

**Die Wirkungen von Riluzol auf das basale und Stimulus-
evozierte Phosphorylierungsmuster in intakten
Synaptosomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Fachbereich II (Biologie/Chemie)
der Universität Bremen

von

Carsten Tober

Tag des öffentlichen Kolloquiums: 08.07.1999

Gutachter der Dissertation:

1. Prof. Dr. H. Flohr
2. Prof. Dr. L. Rensing

Berichte aus der Biologie

Carsten Tober

**Die Wirkungen von Riluzol auf das basale
und Stimulus-evozierte Phosphorylierungsmuster
in intakten Synaptosomen**

D 46 (Diss. Universität Bremen)

Shaker Verlag
Aachen 2000

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Tober, Carsten:

Die Wirkungen von Riluzol auf das basale und Stimulus-evozierte
Phosphorylierungsmuster in intakten Synaptosomen / Carsten Tober.

- Als Ms. gedr. - Aachen : Shaker, 2000

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Bremen, Univ., Diss., 1999

ISBN 3-8265-6899-0

Copyright Shaker Verlag 2000

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISBN 3-8265-6899-0

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen
Telefon: 02407/95 96 - 0 • Telefax: 02407/95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hans Flohr für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit sowie für die Möglichkeit, diese am Institut für Hirnforschung durchzuführen. Bei Herrn Prof. Dr. Ludger Rensing bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Dank gilt auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Astrid Spantekow, Dr. Ulf Glade, Dr. Thomas Häfker sowie Frau Kortmann und Frau Nagler.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Doris Motzko für Hilfe bei der Erstellung von Abbildungen sowie Frau Dipl. Biol. Petra Goll für sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes sowie kritische Diskussion.

Abkürzungen

ALS:	amyotrophe Lateralsklerose
AMPA:	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
ATP:	Adenosintriphosphat
CaM II:	Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat
EC₅₀:	Konzentration effektiva 50, siehe ED ₅₀
ED₅₀:	Dosis effectiva 50; pharmakologische Dosis, bei der 50% der maximalen Wirkung auftritt oder 50% der Probanden oder Versuchstiere eine bestimmte Wirkung zeigen
EKG:	Elektrokardiogramm
GABA:	γ -Aminobuttersäure
GTP:	Guanosintriphosphat
ID₅₀:	inhibitorische Dosis 50, siehe ED ₅₀
i.p.:	intraperitoneal (in den Bauchraum)
i.v.:	intravenös
kDa:	kiloDalton
NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
p.A.:	per analysis
PKC:	Protein-Kinase C
p.o.:	per os (durch den Mund)
PTX:	Pertussistoxin
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
TTX:	Tetrodotoxin

1 EINLEITUNG	11
1.1 Riluzol	11
1.1.1 Struktur und Geschichte von Riluzol	11
1.1.2 <i>In vivo</i> -Effekte von Riluzol	12
1.1.2.1 Neuroprotektion	12
1.1.2.2 Anästhetische Wirkungen	14
1.1.2.3 Sonstige <i>in vivo</i> -Effekte	15
1.1.3 <i>In vitro</i> -Effekte	15
1.1.3.1 Neuroprotektion	15
1.1.3.2 Neurotoxizität	17
1.1.4 Effekte auf die Neurotransmitterfreisetzung/aufnahme	17
1.1.4.1 Effekte auf die Neurotransmitterfreisetzung	17
1.1.4.2 Effekte auf die Neurotransmitteraufnahme	19
1.1.5 Bekannte Mechanismen	19
1.1.5.1 Natriumkanäle	19
1.1.5.2 Kaliumkanäle	20
1.1.5.3 G-Protein vermittelter Transduktionsprozeß	20
1.1.5.4 Wirkung auf exzitatorische Rezeptoren	22
1.1.5.5 Sonstige Mechanismen	23
1.1.6 Offene Fragen	24
1.2 Das Synaptosomenmodell	27
1.2.1 Depolarisationsmechanismen als Werkzeug	28
1.2.1.1 Depolarisation durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration	30
1.2.1.2 Depolarisation durch permanent geöffnete Natriumkanäle	30
1.2.1.3 Depolarisation durch Inhibition der Kaliumkanäle	31
1.2.1.4 Calcium-Ionophore	32
1.3 Mechanismus und Regulation der präsynaptischen Transmitterfreisetzung	33
1.4 Phosphorylierungsreaktionen	35
1.4.1 Mechanismus von Phosphorylierungsreaktionen	35
1.4.2 Phosphorylierungen in Synaptosomen	36
1.4.2.1 Grundphosphorylierung	36
1.4.2.2 Depolarisations-induzierte Phosphorylierungsänderungen	36
1.4.3 Die Synapsine I	39
1.4.4 Die Dynamine I	39
1.5 Fragestellung	40
2 MATERIAL UND METHODEN	43
2.1 Versuchstiere	43
2.2 Synaptosomenpräparation	43
2.2.1 P2-Pellet	43
2.2.2 Percollprozedur	44
2.3 Proteinbestimmung	45
2.4 Phosphorylierung	45
2.4.1 Grundphosphorylierung	45
2.4.2 Inkubation mit Riluzol und/oder TTX	46
2.4.3 Stimulation der Synaptosomen	46

2.5 Gelelektrophorese	47
2.5.1 Gelsystem	47
2.5.2 Gelfärbung und Autoradiographie	48
2.6 Datenauswertung	50
2.6.1 Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades	50
2.6.1.1 Gesamtphosphorylierung	50
2.6.1.2 Einzelne Proteine	50
2.6.2 Nicht-lineare Regression	51
2.6.3 Statistik	51
3 ERGEBNISSE	53
3.1 Basales und evoziertes Proteinphosphorylierungsmuster	53
3.2 Phosphorylierungsmuster unter der Wirkung von Riluzol	56
3.3 Einfluß von Riluzol auf das durch A23187 induzierte Phosphorylierungsmuster	59
3.4 Einfluß von Riluzol auf das durch Kaliumdepolarisation evozierte Phosphorylierungsmuster	61
3.4.1 1 mM extrazelluläres Calcium	61
3.4.2 1 mM extrazelluläres Calcium plus Tetrodotoxin	64
3.5 Einfluß von Riluzol auf das durch Veratridindepolarisation evozierte Phosphorylierungsmuster	67
3.6 Einfluß von Riluzol auf das durch 4-AP-Depolarisation induzierte Phosphorylierungsmuster	70
4 DISKUSSION	73
4.1 Validierung des Versuchssystems	73
4.2 Riluzol und das basale Phosphorylierungsmuster	75
4.3 Riluzol und das evozierte Phosphorylierungsmuster	76
4.3.1 A23187	77
4.3.2 Erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration	78
4.3.3 Veratridin	81
4.3.4 4-Aminopyridin	82
4.4 Zusammenfassung der wesentlichen Schlußfolgerungen zum Wirkmechanismus von Riluzol	84
4.5 Einordnung der Ergebnisse in das bekannte Wirkspektrum von Riluzol	85
4.5.1 Riluzol und Kaliumkanäle	85
4.5.2 Riluzol und Natriumkanäle	85
4.5.3 Riluzol und Calciumkanäle	86
4.5.4 Riluzol und G-Proteine	88
4.6 Molekulare Wirkmechanismen und pharmakologisches Profil von Riluzol	89
4.7 Die anästhetische Wirkung von Riluzol	93
5 LITERATUR	95

Zusammenfassung

Riluzol (2-Amino-6-Trifluoromethoxybenzothiazol) ist ein antikonvulsiv wirkendes Pharmakon mit anästhetischer Potenz. Darüberhinaus erweist es sich auch in einer Reihe von Tiermodellen für akute und chronische neurodegenerative Krankheiten (wie z.B. Morbus Parkinson) sowie in der Behandlung von amyotropher Lateralsklerose beim Menschen als wirksam.

Frühe Studien legten nahe, daß die Wirksamkeit von Riluzol auf einem selektiven Eingriff in die exzitatorische Transmission beruht. Seither wird Riluzol in der Literatur etwas ungenau als Glutamatantagonist oder „antiglutaminerg“ bezeichnet. Als Hauptwirkmechanismus für diese „antiglutaminerge“ Eigenschaft Riluzols wird die Inhibition präsynaptischer Glutamatausschüttung als Folge der hochaffinen Bindung dieses Pharmakons an inaktivierte Natriumkanäle angenommen. Eine Reihe von Befunden legt jedoch die Vermutung nahe, daß weder Wirkort noch Wirkmechanismus hinreichend geklärt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung derjenigen präsynaptischen Riluzoleffekte, die zur Verminderung der Glutamatfreisetzung führen könnten: Dazu wurde der Effekt von Riluzol auf die basale und die Stimulus-evozierte Phosphorylierung von Dynamin IA bzw Synapsin Ib in intakten Synaptosomen aus dem cerebralen Cortex der Ratte untersucht. Beide Proteine sind an der Regulation der Transmitterfreisetzung beteiligt. Durch den Einsatz verschiedener Stimulierungsmethoden ist es möglich, verschiedene Wirkmechanismen voneinander zu unterscheiden: Das Calciumionophor A23187 sorgt für einen „unphysiologischen“ Calciumeintritt durch artifizielle Calciumkanäle, die Kaliumdepolarisation bewirkt Calciumeintritt durch physiologische Calciumkanäle, der Natriumkanalaktivator Veratridin und der Kaliumkanalblocker 4-Aminopyridin bewirken Calciumeintritt vermittelt über Natriumkanäle.

Intakte Synaptosomen, vorinkubiert mit ^{33}P -Orthophosphat (45 min, 37°C), wurden 10 min mit verschiedenen Konzentrationen von Riluzol (1 – 1000 μM) inkubiert. Die Proteine wurden entweder direkt mittels SDS-PAGE separiert oder nach Hinzufügen 1) des Natriumkanalaktivators Veratridin (30 μM , 15 sec) oder 2) von 30 mM K^+ (10 sec) oder 3) des Calciumionophores A23187 (40 μM , 5 min) oder 4) des Kaliumkanalinhibitors 4-Aminopyridin (4-AP, 10 mM, 2 min). Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und mittels eines Laserdensitometers quantifiziert.

Riluzol (1 mM) reduzierte die basale Phosphorylierung von Synapsin Ib und Dynamin IA um etwa 10 %. Die Behandlungen 1) – 4) resultierten in verstärkter Synapsin Ib-Phosphorylierung und Dynamin IA-Dephosphorylierung.

Riluzol hatte keinen Einfluß auf die A23187-induzierten Phosphorylierungsänderungen sowie die 4-AP induzierte Dynamin I-Dephosphorylierung. Alle anderen evozierten Änderungen wurden konzentrationsabhängig von Riluzol abgeschwächt. Das Pharmakon hatte, abhängig vom Depolarisationsmechanismus, unterschiedliche Potenzen: EC_{50} von etwa 500 μ M bei der Kaliumdepolarisation, von etwa 40 μ M für Veratridin und etwa 7 μ M für 4-AP.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Wirkmechanismus von Riluzol in bezug auf Phosphorylierungsreaktionen in Synaptosomen

1. vollständig beschränkt ist auf Prozesse vor dem Calciumeintritt
2. hinsichtlich der Inhibition von spannungsabhängigen Natriumkanälen bestätigt werden kann
3. sich nicht erschöpft in der Interaktion mit Natriumkanälen, sondern eine Inhibition von Calciumkanälen (höchstwahrscheinlich des P-Typs) als zusätzlicher Wirkmechanismus von Riluzol angenommen werden muß