinträchtigt als die an den Neuroblastomzellen. Das hängt unter

anderem damit zusammen, dass für den Kv1.3-Kanal kleinere EC₅₀-Werte ermittelt wurden, so dass die größeren Konzentrationen, bei denen das beschriebene Phänomen auftrat, den Kurvenverlauf nicht mehr so stark beeinflussten.

Bei den Verbindungen **13**, **15** und **16** zeigten sich im untersuchten Konzentrationsbereich keine Probleme. Daher wurden steile Konzentrations-Wirkungs-Kurven an den L-929-Zellen ermittelt. Beispielhaft ist in Abbildung 4.8, oben, eine solche steile Kurve dargestellt. Zum Vergleich befindet sich im unteren Teil der Abbildung eine extrem flach verlaufende Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Die Skalierung der Abszisse ist bei den beiden Graphen nicht identisch. Die obere Kurve ist gestreckt, um die Verläufe der beiden dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven voneinander unterscheiden zu können. Würde man die Skalierung des oberen Graphen der des unteren anpassen, verlief die obere Kurve deutlich steiler.

Ein Maß für die Steigung dieser sigmoidalen Kurven ist der Hillkoeffizient, der im Rahmen der Kurvenanpassung bestimmt wird. In Tabelle 4.7 findet sich eine Übersicht der Hillkoeffizienten. Daraus kann man entnehmen, dass die genannten Verbindungen relativ hohe Werte im Bereich von 1,52 bis 2,25 besitzen.

Für die Curcuminoide wurde auf eine Darstellung der Hillkoeffizienten verzichtet, da deren Konzentrations-Wirkungs-Kurven in der Regel keinen so auffällig flachen Verlauf zeigten.

Verbindung	L-929		N1E-115		
	K _{peak}	K _{end}	Na	K _{peak}	K _{end}
11	1,30	2,09	0,62	0,99	1,31
12	0,86	0,99	0,60	0,53	0,44
13	1,92	1,89	0,51	0,94	1,36
14	0,63	0,53	0,51	0,47	0,26
15	2,25	1,96	0,41	1,43	1,03
16	2,04	1,52	n. b.	n. b.	n. b.

Tab. 4.7: Während der Kurvenanpassung ermittelte Hillkoeffizienten der untersuchten Psoralene; K_{peak} = Kaliumpeakstrom, K_{end} = Kaliumendstrom, Na = Natriumstrom; n. b. = nicht bestimmt.

Bei der Substanz **11** verlaufen die Kurven schon wesentlich flacher, bei Verbindung **12** wird dies noch deutlicher und bei Substanz **14** ist dieses Verhalten am stärksten ausgeprägt. Exemplarisch ist in Abbildung 4.8, unten, die Konzentrations-Wirkungs-Kurve dieser Verbindung gezeigt. Belegt wird dieser optische Eindruck ebenfalls von

Elektrophysiologie

den entsprechenden Hillkoeffizienten, die deutlich kleiner sind als bei den Substanzen **13**, **15** und **16**. Bei Verbindung **12** liegen sie bereits unterhalb von 1 und Substanz **14** zeigt Werte knapp oberhalb von 0,5. Der Hillkoeffizient von 0,53 für den Kaliumendstrom der Substanz **14** ist eine aussagekräftige Folge des oben beschriebenen Ansteigens des Stromes während der 20 Messimpulse.

Weiterhin auffällig bei den zuletzt genannten Verbindungen ist die Tatsache, dass die erhaltenen Kurven für den Kaliumpeak- und den Kaliumendstrom nicht mehr parallel verlaufen, wie es üblicherweise zu beobachten ist. Dies kann man ebenfalls sehr schön in Abbildung 4.8 feststellen.

Kaum steigende Blockaden an den N1E-115-Zellen

An den Neuroblastomzellen war dieser Effekt noch ausgeprägter. Durchgehend alle Kurven verlaufen flacher als die am Kv1.3-Kanal, was man auch an den niedrigen Hill-Koeffizienten ablesen kann. Am stärksten zeigte dies der Natriumstrom, dessen Kurven alle eine kleinere Steigung als 1 aufwiesen. Bei den Verbindungen **11**, **13** und **15** konnten die Kaliumströme noch ausgewertet werden, wobei die Hillkoeffizienten für Natrium in dieser Reihenfolge kleiner wurden (0,62; 0,51; 0,41). Bei Verbindung **12** besitzen die Kurven aller drei Ströme Steigungen kleiner als 1, bei der Substanz **14** sind die Werte geringer und die Konzentrations-Wirkungs-Kurven dementsprechend flacher. Durch einen besonders kleinen Hillkoeffizienten (0,26) zeichnet sich der Kaliumendstrom der Verbindung **14** aus.

Daher wurde beschlossen, die Ergebnisse der Verbindung **14** an den N1E-115-Zellen nicht mit in die Wertung aufzunehmen, ebenso wie die Werte für den Natriumstrom bei Substanz **15**. Aber auch alle anderen Blockaden für den spannungsabhängigen Natriumkanal sollten kritisch betrachtet werden. Denn eine Folge der entstehenden sehr flachen Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind zu hohe ermittelte EC₅₀-Werte, welche die Selektivitätsbestimmung stark verfälschen können. Eine wirkliche Parallelität der einzelnen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die verschiedenen Ströme ist an den Neuroblastomzellen bei keinem der untersuchten Psoralene festzustellen.

Aggregatbildung

Beide Phänomene, sowohl die eben beschriebene, kaum vorhandene Steigerung der Blockade bei Perfusion steigender Konzentrationen als auch das Wiederansteigen des Kaliumendstromes während der 20 Messimpulse, könnte man mit der Bildung von löslichen Aggregaten, z.B. Dimeren und höheren Assoziaten, erklären, die keine oder zumindest eine deutlich schwächere kanalblockierende Wirkung besitzen. Im Falle der Verbindung **14** könnten diese Aggregate so stabil sein, dass sie während

der Messung bereits gebundene Moleküle vom Kanal oder der Membran ablösen, so dass der Strom sogar wieder steigt. Bei den übrigen Substanzen könnte diese Aggregatbildung lediglich dazu führen, dass ab einem bestimmten Schwellenwert die Konzentration an freien Molekülen nicht weiter zunimmt. Stattdessen würden sich die unwirksamen Aggregate bilden. Eine weitere Konzentrationserhöhung würde dann zu keiner weiteren Steigerung der prozentualen Blockade führen. Lysenko et al. postulierten bei verschiedenen Psoralenen bereits eine solche Aggregat-Bildung [Lysenko et al., 1988 und 1989]. Ob diese Theorie für die hier untersuchten Derivate wirklich zutrifft, ist noch unklar.

Es wurden noch zwei weitere Verbindungen am Kv1.3-Kanal vermessen, allerdings jeweils nur einmal, da beide Substanzen bereits in diesem einen Experiment das schon beschriebene Ausbleiben der Blockadesteigerung zeigten. Die Verbindungen sind in Abbildung 4.9 gezeigt.

Die Substanz **17** zeigt bereits bei Konzentrationen ab 1 μM keine Zunahme der blockierenden Wirkung mehr. Bei Verbindung **18** wurde als niedrigste Konzentration 5 μM eingesetzt. Diese erzeugte eine Blockade von 6%. Bei höheren Konzentrationen war keine Steigerung der Blockadewerte festzustellen. Die Rohdaten dieser Substanzen sind ebenfalls im Anhang angegeben.

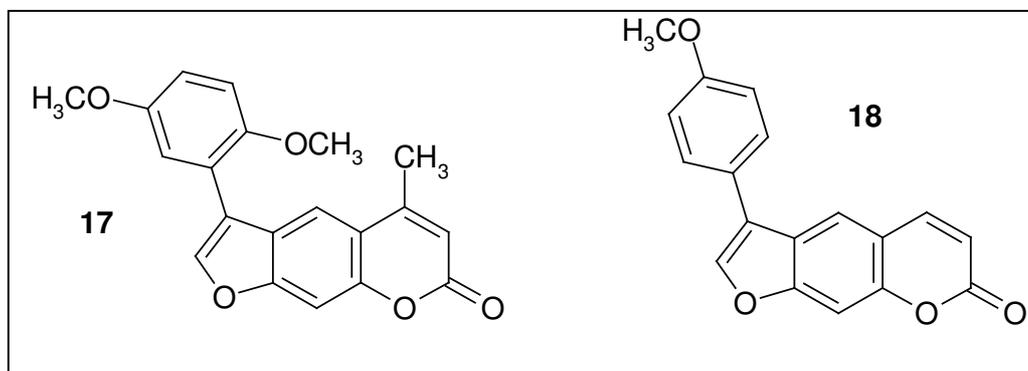


Abb. 4.9: Strukturen der Verbindungen 17 und 18.

Der Konzentrationsbereich, in dem dieser Effekt auftritt, ist bereits beschrieben worden. Er macht sich in Reihenfolge der Verbindungen **11** bis **15** bei zunehmend kleineren Konzentrationen bemerkbar. Die Verbindung **11** zeigt diesen Effekt damit kaum und die Verbindung **16** bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 10 μM ebenfalls nicht. Bei der Substanz **12** ist der Effekt nur minimal. Bei der Substanz **17**, der in 9-Position die Methylgruppe fehlt, zeigt sich das Problem bereits bei einer Konzentration von 1 μM . Für Verbindung **18** kann man nur die Aussage treffen, dass

Elektrophysiologie

der Effekt bei $\leq 5 \mu\text{M}$ einsetzt, also zumindest bei geringeren Konzentrationen als bei den Substanzen **13** bis **15**.

Sollten sich tatsächlich Assoziate bilden, so könnte man sich vorstellen, dass sich jeweils zwei (oder auch mehr) Moleküle zusammenlagern, indem sich die planaren Grundkörper übereinander schieben. Ein solcher Komplex würde durch π -Wechselwirkungen stabilisiert werden. Wäre dies der Fall, ist auch verständlich, warum die Verbindungen **17** und **18** bereits bei kleineren Konzentrationen diese Aggregatbildung zeigen. Sie besitzen in 9- bzw. in 9- und 5-Position keine Methylgruppen mehr, was vermutlich das Übereinanderlagern der planaren Ringsysteme vereinfacht. Die entstehenden Komplexe sind so stabiler, haben eine geringere Energie und bilden sich früher. Nicht direkt einzusehen ist es, dass Verbindung **13** die beschriebenen Effekte erst bei höheren Konzentrationen zeigt als die Substanzen **14** und **15**, da erstere einen kleineren Substituenten an Position 3 trägt. Allerdings könnten die Methoxygruppen der Substanzen **14** und **15** den Phenylrest sterisch in eine Position zwingen, in der die Aggregatbildung erleichtert wird, während der größere Bewegungsspielraum des Phenylringes bei der Substanz **13** dies eher verhindert. Dem scheinen Untersuchungen von Körner zu der DNA-Interkalation der Verbindungen **11** bis **15** zu widersprechen. Er zeigte, dass gerade die Psoralene **14** und **15**, die bereits bei niedrigen Konzentrationen vermutlich Aggregate bilden, kaum interkalierende Eigenschaften besitzen, die Substanz **13** dagegen schon [Körner, 2002]. Diese gegenläufigen Ergebnisse könnten auf abweichende sterische Anforderungen für die Aggregatbildung bzw. die Interkalation zurückzuführen sein. Es ist weiter zu bedenken, dass sich aufgrund der wenigen getesteten Konzentrationen keine Aussagen über die genauen Konzentrationen machen lassen, bei denen diese eventuelle Aggregatbildung einsetzt. Letztlich spielt sich dieser Effekt bei den Substanzen **11** bis **15** in etwa im gleichen grob gefassten Konzentrationsbereich von $5 \mu\text{M}$ bis $25 \mu\text{M}$ ab.

Verbindung 16

In Vorversuchen hatte sich bisher gezeigt, dass Ethylester verschiedener Psoralen-Derivate an Ionenkanälen besser wirken als die freien Säuren [Körner, persönliche Mitteilung]. Daraus wurde geschlossen, dass Carboxylgruppen eher hinderlich für eine Kanalblockade sind. Das Psoralen **16** zeigte daher eine erstaunlich gute Wirksamkeit. Die Verbindung weist jedoch eine Besonderheit auf. Es handelt sich dabei um eine vinyloge β -Dicarbonylverbindung und neigt als solche zur Decarboxylierung (Abb. 4.10).

Das angefertigte $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum mit DMSO-d_6 als Lösungsmittel zeigte unmittelbar nach dem Lösen zu ca. 88% die freie Säure. Eine weitere Messung der

gleichen Lösung nach einer Woche Lagerung bei Raumtemperatur zeigte bereits eine vollständige Umwandlung zum decarboxylierten Produkt. Diese Tatsache machte die Verwendung einer Stammlösung in DMSO über mehrere Tage äußerst fragwürdig, obwohl in den durchgeführten Experimenten kein nennenswerter Trend zu besserer Wirksamkeit erkannt werden konnte. Durch Decarboxylierung geht das Psoralen **16** in die ebenfalls untersuchte Verbindung **15** über, so dass man zumindest nach längerer Lagerung ähnliche Wirksamkeit erwarten sollte. Die EC_{50} -Werte der Substanz sind allerdings etwas höher als die der Substanz **15**, was eventuell auf noch nicht vollständig abgelaufene Decarboxylierung zurückzuführen ist. Da unklar ist, in welchem Ausmaße diese Decarboxylierung in den mit Puffer verdünnten Lösungen oder an den Zellen abläuft, und welche chemische Verbindung zur Wirkung kommt, wurde das Psoralen **16** nicht an den Neuroblastomzellen untersucht. In der Diskussion bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde die Substanz ebenfalls nicht berücksichtigt.

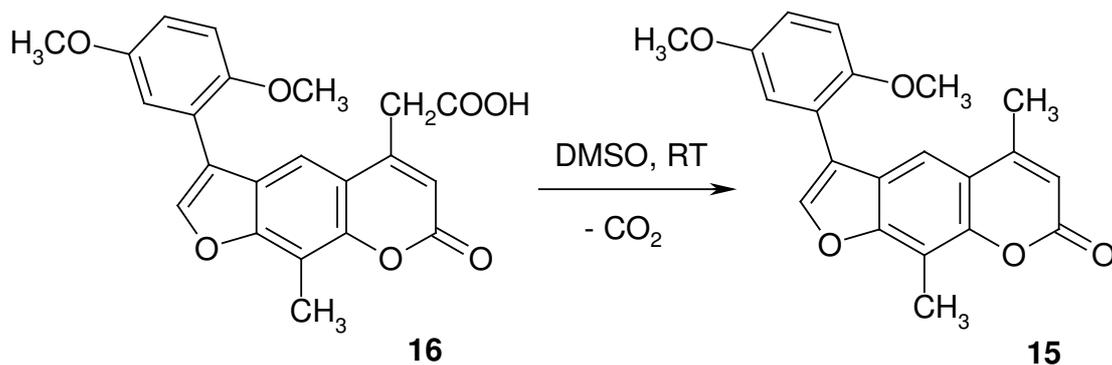


Abb. 4.10: Reaktionsgleichung der Decarboxylierung von Verbindung 16.

Bewertung der Kanalblockade

Kanalblockierende Wirkungen können durch unspezifische Membraneffekte aufgrund einer hohen Lipophilie verursacht werden. Die Verbindung **11** weist mit $3,36 \pm 0,06$ einen deutlich kleineren log P-Wert auf als die Substanzen **12** bis **14**, die alle eine ähnliche Lipophilie besitzen (log P-Wert größer als 4,5) [Körner, 2002]. Daher sollte sie an den L-929-Zellen am wenigsten Wirkung zeigen, wenn unspezifische Effekte für die Kanalblockade der Verbindungen verantwortlich sind. Aus Tabelle 4.6 kann man entnehmen, dass nur die Substanz **14** einen größeren EC_{50} -Wert aufweist als Verbindung **11**. Aufgrund der schon diskutierten Phänomene sind die Ergebnisse für diese Substanz allerdings sehr vorsichtig zu bewerten. Dennoch ist dies ein Hinweis darauf, dass die Ursache der kanalblockierenden Eigenschaften nicht nur in der Lipophilie der Substanzen zu suchen ist.

Die Psoralen-Derivate **12** bis **16** zeigen am Kv1.3-Kanal sehr ähnliche Wirkungen, sowohl bezüglich des Peak- als auch des Endstroms. Die Natriumströme lassen sich

Elektrophysiologie

aufgrund der bereits geschilderten Effekte kaum auswerten. Bezüglich der Kaliumströme an den Neuroblastomzellen kann man die auswertbaren Substanzen in zwei Gruppen einteilen: Zum einen die etwas besser wirksamen Verbindungen **13** und **14** (EC_{50} -Werte im einstelligen mikromolaren Bereich) und zum anderen die Derivate **11** und **12** mit den höheren EC_{50} -Werten.

Um die Psoralen-Derivate trotzdem in eine Reihenfolge ihrer Wirksamkeit zu bringen und vielleicht Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen machen zu können, wurden die prozentualen Blockadewerte der Substanzen bei einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ verglichen. Die beschriebenen Probleme ließen das exaktere Verfahren der Bestimmung der EC_{50} -Werte, das den gesamten Kurvenverlauf berücksichtigt, zweifelhaft erscheinen. Daher wurde auf diesen direkten Vergleich zurückgegriffen. Dazu wurden die Mittelwerte der Blockaden aus den verschiedenen Experimenten bestimmt. Als Streuwert wurde der SEM (standard error of the mean) angegeben. Der SEM wird berechnet als der Quotient der Standardabweichung und der Wurzel aus der Anzahl der Messungen. Diese Werte finden sich in Tabelle 4.8. Bei Substanz **15** sind die entsprechenden Werte für eine Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ angegeben. Dies hängt damit zusammen, dass hier bei den L-929-Zellen nur ein einziger Wert für $5 \mu\text{M}$ zur Verfügung stand. Zudem liegt die durch $2,5 \mu\text{M}$ erzielte Blockade am Kv1.3-Kanal bereits bei über 90%, was sich durch den Einsatz von höheren Konzentrationen kaum mehr steigern lässt. Der Wert für $5 \mu\text{M}$ ist daher in diesem Fall für Vergleiche nicht geeignet.

Verbindung	L-929		N1E-115		
	K_{peak}	K_{end}	Na	K_{peak}	K_{end}
11	21 ± 3 (4)	58 ± 3 (4)	8 ± 2 (5)	18 ± 2 (6)	38 ± 6 (6)
12	56 ± 6 (5)	80 ± 4 (5)	39 ± 3 (5)	39 ± 4 (5)	54 ± 6 (5)
13	84 ± 8 (3)	93 ± 4 (3)	31 ± 5 (4)	47 ± 5 (4)	80 ± 3 (4)
14	7 ± 2 (6)	29 ± 3 (7)	9 ± 3 (5)	16 ± 3 (5)	39 ± 6 (5)
15^a	91 ± 2 (6)	91 ± 3 (5)	13 ± 5 (4)	22 ± 5 (3)	48 ± 7 (3)
16	81 ± 3 (5)	81 ± 4 (5)	n. b.	n. b.	n. b.

Tab. 4.8: Prozentuale Blockaden der Psoralen-Derivate bei einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$, dargestellt als Mittelwert \pm SEM; in Klammern ist die Anzahl der zur Berechnung verwendeten Datenpunkte angegeben; ^a = $2,5 \mu\text{M}$; n. b. = nicht bestimmt.

Anhand dieses direkten Vergleichs kann man feststellen, dass die blockierende Wirkung des Kaliumpeakstromes an den L-929-Zellen von Verbindung **11** bis **15**

ansteigt. Lediglich die Substanz **14** zeigt einen auffällig niedrigen Wert, obwohl sie sich bei der eingesetzten Konzentration von 5 μM noch unproblematisch verhalten sollte. Für den Endstrom gilt das in ähnlicher Weise.

An den N1E-115-Zellen ist für alle drei Ströme eine Steigerung der Wirkung von Verbindung **11** bis **13** festzustellen, aber die Substanz **14** sticht auch hier durch extrem niedrige Werte hervor. Verbindung **15** zeigt wieder etwas größere Blockaden, allerdings nicht so groß, wie man aufgrund des Verhaltens am Kv1.3-Kanal erwartet hätte.

Ein aromatischer Substituent in Position 3 des Psoralengrundgerüsts scheint zu besserer Wirksamkeit an den L-929-Zellen zu führen als eine Methyl- oder t-Butylgruppe bei Verbindung **11** bzw. **12**. Dies trifft sowohl auf den unsubstituierten Phenylrest bei Substanz **13** zu als auch auf den 2,5-Dimethoxyphenylrest von Verbindung **15**. Lediglich das 4-Methoxyphenylderivat zeigt eine deutlich schwächere Wirksamkeit, die sogar noch geringer ist als die von Verbindung **11**.

Für die Neuroblastomzellen ist es offenkundig nicht von entscheidender Bedeutung, ob ein aromatischer oder aliphatischer Substituent in Position 3 enthalten ist, besonders nicht für den Natriumstrom. Diesbezüglich zeigen die Psoralene **14** und **15** identische Wirksamkeit, Verbindung **15** blockiert die Kaliumströme allerdings deutlich besser. Bei der Bewertung der Substanz **15** ist weiter zu beachten, dass bereits ab 5 μM der Effekt der nur noch wenig ansteigenden Blockaden zu beobachten war, so dass die blockierende Wirkung unterschätzt wird. Doch selbst dann zeigt sich für das Psoralen eine deutliche Präferenz für den Kv1.3-Kanal.

Bestimmung und Bewertung der Selektivitäten

Wie schon für die Curcuminoide wurden auch für die Psoralene die verschiedenen Selektivitäten berechnet. Sie sind in Tabelle 4.9 dargestellt.

Verbindung	$K_{\text{peak}}(\text{L-929}) / K_{\text{end}}(\text{L-929})$	$K_{\text{peak}}(\text{N1E}) / K_{\text{end}}(\text{N1E})$	$K_{\text{peak}}(\text{N1E}) / K_{\text{peak}}(\text{L-929})$	$K_{\text{end}}(\text{N1E}) / K_{\text{end}}(\text{L-929})$	$\text{Na}(\text{N1E}) / K_{\text{peak}}(\text{L-929})$	$\text{Na}(\text{N1E}) / K_{\text{peak}}(\text{N1E})$
11	3	3	2	2	13	8
12	4	3	4	6	4	1
13	1	3	6	2	35	6
14	6 ^a	5 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a
15	1	2	10	5	930 ^a	93 ^a

Tab. 4.9: Errechnete Selektivitäten der Psoralene; $K_{\text{peak}} = \text{EC}_{50}$ für den Kaliumpeakstrom in μM ; $K_{\text{end}} = \text{EC}_{50}$ für den Kaliumendstrom in μM ; $\text{Na} = \text{EC}_{50}$ für den Natriumstrom in μM ; ^a: extrem geringe Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven (siehe Tab. 4.6).

Elektrophysiologie

Die Blockade des Kaliumendstroms weist jeweils einen geringeren EC_{50} -Wert auf als die des Kaliumpeakstromes (Tab. 4.6). Dies äußert sich auch in Selektivitäten bis zum Faktor 6, wie man den ersten beiden Spalten der Tabelle 4.9 entnehmen kann. Das gilt für beide untersuchte Zelllinien.

Die Selektivitäten der Substanzen für Kv1.3-Kanäle in Vergleich mit anderen Kaliumkanälen ist in den Spalten drei und vier dargestellt. Sie betragen für den Kaliumpeakstrom 2 bis 10 und für den Endstrom 2 bis 6, wenn man Verbindung **14** nicht berücksichtigt. Für die Selektivität gegenüber spannungsabhängigen Natriumkanälen erhält man Werte zwischen 4 und 35 (Spalte fünf) unter Nichtbeachtung der Substanzen **14** und **15**. Ein Faktor von 35 für den Quotienten zweier EC_{50} -Werte ist relativ gut, aber man muss auch hier wieder bedenken, welche Probleme bei der Aufnahme der Natriumströme aufgetreten sind. Daher ist davon auszugehen, dass dieser Wert nicht vollständig die Realität wiedergibt. Für das Psoralen **15** errechnete sich sogar eine Selektivität von 930. Da die Natriumströme allgemein Probleme bereitet haben, ist auch dieser Wert kritisch zu betrachten und mit Sicherheit zu hoch. Der direkte Vergleich der Wirksamkeit von 5 μ M bzw. 2,5 μ M der verschiedenen Substanzen an beiden Zelllinien zeigt jedoch wie schon erwähnt eine deutliche Präferenz für den Kv1.3-Kanal.

Der Vollständigkeit halber wurde auch die Selektivität zwischen den beiden Ionenströmen an den Neuroblastomzellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Spalte sechs aufgeführt. Vernachlässigt man wieder die Substanzen **14** und **15**, so lässt sich sagen, dass die Kaliumströme um den Faktor 1 bis 8 besser blockiert werden als die Natriumströme. Für Verbindung **15** gilt hier das bereits oben gesagte.

Die erreichten Selektivitäten sind bei den untersuchten Psoralenen etwas besser als bei den Curcuminoiden, aber noch immer nicht therapeutisch ausreichend, so dass auch in diesem Falle darauf verzichtet wurde, die Verbindungen an weiteren Kanälen zu untersuchen.

4.5 Bestimmung der Wiederfindungsraten im Patch-clamp-Experiment

Bei lipophilen Verbindungen wie die in dieser Arbeit untersuchten besteht immer die Gefahr, dass sich nicht unerhebliche Anteile der gelösten Substanzen an aktive Oberflächen, wie beispielsweise an Pumpenschläuche und Zellschälchen, anlagern. Als Folge dieser Adsorptionsvorgänge würde während der Messungen eine geringere Konzentration als angenommen vorliegen und zur Wirkung kommen. Im Rahmen der im folgenden beschriebenen Perfusionsexperimente sollte untersucht werden, welches Ausmaß diese Konzentrationsverminderung bei den eingesetzten Verbindungen annimmt. Da bereits zahlreiche Daten für Psoralen-Derivate vorliegen [Herzog, 2000; Vennekamp, 2002], wurden lediglich Curcuminoide überprüft. Um neben der Gehaltsbestimmung auch eventuell auftretende Zersetzungsprodukte zu detektieren, erfolgte die Bestimmung der Wiederfindung nach der Perfusion mithilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Die HPLC ermöglichte über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich eine direkte Vermessung ohne vorherige Verdünnungsschritte bei zugleich guter Linearität.

4.5.1 Materialien und Geräte

Binary HPLC Pump 1525	Waters
Multi λ Fluorescence Detector 2475	Waters
Software Breeze™	Waters
Säule Nucleosil 100-5 NH ₂ (200 x 4 mm)	Machery-Nagel
DMSO Uvasol®, Nr. 1.02950.0500	Merck
Methanol LiChrosolv®, Nr. 1.06018.2500	Merck

Alle weiteren verwendeten Chemikalien besaßen mindestens p.a.-Qualität und wurden von Merck oder Fluka bezogen.

4.5.2 Methodenbeschreibung

Es wurde unter isokratischen Bedingungen mit einem Fließmittel aus Methanol und einem 22 mM Sörensen Phosphatpuffer pH 7,4 (18,2 mM Na₂HPO₄, 4,04 mM KH₂PO₄ in bidestilliertem Wasser) im Verhältnis 70/30 gearbeitet. Die beiden Bestandteile wurden zusammengegeben und vor Verwendung 20 Minuten in einem

Elektrophysiologie

Ultraschallbad entgast. Die Flussrate betrug 0,7 ml/min und die Säule war auf 25°C thermostatisiert. Die Injektion erfolgte mithilfe einer Hamiltonspritze über eine 500 µl-Dosierschleife. Diese musste zwischen den einzelnen Injektionen sorgfältig mit Aceton und bidestilliertem Wasser gespült werden, um an dem Kolben anhaftende Substanzreste vollständig zu entfernen. Detektiert wurden die Curcuminoide über ihre Eigenfluoreszenz (Verbindung **1**: λ_{Ex} 394 nm, λ_{Em} 533 nm, Verbindungen **2** und **7**: λ_{Ex} 400 nm, λ_{Em} 520 nm).

Von den am Kv1.3-Kanal untersuchten Curcumin-Derivaten wurden nur die Verbindungen **1**, **2** und **7** untersucht. Diese drei Substanzen sind zwar nicht die lipophilsten, aber aufgrund ihrer guten Wirksamkeit die interessantesten. Die Bedingungen sollten bei den Perfusionsexperimenten die gleichen sein wie bei den Patch-clamp-Experimenten. Als Lösungsmittel wurde daher N-Ringer-Lösung unter Zusatz von 5% DMSO gewählt. Auf die zusätzliche Überprüfung der als zweite externe Lösung eingesetzten modifizierten Lösung nach Quandt wurde verzichtet, da nicht anzunehmen ist, dass eine leicht veränderte Zusammensetzung des Puffers die Adsorptionsvorgänge nennenswert beeinflusst. Auch die Substanzkonzentrationen wurden wie bei den Patch-clamp-Untersuchungen gewählt.

Jede Konzentration wurde sowohl in der Kalibrierung als auch in den Perfusionsexperimenten viermal getestet. Zwischen den verschiedenen Durchläufen einer Konzentration wurden die Pumpenschläuche der Patch-clamp-Anlage zweimal mit je 16 ml DMSO-haltiger N-Ringer-Lösung gespült. Dieser Reinigungsvorgang genügte scheinbar, um eventuell im Schlauch verbliebene Substanzreste herauszulösen, denn es war innerhalb der vier nacheinander durchgeführten Messungen einer jeden Konzentration kein Trend zu steigenden Substanzmengen erkennbar. Diesen positiven Trend, also eine steigende Wiederfindungsrate, hätte man erwartet, wenn sich zuvor adsorbierte Moleküle der Curcuminoide bei erneuter Perfusion wieder abgelöst oder bereits adsorbierte Moleküle die Schlauchoberflächen zum Großteil abgesättigt hätten, so dass bei erneuter Perfusion deutlich weniger Substanz hätte gebunden werden können. Beim Wechsel zu einer anderen Konzentration wurde mit 80 ml Methanol und dann mit 40 ml bidestilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Schläuche wie zu Beginn mit der N-Ringer-Lösung gefüllt.

Stammlösungen

Während der Vorbereitungen wurden von den Curcuminoiden verschiedene Stammlösungen in DMSO hergestellt, die nach einer Verdünnung von 1:20 mit N-Ringer-Lösung die gewünschten Konzentrationen und einen DMSO-Gehalt von 5%

ergaben. Diese Stammlösungen sollten jeweils sowohl für die Kalibrierungen als auch für die Perfusionsuntersuchungen verwendet werden, um keine Fehler durch eventuell differierende Konzentrationen zu erhalten. Die Instabilität der Curcumin-Derivate auch in DMSO selbst bei Aufbewahrung im Kühlen und Dunklen machte es notwendig, beide Messungen (Kalibrierung und Perfusion) jeder Konzentration jeweils am gleichen Tag durchzuführen. Es wurden für jeden Tag neue Stammlösungen angesetzt.

Kalibrierung

Über die Zersetzung von Curcuminoiden in wässrigen Lösungen ist schon berichtet worden (siehe Kap. 4.4.2). Deswegen ist es von großem Interesse festzustellen, welcher Anteil einer jeden Verbindung sich über den Zeitraum eines Patch-clamp-Experiments bereits ohne Perfusion abbaut. Daher wurden für die Kalibrierung die Verdünnungen immer neu unmittelbar vor der Vermessung hergestellt. Als Gefäße zum Ansetzen dieser Lösungen wurden Glasvials verwendet, da Vorversuche, in denen Eppendorfgefäße, Zellschälchen oder Glasvials eingesetzt wurden, zeigten, dass das Ausmaß der Adsorption an Kunststoffoberflächen stärker ist als an Glas. Dies war sowohl an der Menge wiedergefundener Substanz nach 15 Minuten zu erkennen, als auch an der Tatsache, dass sich die Zellschälchen und Eppendorfgefäße (wie übrigens auch die Perfusionsschläuche) gelblich färbten. Das Volumen der hergestellten Lösungen betrug 2 ml. Nach exakt einer Minute wurde einmal injiziert und nach 15 Minuten ein zweites Mal. Die Wartezeit von einer Minute war zum Durchmischen und Applizieren der Lösung in die Dosierschleife notwendig. Es wurde ein Zeitrahmen von 15 Minuten gewählt, da an den L-929-Zellen aufgrund der 30 Sekunden Pause zwischen zwei Messpulsen ein Durchlauf von 20 Pulsen bereits zehn Minuten in Anspruch nahm. Dazu kam jeweils noch die Perfusionszeit. Der Vergleich der Werte nach 15 Minuten mit denen nach einer Minute sollte das Ausmaß des Abbaus verdeutlichen.

Perfusion

Auch bei den Perfusionsversuchen wurde die Lösung der jeweiligen Konzentration immer erst direkt vor Beginn durch Verdünnung der DMSO-Stammlösung mit N-Ringer-Lösung hergestellt. Dabei wurden analog der Kalibrierung Glasgefäße eingesetzt, allerdings wurden 20 ml der Verdünnungen hergestellt. Wie bei den Patch-clamp-Experimenten wurden für jede einzelne Messung die Pumpenschläuche mit der DMSO-haltigen N-Ringer-Lösung gefüllt und an einem Zellschälchen befestigt, das genau 2 ml der gleichen Lösung enthielt. Exakt 30 Sekunden nach der Verdünnung wurde mit der Perfusion von 16 ml der frisch hergestellten Substanzlösung begonnen. 15 Minuten nach der Herstellung wurde das Volumen

Elektrophysiologie

des Schälchens in die Dosierschleife injiziert. Der Vergleich der 15 Minuten-Werte der Kalibrierung zum einen und der Perfusionsexperimente zum anderen sollte Rückschlüsse über das Ausmaß der Adsorptionsvorgänge zulassen.

4.5.3 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	Konzentration	Kalibrierung	Perfusion
		Wiederfindung (15 min)	Wiederfindung (15 min)
1	1 μ M	83% \pm 7%	99% \pm 11% ^a
	2 μ M	86% \pm 5%	84% \pm 1%
	4 μ M	86% \pm 2%	91% \pm 7%
	6 μ M	82% \pm 2%	94% \pm 6%
	8 μ M	79% \pm 6%	101% \pm 7%
	16 μ M	72% \pm 4 %	89% \pm 3%
2	0,5 μ M	82% \pm 3%	63% \pm 4%
	1 μ M	86% \pm 2%	73% \pm 1% ^a
	2 μ M	87% \pm 2%	87% \pm 1% ^a
	4 μ M	86% \pm 2%	74% \pm 3%
	8 μ M	89% \pm 6% ^b	72% \pm 3%
7	1 μ M	88% \pm 8%	90% \pm 3%
	3 μ M	89% \pm 3%	76% \pm 2%
	5 μ M	74% \pm 6%	93% \pm 3%
	7 μ M	76% \pm 3% ^a	91% \pm 1%

Tab. 4.10: Ergebnisse der Wiederfindungsexperimente bezogen auf die Substanzmenge nach 1 Minute während der Kalibrierung, dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 4; ^a: n = 3; ^b: n = 5.

Die bei der Kalibrierung und der Perfusion wiedergefundenen Substanzmengen für die verschiedenen Substanzen und die verschiedenen Konzentrationen sind in Tabelle 4.10 zusammengestellt und beziehen sich jeweils auf den Wert nach 1

Minute während der Kalibrierung. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Peakflächen.

Kalibrierung

Es wäre zu erwarten, dass mit steigender eingesetzter Konzentration auch die Substanzmenge zunimmt, die während der Kalibrierung nach 15 Minuten nachgewiesen werden kann. Dies hängt zum einen damit zusammen, dass jede Oberfläche nur eine bestimmte absolute Substanzmenge adsorbieren kann. Das heißt, auch mit steigender Konzentration nimmt die angelagerte Substanzmenge irgendwann nicht mehr zu, die Adsorptionsisothermen nähern sich einem Grenzwert. Für den unwahrscheinlichen Fall, dass die untersuchten Konzentrationen sich noch in dem linearen Teil der Adsorptionsisothermen bewegen, sollte die Wiederfindung in diesem Bereich unabhängig von den Konzentrationen sein. Zum anderen wurde von König und Mamero gezeigt, dass sich mit steigender Konzentration der Curcuminoiden das Ausmaß ihres Abbaus verringert [König, 1993; Mamero, 1997]. Während des Zerfalls sinkt der Gehalt an unzersetztem Curcuminoid bis zu einem bestimmten Grenzwert, der mit wachsender Ausgangskonzentration ansteigt. Diese beiden Effekte sollten bewirken, dass die Wiederfindungsrate mit zunehmender Konzentration ansteigt oder zumindest gleich bleibt.

Von den untersuchten Substanzen erfüllt nur die Verbindung **2** annähernd diese Erwartungen. Die prozentuale Wiederfindung liegt zwischen 82% und 88% und zeigt leicht steigende Tendenz. Die Spannweite der Ergebnisse bei den beiden anderen Verbindungen ist deutlich größer (72% bis 86% bei Curcuminoid **1** und 77% bis 89% bei Curcuminoid **7**). Die nach 15 Minuten nachweisbare Substanzmenge scheint zumindest bei den höchsten untersuchten Konzentrationen zu sinken.

Es ist unklar, warum sich die Verbindungen **1** und **7** hier konträr verhalten. Den Ergebnissen liegt vermutlich kein Messfehler zugrunde, da während der Kalibrierung und der Perfusion wie schon beschrieben die gleiche Stammlösung verwendet wurde. Außerdem wurden die Verdünnungen für jede Messung neu angesetzt und eine Vierfach-Bestimmung durchgeführt. Die geringe Wiederfindung ließe sich mit gesteigertem Abbau oder zunehmender Adsorption erklären, wobei nicht zu verstehen ist, warum die Curcumin-Derivate **1** und **7** hier ein solch abweichendes Verhalten zeigen. Auffällig ist es, dass sich diese beiden Substanzen durch das Vorhandensein von Methoxygruppen von der Verbindung **2** unterscheiden.

Perfusion

Die Wiederfindungsraten nach der Perfusion sind bei Verbindung **2** deutlich kleiner als während der Kalibrierung. Lediglich bei 2 μM ist die gefundene Substanzmenge

Elektrophysiologie

in beiden Fällen gleich. Bei den Curcumin-Derivaten **1** und **7** konnte während der Perfusionsexperimente mit jeweils einer Ausnahme eine größere Substanzmenge nachgewiesen werden als bei der Kalibrierung.

Das Verhalten der letzten beiden Verbindungen ist folgendermaßen zu erklären. Während der Kalibrierung wurde ein sehr kleines Volumen der unterschiedlichen Verdünnungen hergestellt, so dass das Verhältnis zwischen Oberfläche und Substanzmenge recht ungünstig war. Für die Perfusionsexperimente wurde eine deutlich größere Menge an Lösung angesetzt. Diese wurde zusätzlich eine gewisse Zeit frisch durch die Schläuche und das Schälchen hindurch perfundiert, so dass vermutlich nach Absättigung der Oberflächen im Schälchen letztlich fast die Ausgangskonzentration vorlag, lediglich reduziert durch Abbauvorgänge.

Es bleibt die Frage, warum sich in diesem Fall die Verbindung **2** anders als erwartet verhält. Die geringen Wiederfindungsraten sind vermutlich auf erhöhtes Adsorptionsvermögen zurückzuführen, besonders an den Oberflächen der Schläuche und des Schälchens, oder auf gesteigerten Abbau. Dieser scheint allerdings generell für das Curcuminoid **2** nicht stärker zu sein als für die beiden anderen Substanzen, denn die prozentuale Wiederfindung während der Kalibrierung nach 15 Minuten ist nicht kleiner als bei den Verbindungen **1** und **7**.

Zusammenfassung

Abschließend lässt sich festhalten, dass nach der Perfusion fast ausschließlich mehr als 70% der eingesetzten Substanz nachweisbar ist. Dies bedeutet, dass die Wirksamkeit der untersuchten Verbindungen etwas unterschätzt wird, aber dieser Fehler tritt letztlich bei allen Patch-clamp-Untersuchungen mehr oder weniger stark auf, da die Substanzlösungen immer in geeigneter Weise auf die Zellen gebracht werden müssen. Allerdings können die Wiederfindungsraten bei entsprechend hoher Lipophilie und geringer Konzentrationen der Verbindungen auch deutlich geringere Werte annehmen. So fand Vennekamp für verschiedene Psoralene unter bestimmten Bedingungen nur 30% bis 40% der eingesetzten Substanzmenge nach der Perfusion wieder [Vennekamp, 2002]. Der log P-Wert dieser Verbindungen lag bei ca. 4 und die Konzentrationen im unteren nanomolaren Bereich. Herzog berichtete für andere Psoralen-Derivate je nach Struktur und eingesetzter Konzentration Wiederfindungsraten zwischen 47% und 100% [Herzog, 2000].

Ein weiterer Fehler kommt bei der in Kapitel 4.3.5 beschriebenen Vorgehensweise zustande, da die verschiedenen getesteten Konzentrationen alle nacheinander ohne zwischenzeitliches Ausspülen appliziert wurden. Allerdings konnte während der Patch-clamp-Experimente nicht festgestellt werden, dass eine bestimmte Konzentration eine stärkere Blockade erzielte, wenn die Zelle bereits mit einer geringeren Konzentration vorbelastet war.

Man sollte sich darüber im Klaren sein, dass die mithilfe der Patch-clamp-Technik ermittelten Ergebnisse keine unveränderlichen Absolutwerte sind, sondern immer unter Berücksichtigung der Versuchsbedingungen gesehen werden müssen. Da diese Bedingungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit immer gleich waren, ist aber mit Sicherheit die Vergleichbarkeit der Daten untereinander gegeben.

5 Fluoreszenzanisotropie

5.1 Überblick über die Fluoreszenzanisotropie

5.1.1 Das Prinzip

Unter Einwirkung von elektromagnetischer Strahlung des UV-Vis-Bereiches (200 nm bis 800 nm) auf Moleküle mit geeigneten Chromophoren kommt es durch Lichtabsorption zur Elektronenanregung. Während dieses Prozesses ändert sich das Dipolmoment des Moleküls, und man kann ein Absorptionsübergangsdipolmoment zwischen den Dipolmomenten des angeregten und des Grundzustandes bestimmen. Nach der Anregung gibt es verschiedene Möglichkeiten der Energieabgabe. Die meisten Moleküle relaxieren strahlungslos, also ohne Emission elektromagnetischer Strahlung. Die Fluoreszenz zählt zu den strahlenden Relaxationsprozessen. Bei der Energieabgabe ändert sich das Dipolmoment des Moleküls erneut und man kann für die strahlenden Prozesse ein Emissionsübergangsdipolmoment bestimmen. Die Übergangsdipolmomente für die Absorption und die Emission sind nicht parallel, sondern um einen bestimmten, aber meist kleinen Winkel gegeneinander verschoben. Unter der Voraussetzung, dass sich ein Fluorophor zwischen Absorption und Emission nicht nennenswert bewegt, folgt daraus, dass bei Anregung mit linear polarisiertem Licht auch die entstehende Fluoreszenzstrahlung zu einem gewissen Grad polarisiert ist.

Bei Fluoreszenzanisotropie- oder Fluoreszenzpolarisations-Messungen werden herkömmliche Fluorimeter verwendet, bei denen sowohl in den Anregungs- als auch in den Emissionsstrahlengang zusätzlich zum Monochromator je ein Polarisator eingebracht werden kann. Die Abbildung 5.1 veranschaulicht dies. Die Anregung der Moleküle erfolgt mit monochromatischem, vertikal linear polarisiertem Licht. Die Fluoreszenzintensität wird einmal bei vertikal und einmal bei horizontal gestelltem Emissionspolarisator gemessen. Um das Ausmaß der teilweisen Verschiebung der Polarisationssebene des Emissionslichtes gegen die des Absorptionslichtes zu erfassen, hat man zwei Größen eingeführt, die Anisotropie r und die Polarisation P . Sie sind folgendermaßen definiert [Schmidt, 2000]:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2 \times I_{VH}} \quad P = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}}$$

Hierbei stellt I_{VV} die gemessene Fluoreszenzintensität dar, wenn beide Polarisatoren vertikal, also parallel zueinander, stehen. I_{VH} ist die Fluoreszenzintensität bei vertikal ausgerichtetem Anregungs- und horizontal ausgerichtetem Emissionspolarisator, also bei rechtwinkliger Stellung der Polarisatoren zueinander. Bezüglich der Herleitung dieser Formeln sei auf die Literatur verwiesen [Lakowicz, 1983].

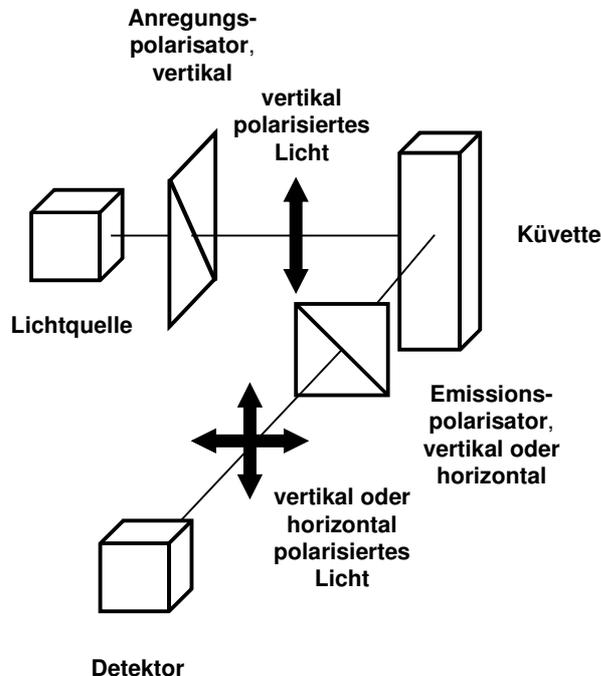


Abb. 5.1: Schema des Geräteaufbaus bei Fluoreszenzanisotropie-Messungen; verändert nach [Lakowicz, 1983].

Man kann die beiden dimensionslosen Größen ineinander umrechnen, sie sagen das gleiche aus, umfassen aber zahlenmäßig unterschiedliche Spannen. Die Polarisation eignet sich aufgrund ihrer Definition am besten zur Beschreibung einer eher polarisierten Strahlung, während die Anisotropie geeigneter ist, das Emissionsverhalten eines Fluorophoren zu charakterisieren. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit die Anisotropie als Messgröße verwendet.

Vor Beginn der eigentlichen Messung muss ein gerätespezifischer Korrekturfaktor G ermittelt werden. Denn auch bei Verwendung einer Strahlungsquelle, die absolut unpolarisiertes Licht erzeugt, werden bei vertikaler bzw. horizontaler Stellung des Emissionspolarisators ohne Anregungspolarisator unterschiedliche Intensitäten gemessen. Das hängt damit zusammen, dass erstens der Anregungsmonochromator selbst eine polarisierende Wirkung besitzt, und zweitens der Emissionsmonochromator nicht die gleiche Durchlässigkeit für horizontal wie für vertikal polarisiertes Licht aufweist. Diese unterschiedliche Sensitivität der

Fluoreszenzanisotropie

Messanordnung für verschieden polarisiertes Emissionslicht wird erfasst, indem die Anregung mit horizontal polarisiertem Licht erfolgt. Dann ist der Emissionspolarisator sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Position rechtwinklig zum Anregungspolarisator ausgerichtet (Abb. 5.2). Unterschiede zwischen den in beiden Fällen erfassten Intensitäten können dann nur in der unterschiedlichen Sensitivität begründet liegen.

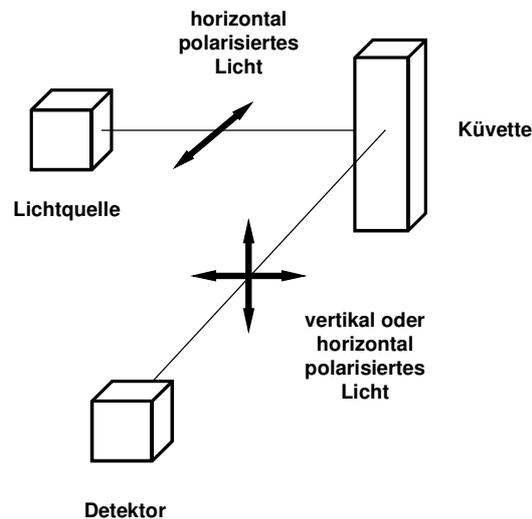


Abb. 5.2: Darstellung der Verhältnisse bei horizontaler Anregung zur Ermittlung des G-Wertes.

Der G-Wert ist durch folgende Formel definiert:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

Die Berechnung der Anisotropie erfolgt dann als:

$$r = \frac{I_{VV} - G \times I_{VH}}{I_{VV} + 2 \times G \times I_{VH}}$$

Um eine Lichtabsorption zu gewährleisten, muss das oben erwähnte Absorptionsübergangsdipolmoment des Moleküls möglichst parallel zum Vektor des linear polarisierten Anregungslichtes liegen. Allerdings können nicht nur die Moleküle das Licht absorbieren, deren Übergangsdipolmoment absolut parallel zu der Polarisationssebene des Anregungslichtes liegen, sondern zu einem kleineren Anteil auch die, deren Übergangsdipolmomente um einen kleinen Winkel gegenüber dieser Ebene verschoben sind. Dabei nimmt die Wahrscheinlichkeit der Absorption mit steigendem Winkel ab. Diesen Vorgang nennt man Photoselektion. Selbst

ausgehend von dem optimalen Fall, dass die Übergangsdipolmomente für die Absorption und die Emission absolut parallel verlaufen, kommt es so bei anschließender Lichtemission zu einer gewissen Depolarisation. Diese wird durch eventuelle Nichtparallelität der Übergangsdipolmomente noch verstärkt. Beides sind intrinsische Gründe für eine Abnahme der Polarisation und können durch die experimentellen Bedingungen kaum beeinflusst werden. Die Photos Selektion ist der Grund dafür, dass die Anisotropie auch beim Fehlen jeglicher Molekülrotationen keine Werte größer als 0,4 annehmen kann [Lakowicz, 1983].

Sogenannte extrinsische Gründe können ebenfalls zur Depolarisation führen. In erster Linie ist hier die Rotationsdiffusion zu nennen. Wenn sich die Moleküle in der kurzen Zeit zwischen Anregung und Emission stark bewegen, wird es zu einer starken Depolarisation kommen. Einen ähnlichen Effekt hat der strahlungslose Energietransfer. Dabei wird die bei der Absorption aufgenommene Energie strahlungslos an einen anderen Fluorophoren abgegeben, unabhängig von der Ausrichtung seines Übergangsdipolmoments. Die Energie kann auf diese Weise nacheinander auf mehrere Moleküle übertragen werden. Bei der abschließenden Emission kann die Ebene des Lichtes um jeden beliebigen Winkel gedreht worden sein. Dieser Effekt tritt allerdings erst bei recht hohen Konzentrationen auf, wie sie in der Fluoreszenzspektroskopie in der Regel nicht verwendet werden.

Daneben sind auch triviale Gründe wie die Trübung der zu untersuchenden Lösung problematisch, denn das entstehende Streulicht kann das Ausmaß der Depolarisation in beide Richtungen beeinflussen.

Geht man von einem idealen Fall aus, in dem die Parallelität der beiden Übergangsdipolmomente gegeben ist, keine trivialen Gründe zur Depolarisation führen und es auch nicht zum strahlungslosen Energietransfer kommt, dann bleibt als die Anisotropie beeinflussende Größe nur noch die Rotationsdiffusion. Die Perrin-Gleichung erklärt den Zusammenhang zwischen der Anisotropie, der Rotationskorrelationszeit und der Fluoreszenzlebensdauer [Lakowicz, 1983]:

$$r = \frac{r_0}{1 + \left(\frac{\tau}{\phi}\right)}$$

Hier bezeichnet r die resultierende Anisotropie und r_0 die intrinsische Anisotropie des verwendeten Fluorophoren, die aufgrund der Photos Selektion und der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanz nicht überschritten werden kann. Die Fluoreszenzlebensdauer, also die Lebensdauer des angeregten Zustandes, wird mit

Fluoreszenzanisotropie

τ bezeichnet und die Rotationskorrelationszeit mit ϕ . Letztere ist umso kleiner, je beweglicher ein Molekül ist. Man kann der Gleichung entnehmen, dass die Anisotropie immer dann sehr klein ist, wenn die Fluoreszenzlebensdauer deutlich größere Werte annimmt als die Rotationskorrelationszeit. Dies ist bei den meisten Substanzen in dünnflüssigen Lösungen der Fall. Maximale Anisotropie-Werte werden erreicht, wenn es sich umgekehrt verhält und ϕ deutlich größer ist als τ . Dies wiederum tritt in hochviskosen Lösungen auf, in denen die freie Beweglichkeit stark eingeschränkt ist. Eine Substanz mit geeigneten Eigenschaften ermöglicht daher durch Anisotropie-Messungen Aussagen über die Viskosität ihrer Umgebung. Diese Substanzen bezeichnet man als Fluoreszenzsonden. Je größer die Viskosität ist, desto weniger wird sich der Fluorophor bewegen können, desto geringer fällt die Depolarisation aus und desto größer ist die Anisotropie.

Es sei noch darauf hingewiesen, dass bei geeigneten Sonden die Fluoreszenzlebensdauer und die Rotationskorrelationszeit in niedrigviskoser Umgebung in der gleichen Größenordnung liegen sollten. Ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes hier bereits deutlich kürzer als ϕ , dann ergeben sich selbst in diesem Milieu hohe Anisotropie-Werte und man wird keinen Unterschied zu Medien höherer Viskosität feststellen können.

5.1.2 Die Anwendungen

Anisotropie-Messungen haben den Vorteil eines einfachen experimentellen Aufbaus, denn man benötigt lediglich ein handelsübliches Fluorimeter. Wie bei allen fluorimetrischen Methoden ist es auch in diesem Fall möglich, mit sehr kleinen Konzentrationen des Fluorophoren, also der Sonde, zu arbeiten. Daher wird die Fluoreszenzanisotropie heute vielfältig im Rahmen biochemischer Untersuchungen eingesetzt. Ist ein Fluorophor vorhanden, der im gewünschten Bereich bindet und auch hinsichtlich der spektralen Eigenschaften geeignet ist, dann kann man mit dieser Fluoreszenzsonde sehr empfindlich jede Änderung des Milieus detektieren, die der Sonde mehr oder weniger Bewegungsspielraum ermöglicht.

Das erste Einsatzgebiet dieser Technik war die Bestimmung der Rotationskorrelationszeit von Proteinen. Dies ist möglich durch Markierung des Proteins mit einer Fluoreszenzsonde bekannter Fluoreszenzlebensdauer. Unter Kenntnis der Viskosität der Umgebungslösung kann so durch Messung der Anisotropie bei verschiedenen Temperaturen die maximale Anisotropie für diesen Komplex ermittelt werden. Die Rotationskorrelationszeit folgt dann aus der Perrin-Gleichung.

Als ein Hauptanwendungsbereich ergibt sich aus dem Gesagten die Bestimmung der Mikroviskositäten von Zellmembranen. Hier werden lipophile Sonden verwendet, die sich zwischen die Membranlipide einlagern. Die Messung ihrer Anisotropie erlaubt Aussagen über ihre Beweglichkeit und damit über die Viskosität der Membran. Um definierte Zahlenwerte für die Größe dieser Zähigkeit zu bekommen, wird vorher eine Kalibrierung mit lipophilen Lösungen bekannter Viskositäten vorgenommen. Meistens werden hier Mineralöle eingesetzt. Ein Problem dabei, dessen man sich bewusst sein sollte, ist die nicht immer gegebene Übertragbarkeit des Bewegungsverhaltens eines Moleküls in einer isotropen Referenzlösung einerseits und einer anisotropen Membran andererseits.

Weitere Einsatzgebiete sind unter anderem die Erfassung des Ausmaßes von Assoziationsreaktionen, von DNA-Interkalation und von DNA-Denaturierung (Übersicht bei [Lakowicz, 1983]).

5.1.3 Aufbau und Eigenschaften von Membranen

Biologische Membranen bestehen aus Lipiden, Proteinen und einem geringen Anteil an Kohlenhydraten. Der Lipidanteil umfasst Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin. Die Phospholipide, die auch Phosphatide genannt werden, unterteilt man in Glycerolphospholipide (Phosphoglyceride) und Sphingophosphoglyceride. Sie unterscheiden sich in ihrer Alkoholkomponente: Glycerol bzw. Sphingosin. Bei den natürlichen Phosphoglyceriden ist das Glycerol meist in Position 1 und 2 mit Fettsäuren verestert und in Position 3 mit Phosphorsäure. Diese Phosphatgruppe ist weiter verestert mit einem Alkohol wie Cholin, Ethanolamin, Serin, Inositol oder Glycerol (Abb. 5.3, links). Phospholipide gehören daher zu den amphiphilen Verbindungen, sie besitzen einen polaren Kopf (Phosphatgruppe mit Alkoholkomponente) und zwei apolare Beine (Fettsäureketten). Aus diesem Grunde werden sie symbolisch dargestellt als Kreis mit zwei Strichen (Abb. 5.3, rechts).

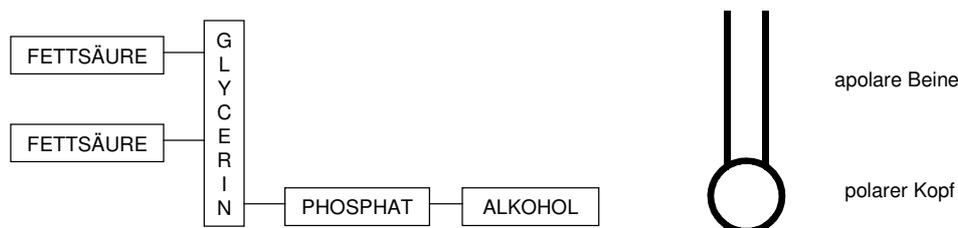


Abb. 5.3: Verschiedene Schreibweisen für Glycerolphospholipide.

Fluoreszenzanisotropie

Die Alkylketten der Fettsäuren können in unterschiedlichen Konformationen vorliegen (Abb. 5.4). In der all-trans-Form (Abb. 5.4, a mitte, b 1) erreicht die Kette ihre maximale Länge und eine minimale Querschnittsfläche. Dies ermöglicht einen extrem hohen Ordnungsgrad. Eine gauche-Konformation (Abb. 5.4, a links und rechts, b 2) führt zu einem Knick in der Kohlenstoffkette, infolge dessen die Länge ab- und die Querschnittsfläche zunimmt. Die Packungsdichte und der Ordnungsgrad werden daraufhin geringer.

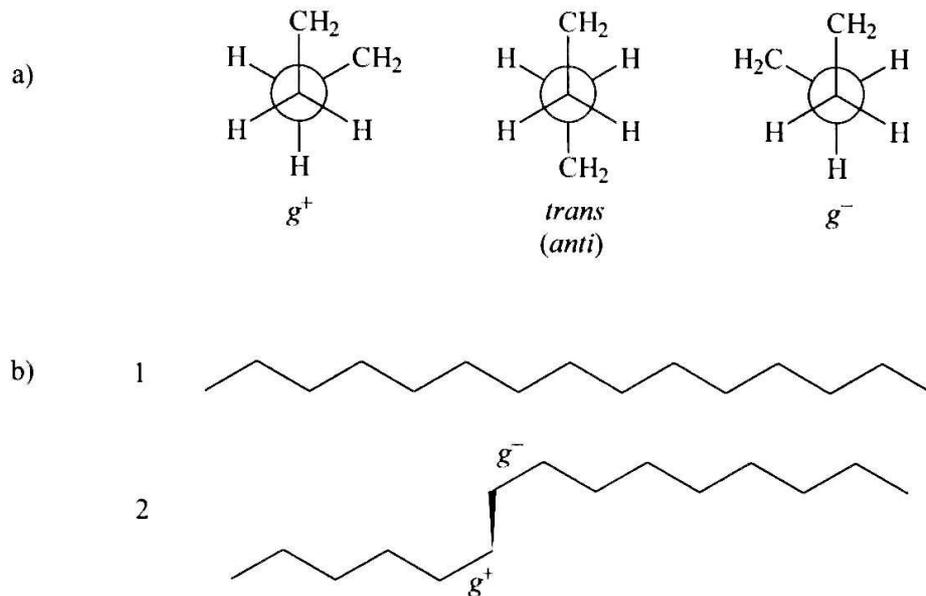


Abb. 5.4: Veranschaulichung der verschiedenen Konformationen von Alkylketten und des jeweiligen Platzbedarfes (aus [Winter und Noll, 1998]).

Die Phosphatide bestimmen den grundlegenden Aufbau von Biomembranen. Sie bilden Doppelschichten. Dabei lagern sich in einer Schicht jeweils die lipophilen Beine so zusammen, dass auch die hydrophilen Köpfe nebeneinander zu liegen kommen. Die Doppelschicht entsteht, indem sich zwei dieser Aggregate so zusammenfinden, dass ihre lipophilen Seiten sich einander zuwenden (Abb. 5.5). Biomembranen sind also nach außen hydrophil, besitzen aber ein hydrophobes Inneres. In diese Phospholipid-Doppelschicht sind je nach Zellart unterschiedliche Mengen an Proteinen und Cholesterol eingelagert. Membranen stellen fluide dynamische Systeme dar, in denen sich sowohl die Phospholipide als auch die Proteine und das Cholesterol relativ gut bewegen können. Die enthaltenen Kohlenhydrate sind an Proteine oder Lipide gebunden. Die Verteilung dieser zusätzlichen Komponenten bewirkt die immer vorhandene Asymmetrie der Membran.

Für physiko-chemische Untersuchungen können Modell-Membranen eingesetzt werden. Der Einfachheit halber werden dazu meist ausschließlich Phospholipide verwendet, eventuell unter Zusatz von Cholesterin. Oft setzt man auch nur ein bestimmtes Phospholipid ein, während native Membranen immer aus verschiedenen Phospholipiden bestehen. In wässriger Lösung lagern sich die Phospholipide wie schon beschrieben zu Doppelschichten aneinander. Bei geeigneter Wahl der Konzentration entstehen dabei geschlossene Vesikel, sogenannte Liposomen. Diese können je nach Herstellungsart uni- oder multilamellar sein, also aus einer oder mehreren umeinander liegenden Doppelschichten bestehen.

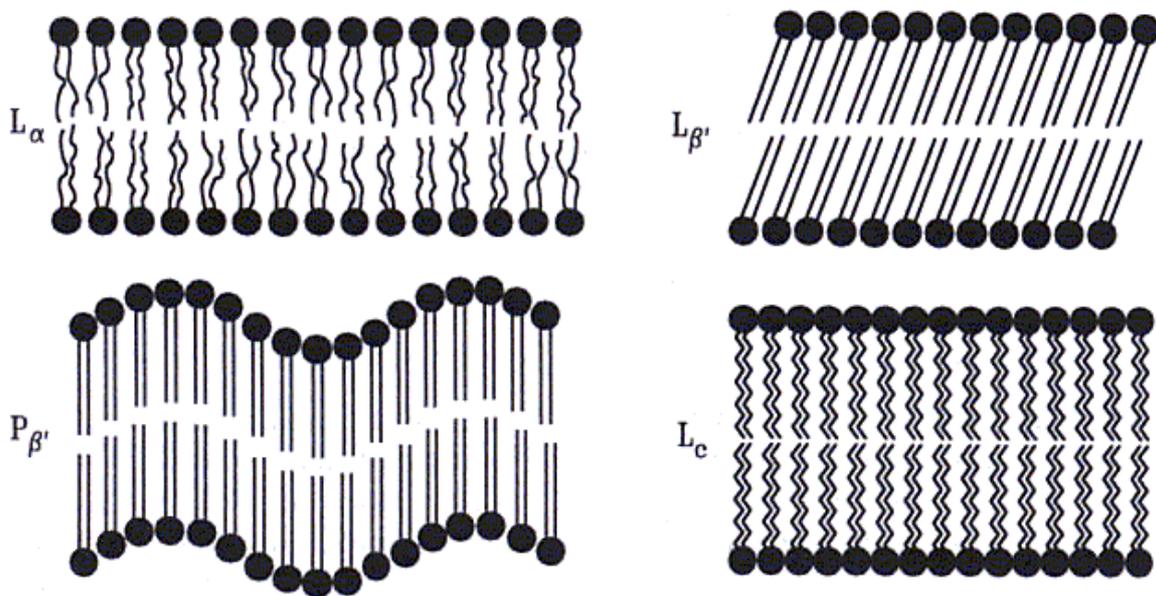


Abb. 5.5: Verschiedene Anordnungen der Phospholipide in verdünnter wässriger Dispersion (aus [Winter und Noll, 1998]).

Phospholipide zeigen einen lyotropen Polymorphismus, wenn sie in kleinen Konzentrationen in einer wässrigen Phase dispergiert werden. Das bedeutet, sie können eine Reihe unterschiedlicher Strukturen annehmen. Diese sind in Abbildung 5.5 zusammengestellt. Im Falle von höheren Gewichtsanteilen an Phospholipiden existieren noch einige weitere Strukturen, auf die hier aber nicht genauer eingegangen werden soll. Bei längerer Verweildauer bei Temperaturen unter 18°C gehen die Phospholipide in die kristalline Sub-Gel-Phase L_c über. Sie zeichnet sich durch einen hohen Ordnungsgrad und eine stark eingeschränkte Beweglichkeit der Fettsäureketten aus. Bei Erhöhung der Temperatur entstehen nacheinander die zwei Gelphasen L_β' und dann P_β' . Auch in diesen Phasen sind die Alkylketten aufgrund ihrer langgestreckten all-trans-Konformation noch sehr geordnet

Fluoreszenzanisotropie

ausgerichtet. Die L_{β} -Phase zeichnet sich durch eine schräge Anordnung der Fettsäureketten in einem Winkel von ca. 60° zur Membranoberfläche aus, die P_{β} -Phase durch gerade Alkylketten, aber eine gewellte Anordnung der gesamten Doppelschicht. Bei weiterer Erwärmung zeigt sich ein Phasenübergang von dem geordneten, gelartigen in einen flüssig-kristallinen Zustand L_{α} . Der Grad der Ordnung der Fettsäurereste der Phospholipide ist hier wesentlich geringer, was auf die Bildung von gauche-Isomeren der Fettsäuren zurückzuführen ist. Aufgrund dieser gauche-Isomere ist die Kettenlänge der Fettsäuren verkürzt und die Doppelschicht besitzt deswegen in diesem Zustand eine geringere Dicke. Man spricht bei diesem Übergang von einem Schmelzen der Alkylketten [Winter und Noll, 1998]. Dieser Vorgang findet meist in einem sehr kleinen Temperaturintervall statt. Man kann eine sogenannte Schmelztemperatur für diesen Phasenübergang bestimmen. Sie ist fast ausschließlich abhängig von den Fettsäureresten, die hydrophilen Anteile der Phospholipide haben kaum einen Einfluss. Mit zunehmender Kettenlänge der Alkylreste steigt der Schmelzpunkt, mit zunehmendem ungesättigten Charakter der Fettsäuren wird er kleiner [Lentz et al., 1976].

Auch die Menge des in der Membran enthaltenen Cholesterols (Abb. 5.6) beeinflusst deren Eigenschaften. Die schwach hydrophile Hydroxylgruppe des Cholesterols befindet sich vermutlich in der Nähe der polaren Phospholipid-Kopfgruppen, während das Steroidgerüst tief zwischen die hydrophoben Alkylketten eindringt [Gliss et al., 1999]. Verschiedene Arbeitsgruppen haben unabhängig voneinander nachgewiesen, dass die Mikroviskosität von Membranen mit steigendem Cholesterolgehalt wächst [Cogan et al., 1973; Vanderkooi et al., 1974; Shinitzky und Inbar, 1974; Cooper et al., 1978]. Dies gilt sowohl für natürliche als auch für künstliche Phospholipid-Doppelschichten. Untersuchungen mithilfe der Fluoreszenzsonde 12-(9-Anthroyl)stearinsäure lassen vermuten, dass das Cholesterol die Rotationsmöglichkeiten des Markers beschränkt, denn die Rotationskorrelationszeit der Verbindung nahm mit steigendem Cholesterolanteil zu [Vanderkooi et al., 1974]. Experimente mit Perylen zeigten bereits zuvor, dass in Anwesenheit von Cholesterol das Ausmaß von out-of-plane-Rotationen erhöht und das von in-plane-Rotationen erniedrigt wird. Diese Tatsache könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Kohlenwasserstoffketten durch Cholesterol auch bei höheren Temperaturen in einen 90° -Winkel zur Membranoberfläche gezwungen werden [Cogan et al., 1973]. Dies ist auch der Grund dafür, dass Cholesterol auf die ungeordnete L_{α} -Phase einen größeren Einfluss hat als auf die Gelphasen, in denen die Fettsäuren bereits in all-trans-Konfiguration und geordnet vorliegen [Vist und Davis, 1990]. Das Cholesterol erhöht die Packungsdichte der Alkylketten und senkt damit das in der Membran vorhandene freie Volumen [Almeida et al., 1992].

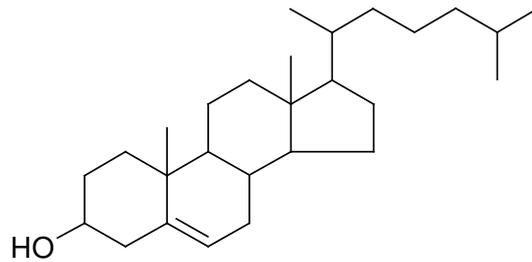


Abb. 5.6: Struktur des Steroidalkohols Cholesterol.

Eine andere Arbeitsgruppe stellte unter Verwendung der Fluoreszenzsonde DPH (Diphenylhexatrien, siehe Kap. 5.1.4) fest, dass die Mikroviskosität der Membran nur bis zu einem Phospholipid-Cholesterol-Verhältnis von 2,0 ansteigt. Es wurde daraufhin eine Art 1:1-Komplex des Cholesterols mit den Fettsäureketten postuliert, und dass sich bei weiterer Erhöhung des Cholesterolgehaltes Cholesterolinseln bilden, die entweder die Fluidität (Kehrwert der Viskosität) nicht beeinflussen, oder in die DPH nicht hineinwandert [Cooper et al., 1978]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Anwesenheit von Cholesterol scheinbar den Ordnungsgrad der Membran erhöht, indem es die Alkylketten in eine möglichst gestreckte Form mit einem geringen Anteil von gauche-Konformationen zwingt. Als ein weiterer Effekt dieser Wirkung wird die Membran vermutlich dicker [Sassaroli et al., 1995].

Die Anwesenheit von Cholesterol erzeugt ab einer Konzentration von etwa 30 mol-% eine neue Phase der Phospholipide. Diese zeichnet sich durch relativ hohe Fluidität bei gleichzeitigem hohem Ordnungszustand der Alkylketten aus und wird daher als β - oder L_o -Phase bezeichnet [Vist und Davis, 1990; Almeida et al., 1992; Gliss et al., 1999]. Das L_o steht für „liquid-ordered“, im Gegensatz zu L_d für „liquid-disordered“. Die L_d -Phase entspricht der oben erwähnten L_α -Phase für reine Phospholipide. Man spricht von einem fluiden Zustand, wenn eine schnelle axiale symmetrische Bewegung der Phospholipide möglich ist und deren laterale Diffusionsraten ähnliche Werte wie in der L_α -Phase aufweisen [Vist und Davis, 1990]. Die L_o - und die L_d -Phase können in Abhängigkeit von der Temperatur und des Cholesterolgehaltes (siehe Phasendiagramm [Almeida et al., 1992]) nebeneinander existieren. Die Plasmamembranen von Säugetierzellen enthalten in der Regel zwischen 25 mol-% und 35 mol-% Cholesterol. Bei physiologischen Temperaturen von ungefähr 37 °C ist eine Koexistenz der beiden L-Phasen durchaus vorstellbar [Almeida et al., 1992]. Der L_o -Zustand ist eher bei höheren Cholesterolanteilen in der Membran anzutreffen, die L_d -Phase bei niedrigeren Anteilen. Erhöht man ausgehend vom L_d -Zustand nach und nach den Cholesterolgehalt, so ändert sich der Diffusionskoeffizient der Phospholipide als Maß ihrer lateralen Beweglichkeit zunächst nicht. Dies könnte zwei Gründe haben: Entweder das Cholesterol besetzt zu Beginn nur kleine freie

Fluoreszenzanisotropie

Volumina, die aufgrund ihrer mangelnden Größe von den Phosphatiden nicht genutzt werden können. Dafür spricht, dass sich der Diffusionskoeffizient des Steroidalkohols mit zunehmender Einlagerung verringert. Oder das Cholesterol befindet sich nicht nur in einer der beiden miteinander assoziierten Monolayer, sondern ordnet sich in der Membran so an, dass es in beide Monolayer eindringt. Diese Theorie lässt sich unterstützen durch den Befund, dass sich die Verteilung des freien Volumens durch Erhöhung des Cholesterolanteils nicht verändert, denn das Volumen, das auf der einen Seite der Doppelschicht vom Cholesterol besetzt wird, wird auf der anderen Seite neu geschaffen [Almeida et al., 1992]. Eine weitere Bestätigung dieser zweiten Theorie liegt eventuell in den Ergebnissen von Gliss et al., die besonders bei höheren Temperaturen ein so hohes Ausmaß an Cholesterolbewegungen parallel zur Membrannormalen fanden, dass die einzig mögliche Erklärung ein Überwechseln zwischen den beiden Monolayern sein konnte [Gliss et al., 1999]. Bei weiterer Zugabe von Cholesterol sinkt schließlich der Diffusionskoeffizient der Phospholipide, was den Phasenübergang von L_d zu L_o signalisiert.

Man hat festgestellt, dass viele Erkrankungen mit Fluiditätsveränderungen von Zellmembranen einhergehen [Okano et al., 1979; Shinitzky und Inbar, 1974; Shinitzky und Barenholz, zitierte Literatur, 1978; Nairn und Rolland, zitierte Literatur, 1980]. Für Lymphozyten ist beispielsweise herausgefunden worden, dass maligne Lymphomzellen wesentlich weniger Cholesterol in ihrer Membran enthalten als gesunde Zellen, und demnach eine geringere Mikroviskosität aufweisen [Shinitzky und Inbar, 1974]. Vermutlich kann man die Malignität der Lymphomzellen durch Erhöhung des Cholesterolgehaltes der Membran reduzieren [Shinitzky und Inbar, zitierte Literatur, 1974]. Aus diesem Grunde hat die Technik der Fluoreszenz-polarisation auch eine hohe klinische Relevanz.

5.1.4 Diphenylhexatrien

Im Rahmen des Überganges von der gelartigen P_{β} -Phase in die flüssig-kristalline L_{α} -Phase kommt es wie beschrieben zu einer Umorientierung der Alkylketten der Phospholipide in einen Zustand geringerer Ordnung. Damit ist eine drastische Abnahme der Mikroviskosität verbunden, die mithilfe geeigneter Fluoreszenzsonden durch Anisotropie-Messungen verfolgt werden kann.

Die Substanz, die für Anisotropie-Experimente an Membranen am häufigsten verwendet wird, ist das 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) (Abb. 5.7), das erstmals 1974 von Shinitzky und Barenholz zur Untersuchung verschiedener Liposomen

eingesetzt wurde [Shinitzky und Barenholz, 1974]. Es vereint eine ganze Reihe vorteilhafter Eigenschaften in sich. DPH ist relativ lipophil und kann tief zwischen die lipophilen Reste der einzelnen Phospholipidmoleküle eingelagert werden [Kaiser und London, 1998]. Es besitzt einen großen Absorptionskoeffizienten und eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute, was das Arbeiten mit sehr kleinen Konzentrationen ermöglicht. Weiterhin zeigt DPH fast identisches optisches Verhalten in verschiedenen Umgebungen, das heißt, die Lage seiner Anregungs- und Emissionsmaxima ändert sich kaum, ebenso wie seine maximale Anisotropie. Seine depolarisierenden Rotationsbewegungen sind isotropisch, also in alle Richtungen gleichermaßen ausgeprägt. Die Rotation um die Längsachse des Moleküls verläuft zwar wesentlich schneller als die übrigen Rotationsbewegungen, aber da sich die Richtung des Übergangsdipolmomentes dabei nicht verändert, hat diese Drehung keinen Einfluss auf die Depolarisation.

Das DPH ist zudem wie kein anderer Fluoreszenzmarker in der Lage, Viskositätsänderungen in Membranen aufzuzeigen. Auch bei Verwendung anderer Sonden sinkt die Anisotropie beim Übergang in den flüssig-kristallinen Zustand, aber bei keiner anderen Verbindung geschieht das in dem Ausmaße wie beim DPH [Shinitzky und Barenholz, 1974; Lakowicz, 1983]. Mittlerweile wurde gezeigt, dass die erhöhte Mikroviskosität in Gegenwart von Cholesterol nicht auf eine veränderte Lokalisation des DPH zurückzuführen ist, sondern tatsächlich auf eine Veränderung der Beweglichkeit [Kaiser und London, 1998].

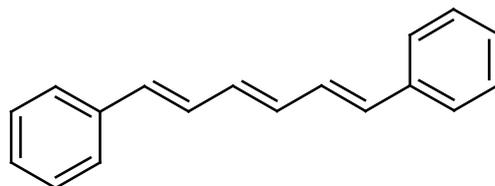


Abb. 5.7: Struktur des Diphenylhexatriens.

Das DPH ist so lipophil, dass es sich nicht nur in den Fettsäureketten der Phospholipide löst, sondern die Doppelschicht sogar durchdringt und sich in vielen lipophilen Kompartimenten wiederfindet [Collard und De Wildt, 1978]. Bei der Untersuchung kompletter Zellen kann diese Eigenschaft zu Problemen führen, da das Fluoreszenzsignal des DPH dann nicht nur die Mikroviskosität der Zellmembran widerspiegelt, sondern das Mittel aller hydrophoben Bereiche. Ein weiterer Nachteil des DPH ist seine reversible trans-cis-Photoisomerisierung bei übermäßiger Bestrahlung, in deren Folge die Fluoreszenzintensität sinkt [Shinitzky und Barenholz, 1974].

5.2 Durchführung der Experimente

5.2.1 Material und Geräte

DPPC, Nr. P-0763	Sigma
DPH, Nr. 43050	Fluka
Cholesterol, Nr. 26740	Fluka
Ultraschallbad Sonorex RK 514	Bandelin
Luminescence Spectrometer LS 50 B	Perkin Elmer
Digitalthermometer Digttemp D 2000	TFA
Umwälzthermostat F20-C	julabo
Fluorescence Data Manager	Perkin Elmer
SigmaPlot™ 5.0	SPSS Inc.

Alle weiteren verwendeten Chemikalien besaßen mindestens p.a.-Qualität und wurden von Merck oder Fluka bezogen.

5.2.2 Herstellung der Untersuchungslösungen

Herstellung der Liposomen

Als Modell von Biomembranen wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Liposomen aus dem Phospholipid L_{α} -Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) eingesetzt. Bei der Herstellung der Liposomen wurde die sogenannte Filmmethode angewendet, bei der sich spontan große multilamellare Vesikel bilden [Junginger et al., 1991]. Mithilfe von Ultraschall wurden diese dann in kleine unilamellare Liposomen umgewandelt [Junginger et al., 1991; Rubas und Schreier, 1991].

Es wurde eine 1 mM Stammlösung des DPPC in Chloroform hergestellt, die im Gefrierschrank sechs bis acht Wochen haltbar war. Zur Herstellung der Liposomen wurde ein Teil dieser Stammlösung in einen Rundkolben pipettiert und das Chloroform mithilfe von Stickstoff verdampft. Um diesen Vorgang nicht durch die entstehende Verdunstungskälte zu verlangsamen, wurde der Kolben dabei in ein Gefäß mit Wasser eingetaucht. So entstand ein dünner Film des DPPC an der Kolbenwand. Anschließend wurde Sörensen Phosphatpuffer pH 7,4 zugegeben, so dass eine Phospholipidkonzentration von 200 μ M vorlag. Zur Bildung einer möglichst klaren Liposomensuspension mit unilamellaren Vesikeln wurde der Kolben für 30 Minuten in ein Ultraschallbad eingebracht.

Es wurden zwei verschiedene Chargen von Liposomen für die folgenden Untersuchungen verwendet. Zum einen erfolgte die Herstellung nach der gängigen Konventionmethode bei einer Temperatur oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Phospholipids [Jacobson und Papahadjopoulos, 1975; Ortiz et al., 1988], in diesem Falle bei $45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (Methode 1). Für die anderen Ansätze wurde das Ultraschallbad ohne Thermostatisierung betrieben (Methode 2). Während der 30 Minuten erhitze sich das Wasser von Raumtemperatur auf ca. 30 °C .

Die Liposomen wurden nur am Tag ihrer Herstellung verwendet.

Charakterisierung der Liposomensuspensionen

Da die Liposomenherstellung mittels der Filmmethode unterhalb der Phasenübergangstemperatur in der Literatur kaum beschrieben ist, wurden beide Ansätze transmissionselektronenmikroskopisch nach Kryofixierung und Gefrierbruch-Replika-Herstellung untersucht, um die beiden Suspensionen zu vergleichen. Die Untersuchung erfolgte durch die Zentrale Mikroskopie der Universität Kiel.

Die Liposomensuspensionen wurden in einem Goldnetz von $8\text{ }\mu\text{m}$ Dicke zwischen zwei Probenträgern aus Kupfer (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) in schmelzendem Propan (ca. -185 °C) so schnell eingefroren, dass eine Entmischung der Proben ausgeschlossen werden kann. Die weitere Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff, bis die Proben in eine vorgekühlte Gefrierätzanlage (BAF 3000, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) überführt wurden. Hier erfolgte bei einer Temperatur von -110 °C unter Hochvakuum (ca. 10^{-7} mbar) der Gefrierbruch und die Herstellung der Replika. Die durch Auseinanderbrechen des Probensandwiches entstandenen Bruchflächen wurden zunächst zur Kontrastgebung aus einem Winkel von 45° mit ca. 2 nm Platin/Kohle und anschließend zur Stabilisierung aus einem Winkel von 90° mit Kohle allein bedampft. Die Proben wurden dann der Gefrierätzanlage entnommen und die erzeugte Replika auf Wasser vorsichtig abfloatiert, gereinigt, getrocknet und der Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM CM 10, Philips, Eindhoven, Niederlande) zugeführt. Von beiden Proben wurden mehrere Bilder aufgenommen (Film Kodak 4489).

Zusätzlich wurde die Liposomensuspension nach Methode 2 einmal auf die gleiche Weise erhitzt, wie während der Aufnahme der Schmelzkurven (siehe Kapitel 5.2.3) und anschließend ebenfalls elektronenmikroskopisch untersucht.

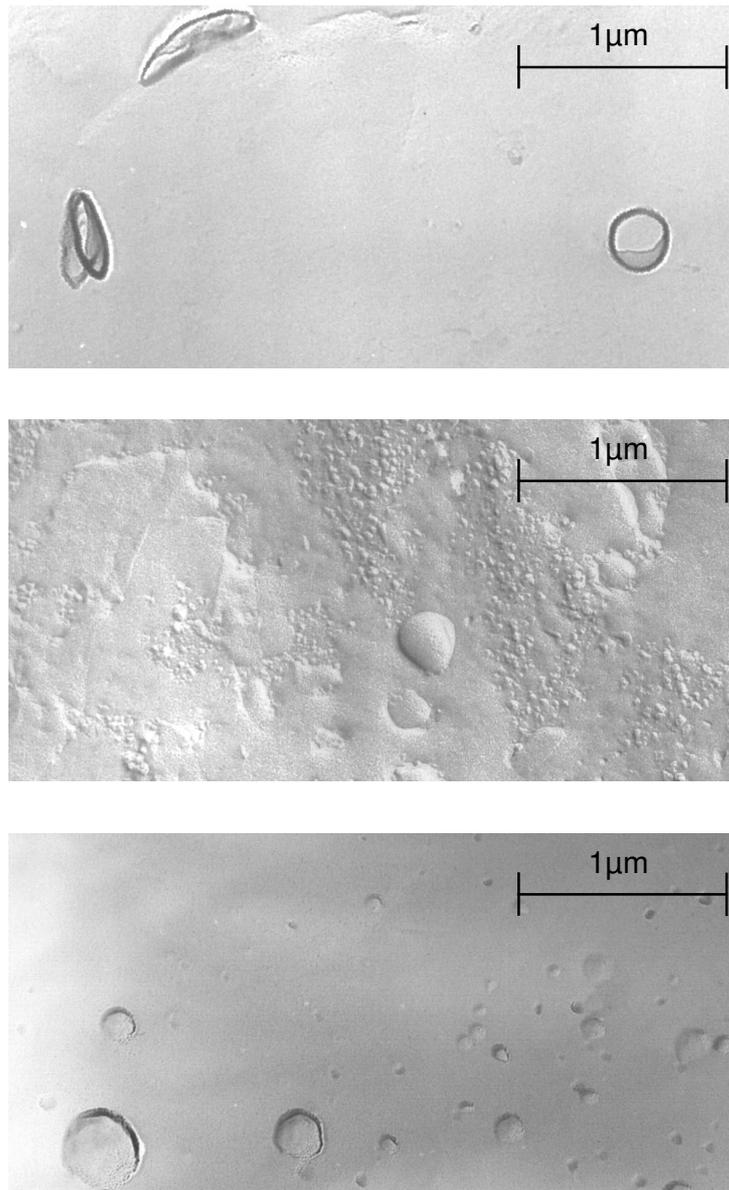


Abb. 5.8: Übersicht der drei verschiedenen Liposomenproben; oben: frisch hergestellte Liposomen nach Methode 2, mitte: Liposomen nach Methode 2 nach Erhitzen, unten: frisch hergestellte Liposomen nach Methode 1.

Die Abbildung 5.8 zeigt repräsentative Übersichtsbilder der drei Proben. Die Liposomendichte in den Proben ist aufgrund der geringen Lipidkonzentration von $200 \mu\text{M}$ sehr gering, so dass es nicht möglich ist, anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen genaue Rückschlüsse auf die Teilchengrößenverteilung zu ziehen. Der Durchmesser der Liposomen variiert jeweils zwischen ca. 100 nm bis 1000 nm , wobei solche ganz großen Partikel die Ausnahme sind. In der Liposomensuspension, die bei Raumtemperatur erzeugt wurde, finden sich neben runden Vesikeln auch noch längliche (Abb. 5.8 oben) und weiterhin

lamellare Strukturen (Abb. 5.9), in denen mehrere Lagen von Phospholipid-Doppelschichten übereinander liegen.

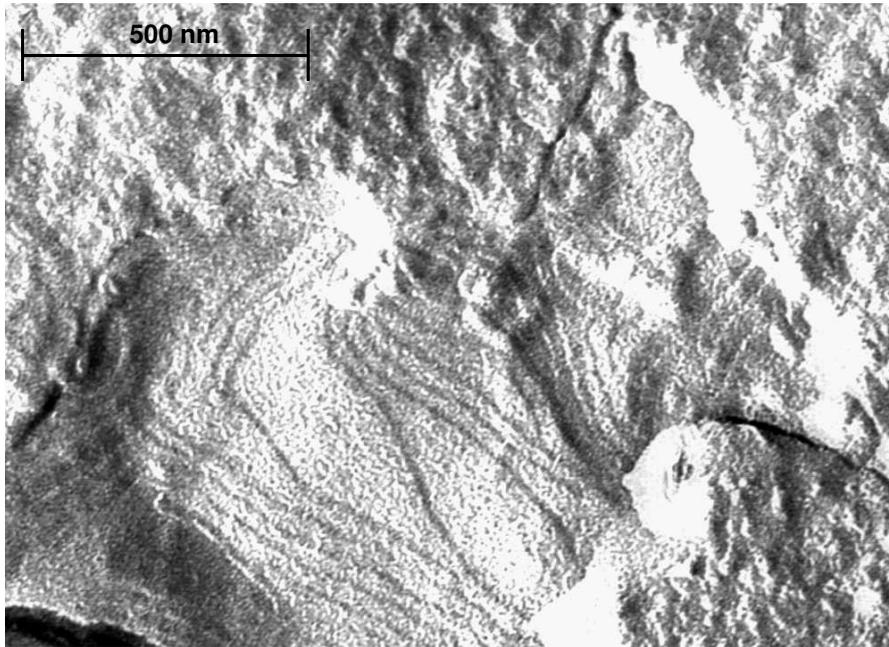


Abb. 5.9 Lamellare Strukturen bei Liposomen nach Methode 2.

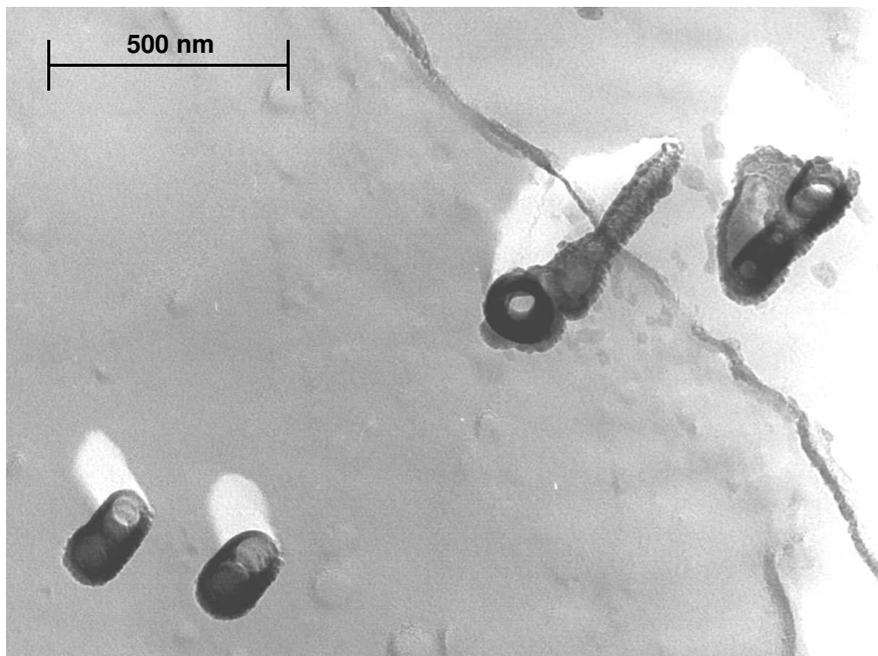


Abb. 5.10: Tubuläre Strukturen bei Liposomen nach Methode 1.

Beide Elemente sind in der konventionell, also oberhalb der Phasenübergangstemperatur hergestellten Suspension nicht zu entdecken (Abb. 5.8 unten), allerdings existieren hier tubuläre Strukturen (Abb. 5.10). Vermutlich sind die

Fluoreszenzanisotropie

vorhandenen Vesikel in beiden Proben unilamellar, da sich auf keinem der Bilder etwas Gegenteiliges entdecken lässt.

Nach Erhitzen zeigt die Liposomensuspension nach Methode 2 weniger scharf abgegrenzte Vesikel als zuvor (Abb. 5.8 mitte, Abb. 5.11). Das ist ein Zeichen dafür, dass die entstandenen Vesikel vermutlich nicht allzu stabil sind und zumindest beim Erwärmen zum Zerfließen neigen.

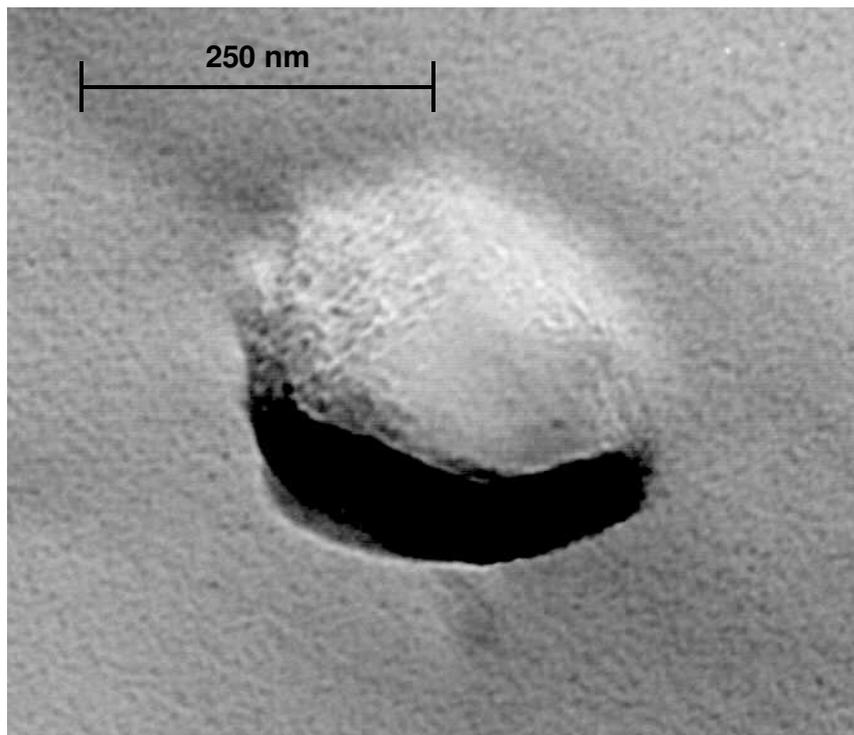


Abb. 5.11: Zerfließendes Liposom nach Erhitzen bei Liposomen nach Methode 2.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass beide Suspensionen nicht dem Idealbild von Liposomen entsprechen, wobei die oberhalb der Phasenübergangstemperatur hergestellte Suspension weniger weit von diesem Bild entfernt ist. Als ein einfaches Membran-Modell, das Lipid-Doppelschichten in annähernd runden Vesikeln enthält, sollten allerdings beide Liposomensuspensionen dienen können.

Herstellung der Substanzlösungen

Als Lösungsmittel für die Curcuminoide und auch für das DPH sollte zum einen DMSO verwendet werden, da dieses auch in den Patch-clamp-Untersuchungen zum Einsatz kam. Auf der anderen Seite ist bekannt, dass DMSO selbst bereits über membranverändernde Eigenschaften verfügt (Übersicht bei [Wu und Quinn, 1998]).

Es erhöht beispielsweise die Phasenübergangstemperatur der Phospholipide [Gordeliy et al., 1998]. Daher wurde THF als ein zweites Lösungsmittel gewählt, um den Lösungsmiteleinfluss zu untersuchen.

Von den Curcuminoiden und der Fluoreszenzsonde DPH wurden Stammlösungen einer Konzentration von 2 mM in DMSO oder THF hergestellt, die im Kühlschrank gelagert und maximal eine Woche verwendet wurden. Die Lösungen wurden noch einmal mit den gleichen Lösungsmitteln verdünnt und dann zu der Liposomensuspension pipettiert, so dass sich in der Küvette jeweils eine Endkonzentration von 2 μ M ergab. Einige Experimente wurden unter Zusatz von DPH und einem Curcuminoid durchgeführt, einige nur mit einer Substanz. Um bei allen Untersuchungen den gleichen Lösungsmittelanteil von 4% zu erreichen, wurde in letzterem Fall noch einmal das gleiche Volumen an reinem Lösungsmittel zugesetzt.

Um den Einfluss des Lösungsmittels zu überprüfen, wurden die zu testenden Substanzen auch ohne Lösungsvermittler direkt bei der Liposomenherstellung zugesetzt. Dafür wurden von den Curcuminoiden und dem DPH Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mM in Chloroform hergestellt, die ebenfalls maximal eine Woche im Kühlschrank haltbar waren. Nach einem weiteren Verdünnungsschritt mit Chloroform wurde die Lösung mit der DPPC-Stammlösung zusammen in einen Rundkolben gegeben. Die Präparation der Liposomen erfolgte dann wie oben beschrieben. Der Lösungsmittelanteil betrug hier 0%, die Substanzkonzentration jeweils 2 μ M.

Die verdünnten Substanzlösungen wurden am Ende eines jeden Tages verworfen.

5.2.3 Aufnahme der Schmelzkurven

Vor Beginn der Experimente wurde die Liposomensuspension mit dem jeweiligen Lösungsmittelzusatz fluorimetrisch untersucht. Dabei konnte für keine der Mischungen Eigenfluoreszenz nachgewiesen werden.

Nach Zugabe der Substanzlösungen (sofern notwendig) direkt in die Küvette wurde die Liposomensuspension im Fluorimeter von Raumtemperatur auf ca. 10°C heruntergekühlt, was etwa 30 Minuten in Anspruch nahm. Diese Zeit sollte auch genügen, um die Einlagerung der Substanzen zwischen die Phospholipide zu ermöglichen. Da DPH in wässrigen Umgebungen so gut wie keine Fluoreszenz zeigt,

Fluoreszenzanisotropie

untersuchten Lentz et al. anhand der Steigerung der Fluoreszenzintensität des DPH die Zeit- und Temperaturabhängigkeit seiner Einlagerung in kleine unilamellare DPPC-Liposomen. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Vorgang bei Temperaturen unter 9°C sehr langsam verläuft und auch nach über 200 Minuten die maximale Fluoreszenzintensität bei weitem nicht erreicht war. Bereits bei 21,1°C verläuft die beschriebene Kurve wesentlich steiler und erreicht innerhalb von 30 Minuten ca. 80% der maximalen Fluoreszenz [Lentz et al., 1976]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass trotz des Abkühlungsvorganges in dieser Zeit eine ausreichende Menge DPH in die Liposomen eingelagert wird. Ein weiterer Beweis dafür ist die nach dem Abkühlen gemessene hohe Fluoreszenzintensität. Aufgrund ähnlicher Struktur und der ebenfalls recht hohen Lipophilie der Curcuminoide wurde vorausgesetzt, dass deren Einlagerung in einem ähnlichen Zeitrahmen verläuft. Die Temperatur wurde mit einem Digitalthermometer in einer nur mit Phosphatpuffer gefüllten Referenzküvette gemessen, um Störungen im Strahlengang der Messküvette zu vermeiden. Beide Küvetten befanden sich nebeneinander in einem temperierbaren Küvettenhalter.

Nach Erreichen der gewünschten Temperatur wurden Anregungs- und Emissionsspektren aufgenommen, um die Fluoreszenzintensität zu überprüfen und die Maxima zu bestimmen. Im Falle der gleichzeitigen Anwesenheit eines Curcuminoids und des DPH wurde das Verhalten beider Substanzen untersucht. Zur Festlegung der Anregungs- und Emissionsmaxima wurde darauf geachtet, dass stets nur eine einzige Substanz in der Liposomensuspension vorhanden war, um jegliche Beeinflussung zu umgehen. Auch wurden diese Werte für jedes der verwendeten Lösungsmittel erneut bestimmt. Eine Ausnahme stellte das DPH dar, hier wurde unabhängig vom Lösungsmittel auf in Ethanol und Aceton ermittelte Werte zurückgegriffen. Danach beträgt die Wellenlänge des Anregungsmaximums $\lambda_{\text{Ex}} = 366 \text{ nm}$ und die des Emissionsmaximums $\lambda_{\text{Em}} = 428 \text{ nm}$ [Kruse, 2003].

Die Kenntnis dieser Werte ist deswegen so wichtig, weil bei diesen Wellenlängen die maximale Fluoreszenzintensität erreicht wird. Aufgrund der bei der Messung der Anisotropie verwendeten Polarisatoren sinkt die Intensität des Anregungslichtes und damit zwangsläufig auch die Intensität des Emissionslichtes, die für sichere Messungen eventuell sogar zu klein wird. Die Verwendung der optimalen Wellenlängen lässt dieses Problem seltener auftreten.

Anschließend wurde die Suspension bei einer Aufheizrate von ca. 2°C bis 3°C pro Minute auf ca. 55°C gebracht. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen die gemessene Fluoreszenzanisotropie und die während der Messung vorherrschende Temperatur notiert. Diese große Anzahl von Messpunkten wurde dann mit

SigmaPlot™ graphisch dargestellt. Sofern diese Graphen annähernd die typische sigmoidale Form aufwiesen, wurde an die Messpunkte eine sigmoidale Kurve angepasst, unter Berücksichtigung einer mit steigender Temperatur linear abnehmenden Anisotropie-Drift. Die Regressionskurve gehorchte folgender Gleichung:

$$r = r_0 + \frac{a}{1 + e^{\frac{-(T-T_m)}{b}}} - c \times T$$

Dabei stellt r die Anisotropie dar, r_0 den oberen Grenzwert der Anisotropie, T die Temperatur und T_m den Schmelzpunkt. Die Größe b ist ein Maß für die Breite der Schmelzstufe, a für die Höhe und c für die Drift.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Lösungsmiteleinfluss

Wie bereits in Kapitel 5.2.2 beschrieben, sollte der Einfluss der beiden Lösungsmittel DMSO und THF im Vergleich zu dem lösungsmittelfreien Ansatz untersucht werden. Dazu wurden Schmelzkurven der DPPC-Liposomen mit DPH als Fluoreszenzsonde aufgenommen. Die Abbildungen 5.12 und 5.13 zeigen die typischen Schmelzkurven von Phospholipiden. Gemäß der schon erwähnten Membranwirkungen des DMSO wurde erwartet, dass sich dessen Kurve deutlich von der ohne Lösungsmittel unterscheidet. Erstaunlicherweise verlaufen diese beiden Graphen zumindest bezüglich der Phasenübergangstemperatur fast identisch bei beiden Suspensionen. Der Schmelzpunkt von Phospholipid-Doppelschichten steigt in der Regel durch DMSO-Zugabe an [Gordeliy et al., 1998]. Dabei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass die DMSO-Konzentration mit 4% relativ gering ist.

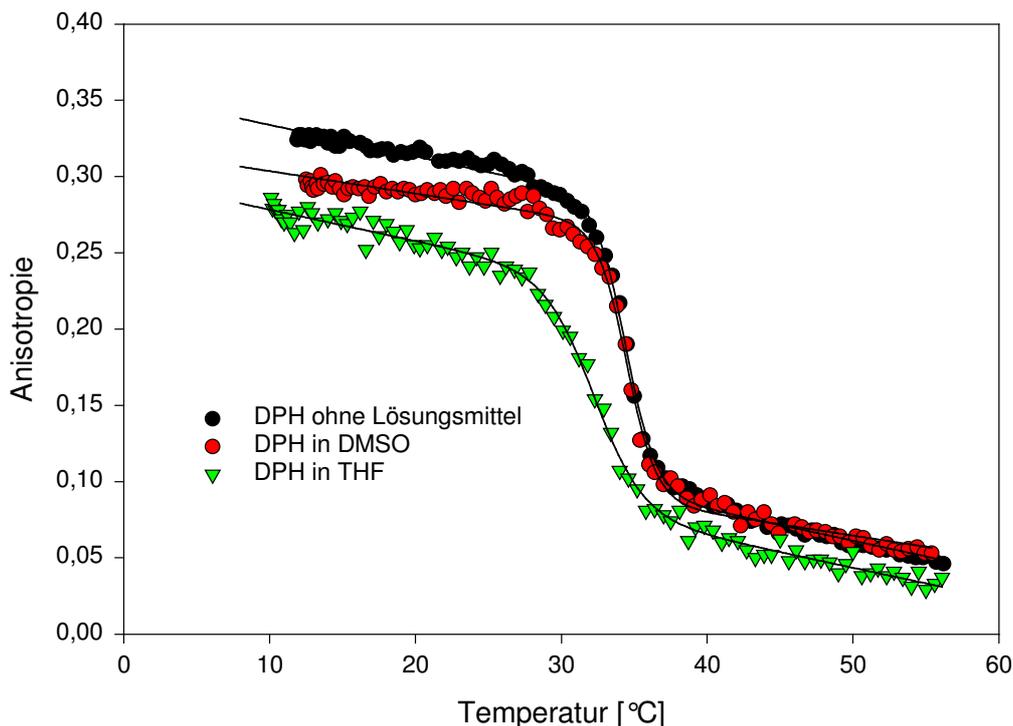


Abb. 5.12: Schmelzkurven von DPPC-Liposomen mit DPH als Fluoreszenzsonde (verschiedene Lösungsmittel, Methode 1).

Bei den Liposomen nach Methode 1 zeigt auch die Verwendung von THF keine deutlichen Unterschiede zwischen den Schmelzkurven (Abb. 5.12, Tab. 5.1). Die Verschiebung zu einer leicht kleineren Schmelztemperatur liegt im Rahmen der

Messungenauigkeit, die dadurch entsteht, dass die Temperatur nicht in der Messküvette bestimmt wird, sondern in einer zweiten Küvette, die zudem ein größeres Füllvolumen aufweist. Bei hohen Aufheizraten sind Temperaturdifferenzen zwischen den beiden Küvetten vorstellbar. Der auffällig flachere Verlauf der THF-Kurve ist ein häufig auftretendes Phänomen bei den Liposomen nach Methode 1 und wird noch erläutert werden. In Tabelle 5.1 sind die per Regression ermittelten Schmelzpunkte bei Verwendung von DPH als Fluoreszenzsonde für beide Suspensionen und alle Lösungsmittel zusammengefasst.

	ohne Lösungsmittel	DMSO	THF
Methode 1	34,4 °C	34,5 °C	32,2 °C
Methode 2	40,1 °C	38,5 °C	31,7 °C

Tab. 5.1: Ermittelte Schmelzpunkte der DPPC-Liposomen mit DPH als Fluoreszenzmarker bei Einsatz verschiedener Lösungsmittel.

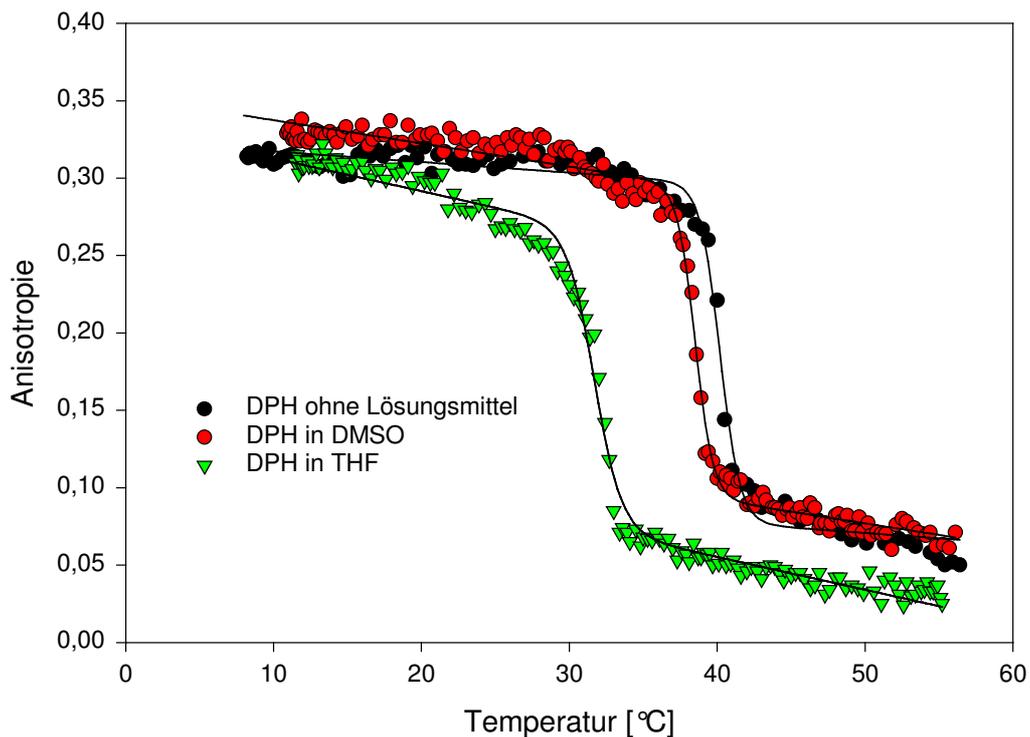


Abb. 5.13: Schmelzkurven von DPPC-Liposomen mit DPH als Fluoreszenzsonde (verschiedene Lösungsmittel, Methode 2).

Bei Methode 2 hingegen findet der Phasenübergang des DPPC bei Verwendung von THF im Vergleich zu den beiden anderen Kurven bereits bei deutlich kleineren Temperaturen statt (Abb. 5.13). Aufgrund dieses überraschenden Ergebnisses wurde in der Literatur nach Hinweisen auf eine bekannte membranbeeinflussende Wirkung des THF gesucht, allerdings erfolglos. Da diese extreme Verschiebung des

Fluoreszenzanisotropie

Phasenüberganges zu kleineren Temperaturen unter Verwendung von THF nur bei Liposomen nach Methode 2 zu beobachten ist, liegt die Vermutung nahe, dass der Herstellungsprozess eine Rolle spielt. Betrachtet man die Schmelztemperaturen der lösungsmittelfreien Ansätze, so lässt sich feststellen, dass die Liposomen nach Methode 2 mit 40,1°C im Bereich des Phasenüberganges von multilamellaren DPPC-Liposomen liegen [Suurkuusk et al., 1976; Lentz et al., 1978], obwohl in den Gefrierbruch-Aufnahmen nichts darauf hindeutet. Die Phasenübergangstemperatur bei Liposomen nach Methode 1 ist mit 34,4°C erstaunlich niedrig, denn für kleine unilamellare DPPC-Liposomen findet man einen Literaturwert von ca. 37°C [Suurkuusk et al., 1976].

Aufgrund dieser schwer interpretierbaren Ergebnisse wurden alle Experimente jeweils mit den beiden unterschiedlich hergestellten Liposomensuspensionen und auch unter Einsatz der drei verschiedenen Lösungsmittel durchgeführt. Dadurch sollten weitere Erkenntnisse über den Einfluss des THF und der Herstellungsart der Phospholipidvesikel gewonnen und Fehlinterpretationen aufgrund dieser Einflüsse vermieden werden.

5.3.2 Curcuminoide als Fluoreszenzsonde

Vergleicht man die Strukturen der Curcuminoide mit der des DPH, dann drängt sich die Vermutung auf, dass auch **Curcumin** und seine Derivate als Fluoreszenzsonden einsetzbar sind und ihre eventuelle membranverändernde Wirkung quasi selbst zu detektieren vermögen. Daher wurde in ersten Experimenten versucht, den Phasenübergang des DPPC mithilfe der Curcuminoide zu verfolgen. Die folgenden Abbildungen enthalten zusätzlich zu den Datenpunkten der Curcumin-Derivate die des DPH, um den Phasenübergang des DPPC unter den jeweiligen Bedingungen zu visualisieren. Es wurden alle Curcuminoide vermessen, die eine Eigenfluoreszenz aufweisen, also die Verbindungen **1** bis **7** und **Curcumin**. Der Übersichtlichkeit wegen werden nur einige der aufgenommenen Kurven exemplarisch wiedergegeben.

Die bei Verwendung der Curcumin-Derivate als Fluoreszenzmarker erhaltenen Schmelzkurven sind nicht von sigmoidaler Form. Sie verlaufen für die Verbindungen **4**, **5** und **6** für alle Bedingungen annähernd fallend, bei den restlichen Curcuminoiden steigen sie an.

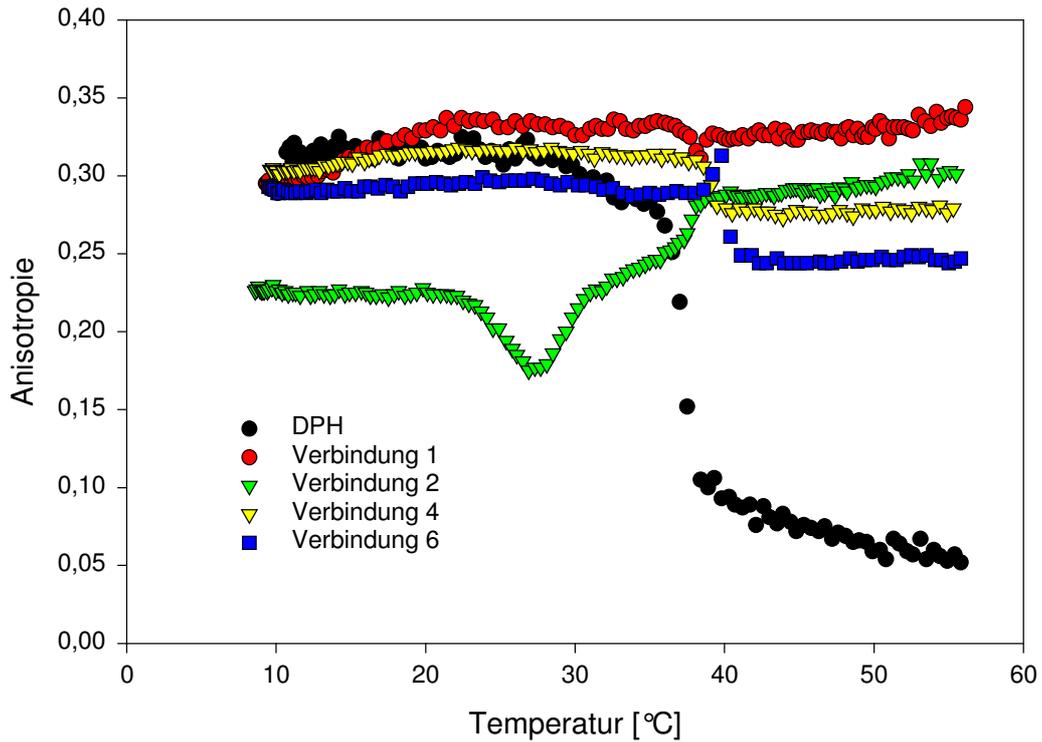


Abb. 5.14: Schmelzkurven mit DPH bzw. den Verbindungen 1, 2, 4 oder 6 als Fluoreszenzmarker (Lösungsmittel DMSO, Methode 2).

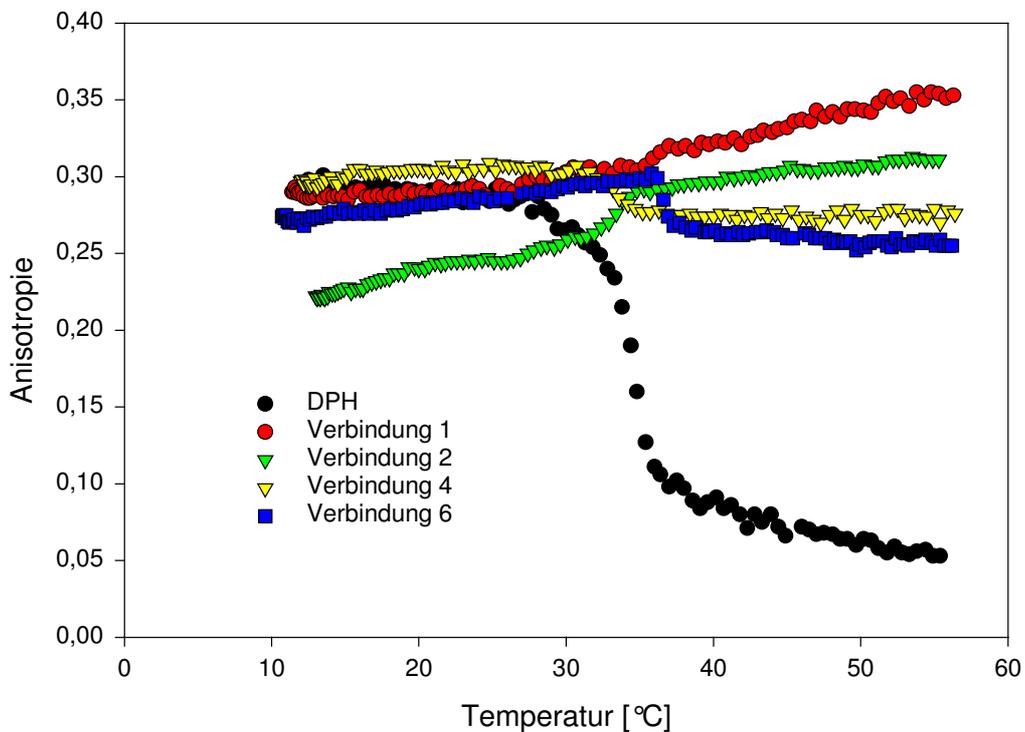


Abb. 5.15: Schmelzkurven mit DPH bzw. den Verbindungen 1, 2, 4 oder 6 als Fluoreszenzmarker (Lösungsmittel DMSO, Methode 1).

Fluoreszenzanisotropie

Die Substanzen **4**, **5** und **6** sind auch die einzigen Derivate, die bei beiden Herstellungsmethoden der Liposomen und allen drei Lösungsmitteln deutliche Stufen aufweisen, wenngleich diese wesentlich kleiner sind als bei Verwendung von DPH. Die Wendepunkte dieser Kurven entsprechen allerdings lediglich in DMSO annähernd dem mithilfe des DPH bestimmten Schmelzpunkt.

Beispielhaft sind die Schmelzkurven der Substanzen **1**, **2**, **4** und **6** für Liposomen beider Herstellungsmethoden bei Verwendung von DMSO in den Abbildungen 5.14 und 5.15 dargestellt.

Die Liposomen, die oberhalb der Phasenübergangstemperatur hergestellt wurden, zeigen generell glattere, weniger stufige Kurven. Besonders auffällig ist dies bei Einsatz von DMSO, denn hier wurden mit den Liposomen nach Methode 2 zum Teil sehr unruhige Kurven aufgenommen. Bei Verwendung von THF verlaufen auch die bei Vesikeln nach Methode 2 erhaltenen Kurven glatt und gerade.

Die Verbindung **6** weist mit Liposomen nach Methode 2 in Ansätzen mit DMSO und ohne Lösungsvermittler eine Spitze nach oben auf, die bei Liposomen nach Methode 1 nicht vorhanden ist, wie in den Abbildungen 5.14 und 5.15 gezeigt ist.

Noch auffälliger ist das Verhalten der Substanz **2**. Sie zeigt bei Herstellungsart 2 der Liposomen eine charakteristische Ausbuchtung bei ca. 30°C, die bei Liposomen nach der anderen Methode nicht zu finden ist. Die leichte Stufe bei etwas höheren Temperaturen zeigen die Kurven der Liposomen beider Suspensionen und finden sich etwas weniger ausgeprägt auch bei Verbindung **7** und bei **Curcumin**.

Genauere Untersuchung des Verhaltens der Verbindung 2

Da eine Verformung der Kurve in diesem Ausmaße bei keiner anderen Substanz zu beobachten war, wurde dieser Effekt genauer untersucht. Es wurde vermutet, dass diese Verbindung nicht in der Lage war, sich während der 30 Minuten des Herunterkühlens auf ca. 10°C vollständig zwischen die DPPC-Moleküle der Liposomen zu schieben. Während des Erwärmens beginnt dann anscheinend jenseits der 20°C ein Prozess der Umlagerung, in dem die Moleküle des Curcuminoids **2** ihre eigentliche Position einnehmen. Knapp oberhalb von 30°C ist dieser Prozess abgeschlossen. Aufgrund der verschiedenen Beweglichkeiten in diesen beiden Stadien der Einlagerung ergeben sich daraus unterschiedliche Anisotropien. Um diese Theorie auf ihre Richtigkeit zu prüfen, wurde mit der Verbindung **2** eine Hystereseurve aufgenommen. Dazu wurden die Liposomen nach Methode 2 wie schon beschrieben mit DMSO und mit der in DMSO gelösten

Substanz **2** versetzt und heruntergekühlt. Anschließend wurde wie zuvor während des Aufheizens auf ca. 55°C ständig die Anisotropie notiert. Nach Erreichen dieser Temperatur wurde das Experiment jedoch nicht beendet, sondern die Anisotropie wurde weiterhin während des folgenden Abkühlungsprozesses erfasst. Die auf diese Weise erzeugten Datenpunkte sind in Abbildung 5.16 dargestellt.

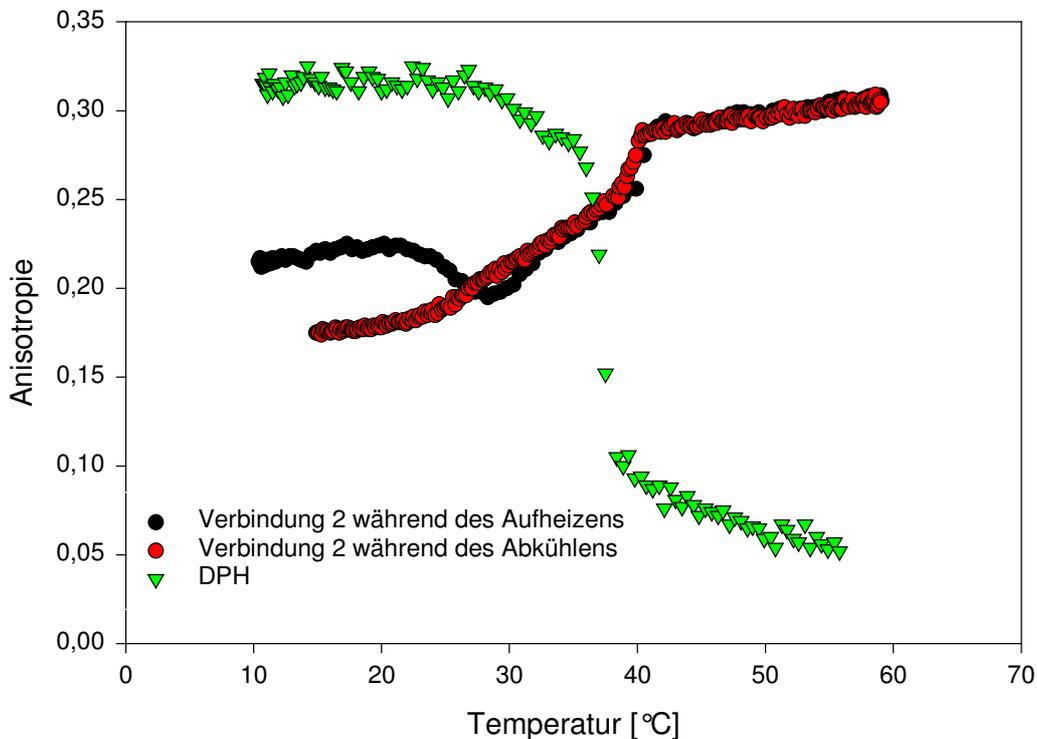


Abb. 5.16: Hysteresekurve der Verbindung 2, DPH als Vergleich (Lösungsmittel DMSO, Methode 2).

Hier kann man sehr schön erkennen, dass die Kurve des Abkühlungsprozesses bei den niedrigen Temperaturen bei geringeren Anisotropien verläuft als die des Aufheizprozesses. Von der charakteristischen Ausbuchtung ist nichts mehr zu sehen. Diese Beobachtung untermauert die oben vorgestellte Theorie. Es scheint also bei Verbindung **2** tatsächlich so zu sein, dass diese bei niedrigen Temperaturen, bei denen die Phospholipide einen sehr rigiden Zustand einnehmen, nicht in der gleichen Art und Weise zwischen die DPPC-Moleküle interkalieren können wie bei höheren Temperaturen. Da dieses Phänomen nur bei einer der beiden Methoden zu beobachten ist, wird ein zweites mal deutlich, dass die beiden Herstellungsarten keinesfalls Liposomen mit identischen Eigenschaften hervorbringen.

Das **Curcumin** und die Substanz **7** scheinen diesen Effekt ebenfalls zu zeigen, allerdings in einem sehr viel kleineren Ausmaß. Bei diesen Verbindungen ist die Ausbuchtung in der Schmelzkurve deutlich geringer ausgeprägt.

Fluoreszenzanisotropie

Zusatz von DPH bei Verwendung der Curcuminoide als Fluoreszenzsonden

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, inwieweit die zusätzliche Anwesenheit des DPH die oben beschriebenen Graphen beeinflusst. Die so erhaltenen Kurvenverläufe unterscheiden sich mit wenigen Ausnahmen nicht von den bereits dargestellten. Die Schmelzkurven in Anwesenheit von DPH sind hin und wieder leicht zu größeren oder kleineren Anisotropie-Werten verschoben. Bei der Verbindung **3** ergibt sich bei Zusatz von DPH unter allen Bedingungen eine sigmoidale Schmelzkurve mit deutlich sichtbarem Phasenübergang (Abb. 5.17). Dies ist auf die Ähnlichkeit der Anregungs- und Emissionswellenlängen beider Substanzen zurückzuführen (Tab. 5.5 und 5.6).

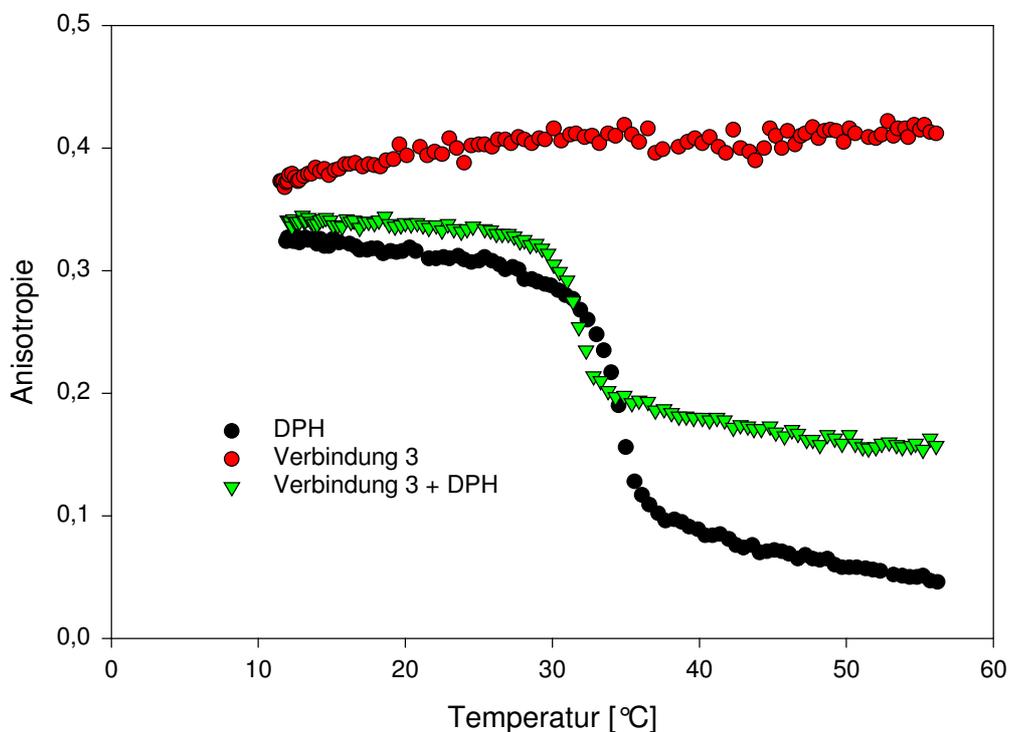


Abb. 5.17: Schmelzkurven mit Verbindung 3 als Fluoreszenzsonde, DPH als Vergleich (ohne Lösungsmittel, Methode 1).

Zusammenfassung

Die Kurvenverläufe für die einzelnen Substanzen unterscheiden sich je nach eingesetztem Lösungsmittel zum Teil beachtlich voneinander. So tritt beispielsweise die beschriebene Ausbuchtung der Verbindung **2** nur bei Verwendung von DMSO bei Liposomen nach Methode 2 auf. In einigen Fällen kann man Stufen und/oder Spitzen ausmachen, die eine Membranveränderung wie den Phasenübergang anzeigen könnten. Allerdings sind die Stufen allesamt zu schwach ausgeprägt, um daraus eine definierte Schmelztemperatur zu ermitteln. Außerdem liegen diese Kurvenstrukturen selten im Bereich des vom DPH visualisierten Phasenübergangs. Die Substanzen

verhalten sich bezüglich des Auftretens solcher Strukturen bei Einsatz der drei verschiedenen Lösungsmittel auch nicht einheitlich. Die Schmelzkurve der Liposomen nach Methode 2 zeigt bei Verbindung 7 unter Verwendung von THF eine leichte Stufe nach oben, die in etwa beim Schmelzpunkt liegt. Bei Verwendung von DMSO erscheint eine Spitze nach unten und anschließend eine Stufe nach oben, allerdings erst kurz hinter dem vom DPH detektierten Phasenübergang. Bei Verzicht auf Lösungsmittelzusatz zeigt sich dann eine Stufe nach oben vor dem Schmelzpunkt. Die Abbildung 5.18 zeigt die eben beschriebenen Kurvenverläufe und zum Vergleich die des DPH.

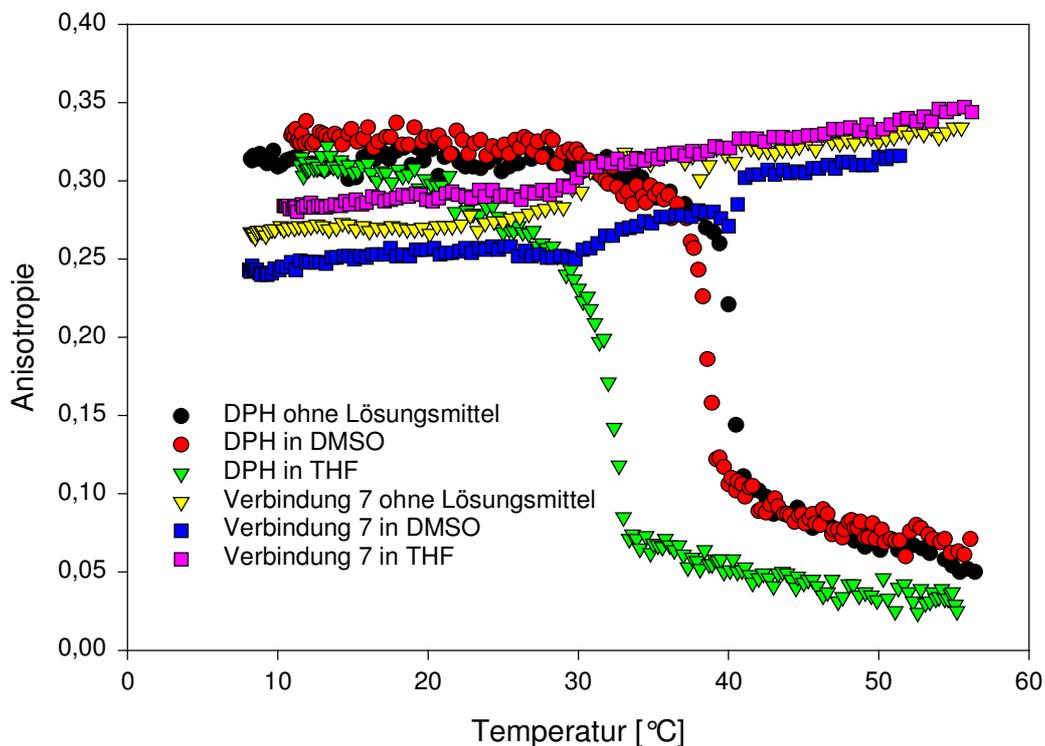


Abb. 5.18: Verschiedene Schmelzkurven bei Einsatz von Verbindung 7 bzw. DPH als Fluoreszenzmarker (verschiedene Lösungsmittel, Methode 2).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich nur der Schluss ziehen, dass die Curcuminoide in keinem Fall geeignet sind, Membranveränderungen anzuzeigen.

Mögliche Gründe für diese Tatsache diskutierte bereits Kruse [Kruse, 2003]. Zum einen wurde angeführt, dass die Curcuminoide eine rigidisierende Wirkung auf die Membran ausüben könnten. Im Extremfall könnte dieser Effekt bewirken, dass fast kein Phasenübergang mehr stattfindet, was zu dem Bild des häufig geraden Kurvenverlaufs passen würde. Allerdings ist diese Wirkung bei Einsatz von nur 2 μM Curcuminoid eher unwahrscheinlich.

Fluoreszenzanisotropie

Eine andere, ebenfalls bei Kruse genannte, mögliche Erklärung wäre das Missverhältnis zwischen der Rotationskorrelationszeit und der Fluoreszenzlebensdauer. Bereits in Kapitel 5.1.1 wurde darauf hingewiesen, dass sich diese beiden Größen zahlenmäßig im gleichen Bereich bewegen müssen, wenn eine Substanz sinnvolle Aussagen über die Viskosität seiner Umgebung machen soll. Für Curcumin (Verbindung **1**) wurde die durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer in verschiedenen Lösungsmitteln mit 64 ps bis 376 ps bestimmt [Khopde et al., 2000], im Schnitt also in etwa 200 ps. (Zum Vergleich: Beim DPH beträgt sie in dickflüssigem Paraffin 10,5 ns [Shinitzky und Barenholz, 1974] und ist damit wesentlich größer.) Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die Rotationskorrelationszeit des Curcumins im Vergleich zu der sehr kurzen Fluoreszenzlebensdauer relativ lang ist. Dann kann sich das Molekül während der kurzen Zeit zwischen Absorption und Emission selbst in der flüssig-kristallinen Membranphase nicht nennenswert drehen. Daher zeigt Curcumin auch in diesem Milieu relativ hohe Anisotropie-Werte, die in diesem Fall aber nicht unbedingt eine hohe Viskosität der Umgebung widerspiegeln, sondern lediglich das Unvermögen des Curcumins, sich innerhalb der kurzen Fluoreszenzlebensdauer deutlich zu bewegen. Die gemessene Anisotropie entspricht annähernd der intrinsischen Anisotropie der Substanz. Diese Betrachtungen könnten in analoger Weise auch für die übrigen untersuchten Curcuminoide gelten.

Die Tatsache, dass die gemessene Anisotropie sich dennoch mit der Temperatur ändert und nicht konstant bleibt, könnte mit eventuellen temperaturbedingten Veränderungen der Fluoreszenzlebensdauer zusammenhängen.

Da sich die Curcuminoide als Fluoreszenzsonden augenscheinlich nicht eignen, wurde im Folgenden versucht, eventuell vorhandene membranverändernde Wirkungen mithilfe des DPH nachzuweisen.

5.3.3 DPH als Fluoreszenzsonde

Für diese Experimente wurde zusätzlich zu dem Curcuminoid jeweils auch DPH zu der Liposomensuspension gegeben. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal des DPH verwendet, um Veränderungen des Schmelzverhaltens der Phospholipide unter Zusatz der Curcumin-Derivate im Vergleich zu DPH allein zu erfassen. Da hier keine Eigenfluoreszenz der eingesetzten Verbindungen notwendig ist, wurden auch die Substanzen **8** bis **10** untersucht, ebenso wie Cholesterol (Konzentration 2 μM), dessen Einfluss auf Membranen bekannt ist (siehe Kapitel 5.1.3). Aufgrund der sehr

schlechten Löslichkeit des Cholesterols wurden bei Einsatz von DMSO als Lösungsmittel keine Schmelzkurven für den Steroidalkohol aufgenommen.

Die in dieser Versuchsreihe erhaltenen Datenpunkte zeigen alle einen deutlichen Phasenübergang an und haben einen mehr oder weniger ausgeprägten sigmoidalen Verlauf.

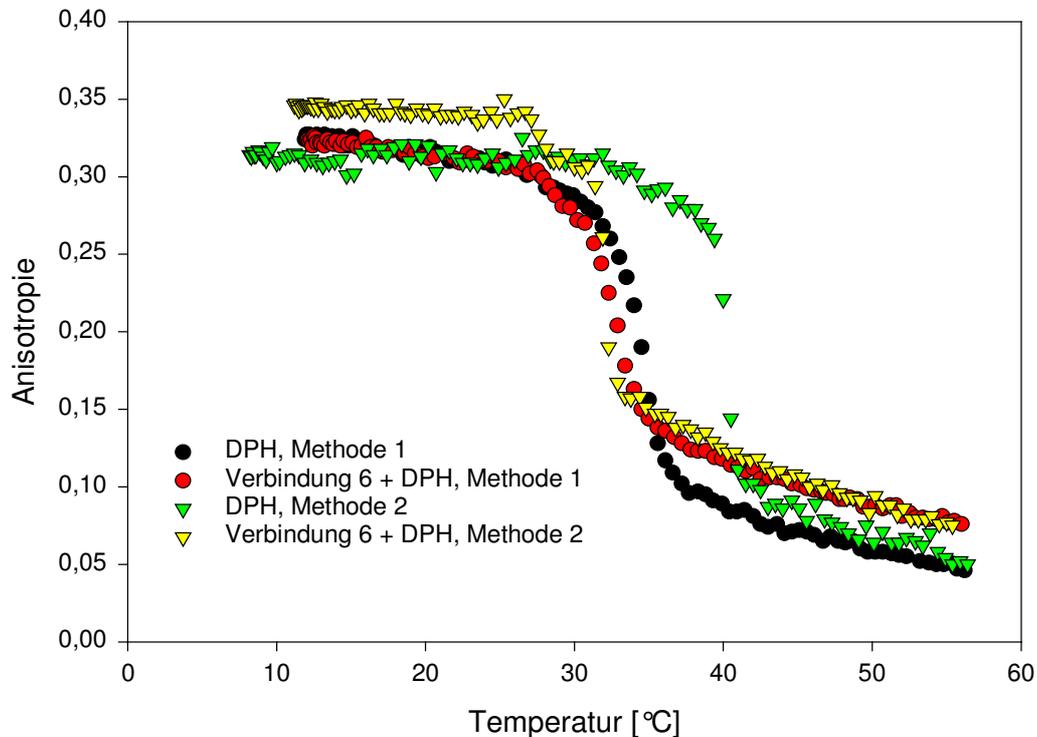


Abb. 5.19: Schmelzkurven mit DPH als Fluoreszenzsonde, mit und ohne Zusatz der Verbindung 6 (ohne Lösungsmittel, beide Methoden).

Auch bei diesen Experimenten verlaufen die Schmelzkurven bei Herstellungsmethode 1 meist glatter und weisen weniger Stufen auf. Dieser Unterschied tritt beispielsweise bei der Verbindung 6 ohne Verwendung von Lösungsvermittler zutage (Abb. 5.19). Die Kurve der Liposomen nach Methode 1 verläuft fast ideal sigmoidal, während bei der Methode 2 eine zweite, kleinere Stufe vor dem eigentlichen Phasenübergang sichtbar ist. Diese Stufe findet sich weniger ausgeprägt auch bei den Substanzen 2, 4 und 5 für die Methode 2 ohne Lösungsmittelzusatz, ebenso wie bei den Curcumin-Derivaten 3, 4 und 5 für die Methode 2 bei Einsatz von DMSO.

Curcumin und die Verbindung 2 zeigen hier keine Stufe, sondern eine Ausbuchtung nach oben (Abb. 5.20). Bei Liposomen nach Methode 1 treten solche Effekte in keinem Fall auf, ebenso wenig wie bei Verwendung von THF als Lösungsmittel.

Fluoreszenzanisotropie

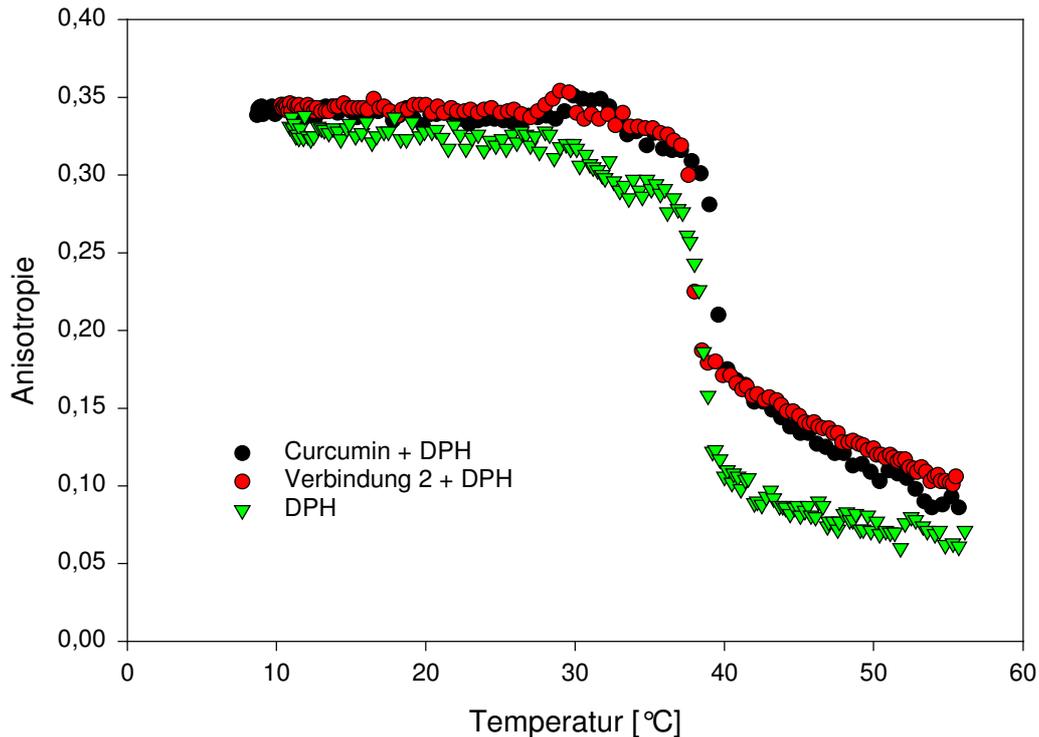


Abb. 5.20: Schmelzkurven mit DPH als Fluoreszenzsonde (Lösungsmittel DMSO, Methode 2).

Bei genauerer Betrachtung kann man in Abbildung 5.20 sogar in der Schmelzkurve des DPH allein eine leichte Stufe erkennen. Eine mögliche Ursache dieser Phänomene könnte die sogenannte Pretransition sein, der Übergang von der glatten Gelphase L_{β} in die gewellte Gelphase P_{β} [Janiak et al., 1976; Heimburg, 2000]. Die Temperaturangaben für diesen Übergang schwanken. Lentz et al. fanden für multilamellare DPPC-Vesikel Werte zwischen 22,9°C (Messung während des Aufheizens) und 31,9°C (Messung während des Abkühlens). Der extrapolierte Wert für eine Aufheiz- bzw. Abkühlrate von 0°C lag bei 29,8°C [Lentz et al., 1978]. Eine andere Arbeitsgruppe fand für nicht näher charakterisierte DPPC-Dispersionen eine Pretransition bei 34,5°C. Die ermittelte Temperatur für diesen Phasenübergang hängt also in starkem Ausmaße von den eingesetzten Methoden ab. Berücksichtigt man diese Schwankungen, könnten die beobachteten Stufen bei der Untersuchung verschiedener Curcuminoide tatsächlich auf diese Pretransition zurückzuführen sein. Unklar bleibt dann allerdings, warum diese nur bei Zusatz einiger Verbindungen zu sehen ist und auch dann nicht unter allen Bedingungen.

Veränderungen im Schmelzverhalten der Phospholipide können erfasst werden als Verschiebung der Phasenübergangstemperatur und als Veränderung der Anisotropie-Werte vor und nach diesem Übergang im Vergleich zu den

entsprechenden Kurven des DPH allein. Die Tabellen 5.3 und 5.4 fassen die beobachteten Veränderungen der Schmelzkurven qualitativ zusammen.

Phasenübergangstemperaturen

	Methode 1			Methode 2		
	ohne Lösungsmittel	DMSO	THF	ohne Lösungsmittel	DMSO	THF
DPH	34,4	34,5	32,2	40,1	38,5	31,7
Curcumin	33,5	36,0	33,2	34,5 ↓	39,9	30,6
1	36,1	36,1	33,1	39,6	40,4	32,2
2	33,9	37,8 ↑	29,8 ↓	40,0	38,1	32,9
3	36,3	31,8 ↓	27,2 ↓	35,8 ↓	38,4	33,0
4	33,6	31,3 ↓	26,4 ↓	32,6 ↓	37,3	30,7
5	34,4	35,6	27,8 ↓	35,2 ↓	40,9 ↑	32,2
6	32,8	33,1	30,1	32,1 ↓	37,5	30,3
7	33,9	35,1	26,6 ↓	37,1 ↓	42,0 ↑	32,1
8	36,9 ↑	35,3	31,8	37,8 ↓	39,0	30,5
9	34,6	33,4	28,6 ↓	38,1	39,0	30,4
10	39,4 ↑	34,7	27,5 ↓	35,7 ↓	36,6	31,1
Cholesterol	38,1 ↑	---	29,0 ↓	35,8 ↓	---	30,9

Tab. 5.2: Mittels DPH als Fluoreszenzmarker ermittelte Schmelzpunkte der DPPC-Liposomen in °C bei Zusatz verschiedener Substanzen; DPH allein als Vergleich. Die Pfeile markieren signifikante Abweichungen (> 2°C) von dem mit DPH allein bestimmten Schmelzpunkt nach oben (↑) bzw. nach unten (↓).

Es soll an dieser Stelle noch einmal betont werden, dass geringe Schmelzpunktverschiebungen aufgrund der Messungenauigkeiten als nicht signifikant angesehen werden müssen. Tabelle 5.2 zeigt die mittels Regression bestimmten Schmelzpunkte für alle Experimente bei Zusatz von Curcuminoiden bzw. Cholesterol. Abweichungen von mehr als 2°C von dem mit DPH allein ermittelten Schmelzpunkt unter den entsprechenden Bedingungen sind mit Pfeilen markiert. Als identisch wurden bei Erstellen der Tabelle 5.3 Schmelzpunkte angesehen, die nicht mehr als 2°C von der mit DPH allein bestimmten Phasenübergangstemperatur abweichen.

Fluoreszenzanisotropie

	ohne Lösungsmittel		DMSO		THF	
	Methode 1	Methode 2	Methode 1	Methode 2	Methode 1	Methode 2
T_m identisch	1 - 7 9	1 2 9	Curcumin 1 5 - 10	Curcumin 1 - 4 6 8 - 10	Curcumin 1 6 8	Curcumin 1 - 10 Cholesterol
T_m kleiner	-----	Curcumin 3 - 8 10 Cholesterol	3 4	-----	2 - 5 7 9 10 Cholesterol	-----
T_m größer	8 10 Cholesterol	-----	2	5 7	-----	-----

Tab. 5.3: Veränderungen der Phasenübergangstemperatur T_m bei Zusatz der verschiedenen Curcuminoide und des Cholesterols im Vergleich zum DPH allein.

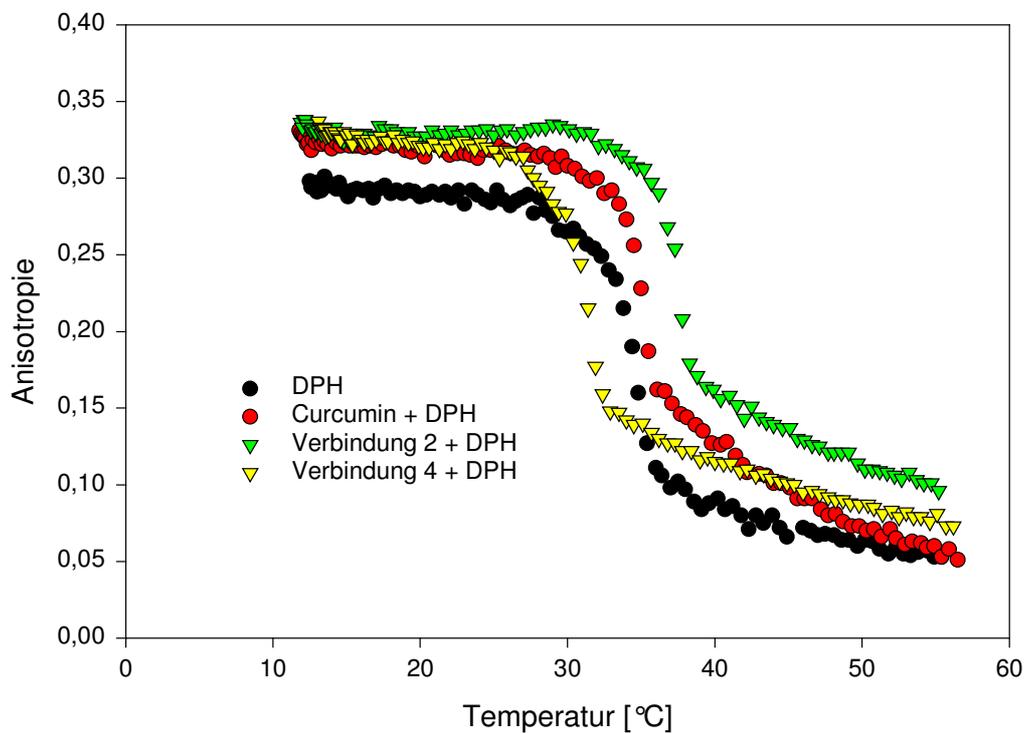


Abb. 5.21: Schmelzkurven mit DPH als Fluoreszenzsonde (Lösungsmittel DMSO, Methode 1).

Bei der Methode 2 der Liposomenherstellung und Verwendung von THF sind die Schmelzpunkte bei Zusatz der verschiedenen Curcuminoide unverändert im Vergleich zum DPH allein, während bei den Liposomen nach Methode 1 unter den gleichen Bedingungen eher kleinere Werte beobachtet werden. Kleinere Phasenübergangstemperaturen finden sich auch bei Verzicht auf Lösungsvermittler bei den Liposomen nach Methode 2. Unter den übrigen Bedingungen zeigen sich mit wenigen Ausnahmen unveränderte Schmelzpunkte. Die Abbildung 5.21 zeigt exemplarisch je eine Schmelzkurve mit identischer (**Curcumin**), geringerer (Verbindung 4) und höherer (Verbindung 2) Phasenübergangstemperatur.

Anhand der ermittelten Daten lässt sich bezüglich der Veränderung der Phasenübergangstemperatur durch den Zusatz von Curcumin-Derivaten keine Konsistenz zwischen den verschiedenen Lösungsmitteln und den beiden Liposomensuspensionen erkennen.

Anisotropie-Werte

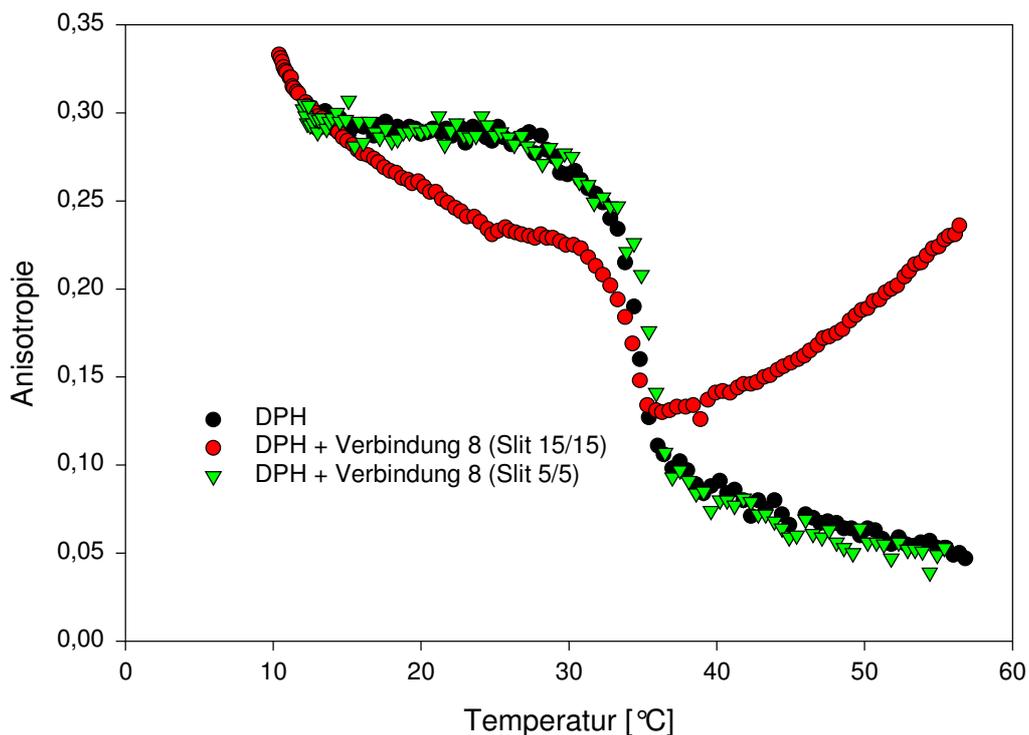


Abb. 5.22: Schmelzkurven mit DPH als Fluoreszenzsonde (Lösungsmittel DMSO, Methode 1).

Die Größe der Anisotropie-Werte sollte im Prinzip deutlich weniger durch Messungenauigkeiten beeinflusst werden als die Phasenübergangstemperatur. Allerdings war der Einsatz der Liposomen nach Methode 1 teilweise mit Problemen

Fluoreszenzanisotropie

verbunden, wenn DPH als Fluoreszenzmarker verwendet wurde. Bei den Messungen ergaben sich mitunter ungewöhnliche Graphen, die aufgrund des Aussehens der übrigen Kurven angezweifelt wurden. Ein Charakteristikum dieser ungewöhnlichen Kurven ist die geringere Steigung bei Verwendung des DPH als Fluoreszenzsonde (Abb. 5.12). Ein zweites Merkmal manifestiert sich in unerwarteten Kurvenverläufen, wie exemplarisch in Abbildung 5.22 gezeigt ist.

Bei der Ursachenforschung stellte sich heraus, dass dieser Effekt zum Teil durch die Geräteeinstellungen bedingt wurde. Die Curcuminoide zeigen nur eine geringe Fluoreszenzintensität und durch die für die Anisotropie-Messungen notwendigen Polarisatoren wird die Lichtintensität weiter herabgesetzt. Daher wurde während der Experimente mit möglichst großem Spalt sowohl im Absorptions- als auch im Emissionsstrahlengang gearbeitet, größer als bei Aufnahme der entsprechenden Fluoreszenzspektren ohne Polarisatoren.

Genauere Untersuchungen am Beispiel des DPH mit DMSO als Lösungsmittel bei 10 °C, 30 °C und 50 °C zeigten, dass die Fluoreszenzintensitäten bei Liposomen nach Methode 1 bei der Anfangstemperatur von ca. 10 °C etwas höher liegen als bei Liposomen nach Methode 2. Das gilt auch bei in den Strahlengang eingebrachten Polarisatoren, also auch für die Lichtintensitäten I_{VH} und I_{VV} (siehe Kap. 5.1.1). Das kann dazu führen, dass bereits bei dieser Temperatur die gemessene Lichtintensität I_{VV} den Erfassungsbereich des Detektors überschreitet.

Beim Aufheizen der Probe beginnen dann zwei gegenläufige Prozesse. Zum einen nimmt die Fluoreszenzintensität aufgrund der zunehmenden Möglichkeiten der strahlungslosen Energieabgabe mit steigender Temperatur ab. Auf der anderen Seite beginnen die Fettsäurereste der Phospholipide, sich immer mehr aufzulockern, bis sie schließlich vollständig schmelzen. Während dieses Vorganges können sich zugesetzte Substanzen wie das DPH zunehmend schneller und leichter zwischen die DPPC-Moleküle einlagern, wodurch die Fluoreszenzintensität des DPH ansteigt. Bei 30 °C ist daher die Lichtintensität vom Detektor nicht mehr exakt erfassbar und in die Berechnung der Anisotropie geht ein zu geringer Wert für I_{VV} ein. Daraus resultiert gemäß der in Kapitel 5.1.1 angegebenen Formel ein zu kleiner Wert für die Anisotropie, was auch die häufiger beobachteten flacheren Kurvenverläufe erklärt. Abbildung 5.22 zeigt ein extremes Beispiel eines solchen stetig fallenden Kurvenverlaufs, der schließlich bei ca. 35 °C in die Phasenumwandlung übergeht.

Das darauf folgende Wiederansteigen lässt sich mit dieser Formel allerdings nicht ohne weiteres erklären. Es wurde aber beobachtet, dass sich die Emissionsmaxima

während der Temperaturerhöhung zu größeren Wellenlängen verschieben. Da zur Bestimmung der Anisotropie auf festen Wellenlängen gemessen wird, bewirkt diese Verschiebung, dass die Fluoreszenzintensität nicht im Maximum gemessen wird, sondern bei steigenden Temperaturen immer weiter daneben. Dadurch sinkt die erfasste Lichtintensität ab. Betrachtet man erneut die Formel zur Berechnung der Anisotropie (Kapitel 5.1.1), so erkennt man, dass sich damit der Zähler vergrößert, der Nenner aber verkleinert. Als Folge davon nimmt die Anisotropie größere Werte an. Diese Beobachtung könnte das Wiederansteigen der Schmelzkurve in Abbildung 5.22 bei großem Spalt erklären. Wählt man den Spalt kleiner, wird ein geringerer Anteil des Emissionslichtes erfasst. Dies scheint bereits ausreichend zu sein, um den beschriebenen Effekt trotz der Verschiebung der Maxima zu vermeiden.

	ohne Lösungsmittel		DMSO		THF	
	Methode 1	Methode 2	Methode 1	Methode 2	Methode 1	Methode 2
Kurvenverlauf identisch	Curcumin					
	1	3 - 5			3	4
	2	7 - 10	8 - 10	8 - 10	8 - 10	8 - 10
	8 - 10	Cholesterol			Cholesterol	Cholesterol
Kurve verläuft nur bei hohen Temperaturen oberhalb	3 - 7	-----	-----	Curcumin 1 - 7	Curcumin 2 7	Curcumin 3 5
gesamte Kurve nach oben verschoben	-----	Curcumin 1 2 6	Curcumin 1 - 7	-----	1 4 - 6	6
verringerte Anisotropie- Differenz	-----	-----	-----	-----	-----	1 2 7

Tab. 5.4: Veränderungen des Kurvenverlaufs bezüglich der Anisotropie-Werte bei Zusatz der verschiedenen Curcuminoide und des Cholesterols im Vergleich zum DPH allein.

Es zeigt sich also, dass die Wahl der richtigen Spaltbreite einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse der Messungen hat, wenn Liposomen nach Methode 1

Fluoreszenzanisotropie

verwendet werden. Wird der Spalt zu klein gewählt, ist die Fluoreszenzintensität zu gering und die Messwerte zeigen eine zu große Streuung. Wird der Spalt zu groß gewählt, weisen die Kurven einen ungewöhnlichen Verlauf auf. Die Probleme eines zu großen Spaltes traten zu keinem Zeitpunkt bei Verwendung der Liposomen nach Methode 2 auf.

Betrachtet man die Ergebnisse in Tabelle 5.4, so fällt auf, dass die Kurven der hydrierten Verbindung **8** sowie der Substanzen mit Curcumin-Partialstruktur **9** und **10** ebenso wie die des Cholesterols unter allen Bedingungen bezüglich der Anisotropie identisch zu der Kurve des DPH allein verläuft. Abweichungen von dieser idealen Kurve stellen immer Verschiebungen nach oben dar. Dabei verläuft entweder der gesamte Graph oberhalb der DPH-Kurve, oder die Anisotropie nimmt nur bei Temperaturen oberhalb des Schmelzpunktes größere Werte an als bei dem DPH allein (Tab. 5.4).

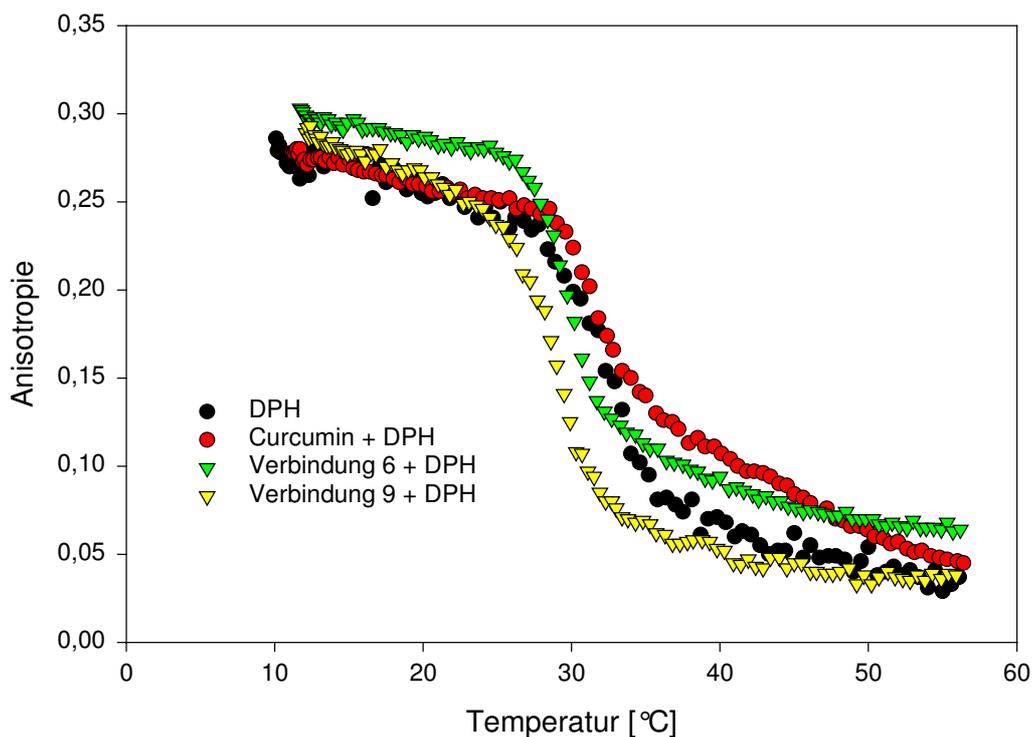


Abb. 5.23: Schmelzkurven mit DPH als Fluoreszenzsonde (Lösungsmittel THF, Methode 1).

Bei Verwendung von DMSO sind für alle Verbindungen bis auf die bereits genannten Substanzen **8** bis **10** und Cholesterol bei den Liposomen nach Methode 1 die Schmelzkurven insgesamt nach oben verschoben, bei den Liposomen nach Methode 2 nur oberhalb der Phasenübergangstemperatur. Auch beim Einsatz von THF sind bis auf jeweils eine weitere Ausnahme die Kurven in unterschiedlichem

Ausmaß verschoben. Lediglich bei Verzicht auf Lösungsvermittler finden sich einige Kurven mit identischem Verlauf. Beispielhaft ist in Abbildung 5.23 jeweils eine Kurve mit identischem Verlauf bezüglich der Anisotropie-Werte gezeigt (Verbindung **9**), eine in der Gesamtheit nach oben verschobene (Verbindung **6**) und eine, die lediglich bei Temperaturen oberhalb des Schmelzpunktes höhere Anisotropie-Werte aufweist, als die Kurve des DPH allein (**Curcumin**).

Die beobachtete Verschiebung zu höheren Anisotropien könnte ein weiteres Zeichen für die rigidisierende Wirkung der Curcuminoide auf Membranen sein, aber wieder sind keine allgemeingültigen Aussagen möglich, da sich zwischen den verschiedenen Lösungsmitteln und den beiden Suspensionen keine Gemeinsamkeiten bezüglich des Verhaltens der verschiedenen Curcumin-Derivate finden lassen.

Auffällig ist die deutlich verringerte Anisotropie-Differenz für die Verbindungen **1**, **2** und **7** bei den Liposomen nach Methode 2 bei Verwendung von THF als Lösungsmittel (Abb. 5.24). Noch auffälliger ist es, dass diese Anisotropie-Differenz bei der Verbindung **2**, die am Kv1.3-Kanal die beste Wirksamkeit zeigt, am geringsten ist.

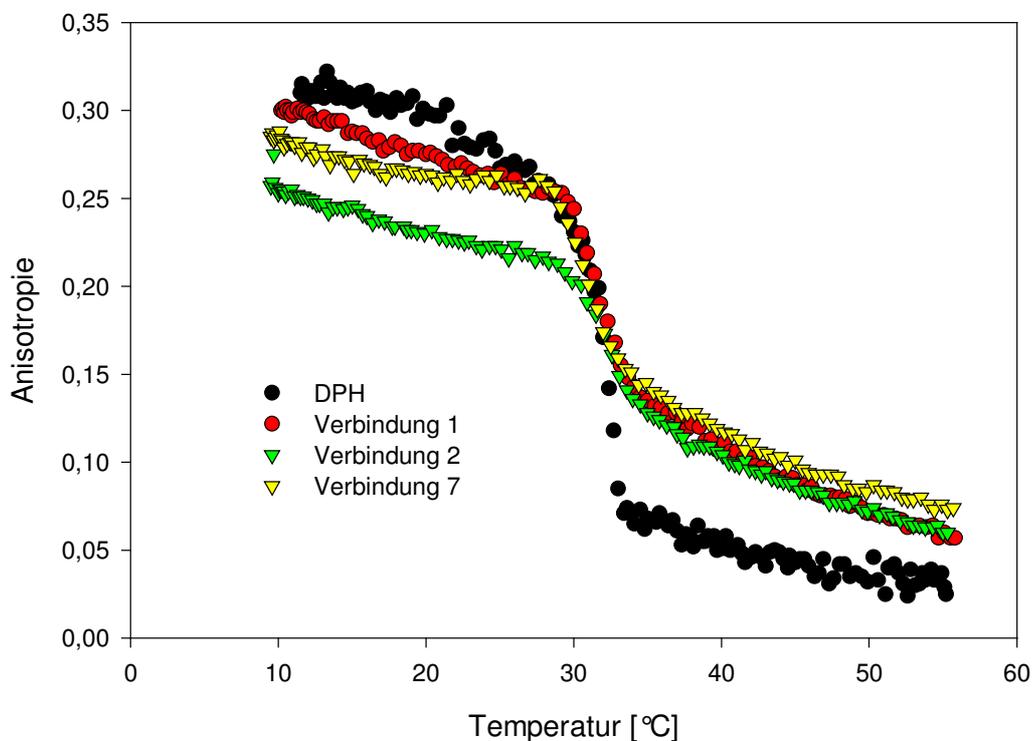


Abb. 5.24: Schmelzkurven mit DPH als Fluoreszenzsonde, Zusatz der Verbindungen 1, 2 und 7 (Lösungsmittel THF, Methode 2)

Fluoreszenzanisotropie

Cholesterol

Mit der Fluoreszenzsonde Laurdan wurde gezeigt, dass Cholesterol in höheren Konzentrationen die Anisotropie bei Temperaturen vor dem Schmelzpunkt senkt, bei Temperaturen darüber deutlich steigert und die Phasenübergangstemperatur verringert [Harris et al., 2002]. Dieser Effekt der sich verkleinernden Schmelzstufe konnte in eigenen Experimenten unter Einsatz von 30 mol-% Cholesterol mit DPH als Fluoreszenzsonde für die Liposomen nach Methode 2 reproduziert werden (nicht gezeigt). Die Schmelztemperatur lag bei Verwendung von THF allerdings bei höheren Werten als ohne den Steroidalkohol und bei Verwendung von DMSO war kaum noch ein Phasenübergang festzustellen.

Zusammenfassung

Die untersuchten Curcuminoide beeinflussen das Schmelzverhalten des DPPC sichtlich, aber das Ausmaß dieser Verschiebung lässt sich nicht mit der Wirksamkeit der Verbindungen an den Ionenkanälen oder den sealzerstörenden Effekten korrelieren. Zudem zeigen die untersuchten Substanzen bei unterschiedlichen Bedingungen jeweils verschiedene Wirkungen.

Probleme

Neben der schlechten Interpretierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse tritt ein weiteres Problem zutage. Die Curcuminoide zeigen selber Fluoreszenz und können daher das spektroskopische Verhalten des DPH beeinflussen. Dies ist ganz besonders zu befürchten, da sowohl das DPH als auch die Curcumin-Derivate relativ breitbandig absorbieren und emittieren. Es kommt erschwerend hinzu, dass das Absorptionsmaximum vieler Curcuminoide im Bereich des Emissionsmaximums des DPH (428 nm) liegt. Die Tabellen 5.5 und 5.6 fassen die ermittelten Maxima zusammen.

Es stellt sich die Frage, ob die gemessenen Anisotropie-Werte unter diesen Umständen verlässlich die Begebenheiten in der Phospholipid-Doppelschicht darstellen. Es lässt sich nicht leugnen, dass die Curcuminoide zumindest einen Teil des Emissionslichtes des DPH absorbieren. Die Fluoreszenzintensität des DPH sinkt in Anwesenheit von Curcumin-Derivaten teilweise drastisch ab. Im Gegenzug steigt die Fluoreszenzintensität der Curcuminoide an, allerdings nicht allzu stark.

Betrachtet man die Wechselwirkungen zwischen dem DPH und den zugesetzten Verbindungen in einem einfachen Modell, so kann man davon ausgehen, dass die Curcuminoide das Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm, das zur Anregung der Fluoreszenzsonde DPH verwendet wird, in der eingesetzten niedrigen Konzentration nicht nennenswert absorbieren.

Verbindung	ohne Lösungsmittel		DMSO		THF	
	Ex [nm]	Em [nm]	Ex [nm]	Em [nm]	Ex [nm]	Em [nm]
Curcumin	425	492	430	495	428	497
1	430	498	430	496	429	499
2	422	492	417	497	422	492
3	397	459	397	460	397	460
4	422	489	422	488	421	489
5	416	486	417	486	417	484
6	474	535	475	540	474	541
7	421	486	425	497	421	490

Tab. 5.5: Anregungs- und Emissionsmaxima der untersuchten Curcuminoide unter den verschiedenen Bedingungen in den Liposomen nach Methode 1; Ex: Anregungswellenlänge, Em: Emissionswellenlänge.

Verbindung	ohne Lösungsmittel		DMSO		THF	
	Ex [nm]	Em [nm]	Ex [nm]	Em [nm]	Ex [nm]	Em [nm]
Curcumin	448	507	445	513	428	500
1	433	513	432	503	429	498
2	408	502	407	506	424	493
3	397	461	397	463	397	459
4	422	489	423	490	421	486
5	417	485	418	488	416	486
6	473	553	473	553	472	540
7	448	500	425	499	422	493

Tab. 5.6: Anregungs- und Emissionsmaxima der untersuchten Curcuminoide unter den verschiedenen Bedingungen in den Liposomen nach Methode 2; Ex: Anregungswellenlänge, Em: Emissionswellenlänge.

Während des Relaxationsprozesses emittiert das DPH unter anderem Strahlung mit einer Wellenlänge von 428 nm, die als Messwellenlänge für die Anisotropie-Untersuchungen verwendet wurde. Diese Emissionsstrahlung kommt aber nicht vollständig am Detektor an, sondern wird zum Teil von den ebenfalls in dem Ansatz vorhandenen Curcuminoide absorbiert. Dies ändert zwar die Intensität, aber nicht die Polarisation des Emissionslichtes, so dass sich auch die bestimmte Anisotropie durch die Anwesenheit der Curcumin-Derivate nicht verändert. Daher sind die erhaltenen Ergebnisse trotz des störenden spektroskopischen Verhaltens der untersuchten Verbindungen auswertbar.

5.3.4 Curcuminoide und DPH als Fluoreszenzsonde

Aufgrund der oben beschriebenen Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum des DPH und den Absorptionsspektren der Curcuminoide wurde in einer dritten Reihe von Anisotropie-Experimenten versucht, beide Fluorophore als Sonden zu nutzen. Dahinter steht die Überlegung, dass das Emissionslicht des DPH von den Curcumin-Derivaten absorbiert werden kann und so zu deren Fluoreszenz beiträgt. Dazu wurde das DPH bei 366 nm angeregt und die Fluoreszenzintensität jeweils bei der Emissionswellenlänge der Curcumin-Derivate bestimmt („gemischte Wellenlängen“). Aufgrund der fehlenden Fluoreszenz wurden die Verbindungen **8** bis **10** und das Cholesterol hier nicht untersucht. Auch diese Untersuchungen führten zu sigmoidalen Kurvenverläufen.

Die hier erhaltenen Schmelzkurven wurden mit den in Kapitel 5.3.3 beschriebenen verglichen. Die Tabellen 5.7 und 5.9 stellen die Ergebnisse qualitativ dar.

Phasenübergangstemperaturen

	ohne Lösungsmittel		DMSO		THF	
	Methode 1	Methode 2	Methode 1	Methode 2	Methode 1	Methode 2
T_m identisch	1 – 3 7	Curcumin 3 5 6	Curcumin 1 3 5 7	Curcumin 1 2 4 6 7	1 3 5 - 7	1 – 7
T_m kleiner	-----	1 2 4 7	2	3 5	Curcumin 2	Curcumin
T_m größer	Curcumin 4 - 6	-----	4 6	-----	4	-----

Tab. 5.7: Veränderungen der Phasenübergangstemperatur T_m bei gemischten Wellenlängen im Vergleich zu den Wellenlängen des DPH.

Es lässt sich erkennen, dass bei den meisten Verbindungen die Schmelzpunkte bei Verwendung gemischter Wellenlängen mit denen identisch sind, die unter

Verwendung der Wellenlängen des DPH ermittelt wurden. Bei den Liposomen nach Methode 2 sind alle vorkommenden Abweichungen negativ, das heißt, die Phasenübergangstemperatur ist geringer. Bei den Liposomen nach Methode 1 verhält es sich bis auf einige Ausnahmen umgekehrt, die Schmelzpunkte sind höher. Die Tabelle 5.8 gibt die mittels Regression ermittelten Phasenübergangstemperaturen wieder.

	Methode 1			Methode 2		
	ohne	DMSO	THF	ohne	DMSO	THF
Curcumin	36,1 ↑	35,5	30,5 ↓	35,1	38,5	27,7 ↓
1	35,9	36,1	32,4	37,1 ↓	39,7	31,1
2	35,9	33,6 ↓	27,5 ↓	36,6 ↓	38,5	31,6
3	35,8	32,2	26,7	35,1	36,3 ↓	32,4
4	35,9 ↑	33,5 ↑	28,5 ↑	30,0 ↓	36,2	31,8
5	37,9 ↑	35,0	28,8	34,9	34,4 ↓	31,4
6	37,0 ↑	35,6 ↑	30,2	34,1	39,5	29,7
7	35,2	35,3	28,1	34,0 ↓	40,1	30,3

Tab. 5.8: Ermittelte Schmelzpunkte der DPPC-Liposomen in °C bei Verwendung gemischter Wellenlängen. Die Pfeile markieren signifikante Abweichungen (> 2°C) nach oben (↑) bzw. nach unten (↓).

Auf eine beispielhafte Darstellung der beschriebenen Effekte wird verzichtet, da sich die gleichen Bilder zeigen wie schon in Kapitel 5.3.3.

Anisotropie-Werte

Die in dieser Experimentenreihe erhaltenen Schmelzkurven sind im Vergleich zu denen, die bei Verwendung der Wellenlängen des DPH erzeugt worden sind, in unterschiedlichem Ausmaß nach unten, also zu kleineren Anisotropie-Werten verschoben. Eine Ausnahme stellt die Verbindung **3** dar, die bei allen Ansätzen bezüglich der Anisotropie (wie auch der Schmelztemperaturen) vergleichbare Werte zeigt wie die entsprechenden Kurven aus Kapitel 5.3.3. Die Abbildung 5.25 zeigt exemplarisch für die Verbindung **4** den Vergleich zwischen dem Kurvenverlauf für DPH alleine, dem unter Zusatz eines Curcuminoids und dem bei Verwendung der gemischten Wellenlängen.

Fluoreszenzanisotropie

	ohne Lösungsmittel		DMSO		THF	
	Methode 1	Methode 2	Methode 1	Methode 2	Methode 1	Methode 2
Kurvenverlauf identisch	Curcumin 1 3 7	Curcumin 3 4 7	3	3	3	3 4
gesamte Kurve nach unten verschoben	2 6	1	Curcumin 1 2 5 - 7	Curcumin 1 2 4 - 7	Curcumin 1 2 6	Curcumin 1 2 5 - 7
Kurve verläuft nur bei geringen Temperaturen unterhalb	4 5	2 5 6	4	-----	4 5 7	-----

Tab. 5.9: Veränderungen des Kurvenverlaufs bezüglich der Anisotropie-Werte bei gemischten Wellenlängen im Vergleich zu den Wellenlängen des DPH.

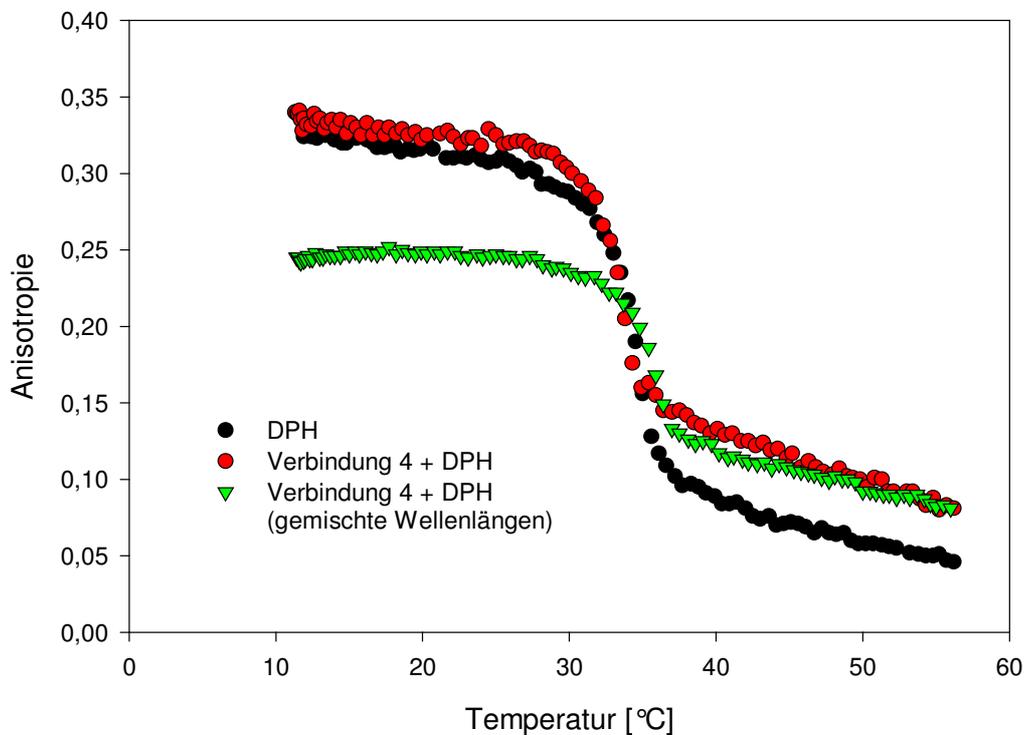


Abb. 5.25: Schmelzkurven im Vergleich (ohne Lösungsmittel, Methode 1).

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Verwendung der gemischten Wellenlängen sigmoidale Schmelzkurven entstehen, wie sie typisch sind für das Phasenübergangs-

verhalten von Phospholipiden. Man misst also nach Anregung des DPH auf der Emissionswellenlänge des jeweiligen Curcumin-Derivates eine ausreichende Lichtintensität. Dafür existieren drei mögliche Ursachen.

Erstens wäre es vorstellbar, dass die Curcuminoide aufgrund ihrer breiten Absorptionsbanden und der verwendeten großen Spaltbreiten bereits das Anregungslicht von 366 nm absorbieren und dementsprechend auf ihren Wellenlängen emittieren. Dann sollte man jedoch erwarten, dass die Schmelzkurven einen Verlauf zeigen wie bei Verwendung der Curcuminoide als Fluoreszenzmarker. Da das DPH vermutlich an dem gemessenen Fluoreszenzsignal beteiligt ist, wäre auch eine Überlagerung der beiden Signale denkbar.

Zweitens wäre es möglich, dass sich dieser Prozess sogar ohne Beteiligung der Curcuminoide vollzieht, und man auf den Emissionswellenlängen der Curcumin-Derivate lediglich die auslaufende Emissionsbande des DPH erfasst. Dann wäre es jedoch nicht zu verstehen, warum die Kurven nicht identisch zu denen in Kapitel 5.3.3 verlaufen, wo ebenfalls nur das Fluoreszenzsignal des DPH verwendet wurde. Allerdings wäre es möglich, dass bei Verwendung verschiedener Wellenlängen verschiedene Anisotropie-Werte erhalten werden.

Eine dritte Alternative wäre es, dass die zugesetzten Verbindungen tatsächlich in der Lage sind, das Emissionslicht des DPH zu absorbieren und daraufhin selbst fluoreszieren. Diese Theorie würde auch die Verschiebung der Schmelzkurven bei Einsatz gemischter Wellenlängen zu geringeren Anisotropien erklären. Der zusätzliche Absorptionsprozess würde eine erneute PhotoSelektion und damit eine Abnahme der Polarisation bedeuten. Ein strahlungsloser Energietransfer zwischen dem DPH und den Curcuminoiden erscheint aus den gleichen Gründen unwahrscheinlich, denn dann sollte das Ausmaß der Depolarisation noch deutlich ausgeprägter zu finden sein, da bei diesem Energietransfer die Ausrichtung der Übergangsdipolmomente unberücksichtigt bleibt.

Mit den zur Verfügung stehenden experimentellen Mitteln ist es nicht möglich, eindeutig zu klären, wie das Anisotropie-Signal bei diesen gemischten Wellenlängen zustande kommt.

Zusammenfassung

Die beobachteten Effekte sind insgesamt klein und liegen innerhalb der Schwankungen aufgrund von Messunsicherheiten. Zusätzlich sind diese Effekte nicht systematisierbar, in Abhängigkeit der gewählten Bedingungen (Herstellungsmethode

Fluoreszenzanisotropie

der Liposomen, Lösungsmittel, Fluoreszenzsonde) zeigen die einzelnen Substanzen häufig sehr unterschiedliche Wirkungen.

Aus diesem Grunde ist keine schlüssige Korrelation zwischen Struktur und Effekt möglich. Die Ergebnisse lassen sich lediglich beschreiben, entziehen sich aber einer wirklichen Interpretation. Daher hat sich die Methode der Fluoreszenzanisotropie-Messungen als nicht geeignet erwiesen, um membranverändernde Wirkungen der Curcumin-Derivate zu detektieren.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Curcuminoide und Psoralene mittels der Patch-clamp-Technik auf ihre blockierende Wirkung an dem spannungsabhängigen lymphozytären Kaliumkanal Kv1.3 untersucht. Neben den elektrophysiologischen Experimenten nahmen kritische Untersuchungen der dabei erhaltenen Ergebnisse einen breiten Raum ein.

Es wurde erstmals für Curcumin und einige Derivate gezeigt, dass diese den Kv1.3-Kanal blockieren. Die ermittelten EC_{50} -Werte lagen im ein- bis dreistelligen mikromolaren Bereich. Die Selektivität der Curcuminoide gegenüber anderen spannungsabhängigen Kalium- und Natriumkanälen war jedoch nicht sehr ausgeprägt (kleiner 10).

Um zu erfassen, welcher Anteil der Verbindungen während der Applikation an aktiven Oberflächen der Messanlage gebunden wurde, wurden mit den drei Substanzen, die am Kv1.3-Kanal die beste Wirksamkeit zeigten, Wiederfindungsstudien durchgeführt. Mithilfe der HPLC konnte gezeigt werden, dass mehr als 70% der eingesetzten Substanzmenge die Messzelle erreicht.

Während der Patch-clamp-Experimente traten gelegentlich sealzerstörende Effekte auf, die membranbeeinflussende Eigenschaften der Curcuminoide vermuten ließen. Diese Eigenschaften könnten auch für die gefundene wenig selektive Kanalblockade verantwortlich sein. Daher wurden Fluoreszenzanisotropie-Messungen an Liposomen als Modell-Membranen durchgeführt, um eine eventuelle Membranveränderung zu erfassen. Es wurden zwei verschiedene Methoden der Liposomenherstellung eingesetzt und drei verschiedene Möglichkeiten, um die zuzugebenden Substanzen zu lösen. Dazu wurden jeweils DMSO oder THF verwendet, bzw. die Verbindungen wurden bereits bei der Vesikelpräparation zugegeben, so dass die Ansätze frei von Lösungsmitteln blieben. Bereits mit der bekannten Fluoreszenzsonde DPH ergaben sich für diese verschiedenen Bedingungen (Herstellungsmethode, Lösungsmittel) deutliche Unterschiede in den erhaltenen Schmelzkurven der Phospholipide.

Es wurde versucht, die Curcuminoide selbst als Fluoreszenzsonden zu verwenden. Doch dabei wurden keine typischen sigmoidalen Schmelzkurven erhalten, sondern Geraden, die meist bei hohen Anisotropie-Werten verliefen. Diese waren nicht geeignet, den Phasenübergang der Phospholipide zu detektieren. Vermutlich hängt

Zusammenfassung

dieses Verhalten mit der extrem kurzen Fluoreszenzlebensdauer der Verbindungen zusammen, die es den Molekülen unmöglich macht, sich zwischen der Absorption des Anregungslichtes und der folgenden Emission nennenswert zu bewegen. Auf diese Weise bestimmt man unabhängig von der Viskosität der Umgebung einen hohen Anisotropie-Wert.

Unter Verwendung von DPH als Fluoreszenzmarker wurden bei Zusatz der Curcuminoide sigmoidale Schmelzkurven erhalten, die sich teilweise sowohl in Bezug auf die Phasenübergangstemperatur, als auch in Bezug auf die Anisotropie-Werte deutlich von den Kurven unterscheiden, die mit DPH allein aufgenommen wurden. Man konnte feststellen, dass die Curcumin-Derivate das Schmelzverhalten von Phospholipiden beeinflussen. Dabei bewirkten die Verbindungen, die lediglich über eine Curcumin-Partialstruktur verfügen, zumindest bezüglich der Anisotropie-Werte eine deutlich geringere Verschiebung der Kurven als die übrigen Substanzen. Die einzelnen Verbindungen zeigten bei verschiedenen Bedingungen häufig sehr unterschiedliche Wirkungen, so dass keine Korrelation zwischen diesen und den Effekten während der Patch-clamp-Experimente möglich war.

Aufgrund der Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum des DPH und den Anregungsspektren der Curcuminoide wurden zusätzlich Schmelzkurven unter Verwendung des Anregungsmaximums des DPH und der Emissionsmaxima der Curcumin-Derivate aufgenommen. Auch auf diese Weise ergaben sich sigmoidale Kurven, die sich sowohl von den Kurven mit DPH allein als auch von denen mit DPH unter Zusatz der Curcuminoide unterscheiden. Auch hier zeigten die einzelnen Verbindungen unter den verschiedenen Bedingungen zum Teil gegensätzliche Wirkungen.

Aus diesen Ergebnissen muss der Schluss gezogen werden, dass Fluoreszenzanisotropie-Messungen nur bedingt geeignet sind, um membranverändernde Eigenschaften der Curcuminoide zu untersuchen.

Des Weiteren wurden verschiedene Psoralene mittels der Patch-clamp-Technik am Kv1.3-Kanal untersucht. Die erreichten EC_{50} -Werte lagen für die meisten Verbindungen im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich. Die Selektivität gegenüber anderen Kanälen erreichte Werte bis 35, zum Teil sogar noch höher.

Ausblick

Die in dieser Arbeit beobachtete Kaliumkanalblockade durch Curcuminoide könnte eine Erklärung für die einleitend beschriebenen Curcumin-Wirkungen im

immunologischen Bereich sein. Die Erforschung dieses Zusammenhanges ist insbesondere aufgrund der Ungiftigkeit des Curcumins hochinteressant.

Eines der Psoralen-Derivate (Verbindung **15**) könnte aufgrund seiner relativ guten Wirksamkeit und der fehlenden DNA-Interaktion hilfreiche Hinweise geben für die Synthese neuer Psoralene mit guter Wirksamkeit am Kv1.3-Kanal bei fehlender Phototoxizität.

7 Literaturverzeichnis

Aiyar, J., Rizzi, J. P., Gutman, G. A., Chandy, K. G.: The Signature Sequence of Voltage-gated Potassium Channels Projects into the External Vestibule; *J. Biol. Chem.* (1996), 271 (49): 31013 - 31016

Almeida, P. F. F., Vaz, W. L. C., Thompson, T. E.: Lateral Diffusion in the Liquid Phases of Dimyristoylphosphatidylcholine/Cholesterol Lipid Bilayers: A Free Volume Analysis; *Biochemistry* (1992), 31 (29): 6739 - 6747

Amano, T., Richelson, E., Nirenberg, M.: Neurotransmitter Synthesis by Neuroblastoma Clones; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1972), 69 (1): 258 – 263

Ammon, H. P. T., Wahl, M. A.: Pharmacology of *Curcuma longa*; *Planta Med.* (1991), 57 (1): 1 - 7

Araújo, C. A. C., Leon, L. L.: Biological Activities of *Curcuma longa* L.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (1996), 96 (5): 723 - 728

Armstrong, C.: The Vision of the Pore; *Science* (1998), 280 (5360): 56 - 57

Averbeck, D.: Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism; *Photochem. Photobiol.* (1989), 50 (6): 859 - 882

Bautz, C., Bohuslavizki, K. H., Koppenhöfer, E.: Über die Wirkung wäßriger Auszüge von *Ruta graveolens* auf die Ionenströme der Nervenmembran; *therapeutikon* (1989), 3 (10): 571-575

Beeton, C., Barbaria, J., Giraud, P., Devaux, J., Benoliel, A.-M., Gola, M., Sabatier, J. M., Bernard, D., Crest, M., Béraud, E.: Selective Blocking of Voltage-Gated K⁺ Channels Improves Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Inhibits T Cell Activation; *J. Immunol.* (2001a), 166 (2): 936 - 944

Beeton, C., Wulff, H., Barbaria, J., Clot-Faybesse, O., Pennington, M., Bernard, D., Cahalan, M. D., Chandy, K. G., Béraud, E.: Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001b), 98 (24): 13942 - 13947

Began, G., Sudharshan, E., Appu Rao, A. G.: Inhibition of Lipoxygenase 1 by Phosphatidylcholine Micelles-Bound Curcumin; *Lipids* (1998), 33 (12): 1223 - 1228

Bezanilla, F.: The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels; *Physiol. Rev.* (2000), 80 (2): 555 – 592

Bezanilla, F.: Voltage Sensor Movements; *J. Gen. Physiol.* (2002), 120 (4): 465 - 473

- Bohuslavizki, K. H., Hänsel, W., Kneip, A., Koppenhöfer, E., Reimers, A., Sanmann, K.:** Blocking of Potassium Channels in Ranvier Nodes by 4,5,6,7-substituted Benzofurans and Its Significance on Demyelinating Diseases, *Gen. Physiol. Biophys.* (1993), 12 (3): 293 - 301
- Bohuslavizki, K. H., Hinck-Kneip, C., Kneip, A., Koppenhöfer, E., Reimers, A.:** Reduction of MS-related scotomata by a new class of potassium channel blockers from *Ruta graveolens*, *Neuro-ophthalmol.:* (1993), 13 (4): 191 - 198
- Butler, A., Wei, A., Baker, K., Salkoff, L.:** A Family of Putative Potassium Channel Genes in *Drosophila*; *Science* (1989), 243 (4893): 943 - 947
- Cahalan, M. D., Wulff, H., Chandy, K. G.:** Molecular Properties and Physiological Roles of Ion Channels in the Immune System, *J. Clin. Immunol.* (2001), 21 (4): 235 - 252
- Cha, A., Snyder, G. E., Selvin, P. R., Bezanilla, F.:** Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy; *Nature* (1999), 402 (6763): 809 - 813
- Chandy, K. G., DeCoursey, T. E., Cahalan, M. D., McLaughlin, G., Gupta, S.:** Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation; *J. Exp. Med.* (1984), 160 (2): 369 - 385
- Chandy, K. G., Gutman, G. A.:** Voltage-gated K⁺ channel genes; *Handbook of receptors and channels : Ligand and Voltage-gated Ion channels*, CRC Press Boca Raton (1995), 1 - 71
- Chandy, K. G., Cahalan, M., Pennington, M., Norton, R. S., Wulff, H., Gutman, G. A.:** Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants; *Toxicon* (2001), 39 (9): 1269 - 1276
- Choi, K. L., Aldrich, R. W., Yellen, G.:** Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991), 88 (12): 5092 - 5095
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz De Miera, E., Rudy, B.:** Molecular Diversity of K⁺ Channels; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1999), 868: 233 - 285
- Cogan, U., Shinitzky, M., Weber, G., Nishida, T.:** Microviscosity and Order in the Hydrocarbon Region of Phospholipid and Phospholipid-Cholesterol Dispersions Determined with Fluorescent Probes; *Biochemistry* (1973), 12 (3): 521 - 528
- Cole, K. S., Curtis, H. J.:** Electric impedance of the squid giant axon during activity; *J. Gen. Physiol.* (1939), 22: 649 - 670
- Collard, J. G., De Wildt, A.:** Localization of the lipid probe 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) in intact cells by fluorescence microscopy; *Exp. Cell. Res.* (1978), 116 (2): 447 - 450

Literaturverzeichnis

- Cooper, R. A., Leslie, M. H., Fischkoff, S., Shinitzky, M., Shattil, S. J.:** Factors Influencing Lipid Composition and Fluidity of Red Cell Membranes in Vitro: Production of Red Cells Possessing More Than Two Cholesterols per Phospholipid; *Biochemistry* (1978), 17 (2): 327 - 331
- DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S., Cahalan, M. D.:** Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?; *Nature* (1984), 307 (5950): 465 - 468
- Defarias, F. P., Stevens, S. P., Leonard, R. J.:** Stable Expression of Human Kv1.3 Potassium Channels Resets the Resting Membrane Potential of Cultured Mammalian Cells; *Receptors Channels* (1995), 3 (4): 273 - 281
- Deters, M., Siegers, C., Muhl, P., Hänsel, W.:** Choleric Effects of Curcuminoids on an Acute Cyclosporin-Induced Cholestasis in the Rat; *Planta Med.* (1999), 65 (7): 610 - 613
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R.:** The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity; *Science* (1998), 280 (5360): 69 - 77
- Fanger, C. M., Ghanshani, S., Logsdon, N. J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J., Beckingham, K., Chandy, K. G., Cahalan, M. D., Aiyar, J.:** Calmodulin Mediates Calcium-dependent Activation of the Intermediate Conductance K_{Ca} Channel, *IKCa1*; *J. Biol. Chem.* (1999), 274 (9): 5746 - 5754
- Fanger, C. M., Rauer, H., Neben, A. L., Miller, M. J., Rauer, H., Wulff, H., Rosa, J. C., Ganellin, C. R., Chandy, K. G., Cahalan, M. D.:** Calcium-activated Potassium Channels Sustain Calcium Signaling in T Lymphocytes; *J. Biol. Chem.* (2001), 276 (15): 12249 - 12256
- Felix, J. P., Bugianesi, R. M., Schmalhofer, W. A., Borris, R., Goetz, M. A., Hensens, O. D., Bao, J.-M., Kayser, F., Parsons, W. H., Rupprecht, K., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J., Slaughter, R. S.:** Identification and Biochemical Characterization of a Novel Nortriterpene Inhibitor of the Human Lymphocyte Voltage-Gated Potassium Channel, Kv1.3; *Biochemistry* (1999), 38 (16): 4922 - 4930
- Fomina, A. F., Fanger, C. M., Kozak, J. A., Cahalan, M. D.:** Single Channel Properties and Regulated Expression of Ca²⁺ (CRAC) Channels in Human T Cells; *J. Cell. Biol.* (2000), 150 (6): 1435 - 1444
- Gewirtz, A. T., Rao, A. S., Simon, Jr., P. O., Merlin, D., Carnes, D., Madara, J. L., Neish, A. S.:** *Salmonella typhimurium* induces epithelial IL-8 expression via Ca²⁺-mediated activation of the NF-κB pathway; *J. Clin. Invest.* (2000), 105 (1): 79 - 92
- Ghanshani, S., Wulff, H., Miller, M. J., Rohm, H., Neben, A., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., Chandy, K. G.:** Up-regulation of the *IKCa1* Potassium Channel during T-cell Activation; *J. Biol. Chem.* (2000), 275 (47): 37137 - 37149

- Glauner, K. S., Mannuzzu, L. M., Gandhi, C. S., Isacoff, E. Y.:** Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the *Shaker* potassium channel; *Nature* (1999), 402 (6763): 813 - 817
- Gliss, C., Randel, O., Casalta, H., Sackmann, E., Zorn, R., Bayerl, T.:** Anisotropic Motion of Cholesterol in Oriented DPPC Bilayers Studied by Quasielastic Neutron Scattering: The Liquid-Ordered Phase; *Biophys. J.* (1999), 77 (1): 331 - 340
- Goel, A., Boland, C. R., Chauhan, D. P.:** Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells; *Cancer Lett.* (2001), 172 (2): 111 - 118
- Goldin, A.:** Diversity of Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1999), 868: 38 – 50
- Gomes, D. de C. F., Alegrio, L. V., de Lima, M. E. F., Leon, L. L., Araújo, C. A. C.:** Synthetic Derivatives of Curcumin and their Activity against *Leishmania amazonensis*; *Arzneimittelforschung* (2002), 52 (2): 120 - 124
- Gordeliy, V. I., Kiselev, M. A., Lesieur, P., Pole, A. V., Teixeira, J.:** Lipid Membrane Structure and Interactions in Dimethyl Sulfoxide/Water Mixtures; *Biophys. J.* (1998), 75 (5): 2343 - 2351
- Grissmer, S., Dethlefs, B., Wasmuth, J. J., Goldin, A. L., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., Chandy, K. G.:** Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990), 87 (23): 9411 - 9415
- Grissmer, S., Nguyen, A. N., Aiyar, J., Hanson, D. C., Mather, R. J., Gutman, G. A., Karmilowicz, M. J., Auperin, D. D., Chandy, K. G.:** Pharmacological Characterization of Five Cloned Voltage-Gated K⁺ Channels, Types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, Stably Expressed in Mammalian Cell Lines; *Mol. Pharmacol.* (1994), 45 (6): 1227 – 1234
- Grunnet, M., Rasmussen, H. B., Hay-Schmidt, A., Klaerke, D. A.:** The voltage-gated potassium channel subunit, Kv1.3, is expressed in epithelia; *Biochim. Biophys. Acta* (2003), 1616 (1): 85 - 94
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J.:** Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches; *Pflügers Arch.* (1981), 391 (2): 85 - 100
- Hanson, D. C., Nguyen, A., Mather, R. J., Rauer, H., Koch, K., Burgess, L. E., Rizzi, J. P., Donovan, C. B., Bruns, M. J., Canniff, P. C., Cunningham, A. C., Verdries, K. A., Mena, E., Kath, J. C., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., Grissmer, S., Chandy, K. G.:** UK-78,282, a novel piperidine compound that potently blocks the Kv1.3 voltage-gated potassium channel and inhibits human T cell activation ; *Br. J. Pharmacol.* (1999), 126 (8): 1707 - 1716

Literaturverzeichnis

Harris, F. M., Best, K. B., Bell, J. B.: Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order; *Biochim. Biophys. Acta* (2002), 1565 (1): 123 - 128

Heimburg, T.: A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition; *Biophys. J.* (2000), 78 (3): 1154 - 1165

Herzog, T.: *Patch-clamp* Studien zur Kv-Kanal-blockierenden Wirkung von Cumarinen, Benzofuranen und Psoralenen als potenzielle Immunsuppressiva; *Dissertation Universität Kiel* (2000)

Hill, R. J., Grant, A. M., Volberg, W., Rapp, L., Faltynek, C., Miller, D., Pagani, K., Baizman, E., Wang, S., Guiles, J. W., Krafft, D. S.: WIN 17317-3: Novel Nonpeptide Antagonist of Voltage-Activated K⁺ Channels in Human T Lymphocytes; *Mol. Pharmacol.* (1995), 48 (1): 98 - 104

Hille, B.: *Ionic Channels of Excitable Membranes*; Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts (1992), 2. Auflage

Hirsh, J. K., Quandt, F. N.: Down-regulation of Na channel expression by A23187 in N1E-115 neuroblastoma cells; *Brain Res.*(1996), 706 (2): 343 – 346

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve; *J. Physiol.* (1952), 117: 500 - 544

Hohlfeld, R.: Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis, Principles, problems and perspectives; *Brain* (1997), 120 (5): 865-916

Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W.: Biophysical and Molecular Mechanisms of *Shaker* Potassium Channel Inactivation; *Science* (1990), 250 (4980): 533 - 538

Hoth, M., Button, D. C., Lewis, R. S.: Mitochondrial control of calcium-channel gating: A mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000), 97 (19): 10607 - 10612

Ireson, C., Orr, S., Jones, D. J. L., Verschoyle, R., Lim, C.-K., Luo, J.-L., Howells, L., Plummer, S., Jukes, R., Williams, M., Steward, W. P., Gescher, A.: Characterization of Metabolites of the Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Hepatocytes and in the Rat *in Vivo*, and Evaluation of Their Ability to Inhibit Phorbol Ester-induced Prostaglandin E₂ Production; *Cancer Res.* (2001), 61 (3): 1058 - 1064

Isacoff, E. Y., Jan, Y. N., Jan, L. Y.: Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the *Shaker* K⁺ channel; *Nature* (1991), 353 (6339): 86 - 90

Jacobsen, K., Papahadjopoulos, D.: Phase Transitions and Phase Separations in Phospholipid Membranes Induced by Changes in Temperature, pH, and Concentration of Bivalent Cations; *Biochemistry* (1975), 14 (1): 152 - 161

- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J.:** *Immunobiology: the immunsystem in health and disease*; Garland Publishing, New York (2001), 5. Auflage
- Janiak, M. J., Small, D. M., Shipley, G. G.:** Nature of the Thermal Pretransition of Synthetic Phospholipids: Dimyristoyl- and Dipalmitoyllecithin; *Biochemistry* (1976), 15 (21): 4575 - 4580
- Jaruga, E., Salvioli, S., Dobrucki, J., Chrul, S., Bandorowicz-Pikula, J., Sikora, E., Franceschi, C., Cossarizza, A., Bartosz, G.:** Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes; *FEBS Lett.* (1998a), 433 (3): 287 – 293
- Jaruga, E., Sokal, A., Chrul, S., Bartosz, G.:** Apoptosis-Independent Alterations in Membrane Dynamics Induced by Curcumin; *Exp. Cell Res.* (1998b), 245 (2): 303 - 312
- Jensen, B. S., Ødum, N., Jørgensen, N. K., Christophersen, P., Olesen, S.-P.:** Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca^{2+} -activated K^+ channels; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96 (19): 10917 - 10921
- Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A. S., Brenner, D. A., Sartor, R. B.:** Curcumin Blocks Cytokine-Mediated NF- κ B Activation and Proinflammatory Gene Expression by Inhibiting Inhibitory Factor I- κ B Kinase Activity; *J. Immunol.* (1999), 163 (6): 3474 - 3483
- Junginger, H.-E., Hofland, H. E. J., Bouwstra, J. A.:** Liposomen und Niosomen – Herstellung und Prüfung; *Pharmazeutische Zeitung* (1991), 136 (25): 1631 - 1641
- Kaiser, R. D., London, E.:** Location of Diphenylhexatriene (DPH) and Its Derivatives within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth; *Biochemistry* (1998), 37 (22): 8180 - 8190
- Kalman, K., Pennington, M. W., Lanigan, M. D., Nguyen, A., Rauer, H., Mahnir, V., Paschetto, K., Kem, W. R., Grissmer, S., Gutman, G. A., Christian, E. P., Cahalan, M. D., Norton, R. S., Chandy, K. G.:** ShK-Dap²², a Potent Kv1.3-specific Immunosuppressive Polypeptide; *J. Biol. Chem.* (1998), 273 (49): 32697 - 32707
- Kang, B. Y., Song, Y. J., Kim, K.-M., Choe, Y. K., Hwang, S. Y., Kim, T. S.:** Curcumin inhibits Th1 cytokine profile in CD4⁺ T cells by suppressing interleukin-12 production in macrophages; *Br. J. Pharmacol.* (1999), 128 (2): 380 - 384
- Kerschbaum, H. H., Cahalan, M. D.:** Single-Channel Recording of a Store-Operated Ca^{2+} Channel in Jurkat T Lymphocytes; *Science* (1999), 283 (5403): 836 - 839
- Khanna, R., Chang, M. C., Joiner, W. J., Kaczmarek, L. K., Schlichter, L. C.:** hSK4/hIK1, a Calmodulin-binding K_{Ca} Channel in Human T Lymphocytes; *J. Biol. Chem.* (1999), 274 (21): 14838 - 14849

Literaturverzeichnis

- Khopde, S. M., Priyadarsini, K. I., Palit, D. K., Mukherjee, T.:** Effect of Solvent on the Excited-state Photophysical Properties of Curcumin; *Photochem. Photobiol.* (2000), 72 (5): 625 - 631
- Kiuchi, F., Goto, Y., Sugimoto, N., Akao, N., Kondo, K., Tsuda, Y.:** Nematocidal Activity of Turmeric: Synergistic Action of Curcuminoids; *Chem. Pharm. Bull.* (1993), 41 (9): 1640 - 1643
- Klemic, K. G., Kirsch, G. E., Jones, S. W.:** U-Type Inactivation of Kv3.1 and *Shaker* Potassium Channels; *Biophys. J.* (2001), 81 (2): 814 - 826
- König, B.:** Analytische Untersuchungen zur Stabilität von Curcuminoiden sowie zu ihrer Eignung als hepatobiliäre Schwermetallausscheider; *Dissertation Universität Kiel* (1993)
- Körner, P.:** 3-Alkyl- and 3-Aryl-7H-furo[3,2-g]-1-benzopyran-7-ones: Synthesis, Photoreactivity, and Fluorescence Properties; *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* (2002), 335 (5): 187 – 199
- Körner, P.:** 3-Alkyl- and 3-Aryl-(7-oxo-7H-furo[3,2-g]chromen-5-yl)alkanoic Acids as Inhibitors of Leukotriene B₄ Biosynthesis; *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* (2003), 336 (6-7): 273 – 284
- Koester, J., Siegelbaum, S.:** *Neurowissenschaften*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1996)
- Koo, G. C., Blake, J. T., Talento, A., Nguyen, M., Lin, S., Sirotna, A., Shah, K., Mulvany, K., Hora, D., Cunningham, P., Wunderler, D. L., McManus, O. B., Slaughter, R., Bugianesi, R., Felix, J., Garcia, M., Williamson, J., Kaczorowski, G., Sigal, N. H., Springer, M. S., Feeny, W.:** Blockade of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 Inhibits Immune Response in Vivo; *J. Immunol.* (1997), 158 (11): 5120 - 5128
- Koo, G. C., Blake, J. T., Shah, K., Staruch, M. J., Dumont, F., Wunderler, D., Sanchez, M., McManus, O. B., Sirotna-Meisher, A., Fischer, P., Boltz, R. C., Goetz, M. A., Baker, R., Bao, J., Kayser, F., Rupprecht, K. M., Parsons, W. H., Tong, X.-C., Ita, I. E., Pivnichny, J., Vincent, S., Cunningham, P., Hora Jr., D., Feeny, W., Kaczorowski, G., Springer, M. S.:** Correolide and Derivatives Are Novel Immunosuppressants Blocking the Lymphocyte Kv1.3 Potassium Channels; *Cell. Immunol.* (1999), 197 (2): 99 - 107
- Goetz, M. A., Baker, R., Bao, J., Kayser, F., Rupprecht, K. M., Parsons, W. H., Tong, X.-C., Ita, I. E., Pivnichny, J., Vincent, S., Cunningham, P., Hora Jr., D., Feeny, W., Kaczorowski, G., Springer, M. S.:** Correolide and Derivatives Are Novel Immunosuppressants Blocking the Lymphocyte Kv1.3 Potassium Channels; *Cell. Immunol.* (1999), 197 (2): 99 - 107
- Kruse, J.:** Curcumin und synthetische Derivate als umgebungssensitive Fluoreszenzsonden; *Dissertation Universität Kiel* (2003)

- Kullmann, D. M.:** The neuronal channelopathies; *Brain* (2002), 125 (Pt6): 1177 - 1195
- Kuo, M.-L., Huang, T.-S., Lin, J.-K.:** Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells; *Biochim. Biophys. Acta* (1996), 1317 (2): 95 - 100
- Kurata, H. T., Soon, G. S., Eldstrom, J. R., Lu, G. W. K., Steele, D. F., Fedida, D.:** Amino-terminal Determinants of U-type Inactivation of Voltage-gated K⁺ Channels; *J. Biol. Chem.* (2002), 277 (32); 29045 - 29053
- Kuryshv, Y. A., Gudz, T. I., Brown, A. M., Wible, B. A.:** KChAP as a chaperone for specific K⁺ channels; *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2000), 278 (5): C931 – C941
- Lakowicz, J., R.:** *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Plenum Press, New York (1983)
- Lehmann-Horn, F., Jurkat-Rott, K.:** Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease; *Physiol. Rev.* (1999), 70 (4): 1317 - 1372
- Leinders, T., Vijverberg, H. P. M.:** Ca²⁺ dependence of small Ca²⁺-activated K⁺ channels in cultured N1E-115 mouse neuroblastoma cells; *Pflügers Arch.* (1992), 422 (3): 223 – 232
- Lentz, B. R., Barenholz, Y., Thompson, T. E.:** Fluorescence Depolarization Studies of Phase Transitions and Fluidity in Phospholipid Bilayers. 1. Single Component Phosphatidylcholine Liposomes; *Biochemistry* (1976), 15 (20): 4521 - 4528
- Lentz, B. R., Freire, E., Biltonen, R. L.:** Fluorescence and Calorimetric Studies of Phase Transitions in Phosphatidylcholine Multilayers: Kinetics of the Pretransition; *Biochemistry* (1978), 17 (21): 4475 - 4480
- Leonard, R. J., Garcia, M. L., Slaughter, R. S., Reuben, J. P.:** Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: Mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin; *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1992), 89 (21): 10094 - 10098
- Lewis, R. S.:** Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes; *Annu. Rev. Immunol.* (2001), 19 : 497 - 521
- Li, C. J., Zhang, L. J., Dezube, B. J., Crumpacker, C. S., Pardee, A. B.:** Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993), 90 (5): 1839 - 1842
- Lim, G. P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S. A., Cole, G. M.:** The Curry Spice Curcumin Reduces Oxidative Damage and Amyloid Pathology in an Alzheimer Transgenic Mouse; *J. Neurosci.* (2001), 21 (21): 8370 - 8377

Literaturverzeichnis

- Lysenko, Y. P., Potapenko, A. Y., Sukhorukov, V. L.:** Dependence of the absorption and fluorescence excitation spectra of the psoralens and coumarins on concentration; *Biophysics* (1988), 33 (5): 804 – 807
- Lysenko, E. P., Sukhorukov, V. L., Vunderlikh, Z., Shagova, L. I., Kuznetsova, G. A., Kuz'mina, L. V., Potapenko, A. Y.:** Effect of aggregation on the fluorescence properties of furocoumarins in solution; *Russ. J. Phys. Chem.* (1989), 63 (10): 1518 - 1521
- Mackenzie, A. B., Chirakkal, H., North, R. A.:** Kv1.3 potassium channels in human alveolar macrophages; *Am. J. Lung Cell. Mol. Physiol.* (2003), 285 (4): L862 – L868
- Mamero, B.:** Curcumin als Antioxidans: Schwermetallionenvermittelte radikalische Oxidation von Curcuminoiden; *Dissertation Universität Kiel* (1997)
- Möller, K.:** Acridone, Furo- und Pyranochinoline als Blocker von Kv-Kanälen – *patch-clamp* Untersuchungen und Studien zur Phototoxizität; *Dissertation Universität Kiel* (2000)
- Mogensen, T. H., Melchjorsen, J., Höllsberg, P., Paludan, S. R.:** Activation of NF- κ B in Virus-Infected Macrophages Is Dependent on Mitochondrial Oxidative Stress and Intracellular Calcium: Downstream Involvement of the Kinases TGF- β -Activated Kinase 1, Mitogen-Activated Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Kinase 1 and I κ B Kinase; *J. Immunol.* (2003), 170 (12): 6224 - 6233
- Moolenaar, W. H., Spector, I.:** The calcium current and the activation of a slow potassium conductance in voltage-clamped mouse neuroblastoma cells; *J. Physiol.* (1979), 292: 307 – 323
- Nairn, R. C., Rolland, J. M.:** Fluorescent probes to detect lymphocyte activation; *Clin. Exp. Immunol.* (1980), 39 (1): 1 - 13
- Narahashi, T., Tsunoo, A., Yoshii, M.:** Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells; *J. Physiol.* (1987), 383: 231 – 249
- Negulescu, P. A., Shastri, N., Cahalan, M. D.:** Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994), 91 (7): 2873 - 2877
- Neher, E., Sakmann, B.:** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres; *Nature* (1976), 260 (5554): 799 - 802
- Nguyen, A., Kath, J. C., Hanson, D. C., Biggers, M. S., Canniff, P. C., Donovan, C. B., Mather, R. J., Bruns, M. J., Rauer, H., Aiyar, J., Lepple-Wienhues, A., Gutman, G. A., Grissmer, S., Cahalan, M. D., Chandy, K. G.:** Novel Nonpeptide Agents Potently Block the C-Type Inactivated Conformation of Kv1.3 and Suppress T Cell Activation; *Mol. Pharmacol.* (1996), 50 (6): 1672 - 1679
- Numberger, M., Draguhn, A.:** *Patch-Clamp-Technik*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1996)

- Okano, Y., Iida, H., Yamauchi, T., Sekiya, T., Kuwabara, H., Goto, M., Nozawa, Y.:** Abnormalities of erythrocyte membranes in biliary atresia: Ultrastructure and lipid composition; *Clin. Chim. Acta* (1979), 94 (3): 317 - 325
- Ortiz, A., Villalaín, J., Gómez-Fernández, J. C.:** Interaction of Diacylglycerols with Phosphatidylcholine Vesicles As Studied by Differential Scanning Calorimetry and Fluorescence Probe Depolarisation; *Biochemistry* (1988), 27 (25): 9030 - 9036
- Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N., Jan, L. Y.:** Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence; *Nature* (1991), 349 (6307): 305 - 310
- Park, S.-Y., Kim, D. S. H. L.:** Discovery of Natural Products from *Curcuma longa* that Protect Cells from Beta-Amyloid Insult: A Drug Discovery Effort against Alzheimer's Disease; *J. Nat. Prod.* (2002), 65 (9): 1227 - 1231
- Parkin, J., Cohen, B.:** An overview of the immune system; *Lancet* (2001), 357 (9270): 1777 - 1789
- Pongs, O., Leicher, T., Berger, M., Roeper, J., Bähring, R., Wray, D., Giese, K. P., Silva, A. J., Storm, J. F.:** Functional and Molecular Aspects of Voltage-Gated K⁺ Channel β Subunits; *Ann. N Y Acad. Sci* (1999), 868: 344 - 355
- Pulla Reddy, A. C., Lokesh, B. R.:** Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes; *Mol. Cell. Biochem.* (1992), 111 (1-2): 117 - 124
- Quandt, F. N.:** Three kinetically distinct potassium channels in mouse neuroblastoma cells; *J. Physiol.* (1988), 395: 401 - 418
- Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Wang, S., Liu, S., Campbell, D. L., Brahmajothi, M. V., Strauss, H. C.:** Inactivation of Voltage-Gated Cardiac K⁺ Channels; *Circ. Res.* (1998), 82 (7): 739 - 750
- Rubas, W., Schreier, H.:** Liposomen: Fortschritte in Herstellungs-Technologie und Therapie; *Pharmazie in unserer Zeit* (1991), 20 (6): 255 - 270
- Salkoff, L., Baker, K., Butler, A., Covarrubias, M., Pak, M. D., Wei, A.:** An essential „set“ of K⁺ channels conserved in flies, mice and humans; *Trends Neurosci.* (1992), 15 (5): 161 - 166
- Sassaroli, M., Ruonala, M., Virtanen, J., Vauhkonen, M., Somerharju, P.:** Transversal Distribution of Acyl-Linked Pyrene Moieties in Liquid-Crystalline Phosphatidylcholine Bilayers. A Fluorescence Quenching Study; *Biochemistry* (1995), 34 (27): 8843 - 8851

Literaturverzeichnis

- Schmalhofer, W. A., Bao, J., McManus, O. B., Green, B., Matyskiela, M., Wunderler, D., Bugianesi, R. M., Felix, J. P., Hanner, M., Linde-Arias, A.-R., Ponte, C. G., Velasco, L., Koo, G., Staruch, M. J., Miao, S., Parsons, W. H., Rupprecht, K., Slaughter, R. S., Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L.: Identification of a New Class of Inhibitors of the Voltage-Gated Potassium Channel, $K_v1.3$, with Immunosuppressant Properties; *Biochemistry* (2002), 41 (24): 7781 - 7794
- Schmidt, W.: *Optische Spektroskopie*; Wiley-VCH, Weinheim (2000)
- Sewing, S., Roeper, J., Pongs, O.: $K_v\beta 1$ Subunit Binding Specific for *Shaker*-Related Potassium Channel α Subunits; *Neuron* (1996), 16 (2): 455 - 463
- Shieh, C.-C., Coghlan, M., Sullivan, J. P., Gopalakrishnan, M.: Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities; *Pharmacol. Rev.* (2000), 52 (4): 557 - 593
- Shinitzky, M., Barenholz, Y.: Dynamics of the Hydrocarbon Layer in Liposomes of Lecithin and Sphingomyelin Containing Dicapoylphosphate; *J. Biol. Chem.* (1974), 249 (8): 2652 - 2657
- Shinitzky, M., Inbar, M.: Difference in Microviscosity Induced by Different Cholesterol Levels in the Surface Membrane Lipid Layer of Normal Lymphocytes and Malignant Lymphoma Cells; *J. Mol. Biol.* (1974), 85 (4): 603 - 615
- Shinitzky, M., Barenholz, Y.: Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization; *Biochim. Biophys. Acta* (1978), 515 (4) : 367 - 394
- Siegers, C., Deters, M., Strubelt, O., Hänsel, W.: Choleric properties of different curcuminoids in the rat bile-fistula model; *Pharm. Pharmacol. Lett.* (1997), 7 (2/3): 87 - 89
- Singh, S., Aggarwal B. B.: Activation of Transcription Factor NF- κ B Is Suppressed by Curcumin (Diferuloylmethane); *J. Biol. Chem.* (1995), 270 (42): 24995 - 25000
- Slaughter, R. S., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J.: Ion Channels as Drug Targets in the Immune System; *Curr. Pharm. Des.* (1996), 2 (6): 610 - 623
- Sreejayan, N., Rao, M. N. A.: Free Radical Scavenging Activity of Curcuminoids; *Arzneimittelforschung* (1996), 46 (2): 169 - 171
- Srimal, R. C., Dhawan, B. N.: Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent; *J. Pharm. Pharmac.* (1973), 25 (6): 447 - 452
- Suurkuusk, J., Lentz, B. R., Barenholz, Y., Biltonen, R. L., Thompson, T. E.: A Calorimetric and Fluorescent Probe Study of the Gel-Liquid Crystalline Phase Transition in Small, Single-Lamellar Dipalmitoylphosphatidylcholine Vesicles; *Biochemistry* (1976), 15 (7): 1393 - 1401
- Teisseyre, A.: The „patch-clamp“ technique and its application in investigations of the properties of human t lymphocyte potassium channels; *Cell. Biol. Mol. Lett.* (2001), 6 (1): 93 - 105

- Tønnesen, H. H., Karlsen, J.:** Studies on Curcumin and Curcuminoids V: Alkaline Degradation of Curcumin; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* (1985a), 180: 132 – 134
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J.:** Studies on Curcumin and Curcuminoids VI: Kinetics of Curcumin Degradation in Aqueous Solution; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* (1985b), 180 (5): 402 – 404
- Vanderkooi, J., Fischkoff, S., Chance, B., Cooper R. A.:** Fluorescent Probe Analysis of the Lipid Architecture of Natural and Experimental Cholesterol-Rich Membranes; *Biochemistry* (1974), 13 (8): 1589 - 1595
- Vennekamp, J.:** Synthese und elektrophysiologische Testung hochwirksamer Psoralenderivate als nicht-peptidische Blocker des lymphozytären Kaliumkanals Kv1.3, *Dissertation Universität Kiel* (2002)
- Vist, M. R., Davis, J. H.:** Phase Equilibria of Cholesterol/Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures: ²H Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry; *Biochemistry* (1990), 29 (2): 451 - 464
- Wahlström, B., Blennow, G.:** A Study on the Fate of Curcumin in the Rat; *Acta Pharmacol. Toxicol.* (1978), 43 (2): 86 - 92
- Wei, A., Covarrubias, M., Butler, A., Baker, K., Pak, M., Salkoff, L.:** K⁺ Current Diversity Is Produced by an Extended Gene Family Conserved in *Drosophila* and Mouse; *Science* (1990), 248 (4955): 599 - 603
- Wei, A., Jegla, T., Salkoff, L.:** Eight Potassium Channel Families Revealed by the *C. elegans* Genome Project; *Neuropharmacology* (1996), 35 (7): 805 - 829
- Wible, B. A., Yang, Q., Kuryshev, Y. A., Accili, E. A., Brown, A. M.:** Cloning and Expression of a Novel K⁺ Channel Regulatory Protein, KChAP; *J. Biol. Chem.* (1998), 273 (19): 11745 - 11751
- Winter, R., Noll, F.:** *Methoden der Biophysikalischen Chemie*; Teubner, Stuttgart (1998)
- Wulff, H.:** Alkoxy-psoralene – eine neue Klasse nicht-peptidischer Blocker von Kaliumkanälen der Shaker Familie – Synthese und *in vitro* Untersuchungen zur Phototoxizität, *Dissertation Universität Kiel* (1998)
- Wulff, H., Miller, M. J., Hänsel, W., Grissmer, S., Cahalan, M. D., Chandy, K. G.:** Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, *IKCa1*: A potential immunosuppressant; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000), 97 (14): 8151 - 8156
- Wulff, H., Calabresi, P. A., Allie, R., Yun, S., Pennington, M., Beeton, C., Chandy, K. G.:** The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS; *J. Clin. Invest.* (2003), 111 (11): 1703 - 1713
- Yellen, G.:** Single Ca²⁺-activated nonselective cation channels in neuroblastoma; *Nature* (1982), 296 (5855): 357 – 359

Literaturverzeichnis

Yu, Z.-W., Quinn, P. J.: The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide (Review); *Mol. Membr. Biol.* (1998), 15 (2): 59 - 68

Zhang, F., Altorki, N. K., Mestre, J. R., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J.: Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells; *Carcinogenesis* (1999), 20 (3): 445 - 451

8 Anhang

Wie schon in Kapitel 4 beschrieben, traten bei den Patch-clamp-Untersuchungen der Curcuminoide und Psoralene immer wieder Probleme auf, welche die Auswertung der Daten erschwerten. Um dennoch sinnvolle Konzentrations-Wirkungs-Kurven und damit EC_{50} -Werte zu erhalten, wurden die Daten gemäß eines hier vorzustellenden Musters bearbeitet. Alle ermittelten Rohdaten bezüglich der Blockaden finden sich in Tabellenform in diesem Anhang, um das genaue Vorgehen transparent zu gestalten.

Bereinigung der Rohdaten

Eine gewöhnliche Konzentrations-Wirkungs-Kurve besitzt eine sigmoidale Form, beginnt bei 0% und endet bei 100% Wirkung, in diesem Fall also Blockade. Dies trifft auch für die getesteten Verbindungen zu, bei denen mit dem untersuchten Konzentrationsbereich die volle Wirkspanne erfasst werden konnte. Es gibt keinen offensichtlichen Grund, dass sich dies bei den anderen Substanzen, bei denen nicht die gesamte Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Messwerten abgedeckt werden konnte, anders verhält, da diese zu der gleichen Stoffklasse gehören. Daher wird auch für diese Verbindungen ein solcher Kurvenverlauf vorausgesetzt. Das bedeutet zwingend, dass mit steigender Konzentration auch die Blockade zunimmt. Dies war bei einigen Substanzen nicht immer gegeben, wie schon in Kapitel 4 beschrieben. Manchmal wurden die Blockadewerte bei steigender Konzentration wieder kleiner, manchmal wurden sogar negative Blockaden erhalten. Die Gründe für dieses Verhalten wurden in Kapitel 4 bereits diskutiert. Verwendet man alle diese Daten kritiklos zur Erzeugung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven, so entstehen ungewöhnliche und unrealistische Kurvenverläufe.

Da die blockierende Wirkung der Verbindungen mit steigender Konzentration nicht wieder kleiner werden dürfte, wurde mit solchen Werten folgendermaßen verfahren: Waren Blockadewerte kleiner als bei der davor vermessenen kleineren Konzentration, wurden sie nicht zur Erzeugung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve eingesetzt. Sofern die danach gemessenen Werte wieder anstiegen, wurden diese verwendet. Waren zwei aufeinanderfolgende Werte kleiner als der zuvor, so wurden alle folgende Werte dieses Experimentes gestrichen, da hier vermutlich ein generelles Problem vorlag. Werte zwischen 90% und 100% wurden auch verwendet, wenn zwei aufeinanderfolgende Blockadewerte leicht absanken, solange sie nicht unter 90% fielen. Dies lässt sich damit begründen, dass eine theoretische Blockade von 100% praktisch nie erreicht wird. Bereits bei Werten ab 90% ist der dann noch messbare Reststrom sehr klein und verändert sich dann von Konzentration zu

Anhang

Konzentration im Rahmen der Messungenauigkeit. So fanden sich hier auch nur maximale Schwankungen von 2%.

Auch negative Blockadewerte erscheinen nicht sinnvoll. Sie würden auf einen Kanalöffner hinweisen, was bei Betrachtung des Verhaltens der problemlos vermessenen Verbindungen sehr unwahrscheinlich ist. Zudem fanden sich solche negativen Werte immer nur bei einzelnen Experimenten mit einer Substanz und nie durchgängig bei allen. Diese negativen Blockadewerte wurden bei der ersten vermessenen Konzentration als 0% verstanden und der normalen Messungenauigkeit zugeschrieben, es sei denn, die anderen Experimente zeigten für die erste Konzentration deutlich höhere Blockaden. In diesem Fall wurde der negative Wert bei der Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven nicht verwendet. Traten solche negativen Blockaden zu späteren Zeitpunkten auf, wurden diese Werte für die Kurvenanpassung generell nicht berücksichtigt. Ergaben zwei Lösungen hintereinander negative Werte (mit Ausnahme der ersten vermessenen Konzentration), wurden alle weiteren Werte dieses Experiments für den betreffenden Strom nicht verwendet.

Zu beachten ist weiterhin, dass sich die verschiedenen Ionenströme nicht gleich verhielten. So konnte es vorkommen, dass bei einem bestimmten Experiment beispielsweise der Natriumstrom problemlos auswertbar war, während beim Kaliumendstrom nur der erste Blockadewert verwendet werden konnte. Sowohl die Einflüsse der Substanzen direkt als auch die Einflüsse der Veränderungen der Messparameter, wie z.B. die Größe des Sealwiderstandes, können sich bei den verschiedenen Kanälen durchaus unterscheiden. Daher wurden alle Ströme jeweils getrennt für sich betrachtet.

Die ausgelassenen Werte, die bei der Erzeugung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven keine Verwendung fanden, werden in den folgenden Tabellen durch eckige Klammern gekennzeichnet. Die negativen Werte zu Beginn eines Experiments, die als 0% angesehen wurden, sind kenntlich gemacht durch runde Klammern. Zusätzlich wurde jeweils eine 0 in das entsprechende Feld der Tabelle eingetragen. Leere Felder bedeuten, dass die betreffende Konzentration entweder nicht vermessen wurde oder die resultierenden Stromkurven aus verschiedenen Gründen nicht auswertbar waren.

Die Angaben in den Tabellen auf den folgenden Seiten verstehen sich als prozentuale Blockaden. Sie wurden aus den resultierenden Stromkurven nach Perfusion der entsprechenden Konzentrationen der verschiedenen Verbindungen

berechnet. Die verschiedenen Experimente sind dabei für jede einzelne Substanz in der Reihenfolge ihrer Entstehung aufgeführt.

8.1 Curcuminoide

8.1.1 L-929-Zellen

Curcumin

	1 μM	2 μM	3 μM	4 μM	5 μM	6 μM	8 μM	10 μM	12 μM	15 μM	20 μM
K_{peak}	2	13	22	[19]	35			90			
K_{end}	11	31	44	53	69			97			
K_{peak}		(-1) 0		[-2]		16	42	78		97	
K_{end}		4		17		46	75	93		97	
K_{peak}		5		6		13	17	27		70	90
K_{end}		11		23		43	63	76		90	91
K_{peak}						19	52	77	85		
K_{end}						38	69	78	[70]		
K_{peak}				31		54	79	91	96		
K_{end}				53		77	91	93	95		

Verbindung 1

	2 μM	4 μM	5 μM	6 μM	8 μM	10 μM	12 μM
K_{peak}			29			94	
K_{end}			46			96	
K_{peak}	(-6) 0	[-4]		6	36	74	86
K_{end}	(-1) 0	7		26	53	76	80
K_{peak}	3	11		33	66	92	95
K_{end}	5	18		45	73	90	93
K_{peak}		21		81	95		
K_{end}		34		89	97		
K_{peak}	8	16		41	64	86	94
K_{end}	22	47		74	88	96	97

Verbindung 2

	0,5 μM	1 μM	1,5 μM	2 μM	2,5 μM
K_{peak}		26			82
K_{end}		33			90

Verbindung 2 (Fortsetzung)

	0,5 μM	1 μM	1,5 μM	2 μM	2,5 μM
K_{peak}	9	33	67	88	
K_{end}	18	52	81	94	
K_{peak}	6	12	33	58	
K_{end}	10	19	45	70	
K_{peak}	7	34	67	88	
K_{end}	16	50	80	94	
K_{peak}	9	21	46	73	87
K_{end}	14	36	66	88	
K_{peak}	17	41	68	87	
K_{end}	19	49	73	89	

Verbindung 3

	2,5 μM	5 μM	7,5 μM	10 μM	17,5 μM	20 μM	25 μM	50 μM
K_{peak}	12	22		31	38		43	49
K_{end}	23	51		69	76		81	84
K_{peak}		16		28	35			
K_{end}		43		65	74			
K_{peak}	1	22	32	37		44		
K_{end}	12	49	65	70		78		
K_{peak}	8	62	Zusammenbruch des					
K_{end}	23	91	Sealwiderstandes					
K_{peak}	20	40		52	61	67		
K_{end}	34	74		88	94	92		

Verbindung 4

	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM	50 μM
K_{peak}	15	23	34	39	41
K_{end}	18	32	46	49	53
K_{peak}	3	14	39	[28]	59
K_{end}	6	18	43	[36]	63
K_{peak}	2	6	6	10	10
K_{end}	6	12	14	19	23
K_{peak}	4	7	9	14	17
K_{end}	13	22	34	41	47

Anhang

Verbindung 5

	2,5 μM	5 μM	10 μM	17,5 μM	25 μM
K_{peak}		30	65	79	
K_{end}		39	72	84	
K_{peak}		32	77	88	
K_{end}		39	83	91	
K_{peak}	12	39	64	72	
K_{end}	18	48	71	77	
K_{peak}		30	52	[40]	
K_{end}		34	58	[49]	
K_{peak}	15	47	70	77	82
K_{end}	24	56	76	83	87
K_{peak}	7	23	34	47	54
K_{end}	11	30	44	60	70

Verbindung 6

	5 μM	10 μM	15 μM	20 μM	25 μM	30 μM	40 μM
K_{peak}		14		29		51	60
K_{end}		16		33		57	67
K_{peak}	4	11	18	32	51		
K_{end}	11	23	35	51	67		
K_{peak}	4						
K_{end}	11						
K_{peak}	5	18	30	40	49		
K_{end}	6	26	37	49	60		
K_{peak}	6	12	35	37			
K_{end}	10	20	45	53			

Verbindung 7

	1 μM	2 μM	2,5 μM	3 μM	4 μM	5 μM
K_{peak}						71
K_{end}						72
K_{peak}	12		65			85
K_{end}	20		68			83
K_{peak}	5	28		39	47	48
K_{end}	10	40		53	63	63
K_{peak}	13	42		69	83	86
K_{end}	24	54		76	84	85

Verbindung 7 (Fortsetzung)

	1 μM	2 μM	2,5 μM	3 μM	4 μM	5 μM
K_{peak}	17	61	73	Zusammenbruch des Sealwiderstandes		
K_{end}	28	67	76			

Verbindung 8

	5 μM	10 μM	15 μM	20 μM	25 μM	50 μM
K_{peak}	17	37	48	61	72	85
K_{end}	26	53	66	79	85	90
K_{peak}	16	35	Zusammenbruch des Sealwiderstandes			
K_{end}	33	53				
K_{peak}	21	35	47	60	74	86
K_{end}	31	53	62	71	77	84
K_{peak}	8	18	28	37	49	71
K_{end}	15	29	45	57	70	88
K_{peak}	20	41	58	66	72	85
K_{end}	26	51	69	79	86	93

Verbindung 9

	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM	50 μM
K_{peak}	4	9	13	20	30
K_{end}	6	14	22	31	40
K_{peak}	3	7	13	20	22
K_{end}	7	14	23	32	38
K_{peak}	0	3	6	6	10
K_{end}	2	7	11	12	20
K_{peak}	4	14	23	31	38
K_{end}	11	23	32	43	51

Verbindung 10

	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM	50 μM
K_{peak}	5	13	16	22	29
K_{end}	10	27	[26]	40	47
K_{peak}	1	[-4]	[-4]	[1]	[6]
K_{end}	3	3	9	18	32
K_{peak}	2	4	10	14	21
K_{end}	4	12	21	24	35

Anhang

Verbindung 10 (Fortsetzung)

	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM	50 μM
K_{peak}	13	26	38	54	70
K_{end}	15	29	41	56	70
K_{peak}	3	5	5	[4]	6
K_{end}	3	10	11	14	19

8.1.2 N1E-115-Zellen

Curcumin

	5 μM	10 μM	15 μM	20 μM	25 μM
Na	6	14	28	52	Zusammenbruch des Sealwiderstandes
K_{peak}	26	45	69	84	
K_{end}	27	46	73		
Na	6	12	26	39	55
K_{peak}	24	45	67	80	87
K_{end}	34	49	71	79	88
Na	6	22	40	62	83
K_{peak}	18	39	68	86	94
K_{end}	25	55	75	90	97
Na	2	15	38	Zusammenbruch des Sealwiderstandes	
K_{peak}	26	50	77		
K_{end}	27	52	80		

Verbindung 1

	2,5 μM	5 μM	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM
Na	7	25	44	70	82	88
K_{peak}	13	32	55	81	85	88
K_{end}	14	38	62	87	91	
Na		5	15	35	47	[20]
K_{peak}		16	23	[20]	[3]	[15]
K_{end}		28	51	82	[58]	[60]
Na		8	38	72	83	87
K_{peak}		12	35	63	72	[-66]
K_{end}		7	42	77	82	[-195]

Verbindung 1 (Fortsetzung)

	2,5 μM	5 μM	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM
Na		6	32	63	[52]	[34]
K _{peak}		19	57	79	[78]	[-124]
K _{end}		30	73			
Na		3	21	31	37	Zusammenbruch des Sealwiderstandes
K _{peak}		17	48	[-5]	[-103]	
K _{end}		35	62	[-7]	[-146]	
Na		0	7	26	55	72
K _{peak}		12	30	58	77	79
K _{end}		16	35	66	83	85

Verbindung 2

	0,5 μM	1 μM	1,5 μM	2 μM	3 μM	4 μM	5 μM	10 μM
Na	4	15	25	Zusammenbruch des Sealwiderstandes				
K _{peak}	15	25	41					
K _{end}	18	35	45					
Na		8		35	51	62	72	
K _{peak}		9		48	68	83	86	
K _{end}		8		45	67	85	96	
Na		5		10	21	43	61	80
K _{peak}		3		25	44	70	89	[84]
K _{end}		5		26	47	71	95	
Na		5		19	39	54	63	82
K _{peak}		11		37	55	66	70	88
K _{end}		14		32	58	68	72	90

Verbindung 3

	5 μM	10 μM	15 μM	20 μM	25 μM	30 μM	40 μM	50 μM
Na		15		29		35	[30]	[19]
K _{peak}		24		39		57	[50]	[47]
K _{end}		34		61		74	[70]	[44]
Na		13		28		29	32	[30]
K _{peak}		31		49		56	[42]	[50]
K _{end}		37		56		64	[42]	[56]
Na	7	14	21	27	28	32		
K _{peak}	30	49	[46]	[41]	[56]	[48]		
K _{end}	53	74	75	[63]	[51]	[67]		

Anhang

Verbindung 3 (Fortsetzung)

	5 μ M	10 μ M	15 μ M	20 μ M	25 μ M	30 μ M	40 μ M	50 μ M
Na	12	28	42	54				
K _{peak}	24	51	64	[52]				
K _{end}	40	73	85	[53]				
Na	7	28	35	42	51	59		
K _{peak}	12	[-91]	[-67]	[8]	[8]	[33]		
K _{end}	[-2]	[-149]	[-52]	[-13]	[17]			
Na	9	24	24	[19]	[23]	[28]		[32]
K _{peak}	18	28	35	[26]	48	[42]		[-25]
K _{end}	29	48	50	[46]	55	[50]		[-49]
Na	4	13	21	32	37			
K _{peak}	26	45	54	64	66			
K _{end}	53	78	84	[75]	[73]			

Verbindung 4

	10 μ M	20 μ M	30 μ M	40 μ M
Na	(-7) 0	[-15]		
K _{peak}	0	6		
K _{end}	(-1) 0	5		
Na	0	0	[-1]	Zusammenbruch des Sealwiderstandes
K _{peak}	14	18	21	
K _{end}	6	20	24	
Na	2	[1]	5	6
K _{peak}	(-1) 0	9	[8]	17
K _{end}	21	[18]	[13]	[22]
Na	9	28	38	61
K _{peak}	20	37	38	44
K _{end}	20	29	44	55
Na	6	12	15	20
K _{peak}	11	[4]	20	26
K _{end}	20	[-1]	34	48
Na	1	6	7	13
K _{peak}	4	14	23	28
K _{end}	9	17	26	30
Na	(-8) 0	3	5	12
K _{peak}	7	21	29	41
K _{end}	13	23	39	51

Verbindung 5

	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM	50 μM
Na	(-1) 0	[-2]	[-4]	[-4]	[-4]
K _{peak}	6	13	27	41	55
K _{end}	4	6	25	42	54
Na	(-2) 0	0	2	[0]	[0]
K _{peak}	4	34	51	74	88
K _{end}	2	32	52	77	92
Na	2	Zusammenbruch des Sealwiderstandes			
K _{peak}	15				
K _{end}	19				
Na	8	17	44	47	
K _{peak}	22	38	64	81	
K _{end}	32	51	71	87	
Na	0	4	11	19	27
K _{peak}	15	26	35	[33]	51
K _{end}	13	30	39	47	[1]
Na	(-2) 0	[-5]	[-10]	[-13]	
K _{peak}	4	20	27	38	
K _{end}	11	21	35	45	
Na	1	[-2]	[-6]	[-10]	
K _{peak}	16	33	49	58	
K _{end}	26	39	63	63	

Verbindung 6

	5 μM	10 μM	15 μM	20 μM	30 μM	40 μM
Na		(-1)		[-10]	[-10]	[-12]
K _{peak}		11		[9]	91	
K _{end}		21		46	82	
Na		4	7	9		
K _{peak}		0	24	35		
K _{end}		13	42	45		
Na	5	7	11	17		
K _{peak}	8	13	39	67		
K _{end}	16	26	50	79		
Na	6	18	24			
K _{peak}	0	40	68			
K _{end}	22	49	77			

Anhang

Verbindung 6 (Fortsetzung)

	5 μ M	10 μ M	15 μ M	20 μ M	30 μ M	40 μ M
Na	7	22	33	37		
K _{peak}	17	56	77	92		
K _{end}	20	70	87			

Verbindung 7

	2,5 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M
Na			6	
K _{peak}			10	
K _{end}			22	
Na			29	Zusammenbruch des Sealwiderstandes
K _{peak}			[-24]	
K _{end}			32	
Na	3	4		Zusammenbruch des Sealwiderstandes
K _{peak}	13	19		
K _{end}	17	34		
Na			15	Zusammenbruch des Sealwiderstandes
K _{peak}			24	
K _{end}			43	
Na		1		Zusammenbruch des Sealwiderstandes
K _{peak}		28		
K _{end}		32		

Verbindung 8

	10 μ M	20 μ M	30 μ M	40 μ M	50 μ M
Na	4	7	10	14	18
K _{peak}	16	34	49	63	71
K _{end}	22	40	59	72	78
Na	(-4) 0	Zusammenbruch des Sealwiderstandes			
K _{peak}	28				
K _{end}	37				
Na	25	58	82	Zusammenbruch des Sealwiderstandes	
K _{peak}	33	72	84		
K _{end}	39	78	84		
Na	4	11	20	[18]	Zusammenbruch des Sealwiderstandes
K _{peak}	28	48	59	[25]	
K _{end}	39	62	72	[47]	

Verbindung 8 (Fortsetzung)

	10 μ M	20 μ M	30 μ M	40 μ M	50 μ M
Na	10	19	30	42	53
K _{peak}	32	53	68	77	84
K _{end}	50	68	81	89	[85]

Verbindung 9

	10 μ M	20 μ M	30 μ M	40 μ M	50 μ M	100 μ M
Na	4	11	Zusammenbruch des Sealwiderstandes			
K _{peak}	(-4) 0	5				
K _{end}	8	16				
Na	1	2	11	15	21	35
K _{peak}	5	[4]	18	21	[20]	51
K _{end}	10	[9]	21	33	37	62
Na	6	12	15	18	25	
K _{peak}	1	4	5	13	21	
K _{end}	3	6	17	31	42	
Na	(-2) 0	2	9	21	34	49
K _{peak}	4	15	27	27	36	49
K _{end}	16	27	36	47	57	68
Na	(-2) 0	[-1]	6	13	23	42
K _{peak}	7	15	19	28	38	48
K _{end}	9	19	22	33	43	52

Verbindung 10

	10 μ M	20 μ M	30 μ M	40 μ M	50 μ M	100 μ M
Na	1	3	8	13	[-34]	
K _{peak}	10	19	24	[23]	51	
K _{end}	6	15	30	30	58	
Na	0	[-3]	2	4	6	
K _{peak}	(-6) 0	2	5	7	22	
K _{end}	(-5) 0	22	26	35	35	
Na	0	0	[-2]	0	3	
K _{peak}	6	7	10	16	26	
K _{end}	7	[5]	16	30	39	
Na	0	[-2]	3	11	13	28
K _{peak}	0	12	[9]	[9]	[11]	[20]
K _{end}	4	11	15	19	21	26

Anhang

Verbindung 10 (Fortsetzung)

	10 μM	20 μM	30 μM	40 μM	50 μM	100 μM
Na	1	3	5	9	12	18
K_{peak}	(-1) 0	14	20	34	40	49
K_{end}	4	20	26	35	43	53

8.2 Psoralene

8.2.1 L-929-Zellen

Verbindung 11

	2,5 μM	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM
K_{peak}		32	65	66	
K_{end}		63	88	[84]	
K_{peak}				66	
K_{end}				94	
K_{peak}				65	
K_{end}				92	
K_{peak}				87	
K_{end}				98	
K_{peak}		19	38	76	
K_{end}		51	94	95	
K_{peak}	7	13	29	65	73
K_{end}	25	54	84	89	90
K_{peak}	7	21	39	70	[68]
K_{end}	28	63	93	97	97

Verbindung 12

	2,5 μM	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM
K_{peak}		41	69	70	86
K_{end}		74	89	[87]	91
K_{peak}	21	41	68		
K_{end}	52	79	90		
K_{peak}	20	61	80	[79]	85
K_{end}	46	85	95	92	94

Verbindung 12 (Fortsetzung)

	2,5 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
K_{peak}	38	58	66	[64]	70
K_{end}	65	72	72	[64]	74
K_{peak}	50	77	85	[82]	88
K_{end}	85	97	98	97	98

Verbindung 13

	0,5 μ M	1 μ M	2 μ M	3 μ M	4 μ M	5 μ M	25 μ M
K_{peak}						93	
K_{end}						97	
K_{peak}		44	86	93			
K_{end}		58	87	92			
K_{peak}	0	17	55	81	92	94	
K_{end}	11	44	79	94	98	99	
K_{peak}	8	52	78	90	91		
K_{end}	18	64	85	92	93		
K_{peak}	2	3	18			65	91
K_{end}	7	14	38			84	98
K_{peak}	28	73	91				
K_{end}	41	79	86				

Verbindung 14

	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
K_{peak}	4	4	[-3]	
K_{end}	31	33	[17]	
K_{peak}	1	11	28	
K_{end}	15	26	36	
K_{peak}	4	34	35	
K_{end}	32	67	72	
K_{peak}	(-1) 0			
K_{end}	23			
K_{peak}	14	30	37	
K_{end}	38	59	61	
K_{peak}				26
K_{end}				54
K_{peak}	15	[13]	20	41
K_{end}	36	37	44	58

Anhang

Verbindung 14 (Fortsetzung)

	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM
K_{peak}	12	14	[13]	21
K_{end}	31	32	[23]	[29]

Verbindung 15

	0,25 μM	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM
K_{peak}			65	98	
K_{end}			76	99	
K_{peak}		52	91	95	
K_{end}		49	91	93	
K_{peak}	0	13	58	84	
K_{end}	5	19	60	81	
K_{peak}	(-3) 0	16	74	90	
K_{end}					
K_{peak}	40	46	86	96	
K_{end}	37	57	92	98	
K_{peak}	6	19	58	85	91
K_{end}	11	31	67	85	89

Verbindung 16

	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM	10 μM
K_{peak}				78	
K_{end}				73	
K_{peak}				67	
K_{end}				66	
K_{peak}	0	3	42	87	91
K_{end}	8	12	54	88	88
K_{peak}	(-5) 0	11	57	88	
K_{end}	7	28	70	88	
K_{peak}	10	25	52	84	93
K_{end}	21	36	63	88	93

Verbindung 17

	0,5 μM	1 μM	2 μM	3 μM	5 μM
K_{peak}	12	39	39	40	43
K_{end}	32	66	66	68	70

Verbindung 18

	5 μ M	10 μ M	25 μ M
K_{peak}	6	[5]	7
K_{end}	25	[19]	[20]

8.2.2 N1E-115-Zellen**Verbindung 11**

	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
Na	10	19	31	Zusammenbruch des Sealwiderstandes
K_{peak}	9	14	30	
K_{end}	14	24	28	
Na	9			
K_{peak}	19			
K_{end}	32			
Na	2	6	17	30
K_{peak}	23	43	68	76
K_{end}	57	78	95	97
Na	(-1) 0	0	4	10
K_{peak}	16	35	65	80
K_{end}	34	72	96	98
Na	13	25	38	44
K_{peak}	14	31	47	48
K_{end}	38	77	96	[67]
Na	12	29	51	Zusammenbruch des Sealwiderstandes
K_{peak}	25	54	72	
K_{end}	55	87	[80]	

Verbindung 12

	2,5 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
Na	23	48	64	Zusammen- bruch des Sealwider- standes	
K_{peak}	37	54	54		
K_{end}	54	78	[66]		
Na	8	26	42	52	60
K_{peak}	25	33	47	[44]	[37]
K_{end}	46	54	71	[67]	[60]

Anhang

Verbindung 12 (Fortsetzung)

	2,5 μM	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM
Na	25	45	Zusammenbruch des Sealwiderstandes		
K _{peak}	29	43			
K _{end}	35	55			
Na	26	40	51	60	67
K _{peak}	0	25	31	41	70
K _{end}	1	26	32	44	72
Na	23	35	46	Zusammenbruch des Sealwiderstandes	
K _{peak}	33	42	55		
K _{end}	41	56	72		

Verbindung 13

	1 μM	2,5 μM	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM
Na	3	11	22	34	[32]	[22]
K _{peak}	11	23	37	56	[54]	[31]
K _{end}	27	55	79	87	88	[71]
Na	14	26	40	47	[44]	
K _{peak}	9	25	43	55	[53]	
K _{end}	28	67	86	93	94	
Na	14	28	40	52	55	
K _{peak}	21	47	63	76	77	
K _{end}	36	71	86	93	92	
Na	2	10	21	31	35	38
K _{peak}	6	22	45	62	65	[55]
K _{end}	15	40	69	84	86	[80]

Verbindung 14

	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM
Na	19	[18]	[15]	[28]
K _{peak}	27	28	[24]	[4]
K _{end}	59	69	[66]	[22]
Na	18	23	[21]	26
K _{peak}	19	[17]	[18]	[7]
K _{end}	50	54	56	[44]
Na	4	15	17	35
K _{peak}	14	16	[13]	[16]
K _{end}	37	46	[41]	[40]

Verbindung 14 (Fortsetzung)

	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM
Na	1	[-3]	[-5]	[-8]
K _{peak}	5	15	[8]	[7]
K _{end}	18	25	29	31
Na	5	[4]	13	17
K _{peak}	16	16	24	[23]
K _{end}	33	26	40	46

Verbindung 15

	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM
Na				11	21	26	
K _{peak}				57	69	[50]	
K _{end}				67	74	[58]	
Na	3	5	6	11	[10]	13	17
K _{peak}	5	13	35	45	[36]	[34]	[42]
K _{end}	17	38	64	68	[58]	[55]	[60]
Na		1	5	5	[2]	[-2]	[-3]
K _{peak}		6	16	23	[20]	[17]	[16]
K _{end}		19	42	53	[47]	[42]	[45]
Na		22	Zusammenbruch des Sealwiderstandes				
K _{peak}		(-6) 0					
K _{end}		6					
Na		1	11	[9]	[4]	[-2]	[-6]
K _{peak}		2	16	20	[18]	[18]	[22]
K _{end}		15	37	43	[40]	[36]	[39]
Na		12	30	[25]	[20]	[22]	[27]
K _{peak}		7	[-22]	[-10]	[5]	[3]	[15]
K _{end}		17	[-43]	[-63]	[-20]	[-25]	[14]

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Transkriptionsfaktor (activator protein 1)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BKCa	calciumabhängiger Kaliumkanal (big conductance)
CAM	Calmodulin
CD	cluster of differentiation
CIF	calcium influx factor
COX	Cyclooxygenase
CRAC	calcium release-activated calcium
CsA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	deuteriertes DMSO
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien
DPPC	L _α -Dipalmitoylphosphatidylcholin
DTH	allergische Typ IV-Reaktion (delayed-type hypersensitivity)
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EC ₅₀	Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
Fos	Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (\triangleq MHC)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
I κ B	inhibitorisches Protein für NF κ B
IKCa	calciumabhängiger Kaliumkanal (intermediate conductance)
IL	Interleukin
INF γ	Interferon γ
IP ₃	Inositoltriphosphat
KChAP	K ⁺ channel-associated protein
KcsA	Kaliumkanal aus Streptomyces lividans
K _{end}	Kaliumendstrom
Kir	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal (inward rectifier)
K _{peak}	Kaliumpeakstrom
KTX	Kaliotoxin
Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal (voltage-gated)
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
log P	Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
LOX	Lipoxygenase
MAP	Kinase (mitogen-activated protein)

MBP	myelinbasisches Protein
MgTX	Margatoxin
MHC	major histocompatibility complex (\triangleq HLA)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Multiple Sklerose
mTOR	mammalian target of rapamycin
Na	Natrium; Natriumstrom
NADH	reduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotids
Nav	spannungsabhängiger Natriumkanal (voltage-gated)
NFAT	Transkriptionsfaktor (nuclear factor of activated T cells)
NF κ B	Transkriptionsfaktor (nuclear factor κ B)
NMR	Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
PBS	phosphat buffered saline
PHA	Phytohämagglutinin
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
PIP ₂	Phosphoinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase γ
ras	GTP-bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of the mean
SERCA	Sarco-Endoplasmatisches Retikulum-Ca ²⁺ -ATPase
ShK	kaliumkanalblockierendes Seeanemonen-Toxin
ShK-Dap ²²	verändertes ShK mit hoher Selektivität für Kv1.3
SKCa	calciumabhängiger Kaliumkanal (small conductance)
SOC	store-operated channel
Tc	zytotoxische T-Zellen
T _{CM}	zentrale Gedächtniszellen (central memory cells)
TEA	Tetraethylammoniumion
T _{EM}	Effektor-Gedächtniszellen (effector memory cells)
Th	T-Helfer-Zellen
THF	Tetrahydrofuran
TK	Tyrosinkinase
TZR	T-Zell-Rezeptor
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbar (visible)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Hänsel.

Herrn Prof. Dr. W. Hänsel möchte ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Überlassung des faszinierenden Themas danken, bei dessen Bearbeitung er mir größten wissenschaftlichen Freiraum ließ.

Herrn Prof. Dr. S. Grissmer aus Ulm schulde ich ganz besonderen Dank für die Überlassung der L-929-Zellen, die fortwährende und schnelle Hilfestellung bei allen elektrophysiologischen Problemen und die großzügige finanzielle Unterstützung, die einen mehrwöchigen Forschungsaufenthalt in seinem Labor ermöglichte.

Für das Bereitstellen der untersuchten Substanzen danke ich Herrn Dr. J. Kruse und Herrn Dr. P. Körner. Ersterem gilt darüber hinaus mein Dank für die Einarbeitung in die Fluoreszenzanisotropie-Messungen.

Bei Frau Dr. T. Herzog und Frau Dr. K. Möller bedanke ich mich für die Einführung in die Patch-clamp-Technik.

Frau Susan Häuer möchte ich meinen herzlichen Dank für die Hege und Pflege der Zellen und die Wiederfindungsstudien mittels der HPLC aussprechen.

Herrn B. Henke danke ich für die Untersuchungen zu der Stabilität der Curcuminoide.

Bei den wissenschaftlichen Hilfskräften Inken Groth, Helge Müller und Ina Lange bedanke ich mich für die Aufnahme von zahlreichen Schmelzkurven.

Ein besonderer Dank geht an die Herren Dr. S. Brodersen, Dr. U. Girreser und A. Schmitz für das sorgfältige und dennoch zügige Korrekturlesen dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. D. Heber möchte ich in diesem Zusammenhang für die Hilfe in allen Fragen der Nomenklatur danken.

Für ständige Diskussionsbereitschaft und viele nützliche Denkanstöße besonders in der letzten Phase meiner Promotion schulde ich Herrn Dr. U. Girreser großen Dank.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Wernekenschnieder
Vorname: Anja
Geburtsdatum: 18.02.1975
Geburtsort: Kiel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

August 1981 – Juni 1985 Grundsule am Göteborgring, Kiel
August 1985 – Juni 1994 Gymnasium Kronshagen, Kronshagen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium und Pharmaziepraktikum

Oktober 1994 – November 1998 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
September 1996 1. Staatsexamen
November 1998 2. Staatsexamen
Januar 1999 – Juni 1999 1. Hälfte des Praktischen Jahres in der Kastanien Apotheke, Kiel
Juli 1999 bis Dezember 1999 2. Hälfte des Praktischen Jahres bei der Ferring GmbH, Kiel
Januar 2000 3. Staatsexamen
Januar 2000 Approbation als Apothekerin

Sonstiges

August 1996 – Juni 1998 Wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
April 2003 Apothekerin für Pharmazeutische Analytik

Seit dem 01.03.2000 bin ich als wissenschaftliche Angestellte am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel tätig. Gleichzeitig begann ich die vorliegende Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. W. Hänsel.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig unter Beratung meines wissenschaftlichen Lehrers und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln erstellt habe.

Kiel, den