AUS DER KLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard M. Graf, MSc.

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss von Sedativa und Hypnotika auf die neuronale, cGMP-spezifische Phosphodiesteraseaktivität

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Alexandra Will

2016

AUS DER KLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard M. Graf, MSc.

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss von Sedativa und Hypnotika auf die neuronale, cGMP-spezifische Phosphodiesteraseaktivität

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Alexandra Will

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sigrid Wittmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Helmut Schweikl

Tag der mündlichen Prüfung:23.11.2016

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis 8

2 Einführung 9

2.1 cGMP-Signalweg 9

2.1.1 Synthese 10

2.1.1.1 pGC 11

2.1.1.2 sGC 12

2.1.2 Abbau 13

2.1.2.1 PDE1 16

2.1.2.2 PDE2 16

2.1.2.3 PDE3 17

2.1.2.4 PDE5 17

2.1.2.5 PDE6 18

2.1.2.6 PDE9 19

2.1.2.7 PDE10 19

2.1.3 Effektoren 20

2.1.3.1 PDE 21

2.1.3.2 PKG 21

2.1.3.3 CNG und HCN 22

2.2 Klinische Anwendung des cGMP-Signalwegs 23

2.3 Interaktion mit Hypnotika und Sedativa 24

2.4 Grundlagen der Enzymkinetik 26

3 Zielsetzung 29

4 Materialien und Methoden 30

4.1 Herstellerverzeichnis 30

4.2 Versuchstiere 31

4.3 Probengewinnung 31

4.3.1 Homogenisierung 31

4.3.2 Proteinextraktion 32

4.3.3 Proteinmengenbestimmung 33

4.4 Versuchsprotokolle 33

4.4.1 Vorbereitung 33

4.4.2 Durchführung 34

4.4.3 Verwendete Testsubstanzen und Konzentrationen 35

4.5 Mant-cGMP-Quantifizierung 36

4.5.1 Reagenzien und Kalibrierung 36

4.5.2 RP-HPLC-Methode 36

4.6 Auswertung des enzymatischen Umsatzes 37

4.6.1 Betrachtung des Substratabfalls über die Zeit 37

4.6.2 Bestimmung der Parameter V_{max} und K_m 37

4.6.3 Quotientberechnung 39

4.7 Statistik 39

5 Ergebnisse 40

5.1 Methodenvergleich 40

5.1.1 Varianten der Proteingewinnung 40

5.1.2 V_{max} und K_m in Abhängigkeit der Bestimmungsmethode 41

5.2 Validierung der Methoden 43

5.2.1 Denaturiertes Protein 43

5.2.2 IBMX 43

5.2.3 ODQ 46

5.3 Experimente mit Sedativa und Hypnotika 47

5.3.1 Propofol 47

5.3.2 Thiopental 49

5.3.3 Diazepam 53

6 Diskussion 58

6.1 Wahl der Proteingewinnungsmethode 58

6.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter 59

6.3 Versuchsaufbau 61

6.4 Sedativa und Hypnotika 63

6.4.1 Propofol 64

6.4.2 Thiopental 65

6.4.3 Diazepam 68

7 Zusammenfassung 74

8 Anhang 76

9 Literaturverzeichnis 78

10 Lebenslauf 88

11 Danksagung 89

1 Abkürzungsverzeichnis

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid
BNP	Brain natriuretic peptide / natiruretisches Peptid Typ B
cAMP	Cyclic andenosine monophosphate / zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate / zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-type natriuretic peptide / Natiruretisches Peptid Typ C
DMSO	Dimethylsulfoxid
GAF	cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA
GC	Guanylatzyklase
GTP	Guanosintriphosphat
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
Mant-cGMP	2‘-O-N’Methylanthraniloylguanosine-3‘-5‘-cyclic monophosphat
mRNA	Messenger-ribonucleic acid
n	Stichprobengröße
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4, 3-a]quinoxalin-1-one
PBS	Phosphate buffered saline
PDE(s)	Phosphodiesterase(n)
pGC	Particulate guanylate cyclase / membrangebundene GC
PKG	Proteinkinase Typ G
PP_i	Diphosphat
RP-HPLC	Reversed phase high-performance liquid chromatography
[S]	Substratkonzentration
sGC	Soluble guanylate cyclase / zytosolische GC
V	Reaktionsgeschwindigkeit
V_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit

2 Einführung

Als Vielzeller ist der Körper auf eine präzise Kommunikation zwischen den Zellen angewiesen. Dabei agieren Hormone als chemische Botenstoffe im extrazellulären Raum. Binden sie an membranständige Rezeptoren der Zielzelle, muss die Information über die Zellmembran hinweg nach intrazellulär weitergeleitet werden. Vor der Identifizierung der beteiligten Moleküle war wenig über den Weitergabemechanismus zwischen dem extrazellulären und intrazellulären Raum bekannt. In den Jahren von 1958 bis 1971 wurde entdeckt, dass die beiden zyklischen Nukleotide zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) als intrazelluläre Botenstoffe wirken. Eine extrazelluläre Hormonbindung führt zu einer intrazellulären Konzentrationsänderung von cAMP und cGMP, die damit zu den „second messengers“ gezählt werden [1].

In der Forschung fand cGMP im Gegensatz zu cAMP in den Jahren nach seiner Erstbeschreibung zunächst wenig Beachtung. Heute ist cGMP als wichtiger intrazellulärer Botenstoff erforscht und viele Aufgaben von cGMP sind bekannt. Da cGMP ubiquitär in den verschiedenen Geweben vorkommt, spielt es bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine zentrale Rolle [2]. Auf intrazellulärer Ebene zählen dazu unter anderem die Regulation von Genexpression, Zellproliferation und eine enge Verknüpfung mit der Kalziumhomöostase [2,3]. Weiter ist cGMP von großer Bedeutung bei der retinalen Phototransduktion, der Thrombozytenfunktion, der Homöostase des kardiovaskulären Systems, der Regulation metabolischer Prozesse und der Neurotransmission [4–9]. Gegenstand intensiver Forschung ist die Rolle von cGMP bei pathologischen und malignen Prozessen sowie die Entwicklung neuer Therapieansätze [2,10].

2.1 cGMP-Signalweg

Der stimulierte Anstieg und Abfall des basalen cGMP-Spiegels werden in der Zelle als Informationsträger genutzt [11]. Aufgrund der komplexen Regulation der Enzyme, die für Synthese und Abbau zuständig sind, ist die Information nicht nur durch das Ausmaß der Konzentrationsänderung, sondern auch durch deren zeitlichen Verlauf und durch die subzelluläre Lokalisation codiert. Neben der exakten Regulation des Auf- und Abbaus ist der cGMP-Signalweg über die Interaktionen mit verschiedenen Effektormolekülen mit zahlreichen essentiellen Funktionen der Zellen vernetzt [12].

2.1.1 Synthese

Als Antwort auf einen Stimulus katalysieren Enzyme aus der Familie der Guanylatzyklasen (GC) die Bildung von cGMP aus dem Substrat Guanosintriphosphat (GTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat. Diese Enzymfamilie umfasst sowohl membrangebundene (pGC, engl. particulate guanylate cyclase) als auch zytosolische (sGC, engl. soluble guanylate cyclase) Formen. Die katalytischen Domänen dieser beiden Subfamilien sind nahezu homolog und mit denen der Adenylatzyklasen, welche cAMP bilden, verwandt. Die Moleküle sind ausschließlich als Dimere aktiv und benötigen für eine hohe enzymatische Wechselzahl bivalente Kationen, bevorzugt Mg^{2+} und Mn^{2+}, als Cofaktoren [12]. Neben der subzellulären Lokalisation unterscheiden sich auch die aktivierenden Liganden der beiden Guanylatzyklasen (s. Abbildung 1) [13]. Guanylatzyklasen wurden in nahezu allen Geweben nachgewiesen [12]. Im Gehirn wird in Neuronen überwiegend sGC, in den Gliazellen pGC exprimiert [14].

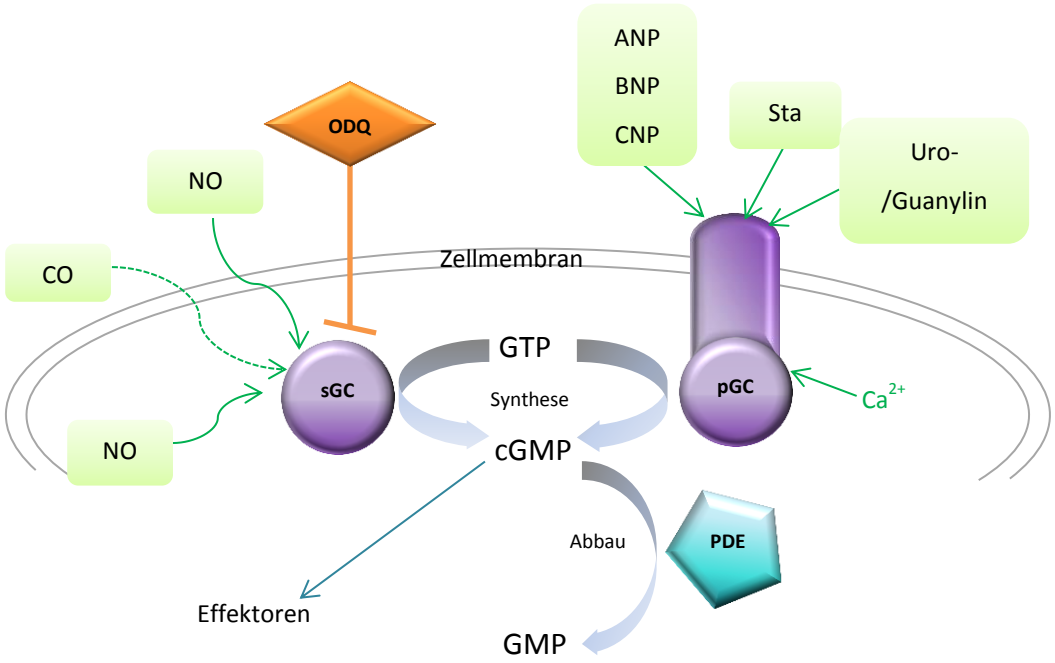

Abbildung 1:
Schematische Darstellung des cGMP-Stoffwechsels: physiologische Stimulatoren (grün); pharmakologischer Inhibitor (orange); Synthese (lila); Abbau (blau);
Sta = bakterielles Enterotoxin; weitere Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

2.1.1.1 pGC

Bei den membrangebundenen Guanylatzyklasen (pGCs) handelt es sich um große Transmembranproteine, die in sieben Isoformen eingeteilt werden: GC-A bis GC-G. Sie unterscheiden sich in der Gewebeverteilung, Ligandenspezifität und Regulation [15]. Die extrazelluläre Komponente der Isoformen GC-A und GC-B dient als Rezeptor für natriuretische Peptidhormone (ANP, BNP, CNP).

Die ANP- und BNP-Rezeptorguanylatzyklasen kommen ubiquitär im Körper vor und vermitteln komplexe Hormoneffekte. Während ANP und BNP als Liganden von GC-A unter anderem blutdrucksenkend und kardioprotektiv wirken, steuert CNP via GC-B Körperfunktionen wie das Knochenwachstum [16]. Im Darm findet sich eine weitere pGC-Isoform (GC-C), die eine wichtige Rolle bei der Flüssigkeits- und Elektrolytregulation spielt [15]. Bei den Formen GC-D bis GC-F handelt es sich um kalziumsensitive Guanylatzyklasen, die in der Retina, im olfaktorischen Epithel, in lichtempfindlichen Zellen der Pinealdrüse sowie in Neuronen der Geschmackswahrnehmung nachgewiesen sind. Daher wird ihnen eine entscheidende Rolle bei der sensorischen Neurotransmission, insbesondere bei der Generierung von Aktionspotentialen, zugeschrieben [17]. Die GC-G wird als „Orphan“-Rezeptor kategorisiert, deren Ligand noch nicht identifiziert wurde [18].

2.1.1.2 sGC

Bei der katalytisch aktiven, zytosolischen Guanylatzyklase (sGC) handelt es sich um ein dimeres Protein, das aus einer α– und einer β–Untereinheit (Isoformen $\alpha_{1/2}$, $\beta_{1/2}$) besteht, wobei die β_1-Untereinheit eine hämbindende Domäne (H-NOX) enthält [11]. Im Gegensatz zu anderen Häm-Proteinen bindet die sGC keinen Sauerstoff (O_2), sondern ist selektiv für Stickstoffmonoxid (NO). Durch die Insensivität gegenüber O_2 kann die sGC als NO-Rezeptor im aeroben Zellmilieu wirken. Bindet NO, das als parakriner Transmitter und Neurotransmitter wirkt, an das Eisen der Häm-Gruppe, steigert sich die Zyklaseaktivität um das 100- bis 200-fache. Dies hat einen cGMP-Anstieg innerhalb von Millisekunden zur Folge. Ebenfalls kann Kohlenmonoxid an die sGC binden, jedoch führt dies zu einer deutlich geringeren Aktivitätssteigerung der cGMP-Produktion [19–21]. Auch das Redoxmilieu spielt eine wichtige Rolle für die Aktivität der sGC [11]. Weiter wird die sGC über negatives Feedback reguliert, indem die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ G (PKG) eine Phosphatase aktiviert, die die Aktivität der sGC herabsetzt [22].

Darüber hinaus existieren exogene Inhibitoren und Aktivatoren. Ursprünglich wurde YC-1 identifiziert, ein Häm-bindender Stimulator, der sowohl NO-unabhängig als auch synergistisch mit NO die Aktivität von sGC steigert. Seit seiner Erstbeschreibung 1994 sind viele Nachfolgesubstanzen entwickelt worden. Dazu zählt auch Riociguat, das in klinischen Phase-III-Studien zur Behandlung von pulmonaler Hypertonie eingesetzt wird [23]. Eine weitere Aktivator-Klasse wurde ab 1997 beschrieben, die Häm-unabhängig die Produktion von cGMP steigert [23]. Selektive Hemmstoff der sGC sind Methylenblau, ODQ und das ODQ-Derivat NS 2028 [24–26]. ODQ bindet kompetitiv zu NO und verhindert so eine Aktivierung der sGC durch NO, ohne dabei Einfluss auf die basale Wechselzahl des Enzyms zu nehmen [25]. Die Hemmung durch ODQ ist irreversibel, da das Häm-Eisen oxidiert wird [27].

2.1.2 Abbau

In intakten Zellen wird der cGMP-Spiegel auf zwei verschiedene Arten gesenkt. Von untergeordneter Rolle sind ATP-abhängige „multidrug“-Transporter, die cGMP ausschleusen und so die intrazelluläre Verfügbarkeit senken. Vermutlich sind sie vor allem für die lokale Kontrolle des cGMP-Spiegels im Mikromilieu bei cGMP-Überproduktion und bei blockiertem Abbau zuständig [28]. Von viel größerer Bedeutung, insbesondere in vitro, sind die Enzyme aus der Familie der Phosphodiesterasen (PDEs). Sie katalysieren selektiv die Hydrolyse der 3‘-Bindung des zyklischen Phosphats von cGMP und / oder cAMP [12,29,30]. Der cGMP-Abbau stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der cGMP-Homöostase dar, da die physiologischen Konzentrationen von cGMP unterhalb der Affinitätskonstante nach Michaelis-Menten (K_m) und unterhalb der maximalen Wechselzahl der PDEs liegen [2,31]. Neben der Höhe des cGMP-Spiegel können PDEs auch den zeitlichen Verlauf des Anstiegs und die intrazelluläre Lokalisation kontrollieren [12].

Ermöglicht wird diese komplexe Regulierung von über 100 Isoenzymen, die spezifisch mit unterschiedlichen Signalwegen interagieren und durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Auch durch eine variable Expression der PDEs und ihrer Isoenzyme innerhalb einer Zelle wird der cGMP-Haushalt gesteuert. Im humanen Genom sind insgesamt 21 PDE-Gene bekannt. Durch unterschiedliche Transkriptionsstarts, Splicing-Varianten und post-translationelle Modifikationen kann ein Gen verschiedene Proteine codieren [2,12]. Die Isoenzyme werden hinsichtlich des codierenden Gens, Sequenzhomologie, Substratspezifität, Regulationsmechanismen und Sensitivität für Pharmaka in elf Familien eingeteilt und mit den Ziffern 1-11 bezeichnet.

Unter physiologischen Bedingungen sind die PDE-Familien 4, 7 und 8 spezifisch für cAMP. Die PDEs 5, 6, und 9 hydrolysieren spezifisch cGMP. Die PDE-Familien 1, 2, 3, 10 und 11 besitzen eine duale Substratspezifität und katalysieren mit unterschiedlich kinetischen Eigenschaften beide Nukleotide [2]. Da die physiologische cAMP-Konzentration dem Zehnfachen der cGMP-Konzentration entspricht, dürften die dualspezifischen PDEs in vivo überwiegend cAMP hydrolysieren [1].

Die katalytische Domäne der PDEs weist innerhalb der PDE-Familien eine Sequenzhomologie von 85 % auf. Zwischen den PDE-Familien ist sie zu 25-45 % identisch [32]. Die regulatorischen Domänen und die Domänen, welche die intrazelluläre Lokalisation determinieren, variieren in sehr viel größerem Umfang. Dazu zählen Kalzium-Calmodulin-Bindungsstellen, Phosphorylierungdomänen, Bindungsstellen für regulatorische Proteine und GAF-Domänen, die allosterische cGMP(cAMP)-Bindungsstellen darstellen (s. Abbildung 2) [33]. Die Bezeichnung „GAF-Domäne“ ist ein Akronym der Enzyme, die eine solche allosterische Nukleotidbindungsstelle aufweisen [34].

Auch exogen modulierende Substanzen, in der Regel Inhibitoren, werden in der Forschung und zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. Neben selektiven Inhibitoren für PDE1 bis PDE5 und PDE7 und PDE9, sind auch ubiquitäre Hemmstoffe wie IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) bekannt [2]. Bei IBMX handelt es sich um methyliertes Xanthinderivat, das alle PDE-Familien außer PDE8 und PDE9 kompetitiv inhibiert [35,36].

PDEs wurden in nahezu allen Geweben nachgewiesen. Dabei zeigt sich, dass ubiquitäre wie zum Beispiel PDE5- und organspezifische wie PDE6-Familien existieren [2]. In neuronalem Gewebe kommen unter den cGMP-hydrolisierenden PDEs neben der PDE6 in Pinealozyten auch die PDE-Familien 1, 2, 3, 5, 9 und 10 vor [37,38]. Sie sollen im Folgenden vorgestellt werden.

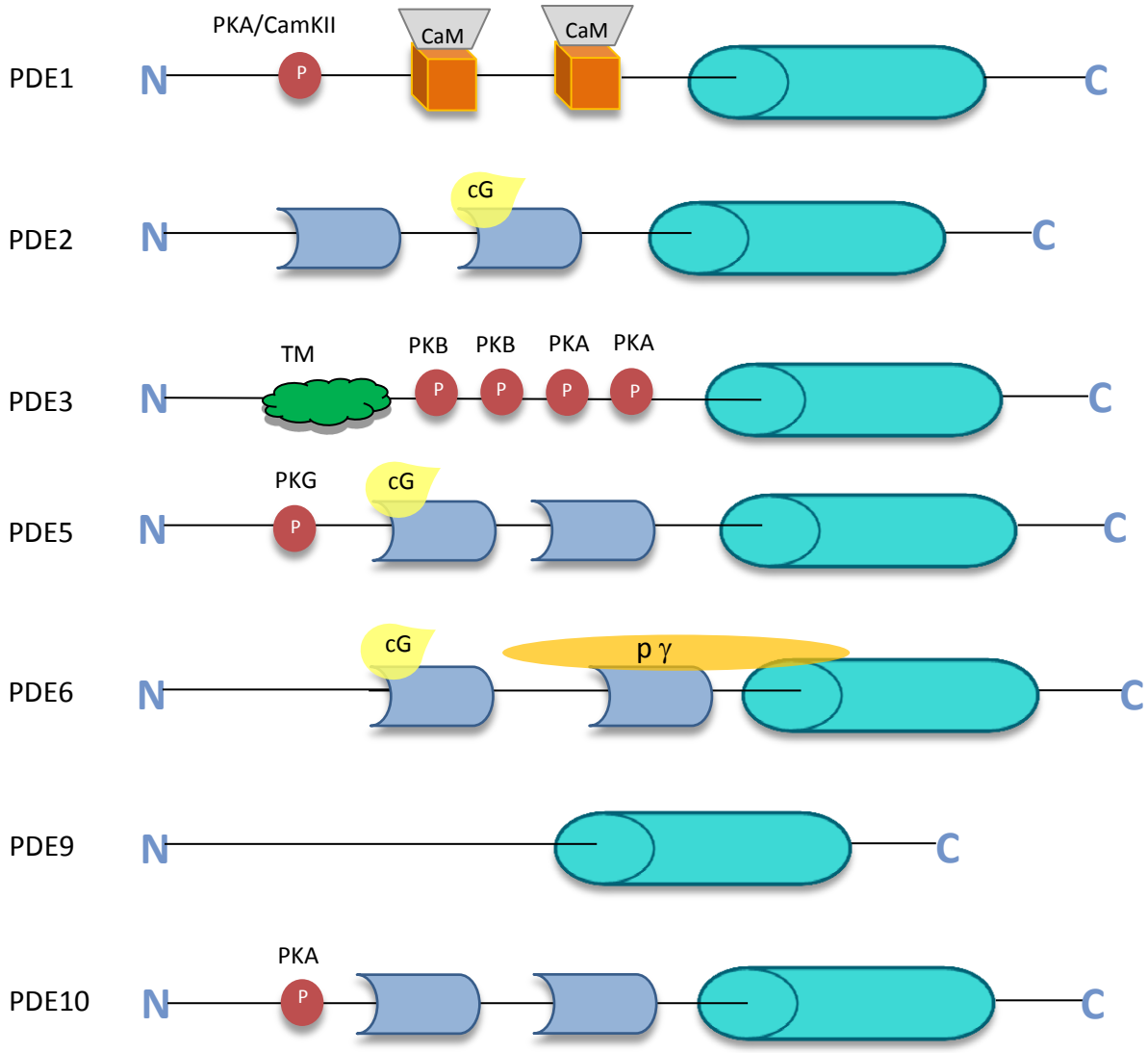

Abbildung 2:
Schematische Darstellung der Proteinstruktur der neuronalen, cGMP-hydrolysierenden PDE-Familien; N = Aminoterminus; C = Carboxyterminus nach Conti, Beavo 2007*[1]*

2.1.2.1 PDE1

Die PDE1-Familie - eine der Ersten, die beschrieben wurden - umfasst drei Gene, die für PDE1A, PDE1B und PDE1C codieren [2,39]. Alle drei Formen sind überwiegend im Zytosol lokalisiert [33]. Es wird angenommen, dass der katalytisch aktive Komplex aus einem Homodimer mit je einem Calmodulin besteht [2]. Charakteristisch für PDE1 ist die Aktivierung durch eine Kalzium-Calmodulin-Bindung. Diese Aktivierung beruht auf einer Steigerung der V_{max}, wohingegen die K_m kaum beeinflusst wird [40]. Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität für Kalzium reguliert das Expressionsmuster der PDE1-Isoenzyme die kalziumabhängigen zyklischen Nukleotidspiegel [2]. Die Sensitivität für Kalzium kann durch eine Phosphorylierung durch cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und durch CaM-Kinase II gesenkt werden [41,42]. Alle PDE1-Enzyme können sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren. Die Affinität für die einzelnen Nukleotide ist dabei von der Isoform abhängig. PDE1A und PDE1B binden bevorzugt cGMP, wohingegen PDE1C gleich affin für cGMP und cAMP ist [2]. Die PDE1-Isoformen wurden im männlichen Reproduktionstrakt, in Herz und Lunge, in der glatten Muskulatur, in Lymphozyten und im olfaktorischen Epithel nachgewiesen [2,43,44]. Darüber hinaus werden alle PDE1-Isoenzyme sehr stark im Gehirn exprimiert [45]. PDE1A ist unter anderem im Hippocampus präsent und nimmt dort eine wichtige Funktion bei „long-term-potentation“ von Signalen ein. PDE1B wurde eine Rolle bei der dopaminergen Rezeptorphysiologie des Striatums nachgewiesen [46]. Weiter sind die PDE1-Isoformen in vielen anderen Neuronen und Gliazellen vertreten und tragen zu der Regulation der physiologischen Abläufe des Gehirns bei. Besonders bei der Koordination der beiden „second-messenger“-Systeme, den zyklischen Nukleotiden und dem intrazellulären Kalziumspiegel, sind die PDE1-Enzyme unerlässlich [33].

2.1.2.2 PDE2

Die PDE2-Familie wurde zunächst als cGMP-stimulierte PDE bezeichnet [47]. Derzeit sind drei verschiedene Splice-Varianten (PDE2A1-3) eines Gens bekannt, die die gleichen kinetischen Eigenschaften besitzen. Die Enzyme kommen zytosolisch vor und können an der Plasmamembran, am sarkoplasmatischen Retikulum, am Golgi-Apparat und an der Kernhülle assoziiert sein [33]. Die PDE2-Enzyme hydrolysieren cAMP und cGMP mit der gleichen Geschwindigkeit, wobei die Affinität für cGMP höher ist als die für cAMP [2].

Zwei GAF-Domänen (GAF-A und GAF-B) wurden identifiziert, die für die Dimerisierung und die allosterische Regulierung von Bedeutung sind [48]. Die GAF-B-Domäne bindet cGMP 30- bis 100-fach affiner als cAMP und aktiviert dadurch das Enzym nach dem „Alles-oder-nichts-Prinzip“ [49]. Da unter physiologischen Bedingungen cAMP in viel höheren Konzentrationen vorliegt, hydrolysieren PDE2-Enzyme überwiegend cAMP, was von cGMP allosterisch stimuliert wird. Die umgekehrte Situation wird aufgrund der Bindungseigenschaften von PDE2 und der Konzentrationsverhältnisse der Nukleotide nicht angenommen [2]. Einen Inhibitor stellt der neural growth factor (NGF) dar, indem er die Bindung der PDE2 an Phosphoproteine steigert [50]. Neben der Funktion im cAMP-Stoffwechsel wirkt die PDE2 wahrscheinlich aufgrund der hohen Affinität für cGMP auch als lokaler cGMP-Regulator [38]. Dies scheint besonders im Gehirn, in olfaktorischen Neuronen, im zerebralen Cortex und im Hippocampus - wo PDE2-Varianten regional stark exprimiert werden - der Fall zu sein [38,51,52]. Außerhalb des Gehirns wurde die PDE2 in vielen anderen Geweben wie Nebennierenrinde, Herz, braunem Fettgewebe und Makrophagen nachgewiesen. Ihre Funktion ist gewebespezifisch und spielt bei der Vernetzung von cAMP- und cGMP-Signalwegen eine große Rolle [2].

2.1.2.3 PDE3

Die PDE3-Familie, die cGMP und cAMP hydrolysiert, wird auch cGMP-inhibierte PDE genannt und kann sowohl membrangebunden als auch zytosolisch vorkommen [2]. Sie besitzt sowohl für cGMP als auch für cAMP eine vergleichbare und hohe Affinität. Die Spaltung von cAMP wird aber zehnmal schneller als die sehr langsame von cGMP katalysiert. Deswegen wird angenommen, dass unter physiologischen Bedingungen die cAMP-Hydrolyse von cGMP kompetitiv kontrolliert wird [33]. Die PDE3 wurde vor allem in embryonalem Neuroepithel nachgewiesen [53]. Eine Rolle für die Funktion des adulten Gehirns übernimmt die PDE3-Familie indirekt durch ihre starke Präsenz in den glatten Muskelzellen der Gefäße [33].

2.1.2.4 PDE5

Als Synonym wird cGMP-bindende-cGMP-spezifische PDE verwendet. Es ist ein Gen bekannt, das drei verschiedene Splice-Varianten (PDE5A1-3) codiert [54,55]. Alle PDE5-Isoenzyme sind im Zytosol lokalisiert [2]. Es handelt sich um homologe Dimere, deren Untereinheiten aus jeweils einer katalytischen Domäne und zwei GAF-Bindungsstellen (GAF-A, GAF-B) bestehen [33].

An der GAF-A Domäne bindet cGMP 100-fach selektiver als cAMP und führt zu einer allosterischen Aktivierung des Enzyms durch eine gesteigerte Substrataffinität [56,57]. Die Phosphorylierung eines nahegelegenen Serinrests durch PKG oder PKA steigert und fixiert die Aktivierung weiter [2]. Dies zeigt, dass die kurzfristige PDE5-Regulierung maßgeblich durch den cGMP-Spiegel erfolgt und verschiedene Aktivitätsstufen vorliegen können [33]. Als zusätzlicher Regulationsmechanismus werden Protein-Protein-Wechselwirkungen angenommen, bei denen kleine Proteine die Phosphorylierung modulieren [58]. Da die PDE5 eine größere Affinität für cGMP besitzt, katalysiert sie unter physiologischen Nukleotidkonzentrationen ausschließlich cGMP. Die V_{max} ist dabei deutlich geringer als die von anderen cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen [2]. Die höchste PDE5-Expression findet sich in der Lunge, im Herz und im Kleinhirn [59]. Auch in Niere, Pankreas, Thrombozyten, glatter Muskulatur und dem Corpus cavernosum wurden hohe Konzentrationen der ubiquitär vorkommenden PDE5 nachgewiesen [2]. Daher ist die PDE5 bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Abläufen beteiligt, wie zum Beispiel der Erektionsbildung und der pulmonalen Hypertonie [33]. Auch wird der PDE5 eine Rolle bei der Gedächtnisbildung zugeschrieben, da der Einsatz von PDE5-Inhibitoren das Kurzzeitgedächtnis für Objekte verbesserte [60].

2.1.2.5 PDE6

Vor Einführung der einheitlichen Nomenklatur wurde die PDE6-Familie aufgrund ihres Vorkommens im äußeren Segment der retinalen Stäbchen und Zapfen Photorezeptor-PDE-Familie genannt. Die PDE6 liegt als Heterodimer zweier großer und zweier kleiner, regulatorischer Untereinheiten vor, die für Stäbchen und Zapfen spezifisch sind [61,62]. Die Regulierung der PDE6 wird durch Phosphorylierung, cGMP-Bindung und Interaktion mit der kleinen Untereinheit realisiert, wobei alle drei Mechanismen einen hemmenden Effekt haben [33]. Die PDE6 ist hochselektiv für cGMP und hat die höchste bekannte Reaktionsgeschwindigkeit, wodurch die schnelle Wahrnehmung von Änderungen der Lichtintensität ermöglicht wird [33,63]. Die PDE6-Familie ist daher unverzichtbar für die Detektion von Licht und deren Umsetzung in ein neuronales Signal. Eine weitere Funktion konnte im Pinealorgan von Hühnern nachgewiesen werden, wo die PDE6 eine Rolle bei der Inhibition der Melatoninsynthese durch Licht spielt [64].

2.1.2.6 PDE9

Die Phosphodiesterasen der Familie 9 sind (wie die PDE5 und PDE6) spezifisch für cGMP und weisen dabei die höchste Affinität auf [35]. Die cGMP-Konzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt (= K_m), ist 40- bis 170-mal niedriger als die K_m der PDE5 und PDE6 [35,65]. Es sind zwei Proteine (PDE9A1/5) nachgewiesen und charakterisiert, wobei keine Hinweise auf regulatorische Domänen gefunden wurden [66]. Die katalytische Domäne weist nur geringe Homologien mit den katalytischen Domänen anderer PDE-Familien auf, was die Resistenz gegenüber gängiger PDE-Inhibitoren, wie auch IBMX, erklären kann [35,65]. Während die PDE9A1 im Zellkern nachgewiesen wurde, konnte die PDE9A5 im Zytosol lokalisiert werden [66]. Das Vorkommen der PDE9 wurde an verschiedenen humanen Geweben und Tiermodellen untersucht [2]. Besonders hohe Konzentrationen finden sich in Niere, Milz, Gehirn, Gastrointestinaltrakt und Prostata [35,65,66]. Im Gehirn ähnelt das Verteilungsmuster dem der sGC, sodass eine funktionelle Assoziation bei der cGMP-Regulation und damit bei der Regulation von Langzeitpotenzierung angenommen wird [67]. Studien mit neuen selektiven Inhibitoren bestätigen eine wichtige Rolle der PDE9 bei Langzeitpotenzierung, Neuroplastizität und Gedächtnis [68,69]. Unabhängig vom Gewebe ist es wahrscheinlich, dass die PDE9 angesichts ihrer kinetischen Eigenschaften für die Regulierung des basalen cGMP-Spiegels zuständig ist [70].

2.1.2.7 PDE10

Die seit 1999 bekannte PDE10 ist die jüngste der PDE-Familien. Ihr gehört ein Gen (PDE10A) an, für das je nach Spezies verschieden viele Splice-Varianten mit gleichen kinetischen Eigenschaften isoliert sind [71–73]. Sie besitzt zwei GAF-Domänen, die sich in ihrer genetischen Organisation von den vorher bekannten unterscheiden [74]. In vitro binden die GAF-Domänen der PDE10 cAMP affiner als cGMP, wodurch die Zyklaseaktivität steigt. Ob diese allosterische Aktivierung auch in vivo zutrifft, ist nicht belegt [2,75]. Über weitere Regulationsmechanismen ist wenig bekannt. Die PDE10 ist eine duale Substratfamilie, die cAMP affiner bindet als cGMP. Dagegen kann cGMP mit einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit umgesetzt werden. Somit wird angenommen, dass in vivo die PDE10-Enzyme als cAMP-inhibierte cGMP-Hydrolase agieren. Die PDE10 konnte in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden, wobei sehr hohe Spiegel in Gehirn und Hoden zu finden sind [71,72].

Weitere detaillierte Studien zur zerebralen Verteilung zeigen, dass die höchste Expression der PDE10 in den Basalganglien vorliegt. Auch in Kleinhirn, Hippocampus und Großhirnrinde wurde ihr Vorkommen nachgewiesen. Weshalb eine Rolle der PDE10 bei der Modulation von striatonigralen und striatopallidalen Signalwegen vermutet wird [76]. Studien mit transgenen Mäusen zeigen eine Verbindung des PDE10-Metabolismus zu der neurodegenerativen Erkrankung Chorea Huntington [77]. Durch die Entwicklung selektiver Inhibitoren konnte die Funktion der PDE10 bei physiologischen und pathologischen Abläufen weitere charakterisiert werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Rolle der PDE10 bei der Behandlung von Schizophrenie und Parkinson [78,79].

2.1.3 Effektoren

Als intrazellulärer Botenstoff aktiviert cGMP verschiedene Effektormoleküle, die das Signal weiterleiten. Dazu zählen die Phosphodiesterasen selbst, die Proteinkinase G und A, sowie cGMP-regulierte Ionenkanäle (s. Abbildung 3).

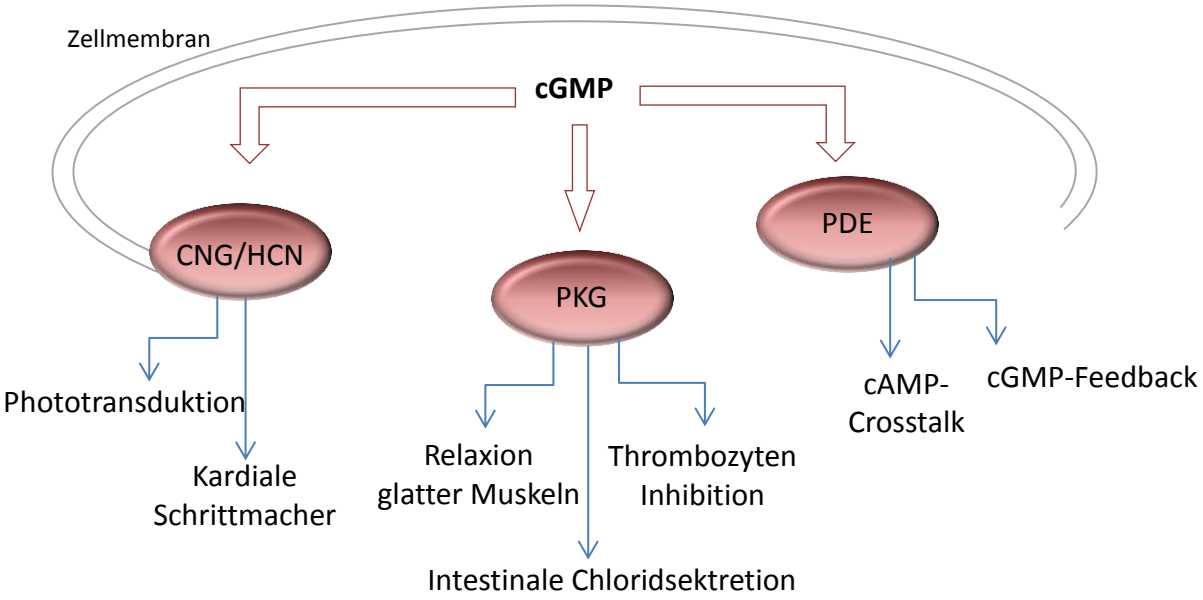

Abbildung 3:
Schema der relevantesten cGMP-Effektormoleküle und Funktion, Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

2.1.3.1 PDE

Fünf der PDE-Familien (2, 5, 6, 10, 11) können durch cGMP aktiviert werden, da sie allosterische cGMP-Bindungsstellen (= GAF-Domänen) besitzen [80]. Bei den cGMP-spezifischen PDE-Familien (5, 6) entsteht dadurch ein Feedback-Mechanismus, über den der Substratspiegel seine Abbaurate autoregulieren kann [2]. Die dual-spezifischen PDE-Familien (2, 10, 11) sind durch die cGMP-Regulation am crosstalk der beiden zyklischen Nukleotide beteiligt. Der cGMP-Spiegel kann so Einfluss auf den cAMP-Spiegel nehmen [16,52]. Diese Verknüpfung der beiden intrazellulären Signalwege findet auch an der Substratbindungsstelle aller dual-spezifischen PDEs (1, 2, 3, 10, 11) statt, da cAMP und cGMP kompetitiv binden [2]. Ein weiterer Effekt der allosterischen cGMP-Bindungsstellen der Phosphodiesterasen ist die Entfernung aus dem aktiven Pool, sodass cGMP nicht mehr für die Interaktion mit anderen Zielproteinen zur Verfügung steht [80].

2.1.3.2 PKG

Den Großteil der Effekte vermittelt cGMP durch die allosterische Aktivierung der Proteinkinase G (PKG). Sie zählt, wie auch die Proteinkinase A (PKA), zu der Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen, die spezifisch durch cAMP aktiviert wird. Die aktive Form phosphoryliert und reguliert spezifische Substrate wie Enzyme und Ionenkanäle. Eine autoinhibitorische Domäne hemmt in der Abwesenheit von cGMP die Aktivität [33]. Es existieren zwei Isoformen der PKG (PKG-I, PKG-II). Bei der PKG I handelt es sich um ein überwiegend zytosolisches Enzym, das in Kardiomyozyten, Thrombozyten und Zellen der glatten Gefäßmuskulatur nachgewiesen wurde. Auch im Kleinhirn, in der Niere und Nebenniere, sowie in Immunzellen wurde die PKG-I gefunden. Die PKG-II liegt überwiegend membrangebunden vor. Ursprünglich wurde ihre Existenz in der Lunge, Niere, dem Kochen und in Zellen des Dünndarms aufgezeigt [81]. Weitere Studien zeigen, dass die PKG-II im Gehirn sehr viel weiter verbreitet ist als die PKG-I und daher angenommen werden kann, dass cGMP im Gehirn seine Effekte hauptsächliche via PKG-II vermittelt [45].

Informationsaustausch in Form von crosstalk zwischen den beiden zyklischen Nukleotiden wird auch über die PKG und PKA betrieben. Da die Bindungsdomänen Homologien aufweisen, können sie bei hohen Konzentrationen von dem anderen Nukleotid kreuzaktiviert werden [1,82].

2.1.3.3 CNG und HCN

Nukleotid-aktivierte Kationenkanäle übersetzen Konzentrationsänderungen von cGMP und cAMP in Änderungen des Membranpotentials und der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese Kanäle gehören zwei unterschiedlichen Familien an: den CNG-Kanälen (cyclic nucleotide-gated channels) und den HCN-Kanälen (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channels), die bei unterschiedlichen physiologischen Rollen große Strukturhomologien aufweisen [83].

Bei CNG-Kanälen handelt es sich um nicht-selektive Kationenkanäle, die ohne gebundenes cGMP oder cAMP eine sehr geringe Offenwahrscheinlichkeit besitzen [84]. Zusätzlich wird der Kationenstrom durch bivalente, permissive Ionen moduliert [85]. Unter physiologischen Bedingungen findet an ihnen vor allem ein Einwärtsstrom von Natrium- und Kalziumionen statt [83]. Die CNG-Kanäle spielen bei der Signaltransduktion der retinalen Photorezeptoren und des olfaktorischen Epithels eine wichtige Rolle. Weiter wurde der Kanal in Hoden, Spermatozoen, Ovar, Herz, Niere und im Gehirn nachgewiesen, wo er bei der Regulation des Membranpotentials, der neuronalen Erregbarkeit und der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt ist [83,86].

Die HCN-Kanäle werden spannungsabhängig bei Hyperpolarisation geöffnet. Durch die Bindung von cAMP oder cGMP wird die Depolarisationsgrenze des HCN-Kanals nach unten verschoben und die maximale Flussrate der Kationen steigt. Die HCN-Kanäle weisen eine schwache Selektivität für Kaliumionen gegenüber Natriumionen (4:1) auf [87]. Ihre Funktion als Schrittmacherkanäle erfüllen sie sowohl am Herzen als auch bei der Neurotransmission [83].

2.2 Klinische Anwendung des cGMP-Signalwegs

Noch bevor der biochemische Zusammenhang bekannt war, wurde mittels NO-Donatoren der cGMP-Spiegel zu therapeutischen Zwecken erhöht. Sir Lauder Brunon stellte bereits 1867 fest, dass sich organische Nitrate zur Schmerzbehandlung bei Angina pectoris eignen. Heute wird mit der Entwicklung optimierter sGC-Aktivatoren, wie dem sich in der klinischen Testphase befindenden Riociguat, nach einer spezifischeren Therapiemöglichkeit gesucht. Damit ist der cGMP-Signalweg für die therapeutische Dilatation von Koronararterien und für weitere Anwendungsgebiete auch in Zukunft von Bedeutung [23].

PDE-Inhibitoren sind eine weitere Möglichkeit den cGMP-Spiegel zu erhöhen und therapeutisch zu nutzen. Trotz der ubiquitären Verbreitung von cGMP und cAMP können spezifische Inhibitoren der verschiedenen PDE-Familien eine zielgerichtete Anwendung ermöglichen. Präparate, die selektiv PDE5 inhibieren, werden zur therapeutischen Vasodilatation eingesetzt. Der größte Erfolg ist die Behandlung der erektilen Dysfunktion mittels der PDE5-Inhibitoren wie Sildenafil, Tadafil und Vardenafil, welche auch zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie verwendet werden [2,88]. Die PDE3-Inhibitoren Milrinon und Cilostazol werden bei therapierefraktärer Herzinsuffizienz und bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit verschrieben [2]. Der unspezifische PDE-Inhibitor Theophyllin wird bei der Therapie des Status asthmaticus und der COPD eingesetzt [33]. Seit 2015 ist der PDE4-Inhibitor Apremilast als neue orale Therapie der Psoriasis und Psoriasis-Arthritis in der EU zugelassen [89]. Dabei handelt es sich um einen neuartigen Behandlungsansatz, der auf die Wiederherstellung des Gleichgewichts von pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Signalen abzielt [90].

PDE-Inhibitoren werden bereits bei einer Vielzahl von Erkrankungen erfolgreich eingesetzt. Weiterhin besteht großes Interesse an der Entwicklung neuer Therapieansätze mit Hilfe von spezifischen PDE-Inhibitoren. Aktuelle Studien suchen für die Behandlung von Karzinomen nach neuen, zielgerichteten Medikamenten (= target therapie), die auf den cGMP-Signalweg wirken [10]. Auch für die Behandlung von zerebralen Erkrankungen wie Alzheimer wird der cGMP-Stoffwechsel als potentielles therapeutisches Ziel erforscht [78,79,91]. Da cGMP insbesondere bei der Langzeitpotenzierung und -depression von synaptischen Signalen eingreift, ist es Teil der molekularen Grundlage von Neuroplastizität, die Lernen und Gedächtnisbildung ermöglicht [92].

Auch konnte gezeigt werden, dass sich der Alterungsprozess in einer Veränderung des basalen neuronalen cGMP-Spiegels widerspiegelt [93]. Daher ist die Rolle des Botenstoffs bei Gedächtnisstörungen von aktuellem Interesse in der Forschung [91]. Weitere Studien zeigen eine Verbindung des cGMP-Spiegels mit exzitatorischer Neurotoxizität [92]. Aufgrund dieser Ergebnisse sind neue Therapieansätze für Morbus Parkinson in den Fokus der Forschung des cGMP-Stoffwechsels gerückt [78,79,91]. Andere Ergebnisse bringen den cGMP-Haushalt mit der Stimmungslage in Verbindung und zeigen, dass hohe cGMP-Spiegel mit einer besseren Stressbewältigung einhergehen [94,95]. Deshalb ist der cGMP-Stoffwechsel unter anderem für die Entwicklung neuer Medikamente zur Therapie von Schizophrenie von Interesse.

2.3 Interaktion mit Hypnotika und Sedativa

Ein Grund für das große Potential von PDE-Inhibitoren als Medikamente sind die geringen physiologischen cGMP- und cAMP-Konzentrationen von weniger als 1-10 µM. Dadurch können exogene, kompetitive Inhibitoren, die zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden sollen, in niedrigen Konzentrationen ohne Wirkverlust dosiert werden [2]. Dies bedeutet auch, dass Phosphodiesterasen empfindlich auf Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten reagieren und so schnell die molekulare Grundlage von Wirkung und Nebenwirkungen werden [96].

cGMP ist bei der Homöostase von Neurotransmittern wie der dopaminergen, cholingergen, glutamatergen Signalübertragung von Bedeutung. So wurde eine wichtige Beteiligung von cGMP bei Lichtwahrnehmung und der Kontrolle des Schlaf-Wach-Rhythmus nachgewiesen [45,97,98]. Andere Studien bringen cGMP mit der Wahrnehmung von Schmerzen in Verbindung [99,100]. Dabei handelt es sich um zerebrale Funktionen, auf die auch Hypnotika und Sedativa wirken, deren genaue Wirkmechanismen oft noch nicht vollständig geklärt sind. Daher sind Interaktionen des cGMP-Signalwegs mit Hypnotika und Sedativa, die sich durch eine unspezifische Pharmakologie auszeichnen, Gegenstand intensiver Forschung [101].

Primär wurde die NO/sGC/cGMP-Signalkaskade, das heißt die stimulierte cGMP-Synthese, auf ihre Beeinflussbarkeit durch Hypnotika untersucht. Erste Studien an Gefäßpräparaten zur Vasodilatation legten zum einen eine Hemmung der NO-induzierten cGMP-Produktion durch Halothan und Isofluran dar [102]. Zum anderen wurde weiter gezeigt, dass intravenöse Hypnotika wie Thiopental die sGC inhibieren und so die Vasodilatation von Widerstandsgefäßen senken [103]. Daran anschließende Untersuchungen an neuronalem Gewebe zeigen, dass sowohl volatile als auch intravenöse Hypnotika wie auch Sedativa einen starken Einfluss auf die cGMP-Homöostase nehmen [104]. Auch hier liegt das Augenmerk der Forschung auf der cGMP-Bildung. Verschiedene Arten der Einwirkungen auf die cGMP-Bildung wurden bereits identifiziert. Einmal zeigen Studien, dass die NMDA-Rezeptor-abhängigen cGMP-Synthese durch Hypnotika gehemmt wird [101]. Ein weiterer Mechanismus ist die Hemmung der NO-Synthase durch volatile Hypnotika, wodurch es indirekt zu einer Hemmung der cGMP-Synthese kommt [102]. Studien an zerebellärem Gewebe im Tiermodell zeigen, dass Thiopental zu einer direkten Hemmung auch der neuronalen sGC führt [104,105]. Ebenfalls an zerebellären Schnitten durchgeführte Experimente zur NO-stimulierten cGMP-Synthese zeigen, dass die Zugabe von Diazepam den cGMP-Spiegel verändert [106].

Die Studienlage zu Wechselwirkungen zwischen PDEs und Hypnotika ist dagegen weniger ausführlich. Einige Studien der Grundlagenforschung konnten sowohl an neuronalem als auch myokardialem Gewebe eine Hemmung der cAMP-spezifischen PDEs, insbesondere der PDE4, durch Diazepam zeigen [96,107]. Andere klinische Studien maßen erhöhte cAMP-Blutspiegel bei Patienten, die Diazepam bekommen hatten [108].

Zur Interaktion von Sedativa und Hypnotika mit cGMP-spezifischen PDEs liegen wiederum weniger Daten vor. Einige klinische Studien beschäftigten sich mit der Wirkung von Propofol auf den cGMP-Haushalt. Hier zeigte sich, dass narkotisierte Patienten, die zusätzlich Propofol bekamen, einen erhöhten cGMP-Speichelspiegel aufwiesen [109]. Weiter wurde eine veränderte Wirkdauer von Propofol durch die simultane Gabe des PDE5-Inhibitors untersucht [110].

2.4 Grundlagen der Enzymkinetik

Die Mehrzahl der Reaktionen, die im menschlichen Körper ablaufen, wird durch Biokatalysatoren, sogenannte Enzyme, ermöglicht. Reaktionen, an denen Enzyme beteiligt sind, weisen eine bestimmte Kinetik auf [111]. Um enzymkatalysierte Reaktionen untersuchen zu können, ist es wichtig, diese zu kennen.

Enzyme erreichen ihre biokatalytische Aktivität und Substratspezifität dadurch, dass sie verschiedene Arten von intermolekularen Kräften nutzen, um die Reaktionspartner in optimale räumliche Orientierung zueinander zu bringen. Dabei erfolgt die Bildung eines Enzymsubstratkomplexes nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip im aktiven Zentrum des Enzyms. Im Gegensatz zu Reaktionen ohne Enzyme, weisen katalysierte Reaktionen eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} auf, die dann erreicht wird, wenn die Substratkonzentration so hoch ist, dass alle Substratbindungsstellen des Enzyms besetzt sind. In diesem Moment entspricht die Reaktionsgeschwindigkeit, das heißt das pro Sekunde entstehende Mol des Produkts, der Wechselzahl des Enzyms. Bei kleinen Substratkonzentrationen ist V_{max} dagegen direkt proportional zu der Substratkonzentration [112].

Spezifische Moleküle, wie Medikamente und Toxine, können Enzyme hemmen. Man unterscheidet reversible und irreversible, sowie kompetitive und nicht-kompetitive Inhibitoren. Während bei einer irreversiblen Inhibition eine sehr langsame oder keine Dissoziation des Inhibitor-Enzym-Komplexes besteht, liegt bei einer reversiblen Inhibition eine schnelle Dissoziation vor. Kompetitive Hemmstoffe schließen eine Bindung des Substrats am aktiven Zentrum des Enzyms aus und senken damit die potentiellen Bindestellen für Substrate. Ihre Wirkung kann durch Erhöhung der Substratkonzentration aufgehoben werden. Dies ist bei nicht-kompetitiven Inhibitoren unmöglich, da deren Bindungsstellen nicht mit dem aktiven Zentrum interferieren. Das nicht-kompetitiv gehemmte Enzym kann daher gleichzeitig Inhibitor und Substrat binden, besitzt aber eine kleinere V_{max} [112].

Ein Modell zur Erklärung der kinetischen Eigenschaften vieler Enzyme liefert die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$V = \frac{V\max \cdot [S]}{Km + [S]}$$

Sie beschreibt mit Hilfe der Michaelis-Menten-Konstante K_m und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} den Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit V und Substratkonzentration [S]. Graphisch stellt sich dieser Zusammenhang als Hyperbel dar (s. Abbildung 4). K_m ist dabei definiert als diejenige Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist. Gleichzeitig kann K_m zur Beurteilung der Substrataffinität des Enzyms herangezogen werden [113]. Die kompetitive und die nicht-kompetitive Hemmung können kinetisch dahingehend unterschieden werden, dass Erstere zu einer Erhöhung der K_m, Letztere hingegen zu einer Erniedrigung der V_{max} führt [112].

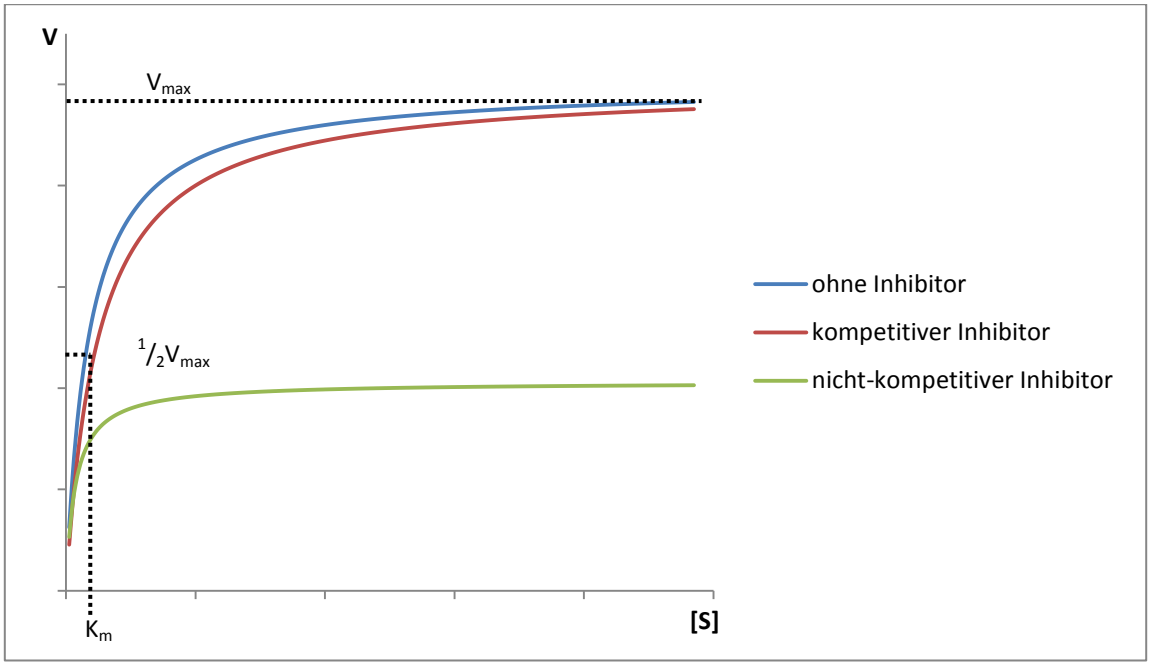

Abbildung 4:
Kurve der Michaelis-Menten-Gleichung bei drei verschiedenen Bedingungen

Auf Basis der Michaelis-Menten-Gleichung wurden verschiedene Linearisierungsverfahren entwickelt, um den Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit V und Substrat [S] als Gerade darstellen zu können. Eines davon ist die doppelt reziproke Auftragung von 1/V gegen 1/[S] nach Lineweaver-Burk (s. Abbildung 5). Die Gerade wird durch folgende Gleichung beschrieben [114]:

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{V\,\max * [S]} + \frac{1}{V\,\max}$$

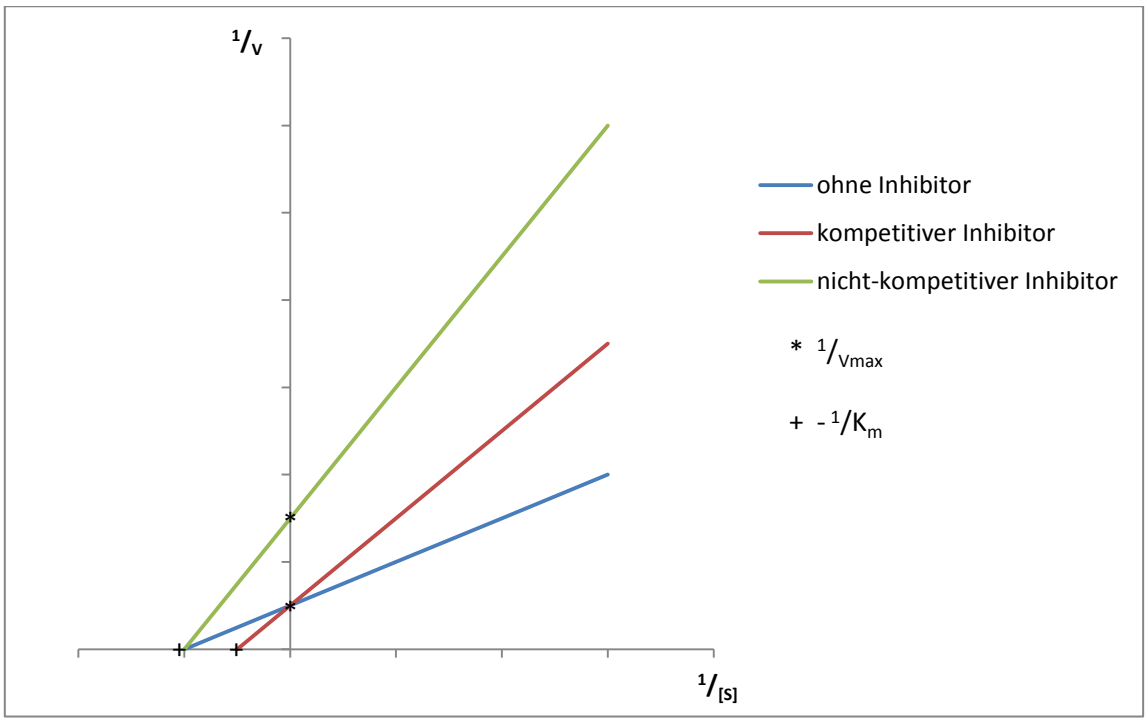

Abbildung 5:
Lineweaver-Burk-Plot bei drei verschiedenen Bedingungen;
** y-Achsenabschnitt = $^{1}/V_{max}$; $^{+}$ x-Achsenabschnitt = $^{-1}/K_m$*

Anhand der beiden Konstanten K_m und V_{max} können Enzyme charakterisiert und hemmende Einflüsse sowohl qualifiziert als auch quantifiziert werden. Um die Interaktion von Enzymen mit Medikamenten verstehen zu können, ist die Analyse von K_m und V_{max} unerlässlich [115].

3 Zielsetzung

Während der Einfluss von Sedativa und Hypnotika auf die cGMP-Synthese durch frühere Untersuchungen nachgewiesen ist, wurden Interaktionen mit dem cGMP-Abbau durch Phosphodiesterasen bis heute sehr viel weniger intensiv untersucht [104,107,116]. Aufgrund ihrer kinetischen Eigenschaften sind Phosphodiesterasen jedoch entscheidend für die cGMP-Konzentration, da diese nicht über die Synthese, sondern vor allem über den Abbau reguliert wird [2,31]. Zudem spielt der cGMP-Signalweg eine essentielle Rolle bei der Regulation von Wachheit und der Stressbewältigung, die auch durch Sedativa und Hypnotika beeinflusst werden. Für die Forschung zur biochemischen Wirkung und Nebenwirkung von Anästhesie und Sedierung ist er deshalb von großem Interesse. Erste Studien dazu haben gezeigt, dass Diazepam die cAMP-spezifische PDE4 hemmt [107]. Welche Rolle die cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen im Rahmen dieser Wechselwirkungen spielen, ist dabei jedoch noch unzureichend geklärt.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der Einfluss der drei Substanzen Thiopental, Propofol und Diazepam auf die neuronale, cGMP-spezifische Phosphodiesteraseaktivität untersucht werden.

Da die Ergebnisgenauigkeit der Versuche direkt von der Qualität der verwendeten Enzyme abhing, sollte der Arbeit die Optimierung der PDE-Gewinnung aus Rattenhirn, welche die enzymatische Aktivität erhält, vorangestellt werden. Dazu wurden sowohl zwei unterschiedliche Methoden zur Gewebehomogenisierung als auch zwei unterschiedliche Vorgehensweisen zur Proteinextraktion getestet und verglichen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Herstellerverzeichnis

Acetonitril / CH_3CN	Merck	Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid / $CaCl_2$	Merck	Darmstadt, Deutschland
CelLytic MT	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
Diazepam	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat / $Na_2HPO_4*2H_2O$	Merck	Darmstadt, Deutschland
DMSO / Dimethylsulfoxid	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
DTT / Dithiothreitol	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
EDTA / Ethylenediaminetetraacetic acid	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
Fluorescein-Natrium-Lsg. (10 %)	Alcon	Hüneberg, Schweiz
Hepes	USB Corporation	Cleveland, USA
IBMX / 3-Isobutyl-1-methylxanthin	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
Kaliumchlorid / KCL	Fluka	St Louis, USA
Kaliumhydrogenphosphat / KH_2PO_4	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Mant-cGMP / 2‘-O-(N’Methylanthraniloyl-guanosine-3‘-5‘-cyclic monophosphat)-Na^+	BioLog	Bremen, Deutschland
Magnesiumchlorid / $MgCl_2$	Fluka	St Louis, USA
Natriumhydrogensulfid-Monohydrat / $NaHS*H_2O$	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
Natriumhydroxid / NaOH Plätzchen	Merck	Darmstadt, Deutschland
ODQ / 1-H-[1,2,4]oxadiazolo-[4, 3-a]quinoxalin-1-one	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
PBS / Phosphate buffered salin	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoSCIENTIFIC	Waltham, USA
PMSF / Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Flourid	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
Propofol / 2,6-Diisopropylphenol	Alfa Aesar	Ward Hill, USA
Protease Inhibitor Cocktail	SIGMA Aldrich	St Louis, USA
Thiopental-Natrium Salz	Inresa	Freiburg, Deutschland
Tris-HCl Puffer	SIGMA Aldrich	St Louis, USA

4.2 Versuchstiere

In Absprache mit dem verantwortlichen Veterinärmediziner des Uniklinikums Regensburg sind die in dieser Arbeit aufgeführten Versuche nicht anzeige- oder genehmigungspflichtig, da es sich um die Verwertung von tierischem Material handelt, das in anderen Versuchen anfällt und dort nicht benötigt wird. Die Tötung der Tiere erfolgte nicht für die hier durchgeführten Versuche. Vier Rattenhirne stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. York Zausig (Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Regensburg). Diese vier adulten, männlichen Wistarratten waren vor der Dekapitation einer Narkose mit Ketamin und Rompun oder Sevofluran 4 % ausgesetzt. Sie wogen im Mittel 245 g. Weiter wurden vier Rattenhirne von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Inga D. Neumann (Lehrstuhl für Neurobiologie und Tierphysiologie, Universität Regensburg) bezogen. Dabei handelte es sich um vier männliche Wistarratten, die vor der Tötung mit CO_2 keine Medikamente erhalten hatten. Zu diesem Zeitpunkt waren die Versuchstiere 25 Wochen alt und wogen im Durchschnitt 490 g. Alle Gehirne wurden nach der Entnahme sofort mit Kochsalzlösung von groben Blutresten befreit und in Alufolie bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

4.3 Probengewinnung

Bei allen folgenden Methoden wurden die Reagenzien gekühlt verwendet und die Proben während der gesamten Aufbereitung so oft wie möglich auf Eis gelagert, um die Aktivität der Enzyme nicht zu gefährden.

4.3.1 Homogenisierung

Die Rattenhirne wurden sowohl von Hand als auch maschinell homogenisiert. Für die manuelle Homogenisierung wurde zunächst 1 g Rattenhirn und 1,2 mL Homogenisierungspuffer (50 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF in Aqua dest; pH 7,4 mittels pH-Meter kontrollierter Zugabe von 1 N HCl) in den gekühlten, sogenannten Potter-Elvehjem Douncer gegeben. Durch zehnmaliges kräftiges Bewegen des Stößels wurde das Gewebe zerkleinert. Das entstandene Homogenisat wurde inklusive des aufschwimmenden Schaums der Proteinextraktion zugeführt [117].

Im ersten Schritt der maschinellen Homogenisierung wurden 100 mg Rattenhirn und 1000 µL kalter Homogenisierungspuffer (50 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF in Aqua dest; pH 7,4 mittels pH-Meter kontrollierter Zugabe von 1 N HCl) in ein Lysing Matrix D Tube der Firma MP Biomedicals gegeben. Für die Homogenisierung wurden die Tubes mit dem Gerät FastPrep-24-Instrument der Firma MP Biomedicals für 20 sec mit 5 m/s geschüttelt. Danach wurde die Proteinextraktion angeschlossen.

4.3.2 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurden verschiedene Methoden (1, 2a/b) angewendet. Bei Methode 1 wurden die homogenisierten Proben bei 4 °C für 8 min mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF) von 152 xg zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde ohne Schaum bei 4 °C für 30 min mit 100000 xg ultrazentrifugiert. Der entstandene Überstand, der dem zytosolischen Zellanteil entsprach, wurde portioniert und bei -80 °C zur Lagerung eingefroren. Das entstandene Pellet wurde mit 1,5 mL Waschpuffer (Homogenisierungspuffer aus Kapitel 4.3.1 und 0,6 M KCl) resuspendiert. Anschließend wurden diese für 3 min mit 425 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, das die Membranfraktion enthielt, in 150 µL 50 mM Tris-HCl Puffer gelöst und bei -80 °C gelagert [117].

Die Proteinextraktion nach Methode 2 wurde nur in Kombination mit der maschinellen Homogenisierung durchgeführt. Dazu wurden 100 mg Hirngewebe mit 1000 µL Lysepuffer (CelLytic MT) und 10 µL Proteaseinhibitor (Protease Inhibitor Cocktail; beides Produkte der Firma SIGMA Aldrich) in einem Lysing Matrix D Tube der Firma MP Biomedicals versetzt und maschinell homogenisiert. Direkt danach wurden die Tubes bei 4 °C für 10 min mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF) von 16060 xg zentrifugiert. Das entstandene Pellet fand keine Weiterverwendung. Mit dem Überstand wurde im weiteren Verlauf zweigeteilt verfahren. Die eine Hälfte wurde bei -80 °C weggefroren (Methode 2a). Die andere Hälfte wurde nach den Vorgaben der Methode 1 ultrazentrifugiert. Die danach überstehende Zytosolfraktion wurde abgehoben und asserviert. Das Pellet mit den Membrananteilen wurden entsprechend der Methode 1 gewaschen. Die Lagerung fand bei -80 °C statt. Dieses Vorgehen wurde als Methode 2b bezeichnet.

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich zytosolisches Protein verwendet, das nach Methode 2b gewonnen wurde.

4.3.3 Proteinmengenbestimmung

Der Proteingehalt der einzelnen Extrakte wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo SCIENTIFIC ermittelt. Das Vorgehen erfolgte entsprechend der Herstellerangaben (Sample to WR ratio = 1:8). Die Proteinproben wurden sowohl unverdünnt als auch nach einer 1:10 Verdünnung in PBS (phosphate buffered saline) in jeweils doppelter Ausführung getestet. Anschließend wurde die Farbreaktion mit dem Gerät Varioskan Flash der Firma Thermo Fisher Scientific bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert und der Proteingehalt mit dem Computerprogramm SkanIT (Version 2.4.509) der Firma Thermo Fisher Scientific ermittelt.

4.4 Versuchsprotokolle

4.4.1 Vorbereitung

Als Substrat wurde das synthetische, fluoreszierende Mant-cGMP verwendet, das mit den gleichen kinetischen Eigenschaften wie cGMP gespalten wird [116]. Das Mant-cGMP wurde als 1 mM Lösung in 50 mM Tris-HCl Puffer verwendet. Portionen dieser Stammlösung wurden bei -4 °C gelagert und jeweils für die Versuche aufgetaut. Als Lösungsmittel des Reaktionsgemisch diente folgender Reaktionspuffer: 10 mM Hepes, 90 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,73 mM $CaCl_2$ in Aqua dest. (pH 7durch 1M NaOH eingestellt) [118].

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze zeigt die nachfolgende Tabelle (s. Tabelle 1). Die Konzentrationen wurden zunächst durch eine Vorverdünnung und schlussendlich durch eine weitere Verdünnung im fixen Endvolumen, in dem die Enzymreaktion ablief, eingestellt. Zur Vorverdünnung wurde als Lösungsmittel für die Substanzen Mant-cGMP, Fluorescein, DMSO und das Proteinextrakt Reaktionspuffer verwendet. Die Testsubstanzen wurden in einem substanzspezifischen Lösungsmittel vorverdünnt (s. Tabelle 2). Den jeweils zugehörigen Kontrollproben wurde die gleiche Menge des substanzspezifischen Lösungsmittels der Testsubstanz hinzugefügt.

Das Substrat Mant-cGMP wurde zum Start der Beobachtungsphase, die Proteinlösung zum Start der Vorinkubation hinzugegeben. Zusätzlich befand sich in jedem der Reaktionscups ein 0,5 cm großes PTFE-Magnetrührstäbchen, das während der Reaktionszeit für eine gleichmäßige Verteilung sorgte.

Tabelle 1:
Zusammensetzung der Reaktionscups mit definiertem Endvolumen 1125 µL

Cup	Kontrolle	Testbedingungen
A	Mant-cGMP 38 µM	Mant-cGMP 38 µM
	Fluorescein 1772 nM	Fluorescein 1772 nM
	Protein ca. 20500 ng/mL	Protein ca. 20500 ng/mL
	Lösungsmittel der Testsubstanz	Testsubstanz in eigenem Lösungsmittel
	Reaktionspuffer	Reaktionspuffer
B	s. A, aber Mant-cGMP 28 µM	s. A, aber Mant-cGMP 28 µM
C	s. A, aber Mant-cGMP 20 µM	s. A, aber Mant-cGMP 20 µM
D	s. A, aber Mant-cGMP 10 µM	s. A, aber Mant-cGMP 10 µM
E	s. A, aber Mant-cGMP 44 µM	s. A, aber Mant-cGMP 44 µM
F	s. A, aber Mant-cGMP 5 µM	s. A, aber Mant-cGMP 5 µM

4.4.2 Durchführung

Damit der enzymatische Umsatz verlässlich gemessen werden konnte, wurden die Enzymreaktionen kontrolliert gestartet und gestoppt. Die Versuche liefen mit Hilfe eines Wasserbads bei 37,0 °C ab. Zunächst wurden die Reaktionscups und die Mant-cGMP-Lösung getrennt für 10 min im Wasserbad inkubiert. Dies diente unter anderem dem Abbau von endogenen cGMP in der Proteinlösung, damit dieser später nicht mit dem des Mant-cGMP interferieren konnte. Zum Start der Enzymreaktion wurde die entsprechende Menge Mant-cGMP hinzugegeben. Nach fünf und 25 Minuten erfolgte die Entnahme von 25 µL, die auf 25 µL eigekühltes Acetonitril pipettiert wurden, um die laufende Reaktion abzustoppen. Anschließend wurden die entnommenen Proben gevortext und auf Eis gestellt. Zur weiteren Nachbereitung wurden die Proben für 3 min mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF) von 16060 xg zentrifugiert und der Überstand in die RP-HPLC gegeben. Die Versuche mit den Kontrollproben und jene mit den Proben mit Testsubstanz wurden jeweils gleichzeitig durchgeführt.

Anhand von Vorversuchen, bei denen Proben zu mehreren verschiedenen Zeitpunkten aus der laufenden Reaktion entnommen worden waren, wurden die optimalen Entnahmezeitpunkte zu Minute fünf und 25 bestimmt. Diese Ergebnisse sind nicht in der hier vorliegenden Arbeit aufgeführt.

4.4.3 Verwendete Testsubstanzen und Konzentrationen

Auf die Versuchsprotokolle wurden verschiedene Testsubstanzen und Substanzkombinationen angewendet. Zunächst erfolgte die Herstellung einer Stammlösung des (Fest-)Stoffes in einem spezifischen Lösungsmittel. Dann wurde diese in einem weiteren, substanzeigenen Lösungsmittel verdünnt und mit einem bestimmten Volumen in das fixierte Reaktionsvolumen pipettiert. Die nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten Substanzen und Substanzkombinationen mit den dazugehörigen Parameter (s. Tabelle 2). Ebenso wurde enzymatisch inaktives Protein verwendet und mit enzymatisch aktivem Protein verglichen. Dazu wurde eine Proteinprobe für 60 min auf 71 °C im Heizblock erhitzt und für 2 min bei 37 °C gekühlt. Anschließend wurde die Reaktion gemäß des Versuchsprotokolls gestartet. In diesem Fall wurde keine Testsubstanz geprüft. Als Kontrollprobe diente die standardmäßig verwendete Zusammensetzung (s. Tabelle 1), die das gleiche, unbehandelte Proteinextrakt enthielt.

Tabelle 2:
Testsubstanzen und Substanzkombinationen mit verwendeten Lösungsmitteln und Konzentrationen

Testsubstanz / Substanzkombination	Stammlösung [mM] (Lösungsmittel)	Lösungsmittel der Vorverdünnung	End-konzentrationen [µM]
Diazepam	35,1 (DMSO)	1:1 Reaktionspuffer-DMSO Gemisch	1; 10; 30; 100
IBMX	90,0 (DMSO)	DMSO	240
ODQ	26,7 (DMSO)	DMSO	10; 100
Propofol (97 % Lösung)	105,9 (Reaktionspuffer)	Reaktionspuffer	10; 100; 300
Thiopental-Natrium	75,7 (Aqua dest.)	Aqua dest.	10; 100; 500
Diazepam+	35,1 (DMSO)	Reaktionspuffer	100
IBMX	90,0 (DMSO)	DMSO	240
Thiopental-Natrium+	75,7 (Aqua dest.)	Aqua dest.	500
IBMX	90,0 (DMSO	DMSO	240

4.5 Mant-cGMP-Quantifizierung

Die Proben, die aus den laufenden Reaktionen zu definierten Zeitpunkten entnommen worden waren, wurden auf die verbliebene Menge Mant-cGMP untersucht, dessen Fluoreszenz nach Spaltung durch PDEs sinkt. Dazu wurde die RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography; dt. Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) zur Trennung des Stoffgemisches in Kombination mit einem nachgeschalteten Fluoreszenzdetektor verwendet.

4.5.1 Reagenzien und Kalibrierung

Die Analyseläufe an der RP-HPLC wurden mit zwei Laufmitteln (A und B) durchgeführt. Sie unterschieden sich in der Menge Acetonitril in 10 mM Phosphatpuffer mit pH 6 (1,2065 g KH_2PO_4; 0,2214 g /Na_2HPO_4*$2H_2O$ in 1 L Aqua dest.). Die Volumenanteile des Laufmittel A waren 94 % Puffer und 6 % Acetonitril. Das Laufmittel B enthielt zu 32 % Puffer und zu 68 % Acetonitril.

Mit Hilfe von Kalibrationslösungen wurde die Retentionszeit von Mant-cGMP experimentell bestimmt und eine Kalibrationskurve erstellt, die die Fluoreszenzstärke den jeweiligen Mant-cGMP-Konzentrationen zuordnete. Als interner Standard wurde sowohl den Kalibrationslösungen als auch dem Reaktionsproben eine bekannte Menge fluoreszierendes Fluorescein hinzugefügt. Die Kalibrationslösungen wurden aus der 1 mM Stammlösung Mant-cGMP (in 50 mM Tris-HCl Puffer) und Fluorescein (10 %) in Laufmittel A der RP-HPLC hergestellt. Die Endkonzentration von Fluorescein war konstant 1794 nM. Die Mant-cGMP-Standardkonzentrationen deckten den Bereich 0,2 µM – 80 µM ab.

4.5.2 RP-HPLC-Methode

Die binäre Pumpe arbeitete mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 mL/min bei einem mittleren Druck von 280 bar. Das Elutionsmittel bestand aus 80 % Laufmittel A und aus 20 % Laufmittel B. Die Proben wurden bei 8 °C im Injektor gekühlt. Zur Analyse wurde je Probe ein Aliquot von 2,5 µL entnommen. Die verwendete Säule ZOBRAX Eclipse XDB-C18 (Partikelgröße 1,8 µm, Länge 50 mm, Innendurchmesser 4,6 mm) der Firma Agilent wurde auf 38 °C temperiert.

Der angeschlossene Fluoreszenzdetektor nahm zunächst die Mant-cGMP-Konzentration bei einer mittleren Retentionszeit von 0,960 min mit folgenden Einstellungen auf: $\lambda_{excitation}$ = 280 nm, $\lambda_{emission}$ = 450 nm [119]. Dann wechselte der Fluoreszenzdetektor innerhalb des Runs (mittlerer Umschaltzeitpunkt: 1,25 min) zur Fluoresceinbestimmung auf $\lambda_{excitation}$ = 490 nm, $\lambda_{emission}$ = 520 nm. Die mittlere Retentionszeit des Fluorescein betrug 1,5 min. Die Gesamtdauer eines Runs lag bei 2,25 min. Mit Hilfe des Computerprogramms Agilent ChemStation (Version 04.02.096) der Firma Agilent Technologies und der erstellten Kalibrationskurve wurden aus den Messungen des Fluoreszenzdetektors die Konzentrationen des Mant-cGMPs und des Fluoresceins berechnet.

4.6 Auswertung des enzymatischen Umsatzes

Der enzymatische Umsatz wurde auf zwei verschiedene Arten analysiert. Erstens wurde der Substratabfall über die Zeit, die sogenannte Reaktionsgeschwindigkeit V, berechnet. Da die Substratkonzentration ausreichend hoch gewählt wurde, um eine Sättigung aller Bindungsstellen der PDEs und damit die V_{max} zu erreichen, konnte zweitens die Enzymreaktion mit Hilfe der Michaelis-Menten-Kinetik untersucht werden.

4.6.1 Betrachtung des Substratabfalls über die Zeit

Die Mant-cGMP-Abnahme pro Zeiteinheit wurde aus den Messungen nach 5 min und 25 min berechnet. Die berechnete Reaktionsgeschwindigkeit V wurde weiter auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen, um zwischen den Versuchen vergleichen zu können. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden zunächst nach der eingesetzten Startkonzentration Mant-cGMP geordnet betrachtet und dann bei fehlenden signifikanten Unterschieden zusammengefasst. Mit Hilfe des Computerprogrammes IBM SPSS Statistics 21 (Version 21.0.0.0) der Firma International Business Machines Corporation (IBM) wurden die dazugehörigen Mittelwerte berechnet.

4.6.2 Bestimmung der Parameter V_{max} und K_m

Aus den gemessenen Mant-cGMP-Konzentrationen zu den zwei verschiedenen Zeitpunkten (Minute fünf und 25) der Enzymreaktion wurde die Reaktionsgeschwindigkeit V berechnet. Diese wurde den jeweiligen Substratkonzentrationen Mant-cGMP [S] zugeordnet, die nach fünf min gemessen worden waren. Somit standen je Versuchsbedingung sechs Wertepaare [S]/V für die Bestimmung von V_{max} und K_m zur Verfügung. Zwei unterschiedliche Verfahren wurden dazu verwendet.

Mit Hilfe des Computerprogramms Excel (Version 2010) der Firma Microsoft wurde ein Lineweaver-Burk-Plot erstellt. Dazu wurden die sechs Wertepaare doppelreziprok aufgetragen und eine Regressionsgerade angelegt. Anhand des y-Achsenabschnitts und der Steigung dieser Regressionsgerade wurden die gesuchten Parameter berechnet (s. Abbildung 6).

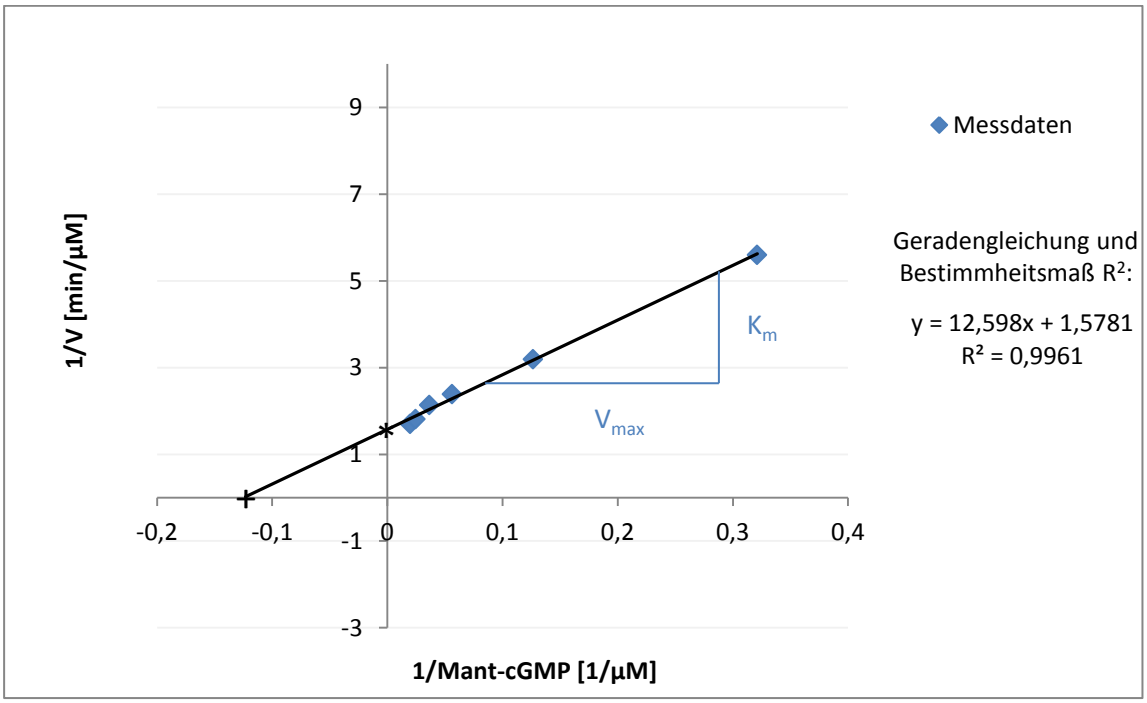

Abbildung 6:
Beispiel für die Auswertung mittels Lineweaver-Burk-Plot; $^{1}/V_{max}$ *= *(y-Achsenabschnitt);* $^{-1}/K_m$ *=* $^{+}$ *(x-Achsenabschnitt) und* K_m *= Steigung* $*$ V_{max}

Als weiteres Auswertungsverfahren wurde eine nicht-lineare Regressionsanalyse mit Hilfe des Levenberg-Marquardt-Algorithmus durchgeführt. Dabei handelt es sich nicht um eine analytische Rechnung, sondern um einen numerischen Optimierungsalgorithmus, der nicht-lineare Ausgleichsprobleme mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate löst [120]. Anhand der sechs Wertepaare [S]/V wurde so diejenige Michaelis-Menten-Hyperbel und deren Konstanten K_m und V_{max} bestimmt, die mit dem kleinsten Fehler durch die Wertepaare gelegt werden kann. Dazu wurde das Computerprogramm IBM SPSS Statistics 21 (Version 21.0.0.0) der Firma International Business Machines Corporation (IBM) verwendet.

4.6.3 Quotientberechnung

Zur weiteren Analyse zwischen den Versuchen wurden die Ergebnisse als normierter Prozentsatz der Kontrollproben betrachtet. Dazu wurde jeweils ein Quotient gebildet, wobei für die Kontrollprobe der Wert 1 definiert wurde. Auf diese Weise konnten zudem die Werte der beiden unterschiedlichen Bestimmungsverfahren von K_m und V_{max} vergleichen werden. Die normierten Werte werden in dieser Arbeit durch ein ^{n}-Suffix dargestellt.

4.7 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit IBM SPSS Statistics 21 (Version 21.0.0.0) der Firma International Business Machines Corporation (IBM). Bei allen statistischen Tests wurde ein 5 % Signifikanzniveau verlangt. Ergaben sich p-Werte, die unter dem verlangten Signifikanzniveau lagen, wurden diese zusätzlich angegeben. Für Einfachvergleiche von Mittlerwerten zweier Gruppen wurde der T-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Davor wurden die Variablen mittels des Kolmogorov-Smirnow-Lilliefors-Tests auf Normalverteilung und mittels des Levene-Tests auf Homogenität der Varianzen untersucht. Für Mehrfachvergleiche von Mittelwerten mehrerer Gruppen wurde eine einfaktorielle Anova mit post-hoc-Tests nach Bonferoni, Dunnett (T2-seitig) bzw. Dunnett T3 verwendet, wobei auch hier die Homogenität der Varianzen mittels Levene-Test überprüft wurde. Die Grafiken der Mittelwertverteilung wurden im gleichen Programm erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Methodenvergleich

5.1.1 Varianten der Proteingewinnung

Die manuelle und maschinelle Homogenisierung wurden hinsichtlich einer effizienten Proteingewinnung verglichen. Die maschinelle Homogenisierung erbrachte eine nicht signifikant höhere Proteinmenge pro eingesetzte Hirnmasse als die Methode per Hand (s. Abbildung 7). Dabei war die Standardabweichung der Mittelwerte der manuellen Aufarbeitung größer als die der maschinellen ($\sigma_{manuell}$ = 8,77, $\sigma_{maschinell}$ = 6,86). Weiter wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur Proteinextraktion verglichen. Dazu wurden zwei Probengruppen zunächst nach dem maschinellen Verfahren homogenisiert und dann der Proteinextraktion nach Methode 1 bzw. nach Methode 2 zugeführt (s. Kapitel 4.3.1). Die Proteinextrakte zeigten keine signifikanten Differenzen der mittleren Gesamtmenge an Protein (s. Tabelle 3). Jedoch ermöglichten nur die Methoden 1 und 2b durch die Ultrazentrifugation eine Auftrennung in Membran- und Zytosolprotein (s. Kapitel 4.3.1).

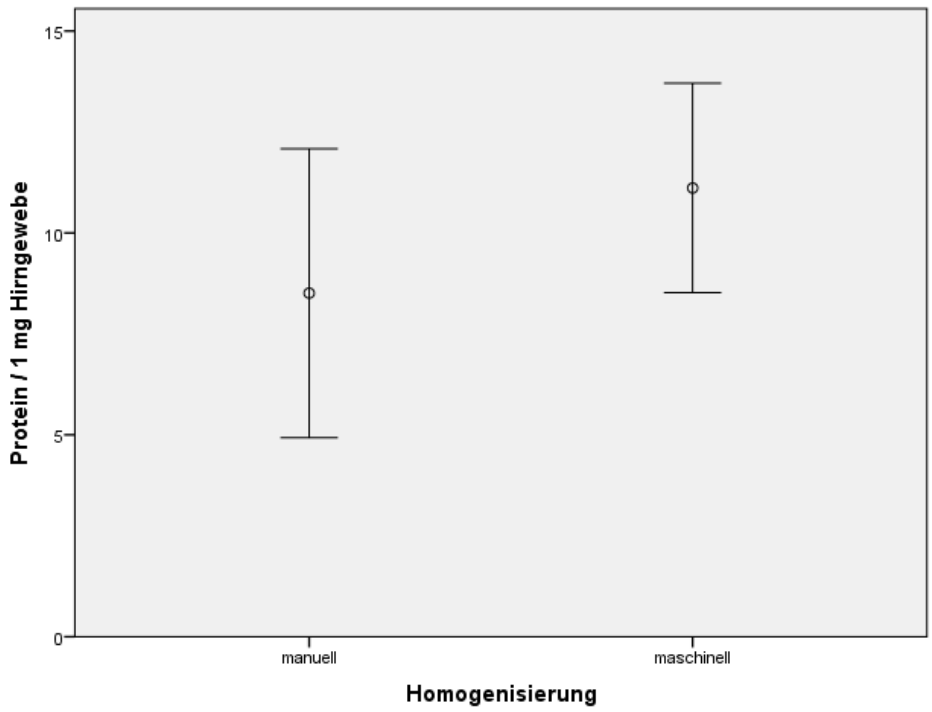

Abbildung 7:
Protein [µg] pro eingesetztem 1 mg Hirngewebe in Abhängigkeit der Homogenisierungsmethode; Mittelwerte (± SEM); p = 0,560; n = 6

Tabelle 3:
Protein pro eingesetztem 1 mg Hirngewebe in Abhängigkeit der Extraktionsmethode; Mittelwerte (± SEM); n = 7

Präparation	Anteil	Protein [µg]	*p*
Methode 1	gesamt	18 (±3,8)	0,681
Methode 2	gesamt	20 (±4,2)	

5.1.2 V_{max} und K_m in Abhängigkeit der Bestimmungsmethode

Für die Analyse wurden die Messungen der Kontrollproben ohne Testsubstanz verwendet. Sowohl die nicht-lineare als auch die lineare Regressionsanalyse zur Bestimmung von K_m und V_{max} zeigten, dass die Werte der Parameter je nach verwendetem Homogenisat individuell verteilt waren (s. Abbildung 8 und Abbildung 9). Dabei wiesen die beiden verschiedenen Berechnungsmethoden für K_m und V_{max} unterschiedliche Werteverteilungen auf. Der Standardfehler des Mittelwerts der K_m, die mittels nicht-linearer Regressionsanalyse berechnet wurden, war niedriger ($SEM_{nicht\text{-}linear}$ = 0,9) als jener der K_m nach der linearen Methode nach Lineweaver-Burk (SEM_{linear} = 2,2). Für die Bestimmung von V_{max} ergaben sich hinsichtlich des Standardfehlers des Mittelwerts keine Unterschiede (SEM_{linear} = 0,002; $SEM_{nicht\text{-}linear}$ = 0,002).

Bei der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m zeigten sich in Abhängigkeit der verwendeten Methode Unterschiede (s. Kapitel 4.6.2). Bei gleichen Ausgangsdaten lieferte das lineare Vorgehen nach Lineweaver-Burk im Mittel signifikant höhere K_m-Werte als die nicht-lineare Methode. Die beiden Auswertungsmethoden ergaben für die V_{max} vergleichbare, nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte (s. Tabelle 4).

Tabelle 4*:*
K_m und V_{max} in Abhängigkeit der Bestimmungsmethode; Mittelwerte (± SEM); p < 0,05; n = 50

	Methode		*p*
	linear	nicht-linear	
K_m [µM]	26,9 (±2,2)	10,4* (±0,9)	< 0,0001
V_{max} [µmol/min/mg]	0,029 (±0,002)	0,030 (±0,002)	0,914

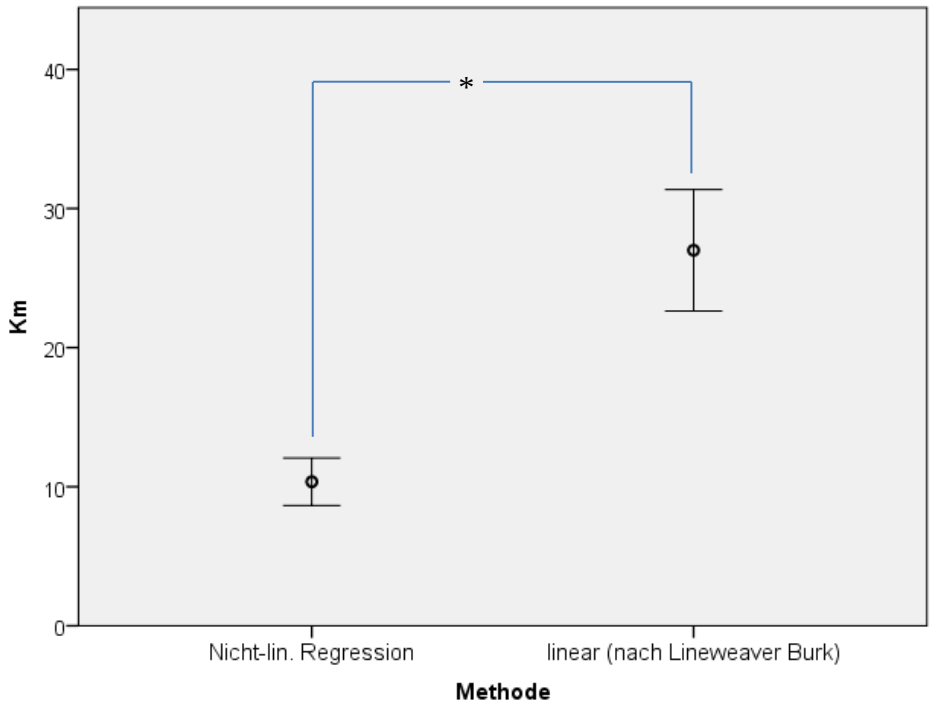

Abbildung 8:
*K_m [µM] in Abhängigkeit der Bestimmungsmethode; Mittelwerte (± 2 SEM); * p < 0,05; n = 50;*

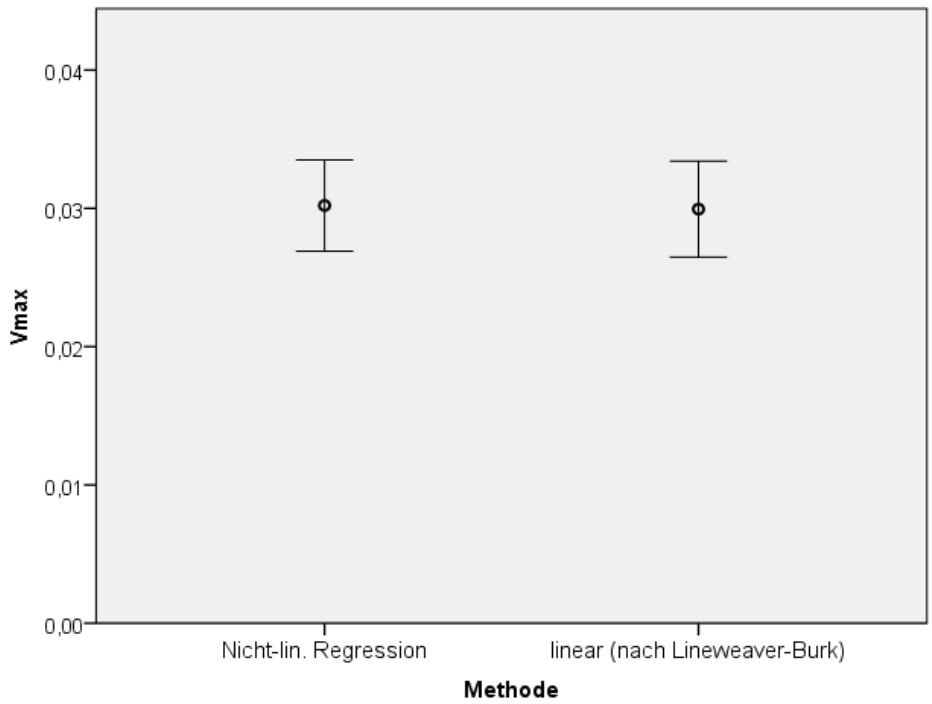

Abbildung 9:
V_{max} [µmol/min/mg] in Abhängigkeit der Bestimmungsmethode; Mittelwerte (± 2 SEM); n = 50

5.2 Validierung der Methoden

Im Vorfeld der Experimente mit Sedativa und Hypnotika sollte erstens geklärt werden, ob der detektierte Mant-cGMP-Abfall den Abbau durch PDEs widerspiegelt und zweitens, ob die Versuchsanordnung eine Inhibition der PDEs darstellen kann.

5.2.1 Denaturiertes Protein

Um auszuschließen, dass sich der Abfall des Fluoreszenzsignals von Mant-cGMP über die Zeit durch einen spontanen Zerfall des Moleküls ergab, wurde enzymatisch inaktives, hitzedenaturiertes Proteinextrakt getestet und mit einer Probe, die das identische, enzymatisch aktive Proteinextrakt enthielt, verglichen. Bei allen vier Startkonzentrationen wurde in Abwesenheit aktiver Enzyme ein Mant-cGMP-Abfall von weniger als 1 % von der Ausgangskonzentration beobachtet. Dagegen zeigte sich bei dem aktiven Protein eine kontinuierliche Mant-cGMP-Abnahme in Abhängigkeit der Ausgangskonzentration des Substrats. Die Mittelwertdifferenz war signifikant (s. Tabelle 5).

Tabelle 5:
*Mant-cGMP-Abnahme in Bezug auf die Startkonzentration Mant-cGMP bei An-/Abwesenheit von aktivem Proteinextrakt; Mittelwerte; * $p < 0,005$; $n = 3$*

	Abnahme [% / 25 min]	
Start Mant-cGMP [µM]	aktives Proteinextrakt	denaturiert
80,2	16,81	0,31*
62,8	31,68	0,09*
42,3	63,39	0,24*
20,4	90,02	0,10*

5.2.2 IBMX

Die Zugabe des unspezifischen, kompetitiven PDE-Inhibitors IBMX führte zu einer signifikanten Hemmung des Mant-cGMP-Abbaus. Eine vollständige Blockade des Abbaus blieb aus und Mant-cGMP wurde weiter in geringen Mengen hydrolysiert. Dabei war die Hemmung durch IBMX bei niedrigeren Substratkonzentrationen stärker als bei höheren (s. Tabelle 6).

Tabelle 6:
Mant-cGMP-Abnahme in Abhängigkeit der Startkonzentration Mant-cGMP; 0µM vs. 240 µM IBMX; Abnahme^n = normierter Anteil der Abnahme in Bezug auf 0 µM IBMX; Mittelwerte (± SEM); p < 0,001; n = 20*

Start Mant-cGMP [µM] Abnahme [µmol/min/mg]

	IBMX 0 µM	IBMX 240 µM	Abnahme^n
44	0,026 (± 0,002)	0,009* (± 0,0006)	0,33
38	0,022 (±0,001)	0,007 * (±0,0006)	0,33
28	0,021 (±0,002)	0,006 * (±0,0005)	0,27
20	0,018 (±0,001)	0,005* (±0,0004)	0,25
10	0,012 (±0,0006)	0,003 * (±0,0002)	0,21
5	0,007 (±0,0003)	0,001 * (±0,0001)	0,19

Für die Michaelis-Menten-Kinetikanalyse wurden die Parameter sowohl mittels linearer als auch nicht-linearer Regression bestimmt. Es zeigte sich für beide Berechnungen unter Anwesenheit von 240 µM IBMX eine signifikante Erhöhung der Mittelwerte der Michaelis-Menten-Konstante K_m (s. Abbildung 10). Des Weiteren kam es darunter auch zu einer signifikanten Erniedrigung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} (s. Tabelle 7).

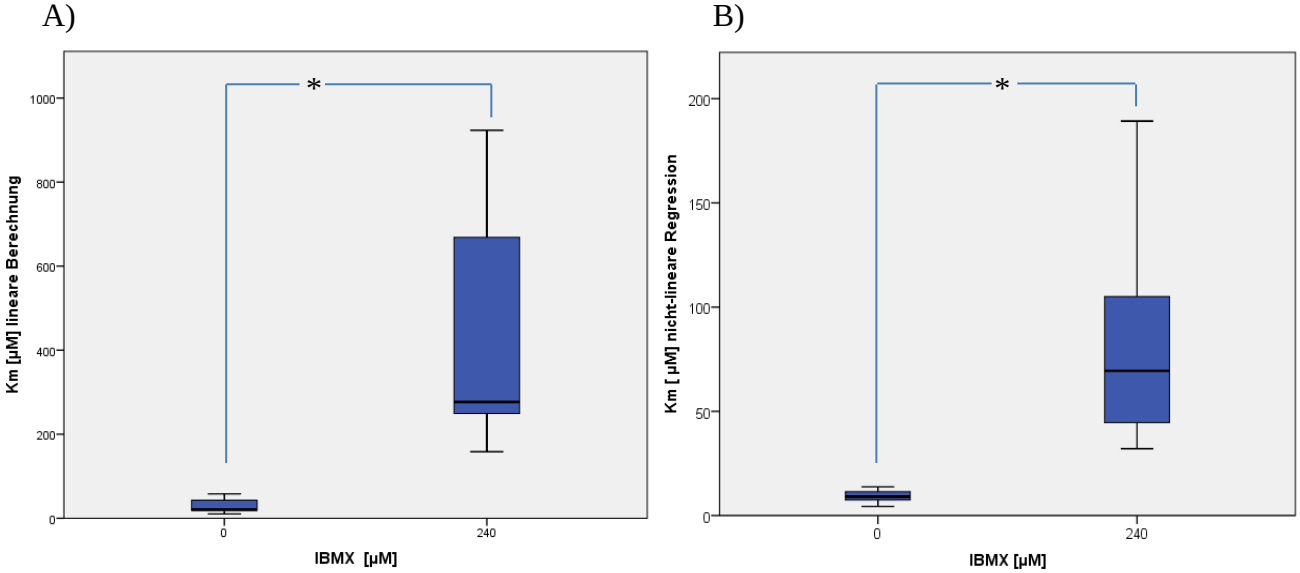

Abbildung 10:
K_m bei 0 µM vs. IBMX 240 µM; Mittelwerte (± SEM); n = 12
***A)** Lineare Berechnung: * p = 0,004; **B)** Nicht-lineare Berechnung: * p < 0,0001*

Tabelle 7:
*V_{max} [µmol/min/mg] bei 0 µM vs. 240 µM IBMX; Mittelwerte (± SEM); * p < 0,05; n = 13*

	IBMX [µM]		*p*
	0	240	
V_{max} (linear)	0,029 (±0,003)	0,018* (±0,002)	0,008
V_{max} (nicht-linear)	0,029 (±0,003)	0,020* (±0,003)	0,017

Unter Anwesenheit von 240 µM IBMX kam es bei der höchsten, eingesetzten Mant-cGMP-Konzentration nicht mehr zu einer vollständigen asymptotischen Angleichung der Reaktionsgeschwindigkeit V an die V_{max} (s. Abbildung 11).

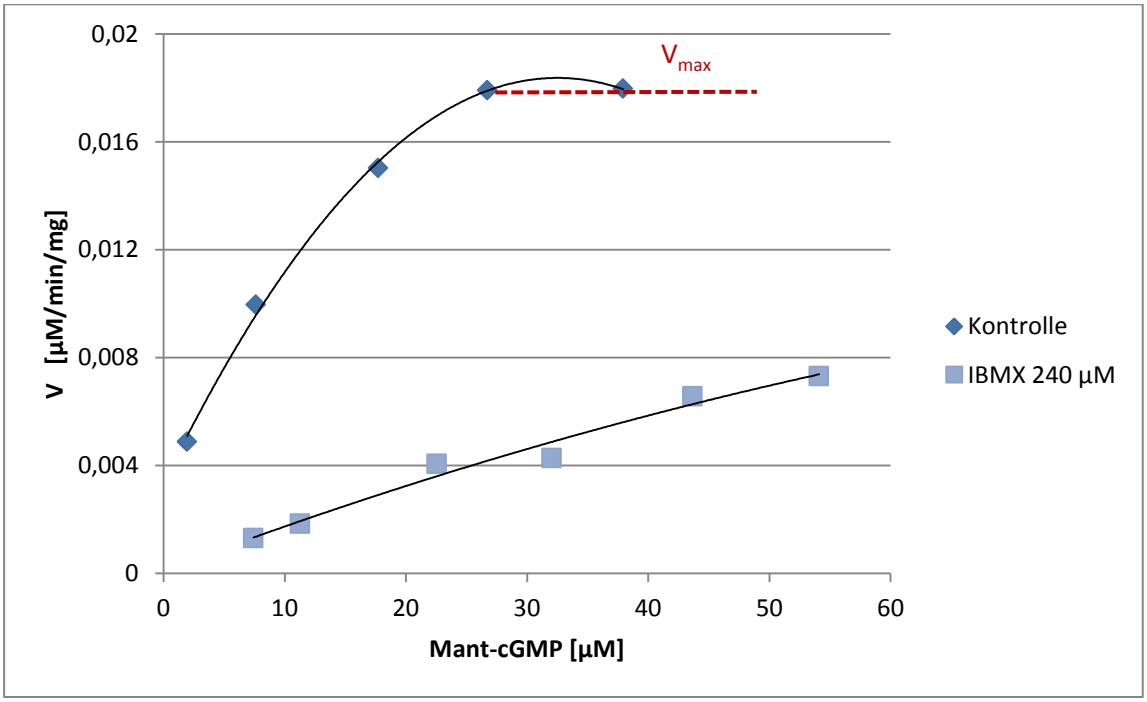

Abbildung 11:
Michaelis-Menten-Auftragung: Reaktionsgeschwindigkeit V und Mant-cGMP-Konzentration bei 0 µM und 240 µM IBMX; n = 3

5.2.3 ODQ

Um eine Beeinflussung der gemessen PDE-Aktivität durch in vitro produziertes cGMP zu testen, wurde der selektive Inhibitor ODQ der zytosolischen Guanylatzyklase verwendet. So konnte ausgeschlossen werden, dass bereits gespaltenes Mant-cGMP in vitro erneut gebildet wird. Der mittlere Mant-cGMP-Abfall war unter Anwesenheit von ODQ (10 µM, 100 µM) nicht signifikant unterschiedlich zu 0 µM.

Es wurden K_m und V_{max} nach Lineweaver-Burk bzw. durch nicht-lineare Regression berechnet. Hier zeigten sich keine signifikanten Mittelwertdifferenzen zwischen 0 µM und den ODQ-Konzentrationen 10 µM und 100 µM (s. Tabelle 8). Auch bei den normierten Quotienten fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten.

***Tabelle 8**:*
K_m; V_{max}; normierte K_m (= K_m^n), V_{max} (= V_{max}^n) in Abhängigkeit der ODQ-Konzentration; Mittelwerte (± SEM); n = 3

Parameter	Berechnung	ODQ [µM]			*p*
		0	10	100	
K_m	linear	21,1 (±8,7)	20,2 (±8,2)	22,6 (±8,1)	0,980
[µM]	nicht-linear	13,2 (±2,5)	20,4 (±2,7)	14,7 (±1,1)	0,131
V_{max}	linear	0,039 (±0,009)	0,041 (±0,009)	0,043 (±0,003)	0,920
[µmol/min/mg]	nicht-linear	0,042 (±0,010)	0,051 (±0,009)	0,041 (±0,007)	0,719
K_m^n	linear	*1*	0,98 (±1,3)	1,12 (±5,9)	0,067
	nicht-linear	*1*	1,69 (±45,7)	1,19 (±23,7)	0,313
V_{max}^n	linear	*1*	1,09 (±4,2)	1,26 (±31,0)	0,595
	nicht-linear	*1*	1,26 (±13,0)	1,01 (±9,9)	0,173

5.3 Experimente mit Sedativa und Hypnotika

Es wurden drei verschiedene anästhetisch bzw. sedativ wirkende Substanzen bezüglich ihres Einflusses auf die PDE-Aktivität untersucht.

5.3.1 Propofol

Mit dem Anästhetikum Propofol wurden drei Konzentrationsniveaus getestet (10 µM, 100 µM, 300 µM). Dabei konnte keine signifikante Änderung der Mittelwerte des Mant-cGMP-Abbaus festgestellt werden. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollproben fiel der Mant-cGMP-Spiegel unter Anwesenheit von Propofol gleich schnell ab (s. Abbildung 12).

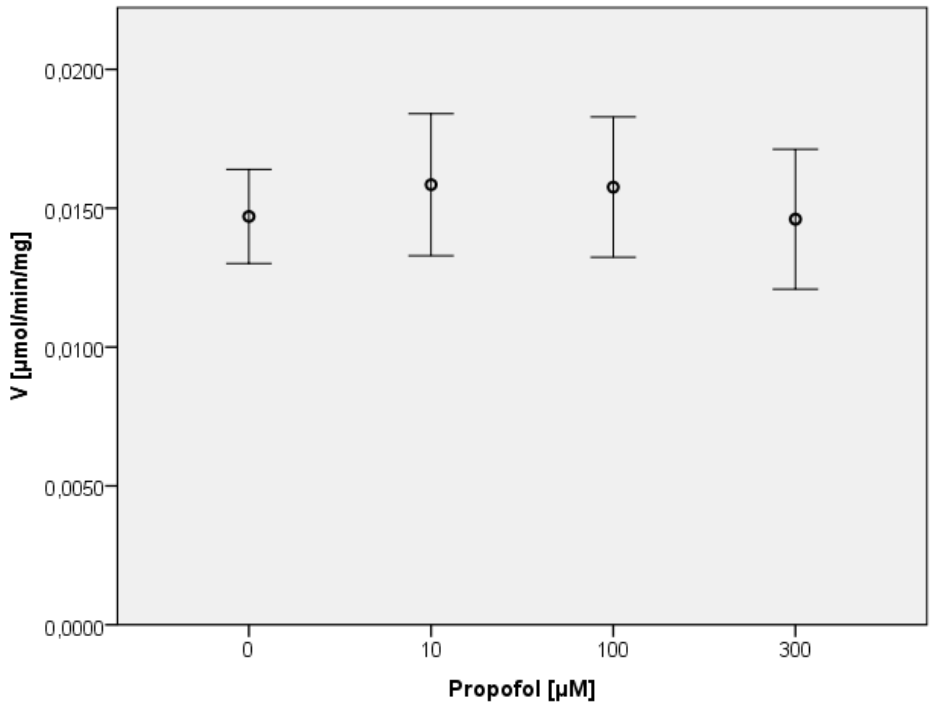

Abbildung 12:
Mant-cGMP-Abfall in Abhängigkeit der Propofolkonzentration;
Mittelwerte (± 2 SEM) aller Startkonzentrationen Mant-cGMP; jeweils n = 18

Die Resultate der Kinetikanalyse bestätigten diese Ergebnisse. Die Berechnungen von K_m und V_{max} nach Lineweaver-Burk und mittels nicht-linearer Regression zeigten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte nach Zugabe von Propofol. Die normierten K_m^n und V_{max}^n ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Mittelwertvergleich (s. Tabelle 9).

Tabelle 9:
K_m; V_{max} und normierte K_m^n; V_{max}^n in Abhängigkeit der Propofolkonzentration; Mittelwerte (± SEM); jeweils n = 3

Parameter	Berechnung	Propofol [µM]				*p*
		0	10	100	300	
V_{max} [µmol/min/mg]	linear	0,014 (±0,012)	0,026 (±0,024)	0,026 (±0,024)	0,021 (±0,002)	0,763
	nicht-lin.	0,024 (±0,0009)	0,026 (±,002)	0,025 (±0,001)	0,024 (±0,001)	0,614
K_m [µM]	linear	36,4 (±1,9)	31,78 (±0,81)	32,4 (±1,3)	32,8 (±5,1)	0,517
	nicht-lin.	10,5 (±0,7)	10,5 (±1,4)	9,9 (±1,0)	8,9 (±0,7)	0,617
V_{max}^n	linear	*1*	1,02 (±2,5)	1,03 (±2,7)	0,6 (±3,8)	0,150
	nicht-lin.	*1*	1,05 (±4,1)	1,03 (±6,8)	0,98 (±4,3)	0,488
K_m^n	linear	*1*	0,91 (±0,3)	0,93 (±3,8)	0,86 (±4,2)	0,064
	nicht-lin.	*1*	1,01 (±13,4)	0,97 (±15,1)	0,85 (±8,8)	0,601

5.3.2 Thiopental

Der Einfluss von Thiopental auf den Mant-cGMP-Abbau wurde bei drei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Bei 10 µM und 100 µM Thiopental waren keine signifikanten Veränderungen des mittleren Abfalls nachweisbar. Bei 500 µM Thiopental stieg die mittlere Hydrolyserate signifikant im Vergleich zu 0 µM an. Das Ausmaß des beschleunigten Abbaus korrelierte dabei nicht mit der Mant-cGMP-Startkonzentration (s. Tabelle 10).

Tabelle 10:
Mant-cGMP-Abnahme und normierte Abnahme in Abhängigkeit der Thiopentalkonzentration; Mittelwerte (± SEM) aller Startkonzentrationen; n = Stichprobengröße;
*p-Wert = Mittelwertvergleich mit der jeweils angegebenen Kontrolle (0 µM Thiopental: Kontrolle_10, Kontrolle_100, Kontrolle_500); * p <0,05; restl. Werte nicht signifikant*

Probe	Abnahme [µmol/min/mg]	Abnahme^n	*p*	*n*
Kontrolle_10	0,022 (±0,002)	*1*	0,325	2
Thiopental 10 µM	0,025 (±0,002)	1,03 (±0,86)		
Kontrolle_100	0,018 (±0,002)	*1*	0,516	5
Thiopental 100 µM	0,017 (±0,002)	1,04 (±1,34)		
Kontrolle_500	0,013 (±0,001)	*1*	0,028	5
Thiopental 500 µM	0,016* (±0,001)	1,41* (±2,99)		

Für die Analyse Enzymkinetik anhand von K_m und V_{max} wurden die Messungen der verschiedenen Thiopentalkonzentrationen mit der jeweiligen Kontrolle (0 µM) verglichen. Unter Anwesenheit von 10 µM und 100 µM Thiopental kam es - dem nicht signifikant veränderten, mittleren Abbau entsprechend - zu keiner signifikanten Änderung der Mittelwerte von K_m und V_{max}. Die Steigerung des Mant-cGMP-Abbaus bei Zugabe von 500 µM Thiopental ging mit einer Veränderung der beiden Parameter einher, die nach Lineweaver-Burk berechnet wurden. Im Mittelwertvergleich sank die K_m signifikant und die V_{max} stieg signifikant an. Für die Werte, die mittels nicht-linearer Regressionsanalyse ermittelt wurden, ergaben sich für die K_m-Mittelwerte keine signifikanten Änderungen. Bei den Mittelwerten der V_{max} zeigte sich eine signifikante Zunahme (s. Tabelle 11 und Abbildung 13).

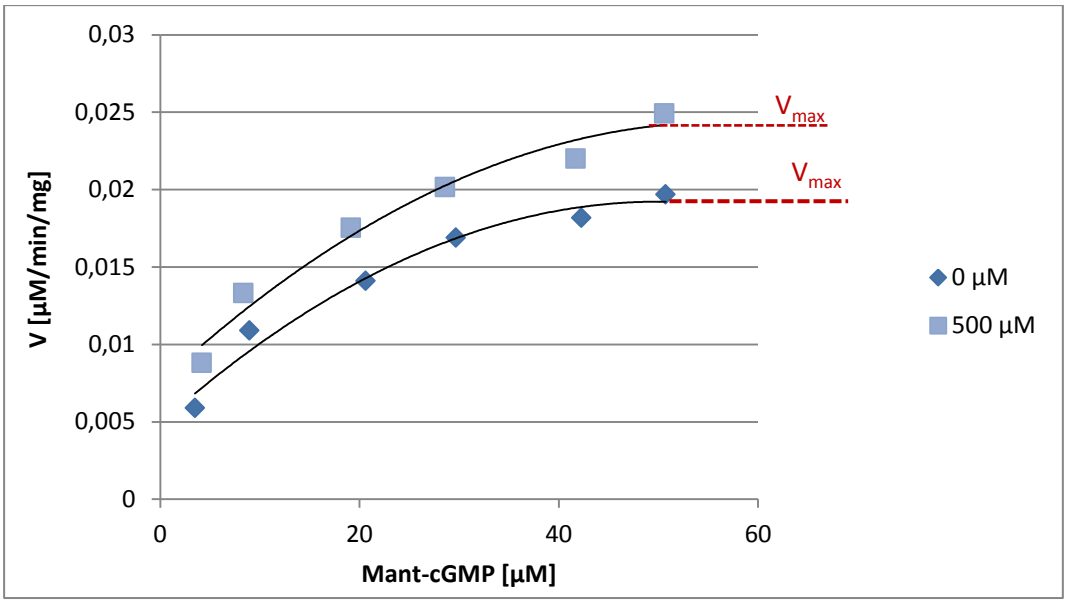

Abbildung 13:
Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration;
0 µM vs. 500 µM Thiopental; n = 3

Tabelle 11:
*K_m; V_{max} in Abhängigkeit der Thiopentalkonzentration mit zugehörigen Kontrollproben = 0 µM (Kontrolle_10, Kontrolle_100, Kontrolle_500); Mittelwerte (± SEM); * p = 0,0001; ˜ p = 0,026; § p = 0,01; restl. Werte nicht signifikant;*
n (Thiopental 10 µM) = 3; n (Thiopental 100 µM) = 4; n (Thiopental 500 µM) = 5

Probe	K_m		V_{max}	
	lin.	nicht-lin.	lin.	nicht-lin.
Kontrolle_10	13,5 (±0,23)	8,5 (±0,70)	0,041 (±0,002)	0,041 (±0,002)
Thiopental 10 µM	13,8 (±0,53)	7,7 (±0,58)	0,039 (±0,001)	0,039 (±0,002)
Kontrolle_100	31,9 (±7,5)	8,2 (±0,72)	0,028 (±0,005)	0,028 (±0,005)
Thiopental 100 µM	30,9 (±6,9)	9,7 (±1,4)	0,028 (±0,005)	0,029 (±0,004)
Kontrolle_500	44,9 (±0,84)	8,5 (±1,03)	0,020 (±0,01)	0,021 (±0,001)
Thiopental 500 µM	26,7*(±0,91)	9,7 (±0,69)	0,024˜(±0,01)	0,026§(±0,001)

Zur Analyse der K_m und V_{max} zwischen den Konzentrationsgruppen wurden die Werte auf die jeweiligen Kontrollen (0 µM Thiopental) normiert. Diese Darstellung zeigte eine signifikante Differenz der Mittelwerte von K_m^n zwischen 0 µM, 10 µM Thiopental und 500 µM Thiopental bei der Berechnung nach Lineweaver-Burk, während diese bei der nicht-linearen Regressionsanalyse fehlte. Weiter waren für beide Berechnungsmethoden die normierten Mittelwerte V_{max}^n zwischen 0 µM, 10 µM und 500 µM signifikant unterschiedlich (s. Abbildung 14 und Abbildung 15).

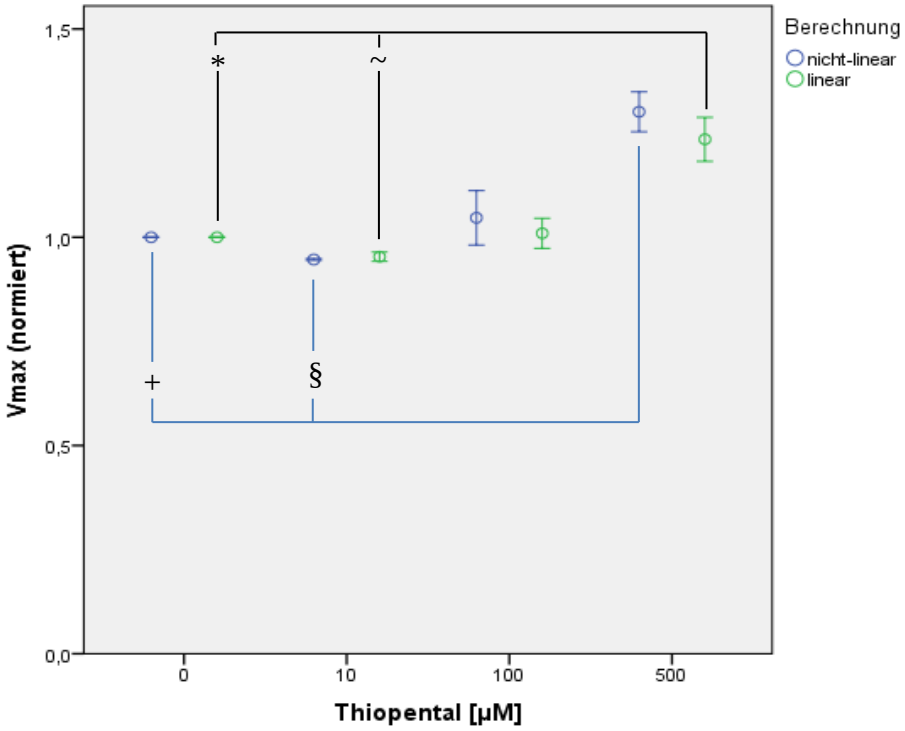

Abbildung 14:
V_{max}^n in Abhängigkeit der Thiopentalkonzentration und Parameterbestimmung;
*Mittelwerte (± SEM); * p < 0,01; ~ p < 0,015; $^+$ p < 0,02; § p < 0,013;*
restl. Werte nicht signifikant; n (10µM u. 100 µM Thiopental) = 3;
n (0 µM u. 500 µM Thiopental) = 5

Um den Einfluss von Thiopental auf die PDE-Aktivität weiter zu untersuchen, wurden Experimente mit der Kombination aus IBMX (240 µM) und Thiopental (500 µM) durchgeführt. Die Hemmung des Mant-cGMP-Abbaus durch IBMX war nach Zugabe von 500 µM Thiopental im Vergleich zu Proben mit 240 µM IBMX nicht signifikant unterschiedlich (s. Tabelle 12).

Die Mittelwertvergleiche der Parameter V_{max} und K_m der linearen als auch nicht-linearen Regressionsanalyse zeigten keine signifikante Veränderung zwischen den IBMX-Thiopental-Proben zu den reinen IBMX-Proben (s. Tabelle 12).

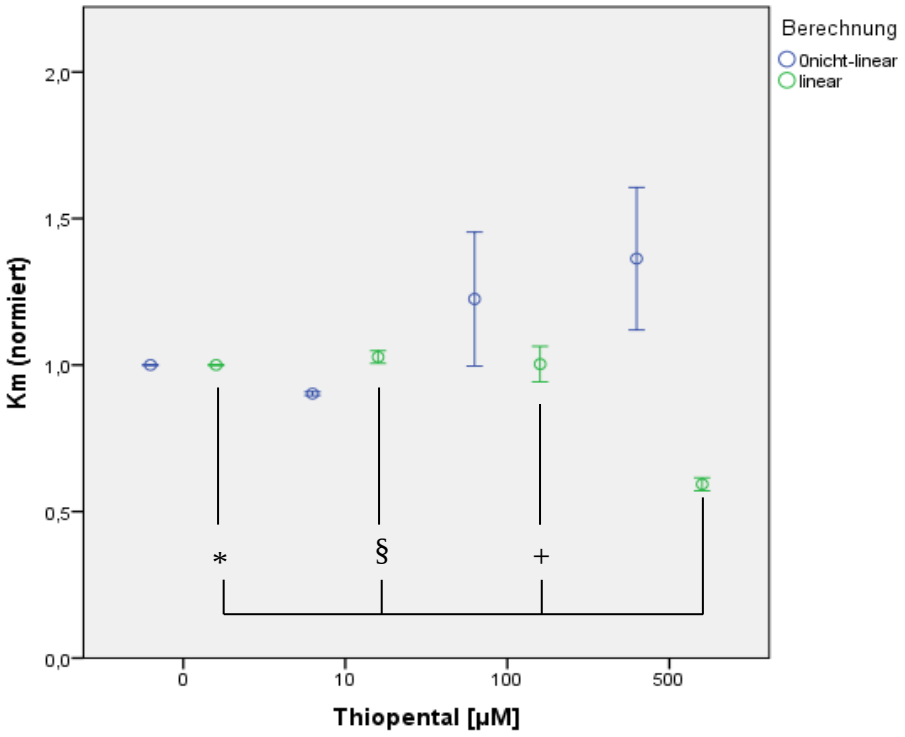

Abbildung 15:
*K_m^n in Abhängigkeit der Thiopentalkonzentration und Parameterbestimmung; Mittelwerte (± SEM); * p < 0,0001; § p < 0,0001; $^+$ p < 0,001; restl. Werte nicht signifikant; n (10µM u. 100 µM Thiopental) = 3; n (0 µM u. 500 µM Thiopental) = 5*

Tabelle 12:
Mant-cGMP-Abfall in Abhängigkeit der IBMX- bzw. Thiopentalkonzentration; Mittelwerte (± SEM) aller Startkonzentrationen; normierte Aktivität in Bezug auf die Kontrollproben; n = 17

Probe	Abfall [µmol/min/mg]	normierte Aktivität^n
Kontrolle (0 µM)	0,013 (±0,0011)	*1*
IBMX 240 µM	0,004 (±0,0006)	0,32 (±2,3)
IBMX 240 µM + Thiopental 500 µM	0,004 (±0,001)	0,33 (±2,2)

5.3.3 Diazepam

Die Wirkung von 10 µM, 30 µM und 100 µM Diazepam auf den Mant-cGMP-Abbau wurde untersucht. Die Konzentration von 10 µM Diazepam beeinflusste den mittleren Mant-cGMP-Abfall nicht signifikant. Die Konzentration von 30 µM Diazepam zeigte eine geringe, nicht signifikante Hemmung des mittleren Mant-cGMP-Abbaus. Bei Zugabe von 100 µM Diazepam wurde eine Blockade der mittleren cGMP-Hydrolyse beobachtet, deren Ausmaß von der Mant-cGMP-Startkonzentration abhing. Während sich der mittlere Abbau von 44 µM, 38 µM und 28 µM nicht signifikant verlangsamte, kam es bei 20 µM, 10 µM und 5 µM Mant-cGMP zu einer signifikanten Inhibition des mittleren Mant-cGMP-Abfalls (s. Tabelle 13 und Abbildung 16). Die Mittelwerte der Versuche mit Diazepam wurden mit den jeweils zugehörigen Kontrollproben (0 µM) verglichen.

Tabelle 13:
*Mant-cGMP-Abbau in Abhängigkeit der Startkonzentration; Mant-cGMP und Diazepam-Anteil (= Dia; Ziffer entspricht µM; Kontrolle = 0 µM Diazepam); n = 7; normierte Abnahme (= Abnahme^n)in Bezug auf die Kontrolle; * p < 0,05; restl. Werte nicht signifikant*

Start Mant-cGMP [µM]:		44	38	28	20	10	5
Abnahme	Kontrolle 10	0,030	0,026	0,023	0,015	0,022	0,0075
[µmol/min/mg]	Dia 10	0,031	0,028	0,023	0,019	0,008	0,002
	Kontrolle 30	0,020	0,020	0,020	0,018	0,013	0,005
	Dia 30	0,020	0,018	0,020	0,018	0,012	0,005
	Kontrolle 100	0,030	0,026	0,024	0,021	0,014	0,006
	Dia 100	0,028	0,024	0,020	0,016*	0,010*	0,003*
Abnahme^n	Dia 10	1,01	1,07	1,01	0,88	1,07	1,04
	Dia 30	0,91	0,92	1,01	0,98	0,88	1,03
	Dia 100	0,93	0,94	0,82	0,74	0,70	0,76

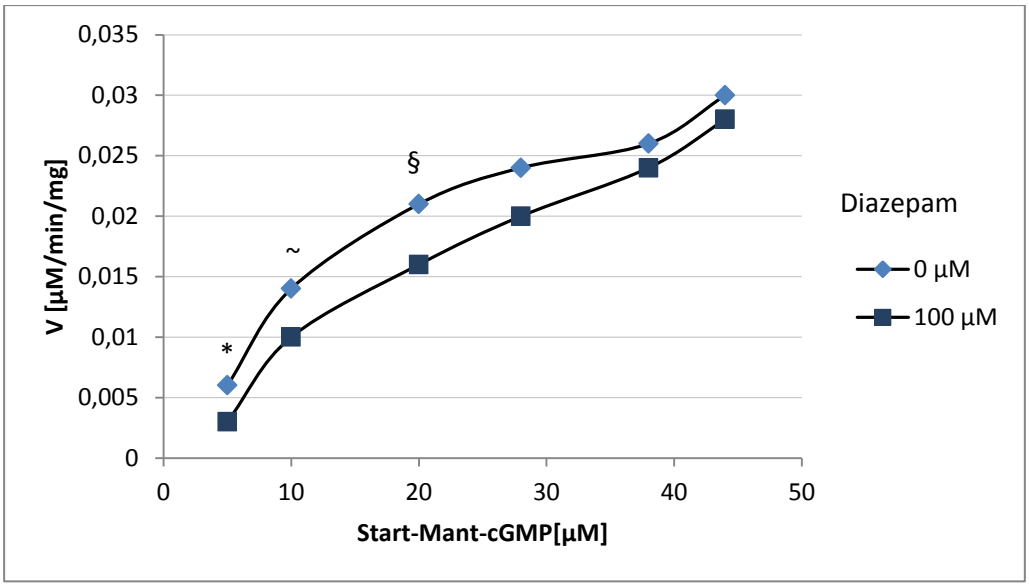

Abbildung 16: *Mant-cGMP-Abbau in Abhängigkeit der Startkonzentration Mant-cGMP; 0 µM vs. 100 µM Diazepam; * p = 0,0001; ~ p = 0,0001; § p = 0,036; restl. Werte nicht signifikant; n = 7*

Für die Analyse des Mant-cGMP-Abfalls nach der Michaelis-Menten-Kinetik wurden die K_m und die V_{max} linear nach Lineweaver-Burk und durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelt. Es zeigte sich, dass die Diazepam-vermittelte Hemmung mehr mit einer Erhöhung der K_m, als mit einer Erniedrigung V_{max} korrespondierte (s. Abbildung 17).

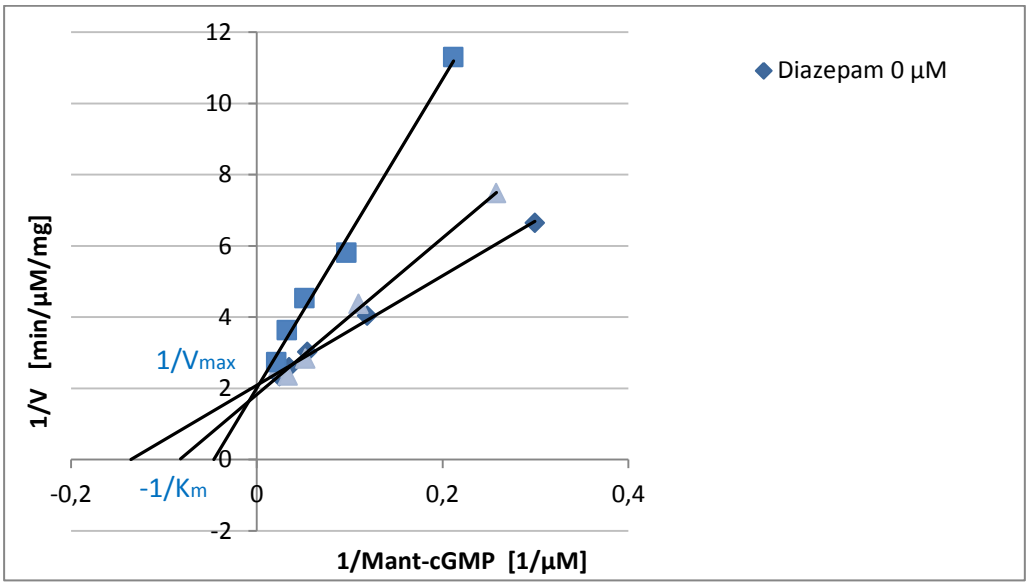

Abbildung 17:
Lineweaver-Burk-Plot: doppelreziproke Auftragung der Mant-cGMP-Konzentration und der V_{max} bei drei verschiedenen Diazepamkonzentrationen; n = 3

Der Vergleich der Mittelwerte für K_m, die nach Lineweaver-Burk ermittelt wurden, ergab einen nicht signifikanten Anstieg nach Zugabe von 30 µM und 100 µM Diazepam (s. Abbildung 18). Beim Mittelwertvergleich der K_m-Werte, die mittels nicht-linearer Regression berechnet wurden, wurde ebenfalls eine entsprechende Zunahme durch Diazepam (30 µM; 100 µM) beobachtet. Die Differenz dieser K_m-Mittelwerte zu denen der Kontrollproben war bei 30 µM nicht signifikant, bei 100 µM dagegen schon. Weiter unterschieden sich diese mittleren K_m-Werte der Diazepamkonzentration 100 µM signifikant zu jenen der beiden niedrigeren 10 µM und 30 µM (s. Abbildung 19).

Im Mittelwertvergleich der normierten Werte (K_m^n) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen 0 µM, 10 µM und 30 µM zu 100 µM Diazepam für die Parameter der nicht-linearen Regressionsanalyse. Auch waren die linear bestimmten mittleren K_m^n-Mittelwerte bei 100 µM Diazepam signifikant höher als solche bei 0 µM, 10 µM und 30 µM (s. Tabelle 14).

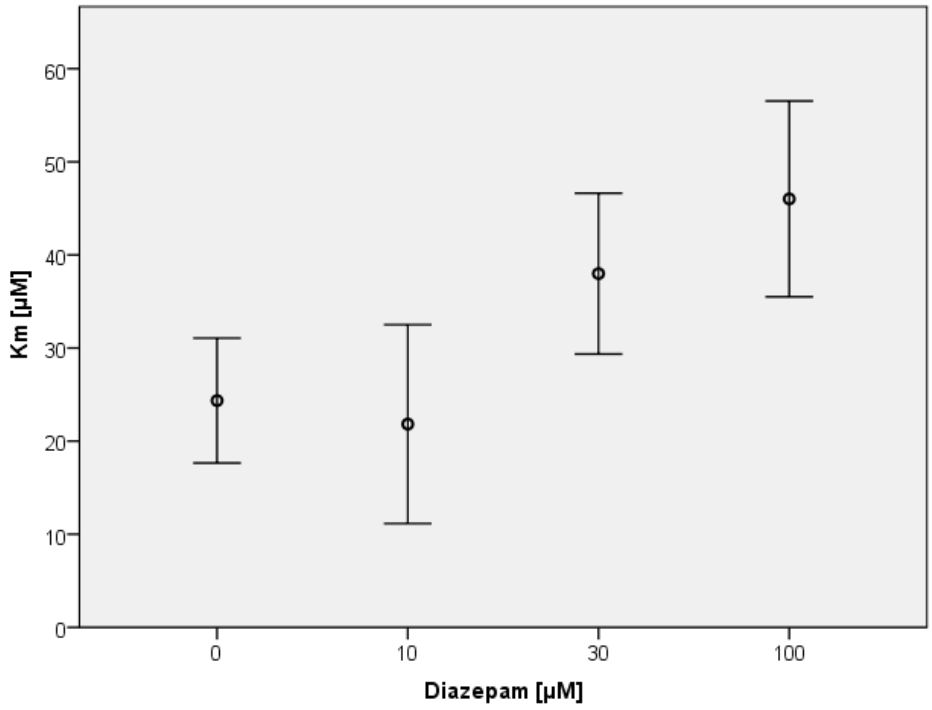

Abbildung 18:
K_m in Abhängigkeit der Diazepamkonzentration; Mittelwerte (± SEM); Parameterberechnung nach Lineweaver-Burk; n = 7; Werte nicht signifikant unterschiedlich

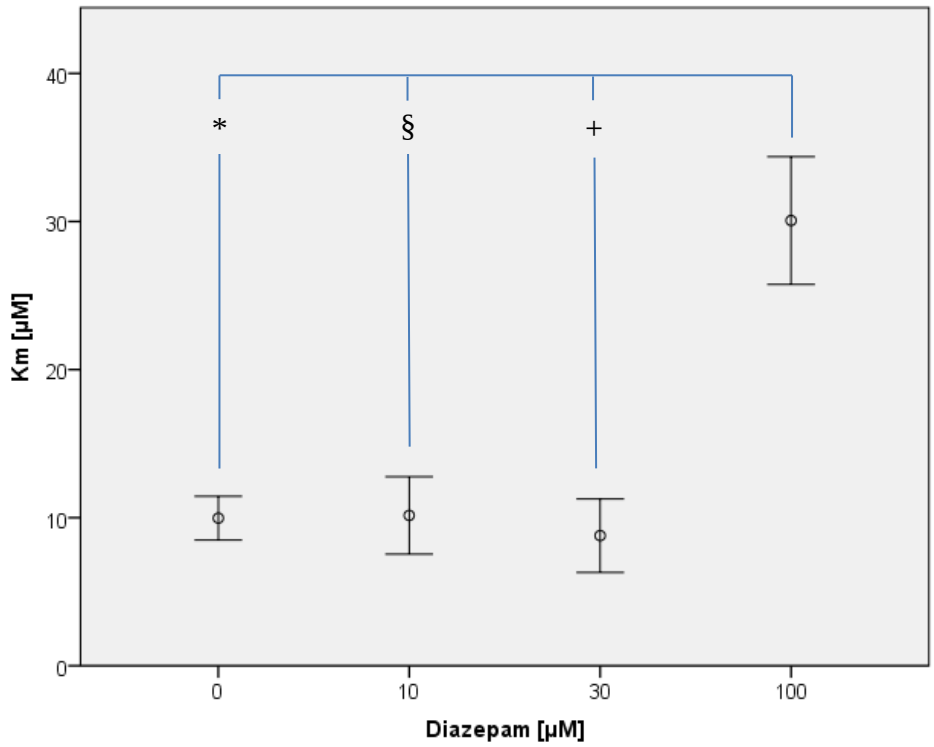

Abbildung 19:
*K_m in Abhängigkeit der Diazepamkonzentration; Mittelwerte (± SEM); Parameterberechnung mittels nicht-lin. Regressionsanalyse; * p < 0,014, § p < 0,014, $^{+}$ p < 0,017; n = 7*

***Tabelle 14**:*
*Normierte K_m^n in Abhängigkeit der Diazepamkonzentration; Mittelwerte (± SEM); * p < 0,05; n = 7*

Parameter	Berechnung	Diazepam [µM]				*p*
		0	10	30	100	
K_m^n	linear	*1*	0,95 (±3,8)	1,22 (±3,7)	2,37* (±10,7)	0,004
	nicht-lin.	*1*	0,98 (±19,9)	1,11 (±30,8)	3,26*(±49,8)	0,004
Stichprobengröße n		6	3	3	6	

Die mittlere V_{max} veränderte sich unabhängig von der Art der Parameterbestimmung nicht signifikant durch die Zugabe von Diazepam. Der Vergleich der Mittelwerte der V_{max}^n lieferte keine signifikanten Differenzen zwischen den verschiedenen Diazepamkonzentrationen (s. Tabelle 15).

Tabelle 15:
V_{max} und normierte V_{max}^{n} in Abhängigkeit von Diazepam; Mittelwerte (± SEM); n = 7

Parameter	Berechnung	Diazepam [µM]				*p*
		0	10	30	100	
V_{max} [µmol/min/mg]	linear	0,0341 (±0,0033)	0,0367 (±0,0062)	0,0278 (±0,0052)	0,0375 (±0,0034)	0,574
	nicht-lin.	0,0352 (±0,0039)	0,0385 (±0,0074)	0,0260 (±0,0057)	0,0432 (±0,0055)	0,327
V_{max}^{n}	linear	*1*	0,98 (±7,1)	1,04 (±8,3)	1,01 (±5,5)	0,870
	nicht-lin.	*1*	0,98 (±10,1)	0,98 (±11,9)	1,19 (±8,6)	0,100
Stichprobengröße n		6	3	3	6	

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Diazepam und IBMX kombiniert. Es sollte getestet werden, ob es dadurch zu einer additiven Hemmung der Mant-cGMP-Spaltung kommt. Nach Zugabe von 100 µM Diazepam zu 240 µM IBMX wurde ein nicht signifikant geringerer, mittlerer Mant-cGMP-Abbau als bei dem alleinigen Einsatz von 240 µM IBMX beobachtet. Dieser war bei den verschiedenen Startkonzentrationen konstant (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Durch die Anwesenheit des ompetitiven Inhibitors IBMX und Diazepam war die Sättigung des Enzyms mit der eingesetzten Substratmenge nicht gegeben, sodass die Kinetikanalyse des Mant-cGMP-Abfalls nicht möglich war.

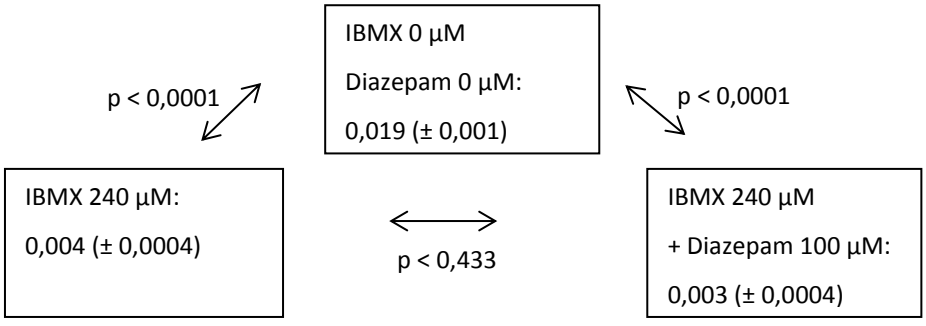

Abbildung 20:
Mant-cGMP-Abnahme [µmol/min/mg] in Abhängigkeit der IBMX- bzw. Diazepamkonzentration; Mittelwerte (± SEM) aller Startkonzentrationen; n = 20

6 Diskussion

6.1 Wahl der Proteingewinnungsmethode

Für die Gewinnung der Phosphodiesterasen aus Gewebe wurden in bisherigen Studien viele unterschiedliche Verfahren gewählt. Je nach Ausgangsgewebe wurden zum Beispiel mechanische Stößel, spezielle Aufbereitungsmaschinen wie dem Polytron-Homogenizer oder ultraschallgestützten Verfahren verwendet [107,118,121]. Um eine optimale Protein- bzw. PDE-Gewinnung evaluieren zu können, wurden in dieser Arbeit die manuelle Homogenisierung mit Stößel und die maschinelle Homogenisierung durch das FastPrep-24-Instrument verglichen. Bei der Proteinextraktion aus kleinen Hautproben hatte das FastPrep-24-Instrument eine höhere Proteinausbeute als der Polytron-Homogenizer erbracht [122]. Auch wurde es erfolgreich zur Lipoproteinisolation aus Mausgewebe, wie Gehirn, Lunge, Niere und Leber, eingesetzt [123].

In dieser Arbeit ergab die maschinelle Homogenisierung eine nicht signifikant höhere Proteinmenge pro eingesetzter Hirnmasse. Darüber hinaus zeigte sich hier eine geringere Streuung der Werte um den Mittelwert (s. Kapitel 5.1.1). Dies lässt auf eine gleichmäßigere und damit homogenere Proteinausbeute schließen. Auch überzeugte die deutlich leichtere und schnellere Handhabe des maschinellen Verfahrens im Labortalltag. Die geringere Anzahl an Arbeitsschritten reduzierte das Risiko einer Kontamination.

Der Vergleich der beiden Proteinextraktionsmethoden zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der gewonnenen Proteinmenge. Wegen der besseren Praxistauglichkeit und der guten Kombinierbarkeit mit der maschinellen Gewebehomogenisierung wurde die Methode 2 (s. Kapitel 4.3.2) gewählt.

6.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter

Die Michaelis-Menten-Gleichung mit den Parametern K_m und V_{max} charakterisiert die Kinetik zahlreicher enzymkatalysierter Reaktionen [113]. Dabei dienen K_m und V_{max} zum einen dazu, die Enzymeigenschaften zu beschreiben. Zum anderen kann anhand von K_m und V_{max} bestimmt werden, ob Inhibitoren das Enzym am katalytischen Zentrum oder an anderen Bindestellen blockieren bzw. ob es sich um nicht-kompetitive oder kompetitive Inhibitoren handelt [112]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung von K_m und V_{max} ausschließlich für Letzteres und damit für die Beschreibung der Interaktionsart der eingesetzten Substanzen mit den PDEs verwendet. Dazu wurde die Veränderung der Parameter im Vergleich zu den Kontrollproben gemessen. So war es möglich, die Wirkung der eingesetzten Substanzen auf die Enzymaktivität nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ zu bewerten [115].

Vor der Entwicklung moderner Computer waren große Rechenleistungen, welche die nicht-lineare Regressionsanalyse der Hyperbel benötigen, nicht im Alltag verfügbar. Deswegen entwickelten unter anderen Lineweaver und Burk eine Linearisierung, in der sie die Kehrwerte der Daten auftrugen [114]. Diese doppelreziproke Darstellung ist aufgrund der einfachen Handhabung und der relativ zuverlässigen Ergebnisse das bekannteste Bestimmungsverfahren für K_m und V_{max}. Allerdings kommt es insbesondere bei Messungen von kleinen Konzentrationen wegen der Verwendung der Kehrwerte zu einer Fehlerpotenzierung und damit zu relevanten Ungenauigkeiten [115]. Die Güte der Methode nach Lineweaver-Burk hängt darüber hinaus auch von der Anzahl der Wertepaare [S]/V ab. In dieser Arbeit wurden sechs Wertepaare ermittelt und ausgewertet. Diese Größenordnung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen, die die Wechselwirkungen von Medikamenten und PDEs untersuchten, verwendet [107,124]. Zwar hatte eine Metaanalyse gezeigt, dass eine größere Anzahl die Bestimmungsgenauigkeit weiter erhöhen würde; da dieser deutliche Mehraufwand jedoch die Realisierbarkeit vieler Projekte mindern würde, wird in der Forschung zur Enzymkinetik in der Regel die hier verwendete Größenordnung akzeptiert [115].

In dieser Arbeit ergaben sich bei gleichen Ausgangsdaten unbeeinflusster Reaktionen signifikant unterschiedliche K_m-Werte in Abhängigkeit von der verwendeten Methode (s. Kapitel 5.1.2). Dies ist ein Hinweis drauf, dass es durch die lineare Auftragung nach Lineweaver-Burk zu einem Bias gekommen sein kann. Diese Differenz ist für die Analyse von Inhibitoren und dem Mechanismus der Inhibition allerding nicht von Bedeutung. Da in dieser Arbeit nicht die Enzymeigenschaften, sondern die Wirkung der Medikamente bestimmt wurden, waren ausschließlich die qualitativen Veränderungen der Parameter K_m und V_{max} im Vergleich zu den Kontrollproben ohne Testsubstanz entscheidend.

Ein weiteres Indiz für die Variabilität bei der Auswertung nach Lineweaver-Burk ist die mehr als doppelt so große Streuung der K_m-Werte, der Proben ohne Testsubstanz um den Mittelwert (s. Kapitel 5.1.2). Aber auch bei den Werten, die mittels nicht-linearer Regressionsanalyse ermittelt worden waren, zeigte sich eine deutliche Streuung zwischen den einzelnen Versuchen. Ein Grund dafür könnte die individuelle Zusammensetzung der Proteinproben mit potentiell unterschiedlichem Anteil an PDEs sein. Da sich in der jeweiligen Kontrollprobe der identische PDE-Pool wie in der zu testenden Probe befand und ausschließlich diese Probenpaare verglichen wurden, wurde dieser potentielle Störfaktor eliminiert. Um den eben genannten Einschränkungen durch die Auswertungsmethoden und die Individualität der Proteinproben noch besser entgegentreten zu können, wurden die K_m- und V_{max}-Werte auf die der jeweils zugehörigen Kontrollproben bezogen und als normierter Anteil betrachtet. Dadurch konnten die Wechselwirkungen der Testsubstanz auf die PDE-Kinetik mit einem Minimum an externem Einfluss detektiert werden. Ein weiterer Vorteil der Normierung war, dass die Ergebnisse der linearen und nicht-linearen Auswertung verglichen werden konnten.

Als weiteres, computergestütztes Bestimmungsverfahren für K_m und V_{max} wurde die nicht-lineare Regression angewandt. Dazu schätzt das verwendete Computerprogramm anhand eines Algorithmus diejenige Hyperbel, die sich mit dem geringsten Fehler durch die Messpunkte legen lässt [120]. Die Konstanten dieser Hyperbelgleichung sind die Parameter K_m und V_{max} und werden mit dazugehörigem Standardfehler und Konfidenzintervall angegeben (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** nd **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Wie gut dieses Optimierungsverfahren arbeitet, hängt unter anderem davon ab, inwieweit unter Versuchsbedingungen die V_{max}, das heißt die Sättigung aller katalytischen Bindestellen mit Substrat, erreicht wurde.

Die Charakterisierung von kompetitiven Inhibitoren wie IBMX bzw. kompetitiv inhibitorischen Substanzen wie Diazepam bringt deshalb Einschränkungen mit sich. Die Interaktion von IBMX und Diazepam mit dem katalytischen Zentrum führte dazu, dass diese nicht mit Mant-cGMP besetzt waren und die V_{max} nicht erreicht wurde. In diesem Fall würde durch eine Erhöhung der Mant-cGMP-Konzentration zwar die V_{max} wieder erreicht werden und die Bestimmungsgenauigkeit für K_m und V_{max} steigen. Jedoch würden dadurch auch die kompetitiven Inhibitoren verdrängt und ihre Wirkung könnte nicht registriert werden. Daher ist die Beschreibung von kompetitiven Inhibitoren anhand von K_m und V_{max} primär von qualitativem Wert.

Bisherige Studien zur Kinetik der Phosphodiesterasen bedienten sich überwiegend linearer Auswertungsmethoden zur Bestimmung von K_m und V_{max} [35,107,124]. Diese linearen Verfahren schränken im Gegensatz zu den nicht-linearen Verfahren die Auswertungsgenauigkeit ein. Jedoch haben auch die computergestützten Verfahren Limitationen [115]. Als Konsequenz wurden in dieser Arbeit sowohl die lineare nach Lineweaver und Burk, als auch die nicht-lineare Regressionsanalyse angewendet und die normierten Ergebnisse abgeglichen.

6.3 Versuchsaufbau

Aus mehreren Gründen konnte der verwendete Versuchsaufbau eine genaue Darstellung der PDE-Aktivität gewährleisten. Zum einen konnte der Konzentrationsverlauf von Mant-cGMP, das die gleichen Eigenschaften wie cGMP besitzt, aufgrund der Fluoreszenzänderung exakt abgebildet werden [119]. Durch die vorherige Stoffauftrennung an der RP-HPLC wurden Verunreinigungen vermieden, wodurch insbesondere bei kleinen Konzentrationen Messfehler minimiert werden konnten. Die Ergebnisse der Versuche mit kleinen Konzentrationen sind vor allem auch deshalb von besonderem Interesse, da diese in vivo vorliegen. Der Fluoreszenzdetektor, dessen hohe Präzision am Einzelpeak sichtbar wurde, ermöglichte eine verlässliche Messung. Durch die Verwendung eines internen Standards wurde die Messmethode zusätzlich kontrolliert und es konnten Zusatzinformationen über die Retentionszeiten gewonnen werden.

Zum anderen wurde in Versuchen mit denaturiertem, enzymatisch inaktivem Protein gezeigt, dass die Mant-cGMP-Abnahme nicht spontan oder durch andere Mechanismen, sondern durch die PDE-Aktivität erfolgte (s. Kapitel 5.2.1).

Weiter zeigten die Versuche mit ODQ, dem Guanylatzyklase-Inhibitor, dass keine Verfälschung der PDE-Aktivität durch eine in vitro-Neubildung von cGMP bzw. Mant-cGMP entstand (s. Kapitel 5.2.3). Eine Neubildung von cGMP hätte eine Hemmung der PDE-Aktivität vorgetäuscht, da das nicht-messbare cGMP am Enzym kompetitiv binden würde. Eine Neubildung von Mant-cGMP hätte ebenfalls eine niedrige Enzymaktivität imitiert. Durch die Versuche mit dem PDE-Inhibitor IBMX wurde bestätigt, dass der Versuchsaufbau eine Beeinflussung der Enzymaktivität darstellen konnte (s. Kapitel 5.2.2).

Ein essentieller Faktor bei in vitro-Versuchen ist die Haltbarkeit der Enzyme. Dazu wurde im Vorfeld dieser Arbeit die zeitabhängige Enzymaktivität getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche, die hier nicht aufgeführt sind, zeigten, dass über die Dauer von 30 min kein Aktivitätsverlust auftrat. Da der vollständige Abbau der hohen Substratkonzentration, mit der die V_{max} erreicht werden konnte, diese Zeitspanne überschritten hätte, wurden, um die vollständige Reaktion abzubilden, verschiedenen Startkonzentrationen gewählt und in einzelne Reaktionsansätze gesplittet.

Andere Studien, die die PDE-Aktivität in vitro untersucht hatten, verwendeten einen H^3-Radio-Assay [96,107]. In diesem Verfahren war allerdings ein weiterer Enzym-abhängiger Arbeitsschritt notwendig, bevor das verbliebende cGMP-Äquivalent gemessen werden konnte. Dieser zweite Arbeitsschritt erhöht das Risiko für Fehler beim Handling. Dies ist bei der Verwendung von Mant-cGMP nicht gegeben und ist ein Grund für die hohe Präzision dieser Methode. Darüber hinaus zeichnet sich das Substrat des Radio-Assays durch eine größere Instabilität aus, was eine häufigere Purifikation nötig macht [125]. Das hier verwendete Verfahren, bei dem keine zusätzliche Behandlung des Mant-cGMPs notwendig war, bot damit eine deutlich einfachere und sicherere Handhabe, wodurch das Fehlerrisiko minimiert wurde.

6.4 Sedativa und Hypnotika

Sedativa wie zum Beispiel das Benzodiazepin Diazepam und Hypnotika wie zum Beispiel Propofol finden in verschiedenen Bereichen der Schulmedizin Anwendung. Im Vergleich zu anderen Medikamenten zeichnen sie sich durch eine relativ unspezifische Pharmakologie aus und führen durch die kombinierte Beeinflussung verschiedener physiologischer Abläufe unseres Gehirns zu einer Einschränkung des Bewusstseins. Die Störung der Informationsübertragung zwischen den Neuronen durch die Interaktion mit den an der Signaltransmission beteiligten Ionenkanälen und Rezeptoren ist einer der bekannten Mechanismen, über die Anästhesie und Sedierung vermittelt werden [126]. Seit den 90er Jahren ist außerdem bekannt, dass Hypnotika zusätzlich auf intrazellulärer Ebene direkt auf die second-messenger der Signaltransmission, wie zum Beispiel das NO/cGMP-System, einwirken [126]. Da der NO/cGMP-Metabolismus mit zahlreichen Transmittersystemen wie zum Beispiel Glutamat, Glycin und Acetylcholin vernetzt ist und so eine zentrale Rolle bei der Regulation von Vigilanz und Stressbewältigung einnimmt, stellt er ein potentes und effektives Ziel für Hypnotika dar. Der gemeinsame Endpunkt der komplexen Regulation des NO/cGMP-Systems ist die cGMP-Konzentration [101,126]. Ein Einfluss darauf wurde vor allem deshalb angenommen, da in früheren Untersuchungen eine Hemmung der NO- bzw. der cGMP-Synthese durch volatile und intravenös applizierte Hypnotika und Sedativa gezeigt werden konnte [104,116]. Die cGMP-Konzentration wird primär über den Abbau durch die PDEs kontrolliert, die aufgrund ihrer kinetischen Eigenschaften das Nukleotid affiner und schneller spalten als die Guanylatzyklasen es bilden [2,31]. Trotz ihrer entscheidenden Rolle für das Informationssignal des NO/cGMP-Metabolismus sind PDEs als potentielle Interaktionspartner mit Hypnotika und Sedativa viel weniger intensiv untersucht. Auch wenn bereits zahlreiche Zielstrukturen von Hypnotika identifiziert worden sind, bleiben viele Aspekte des Wirkmechanismus von anästhesierelevanten Medikamenten bis heute unklar. Für das Verständnis und vor allem für die Prävention von unerwünschten Nebenwirkungen sowie der Entwicklung spezifischerer, nebenwirkungsärmerer Präparate ist die Erforschung weiterer molekularer Grundlagen von Narkose und Sedierung unerlässlich. Einen möglichen Einfluss von Hypnotika und Sedativa auf die cGMP-spezifische PDE-Aktivität zu untersuchen ist daher von großem Interesse [126].

6.4.1 Propofol

Es konnte gezeigt werden, dass cGMP bei der Vermittlung der sedativen und anästhetischen Wirkung vieler Hypnotika und Sedativa wie zum Beispiel Isofluran und Diazepam eine zentrale Rolle spielt [126]. Daher ergab sich die Fragestellung, ob auch Propofol auf das cGMP-System wirkt. Messungen des cGMP-Spiegels im Speichel von Patienten unter Propofol/Isofluran-Anästhesie zeigten erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, die kein Propofol erhielt [109]. Auch deuteten weitere Experimente, die anhand des cGMP-Plasmaspiegel kontrolliert wurden, eine veränderte Wirkdauer von Propofol durch die simultane Gabe des PDE5-Inhibitors Sildenafil an [110]. Jedoch sind sowohl anhand der Speichel- als auch der Plasmakonzentration nur sehr bedingt Rückschlüsse auf die zerebralen cGMP-Spiegel möglich. Auch wenn erste Zusammenhänge zwischen dem NO/cGMP-Metabolismus und Propofol aufgezeigt worden sind, bleibt ein konkreter Mechanismus weiter unklar [101,127]. Daher sollte in dieser Arbeit eine potentielle direkte Wirkung von Propofol auf zerebrale, zytosolische PDEs untersucht werden. Es konnte bei allen untersuchten Propofol-Konzentrationen keine Veränderung des Mant-cGMP-Abbaus verzeichnet werden. Die dazu gewählten Propofol-Konzentrationen hatten jedoch in anderen Versuchsansätzen bereits eine wirksame Beeinflussung des myokardialen cAMP-Haushalts und des cAMP vermittelten Tonus renaler Arteriolen gezeigt [128,129]. Daher darf von einer ausreichend hohen Dosierung von Propofol ausgegangen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergeben daher keinen Hinweis darauf, dass Propofol mit dem neuronalen, zytosolischen cGMP-Abbau interferiert. Für eine weitere Erforschung der Beziehung von Propofol und PDEs wären die membranständigen PDEs ein interessanter Ansatzpunkt. Die aufwändigen Untersuchungen dazu wären im Rahmen einer weiteren Arbeit zu sehen, die hierfür die Proteinextraktionsmethode dieser Arbeit anwenden könnte. Um die Wechselwirkungen von Propofol mit dem NO/cGMP-System im Ganzen beurteilen zu können, fehlen bisher weitere spezifische Untersuchungen.

6.4.2 Thiopental

Zunächst wurde für volatile Hypnotika eine Steigerung der Wirkpotenz durch die Inhibierung des NO/cGMP-Metabolismus beschrieben [101]. Daran angeknüpfte Studien konnten auch für intravenöse Hypnotika, darunter das Barbiturat Thiopental, eine Potenzierung des hypnotischen Effekts durch die simultane Gabe des NO-Synthase-Hemmers L-NAME demonstrieren [127]. Daraus wurde geschlossen, dass Thiopental zumindest einen Teil seiner anästhetischen und sedativen Wirkung durch die Hemmung des NO/cGMP-Stoffwechselwegs entfaltet [126]. An Kleinhirnschnitten von Ratten wurde gezeigt, dass Thiopental den cGMP-Anstieg, der durch Stimulation von glutamatergen NMDA-Rezeptoren induziert worden war, unabhängig von NO unterdrückt [104]. Als mögliche Gründe für diese Beobachtung wurden sowohl eine Inhibition der cGMP-Synthese durch die GC als auch eine Verstärkung des cGMP-Abbaus durch PDEs diskutiert. Die Versuche an zerebellärem Gewebe von *Terasako et al.* wiesen nach, dass Thiopental die stimulierte GC hemmt. Die Vermutung, dass auch eine Aktivierung der PDEs ursächlich sein könnte, konnte der Versuchsaufbau zu diesem Zeitpunkt nicht zeigen [104]. Während daraufhin die GC-Hemmung durch Thiopental zu einer von vielen Autoren anerkannten Annahme wurde, erfolgte in der vergangenen Zeit keine Überprüfung der Beziehung von Thiopental und der PDE-Aktivität [126,130]. Insbesondere ihre essentielle Rolle für die cGMP-Konzentration macht die PDEs als potentiellen Angriffspunkt von Thiopental jedoch bedeutsam.

Angesichts der offenen Frage, ob und wie Thiopental insbesondere auf den basalen cGMP-Spiegel wirkt, wurde in dieser Arbeit die Interaktion von Thiopental und neuronalen zytosolischen PDEs anhand der neueren, exakten Methode mit Mant-cGMP untersucht werden.

Die Zugabe von 10 µM und 100 µM Thiopental beeinflussten den Mant-cGMP-Abbau nicht. In Anwesenheit von 500 µM Thiopental lief der Mant-cGMP-Abbau signifikant schneller ab als jener der Kontrollproben, die 0 µM enthielten. Die Beschleunigung betrug unabhängig von der Mant-cGMP-Startkonzentration das 1,4-fache der Abbaurate der Kontrollen (s. Kapitel 5.3.2). Vorversuche mit dem GC-Inhibitor ODQ hatten keinen veränderten Mant-cGMP-Abbau gezeigt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der beschleunigte Abbau nicht durch die Hemmung der GC, sondern durch eine Aktivierung der PDEs durch Thiopental entstand.

Dass es im Rahmen einer Narkose mit Thiopental zu einer Absenkung des cGMP-Spiegel kommt, konnte in früheren Studien anhand der durch Thiopental gehemmten GC gezeigt werden [104]. Die vorliegende Arbeit legt darüber hinaus dar, dass der cGMP-Spiegel in vitro ebenfalls durch eine Aktivierung der PDEs gesenkt wird. Für die Anwendung von Thiopental in vivo würde dies eine gleichsinnige Beeinflussung des cGMP-Spiegels bedeuten, die sowohl einen verminderten stimulierten cGMP-Anstieg als auch einen gesteigerten Abbau des basalen cGMP-Spiegels umfasst. In vivo könnte es damit zu einer Potenzierung des Effekts von Thiopental kommen. Dies würde auch die höheren Konzentrationen von Thiopental erklären, die für in vitro-Versuche, die jeweils einen Arm des cGMP-Haushalts betrachten, notwendig sind [126].

Der beschleunigte Abbau unter Thiopental wurde hinsichtlich Auswirkungen auf die Enzymkinetik analysiert. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m veränderte sich uneinheitlich. Die Werte der linearen Berechnungsmethode nach Lineweaver-Burk sanken signifikant. Dieses Ergebnis wurde von den Werten, die mittels der nicht-linearen Methode berechnet wurden, nicht bestätigt. Diese kontroversen Ergebnisse erlauben keine definitiven Rückschlüsse darauf, ob Thiopental die Affinität der PDEs für ihr Substrat ändert. Ein möglicher Grund könnte eine Verzerrung der Ergebnisse durch die doppelreziproke Auftragung der linearen Darstellung sein. Die ebenfalls größere Streuung der Ergebnisse der nicht-linearen Methode legt allerdings einen zusätzlichen Störfaktor nahe. Denkbar wäre unter anderem eine entgegengesetzte Beeinflussung der Affinität der verschiedenen PDE-Familien, die im verwendeten Homogenisat enthalten waren. Die unterschiedlichen katalytischen Domänen und Regulationsdomänen der einzelnen PDE-Familien stellen dafür die molekulare Grundlage dar. Da die Analyse der K_m alle PDE-Familien umfasste, könnten sich einzelne Veränderungen addieren oder subtrahieren und so zu einer kontroversen Entwicklung der globalen K_m führen.

Eindeutige Ergebnisse lieferte die Analyse der V_{max}. Beide Bestimmungsmethoden (linear und nicht-linear) ergaben eine signifikant erhöhte V_{max} bei Zusatz von 500 µM Thiopental. Daraus lässt sich schließen, dass der beschleunigte Mant-cGMP-Abbau durch eine Steigerung der maximalen Wechselzahl der PDEs entstand. Thiopental könnte dies durch eine allosterische Aktivierung der Enzyme vermitteln. Dafür kämen zum Beispiel direkte Thiopental-Bindungsstellen an den PDEs in Frage.

Aber auch eine indirekte, allosterische Aktivierung durch die Beeinflussung anderer Regulationsmechanismen der PDE-Aktivität wäre denkbar. Der Einfluss von Thiopental auf den Phosphorylierungszustand der PDEs sowie eine Veränderung des cAMP-Spiegels würden die Enzymaktivität anheben. So führt zum Beispiel die Phosphorylierung von PDE2 und PDE5 zu einer Aktivitätssteigerung. Die PDE10 hingegen besitzt cAMP-affine GAF-Bindungsstellen, die bei in vitro-Versuchen eine allosterische Aktivierung vermittelten [75].

Zur Überprüfung der Annahme, dass Thiopental primär über eine Erhöhung der V_{max} der PDEs wirkt, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der unspezifische PDE-Inhibitor IBMX mit der wirksamen Thiopental-Konzentration kombiniert. Der kompetitive PDE-Inhibitor IBMX führte primär zu einer Erhöhung der K_m. Würde Thiopental auch die Affinität der PDEs für Mant-cGMP erhöhen und damit K_m senken, könnte ein Teil der IBMX-Wirkung antagonisiert werden. Die Kombination von Thiopental und IBMX führte weder zu einer Veränderung des Mant-cGMP-Abbaus noch zu einer Veränderung von K_m und V_{max} im Vergleich zu Proben, die ausschließlich IBMX enthielten. Der schnellere Mant-cGMP-Abbau durch Thiopental ist daher in diesem Versuchsaufbau nicht durch eine Interaktion am aktiven Zentrum der PDEs zu erklären.

Am Tiermodell mit Xenopus laevis zeigten *Tonner et al.*, dass die klinische Wirkung von Thiopental mit einer Hemmung des NO/cGMP-Stoffwechselwegs einhergeht [126]. Aufgrund der Ergebnisse von *Teresako et. al.* wurde eine Hemmung der cGMP-Produktion durch die GC als molekulare Grundlage angenommen [104]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit leisten einen weiteren Beitrag für die Identifizierung zusätzlicher molekularer Angriffspunkte von Thiopental. Welche Bedeutung die nachgewiesene Aktivierung der neuronalen zytosolischen, cGMP-spezifischen PDEs für die klinische Praxis hat, können in vitro-Versuche allerdings nicht beantworten. Jedoch bieten diese Ergebnisse einen neuen Anstoß für die Erforschung der Wechselwirkungen von Thiopental und PDEs.
Die exakte Methode mittels Mant-cGMP könnte in Zukunft auch bei Zellmodellen weiter eingesetzt werden und so überprüfen, ob die hier gemachten Beobachtungen übertragbar sind. Weitere in vitro-Versuchsreihen mit dem Einsatz von purifizierten PDEs würden eine Verifizierung der hier gefundenen K_m-Veränderungen erlauben.

6.4.3 Diazepam

Für das Benzodiazepin Diazepam liegen bisher noch keine Daten über Interaktionen mit neuronalen cGMP-spezifischen PDEs vor. Ein Zusammenhang zwischen Diazepam und dem NO/cGMP-Metabolismus liegt aber aufgrund von Ergebnissen, die eine veränderte cGMP-Synthese unter dem Einfluss von 1 mM Diazepam ergeben, nahe [106]. Diese Untersuchungen an Kleinhirnschnitten von Ratten können jedoch wegen der teils gegensätzlichen Messungen, die bei Diazepamzugabe sowohl einen Abfall als auch Anstieg des cGMP-Spiegels zeigten, alleine keine befriedigende Antwort auf die Frage geben, ob und wie Diazepam auf den NO/cGMP-Metabolismus einwirkt [106].

In verschiedenen Studien wurden kardiale und neuronale cAMP-spezifische PDEs bereits auf ihre Beeinflussbarkeit durch Diazepam untersucht. Zum einen stellte sich dabei heraus, dass Diazepam in vitro zu einer Akkumulation von cAMP führt, wobei ein Gemisch aller neuronalen cAMP-spaltenden PDEs verwendet wurde (IC_{50} 38 µM) [96]. Zum anderen inhibierte Diazepam in isolierten Gewebesträngen die myokardiale PDE4, die cAMP hydrolysiert [107]. Ebenfalls hinweisend auf eine Hemmung des cAMP-Abbaus durch Diazepam könnten erhöhte cAMP-Blutwerte sein, die bei anästhesierten Patienten nach einer Diazepamgabe gemessen wurden [108]. Aufgrund der engen Verknüpfung der Nukleotide cAMP und cGMP, wie zum Beispiel über dualspezifische PDEs, könnte auch eine Hemmung der cGMP-spezifischen PDEs ein möglicher Angriffspunkt von Diazepam auf den NO/cGMP-Metabolismus sein [16].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Überlegungen und zeigen, dass Diazepam cGMP-spezifische PDEs inhibiert. Diazepam hemmte konzentrationsabhängig die Mant-cGMP Hydrolyse durch neuronale zytosolische PDEs. Diazepam-Konzentrationen von 10 µM und 30 µM führten zu keiner Veränderung der Mant-cGMP-Hydrolyse im Vergleich zur Kontrollprobe, die kein Diazepam enthielt. Bei Zusatz von 100 µM Diazepam sank die Abbauraute auf 80 % des Kontrollwerts.

Um sicher zu gehen, dass die verminderte Mant-cGMP-Abnahme auch eine Hemmung der PDE-Aktivität widerspiegelte, wurden mögliche Störfaktoren ausgeschlossen. Eine Störung der Enzymaktivität durch DMSO, das zur Lösung von Diazepam verwendet wurde, konnte durch entsprechende Kontrollversuche ausgeschlossen werden. Zudem wurden für den verwendeten DMSO-Volumenanteil von unter 0,3 % bisher keine Enzymfunktionsstörungen beschrieben [107].

Eine Vorinkubation führte zur Hydrolyse von noch vorhandenem endogenem cGMP. Damit konnte sichergestellt werden, dass keine kompetitive Hemmung der PDEs durch endogenes, unmarkiertes cGMP in der Probe auftrat. Hemmende Einflüsse durch eine in vitro-Neubildung von cGMP sowie von gespaltenem Mant-cGMP mussten primär mit in Erwägung gezogen werden. Die Synthese von neuem cGMP und Mant-cGMP konnte jedoch in einer separaten Versuchsreihe ausgeschlossen werden. In dieser zeigte sich, dass die Zugabe des sGC-Inhibitors ODQ zu keiner Veränderung der PDE-Aktivität im Vergleich zu Kontrollproben ohne ODQ führte. Da Mant-cGMP zudem mit der gleichen Enzymkinetik wie cGMP durch PDEs abgebaut wird, ist also von einer Hemmung zytosolischer cGMP-spezifischer PDEs durch Diazepam auszugehen [119].

Die Zugabe von Diazepam führte nicht zu einer vollständigen Blockade der PDE-Aktivität. Die Bedeutung der verbliebenen Restaktivität der Enzyme muss zunächst hinsichtlich der Versuchsanordnung betrachtet werden. Ein spontaner Zerfall des restlichen Mant-cGMPs konnte in diesem Versuchsaufbau ausgeschlossen werden, da denaturiertes und damit inaktives Protein zu keiner Mant-cGMP-Abnahme führte. Durch den Einsatz des ubiquitären Inhibitors IBMX, der mit Ausnahme von PDE9 (und PDE8, die cGMP nicht spaltet) mit einer mittleren Hemmkonzentration (IC_{50}) von 2-50 µM alle PDEs hemmt, sank bei 240 µM die Abbaurate auf 30 % in Bezug auf die Kontrollwerte [2]. Diese Restaktivität kann zum einen durch die PDE9 entstanden sein. Zum anderen könnten jedoch Einflüsse durch die Verteilung im Probengefäß und die Inkubationsdauer verantwortlich sein. Um diese potentiellen Einflussfaktoren zu minimieren, kamen Magnetrührer zur Anwendung. Ferner wurde mit den in früheren Studien erprobten Inkubationszeiten gearbeitet [118].

Die beobachtete Restaktivität der PDEs von 80% bei Inkubation mit Diazepam wirft die Frage auf, ob Diazepam als spezifischer oder unspezifischer PDE-Inhibitor agiert. Ein unspezifischer Inhibitor könnte bei unzureichender Dosierung eine Restaktivität verursachen. Allerdings war die hier verwendete Diazepam-Konzentration (100 µM) gleich hoch oder höher als die Konzentrationen, die in anderen Versuchsmodellen für eine umfassendere PDE-Hemmung nötig waren, sodass eine unzureichende Dosierung unwahrscheinlich ist [96,107].

Ein anderer möglicher Grund wäre, dass Diazepam nicht alle PDE-Familien inhibiert. Da sich im eingesetzten homogenisierten Rattenhirn verschiedene PDEs von Blutgefäßen, Gliazellen und Neuronen befanden, muss bei diesem Versuchsaufbau anhand von Literaturangaben abgeschätzt werden, welche cGMP-hydrolysierende PDE-Familien im verwendeten zytosolischen Protein enthalten waren. Die PDE-Familien 1, 2, 3, 5, 6, 9 und 10 hydrolysieren cGMP. Mit Ausnahme von PDE3 ist bisher für alle der Nachweis im Gehirn gelungen. Die PDE3 ist jedoch in Gefäßen vertreten [2]. Die PDE6 dürfte im Homogenisat in vernachlässigbar geringen Mengen vertreten sein, da sie im Gehirn bisher ausschließlich im Pinealorgan nachgewiesen wurde [64]. Die damit verbleibenden Formen, die in Betracht kommen, sind die zytosolischen PDE1-Isoformen, PDE2A1, PDE3A, PDE5, PDE9A5 und PDE10A1/3 [2]. Damit eine Bestimmung der Enzymkinetik nach Michaelis-Menten möglich war, wurde eine große Konzentration des Substrats Mant-cGMP eingesetzt. Unter diesen Bedingungen ist nicht die Affinität zum Substrat sondern die maximale Wechselzahl des Enzyms entscheidend für die Abnahme der Mant-cGMP-Konzentration. Die Restaktivität von 80 % bei Zugabe von Diazepam spräche also für die Hemmung einer PDE-Familie mit geringerer Hydrolysegeschwindigkeit wie die PDE3, PDE5 und PDE9. Die PDE1-Isoformen (30-300 µmol/min/mg) und die PDE2A1 (123 µmol/min/mg) weisen eine hohe V_{max} für die Hydrolyse von cGMP auf. Die Hydrolysegeschwindigkeit von PDE3A (0,34 µmol/min/mg), von PDE5 (1,3 µmol/min/mg) und von PDE9 (4,9 nmol/min/mg) liegen deutlich darunter [2,65,131]. Für die Enzymkinetik der PDE10 existieren bis dato keine Angaben. Die Identifikation von Diazepam als spezifischem PDE-Inhibitor ist aus verschiedenen Gründen von Bedeutung. Analysen zerebraler Strukturen haben gezeigt, dass es spezifische regionale Verteilungsmuster und subzelluläre Kompartimentierungen der PDE-Formen im Gehirn gibt [45]. Mit der Kenntnis, welche PDE-Form Diazepam inhibiert, können also weitere Rückschlüsse auf die regionale Wirkweise von Diazepam gezogen werden. Um weitere Aussagen darüber treffen zu können, welche PDE-Familie durch Diazepam gehemmt wird, wurden Versuche mit der Kombination IBMX und der wirksamen Diazepam-Konzentration durchgeführt. IBMX inhibiert als unspezifischer Inhibitor alle cGMP-spezifischen PDEs mit Ausnahme der PDE9. Es sollte so getestet werden, ob Diazepam durch eine potentielle Inhibition der PDE9 die verbliebene Restaktivität bei IBMX zusätzlich senkt.

Die Kombination (240 µM IBMX + 100 µM Diazepam) zeigte eine zusätzliche geringe, nicht signifikante Abnahme der Aktivität. Ob diese zusätzliche Verlangsamung der Hydrolyse einen Hinweis darauf liefern kann, dass Diazepam die PDE9 beeinflusst, kann in diesem Versuchsaufbau nicht sicher beurteilt werden. Dieses Ergebnis weist vielmehr darauf hin, dass die Ursachen für eine Restaktivität der PDEs bei IBMX (240 µM) und Diazepam (100 µM) kongruent sind und die durch Diazepam gehemmte(n) PDE(s) auch durch IBMX gehemmt werden können.

Die Charakterisierung des Mechanismus der Inhibition von Diazepam erfolgte anhand der Parameter K_m und V_{max}. Die Zugabe von Diazepam führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der normierten K_m^n, der bei der höchsten Konzentration (100 µM) signifikant war. Durch die Normierung der Werte auf den jeweiligen Kontrollwert konnten Störungen durch die doppelreziproke Auftragung und Schwankungen durch die Zusammensetzung des Homogenisat eliminiert werden. So sind auch die uneinheitlichen Ergebnisse der Mittelwertvergleiche (100 µM vs. 0 µM Diazepam) der K_m in Bezug auf die Signifikanz je nach Auswertungsmethode (linear vs. nicht-linear) zu erklären. Da die Mant-cGMP-Abnahme insbesondere bei kleinen Startkonzentrationen Mant-cGMP von Diazepam gehemmt wurde, kann es durch die doppelreziproke Auftragung bei Lineweaver-Burk zu einem relevanten Bias kommen, da hier die Fehlerzunahme umgekehrt proportional zu der Größe der Messwerte ist [115]. Die V_{max} blieb bei allen untersuchten Diazepam-Konzentrationen unbeeinflusst. Die konzentrationsabhängige Zunahme der K_m bei unveränderter V_{max} spricht für eine kompetitive Hemmung des cGMP-Abbaus Dass Diazepam bei kleinen Substratkonzentrationen eine größere Inhibitionswirkung aufwies, bestätigt dies und legt nahe, dass es sich um eine reversible kompetitive Hemmung der PDEs handelt, die durch hohe Substratkonzentrationen antagonisiert werden kann [112].

Auf die kardiale cAMP-spezifische PDE4 hatte Diazepam hingegen einen anderen Effekt. Messungen hatten eine nicht-kompetitive Hemmung der cAMP-Hydrolyse durch Diazepam gezeigt [107]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Diazepam auf die verschiedenen PDE-Familien (cGMP- vs. cAMP-spezifisch) unterschiedlich wirkt. Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modell mit aufgeschlossenen Zellen verwendet, das ausschließlich neuronale zytosolische PDEs testete. In der Arbeit von *Collado et al.* kamen intakte Zellverbände zum Einsatz, worin sowohl zytosolische als auch membrangebundenen PDEs enthalten waren [107].

Daher könnte die Wirkweise von Diazepam auch von der Art des Gewebes oder der genauen subzellulären Lokalisation der PDEs abhängen.

Um eine Inhibition der PDE-Aktivität durch Diazepam zu erreichen, war in diesem Versuchsaufbau eine Konzentration von 28,47 µg/mL (100 µM) notwendig. Die mittlere Plasmakonzentration von Patienten, die 2 – 30 mg Diazepam täglich zur Behandlung von chronischen Angststörungen erhielten, liegt jedoch nur bei 0,02 – 1,01 µg/mL [132]. Allerdings werden von Suchtpatienten, die eine sukzessive Dosiserhöhung verlangen und bei der Therapie des Status epilepticus deutlich höhere Konzentrationen erreicht (6,01±1,21 µg/mL) [133]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die zerebrale Diazepamkonzentration größer ist als die, die im Plasma gemessen wird [107]. Da die leicht messbaren Plasmakonzentrationen also womöglich nur eingeschränkt die tatsächlichen intrazellulären Verhältnisse widerspiegeln, könnten auch die hier eingesetzten Konzentrationen relevant sein. Als weiterer wichtiger Punkt ist zu nennen, dass in diesem Versuchsaufbau große Mengen an Mant-cGMP eingesetzt worden sind, die dem 5 – 30-fachen der angenommen intrazellulären cGMP-Konzentration entsprechen. Dies war nötig zur Bestimmung der Enzymkinetik, weil dazu die V_{max} des Enzyms erreicht werden muss. Da sich Diazepam als kompetitiver Inhibitor gezeigt hat, der durch hohe Substratkonzentrationen verdrängt wird, macht der Versuchsaufbau ebenfalls hohe Diazepamkonzentrationen notwendig. Umgekehrt liegen in vivo meistens sehr geringe Konzentrationen an cGMP vor, sodass hier bereits geringe Mengen an kompetitiven Inhibitoren wirken [2]. Daher könnten im menschlichen Gehirn bereits geringere Konzentrationen an Diazepam zu einer signifikanten Beeinflussung der PDEs führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein ausgewählter Aspekt des NO/cGMP-Haushalts am Modell betrachtet. Inwieweit das damit erbrachte Ergebnis, dass Diazepam als kompetitiver PDE-Inhibitor agiert, von klinischer Relevanz ist, bleibt aus verschiedenen Gründen kritisch zu diskutieren. Das verwendete Modell zeigt ein globales Bild des cGMP-PDE-Diazepam-Zusammenhangs. Die Rolle des cGMP-Spiegels für die Funktion des Gehirns hängt aber essentiell von der Region des Gehirns, dem Zelltyp und dem subzellulären Pool ab. Damit führt die inhibitorische Wirkung von Diazepam je nach regionalem und subzellulärem Wirkort zu multiplen klinischen Effekten am Patienten [101]. Zusätzlich wurde in diesen Versuchen die Wirkung von Diazepam unidirektional untersucht.

In vivo hat Diazepam jedoch weitere molekulare Angriffspunkte, was zu einem komplexen multidirektionalen Einfluss auf die Transmitter- und second-messenger-Systeme führt. So konnte Diazepam in Studien die Synthese von cGMP beeinflussen und auch über $GABA_A$-Rezeptoren vermittelt auf den cGMP-Haushalt einwirken [106,134]. Weitere Regulationsmechanismen der cGMP-Homöostase, wie der cross-talk via cAMP, werden durch die Inhibition der PDE4 zusätzlich durch Diazepam gestört [107]. Ein weiterer Aspekt, der die Wirkung von Diazepam in Patienten moduliert, ist die Veränderung des NO/cGMP-Systems durch krankhafte Prozesse. So wurden zum Beispiel erhöhte NO-Konzentrationen im Rahmen septischer Stoffwechsellagen festgestellt [101]. Diese Pathologien lassen sich unter in vitro-Bedingungen nur unzureichend imitieren. Ergebnisse klinischer Studien bieten zwar eine größere Relevanz für Patienten, können jedoch nur Hinweise auf die komplexe funktionelle Koppelung von Diazepam und dem cGMP-Metabolismus geben. Beispielsweise konnten anti-depressive Effekte, wie sie auch von Diazepam bekannt sind, durch die Gabe des PDE5-Inhibitors Sildenafil erzeugt werden [95]. Allerdings zeigen andere Studienergebnisse, dass Sildenafil die Krampfschwellenverschiebung gegensätzlich zu Diazepam beeinflusst [135]. Um mehr Kenntnis über die molekulare Wirkweise von Diazepam zu erlangen, sind diese Studien daher weniger geeignet. Mit Hilfe von in vitro-Versuchen, die die Interaktion mit spezifischen Enzymen gezielt abbilden, können einzelne Puzzleteile der komplexen Wirkung von Diazepam identifiziert werden. Die Synopsis darüber kann dann das Verständnis bezüglich der Effektvermittlung von Diazepam komplementieren. Dieses Verstehen ist die Grundlage für die Entwicklung neuer spezifischer Pharmaka für die Anästhesie. Mit Hinblick auf die zahlreichen neuen spezifischen PDE-Inhibitoren, die in der jüngeren Vergangenheit auf den Markt kamen, ist dies auch für den Bereich der Sedativa denkbar [33]. Dadurch ließen sich in Zukunft potentielle nachteilige Nebenwirkungen für Patienten erkennen und vermeiden. Zwar kann der verwendete Versuchsaufbau die Nachteile von in vitro-Versuchen nicht überwinden. Aufgrund der präzisen Abbildung der PDE-Aktivität über die Zeit kann er jedoch in Zukunft einen großen Beitrag für die Erforschung weiter Eigenschaften der Interaktion von PDEs und Diazepam oder anderen Wirkstoffen leisten. Insbesondere die Verwendung von purifizierten PDE-Familien und der Einsatz von spezifischen PDE-Inhibitoren könnten detailliertere Informationen über die Wechselwirkung verschiedener Substanzen mit PDEs liefern. Limitierende Faktoren sind jedoch im damit verbundenen finanziellen und zeitlichen Aufwand zu sehen.

7 Zusammenfassung

Der im Organismus ubiquitär verbreitete intrazelluläre Botenstoff cGMP ist die molekulare Grundlage zahlreicher physiologischer und pathologischer Vorgänge. Im Gehirn ist er mit der Mehrzahl der Transmittersysteme vernetzt. Dadurch spielt er unter anderem eine Rolle bei der Regulation von Wachheit und Stressbewältigung. Auf diese Vorgänge nehmen auch Hypnotika und Sedativa, deren Wirkmechanismen bis heute noch nicht vollständig geklärt sind, Einfluss. Da in der Literatur erste Erkenntnisse vorliegen, dass Hypnotika und Sedativa auch in die cGMP-Synthese eingreifen, sollte im Zuge dieser Arbeit der Einfluss von Propofol, Thiopental und Diazepam auf die neuronale cGMP-spezifische Phosphodiesteraseaktivität untersucht werden. Phosphodiesterasen (PDEs) sind für den cGMP-Abbau verantwortlich, der den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der cGMP-Konzentration darstellt.

Für die Versuche in vitro wurden zytosolische Phosphodiesterasen aus Rattenhirn verwendet. Der enzymatische Reaktionsverlauf wurde mit Hilfe des synthetischen, fluoreszierenden Substrats Mant-cGMP, das nach Spaltung sein Fluoreszenzsignal ändert, aufgezeichnet. Die Messung des Mant-cGMP-Signals erfolgte mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) und Fluoreszenzdetektor. Es wurde eine hohe Substratkonzentration gewählt, um eine Sättigung der Bindungsstellen der Phosphodiesterasen und damit die V_{max} zu erreichen. Auf diese Weise sollte der Einfluss der Medikamente auf die Enzymreaktion mittels der Michaelis-Menten-Kinetik bewertet werden.

Der Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Proteingewinnung ergab eine hohe Proteinausbeute und einfache Handhabung der maschinellen Homogenisierung mit dem FastPrep-24-Instrument.

Vorversuche konnten zeigen, dass die gemessene Mant-cGMP-Abnahme tatsächlich einem Abbau durch die PDEs entsprach, keine in vitro-Bildung von cGMP bzw. Mant-cGMP stattfand und eine inhibitorische Wirkung abgebildet werden konnte. Allerdings zeigten die Versuche mit IBMX auch, dass die Auswertung der Enzymkinetik nach Michaelis-Menten für kompetitive Inhibitoren limitiert war.

Bei Versuchen mit Propofol (10, 100, 300 µM) wurde keine Wirkung auf die Phosphodiesteraseaktivität gefunden. Aufgrund von Hinweisen aus klinischen Studien, dass Propofol den cGMP-Signalweg beeinflusst, wäre jedoch in Zukunft eine Untersuchung der Beziehung zwischen Propofol und der cGMP-Synthese aufschlussreich. Durch die Zugabe von 500 µM Thiopental konnte eine signifikante Steigerung der Phosphodiesteraseaktivität gemessen werden. Für Thiopental war in der Literatur bereits bekannt, dass es zumindest teilweise über eine Hemmung der cGMP-Synthese, also über eine erniedrigte cGMP-Konzentration, wirkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Thiopental in vitro auch über eine Beschleunigung des cGMP-Abbaus zu einer erniedrigten cGMP-Konzentration führt, stehen damit in Einklang. In vivo käme es somit zu einer Wirkpotenzierung. Ein nächster Schritt wäre die Überprüfung und Umsetzung der hier gefundenen Ergebnisse unter in vivo-Bedingungen. Über welchen Mechanismus Thiopental zu einer Erhöhung der Phosphodiesteraseaktivität führt, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden und wäre das Ziel anschließender Versuche mit purifizierten PDEs. Für Diazepam lagen bereits aus anderen Studien Daten vor, die zeigen, dass Diazepam die cGMP-Synthese beeinflusst und zusätzlich die cAMP-spezifische Phosphodiesteraseaktivität senkt. Aufgrund der engen Verknüpfung des cAMP- und cGMP-Stoffwechsels wurde im Vorfeld dieser Arbeit vermutet, dass Diazepam auch die cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen hemmt. Die Ergebnisse der Versuche mit 100 µM Diazepam validierten dies und zeigten eine verminderte Phosphodiesteraseaktivität von 80 % der unbeeinflussten Aktivität. Die Kinetikanalyse erbrachte den Hinweis, dass es sich dabei um eine reversible kompetitive Hemmung spezifischer PDE-Isoformen handelt. Da in dieser Arbeit ein PDE-Gemisch verwendet wurde, konnte nicht beantwortet werden, welche Isoform von Diazepam gehemmt wird. Für die Entwicklung besserer Medikamente und das Verständnis, wie unerwünschte Nebenwirkungen entstehen, ist dies in Zukunft auch von Interesse. Hier könnten die Versuche nach dem Protokoll dieser Arbeit mit purifizierten PDEs weiterführen.

Der verwendete Versuchsaufbau konnte sehr genau den zeitlichen Verlauf der Phosphodiesteraseaktivität abbilden. Dadurch gelang ein differenziertes Bild der Wirkweise der Substanzen. Für die Analyse des Mechanismus mit Hilfe der Michaelis-Menten-Kinetik ergaben sich trotz zahlreicher Verbesserungen im Vergleich zu vorangehenden Studien Limitationen. Nichtsdestotrotz besitzt dieser Versuchsaufbau großes Potential für die Erforschung des cGMP-Metabolismus. Insbesondere die Kombination von Mant-cGMP und Mant-cAMP würde sich zur Untersuchung des crosstalks an den Phosphodiesterasen eignen.

8 Anhang

Tabelle 16: *K_m-Werte der nicht-linearen Regressionsanalyse mit zugehörigem Standardfehler und 95 % Konfidenzintervalle*

Probe	Konzentration [µM]	K_m	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Kontrolle	0	10,3	2,3	2,9	15,9
Diazepam	10	13,8	3,0	5,5	22,2
Diazepam	30	8,8	2,7	0,7	16,7
Diazepam	100	31,0	12,1	-6,1	68,1
Thiopental	10	7,7	1,0	4,8	10,5
Thiopental	100	9,7	2,1	3,8	15,5
Thiopental	500	9,6	3,0	1,1	18,2
Propofol	10	10,5	3,0	2,1	18,8
Propofol	100	9,9	3,0	1,56	18,3
Propofol	300	8,9	2,9	0,5	17,3
ODQ	10	20,4	7,7	-3,5	44,3
ODQ	100	14,7	3,1	5,2	24,2
IBMX	240	69,3	27,2	15,1	90,3

Tabelle 17: *V_{max}-Werte der nicht-linearen Regressionsanalyse mit zugehörigem Standardfehler und 95 % Konfidenzintervalle*

Probe	Konzentration [µM]	V_{max}	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Kontrolle	0	0,0293	0,0022	0,0231	0,0356
Diazepam	10	0,0498	0,0040	0,0385	0,0609
Diazepam	30	0,0259	0,0021	0,0195	0,0323
Diazepam	100	0,0447	0,0085	0,0184	0,0709
Thiopental	10	0,0385	0,0014	0,0346	0,0423
Thiopental	100	0,0285	0,0016	0,0241	0,0329
Thiopental	500	0,0258	0,0024	0,0192	0,0325
Propofol	10	0,0259	0,0023	0,0196	0,0322
Propofol	100	0,0253	0,0023	0,0189	0,0316
Propofol	300	0,0235	0,0023	0,0169	0,0300
ODQ	10	0,0509	0,0073	0,0285	0,0733
ODQ	100	0,0410	0,0026	0,0333	0,0488
IBMX	240	0,0193	0,0045	0,0069	0,0317

9 Literaturverzeichnis

1. Beavo JA, Brunton. Cyclic nucleotide research - still expanding after half a century. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3:710–18.
2. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. Pharmacol Rev. 2006;58:488–520.
3. Ciani E, Guidi S. Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. J Neurochem. 2002;82:1282–89.
4. Cote RH, Nicol GD. Changes in cGMP concentration correlate with some, but not all, aspects of the light-regulated conductance of frog rod photoreceptors. J Biol Chem. 1986;261:12965–75.
5. Radomski MW, Palmer RM. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. Biochem Biophys Res Commun. 1987;148:1482–89.
6. Gold ME, Wood KS. L-arginine-dependent vascular smooth muscle relaxation and cGMP formation. Am J Physiol. 1990;259:1813–21.
7. Bergemann C, Löken C. Inhibition of glucose transport by cyclic GMP in cardiomyocytes. Life Sciences. 2001;69:1391–406.
8. Vente J de. cGMP: a second messenger for acetylcholine in the brain? Neurochemistry International. 2004;45:799–812.
9. Garthwaite J, Charles SL. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature. 1988;336:385–88.
10. Fajardo AM, Piazza GA. The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: targets for prevention and treatment. Cancers (Basel). 2014;6:436–58.
11. Derbyshire ER, Marletta MA. Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. Annu. Rev. Biochem. 2012;81:533–59.
12. Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. Annu Rev Biochem. 2007;76:481–511.
13. Sharma RK. Evolution of the membrane guanylate cyclase transduction system. Mol Cell Biochem. 2002;230:3–30.

14. Goncalves J, Grove KL. Generation of cyclic guanosine monophosphate in brain slices incubated with atrial or C-type natriuretic peptides: comparison of the amplitudes and cellular distribution of the responses. Regul Pept. 1995;57:55–63.
15. Lucas KA, Pitari GM. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. Pharmacol Rev. 2000;52:375–414.
16. Feil R, Kemp-Harper B. cGMP signalling: from bench to bedside. Conference on cGMP generators, effectors and therapeutic implications. EMBO Rep. 2006;7:149–53.
17. Sharma RK. Membrane guanylate cyclase is a beautiful signal transduction machine: overview. Mol Cell Biochem. 2010;334:3–36.
18. Kuhn M, Ng CK. Identification of an orphan guanylate cyclase receptor selectively expressed in mouse testis. Biochem J. 2004;379:385–93.
19. Jain R, Chan MK. Mechanisms of ligand discrimination by heme proteins. J Biol Inorg Chem. 2003;8:1–11.
20. Ballou DP, Zhao Y. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:12097–101.
21. Duda T, Goraczniak RM. Cloning and expression of an ATP-regulated human retina C-type natriuretic factor receptor guanylate cyclase. Biochemistry. 1993;32:1391–95.
22. Ferrero R, Rodriguez-Pascual F. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase activity inhibition through cyclic GMP-dependent dephosphorylation. J Neurochem. 2000;75:2029–39.
23. Follmann M, Griebenow N. The Chemistry and Biology of Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. Angew. Chem. Int. Ed. 2013;52:9442–62.
24. Gruetter CA, Kadowitz PJ. Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite, and amyl nitrite. Can J Physiol Pharmacol. 1981;59:150–56.
25. Garthwaite J, Southam E. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-1,2,4oxadiazolo4,3-aquinoxalin-1-one. Mol Pharmacol. 1995;48:184–88.
26. Olesen SP, Drejer J. Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. Br J Pharmacol. 1998;123:299–309.
27. Schrammel A, Behrends S. Characterization of 1H-1,2,4oxadiazolo4,3-aquinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. Mol Pharmacol. 1996;50:1–5.

28. Wielinga PR, van der Heijden I. Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. J Biol Chem. 2003;278:17664–71.
29. Russwurm M, Behrends S. Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. Biochem J. 1998;335:125–30.
30. Feussner M, Richter H. Association of soluble guanylate cyclase with the sarcolemma of mammalian skeletal muscle fibers. Acta Histochem. 2001;103:265–77.
31. Nikolaev VO, Gambaryan S. Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis. J Biol Chem. 2005;280:1716–19.
32. Juilfs DM, Soderling S. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1999;135:67–104.
33. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. Pharmacol Ther. 2006;109:366–98.
34. Ho YS, Burden LM. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. EMBO J. 2000;19:5288–99.
35. Fisher DA, Smith JF. Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. J Biol Chem. 1998;273:15559–64.
36. Fisher DA, Smith JF. Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase. Biochem Biophys Res Commun. 1998;246:570–77.
37. Carcamo B, Hurwitz MY. The mammalian pineal expresses the cone but not the rod cyclic GMP phosphodiesterase. J Neurochem. 1995;65:1085–92.
38. Hepp R, Tricoire L. Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. J Neurochem. 2007;102:1875–86.
39. Cheung WY. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. Biochem Biophys Res Commun. 1970;38:533–38.
40. Kincaid RL, Stith-Coleman IE. Proteolytic activation of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. J Biol Chem. 1985;260:9009–15.
41. Sharma RK, Wang JH. Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin-dependent phosphatase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82:2603–07.
42. Sharma RK, Wang JH. Calmodulin and Ca2+-dependent phosphorylation and dephosphorylation of 63-kDa subunit-containing bovine brain calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme. J Biol Chem. 1986;261:1322–28.

43. Yan C, Zhao AZ. Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. Proc Natl Acad Sci USA (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America). 1995;92:9677–81.
44. Yan C, Zhao AZ. The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner. J Biol Chem. 1996;271:25699–706.
45. Domek-Lopacinska K, Strosznajder JB. Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology. J Physiol Pharmacol. 2005;56 Suppl 2:15–34.
46. Wroblewska H, Gorczyca WA. Phosphodiesterases of cyclic GMP. Postepy Hig Med Dosw. 2001;55:611–27.
47. Beavo JA, Hardman JG. Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate hydrolysis by guanosine 3',5'-monophosphate. J Biol Chem. 1971;246:3841–46.
48. Martinez SE, Wu AY. The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:13260–65.
49. Wu AY, Tang X. Molecular determinants for cyclic nucleotide binding to the regulatory domains of phosphodiesterase 2A. J Biol Chem. 2004;279:37928–38.
50. Bentley JK, Juilfs DM. Nerve growth factor inhibits PC12 cell PDE 2 phosphodiesterase activity and increases PDE 2 binding to phosphoproteins. J Neurochem. 2001;76:1252–63.
51. Suvarna NU, O'Donnell JM. Hydrolysis of N-methyl-D-aspartate receptor-stimulated cAMP and cGMP by PDE4 and PDE2 phosphodiesterases in primary neuronal cultures of rat cerebral cortex and hippocampus. J Pharmacol Exp Ther. 2002;302:249–56.
52. Bender AT, Beavo JA. Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages. Neurochem Int. 2004;45:853–57.
53. Reinhardt RR, Chin E. Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. J Clin Invest. 1995;95:1528–38.
54. Hamet P, Coquil JF. Cyclic GMP binding and cyclic GMP phosphodiesterase in rat platelets. J Cyclic Nucleotide Res. 1978;4:281–90.
55. McAllister-Lucas LM, Sonnenburg WK. The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. J Biol Chem. 1993;268:22863–73.

56. Zoraghi R, Bessay EP. Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. J Biol Chem. 2005;280:12051–63.
57. Mullershausen F, Friebe A. Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. J Cell Biol. 2003;160:719–27.
58. Lochhead A, Nekrasova E. The regulation of the cGMP-binding cGMP phosphodiesterase by proteins that are immunologically related to gamma subunit of the photoreceptor cGMP phosphodiesterase. J Biol Chem. 1997;272:18397–403.
59. Giordano D, Stefano ME de. Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. Biochim Biophys Acta. 2001;1539:16–27.
60. Prickaerts J, Sik A. Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. Neurochem Int. 2004;45:915–28.
61. Gillespie PG, Beavo JA. Inhibition and stimulation of photoreceptor phosphodiesterases by dipyridamole and M&B 22,948. Mol Pharmacol. 1989;36:773–81.
62. Stryer L. Vision: from photon to perception. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:557–59.
63. Gillespie PG, Beavo JA. Characterization of a bovine cone photoreceptor phosphodiesterase purified by cyclic GMP-sepharose chromatography. J Biol Chem. 1988;263:8133–41.
64. Morin F, Lugnier C. Expression and role of phosphodiesterase 6 in the chicken pineal gland. J Neurochem. 2001;78:88–99.
65. Soderling SH, Bayuga SJ. Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. J Biol Chem. 1998;273:15553–58.
66. Wang P, Wu P. Identification and characterization of a new human type 9 cGMP-specific phosphodiesterase splice variant (PDE9A5). Differential tissue distribution and subcellular localization of PDE9A variants. Gene. 2003;314:15–27.
67. Andreeva SG, Dikkes P. Expression of cGMP-specific phosphodiesterase 9A mRNA in the rat brain. J Neurosci. 2001;21:9068–76.
68. Hutson PH, Finger EN. The selective phosphodiesterase 9 (PDE9) inhibitor PF-04447943 (6-[(3S,4S)-4-methyl-1-(pyrimidin-2-ylmethyl)pyrrolidin-3-yl]-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one) enhances synaptic plasticity and cognitive function in rodents. Neuropharmacology. 2011;61:665–76.

69. Kleiman RJ, Chapin DS. Phosphodiesterase 9A regulates central cGMP and modulates responses to cholinergic and monoaminergic perturbation in vivo. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2012;341:396–409.
70. van Staveren W, Glick J. Cloning and localization of the cGMP-specific phosphodiesterase type 9 in the rat brain. J Neurocytol. 2002;31:729–41.
71. Soderling SH, Bayuga SJ. Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:7071–76.
72. Loughney K, Snyder PB. Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. Gene. 1999;234:109–17.
73. Fujishige K, Kotera J. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). J Biol Chem. 1999;274:18438–45.
74. Fujishige K, Kotera J. The human phosphodiesterase PDE10A gene genomic organization and evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains. Eur J Biochem. 2000;267:5943–51.
75. Gross-Langenhoff M, Hofbauer K. cAMP is a ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11. J Biol Chem. 2006;281:2841–46.
76. Seeger TF, Bartlett B. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. Brain Res. 2003;985:113–26.
77. Hebb AL, Robertson HA. Striatal phosphodiesterase mRNA and protein levels are reduced in Huntington's disease transgenic mice prior to the onset of motor symptoms. Neuroscience. 2004;123:967–81.
78. Garcia AM, Redondo M. Phosphodiesterase 10 inhibitors: new disease modifying drugs for Parkinson's disease? Curr Med Chem. 2014;21:1171–87.
79. Kehler J, Kilburn JP. Patented PDE10A inhibitors: novel compounds since 2007. Expert Opin Ther Pat. 2009;19:1715–25.
80. Okada D, Asakawa S. Allosteric activation of cGMP-specific, cGMP-binding phosphodiesterase (PDE5) by cGMP. Biochemistry. 2002;41:9672–79.
81. Lohmann SM, Vaandrager AB. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. Trends Biochem Sci. 1997;22:307–12.
82. Jiang H, Colbran JL. Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries. J Biol Chem. 1992;267:1015–19.
83. Craven KB, Zagotta WN. CNG and HCN channels: two peas, one pod. Annu Rev Physiol. 2006;68:375–401.

84. Tibbs GR, Goulding EH. Allosteric activation and tuning of ligand efficacy in cyclic-nucleotide-gated channels. Nature. 1997;386:612–15.
85. Kusch J, Nache V. Effects of permeating ions and cGMP on gating and conductance of rod-type cyclic nucleotide-gated (CNGA1) channels. The Journal of Physiology. 2004;560:605–16.
86. Podda MV, Grassi C. New perspectives in cyclic nucleotide-mediated functions in the CNS: the emerging role of cyclic nucleotide-gated (CNG) channels. Pflugers Arch. 2014;466(7):1241–57.
87. Ludwig A, Zong X. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. Nature. 1998;393:587–91.
88. Boolell M, Gepi-Attee S. Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. Br J Urol. 1996;78:257–61.
89. Rute Marques. Oral OTEZLA® (apremilast) Approved by the European Commission for the Treatment of both Patients with Psoriasis and Psoriatic Arthritis. Boudry, Schweiz; 2015.
90. Schafer P. Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis. Biochemical Pharmacology. 2012;83:1583–90.
91. Prickaerts J, Vente J de. cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. Eur J Pharmacol. 2002;436:83–87.
92. Wang X, Robinson PJ. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. J Neurochem. 1997;68:443–56.
93. Chalimoniuk M, Strosznajder JB. Aging modulates nitric oxide synthesis and cGMP levels in hippocampus and cerebellum. Effects of amyloid beta peptide. Mol Chem Neuropathol. 1998;35:77–95.
94. Xu Y, Zhang H. Phosphodiesterases in the central nervous system: implications in mood and cognitive disorders. Handb Exp Pharmacol. 2011:447–85.
95. Wang C, Zhang J. Antidepressant-like effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor etazolate and phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil via cyclic AMP or cyclic GMP signaling in mice. Metab Brain Dis. 2014;29(3):673–82.
96. Weinryb I, Chasin M. Effects of therapeutic agents on cyclic AMP metabolism in vitro. J Pharm Sci. 1972;61:1556–67.
97. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annu Rev Biochem. 1994;63:175–95.

98. Liu C, Ding JM. Coupling of muscarinic cholinergic receptors and cGMP in nocturnal regulation of the suprachiasmatic circadian clock. J Neurosci. 1997;17:659–66.
99. Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. Br J Pharmacol. 2002;135:1079–95.
100. Zhu H, Barr GA. Opiate withdrawal during development: are NMDA receptors indispensable? Trends Pharmacol Sci. 2001;22:404–08.
101. Tonner PH, Scholz J. The NO/cGMP signal transduction system: a central target for anesthetics? Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 1999;34:78–89.
102. Nakamura K, Terasako K. Mechanisms of inhibition of endothelium-dependent relaxation by halothane, isoflurane, and sevoflurane. Can J Anaesth. 1994;41:340–46.
103. Kim SO, Toda H. Thiopental attenuates relaxation and cyclic GMP production in vascular smooth muscle of endotoxin-treated rat aorta, independent of nitric oxide production. Br J Anaesth. 1998;81:601–02.
104. Terasako K, Nakamura K. Inhibitory effects of anesthetics on cyclic guanosine monophosphate (cGMP) accumulation in rat cerebellar slices. Anesth. Analg. 1994;79:921–26.
105. Terasako K, Nakamura K. Barbiturates inhibit endothelium-dependent and independent relaxations mediated by cyclic GMP. Anesth. Analg. 1994;78:823–30.
106. Aerden L, Steinbusch H. Dual effect of diazepam on cGMP levels in rat brain slices. Neurochem Res. 2004;29:1725–29.
107. Collado MC, Beleta J. Functional and biochemical evidence for diazepam as a cyclic nucleotide phosphodiesterase type 4 inhibitor. Br J Pharmacol. 1998;123:1047–54.
108. Carceles MD. Effect of Diazepam on Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate (cAMP) Plasma Level in Anesthetized Patients. Clinical Therapeutics. 2004;26:737–43.
109. Engelhardt T, Galley HF. Saliva cyclic GMP increases during anaesthesia. Br J Anaesth. 2002;89:635–37.
110. Engelhardt T, MacDonald J. Selective phosphodiesterase 5 inhibition does not reduce propofol sedation requirements but affects speed of recovery and plasma cyclic guanosine 3',5'-monophosphate concentrations in healthy volunteers. Anesth. Analg. 2005;101:1050–53.
111. Schellenberger A. Enzymkatalyse: Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme. Berlin, New York: Springer-Verlag; 1989.
112. Berg JM, Tymoczko JL. Biochemie. 7th ed. Lehrbuch. Berlin: Springer Spektrum; 2013.

113. Michaelis L, Menten ML. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. Biochemistry. 2011;50:8264–69.
114. Lineweaver H, Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J. Am. Chem. Soc. 1934;56:658–66.
115. Ritchie RJ, Prvan T. Current statistical methods for estimating the Km and Vmax of Michaelis-Menten kinetics. Biochemical Education. 1996;24:196–206.
116. Galley HF, Le Cras AE. Differential nitric oxide synthase activity, cofactor availability and cGMP accumulation in the central nervous system during anaesthesia. Br J Anaesth. 2001;86:388–94.
117. Müller D, Cortes-Dericks L. Homologous and lysophosphatidic acid-induced desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor, guanylyl cyclase-A, in MA-10 leydig cells. Endocrinology. 2006;147:2974–85.
118. Alfonso A, Estevez M. Determination of phosphodiesterase activity in rat mast cells using the fluorescent cAMP analogue anthraniloyl cAMP. Cell Signal. 1995;7:513–18.
119. Johnson JD, Walters JD. A continuous fluorescence assay for cyclic nucleotide phosphodiesterase hydrolysis of cyclic GMP. Anal Biochem. 1987;162:291–95.
120. Watson GA, editor. The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory In: Lecture Notes Math. Numerical Analysis: Springer; 1977.
121. Beavo JA. Hydrolysis of Cyclic Guanosine and Adenosine 3',5'- Monophosphat by Rat an Bovine Tissues. The Journal of biological Chemistry. 1970;245:5649–55.
122. Berglund SR, Schwietert CW. Optimized methodology for sequential extraction of RNA and protein from small human skin biopsies. The Journal of investigative dermatology. 2007;127:349–53.
123. Londoño D, Cadavid D. Bacterial Lipoproteins Can Disseminate from the Periphery to Inflame the Brain. The American Journal of Pathology. 2010;176:2848–57.
124. Cherry JA, Thompson BE. Diazepam and rolipram differentially inhibit cyclic AMP-specific phosphodiesterases PDE4A1 and PDE4B3 in the mouse. Biochim Biophys Acta. 2001;1518:27–35.
125. Bergmeyer HU, editor. Methods of enzymatic analysis: Fundamentals. 3rd ed. Enzymes ; 2, Esterases, glycosidases, lyases, ligases, Vol 4: Weinheim:Verlag; 1983.
126. Tonner PH. Wirkmechanismen von Anästhetika: How do aneasthetics act? Anästh Intenivmed. 2006;47:265–82.
127. Tonner PH. Inhibition of nitric oxide synthase decreases anesthetic requirements of intravenous anesthetics in Xenopus laevis. Anesthesiology. 1997;87:1479–85.

128. Kurokawa H, Matsunaga A. Clinically relevant concentrations of olprinone reverse attenuating effect of propofol on isoproterenol-induced cyclic adenosine monophosphate accumulation in cardiomyocytes. Hiroshima J. Med. Sci. 2008;57:1–6.
129. Liu Y, Chang H. Effects of propofol on responses of rat isolated renal arteriole to vasoactive agents. Vascul Pharmacol. 2009;51:182–89.
130. Galley HF. Anaesthesia and the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the central nervous system. Br J Anaesth. 2000;84:141–43.
131. Snyder PB, Florio VA. Isolation, expression and analysis of splice variants of a human Ca2+/calmodulin-stimulated phosphodiesterase (PDE1A). Cell Signal. 1999;11:535–44.
132. Greenblatt DJ. Plasma diazepam and desmethyldiazepam concentrations during long-term diazepam therapy. Br J Clin Pharmacol. 1981;11:35–40.
133. Samuelson PN. Hemodynamic responses to anesthetic induction with midazolan or diazepam in patients with ischemic heart disease. Anesth Analg. 1981;60:802–09.
134. Fedele E. Benzodiazepine-Sensitive GABA(A) Rezeptors Limit the Activity of the NMDA/NO/CyclicGMP Pathway: A Microdialysis Study in the Cerebellum of Freely Moving Rats. J Neurochem. 2000;75:782–87.
135. Gholipour T. The interaction of sildenafil with the anticonvulsant effect of diazepam. Eur J Pharmacol. 2009;617:79–83.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexandra Will
Geburtsdatum	15.11.1988
Geburtsort	München

Ausbildung

1996-1999	Grundschule II, Zirndorf
2000-2008	Dietrich Bonhoeffer Gymnasium, Oberasbach
2008-2015	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. Sigrid Wittmann für die ausgesprochen gute Betreuung, die sich durch ihr ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit besonders auszeichnete.

Außerdem bedanke ich mich herzlichst bei Frau Dr. Andrea Mietens für ihre Unterstützung. Ihre große Hilfe bei der Literaturrecherche und ihre Diskussionsbereitschaft der Ergebnisse haben diese Arbeit sehr bereichert.

Ein sehr großer Dank geht auch an Herrn Dr. Michael Gruber, dessen wertvolle Tipps und Ratschläge wesentlich zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Anästhesielabors, die mir bei meiner Labortätigkeit hilfreich zur Seite standen, bedanken.

Meinem guten Freund Dr. Jürgen Seiler danke ich für sein stets offenes Ohr bei Fragen und Problemen jeglicher Art und für seine hervorragenden Ratschläge.

Bei meiner Mutter und meiner guten Freundin Mona Walter möchte ich mich für das aufmerksame Korrekturlesen bedanken; ebenso bei meinem Bruder für die Hilfe bei technischen Problemen.

Zu guter Letzt danke ich von Herzen meinen Eltern und meinem Großvater, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht haben.