



JULIA KRISTINE BEUCHE

**EINFLUSS KLINISCH RELEVANTER ETHANOL-
KONZENTRATIONEN AUF IONENKANÄLE
SENSORISCHER NEURONE DER RATTE**

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Einfluss klinisch relevanter Ethanolkonzentrationen
auf Ionenkanäle sensorischer Neurone der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Julia Kristine Beuche

aus Lich

Giessen 2006

Aus dem Physiologischen Institut
Leitung: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: PD Dr. A. Scholz

Gutachter: PD Dr. E. Stolz

Tag der Disputation: 05.09.2006

| | | |
|-----------------|--|------------------|
| <u>1</u> | <u>EINLEITUNG</u> | <u>4</u> |
| 1.1 | Funktion der Ionenkanäle in erregbaren Zellen | 4 |
| 1.2 | Ruhemembranpotenzial und Aktionspotenzial von Neuronen | 5 |
| 1.3 | Anatomie des Hinterwurzelganglions | 7 |
| 1.4 | Ionenkanäle am Hinterwurzelganglion | 9 |
| 1.5 | Steuerung von Zellfunktionen durch die Proteinkinase C | 12 |
| 1.6 | Ethanol | 15 |
| 1.7 | Interaktionen von Proteinkinase C und Ethanol | 18 |
| 1.8 | Fragestellung | 19 |
| <u>2</u> | <u>MATERIAL UND METHODEN</u> | <u>22</u> |
| 2.1 | Präparation | 22 |
| 2.2 | Lösungen | 24 |
| 2.2.1 | Außenlösungen | 24 |
| 2.2.2 | Innenlösungen | 25 |
| 2.3 | Pharmaka | 26 |
| 2.3.1 | Ethanol | 26 |
| 2.3.2 | Staurosporin | 26 |
| 2.3.3 | Phorbol 12-myristat 13-acetat | 26 |
| 2.3.4 | Tetrodotoxin | 27 |
| 2.4 | Die <i>patch-clamp</i> Technik | 27 |
| 2.5 | Versuchsstand | 30 |
| 2.6 | Auswertung und Darstellung | 34 |
| <u>3</u> | <u>ERGEBNISSE</u> | <u>36</u> |
| 3.1 | Verteilung der Neurone nach Größe und Farbe | 36 |
| 3.2 | Einteilung der Neurone in „Gruppe A“ und „B“ | 37 |
| 3.3 | Veränderungen der Auswärtsströme nach Ethanolapplikation | 39 |
| 3.4 | Staurosporin als Inhibitor der Proteinkinase C | 42 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.5 | Ethanoleffekte auf spannungsabhängige Kaliumströme | 45 |
| 3.6 | Staurosporin und spannungsabhängige Kaliumströme | 48 |
| 3.7 | PMA und spannungsabhängige Kaliumströme | 51 |
| 3.8 | Veränderungen der Einwärtsströme durch Ethanol | 54 |
| 3.9 | Staurosporin und Einwärtsströme | 56 |
| 3.10 | Tetrodotoxin und Einwärtsströme | 58 |
| 4 | <u>DISKUSSION</u> | 60 |
| 4.1 | Die <i>slice</i>-Präparation | 60 |
| 4.2 | Ethanoleffekt auf Aktionspotenzialdauer und Auswärtsströme | 61 |
| 4.3 | Einfluss von Staurosporin auf Aktionspotenzialdauer und Auswärtsströme | 63 |
| 4.4 | Spannungsabhängige Kaliumströme | 65 |
| 4.5 | Spannungsabhängige Kaliumströme nach Applikation von Staurosporin | 67 |
| 4.6 | Spannungsabhängige Kaliumströme nach Applikation von PMA | 68 |
| 4.7 | Einwärtsströme | 69 |
| 4.8 | TTX-resistente Natriumströme | 70 |
| 4.9 | Ausblick und Schlussfolgerung | 71 |
| 5 | <u>ZUSAMMENFASSUNG</u> | 73 |
| 6 | <u>SUMMARY</u> | 75 |
| 7 | <u>ANHANG</u> | 77 |
| 7.1 | Verzeichnis der Abbildungen | 77 |
| 7.2 | Verzeichnis der Tabellen | 78 |
| 7.3 | Verzeichnis der Abkürzungen | 79 |
| 7.4 | Erklärung | 80 |

| | | |
|------------|-----------------------------|-----------|
| 7.5 | Lebenslauf | 81 |
| 7.6 | Danksagung | 82 |
| 7.7 | Literaturverzeichnis | 83 |

1 Einleitung

1.1 Funktion der Ionenkanäle in erregbaren Zellen

Die Grundlage der elektrischen Erregbarkeit von Zellen ist das Vorhandensein von verschiedenen Ionenkanälen in deren Zellmembran. Die Zellmembran ist aus Lipiden aufgebaut, die sich in wässriger Lösung spontan zu einer Doppellipidschicht zusammenlagern. Diese äußere Hülle dient als Schutzmechanismus, der die Zelle von ihrer Umgebung separiert und das innere Milieu der Zelle konstant hält. Um trotzdem Austauschvorgänge verschiedener Substanzen zu ermöglichen, sind entsprechende Transportmechanismen notwendig. Dabei wird hauptsächlich auf der Grundlage kinetischer Kriterien zwischen *Carriern* und Ionenkanälen unterschieden.

Als Beispiel für einen *Carrier* ist die Na^+ - K^+ -Pumpe zu nennen, die an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials beteiligt ist (siehe Kapitel 1.2). Um die intrazellulär hohe K^+ - und die extrazellulär gesteigerte Na^+ -Konzentration zu erhalten, transportiert das in die Doppellipidmembran eingebettete Enzym Na^+ - K^+ -ATPase pro Adenosintriphosphat- (ATP-) Molekül drei Na^+ - gegen zwei K^+ -Ionen in einem aktiven Prozess entgegen ihres Konzentrationsgradienten. Während an der Innenseite der Doppellipidmembran ATP in Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat gespalten wird, können zwischen 150 und 600 Na^+ -Ionen pro Sekunde umgesetzt werden.

Die zweite Gruppe von Transportproteinen sind die Ionenkanäle, die Bestandteil von Membranen sämtlicher Zellen sind. Ein Ionenkanal kann als wassergefüllte Pore beschrieben werden, die mehr oder weniger selektiv von einer bestimmten Ionenart passiert werden kann. Hierbei werden die Ionen durch Diffusion in einem passiven Transport mit einer Geschwindigkeit von bis zu 10^6 Ionen pro Sekunde je nach vorliegendem elektrischen Potenzial entlang oder auch entgegen ihres Konzentrationsgradienten innerhalb eines elektrischen Feldes bewegt.

Eine Vielzahl von Ionenkanälen ist ubiquitär, aber mit unterschiedlichem Verteilungsmuster an den Membranen der verschiedenen Zellen vorhanden. Ebenso umfangreich sind ihre Aufgaben, zu denen über die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials und die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotenzialen (APs) die elektrische Informationsfortleitung zählt.

Die Entwicklung der Spannungsklemme (*voltage-clamp* Verfahren) ermöglichte die Kontrolle des Membranpotenzials einer Zelle (Hodgkin *et al.*, 1949; Cole, 1949). Diese Methode erlaubt durch die Messung des Membranpotenzials mit einer Elektrode das Halten des gewählten Potenzials durch die Injektion des entsprechenden Stroms durch eine weitere Elektrode. Erstmals konnte dadurch die Messung von Strömen als Reaktion auf definierte Spannungssprünge erfolgen.

Die klassischen Untersuchungen am Riesenaxon des Tintenfisches ließen zwei verschiedene Stromkomponenten erkennen (Hodgkin & Huxley, 1952). Die vorübergehende einwärts gerichtete Leitfähigkeit wurde später als Na^+ -Strom, die anhaltende auswärts gerichtete als K^+ -Strom bezeichnet.

Die Entwicklung der *patch-clamp* Technik durch Neher & Sakmann (1976) bzw. Hamill *et al.* (1981) führte bei der Untersuchung von Acetylcholinrezeptoren von Froschmuskelzellen zur Beobachtung von Strömen durch einzelne Ionenkanäle. Damit war das Vorhandensein von Ionenkanälen belegt.

1.2 Ruhemembranpotenzial und Aktionspotenzial von Neuronen

Das Zellinnere ist gegenüber dem Zelläußeren negativ geladen, so dass sich über die Doppellipidmembran eine elektrische Potenzialdifferenz messen lässt. Dieses negative Ruhemembranpotenzial ist die Grundlage der Erregungsbildung und -leitung in verschiedenen Zellen. Zu den Voraussetzungen eines Ruhemembranpotenzials zählt sowohl eine ungleiche Ionenverteilung zwischen intra- und extrazellulärer Flüssigkeit als auch eine

unterschiedliche Leitfähigkeit der Zellmembran für verschiedene Ionen. So findet sich intrazellulär K^+ als häufigstes Ion, während Na^+ -Ionen im extrazellulären Bereich vorherrschend sind. Die Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten für Na^+ - und K^+ -Ionen wird durch die Na^+ - K^+ -ATPase sichergestellt. Durch diesen elektrogenen Vorgang ergibt sich extrazellulär ein positiver Ladungsüberschuss. So wird ein elektrisches Feld aufgebaut, bei dem die intrazelluläre Flüssigkeit gegenüber der extrazellulären negativ geladen ist.

Das Ruhemembranpotenzial ist weitgehend ein K^+ -Diffusionspotenzial, da die Doppellipidmembran unter Ruhebedingungen hauptsächlich für K^+ -Ionen permeabel ist. Mit jedem K^+ -Ion, das aus der Zelle strömt, passiert auch ein positiver Ladungsträger die Zellmembran, was den Aufbau einer Potenzialdifferenz nach sich zieht.

Schließlich verhindert dieses dem Konzentrationsgradienten entgegengerichtete Diffusionspotenzial einen weiteren Ausstrom von K^+ -Ionen, so dass dem Angleichen der intra- und extrazellulären K^+ -Ionenkonzentration entgegengewirkt wird. Der Nettoionenstrom über die Doppellipidmembran kommt bei Einstellung eines Gleichgewichts zwischen den treibenden chemischen und elektrischen Gradienten zum Erliegen, und es stellt sich ein Gleichgewichtspotenzial ein. Das Gleichgewichtspotenzial eines Ions zwischen der Innenseite und der Außenseite der Zellmembran lässt sich mit Hilfe der Nernstschen Gleichung errechnen. Die Abweichung des Ruhemembranpotenzials vom Gleichgewichtspotenzial für K^+ -Ionen wurde als unter Ruhebedingungen ebenfalls vorhandene geringfügige Permeabilität für einige andere Ionen interpretiert (Goldman, 1943; Hodgkin & Katz, 1949).

Als erregbar werden Zellen bezeichnet, die Informationen in Form von APs generieren und weiterleiten können (Hille, 2001). Ein adäquater Reiz bewirkt die Depolarisation der Zellmembran, die bei Überschreiten des Schwellenpotenzials ein AP auslöst. Das Schwellenpotenzial ist wie die Dauer oder die Amplitude des APs für jeden Zelltyp charakteristisch, aber auch individuell bei jeder Zelle je nach vorhandenen Ionenkanälen

unterschiedlich. Bei Erreichen des Schwellenpotenzials ändert sich sprunghaft die Membranleitfähigkeit und es kommt zur Öffnung von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen und damit zum Einstrom von Na^+ -Ionen in die Zelle. Während der Depolarisation der Membran erfolgt eine Umkehr ihrer Polarität und das Membranpotenzial nähert sich dem Gleichgewichtspotenzial für Na^+ -Ionen von ca. +60 mV. Während dieses schnellen Aufstiegs des APs zur Spitze setzt nach ca. 0,1 ms die Inaktivierung der Na^+ -Kanäle ein, so dass das Erreichen des Na^+ -Gleichgewichtspotenzials verhindert wird. Zeitgleich kommt es durch die zunehmende Depolarisation der Membran zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit für spannungsabhängige K^+ -Kanäle. Die Umkehr des APs (Repolarisation) erfolgt unter anderem durch *delayed-rectifier* Kanäle nach extrazellulär fließenden K^+ -Ionen. Die Inaktivierung der Na^+ -Kanäle bleibt über das ca. 1 ms dauernde AP hinaus für ca. 2 ms oder länger bestehen. Diese Phase wird absolute Refraktärphase genannt, an die sich die relative Refraktärphase anschließt. Die absolute Refraktärphase begrenzt die maximal mögliche Frequenz, mit der an der Zellmembran APs ausgelöst werden können.

Die bei Erregung eines Nerven ableitbaren APs treten nicht nur im Bereich des Reizortes, sondern auch in einigem Abstand zu diesem auf. Die Fortleitung eines APs verläuft in den nicht myelinisierten Nervenfasern durch eine kontinuierliche Depolarisation, die entlang der Nervenfasermembran verläuft. In den markhaltigen Nervenfasern erlauben die Ranvierschen Schnürringe die saltatorische Ausbreitung der Erregung entlang der Schnürringe über die myelinisierten Abschnitte hinweg. Die Ranvierschen Schnürringe sind myelinfreie Bereiche zwischen den sonst von Myelin umgebenen Faserabschnitten. Dadurch können Leitungsgeschwindigkeiten von bis zu 120 m/s erreicht werden.

1.3 Anatomie des Hinterwurzelganglions

Zu beiden Seiten des im Wirbelkanal verlaufenden und im Liquor cerebrospinalis eingebetteten Rückenmarks treten Nervenfasern dorsolateral ein und ventrolateral aus. Diese

vereinigen sich zunächst zu den Hinter- bzw. Vorderwurzeln, welche sich dann zu den Spinalnerven zusammenschließen. In den Hinterwurzeln sind die Hinterwurzelganglien (DRGs, *dorsal root ganglia*) mit den in ihnen enthaltenen Somata der primär sensorischen Neurone eingeschaltet. Diese sind das erste Neuron der afferenten sensiblen Fasern. Die Nervenzellen liegen hauptsächlich im Randbereich der Hinterwurzelganglien, während im zentralen Bereich der Ganglien vorwiegend die aus den Nervenzellen austretenden Fasern zu finden sind (Andres, 1961). Die bindegewebige Dura mater spinalis und die Arachnoidea spinalis umgeben die Spinalwurzeln, begleiten diese durch die Foramina intervertebralia und dienen auch den Hinterwurzelganglien als Umhüllung (Epi- und Perineurium). Die zwischen den Neuronen liegenden Gliazellen übernehmen verschiedene Schutz- und Versorgungsfunktionen. Die peripheren Axone sind dagegen von Schwannschen Zellen umgeben (Pannese, 1960), welche die Myelinscheide dieser Fasern bilden.

Das Neuron des Hinterwurzelganglions hat einen zweigeteilten, T-förmigen Fortsatz. Vom peripheren Rezeptor ausgehend gelangt ein Reiz über den sensiblen bzw. sensorischen Anteil und den Knotenpunkt des Neurons hinweg in Richtung des zentral gelegenen Axons. Von dort wird die Erregung über eine Synapse durch Freisetzung von Transmittern auf Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks weitergeleitet.

Die kleinen Neurone (Durchmesser ca. 20 μm) der Hinterwurzelganglien, die Teil des peripheren Nervensystems sind, können entweder myelinisierte (A δ -) oder unmyelinisierte (C-) Fasern führen. Die verschiedenen Fasergruppen von peripheren Nervenfasern lassen sich je nach Leitungsgeschwindigkeit, Größe und Funktion in verschiedene Fasertypen einteilen (Gasser H.S & Erlanger, 1929; Gasser H.S & Grundfest, 1939).

Die A δ -(Hautafferenzen für Temperatur und Nozizeption) und C-Fasern (Hautafferenzen für Nozizeption) sind mit einer Leitungsgeschwindigkeit von 12-30 m/s bzw. 0,5-2 m/s den kleinen Neuronen der Hinterwurzelfasern zugeordnet (Gasser H.S & Grundfest, 1939). Harper und Lawson beschrieben eine Korrelation zwischen unterschiedlich schnell leitenden

Nervenfasern der primär sensorischen Neurone und der Größe ihrer Somata (Harper & Lawson, 1985). Danach sollen die langsam leitenden C-Fasern den kleineren dunklen Somata zugeordnet werden können, während schnell leitende A α - und A β -Fasern häufig die Fortsätze großer heller Neurone sind. Dagegen konnte für die A δ -Fasern keine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Zellgröße bzw. -färbung erfolgen (Harper & Lawson, 1985).

1.4 Ionenkanäle am Hinterwurzelganglion

In den Zellmembranen und Axons der primär sensorischen Neurone befinden sich unterschiedliche Kanaltypen mit einem variablen Verteilungsmuster (zur Übersicht siehe Scholz, 2001). Dadurch bedingt fanden sich in der vorliegenden Arbeit je nach Zelle unterschiedliche APs und Ströme. Die meisten Ionenkanäle sind vorwiegend für eine Art von Ionen durchlässig, wobei es bei den einzelnen Ionenkanälen aber graduelle Unterschiede gibt. Diese mehr oder weniger stark ausgeprägte Spezifität ist durch den Selektivitätsfilter des Membranproteins bedingt. Das Öffnen eines Ionenkanals kann durch unterschiedliche Signale hervorgerufen werden. Zu diesen gehört die Änderung des Membranpotenzials, die Bindung von externen Modulatoren oder auch der Ablauf intrazellulärer Mechanismen.

Seit Mitte der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts sind beim Menschen mehrere hundert Gene für Untereinheiten von Membranproteinen gefunden worden, die ein großes Repertoire für verschiedene Ionenkanäle bilden. Diese Gene gehören zu einer kleinen Gruppe von Superfamilien, deren Ursprünge sich bis zu den Bakterien zurückverfolgen lassen (Hille, 2001).

Die große Gruppe der **K⁺-Kanäle** (Übersicht siehe Kapitel 5, Hille, 2001) wurde nach Unterschieden in ihrer Kinetik, Ionenselektivität, Spannungsabhängigkeit und pharmakologischen Eigenschaften klassifiziert (Rudy, 1988; Dreyer, 1990; Kolb, 1990; Vogel & Schwarz, 1995). Bei Säugetieren sind für die Untereinheiten von K⁺-Kanälen durch

molekularbiologische Untersuchungsmethoden mehr als 80 Gene identifiziert worden (Hille, 2001).

Durch die *signature sequence* (Heginbotham *et al.*, 1992; Heginbotham *et al.*, 1994), die sich bei allen K^+ -Kanälen aus einer analogen Aminosäuresequenz zusammensetzt, wird ein *p-loop* gebildet. Die äußere Region der Pore und der Selektivitätsfilter wird durch vier dieser *p-loops* begrenzt. Mindestens zwei transmembranäre Segmente sind notwendig, um zusammen mit den *p-loops* den die Pore bildenden Bereich zu vervollständigen. Dieser wohl einfachste Aufbau der Kanalstruktur ist bei dem bakteriellen K^+ -Kanal KCSA nachgewiesen worden (Doyle *et al.*, 1998).

Spannungsabhängige K^+ -Kanäle (K_V -Kanäle) zeichnen sich in der Regel durch das Vorhandensein von sechs transmembranären Segmenten aus, wobei in der Regel ein Teil des vierten Segmentes als Spannungssensor fungiert. Am primären sensorischen Neuron sind mehrere Typen von spannungsabhängigen K^+ -Strömen vorhanden, (Florio *et al.*, 1990; Safronov *et al.*, 1996; Gold *et al.*, 1996a; Scholz *et al.*, 1998b), die unter anderem während der Repolarisationsphase eines APs aktiv sind. Zu dieser Gruppe zählt auch der *delayed-rectifier* K^+ -Strom, bei dem die Änderung der Membranleitfähigkeit nach einem depolarisierenden Spannungssprung erst verzögert eintritt (Hodgkin *et al.*, 1949).

Unter Verwendung molekularbiologischer Methoden konnten anhand unterschiedlicher Zellpopulationen weitere K^+ -Kanäle nachgewiesen werden (Coetzee *et al.*, 1999; Nerbonne, 2000).

Die ionenaktivierten K^+ -Kanäle werden in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration der beeinflussenden Ionen aktiviert. Zu dieser Gruppe zählt man die kalziumaktivierten K^+ -Kanäle (Pallotta *et al.*, 1981; Pennefather *et al.*, 1985) und auch einen natriumaktivierten K^+ -Kanal (Kameyama *et al.*, 1984; Bader *et al.*, 1985).

Die Aktivierung der **ligandengesteuerten K^+ -Kanäle** erfolgt über Rezeptoren, welche, wie beim muskarinergen Acetylcholinrezeptor (Brown & Adams, 1980), sowohl außerhalb der

Zelle liegen können als auch, wie bei dem ATP-sensitiven K^+ -Kanal (Noma, 1983), an der Innenseite der Zellmembran vorhanden sind.

Eine Besonderheit stellen **2-P-domain K^+ -Kanäle** mit jeweils zwei *p-loops* dar. Etwa 50 Gene dieser 2-P-domain K^+ -Kanäle, die jeweils vier transmembranäre Segmente aufweisen, konnten bei *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 1999).

Die spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle (Na_v -Kanäle) sind in erregbaren Zellen für die Aufstrichphase des APs verantwortlich. Die verschiedenen Typen von Na^+ -Kanälen werden aufgrund ihrer Kinetiken und Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung eingeteilt. Eine unter pharmakologischem Aspekt gesehene Einteilung der Na^+ -Kanäle erfolgt aufgrund ihrer vorhandenen bzw. fehlenden Sensitivität gegenüber dem Kugelfischgift Tetrodotoxin (TTX; Narahashi *et al.*, 1964; Hille, 2001).

Die TTX-resistenten Na^+ -Kanäle (TTXr) des sensorischen Neurons sind wegen ihrer relativen Insensitivität gegenüber TTX im nanomolaren Bereich als solche charakterisiert (Catterall, 2000; Baker & Wood, 2001). In Neuronen mit großem Durchmesser ($> 40 \mu m$) sind ausschließlich die TTX-sensitiven Na^+ -Kanäle (TTXs) zu finden, während in den Neuronen mit kleinem Durchmesser ($< 25 \mu m$) die TTX-resistenten Na^+ -Kanäle deutlich überwiegen (Scholz, 2001). Neurone mittleren Durchmessers enthalten variable Anteile beider Komponenten (Scholz *et al.*, 1998a).

Bei den spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen ist eine Interaktionsstelle für die Proteinkinase C (PKC) bekannt, wobei eine Phosphorylierung des Kanalproteins eine verlangsamte Inaktivierung bewirkt (West *et al.*, 1991; Cantrell *et al.*, 1996).

Die verschiedenen **spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle** (Ca_v -Kanäle) an primär sensorischen Neuronen wurden unter anderem von Kostyuk *et al.* (1974) und Nowycky *et al.* (1985) beschrieben. Im Bereich der Somata gelangen während eines APs Ca^{2+} -Ionen in die Zellen, wodurch verschiedene Mechanismen initiiert werden. So wird zum Beispiel während und nach APs über eine Erhöhung Ca^{2+} -Konzentration an der zytoplasmatischen Seite die

Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen bewirkt (Gold *et al.*, 1996b; Scholz *et al.*, 1998b). Die verschiedenen Typen von Ca^{2+} -Kanälen finden sich in unterschiedlicher Zusammensetzung auf den Neuronen des Hinterwurzelganglions (Mintz *et al.*, 1992; Diochot *et al.*, 1995; Scholz *et al.*, 1997).

1.5 Steuerung von Zellfunktionen durch die Proteinkinase C

Die Steuerung von Zellfunktionen kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Eine Möglichkeit ist die Änderung des Membranpotenzials, welches bei Neuronen in Form von APs als Information verarbeitet und weitergeleitet wird. Synaptische Überträgerstoffe (Transmitter) gehören zu den Substanzen, die über spezifische Rezeptoren unter anderem elektrische Signale hervorrufen können. Sekundäre Botenstoffe (*second-messengers*) dienen innerhalb der Zelle der Weiterverarbeitung der von außen auf die Zellmembran einwirkenden Informationen. Sie haben die Funktion eines biologischen Verstärkers, der die Reaktion eines Signals mit dem externen Rezeptor in die Phosphorylierung einiger intrazellulär gelegener Proteine umwandelt, durch die dann verschiedene Zellfunktionen kontrolliert werden. Die Modulation eines Kanalproteins erfolgt dann erst mit einer gewissen Verzögerung, die durch die Abfolge der Signalkaskade eines *second-messenger* Systems bedingt ist.

Ein Beispiel hierfür ist das Phosphoinositol-System (IP_3 -System), dessen Signalwege in der Abbildung 1 dargestellt sind. Das bekannte Phänomen des „*rundown*“ könnte mit solchen Phosphorylierungsvorgängen zusammenhängen (Hille, 2001).

Die PKC spielt eine Schlüsselrolle in der intrazellulären Signaltransduktion und ist in Vorgänge wie Wachstum und Differenzierung involviert. Zu den Angriffspunkten der PKC und ihrer Produkte zählen Rezeptoren, G-Proteine, Ionenkanäle oder auch andere Kinasen (Nishizuka, 1995; Newton, 1996; Mellor & Parker, 1998). Die Aktivierung der PKC erfolgt auf physiologischem Weg unter anderem über Diacylglycerin (DG). Durch Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter oder Hormone als externes Signal wird über ein

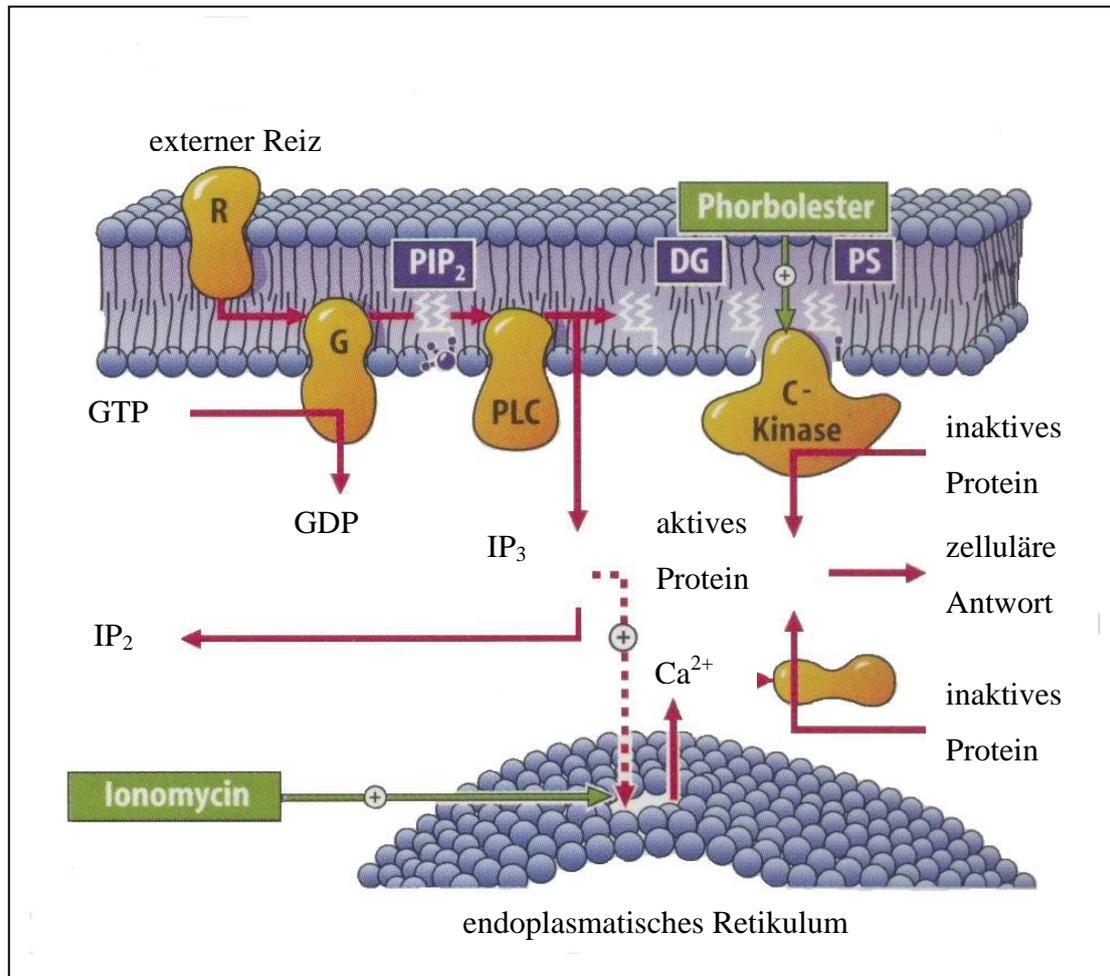


Abbildung 1 *Second-messenger System des Phosphoinositol (IP₃)*

Von einem externen Reiz ausgehend verläuft die Reaktionskette des Phosphoinositol (**IP₃**) über Phosphatidylinosindiphosphat (**PIP₂**), welches in Diacylglycerin (**DG**) und **IP₃** gespalten wird. Dadurch wird die spezifische Wirkung der Stimulation des membranständigen Rezeptors (**R**) über zwei getrennte Signalwege vermittelt. **G**-GTP-aktiviertes Protein, **PLC**-Phospholipase C, **PS**-Phosphatidylserin (modifiziert nach Schmidt & Thews, 1995).

second-messenger System die Bildung von DG ausgelöst (Nishizuka, 1986). Liegen die Enzyme in aktivierter Form vor, binden sie an Phospholipide der Doppellipidmembran oder an membranständige Rezeptoren. Mehrere Isoenzyme werden unter dem Begriff „PKC“ zusammengefasst und aufgrund ihrer Struktur und damit verbundener Sensitivität bzw.

fehlender Reaktionen auf DG und Phorbolster in drei Gruppen eingeteilt (Nishizuka, 1988; Nishizuka, 1992; Hug & Sarre, 1993; Nishizuka, 1995). Zu den klassischen Isoenzymen (cPKC) zählen die PKC α , β I, β II und γ , welche Ca²⁺-abhängig sind und durch DG, Phorbolster und Phosphatidylserin (PS), ein in der Doppellipidmembran vorhandenes Phospholipid, stimuliert werden können. Die Gruppe der *novel* PKC (nPKC) beinhaltet die PKC δ , ϵ , η , θ und μ , die sich durch eine Ca²⁺-Unabhängigkeit, aber eine Sensitivität bezüglich DG, Phorbolstern und PS auszeichnen. Die atypischen PKC ζ , ι , und λ reagieren Ca²⁺-unabhängig und sind DG- und Phorbolster-insensitiv (Nishizuka, 1995). Die PKC μ oder Proteinkinase D (PKD) zeigt einige von den für die PKC-Isoenzyme üblich abweichenden Eigenschaften bezüglich der Regulation und Substratspezifität und wird deshalb von manchen Autoren den „PKC-related kinases“ zugeordnet (Johannes *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1994). Die Struktur der einzelnen PKCs wird durch zwei spezifische Domänen bestimmt, die als regulatorische und katalytische Domäne bezeichnet werden. Die bei den cPKCs, nPKCs und der PKC μ bzw. PKD doppelt vorhandene cysteinreiche Domäne ist innerhalb der regulatorischen Domäne angesiedelt und stellt die Bindungsstelle für den *second-messenger* DG und für Phorbolster dar (Burns & Bell, 1991; Kazanietz *et al.*, 1995). Die katalytische Domäne setzt sich aus der Bindungsstelle für ATP und dem substratbindenden Bereich zusammen (Taylor & Radzio-Andzelm, 1994). Im membranständigen Zustand bietet der sich zwischen der regulatorischen und der katalytischen Domäne befindliche Anteil einen Angriffspunkt für intrazelluläre Proteasen, die an dieser Stelle eine Aufspaltung des Enzyms bewirken können (Newton, 1993).

Bei den Isoenzymen der PKC lassen sich Unterschiede bezüglich ihres Vorkommens in den Geweben feststellen. Die PKC α , β I, β II, δ , ϵ und ζ treten ubiquitär auf (Schaap & Parker, 1990; Wetsel *et al.*, 1992; Hug & Sarre, 1993). Die PKC θ dominiert im Skelettmuskel und weist eine geringere Ausbreitung in Lunge, Milz, Haut und Gehirn auf (Osada *et al.*, 1992).

Im Lungen- und Thymusgewebe ist das Vorkommen der PKC μ besonders stark ausgeprägt, wobei dieses Isoenzym ansonsten ubiquitär auftritt (Rennecke *et al.*, 1996).

Im Bereich des ZNS dominiert die PKC δ in den Somata von Neuronen, während die PKC ϵ gehäuft in präsynaptischen Endigungen auftritt. (Merchenthaler *et al.*, 1993; Tanaka & Nishizuka, 1994).

Untersuchungen im Bereich des PNS belegen, dass die Capsaicinwirkung direkt über die PKC reguliert wird (Zhou *et al.*, 2001). Uehara *et al.* (2004) beschrieben einen Einfluss der PKC α und PKC β II am DRG der diabetischen Maus im Zusammenhang mit deren sensorischer Neuropathie. Auch die PKC δ des DRG soll an der Pathogenese der diabetischen Ratte beteiligt sein (Sakaue *et al.*, 2003).

Diese Ergebnisse weisen auf eine weitreichende funktionelle Bedeutung verschiedener Isoenzyme der PKC hin und lassen vermuten, dass ein Teil der oben genannten Isoenzyme der PKC auch bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wirkung von Ethanol auf die kleinen Neurone des DRG einen Einfluss haben könnten. Diese sind die PKC δ , ϵ , η , θ und μ , die zu der Gruppe der *novel* PKCs (nPKCs) gehören, weitere Isoenzyme können wegen der verwendeten Lösungen ausgeschlossen werden. Nur bei den Experimenten zur Untersuchung der spannungsabhängigen K⁺-Kanäle und der TTXr Na⁺-Kanäle wäre grundsätzlich ein Einfluss der klassischen PKCs (cPKCs, PKC α , β I, β II und γ) möglich, da diese Gruppe der PKCs Ca²⁺-abhängig ist. Bei beiden Experimentgruppen wurden aber die in der Innenlösung vorhandenen F⁻-Ionen in Form von KF bzw. CsF zur Blockade potentieller Ströme durch Ca²⁺-Kanäle verwendet, so dass Ca²⁺-abhängige PKCs hier nicht aktiv sein konnten.

1.6 Ethanol

Ethanol wirkt hauptsächlich im Bereich des Zentralen Nervensystems (ZNS; Charness *et al.*, 1989; Little, 1991; Tabakoff & Hoffman, 1996; Lovinger, 1997). So konnte gezeigt werden, dass Ethanol die ligandengesteuerten γ -amino-Buttersäure-A-(GABA_A-) Rezeptoren über

einen Mechanismus potenziert, an dem auch die PKC beteiligt sein soll (Machu *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1995). Diese Rezeptoren vermitteln die inhibitorische synaptische Übertragung, welche durch Konzentrationen von 20-200 mM Ethanol gesteigert werden kann (Mihic *et al.*, 1997), wobei ca. 17,8 mM 1‰ v/v entsprechen. Der durch Ethanol in Konzentrationen von 10-50 mM herbeigeführte Effekt am GABA_A-Rezeptor soll durch PKC-spezifische Inhibitoren unterbunden werden können (Machu *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1995). Neuere Untersuchungen ergaben ab einer Ethanolkonzentration von 3 mM eine Wirkung auf extrasynaptisch lokalisierte GABA_A-Rezeptoren, die damit wahrscheinlich als der Hauptwirkungsort von Ethanol im ZNS angesehen werden können. Dafür wurde die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (DNS) verschiedener Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors der Ratte verwendet, die anatomisch unterschiedlichen Regionen des Gehirns zugeordnet werden können (Wallner *et al.*, 2003). Weiterhin können Glutamat-Rezeptoren vom *N*-methyl-D-aspartat-(NMDA-)Typ inhibiert (Peoples & Weight, 1995; Minami *et al.*, 1998) und nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren je nach verwendeter Kombination der verwendeten Untereinheiten und Konzentration von Ethanol (1-300 mM) potenziert bzw. inhibiert werden (Covernton & Connolly, 1997). Die Inhibierung der NMDA- (Wang & Salter, 1994; Suzuki & Okumura-Noji, 1995; Yu *et al.*, 1997) und die Potenzierung der GABA_A-Rezeptoren (Moss *et al.*, 1995; Valenzuela *et al.*, 1995) kann über Phosphorylierungsreaktionen erfolgen, an denen Tyrosinkinasen beteiligt sind.

Die Inhibierung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle konnte in Neuronen des Mollusken (*Helix pomatia*) nachgewiesen werden. Die Verwendung des PKC-Blockers Staurosporin konnte die Wirkung von Ethanol auf die Ca²⁺-Kanäle verhindern, so dass hier ein Zusammenhang mit einer G-Protein gekoppelten Signalkaskade nahe liegt (Kerschbaum & Hermann, 1997).

Die anästhetische Wirkung von Ethanol ist durch die Ergebnisse verschiedener Studien belegt worden (Schnelle, 1965; Dundee *et al.*, 1969; James *et al.*, 1978; Woodrow & Eltherington, 1988). Bezüglich der analgetischen Effekte beim Menschen gibt es neben verschiedenen

klinischen Beobachtungen auch sehr frühe wissenschaftliche Veröffentlichungen (Wolff *et al.*, 1941; Wolff *et al.*, 1942), in denen ein Anstieg der Schmerzschwelle bei oraler Verabreichung von Ethanol protokolliert wurde. Ein wichtiger Teil der sedativen Wirkungen des Alkohols wird, wie oben bereits erwähnt, über GABA_A-Rezeptoren vermittelt. Ein Teil des analgetischen Effektes von Ethanol lässt sich auf die Öffnung der im ZNS vorhandenen G-Protein aktivierten *inward-rectifier* K⁺-Kanäle (K_{ir} bzw. GIRK) zurückführen. Allerdings konnte hier kein Nachweis einer Interaktion der Ethanolwirkung mit G-Proteinen oder *second-messenger* Systemen erbracht werden (Kobayashi *et al.*, 1999). Dagegen sind in anderen Arbeiten verschiedene G-Protein aktivierte *inward-rectifier* K⁺-Kanäle beschrieben, die durch mehrere G-Protein gekoppelte Opioidrezeptoren aktiviert werden können (North, 1989; Ikeda *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu den Ethanoleffekten im ZNS ist eine weitreichende wissenschaftliche Grundlage im Bezug auf das periphere Nervensystem (PNS) nicht vorhanden.

Im Zusammenhang mit chronischem Alkoholkonsum kommt es zu irreversiblen neurologischen Schäden (Charness *et al.*, 1989), die sowohl Teile des Gehirns betreffen als sich auch in Form einer peripheren Neuropathie manifestieren können. Im Hinblick auf akute Auswirkungen wird auch die Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals (*large conductance calcium activated K⁺-channel*, BK_{Ca}-Kanal) durch Ethanol (an isolierten Endigungen der Neurohypophyse; Dopico *et al.*, 1996) in klinisch relevanten Konzentrationen von 20-80 mM (entspricht ca. 1-4‰ v/v) zusammen mit der ethanolinduzierten Blockade der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle als Erklärung einer reduzierten Sekretion von Vasopressin und der bekannten gesteigerten Diurese unter Ethanoleinfluss angenommen (Treisman *et al.*, 1991).

1.7 Interaktionen von Proteinkinase C und Ethanol

Die von Gruß *et al.* (2001) untersuchten sensorischen Neurone zeigten nach Gabe von Ethanol bei den APs und Strömen unterschiedliche Reaktionen. Bei einem Teil dieser Neurone konnten diese Veränderungen durch den Einfluss des BK_{Ca}-Kanals erklärt werden, bei den übrigen Neuronen blieb die Ursache der durch Ethanol irreversibel verlängerten Aktionspotenzialdauer (AP-Dauer) und der damit einhergehenden Reduktion der Auswärtsströme ungeklärt. Die zuletzt genannte Subpopulation wurde in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig untersucht und als „Gruppe B“ Neurone bezeichnet. Da die PKC im Rahmen der zahlreichen Signalkaskaden innerhalb der Zelle eine zentrale Rolle spielt, ließen die Veränderungen bei diesen Zellen einen Zusammenhang der Ethanolwirkung mit den durch die PKC vermittelten Effekten vermuten.

Bei der Untersuchung von Ethanoleffekten via unterschiedlicher Isoenzyme der PKC konnte je nach experimentellen Konditionen und je nach Zellpopulation in mehreren Studien keine Wirkung von Ethanol über dieses *second-messenger* System gezeigt werden (Machu *et al.*, 1991; Messing *et al.*, 1991; D'Souza *et al.*, 1992). Dagegen konnte von der Gruppe um Slater an Hirnzellen der Ratte eine proportional zur Kettenlänge des Alkohols vorhandene Blockade einer aus mehreren Isoenzymen zusammengesetzten Mischung der konventionellen PKC (cPKC) dokumentiert werden (Slater *et al.*, 1993; Slater *et al.*, 1994). Allerdings konnte bei der durch DG aktivierten und membranständigen PKC nur eine mäßige Inhibition durch kurzkettige Alkohole wie Ethanol und Pentanol erreicht werden; die durch Phorbolster aktivierte PKC zeigte sich relativ insensitive (Slater *et al.*, 1997). Die katalytische Domäne der PKC soll durch Ethanol nicht beeinflusst werden, so dass eine Interaktion zwischen Ethanol und der regulatorischen Domäne angenommen werden kann (Slater *et al.*, 1993; Hemmings, Jr. *et al.*, 1995). Die Effekte von Ethanol auf die durch die PKC vermittelten Mechanismen hängen von der Lokalisation des Enzyms ab. Dabei spielt es eine Rolle, ob das Enzym sich zum Beispiel im Bereich des Zytoskeletts befindet oder membranständig ist. Es konnte anhand

verschiedener Zellpopulationen gezeigt werden, dass durch Ethanol die Translokation der PKC zur Doppellipidmembran ausgelöst werden kann (Skwish & Shain, 1990; DePetrillo & Liou, 1993; Domenicotti *et al.*, 1998). Dagegen konnte Steiner *et al.* (1997) anhand von Zellen der Adenohypophyse zeigen, dass Ethanol die Translokation der PKC in einen membranständigen Zustand verhindert.

1.8 Fragestellung

In den letzten Jahren wurden fast ausschließlich die Effekte von Ethanol auf das zentrale Nervensystem erforscht. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, dass durch Ethanol verschiedene spannungsabhängige und ligandengesteuerte Ionenkanäle moduliert werden können (Harris, 1999).

Von Gruß *et al.* (2001) konnte gezeigt werden, dass Ethanol (40-80 mM) im Bereich des peripheren Nervensystems zwei verschiedene Reaktionen der AP-Dauer bei den kleinen Neuronen des DRGs hervorgerufen hat.

40% der Neurone zeigten in Ethanol eine Reduktion der AP-Dauer, die mit einer beschleunigten Repolarisationsphase des APs einherging. Diese Gruppe von Neuronen wurde als „Gruppe A“ bezeichnet, wobei die Verkürzung der AP-Dauer Grundlage für die Einteilung war. Im Zusammenhang mit der ethanolinduzierten verkürzten AP-Dauer konnte in der *whole-cell* Konfiguration ein erhöhter Auswärtsstrom beobachtet werden. Dieser Effekt von Ethanol konnte durch Iberiotoxin, einem spezifischen Blocker des kalziumaktivierten K⁺-Kanals mit großer Leitfähigkeit, verhindert werden. Eine über den BK_{Ca}-Kanal vermittelte Modulation der AP-Dauer der kleinen Neurone des DRGs wurde bereits in einer früheren Arbeit beschrieben (Scholz *et al.*, 1998b).

60% der Neurone der „Gruppe B“ zeigten dagegen nach Ethanolapplikation (40 mM) eine Verlängerung der AP-Dauer, die irreversibel war und sich im Auswasch teilweise fortsetzte. Im Zusammenhang mit den elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Zellen

immunhistochemisch auf Isolectin B4 (I-B4; Sigma, Deutschland) untersucht. I-B4 ist ein Marker für eine Subpopulation von unmyelinisierten, primär afferenten Neuronen (Plenderleith & Snow, 1993; Snider & McMahon, 1998), die nozizeptiven afferenten Fasern

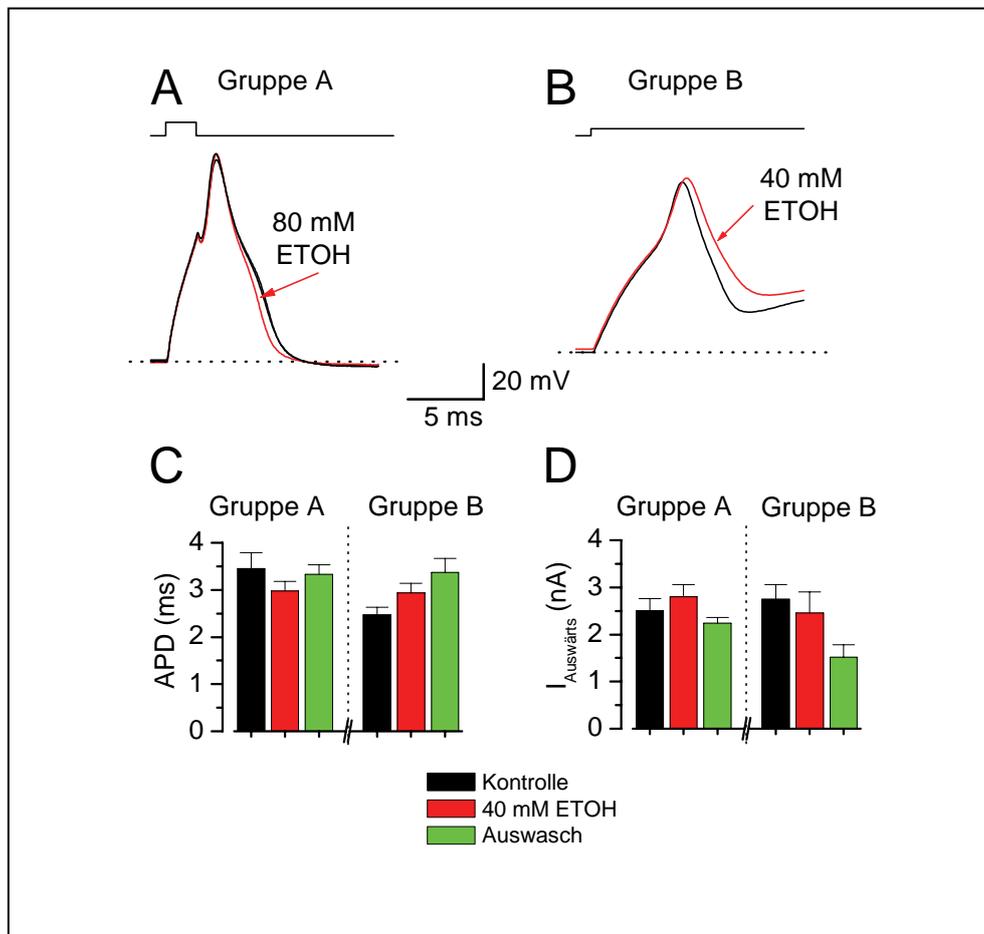


Abbildung 2 Durch Ethanol induzierte Veränderungen der kleinen DRG-Neurone

(A) Die nach Ethanolapplikation verkürzte AP-Dauer eines „Gruppe A“ Neurons. (B) In Ethanol verlängerte AP-Dauer eines „Gruppe B“ Neurons. (C) Balkendiagramm der gemittelten Werte aller untersuchten Neurone. (D) Die Auswärtsströme waren dazu passend erhöht bzw. reduziert (Gruß *et al.*, 2001).

der Haut zugeordnet werden können (Haberberger & Bodenbenner, 2000). Dabei wurden über 90% der „Gruppe A“ Neuronen als positiv identifiziert.

Die signifikant kürzere AP-Dauer der Neurone der „Gruppe B“ in Ca^{2+} -freier Standard-Lösung wie auch die differierenden Färbereigenschaften mit I-B4 ließen darauf schließen, dass die Zellen der beiden Gruppen zu unterschiedlichen Subpopulationen der kleinen Neurone des DRG gehören.

Die beobachteten Effekte der „Gruppe A“ Neurone lassen sich, wie oben beschrieben, durch die Aktivierung des BK_{Ca} -Kanals während eines APs erklären. Dagegen blieb die Ursache der bei „Gruppe B“ Neuronen abweichenden Effekte bezüglich der AP-Dauer nach Ethanolapplikation ungeklärt. Als Ziel dieser Arbeit galt es, eine Aussage über eine mögliche Beteiligung der PKC an einem Mechanismus zu treffen, der die Verlängerung der AP-Dauer und der damit einhergehenden Modulation der Ströme durch Ethanol über eine Aktivierung der PKC bei den „Gruppe B“ Neuronen beeinflusst.

Im Rahmen der Fragestellung wurden die Auswirkungen der verschiedenen Pharmaka auf die APs und die gesamten Auswärtsströme untersucht. Um einen Einfluss der PKC feststellen zu können, wurde Staurosporin als Inhibitor der PKC verwendet. Dabei wurde ein Schwerpunkt auf die spannungsabhängigen K^{+} -Ströme als eine der Komponenten des gesamten Auswärtsstroms gelegt und deshalb bei diesen Experimenten neben Staurosporin auch Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) als Aktivator der PKC eingesetzt. Dadurch könnte eine durch Staurosporin erzielte Wirkung verifiziert werden, wenn durch PMA der gleiche Effekt wie durch Ethanol erreicht würde.

Außerdem wurde die Modulation der Einwärtsströme durch Ethanol und Staurosporin beobachtet. Die weitere Differenzierung erfolgte durch die Verwendung von TTX, um die TTX-resistenten Na^{+} -Ströme (TTXr) als eine Komponente der Einwärtsströme unabhängig von den TTX-sensitiven Na^{+} -Strömen (TTXs) registrieren zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation

In dieser Arbeit wurden vor allem kleine Neurone der Hinterwurzelganglien (mittlerer Durchmesser: $20,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $n = 60$) untersucht. Diese sind aufgrund ihrer Größe am ehesten dem A δ - und C-Typ zuzuordnen, welche für die Weiterleitung von Informationen aus Schmerz- und Thermorezeptoren verantwortlich sind.

Der Vorteil der hier beschriebenen *slice*- oder Dünnschnitt-Präparation besteht in der relativ „intakten“ Umgebung der Zellen, denn sowohl der umgebende Zellverbund als auch zugehörige Axons bleiben erhalten. Im Gegensatz zu der enzymatischen Präparation, bei der eine Veränderung der Kanalproteine möglich ist (Hestrin & Korenbrot, 1987), kann bei der *slice*-Präparation eine Beeinträchtigung der Kanal- und Rezeptoreigenschaften durch solche Enzyme vermieden werden. Außerdem konnte das Ruhepotenzial der kleineren sensorischen Neurone in einem Bereich gemessen werden, der um ca. 10-20 mV negativer lag als bei enzymatischer Präparation (Scholz *et al.*, 1999). Auch der Eingangswiderstand lag gegenüber den Neuronen aus enzymatischer Präparation bis zu 50fach höher. Dies spricht bei dieser Präparation für relativ intakte Zellen. Allerdings erlaubt die *slice*-Präparation der DRGs aufgrund ihrer Einbettung in ein sehr festes Bindegewebe lediglich den Zugang zu den im Schnitt oberflächlich gelegenen Neuronen, nicht aber zu den tiefer gelegenen, wie es für Hirnschnitte beschrieben ist (Edwards *et al.*, 1989; Scholz *et al.*, 1998b).

Die für diese Untersuchungen verwendete Präparation basiert auf einer von Safronov *et al.* (1996) entwickelten Methode. Dazu werden die Hinterwurzelganglien von 3-9 Tage alten Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts aus eigener Zucht entnommen. Das Töten der Ratten erfolgte gemäß den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes (25.05.1998, §7).

Zur Vorbereitung der Präparation werden ca. 0,5 l der Standard-Lösung in einem Gefrierfach für etwa 2 h auf eine Temperatur von ca. 2-4° C eingestellt, um eine teils kristalline und teils wässrige Lösung zu erhalten. Nach der Dekapitation der Versuchstiere wird die Wirbelsäule über einen dorsalen Zugang dargestellt, so dass sie mit ihrem umgebenden Gewebe ihrer Länge nach in kranialer Richtung bis in den thorakalen Bereich der Ratte im Ganzen entnommen werden kann. Die darauf folgende Präparation der Hinterwurzelganglien wird von ventral in einer Präparierschale durchgeführt. Diese ist während der gesamten Präparation mit eiskalter Standard-Lösung gefüllt. Es erfolgt eine ständige Begasung der Standard-Lösung mit Carbogen-Gas (95% O₂, 5% CO₂), welche den pH-Wert konstant hielt.

Zur Präparation der Hinterwurzelganglien wird zunächst die Wirbelsäule mit Hilfe einer Iridektomieschere (Storz, Deutschland) von ventral durch zwei parallele Längsschnitte eröffnet. Durch die dadurch entstehende Fensterung kann das Rückenmark vorsichtig von den Hinterwurzelganglien abgetrennt und aus dem Wirbelkanal entfernt werden. Unter einer Lupe (Wild M3, Schweiz- 6,4- oder 40-fache Vergrößerung) können aus dem lumbalen Bereich der Wirbelsäule 3-4 Ganglien mit einer feinen Pinzette vorsichtig herausgezogen werden. Die auf diese Art vorbereiteten Ganglien werden in den flüssigen Agar (2% w/v, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, BRD) eingebettet.

Der Agar wurde zuvor in einem mit 20 ml Standard-Lösung gefüllten Becherglas angesetzt, unter Rühren zweimal aufgekocht und danach auf die erforderliche Temperatur von ca. 39° C abgekühlt.

Nun wird das Becherglas mit den im Agar eingebetteten Ganglien für ca. 3 min. in einer auf -22° C gehaltenen flüssigen NaCl-Lösung (23%) abgekühlt. Anschließend kann der Agar in verfestigtem Zustand mit einem Spatel aus dem Becherglas entnommen werden. Die Ganglien werden samt dem umgebenden Agar in pyramidenförmige Stücke geschnitten und anschließend mit Acrylcyanat (Sekunden-Alleskleber, UHU GmbH, BRD) auf einer Glasplatte befestigt. Diese wird in den Probenhalter eines Vibratoms (FTB 1.4, Vibracut

Feinwerktechnik, BRD) eingespannt. Zur Schnittherstellung findet mit der am Vibratom befestigten Rasierklinge (Super Silver Platinveredelt, Gillette, BRD) ein Schneidevorgang mit einer Vorschubgeschwindigkeit von ca. 4 mm/min statt. Die Schnitte waren 150 bzw. 100 μm dünn, so dass man sogenannte „thin slices“ erhält. Diese hatten eine akzeptable mechanische Festigkeit und sind außerdem ausreichend lichtdurchlässig, um unter dem Mikroskop betrachtet werden zu können. Die Schnitte wurden in einem Becherglas mit ca. 200 ml Standard-Lösung aufbewahrt, das unter Begasung mit Carbogen-Gas in einem Wasserbad (Colora Kryo-Thermostat WK5, Colora Messtechnik GmbH, BRD) bei einer Temperatur von etwa 37° C für ca. 30 min. konstant gehalten wird. Die inkubierten Schnitte sind anschließend bis zu 8 h bei einer Zimmertemperatur von ca. 21-25° C zu Messungen genutzt worden. Eine mit Standard-Lösung gefüllte Pasteur-Pipette dient dem Transport der Schnittpräparate in die Experimentierkammer.

2.2 Lösungen

Die während dieser Untersuchung verwendeten Substanzen bzw. Pharmaka wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, BRD) bezogen. Alle Konzentrationen sind in mmol/l (mM) angegeben.

2.2.1 Außenlösungen

Standard-Lösung:

NaCl 115; KCl 5,6; MgCl₂ 1; Glucose 11; NaH₂PO₄ 1; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2,2. Diese Außenlösung hat eine Na⁺-Endkonzentration von 141 mM.

Ca²⁺-freie Standard-Lösung:

NaCl 115; KCl 5,6; MgCl₂ 5; Glucose 11; NaH₂PO₄ 1; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 0. Die Lösung ist nominell Ca²⁺-frei.

Um mögliche Veränderungen der Oberflächenladung auszugleichen, wurde die Mg^{2+} -Konzentration auf 5 mM angehoben, wodurch zusätzlich Ca^{2+} -Kanäle blockiert werden (Hille, 2001).

Cholinchlorid-Lösung:

Cholinchlorid 115; KCl 5,6; $CaCl_2$ 2,2; $MgCl_2$ 1; Glucose 11; KH_2PO_4 1; $KHCO_3$ 25. Die Endkonzentration von Cholinchlorid lag bei 141 mM.

Cholinchlorid wurde bei den Experimenten zur Untersuchung der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle im Austausch für Na^+ -Ionen eingesetzt (Hodgkin & Katz, 1949).

Die Standard-Lösung, die Ca^{2+} -freie Standard-Lösung und die Cholinchlorid-Lösung wurden kontinuierlich mit Carbogen-Gas (95 % O_2 , 5% CO_2) auf einen pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt und dieser mit Hilfe einer pH-Elektrode (Mikroprozessor pH-Meter CG 837, BRD) kontrolliert.

2.2.2 Innenlösungen

High_{Ki} ATP:

KCl 18; K^+ -Aspartat 100; $CaCl_2$ 1; $MgCl_2$ 3; Na_2 -ATP 2; Na_3 -GTP 0,1; EGTA (Ethylenglycol-bis(β -Aminoethyl Ether) N,N,N',N',-Tetraessigsäure) 10; HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'[2-Ethanosulfonsäure]) 10. Der pH-Wert wurde mit NaOH und KOH auf 7,2 eingestellt. Die Na^+ -Endkonzentration lag bei 14,3 mM, die K^+ -Endkonzentration betrug 145 mM.

KF:

KF 102; KCl 30; Na_2 -ATP 2; HEPES 10. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,4 eingestellt und die K^+ -Endkonzentration mit KCl auf 140 mM ergänzt. Durch Zugabe von Fluorid- (F^-)

Ionen in die Innenlösung können Ströme durch Ca^{2+} -Kanäle blockiert werden (Kostyuk *et al.*, 1977).

CsF:

NaCl 10; CsCl 40; CsF 67,5; HEPES 10; $\text{Na}_2\text{-ATP}$ 2. Der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,2 eingestellt. Die Cs^+ -Endkonzentration lag bei 135 mM.

2.3 Pharmaka

2.3.1 Ethanol

Ethanol (99,8%, unvergällt, Riedel-de Haën, BRD) wurde direkt in die Außenlösung pipettiert, um die gewünschte Konzentration zu erreichen. Die dabei gewählte Konzentration von 40 mmol/l entspricht in etwa einer Blutalkoholkonzentration von 2‰ w/v.

2.3.2 Staurosporin

Dieser unspezifische Inhibitor der Proteinkinase C (Tamaoki & Nakano, 1990) wurde am Experimentiertag als Bestandteil der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung in einer Konzentration von 100 nM angesetzt (Endkonzentration von DMSO 0,1%). Die Stammlösung enthielt 100 μM Staurosporin in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Es wurde auf einen adäquaten Lichtschutz durch schwarze Perfusorspritzen und Schläuche im Verteilersystem und lichtgeschützte Lagerung dieser Substanz geachtet.

2.3.3 Phorbol 12-myristat 13-acetat

Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) wurde als Aktivator der PKC eingesetzt (Niedel *et al.*, 1983). Zunächst wurde eine Stammlösung mit 4 mM PMA in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt. Für die Durchführung der Experimente erfolgte am Experimentiertag eine

Verdünnung auf 500 nM PMA in der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung (Endkonzentration von DMSO 0,0125%). PMA wurde aufgrund seiner Photosensibilität lichtgeschützt gelagert, während des Experiments in schwarzen Perfusorspritzen aufbewahrt und durch schwarze Schläuche zur Experimentierkammer geleitet.

2.3.4 Tetrodotoxin

TTX ist in den Eingeweiden des Kugelfisches (*Tetraodontiae*) zu finden. Durch dieses Gift werden TTX-sensitive spannungsabhängige Na^+ -Kanäle selektiv und reversibel blockiert (Narahashi *et al.*, 1964). Um die TTX-resistenten Na^+ -Ströme unabhängig von den TTX-sensitiven Na^+ -Strömen untersuchen zu können, enthielt die Außenlösung TTX (Latoxan, Frankreich) in einer Konzentration von 200 nM. TTX wirkt nur von der Außenseite der Doppellipidmembran und kann diese auch nicht permeieren (Hille, 2001).

2.4 Die *patch-clamp* Technik

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der *patch-clamp* Technik angewendet (Hamill *et al.*, 1981), die von Neher & Sakmann (1976) erstmals beschrieben wurde. Mit Hilfe dieser Technik kann ein sehr kleiner Teil der Zellmembran (Membranfleck, *patch*) elektrisch von seiner Umgebung isoliert und die durch die einzelnen Ionenkanäle dieses *patches* fließenden Ströme registriert werden. Die *patch-clamp* Technik basiert auf dem Prinzip der Spannungsklemme (*voltage-clamp*; Cole, 1949; Marmont, 1949). Die Spannungsklemme wird eingesetzt, um eine individuell einstellbare Spannung an eine Membran anlegen zu können, welche auch bei durch die Membran fließenden Strömen konstant gehalten wird. Durch die Erzeugung eines Kompensationsstromes wird verhindert, dass sich der Wert des Membranpotenzials ändert. Kann nun ein Strom über den Widerstand des Ionenkanals gemessen werden, zieht das nach dem Ohmschen Gesetz eine Veränderung der Spannung nach sich. Mit Hilfe eines negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das

Membranpotenzial gemessen und mit der vorgegebenen Sollspannung verglichen wird, ist es möglich, bei abweichenden Werten einen entgegengesetzten Strom in die Zelle zu injizieren. Dieser setzt sich außer aus dem Strom durch die einzelnen Ionenkanäle auch aus dem sogenannten Leckstrom zusammen, der vom Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran abhängt. Aus dem gemessenen Kompensationsstrom lässt sich die Leitfähigkeit bzw. der Widerstand der untersuchten Membran ableiten.

Um die transmembranäre Potenzialdifferenz messen zu können, wird als Versuchsanordnung die sogenannte Stromklemme (*current-clamp*) gewählt. Dieser Modus lässt Rückschlüsse auf das natürliche Erregungsmuster der Zelle zu. Hierbei kann man an Neuronen durch Stromimpulse mit definierter Stärke und Länge eine Depolarisation der Zellmembran und nach Überschreiten eines Schwellenwertes ein AP auslösen.

Die Methode der *patch-clamp* Technik wurde durch eine weiterentwickelte Verstärkertechnik im Zusammenhang mit einem verbesserten Abdichtwiderstand im Gigaohm-Bereich (*giga-seal*) etabliert.

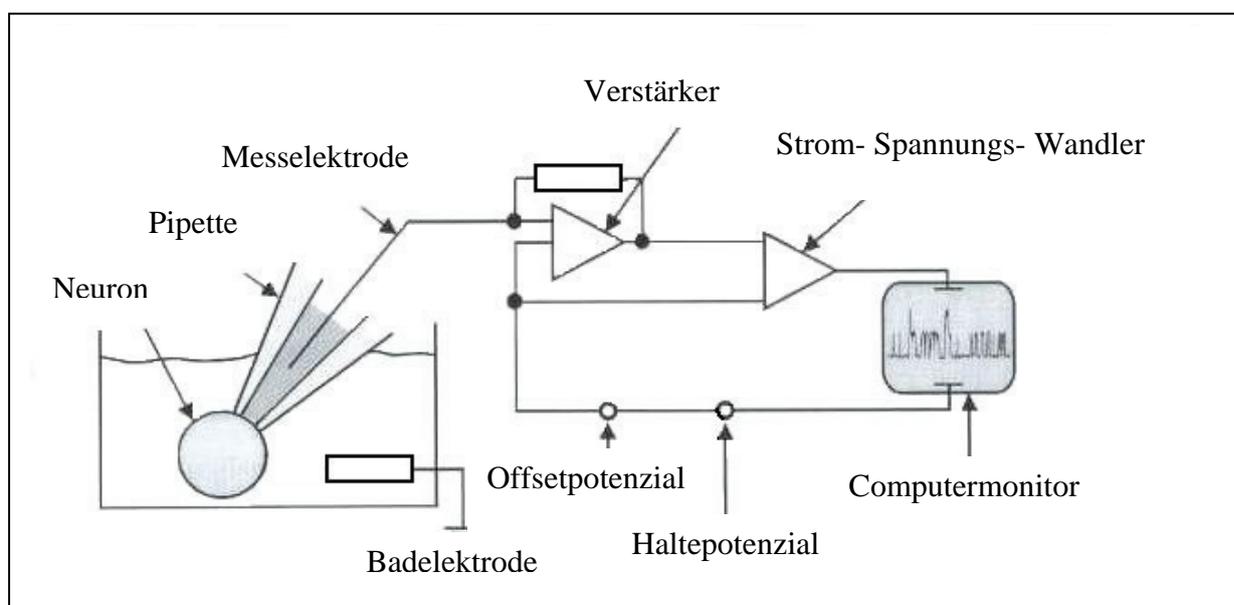


Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus

Wird eine saubere und an der Spitze feuerpolierte Glaspipette vorsichtig auf die Membran aufgesetzt, kann der Abdichtwiderstand sprunghaft auf bis zu 100 Gigaohm ansteigen. Diese Konfiguration nennt man *cell-attached* (siehe Abbildung 3). Hierbei befindet sich der elektrisch isolierte Membranfleck weiterhin im Verbund der Doppellipidmembran und wird als einziger Bereich der Zellmembran elektrisch kontrolliert. Der größte Teil der Doppellipidmembran und das Ruhepotenzial bleiben unbeeinflusst und das intrazelluläre Milieu physiologisch erhalten. Von der *cell-attached* Konfiguration gelangt man in die *whole-cell* Konfiguration, indem man weiterhin Sog auf die Pipette einwirken lässt, so dass die Membran schließlich durchreißt und die Pipette mit dem Zellinneren leitend verbunden ist. Daraus resultiert eine Einbeziehung aller in der gesamten Zellmembran vorhandenen und auch aktiven Ionenkanäle in die Messungen. Im *current-clamp* Modus lässt sich kurz nach dem Durchbrechen der Membran das Ruhepotenzial der Zelle bestimmen. Die verwendete Innenlösung befindet sich zunächst in der Pipette, diffundiert dann aber in das Zellinnere. Beim Durchsaugen der Zellmembran gelangen Membranbestandteile in den Mündungsbereich der Pipette, was zu einer Erhöhung des Serienwiderstandes führt. Der Serienwiderstand entspricht also nicht unbedingt dem Pipettenwiderstand, was unter anderem Einfluss auf die benötigte Zeitdauer hat, in der die angelegte Spannung tatsächlich an der Zelle vorliegt. Ein möglichst geringer Serienwiderstand lässt eine kurze Zeitdauer der Membranumladung zu. Sämtliche Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der *whole-cell* Konfiguration durchgeführt.

Bei entsprechenden Eingangswiderständen des Verstärkers können mit der *patch-clamp* Technik Ströme im pA-Bereich aufgelöst werden. Außerdem wird durch einen zunehmenden Abdichtwiderstand die Amplitude des Hintergrundrauschens geringer und die Signalqualität verbessert (Hamill *et al.*, 1981).

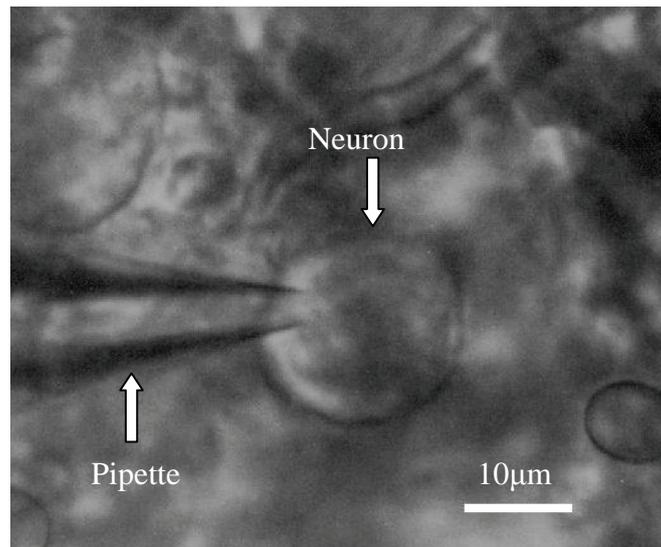


Abbildung 4 Sensorisches Neuron mit Pipette während eines *patch-clamp* Versuchs

2.5 Versuchsstand

Der *patch-clamp* Messstand befindet sich innerhalb eines Metallgehäuses, welches als Faradayscher Käfig dient. Bei dem verwendeten Mikroskop (Axioskop FS, Zeiss, BRD) ist es möglich, zwischen einem Objektiv mit 4-facher Vergrößerung und einem Objektiv mit 40-facher Vergrößerung zu wählen. Zusätzlich wird eine 10-fache Vergrößerung durch das Okular erreicht. Der kleinere Vergrößerungsfaktor wird verwendet, um sich einen Überblick über das Schnittpräparat zu verschaffen, der größere, um die Pipette der Zelle anzunähern. Ein schwingungsgedämpftes Tischgestell (T250, Physik Instruments, BRD) dient als Unterlage für das Mikroskop. Die Zellen können während der Messungen auf einem Monitor (WV-5410N, Panasonic, Japan) betrachtet werden, die Übertragung erfolgt über eine Videokamera (WV-BP500, Panasonic, BRD). Auf diesem Monitor wird die Größe der Zellen gemessen und aufgrund dieser Maße mittels geeigneter Skalierung die tatsächliche Größe der Zelle bestimmt.

Die Experimentierkammer (siehe Abbildung 5) ist aus einer 4 mm dicken Delrin®-Scheibe gefertigt, die darin enthaltenen zwei Kammern sind mit einem Durchmesser von 2 cm

hineingefräst. Delrin® als hydrophobes Oberflächenmaterial soll die Ausbildung eines Wasserfilms an der Oberfläche des Pipettenhalters vermeiden. Die verwendeten Kunststoffe sollen aufgrund ihrer recht niedrigen Dielektrizitätskonstante das Rauschen als Störfaktor möglichst gering halten. Die für die *whole-cell* Ableitungen ausschließlich verwendete Hauptkammer hat ein Fassungsvermögen von ca. 1 ml. Mit Hilfe des Perfusionssystems wurde eine Durchflussrate von ca. 1,7 ml/min erreicht. Die von der Hauptkammer durch einen Delrinsteig getrennte Nebenkammer kam im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz.

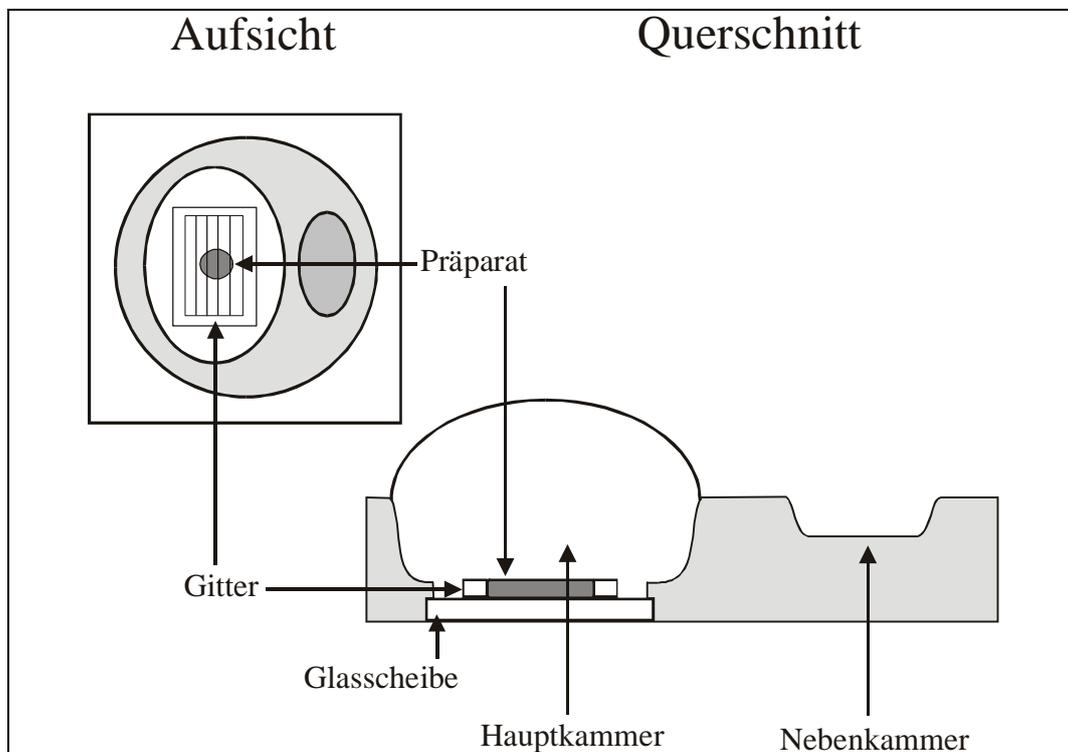


Abbildung 5 Aufbau der Experimentierkammer

Die Hauptkammer mit dem darin befindlichen Schnittpräparat und die Nebenkammer sind in dieser Abbildung sowohl im Querschnitt (großes Bild) als auch in der Aufsicht (kleines Bild) dargestellt. (Modifiziert nach Gruß, 1998).

Das Applikationssystem für die Außenlösungen befindet sich ca. 50 cm oberhalb der Experimentierkammer. Bis zu sechs begasbare Perfusorspritzen mit jeweils 50 ml Fassungsvermögen erlauben eine Lösungszufuhr mit Hilfe des hydrostatischen Drucks. Die Schläuche der Spritzen werden auf ein Verteilersystem (Werkstatt Physiologisches Institut Giessen, BRD) aufgesteckt, über das die jeweils gewünschte Lösung per Drehschalter ausgewählt werden kann. Dieser Verteiler besitzt sechs Eingänge und einen Ausgang. Anschließend wird die Lösung über einen Teflon®-Schlauch mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm und eine an der Spitze gebogene Spritzenkanüle (0,5 mm Innendurchmesser) der Experimentierkammer zugeführt. Das System hat vom Verteilerausgang bis zur Kammer ein Totraumvolumen von 0,27 ml (bei Verwendung eines 15 cm langen Schlauches mit aufgesteckter Spritzenkanüle). Das Absaugen der Lösungen erfolgt ebenfalls über eine gebogene Spritzenkanüle. Der dazu erforderliche Unterdruck wird durch eine Aquariumspumpe (Wisa, BRD) bereitgestellt. Der Schnitt wird mit Hilfe eines mit ca. vier bis fünf Einzelsträngen eines Zahnseidefadens bespannten Platinrahmens am Boden der Experimentierkammer fixiert.

Zur Einstellung des Pipettenhalters, der an der *headstage* befestigt ist, dient ein dreiachsiger Mikromanipulator (ZSS 32-200-1.2, Märzhäuser, BRD), welcher über einen 3-Achsen Joystick gesteuert wird. Dieser ermöglicht eine minimale Schrittweite von 0,1 μm .

Für die Messungen wurden Pipetten aus zwei verschiedenen Glasarten verwendet. Zum einen Pipetten aus Borosilikatglas (GC150F-7,5, Clarc Medical Instruments, England), welche einen Außendurchmesser von 1,5 mm, einen Innendurchmesser von 0,86 mm und eine Länge von 7,5 cm aufweisen. Das in den Pipetten enthaltene Filament begünstigt das Befüllen der Pipetten, da die jeweilige Innenlösung die Pipettenspitze entlang des Filaments leichter erreicht. Das Borosilikatglas stellt eine Kompromisslösung zwischen harten Gläsern mit optimalen elektrischen Eigenschaften und weichen Gläsern mit günstigeren Verarbeitungseigenschaften dar. Bei einem Teil der Experimente wurden aufgrund der

einfacheren und gleichmäßigeren Herstellung der Pipetten mit großem Spitzendurchmesser, also niedrigem Widerstand, „CEEBEE Precision capillary tubes“ (Typ 101-PS Plain, Chr. Bardran, Dänemark) aus weichem Hämatokritglas vorgezogen.

Um mögliche Verunreinigungen entfernen zu können, werden die Pipetten mit Methanol und Aceton abgerieben. Die Fertigstellung der Pipetten erfolgt mit Hilfe eines Horizontal-Ziehgerätes (Modell P97, Instrument Co., Sutter, USA). Um die Ausbildung eines hochohmigen *giga-seals* zu ermöglichen, werden die Pipetten unmittelbar vor Beginn eines Experiments mit Hilfe einer *Mikroforge* feuerpoliert (Hamill *et al.*, 1981). Dadurch wird sowohl eine Glättung der Oberfläche und eine Beseitigung von Oberflächenverunreinigungen als auch eine weitere Verkleinerung der Pipettenspitze und damit eine Erhöhung des Pipettenwiderstandes erreicht.

Die gefilterte (0,2 µm Filter, Renner, BRD) Pipettenlösung wird mit Hilfe von 2 ml-Spritzen in die Pipette gefüllt. Als Pipetten- und auch als Badelektrode werden Silberdrähte (Johnson Matthey GmbH, BRD) mit einem Durchmesser von 0,5 mm verwendet.

Als *patch-clamp* Verstärker diente ein Axopatch 200A (Axon Instruments, USA). Sämtliche Testimpulse, Spannungsänderungen und Stromimpulse werden über einen Computer (Intel, Celeron, 433 MHz) gesteuert und gelangen über den Analog-Digital-Wandler (Digidat 1200, Axon Instruments, USA), den Verstärker und dessen *headstage* (CV201 AU, Axon Instruments, USA) mit dem Operationsverstärker (OPA = *operational amplifier*) zur Pipette.

Der Widerstand der mit einer der Innenlösungen gefüllten Pipette wird nach Eintauchen in die Badlösung mit Hilfe eines rechteckigen Testimpulses vor Ausbildung eines *giga-seals* ermittelt. Liegt die Pipettenmündung in unmittelbarer Nähe der Zellmembran, wird das Potenzial, bei dem zwischen Pipette und Badelektrode kein Strom fließt, am Verstärker als Null adjustiert.

Bei einer *whole-cell* Ableitung treten während Spannungspulsen relativ große störende Stromspitzen abwechselnder Polarität auf, weil die gesamte Fläche der Zellmembran und

damit relativ große Kapazitäten schnell umgeladen werden müssen. Die schaltungsmäßige Auslegung des Verstärkers erlaubt mit Hilfe einstellbarer Bedienungselemente eine Kompensation dieser Störeffekte. Weiterhin lässt sich mit Hilfe dieses Korrekturverfahrens die ungefähre Kapazität der Zellmembran in der *whole-cell* Konfiguration abschätzen, deren Wert mit der Größe der jeweiligen Zelle korreliert.

Außerdem kann die Ableitung durch die Reduktion des Serienwiderstandes optimiert werden, über den ein Teil der Kommandospannung abfällt. Dadurch ergibt sich eine zu geringe Potenzialdifferenz über der Zellmembran, da die Kommandospannung die Zellmembran nicht in voller Höhe erreicht. Deswegen erfolgt eine zusätzliche Strominjektion als Ausgleichsstrom. Die Filterung der Signale erfolgte über das Tiefpassfilter des Axopatch 200B (4-Pol Besselfilter).

2.6 Auswertung und Darstellung

Die während des Experimentes resultierenden Daten werden mit Hilfe eines Analog-Digital-Wandlers digitalisiert und dann auf der Festplatte des Computers gespeichert. Die Registrierung und Auswertung der Daten erfolgt unter anderem mit dem Programm Clampex (Version 8.0, Axon Instruments, USA), mit welchem die Daten graphisch dargestellt und sowohl kapazitive Artefakte als auch Leckströme korrigiert werden können. Dazu werden während der *voltage-clamp* Experimente hyperpolarisierende Impulse ausgelöst, wodurch bei in der Regel fehlender Ionenkanalaktivierung Ströme registriert werden können. Diese Ströme werden gemittelt und man erhält die Nettoströme durch Addition der gemittelten und mit einem Faktor multiplizierten Korrekturströme zu den Originalströmen. Weitere Auswertungen und Berechnungen erfolgten mit Clampfit (Version 6.0 und 8.2, Axon Instruments, USA), Excel (Version 2000, Microsoft Corp., USA), Origin (Version 6.0, Microcal Software Inc., USA), zu graphischen Darstellungen wurde außerdem Corel Draw (Version 6.0, Corel, Kanada) verwendet.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M. (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben.

Alle Angaben auf Veränderungen beziehen sich auf das Kriterium einer Abweichung von mindestens 5% des Ausgangswertes. Für die statistische Auswertung der Experimente wurde, sofern nicht anders erwähnt, der „t-Test“ verwendet.

Die Abbildungen der Auswärtsströme sind normiert dargestellt, das heißt, dass der Kurvenverlauf der Ströme in den verschiedenen Lösungen bzw. Pharmaka in Relation zu der jeweiligen Bezugs-Lösung bei einem Testpotenzial von +40 mV gezeigt ist. Bei den Einwärtsströmen erfolgte die Normierung in analoger Weise auf den Maximalstrom, aber hier war der maximale Strom bei den einzelnen Experimenten bei unterschiedlichen Potenzialen erreicht. Dadurch verläuft die Kurve des Einwärtsstroms in der Bezugs-Lösung bei dem Testpotenzial von 0 mV nicht durch den Punkt „1“ der Ordinate.

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung der Neurone nach Größe und Farbe

Die Zellen wurden anhand ihrer Größe und des an ihnen gemessenen Ruhepotenzials verglichen. Zusätzlich wurde eine Einteilung der Zellen nach ihrer Zytoplasma-, „Färbung“ vorgenommen, bei welcher nach hell, mittel und dunkel unterschieden werden konnte. Die Summe der Zellen, bei denen die Größe und das Ruhepotenzial angegeben wurde, entspricht nicht der Gesamtzahl aller untersuchten Neurone, weil diese Parameter nicht für alle Zellen erfasst wurden.

Vergleicht man die Neurone mit heller und mittlerer Zellfärbung bezüglich ihres Ruhemembranpotenzials und ihrer Größe, ist kein signifikanter Unterschied festzustellen (jeweils $p > 0,05$). Die Gegenüberstellung der mittleren und dunklen Neurone in Hinblick auf die oben genannten Parameter weist ebenfalls mit jeweils $p > 0,05$ keinen signifikanten Unterschied auf (zur Ermittlung dieser p-Werte wurde der ANOVA-Test herangezogen).

| Zellfärbung | hell | mittel | dunkel |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| E_R (mV) | -55,9 ± 4,8 n = 6 | -57,1 ± 1,8 n = 33 | -52,4 ± 4,1 n = 5 |
| Größe (µm) | 19,8 ± 1,3 n = 6 | 20,2 ± 0,5 n = 78 | 17,9 ± 1,6 n = 6 |

Tabelle 1 Größe und Ruhepotenzial der Zellen

3.2 Einteilung der Neurone in „Gruppe A“ und „B“

Aufgrund der langsamen Kinetik und der Irreversibilität der durch Ethanol verursachten Effekte bei den Neuronen der „Gruppe B“ in der vorangegangenen Arbeit von Gruß *et al.* (2001) lag die Vermutung nahe, dass diese im Zusammenhang mit *second-messenger* Systemen stehen könnte. Ein solcher indirekter Effekt wäre die Beeinflussung der PKC durch Ethanol, dessen Ablauf der Signalkaskade unter Kapitel 1.5 beschrieben ist. Um Phosphorylierungen innerhalb der Signalkaskade eines *second-messenger* Systems in Verbindung mit der PKC zu ermöglichen, wurde eine phosphathaltige Innenlösung verwendet. Zu Beginn der Untersuchungen galt es, die zuvor beobachteten Effekte von Ethanol auf die AP-Dauer der kleinen DRG-Neurone (Gruß *et al.*, 2001) unter Verwendung der High_{Ki} ATP Innenlösung zu verifizieren.

Die Einteilung der Subpopulationen „Gruppe A“ und „B“ erfolgte aufgrund der Modulation der AP-Dauer nach Ethanolgabe im Vergleich zur Ca²⁺-freien Standard-Lösung.

Die Neurone der „Gruppe A“ zeigen eine signifikante Verkürzung der AP-Dauer von $5,53 \pm 0,60$ ms in der Ca²⁺-freien Standard-Lösung auf eine AP-Dauer von $4,34 \pm 0,25$ ms nach Ethanolapplikation ($p = 0,013$; $n = 9$). Im Auswasch betrug die AP-Dauer $5,02 \pm 0,64$ ms ($p > 0,05$; $n = 8$; Abbildung 6C).

Bei den in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersuchten Neuronen der „Gruppe B“ ließ sich eine AP-Dauer von $4,15 \pm 0,45$ ms in der Ca²⁺-freien Standard-Lösung messen, die sich nach Zugabe von Ethanol auf $5,10 \pm 0,64$ ms verlängerte ($p = 0,02$; $n = 10$). Ein Anstieg der AP-Dauer auf $6,46 \pm 1,15$ ms war im Auswasch zu verzeichnen ($p > 0,05$; $n = 6$; Abbildung 6D).

Die Neurone der „Gruppe A“ zeigten unter Kontrollbedingungen in der Ca²⁺-freien Standard-Lösung tendenziell eine längere AP-Dauer, wobei aber beim Vergleich der beiden Gruppen die mittlere AP-Dauer nicht signifikant voneinander abweicht ($p > 0,05$). Weiterhin gab es eine Gruppe von Neuronen, bei der von der Ca²⁺-freien Standard-Lösung ausgehend durch die

Ethanolapplikation keine Veränderung bzw. Änderung <5% der AP-Dauer zu erzielen war ($5,81 \pm 0,63$ ms in Ca^{2+} -freier Standard-Lösung, $5,87 \pm 0,62$ ms in Ethanol; $p > 0,05$; $n = 6$).

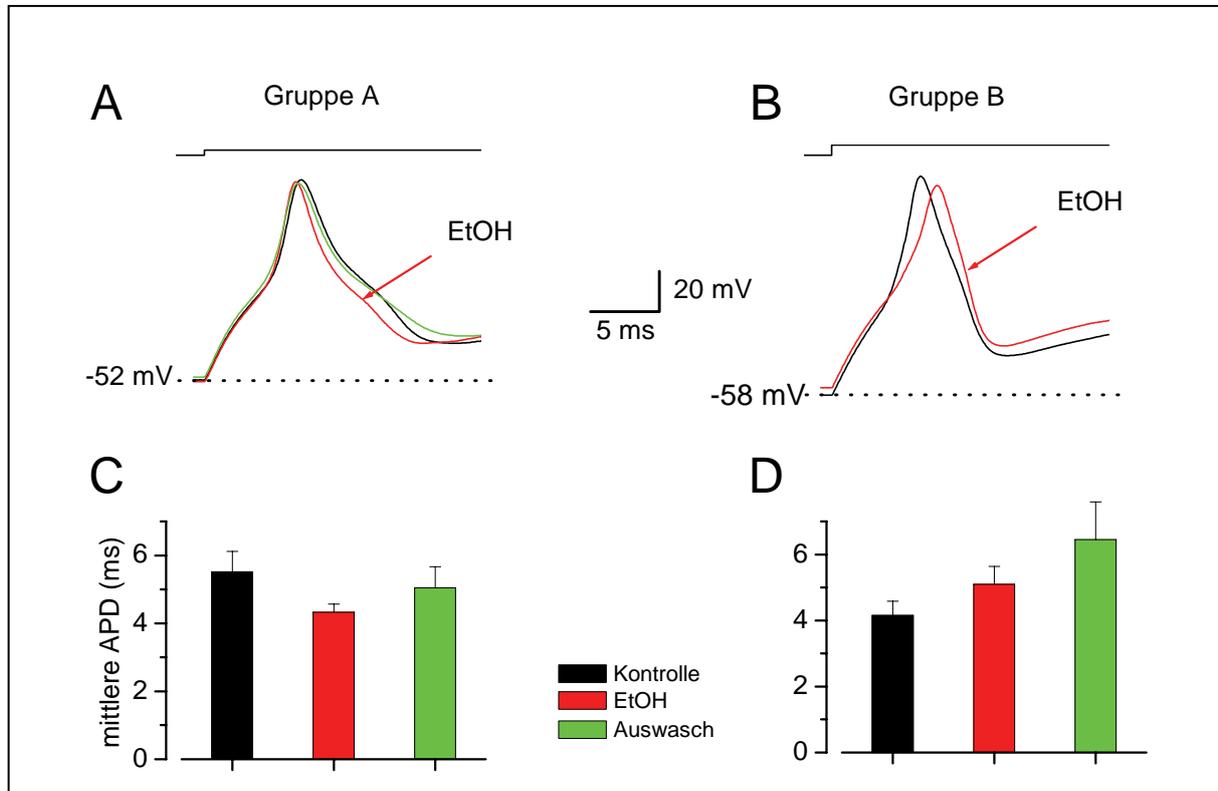


Abbildung 6 Beeinflussung der AP-Dauer durch Ethanol

(A) und (B) Originalregistrierungen im *current-clamp* Modus (A) Ethanol (40 mM) verkürzte die AP-Dauer im Vergleich zu der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung reversibel. (B) „Gruppe B“ Neuron, bei dem Ethanol eine Verlängerung der AP-Dauer bewirkte. Das vor Beginn des Stromimpulses gemessene Ruhepotenzial ist durch die gepunktete Linie markiert. In (C) und (D) ist die durch Ethanol induzierte Modifikation der AP-Dauer in „Gruppe A“ ($n = 9$) bzw. in „Gruppe B“ ($n = 10$) dargestellt. Außenlösung Ca^{2+} -freie Standard-Lösung, Innenlösung High $_{\text{K}_i}$ ATP.

3.3 Veränderungen der Auswärtsströme nach Ethanolapplikation

Die Einteilung der untersuchten Neurone ist, wie bereits unter 3.2 beschrieben, anhand der Veränderung der AP-Dauer nach Ethanolapplikation erfolgt.

In der Abbildung 7C und D sind die Strom-Spannungskurven der Auswärtsströme von Neuronen der „Gruppe A“ (n=6) bzw. „B“ (n=10) dargestellt. Diese wurden 100 ms nach Beginn des Spannungssprungs gemessen (*steady state*).

Die Messung und Darstellung der maximalen Auswärtsströme erfolgte, um eine mögliche Beteiligung inaktivierender Ströme registrieren zu können (Abbildung 7E und F). Sämtliche Daten sind auf die Messwerte der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung bei einem Testpotenzial von +40 mV normiert, auf das sich auch alle Zahlenangaben beziehen.

Die „Gruppe A“ Neurone zeigten hierbei einen Anstieg der Auswärtsströme von $1,0 \pm 0$ (per definitionem, s.o.) in Ca^{2+} -freier Standard-Lösung auf $1,28 \pm 0,08$ ($p = 0,021$; $n = 6$) nach Applikation von Ethanol. Dieser Anstieg war im Auswasch tendenziell reversibel ($1,17 \pm 0,11$; $p > 0,05$; $n = 6$; Abbildung 7C, *steady state*).

Der Verlauf des Maximalstroms der „Gruppe A“ Neurone veränderte sich ausgehend von der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung bei $1,0 \pm 0$ auf $1,18 \pm 0,12$ in Ethanol ($p > 0,05$; $n = 6$). Die Messung des Maximalstroms im Auswasch zeigte mit $1,07 \pm 0,12$ rückläufige Werte ($p > 0,05$; $n = 6$; Abbildung 7E).

Bei den Neuronen der „Gruppe B“ lagen die Auswärtsströme bei $1,0 \pm 0$ in Ca^{2+} -freier Standard-Lösung. Im Vergleich dazu wurde sowohl nach der Applikation von Ethanol ($0,77 \pm 0,07$; $p = 0,01$; $n = 10$) als auch im Auswasch mit $0,58 \pm 0,13$ ($p = 0,07$; $n = 5$) eine fortlaufende Reduktion der Ströme registriert (Abbildung 7D, *steady state*).

Der Maximalstrom der Neurone der „Gruppe B“ zeigte von der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung ($1,0 \pm 0$) ausgehend in Ethanol ($0,74 \pm 0,08$; $p = 0,01$; $n = 10$) und im Auswasch ($0,55 \pm 0,12$; $p = 0,06$; $n = 5$) ebenfalls eine Reduktion (Abbildung 7F).

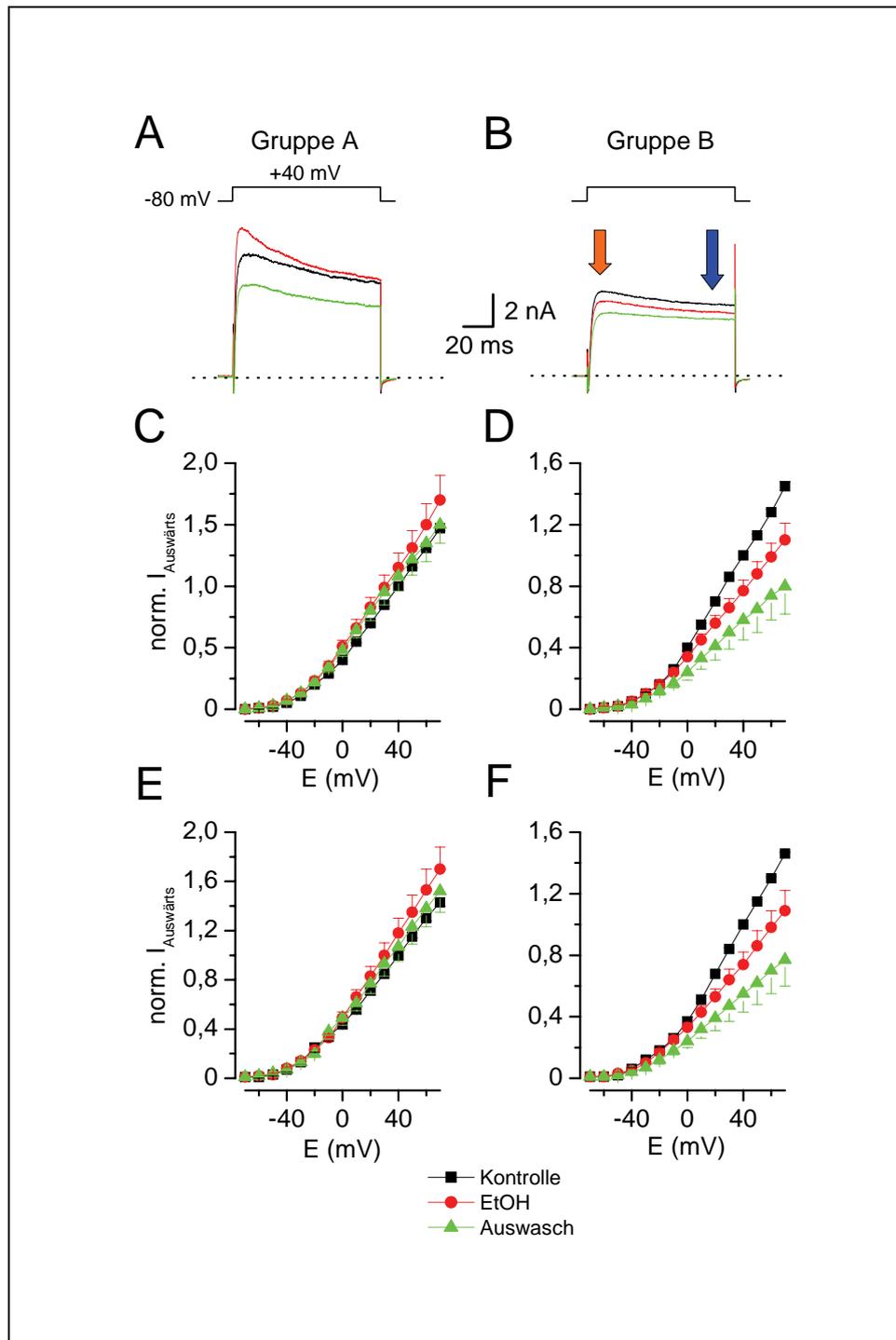


Abbildung 7 Reaktionen der Auswärtsströme nach Ethanolapplikation

(A, B) Originalregistrierungen, die Pfeile zeigen die Messpunkte des Maximalstroms (siehe auch E,F; orange) bzw. *steady state* (siehe auch C,D; blau). (C, E) Normierte Strom-Spannungskurven von „Gruppe A“ (D, F) und „Gruppe B“ Neuronen. Außenlösung Ca^{2+} -freie Standard-Lösung, Innenlösung High $_{\text{K}_i}$ ATP.

In der Tabelle 2 und 3 sind die während der Experimente ermittelten Messwerte enthalten, die als Basis für die spätere Normierung dienen.

| Lösung | mittlerer Strom <i>steady state</i> | mittlerer Strom maximal | n |
|---|--|--------------------------------|----------|
| Ca ²⁺ -freie Standard-Lösung | 3,56 nA ± 0,54 | 4,37 nA ± 0,74 | 6 |
| Ethanol | 4,01 nA ± 0,60 | 5,18 nA ± 1,01 | 6 |
| Auswasch | 3,69 nA ± 0,41 | 4,49 nA ± 0,55 | 6 |

Tabelle 2 Auswärtsströme der Neuronen der „Gruppe A“

| Lösung | mittlerer Strom <i>steady state</i> | mittlerer Strom maximal | n |
|---|--|--------------------------------|----------|
| Ca ²⁺ -freie Standard-Lösung | 4,15 nA ± 0,36 | 5,17 nA ± 0,48 | 10 |
| Ethanol | 3,18 nA ± 0,43 | 3,80 nA ± 0,54 | 10 |
| Auswasch | 2,22 nA ± 0,59 | 2,48 nA ± 0,62 | 5 |

Tabelle 3 Auswärtsströme der Neuronen der „Gruppe B“

Die maximalen Auswärtsströme der „Gruppe B“ Neurone sind in der Abbildung 7F zu sehen. In der Abbildung 8 ist zum einen der Kurvenverlauf der relativen Änderung zwischen den maximalen Auswärtsströmen in Ca²⁺-freier Standard-Lösung und nach Applikation von Ethanol zu sehen. Zum anderen ist die relative Änderung zwischen den maximalen Auswärtsströmen in Ca²⁺-freier Standard-Lösung und dem Auswasch aufgetragen. Diese Kurven entsprechen dem jeweils blockierten Anteil der gesamten Auswärtsströme, aus dem die in Abbildung 7F hervorgehende Reduktion dieser Ströme resultiert.

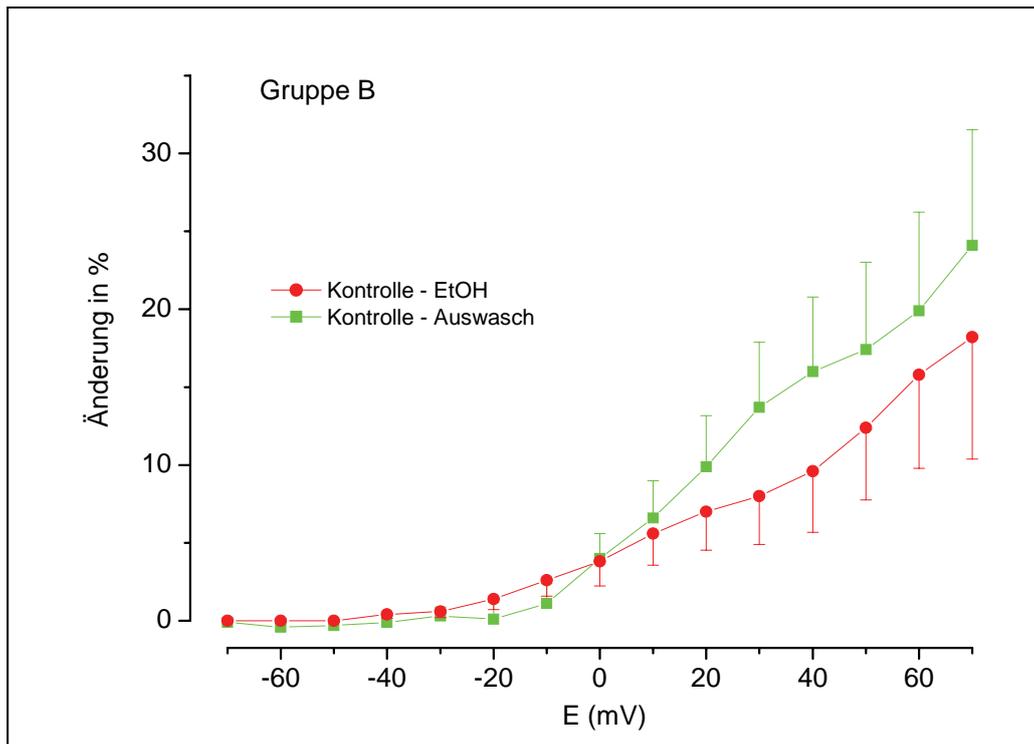


Abbildung 8 Blockade der Auswärtsströme von „Gruppe B“ Neuronen

In dieser Abbildung ist die relative Änderung der maximalen Auswärtsströme dargestellt. Kontrolle-EtOH (rot; $n = 10$), Kontrolle-Auswasch (grün; $n = 5$). Außenlösung Ca^{2+} -freie Standard-Lösung, Innenlösung High_{K_i} ATP.

3.4 Staurosporin als Inhibitor der Proteinkinase C

In Bezug auf das in Kapitel 1.5 beschriebene IP_3 -System, in dessen Signalkaskade die PKC integriert ist, wurde Staurosporin (100 nM) zur Blockade der PKC verwendet. Unter der Annahme, dass die bei den Neuronen der „Gruppe B“ beobachtete Verlängerung der AP-Dauer nach Ethanolapplikation auf der Beeinflussung des oben genannten *second-messenger* Systems basiert, wäre durch Staurosporin eine Verhinderung dieses Effektes zu erwarten.

Die Abbildung 9 zeigt die Effekte von Ethanol nach vorheriger Gabe von Staurosporin auf die Auswärtsströme nach 100 ms (*steady state*).

Der Verlauf des Auswärtsstroms (*steady state*) während des Einwasches von Ethanol nach Präinkubation mit Staurosporin ist in der Abbildung 9A dargestellt. Darunter sind

Originalregistrierungen eines Experiments im *voltage-clamp* Modus zu sehen (Abbildung 9B).

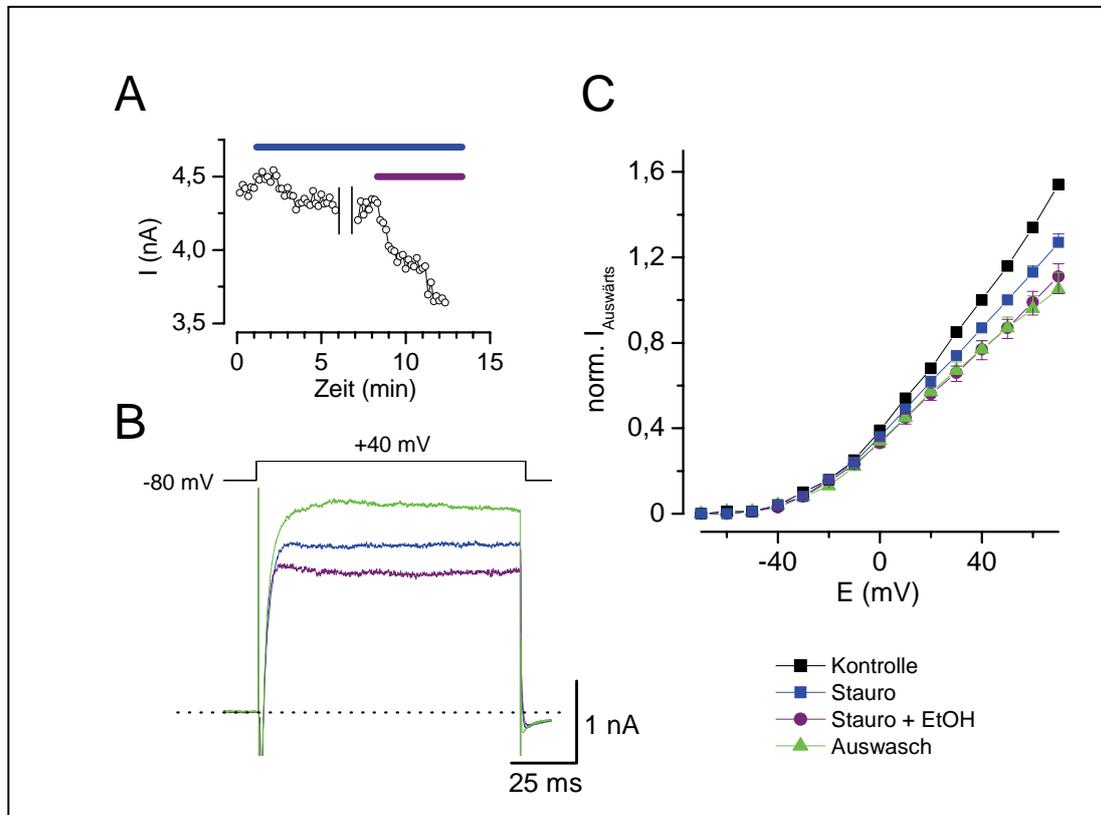


Abbildung 9 Normierte Auswärtsströme nach Staurosporinapplikation

(A) Verlauf der Auswärtsströme nach Applikation von 100 nM Staurosporin (Stauro) und nach gemeinsamer Applikation von Staurosporin und Ethanol. (B) Originalregistrierungen. (C) Strom-Spannungskurve, normiert auf die bei +40 mV gemessenen Werte in Ca^{2+} -freier Standard-Lösung ($n = 10$). Außenlösung Ca^{2+} -freie Standard-Lösung, Innenlösung High $_{\text{K}_i}$ ATP.

Im Vergleich zur Ca^{2+} -freien Standard-Lösung ($1,0 \pm 0$; per definitionem, s.o.) wurde nach Applikation von Staurosporin ein Auswärtsstrom in Höhe von $0,87 \pm 0,04$ gemessen ($p = 0,005$; $n = 10$). Staurosporin konnte eine weitere Reduktion der Auswärtsströme durch

Ethanol auf $0,77 \pm 0,07$ ($p = 0,0009$; $n = 10$) nicht verhindern. Diese blieben im Auswasch unverändert ($0,78 \pm 0,04$; $p = 0,71$; $n = 9$; Abbildung 9C).

In der Tabelle 4 sind die gemittelten Originalmesswerte eingetragen.

| Lösung | mittlerer Strom <i>steady state</i> | n |
|---|--|----------|
| Ca ²⁺ -freie Standard-Lösung | 5,11 nA \pm 0,81 | 10 |
| Staurosporin | 4,36 nA \pm 0,63 | 10 |
| Staurosporin+Ethanol | 3,88 nA \pm 0,65 | 10 |
| Auswasch | 4,19 nA \pm 0,72 | 9 |

Tabelle 4 Auswärtsströme nach Präinkubation mit Staurosporin

Bei fast allen ($n = 10$) der unter diesen Bedingungen untersuchten Neuronen ($n = 11$), dargestellt in der Abbildung 10B, konnte durch Staurosporin eine Verlängerung der AP-Dauer durch Ethanol unterbunden werden. In dieser Gruppe betrug die AP-Dauer in der Ca²⁺-freien Standard-Lösung $4,13 \pm 0,21$ ms, nach Präinkubation mit Staurosporin konnte ein tendenzieller Anstieg der AP-Dauer festgestellt werden ($4,46 \pm 0,37$ ms; $p = 0,28$; $n = 10$). Nach Applikation von Ethanol und Staurosporin zusammen zeigte sich eine reversible Verkürzung ($4,0 \pm 0,26$ ms; $p = 0,051$; $n = 10$; Auswasch $4,62 \pm 0,30$ ms; $p = 0,021$; $n = 9$).

Die „Gruppen A“ und „B“ sind aufgrund der Präinkubation mit Staurosporin nicht zu differenzieren.

Nur in einer Zelle ist die AP-Dauer in Ethanol trotz der vorherigen Gabe von Staurosporin länger geworden. Hierbei betrug die AP-Dauer in der Ca²⁺-freien Standard-Lösung 4,30 ms, nach Applikation von Staurosporin 5,35 ms, ein weiterer Anstieg der AP-Dauer auf 5,65 ms konnte in Ethanol gemessen werden.

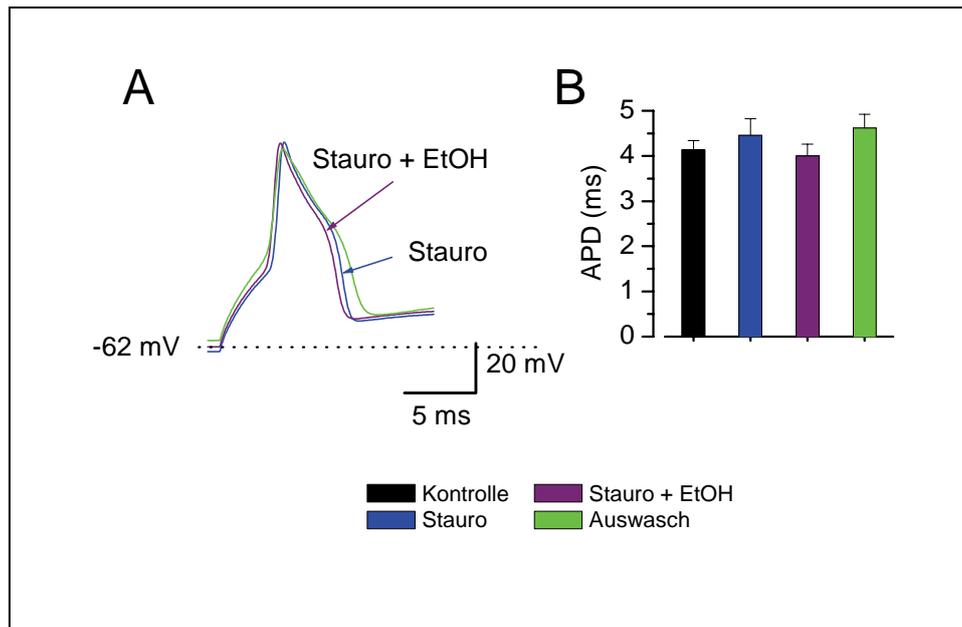


Abbildung 10 Staurosporin kann eine Verlängerung der AP-Dauer durch Ethanol verhindern

(A) Originalregistrierungen eines APs in 40 mM Ethanol nach Präinkubation mit 100 nM Staurosporin. (B) Durchschnittliche AP-Dauer der untersuchten Neurone ($n = 10$). Außenlösung Ca^{2+} -freie Standard-Lösung, Innenlösung High $_{\text{K}_i}$ ATP.

3.5 Ethanoleffekte auf spannungsabhängige Kaliumströme

Um speziell die spannungsabhängigen K^+ -Ströme messen zu können, wurden sowohl die Ca^{2+} -Ströme selbst als auch die Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Ströme durch Verwendung von Kaliumfluorid (KF) als Ca^{2+} -Chelator in der Innenlösung minimiert. Na^+ -Ströme wurden mittels Cholinchlorid unterbunden, welches an der Stelle von Na^+ Ionen Bestandteil der Außenlösung war und damit Na^+ -Ionen nicht mehr als Ladungsträger zur Verfügung standen (Hodgkin & Katz, 1949). Deshalb war bei diesen Experimenten aufgrund fehlender Na^+ -Ströme das Auslösen eines APs nicht möglich, so dass hier ausschließlich der *voltage-clamp* Modus angewendet werden konnte.

Die erhöhte K^+ -Konzentration lag bei 31,6 mM, woraus sich bei unveränderter Innenlösung nach der Nernstschen Gleichung eine Verschiebung des Umkehrpotenzials für K^+ -Ströme von -82,7 mV (Ca^{2+} -freie Standard-Lösung, High K_i ATP) zu -37,8 mV (Cholinchlorid-Lösung, KF) ergab.

Bei der einen Hälfte der Neuronen (Abbildung 11B) bewirkte die Zugabe von Ethanol einen reversiblen Anstieg der spannungsabhängigen K^+ -Ströme auf $1,21 \pm 0,05$ nA ($p = 0,026$; $n = 4$; Auswasch $1,05 \pm 0,07$; $p = 0,003$; $n = 4$).

Diese Gruppe von Zellen wurde in Anlehnung an die zuvor festgelegte Einteilung in die Gruppen und der damit im Zusammenhang stehenden Modulation der Ströme als „Gruppe A“ bezeichnet. An dieser Stelle ist eine Charakterisierung im ursprünglichen Sinne nicht möglich, da die Generierung von APs aufgrund der Verwendung von Cholinchlorid und KF ausgeschlossen ist.

Die zweite Hälfte der Neuronen entspricht der „Gruppe B“ (Abbildung 11D). Hier konnte nach der Gabe von Ethanol eine tendenzielle Reduktion der Ströme ($0,77 \pm 0,09$; $p > 0,05$; $n = 4$) im Vergleich zu der Cholinchlorid-Lösung beobachtet werden. Diese Veränderung war im Auswasch irreversibel bzw. setzte sich weiter in Richtung einer Reduktion fort ($0,69 \pm 0,10$; $p = 0,01$; $n = 4$).

Bei beiden Gruppen sind die spannungsabhängigen K^+ -Ströme auf die Cholinchlorid-Lösung bei +40 mV normiert. In der Tabelle 5 und 6 sind die während der Experimente registrierten Stromwerte dargestellt.

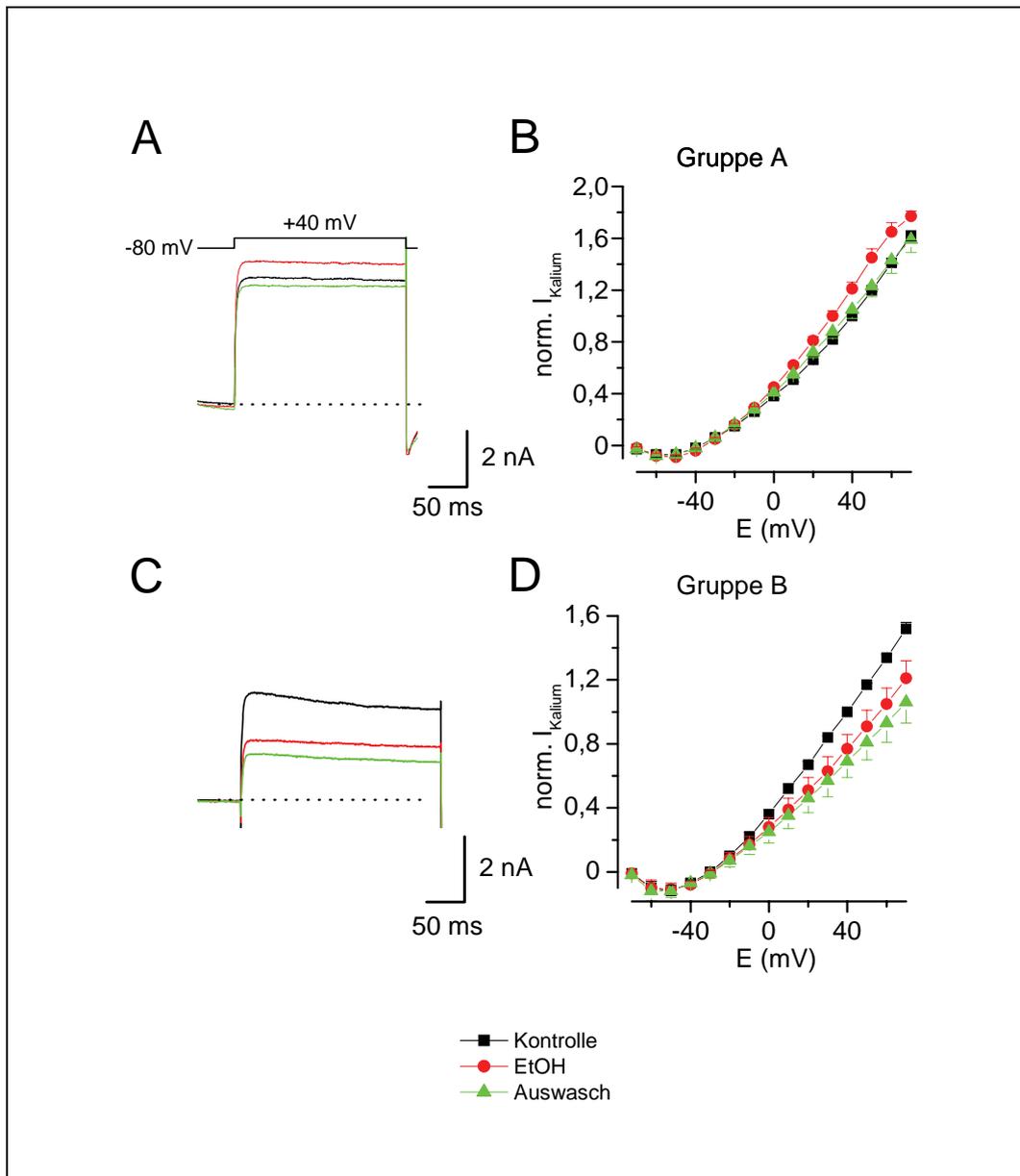


Abbildung 11 Spannungsabhängige K⁺-Ströme

(A) Reversibler Anstieg der spannungsabhängigen K⁺-Ströme eines „Gruppe A“ Neurons. (B) Strom-Spannungskurve der „Gruppe A“ Neurone (*steady state*; n = 4). (C) Irreversible Reduktion in 40 mM Ethanol, „Gruppe B“ Neuron. (D) Strom-Spannungskurve der „Gruppe B“ Neurone (*steady state*; n = 4). Außenlösung Cholinchlorid-Lösung, Innenlösung KF.

| Lösung | mittlerer Strom <i>steady state</i> | n |
|----------------------|-------------------------------------|---|
| Cholinchlorid-Lösung | 4,10 nA ± 0,55 | 4 |
| Ethanol | 5,02 nA ± 0,84 | 4 |
| Auswasch | 4,41 nA ± 0,83 | 4 |

Tabelle 5 Spannungsabhängige K⁺-Ströme der Neurone der „Gruppe A“

| Lösung | mittlerer Strom (nA) <i>steady state</i> | n |
|----------------------|--|---|
| Cholinchlorid-Lösung | 2,77 nA ± 0,27 | 4 |
| Ethanol | 2,15 nA ± 0,33 | 4 |
| Auswasch | 1,93 nA ± 0,34 | 4 |

Tabelle 6 Spannungsabhängige K⁺-Ströme der Neurone der „Gruppe B“

3.6 Staurosporin und spannungsabhängige Kaliumströme

Bei der Untersuchung der spannungsabhängigen K⁺-Ströme unter dem Einfluss von Staurosporin ergaben sich verschiedene Resultate: bei sechs Neuronen wurde ein Anstieg der spannungsabhängigen K⁺-Ströme gemessen, bei drei Neuronen eine Reduktion derselben und bei zwei Zellen blieben die spannungsabhängigen K⁺-Ströme unverändert.

Bei sechs der untersuchten Neuronen wurden nach Präinkubation mit Staurosporin spannungsabhängige K⁺-Ströme in Höhe von $0,81 \pm 0,08$ gemessen ($p = 0,06$ $n = 6$). Nach Zugabe von Ethanol und Staurosporin war ein Anstieg der Ströme auf $1,06 \pm 0,12$ zu verzeichnen ($p = 0,03$; $n = 6$), welche im Auswasch nahezu unverändert waren ($1,10 \pm 0,13$; $p = 0,5$; $n = 6$; Abbildung 12B).

Die während der elektrophysiologischen Untersuchungen erhobenen Messwerte sind in der Tabelle 7 zu sehen.

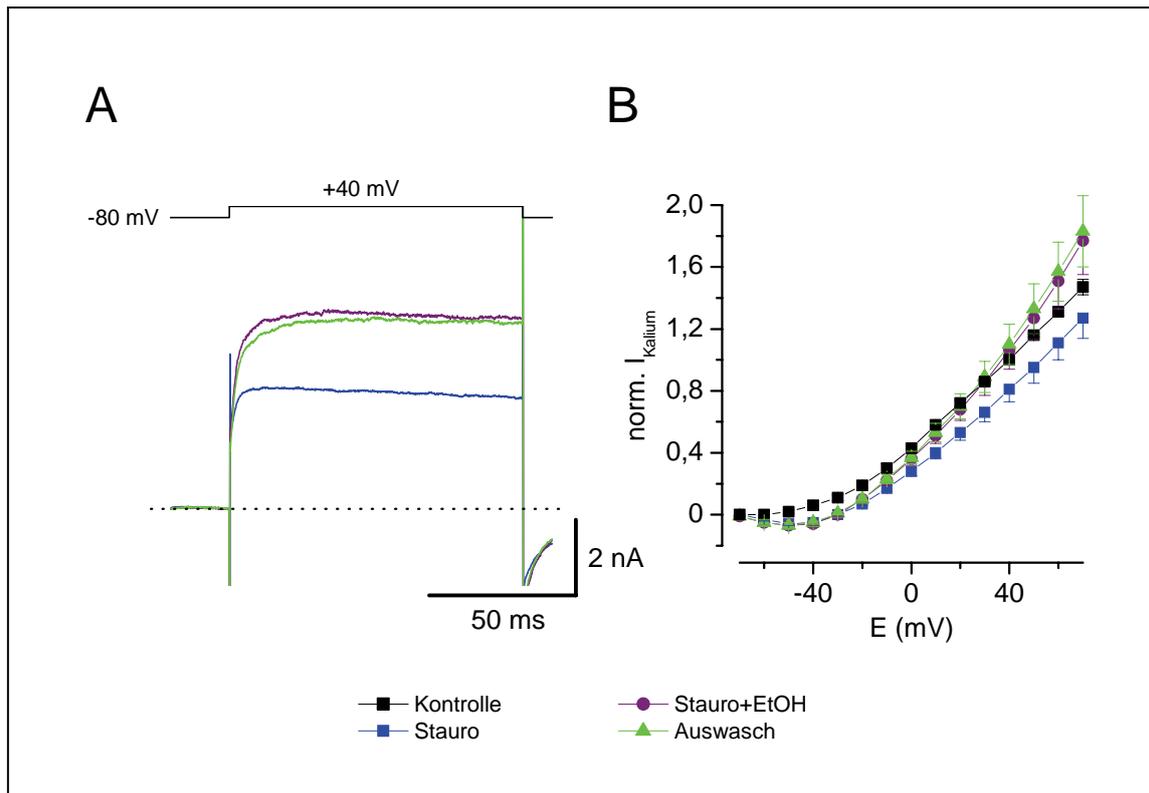


Abbildung 12 Anstieg der spannungsabhängigen K^+ -Ströme

(A) Originalregistrierungen eines Neurons in 100 nM Staurosporin und nach Zugabe von 40 mM Ethanol. (B) Auf die in Cholinchlorid-Lösung bei +40 mV gemessenen Werte normierte Strom-Spannungskurve, (*steady state*; $n = 6$). Außenlösung Cholinchlorid-Lösung, Innenlösung KF.

| Lösung | mittlerer Strom <i>steady state</i> | n |
|----------------------|-------------------------------------|---|
| Cholinchlorid-Lösung | 3,98 nA ± 0,59 | 6 |
| Staurosporin | 3,18 nA ± 0,52 | 6 |
| Staurosporin+Ethanol | 4,05 nA ± 0,52 | 6 |
| Auswasch | 4,25 nA ± 0,61 | 6 |

Tabelle 7 Anstieg der spannungsabhängigen K^+ -Ströme, die nach Präinkubation mit Staurosporin in Ethanol erhöht waren

In der Abbildung 13B sind die spannungsabhängigen K^+ -Ströme der drei Zellen dargestellt, bei denen Ethanol nach Präinkubation mit Staurosporin eine Reduktion hervorgerufen hat. Die Zugabe von Staurosporin bewirkte im Vergleich zur Cholinchlorid-Lösung eine Reduktion der spannungsabhängigen K^+ -Ströme zu $0,77 \pm 0,08$ ($n = 3$), durch die Applikation von Ethanol und Staurosporin zusammen ergab sich eine weitere Reduktion zu $0,66 \pm 0,09$ ($n = 3$). Im Auswasch zeigte sich ein Strom von $0,56 \pm 0,11$ ($n = 2$).

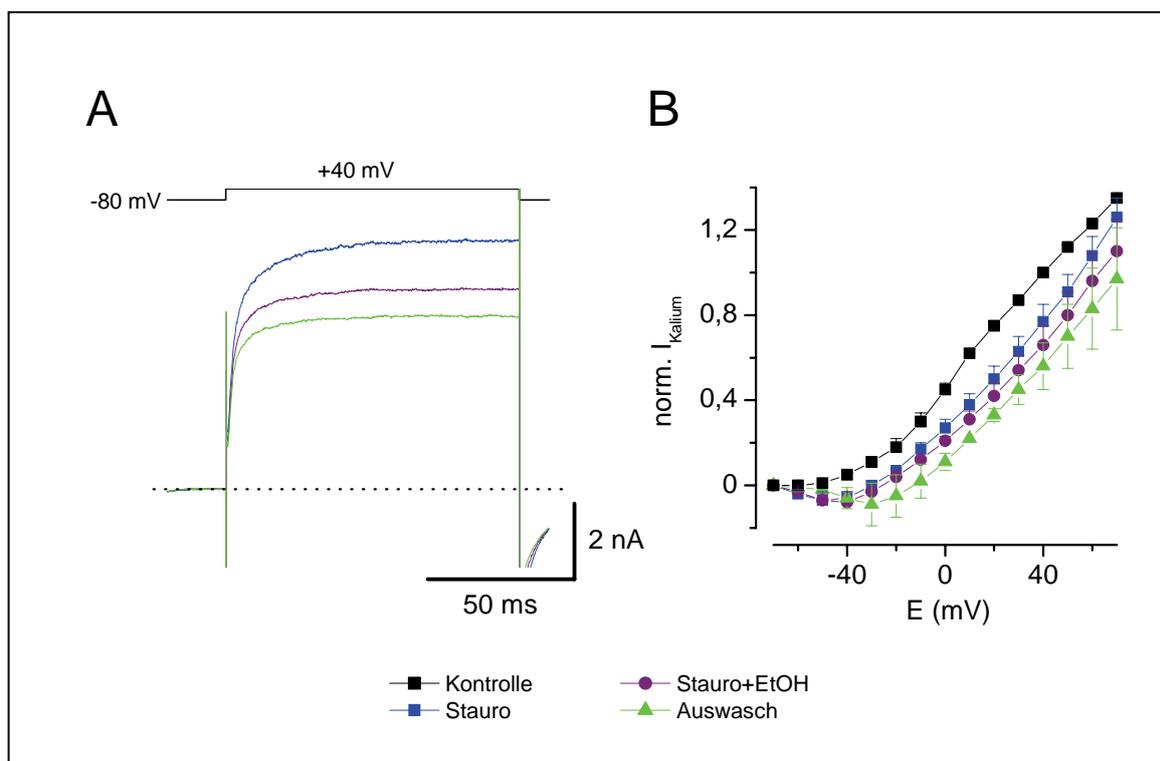


Abbildung 13 Reduktion der spannungsabhängigen K^+ -Ströme

(A) Originalregistrierungen nach Präinkubation mit 100 nM Staurosporin, 40 mM Ethanol bewirkte eine Reduktion. (B) Auf die in Cholinchlorid-Lösung bei +40 mV gemessenen Werte normierte Strom-Spannungskurve ($n = 3$). Außenlösung Cholinchlorid-Lösung, Innenlösung KF.

Bei zwei Experimenten resultierte aus der Applikation von Ethanol keine Veränderung der spannungsabhängigen K^+ -Ströme. Die gemittelten Messwerte sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

| Lösung | mittlerer Strom <i>steady state</i> | n |
|----------------------|--|----------|
| Cholinchlorid-Lösung | 5,65 nA \pm 2,25 | 3 |
| Staurosporin | 4,12 nA \pm 1,34 | 3 |
| Staurosporin+Ethanol | 3,48 nA \pm 1,02 | 3 |
| Auswasch | 3,63 nA \pm 0,96 | 2 |

Tabelle 8 Spannungsabhängige K^+ -Ströme nach Präinkubation mit Staurosporin, bei denen eine Reduktion der Ströme in Ethanol vorlag

| Lösung | mittlerer Strom <i>steady state</i> | n |
|----------------------|--|----------|
| Cholinchlorid-Lösung | 3,20 nA \pm 0,04 | 2 |
| Staurosporin | 3,13 nA \pm 1,43 | 2 |
| Staurosporin+Ethanol | 3,17 nA \pm 1,46 | 2 |
| Auswasch | 3,11 nA \pm 1,52 | 2 |

Tabelle 9 Spannungsabhängige K^+ -Ströme nach Präinkubation mit Staurosporin, bei denen durch Ethanol keine Veränderung hervorgerufen wurde

3.7 PMA und spannungsabhängige Kaliumströme

Um einen Vergleich der Messergebnisse nach Applikation des oben verwendeten Staurosporin als Inhibitor der PKC mit denen eines Aktivators der PKC ziehen zu können, wurde Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA; Nidel *et al.*, 1983) in einer Konzentration von 500 nM für die folgenden Untersuchungen der spannungsabhängigen K^+ -Ströme ausgewählt. Es würde für eine PKC-vermittelte Reduktion der spannungsabhängigen K^+ -Ströme sprechen,

wenn analog zum Ethanoleffekt bei einem Teil der Neuronen durch PMA eine Reduktion der Ströme festzustellen wäre.

Bei einem Teil dieser Neurone wurde untersucht, ob die alleinige Applikation von PMA eine Wirkung auf die Auswärtsströme hat. Bei einem weiteren Teil der Neurone wurde PMA und Ethanol gemeinsam appliziert, um den Ethanoleffekt nach Präinkubation von PMA messen zu können. Deshalb wurden in der Auswertung nur in der Cholinchlorid-Lösung und in PMA Neurone beider Gruppen einbezogen.

Ausgehend von der Cholinchlorid-Lösung wurden bei einem Testpotenzial von +40 mV nach der Zugabe von PMA spannungsabhängige Kaliumströme in Höhe von $0,67 \pm 0,07$ ($p = 0,004$; $n = 6$) gemessen, die gemeinsame Applikation von PMA und Ethanol bewirkte eine Reduktion auf $0,57 \pm 0,06$ ($p = 0,004$; $n = 5$). Im Auswasch lagen die Ströme bei $0,46 \pm 0,09$ ($p > 0,05$; $n = 5$; Abbildung 14).

Die Messwerte der drei Neurone, deren Stromamplitude nach Applikation PMA erhöht war, sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Die während der Experimente erhobenen Daten zweier durch PMA nicht beeinflusster Zellen sind in der Tabelle 12 aufgeführt.

| Lösung | mittlerer Strom <i>steady state</i> | n |
|----------------------|--|----------|
| Cholinchlorid-Lösung | $6,75 \text{ nA} \pm 1,23$ | 6 |
| PMA | $4,67 \text{ nA} \pm 1,18$ | 6 |
| PMA+Ethanol | $3,87 \text{ nA} \pm 1,08$ | 5 |
| Auswasch | $3,13 \text{ nA} \pm 1,19$ | 5 |

Tabelle 10 Spannungsabhängige K^+ -Ströme mit reduzierter Stromamplitude nach Applikation von PMA

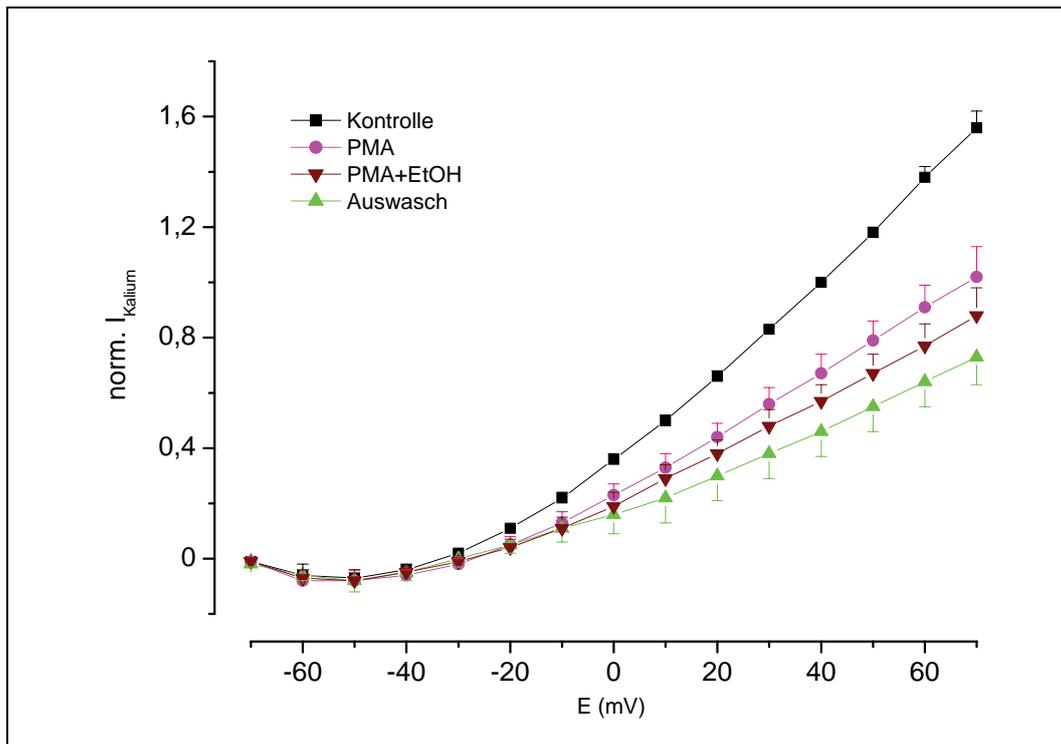


Abbildung 14 Spannungsabhängige K^+ -Ströme und Applikation von PMA

Strom-Spannungskurve der spannungsabhängigen K^+ -Ströme unter dem Einfluss von PMA, *steady state* ($n = 6$). Die Normierung erfolgte auf die Werte in der Cholinchlorid-Lösung bei +40 mV, Innenlösung KF.

| Lösung | mittlerer Strom <i>steady state</i> | n |
|----------------------|-------------------------------------|---|
| Cholinchlorid-Lösung | 4,79 nA \pm 1,89 | 3 |
| PMA | 7,48 nA \pm 1,34 | 3 |
| PMA+Ethanol | 7,54 nA | 1 |
| Auswasch | 5,67 nA | 1 |

Tabelle 11 Spannungsabhängige K^+ -Ströme mit erhöhter Stromamplitude nach Applikation von PMA

| Lösung | mittlerer Strom <i>steady state</i> | n |
|----------------------|-------------------------------------|---|
| Cholinchlorid-Lösung | 3,49 nA \pm 0,09 | 2 |
| PMA | 3,47 nA \pm 0,05 | 2 |
| PMA+Ethanol | 3,18 nA | 1 |
| Auswasch | 3,04 nA | 1 |

Tabelle 12 Spannungsabhängige K⁺-Ströme, bei denen PMA keine Wirkung zeigte

3.8 Veränderungen der Einwärtsströme durch Ethanol

Die Neurone der „Gruppe B“ wurden aufgrund ihrer Verlängerung der AP-Dauer nach der Applikation von Ethanol als solche charakterisiert. Wie bereits zuvor beschrieben, ging damit eine partielle Blockade der Auswärtsströme einher.

Obwohl allein aus der Blockade von Auswärtsströmen eine verlängerte AP-Dauer resultieren könnte, sind weitere Mechanismen nicht auszuschließen. Aus diesem Grund sind in der vorliegenden Arbeit auch mögliche Einflüsse von Einwärtsströmen untersucht worden. Die Blockade der Einwärtsströme nach Verabreichung von Ethanol im Vergleich zur Ca²⁺-freien Standard-Lösung (Abbildung 15A) ist als Differenzstrom in der Abbildung 15B dargestellt, der dem durch Ethanol blockierten Anteil der Einwärtsströme entspricht.

In der Ca²⁺-freien Standard-Lösung lag bei den gesamten Einwärtsströmen eine Amplitude von $0,94 \pm 0,04$ vor. Die Zugabe von Ethanol bewirkte eine Reduktion der Ströme auf $0,53 \pm 0,13$ ($p = 0,03$; $n = 5$), im Auswasch wurde anschließend ein Wert von $0,59 \pm 0,10$ ($p > 0,05$; $n = 5$) gemessen. Die Daten beziehen sich auf das Testpotenzial von 0 mV, da bei diesem Potenzial der Einwärtsstrom im Mittel am größten war. Der Maximalwert des gemittelten Kurvenverlaufs der Ca²⁺-freien Standard-Lösung liegt bei dem Testpotenzial von 0 mV nicht bei dem Wert „1,0“ der Ordinate, da die Maximalwerte bei den einzelnen Experimenten bei unterschiedlichen Potenzialen vorlagen. Die gemittelten Messwerte sind in der Tabelle 13 dargestellt.

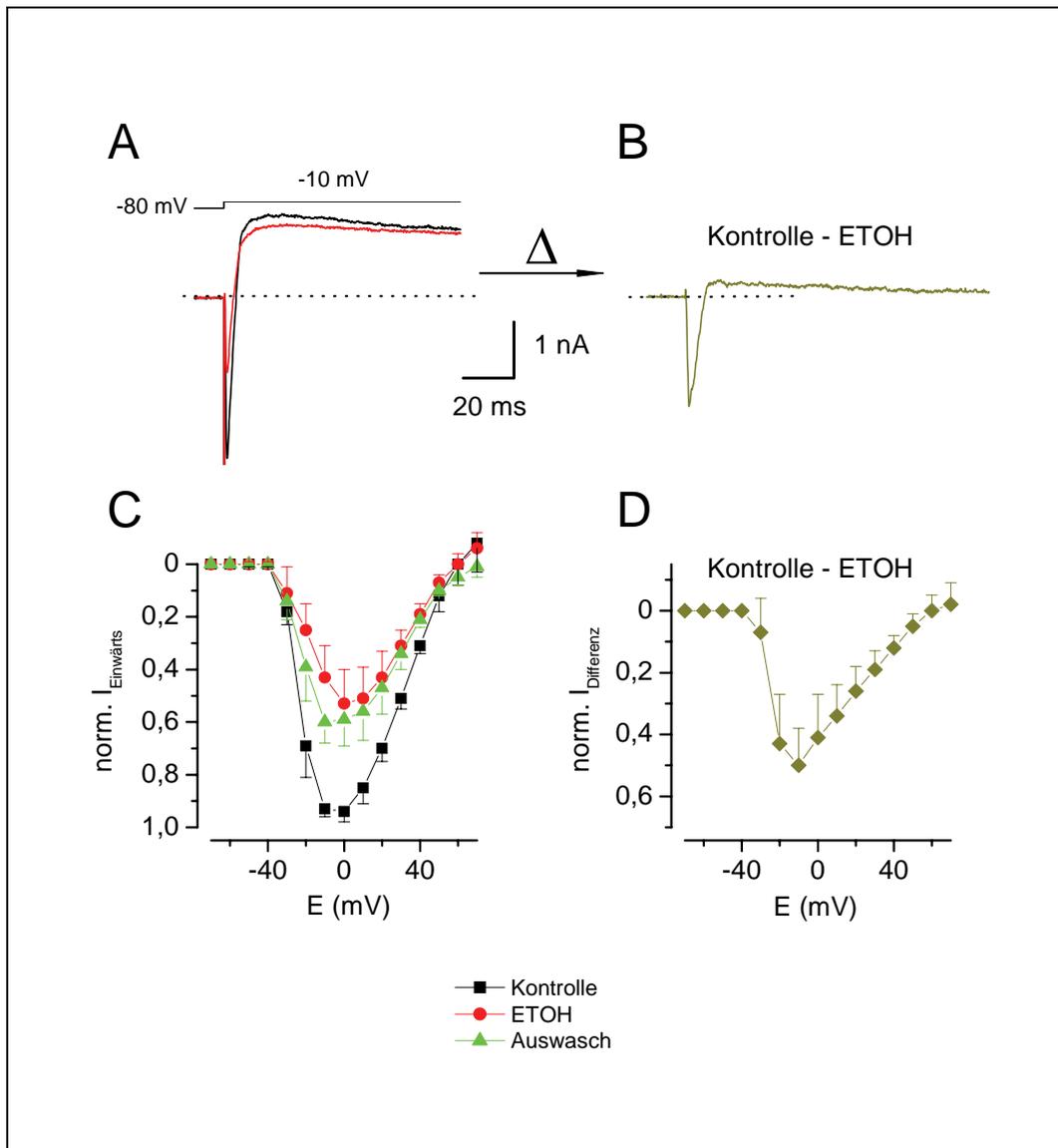


Abbildung 15 Einwärtsströme

(A) Die Originalregistrierungen zeigen die Einwärtsströme eines „Gruppe B“ Neurons, die in 40 mM Ethanol im Vergleich zur Ca^{2+} -freien Standard-Lösung reduziert waren ($E = -10$ mV). In (B) ist der Differenzstrom aus (A) dargestellt. (C) Normierte Einwärtsströme von „Gruppe B“ Neuronen ($n = 5$). (D) Differenzstrom zwischen Kontrolle und Ethanol aus (C). Als Außenlösung wurde Ca^{2+} -freie Standard-Lösung, als Innenlösung High_{K_i} ATP verwendet.

| Lösung | mittlerer Strom | n |
|--|-----------------|---|
| Ca ²⁺ -freie Standard-Lösung | -3,63 nA ± 1,29 | 5 |
| Ethanol | -1,50 nA ± 0,25 | 5 |
| Auswasch | -2,27 nA ± 0,92 | 5 |

Tabelle 13 Einwärtsströme der Neuronen der „Gruppe B“

3.9 Staurosporin und Einwärtsströme

Im weiteren Verlauf der Experimente wurde der Einfluss von Staurosporin auf die Wirkung von Ethanol auf die Einwärtsströme untersucht (Abbildung 16), welche Hinweise über eine mögliche Auswirkung des oben beschriebenen *second-messenger* Systems auf diese Stromkomponenten geben sollten.

Die Einwärtsströme lagen in der Ca²⁺-freien Standard-Lösung bei einem Testpotenzial von 0 mV in Höhe von $0,94 \pm 0,02$ vor, nach der Applikation von Staurosporin bei $0,67 \pm 0,05$ ($p = 0,0003$; $n = 10$). Durch die gemeinsame Zugabe von Staurosporin und Ethanol erfolgte eine Reduktion auf $0,5 \pm 0,06$ ($p = 0,004$; $n = 9$). Im Auswasch konnten die Einwärtsströme bei $0,46 \pm 0,07$ ($p > 0,05$; $n = 9$) verzeichnet werden. Die Normierung erfolgte auf die Maximalwerte in Ca²⁺-freier Standard-Lösung, die jeweils bei unterschiedlichen Potenzialen vorlagen. Die Messwerte der Ströme dieser Neurone sind in der Tabelle 14 aufgeführt.

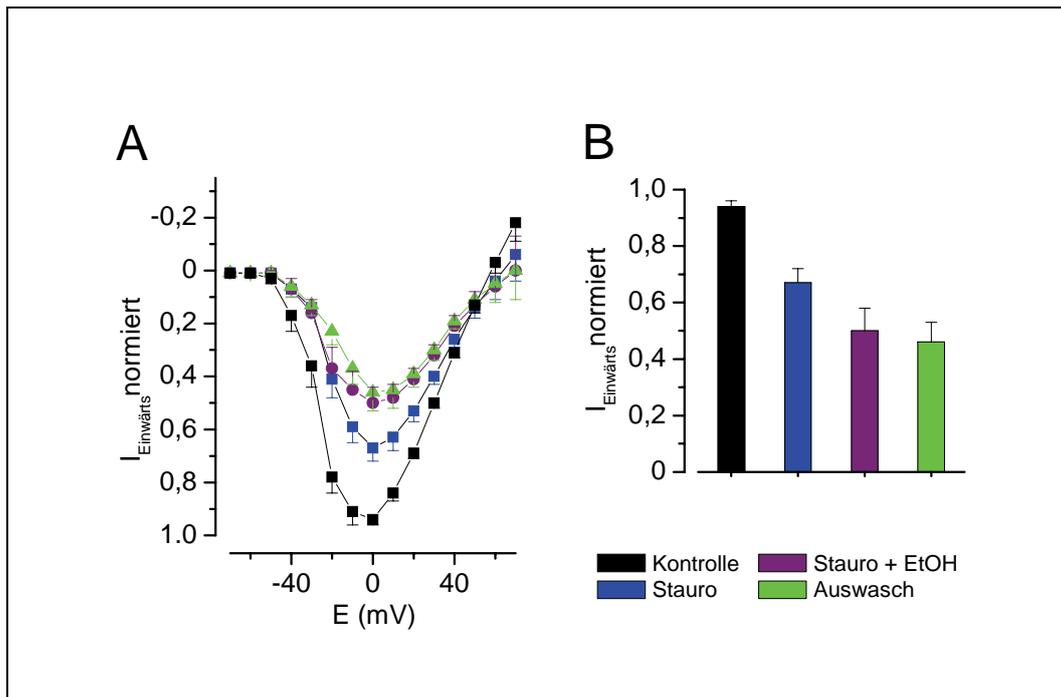


Abbildung 16 Einwärtsströme nach Staurosporin-gabe

(A) Strom-Spannungskurve der Einwärtsströme nach Präinkubation mit 100 nM Staurosporin, auch hier konnte 40 mM Ethanol eine Blockade der Einwärtsströme hervorrufen ($n = 10$). (B) Balkendiagramm der auf Ca^{2+} -freie Standard-Lösung normierten Einwärtsströme bei 0 mV. Außenlösung Ca^{2+} -freie Standard-Lösung, Innenlösung High $_{\text{K}_i}$ ATP.

| Lösung | mittlerer Strom | n |
|---|-----------------------------|----|
| Ca^{2+} -freie Standard-Lösung | $-6,13 \text{ nA} \pm 1,24$ | 10 |
| Staurosporin | $-4,21 \text{ nA} \pm 0,81$ | 10 |
| Staurosporin+Ethanol | $-3,29 \text{ nA} \pm 0,88$ | 9 |
| Auswasch | $-2,94 \text{ nA} \pm 0,76$ | 9 |

Tabelle 14 Einwärtsströme nach Präinkubation mit Staurosporin

3.10 Tetrodotoxin und Einwärtsströme

Um genauere Informationen über die Komponenten des unter Kapitel 3.8 genannten Einwärtsstroms zu erhalten, wurden Experimente mit TTX (200 nM) durchgeführt. Durch den Zusatz von Cs⁺-Ionen in die Innenlösung wurden K⁺-Ströme unterbunden (Safronov *et al.*, 1996; Gold *et al.*, 1996a). Die in der Innenlösung vorhandenen F⁻-Ionen wurden zur Blockade potenzieller Ströme durch Ca²⁺-Kanäle eingesetzt (Kostyuk *et al.*, 1977). Diese Wahl der Lösungen und Pharmaka erlaubte die isolierte Untersuchung von TTX-resistenten Na⁺-Strömen (TTXr).

Der TTXr Na⁺-Strom wurde in der Standard-Lösung in Höhe von $0,88 \pm 0,03$ (n = 5) gemessen, eine Reduktion erfolgte nach der Applikation von Ethanol ($0,55 \pm 0,05$; p = 0,0001; n = 5). Im Auswasch wurde der TTXr Na⁺-Strom bei $0,70 \pm 0,14$ (p > 0,05; n = 5) registriert. Diese Angaben beziehen sich auf das Testpotenzial von 0 mV. Die Normierung basiert auf den Maximalwerten in der Standard-Lösung, die bei den einzelnen Experimenten bei unterschiedlichen Potenzialen gemessen wurden. In der Tabelle 15 sind die während der Experimente erhobenen absoluten Daten dargestellt.

| Lösung | mittlerer Strom | n |
|-----------------|-----------------|---|
| Standard-Lösung | -4,21 nA ± 0,32 | 5 |
| Ethanol | -2,64 nA ± 0,30 | 5 |
| Auswasch | -2,77 nA ± 0,65 | 5 |

Tabelle 15 TTXr Na⁺-Ströme unter dem Einfluss von Ethanol

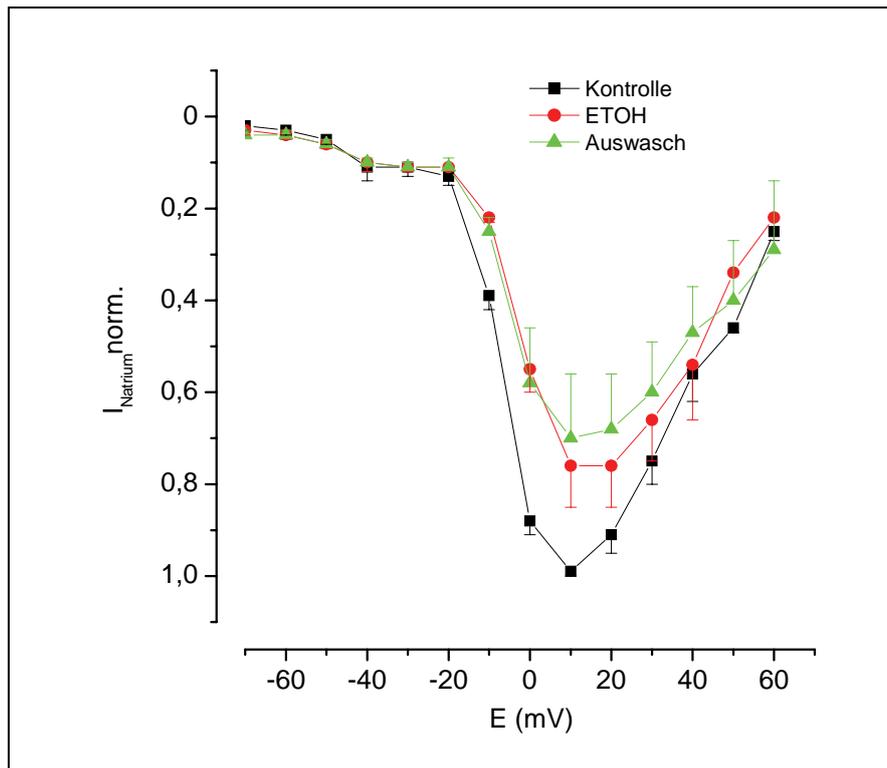


Abbildung 17 Blockade der TTXr Na^+ -Ströme nach Ethanolapplikation

Strom-Spannungskurve der TTXr Na^+ -Ströme, die durch die Zugabe von Ethanol blockiert wurden ($n = 5$). Außenlösung Standard-Lösung, Innenlösung CsF.

4 Diskussion

4.1 Die *slice*-Präparation

Der Vorteil der Methode der *slice*-Präparation von Neuronen liegt darin, dass diese während der Präparation und der Experimente in ihre Umgebung eingebettet sind, wobei die benachbarten Zellen und Strukturen weitgehend erhalten bleiben.

Die durch die *slice*-Präparation gewonnenen Schnitte erlauben hauptsächlich den Zugang zu den oberflächlich gelegenen kleinen und mittelgroßen Neuronen (Safronov *et al.*, 1996), von deren Somata nozizeptive C- und A δ -Fasern ausgehen (Harper & Lawson, 1985). Die großen Neurone werden durch Satellitenzellen umhüllt, welche den Kontakt der Pipette zu den Neuronen verhindert (Safronov *et al.*, 1996).

Häufig ist nach der *slice*-Präparation auch der Axonverlauf eines Neurons im Gewebeverband zu verfolgen (Scholz, 2001). Ein weiterer Hinweis für das „Intaktsein“ der Neurone sind ihre mit der *patch-clamp* Technik gemessenen Ruhemembranpotenziale, die in der vorliegenden Arbeit überwiegend in einem Bereich von ca. -50 bis -60 mV lagen. Diese Größenordnung stimmt damit etwa mit den von Gruß *et al.* (2001) angegebenen Werten von ca. -60 bis -65 mV überein. Außerdem konnten als zusätzliches Indiz für den guten Zustand der Zellen Eingangswiderstände von über einem Gigaohm ($G\Omega$) gemessen werden, die damit etwa um eine Zehnerpotenz höher liegen als für enzymatisch dissoziierte Zellen beschrieben (Scholz, 2001).

Einer der Nachteile der *slice*-Präparation besteht darin, dass nach dem Einwasch bestimmter Substanzen, wie zum Beispiel hochmolekularer Toxine oder auch lipophiler Substanzen, in die Experimentierkammer der gesamte Schnitt kontaminiert ist. Diese sind oft trotz längerer Auswaschzeiten nicht sicher zu eliminieren, so dass der Schnitt damit für folgende Experimente unbrauchbar wird. Außerdem ist der Zeitfaktor der Applikation von Substanzen

nicht unerheblich, da das Volumen der gesamten Experimentierkammer berücksichtigt werden muss und sich zudem die Testsubstanzen teilweise im Gewebe ablagern.

4.2 Ethanoleffekt auf Aktionspotenzialdauer und Auswärtsströme

Ein Einfluss von Ethanol auf die AP-Dauer auf die kleinen Neurone der Hinterwurzelganglien ist nur durch sehr wenige wissenschaftliche Untersuchungen belegt worden (Oakes & Pozos, 1982a; Gruß *et al.*, 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Neuronen zeigten nach Applikation von 40 mM Ethanol im Vergleich zu der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung als Referenzgröße eine Veränderung in ihrer AP-Dauer, auf deren Grundlage auch ihre Einteilung in die „Gruppe A“ und „B“ erfolgte. Ethanol konnte bei den Neuronen der „Gruppe A“, die einen Anteil von 36% an der Gesamtpopulation der Zellen hatten, eine reversible Verkürzung der AP-Dauer um ca. 22% hervorrufen. Diese Verkürzung der AP-Dauer wurde in einer früheren Studie der Aktivierung des BK_{Ca} -Kanals zugeordnet, wobei hier durch Ethanol lediglich eine Verkürzung der AP-Dauer um ca. 8% im Vergleich zu der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung vorlag (Gruß *et al.*, 2001).

Die „Gruppe B“ war in der vorliegenden Arbeit in der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung mit einem Anteil von 40% aller untersuchten Zellen vertreten. Ihre AP-Dauer wurde nach der Applikation von Ethanol mit einer Verlängerung um ca. 23% gemessen. In derselben Außenlösung wurde von der Gruppe um Gruß in Ethanol eine Verlängerung der AP-Dauer um ca. 15% angegeben, allerdings wurde dort eine ATP-/GTP- und Aspartat-freie Innenlösung verwendet (Gruß *et al.*, 2001).

Bei einer weiteren Gruppe von Neuronen war keine Modifikation der AP-Dauer zu verzeichnen, denn bei diesen 24% aller Zellen betrug die Änderung des Ausgangswertes weniger als 5%. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass zusätzlich zu den oben

genannten Zellen der „Gruppe A“ bzw. „B“ ein oder auch mehrere Subpopulationen der kleinen Neurone der Hinterwurzelganglien existieren.

Gruß *et al.* (2001) konnten zeigen, dass Ethanol bezüglich der Modulation der AP-Dauer der Neuronen der „Gruppe B“ beim Vergleich der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung und der Ca^{2+} -haltigen Standard-Lösung zwar jeweils eine Verlängerung der AP-Dauer, aber in unterschiedlicher Ausprägung hervorgerufen hat.

Da die vorliegenden Untersuchungen auf der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung basieren und der interne Ca^{2+} -Chelator EGTA (Ethylenglycol-bis(β -Aminoethyl Ether) N,N,N',N'-Tetraessigsäure) verwendet wurde, ist davon auszugehen, dass die Einteilung der Neurone in die „Gruppe A“ bzw. „B“ im ursprünglichen Sinn fortgeführt werden konnte und trotz Ca^{2+} -freier Standard-Lösung ein geringer Einfluss von BK_{Ca} -Kanälen weiterhin potenziell möglich war (siehe Abbildung 6 und 7). Erst nach einem Austausch von EGTA durch den schnelleren Chelator BAPTA (1,2-bis(2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) konnte die Wirkung der BK_{Ca} -Kanäle während eines APs unterbunden werden (Gruß *et al.*, 2001).

Betrachtet man in den oben genannten Gruppen von Zellen die Auswärtsströme, lassen sich folgende Ergebnisse feststellen: Die Neurone der „Gruppe A“ zeigen korrespondierend zu dem reversibel verkürzten AP ebenfalls reversibel erhöhte Auswärtsströme, die in Ethanol um 28% (*steady state*) bzw. um 18% (Maximalstrom) erhöht waren. Im Auswasch war bei den Auswärtsströmen eine weitere Reduktion der Messwerte sowohl *steady state* (um ca. 9%) als auch beim Maximalstrom (ebenfalls um ca. 9%) zu verzeichnen. Diese Angaben zeigen die gleiche Tendenz wie die Ergebnisse von Gruß *et al.* (2001), bei denen in Ethanol auch eine Erhöhung der Auswärtsströme (um ca. 12%) und eine Reduktion im Auswasch (um ca. 21%) erfolgte.

Die Neurone der „Gruppe B“ reagierten dagegen mit einer Reduktion ihrer gemessenen Auswärtsströme. Die Zugabe von Ethanol zu der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung bewirkte eine

Reduktion um ca. 23% und weiterhin um ca. 25% im Auswasch (*steady state*). Bei den maximalen Auswärtsströmen lag eine Reduktion um 26% nach Ethanolapplikation und um ca. 26% im Auswasch vor. Auch diese Ergebnisse gehen tendenziell konform mit den Werten früherer Untersuchungen, bei denen aus der Zugabe von Ethanol eine Reduktion des Auswärtsstroms um ca. 9% hervorging und im Auswasch eine Reduktion um ca. 39% zu messen war (Gruß *et al.*, 2001). Die verlängerte AP-Dauer bei den Neuronen der „Gruppe B“ könnte sowohl durch die Blockade der Auswärtsströme als auch durch die Aktivierung von Einwärtsströmen bedingt sein. Auch eine Überlagerung beider Effekte ist nicht auszuschließen.

Die genannten Effekte von Ethanol wurden von Gruß *et al.* (2001) sowohl in Konzentrationen von 40 mM als auch in 80 mM beobachtet, welche mit einer klinisch durch eine Alkoholintoxikation zu erreichenden Blutalkoholkonzentration von ~2-4 ‰ v/v korrespondieren. Unter der Verwendung von 80 mM Ethanol und Ca^{2+} -freier Standard-Lösung konnte, analog zu den oben genannten Experimenten in Ca^{2+} -haltiger Standard-Lösung im Vergleich zu der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung, ebenfalls ein stärkerer Effekt herbeigeführt werden. Damit war in dieser früheren Studie die Ausprägung der Effekte von Ethanol konzentrationsabhängig, sowohl im Bezug auf Ca^{2+} -Ionen als auch auf Ethanol in der Außenlösung (Gruß *et al.*, 2001).

Mögliche Effekte durch reine Veränderungen der Osmolarität durch Ethanol konnten durch die Substitution von Ethanol durch Glukose ausgeschlossen werden (Gruß *et al.*, 2001).

4.3 Einfluss von Staurosporin auf Aktionspotenzialdauer und Auswärtsströme

Zur Blockade der PKC wurde Staurosporin (Omura *et al.*, 1977) eingesetzt, dessen IC_{50} zur Blockade der PKC mit 2,7 nM angegeben wird (Tamaoki & Nakano, 1990).

In der vorliegenden Arbeit bewirkte Staurosporin, ausgehend von der Amplitude der Auswärtsströme in der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung, bei den untersuchten Neuronen eine

Reduktion der Auswärtsströme um 13%. Aus der gemeinsamen Applikation von Staurosporin und Ethanol resultierte eine weitere Reduktion um 12%. Im anschließenden Auswasch erhöhten sich die Auswärtsströme wieder um ca. 5%. Betrachtet man die AP-Dauer dieser Neuronen, ließ sich, von der AP-Dauer in der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung ausgehend, eine ca. 8%ige Erhöhung in Staurosporin feststellen, die durch Staurosporin und Ethanol wieder um ca. 10% reduziert wurde. Im Auswasch konnte eine um ca. 16% erhöhte AP-Dauer gemessen werden.

Die Einteilung der Zellen in die „Gruppe A“ bzw. „B“ basierte ursprünglich aufgrund der Modifikation der AP-Dauer nach Ethanolapplikation im Vergleich zu der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung. Nach der Präinkubation mit Staurosporin konnte die Differenzierung nicht mehr im diesem Sinne fortgeführt werden, weil die Applikation von Ethanol nicht mehr direkt auf die Ca^{2+} -freie Standard-Lösung als Referenzgröße erfolgt ist und Staurosporin die Modifikation beeinträchtigt haben könnte.

Bei diesen Experimenten traten nach Präinkubation mit Staurosporin und anschließender gemeinsamer Applikation von Staurosporin und Ethanol bei einer reversibel verkürzten AP-Dauer gleichzeitig reduzierte Auswärtsströme auf. Diese Tatsache erscheint widersprüchlich, denn eine verkürzte AP-Dauer ließe einen damit einhergehenden Anstieg von Auswärtsströmen vermuten, welche durch eine beschleunigte Repolarisationsphase die Verkürzung der AP-Dauer erklären könnte. Dementsprechend zeigten die unter Kapitel 3.3 genannten Neurone der „Gruppe A“ in Ethanol ohne Präinkubation mit Staurosporin bei einer reversibel verkürzten AP-Dauer auch reversibel erhöhte Auswärtsströme. Auch bei den Experimenten mit Präinkubation von Staurosporin wäre bei einer verkürzten AP-Dauer eher ein Anstieg der Stromamplitude zu erwarten gewesen, denn der Anteil der Neurone der „Gruppe A“ hätte unabhängig vom Einfluss der PKC diese Tendenz und die Reduktion des Stroms durch Ethanol bei den Neuronen der „Gruppe B“ sollte durch Staurosporin verhindert werden.

Außerdem ist anzunehmen, dass die Ethanoleffekte der „Gruppe B“ Neurone überwiegen, da diese zahlenmäßig stärker vertreten sind und auch die Reduktion der Stromamplitude in Ethanol tendenziell größer war als der Anstieg des Stroms bei den Neuronen der „Gruppe A“ (+18% bzw. -26%, Maximalstrom; siehe Kapitel 3.3).

Im Vergleich zu den in Kapitel 3.2 dokumentierten Experimenten, bei denen sich eine Aufteilung der Zellen zu ca. 36% in „Gruppe A“, zu ca. 40% in „Gruppe B“ und zu 24% in eine weitere Gruppe ergab, konnte hier nach der gemeinsamen Applikation von Staurosporin und Ethanol bei über 90% der Neuronen keine Verlängerung der AP-Dauer gemessen werden.

Da die Veränderungen der AP-Dauer nach Präinkubation von Staurosporin nicht allein durch die Effekte auf die Auswärtsströme erklärt werden können, wurde der Einfluss von Staurosporin auf die Einwärtsströme als weitere Komponente untersucht (siehe Kapitel 3.9)

4.4 Spannungsabhängige Kaliumströme

Wie auch schon nach der Applikation von Ethanol in der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung gezeigt werden konnte, ergab sich auch bei den spannungsabhängigen K^+ -Strömen eine Aufteilung der Neurone in zwei Gruppen. Auch an dieser Stelle konnte wegen der eingesetzten Lösungen (KF als Innenlösung und externer Cholinchlorid-Lösung) eine Zuordnung der Zellen nicht mehr nach der Veränderung der AP-Dauer als ursprünglichem Parameter erfolgen. Die Bezeichnung „Gruppe A“ bzw. „B“ wurde deshalb auf der Grundlage der im Kapitel 3.3 beschriebenen veränderten Auswärtsströme als analoge Modulation durch Ethanol und aus Gründen der Übersichtlichkeit beibehalten.

Die Neurone der „Gruppe A“ (ca. 50% der Zellen) zeigten in Ethanol, ausgehend von der Cholinchlorid-Lösung, einen im Auswasch reversiblen Anstieg der spannungsabhängigen K^+ -Ströme um 21%. Bei den Neuronen der „Gruppe B“, die die zweite Hälfte dieser Zellen ausmachte, konnte in Ethanol eine tendenzielle Reduktion der spannungsabhängigen K^+ -

Ströme um 23% gemessen werden. Im Auswasch setzte sich diese Tendenz fort, und es wurde eine weitere Reduktion der Ströme um ca. 10% beobachtet, allerdings waren die Veränderungen der „Gruppe B“ Neuronen in Ethanol hier nicht signifikant.

Da der Effekt der erhöhten spannungsabhängigen K^+ -Ströme bei den Zellen der „Gruppe A“ relativ rasch reversibel war, spricht das eher für einen unmittelbaren Effekt von Ethanol auf Ionenkanäle ohne eine Einbeziehung zellulärer Signalkaskaden, die bei ihrem Ablauf einen gewissen Zeitraum in Anspruch nehmen. Durch Verwendung von KF sollte sowohl die Aktivität von Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Strömen wie dem BK_{Ca} -Kanal blockiert als auch der Einfluss der potenziell involvierten Isoenzyme der Ca^{2+} -abhängigen cPKC minimiert sein. Dabei ist es erstaunlich, dass bei den Neuronen der „Gruppe A“ nach Applikation von Ethanol ein Anstieg der Stromamplitude zu beobachten war und im Auswasch die Stromamplitude fast wieder den Ausgangswert in Cholinchlorid-Lösung erreicht, obwohl der BK_{Ca} -Kanal keinen Einfluss haben sollte.

Dagegen konnte bei den Neuronen der „Gruppe B“ eine durch Ethanol verursachte und auch im Auswasch fortgesetzte Reduktion der Ströme beobachtet werden. Aufgrund dieses irreversiblen und langsam ablaufenden Effektes kann hier eher ein auf einem indirekten Effekt, wie zum Beispiel einem *second-messenger* System, basierender Mechanismus vermutet werden. Ähnliche Kurvenverläufe für „Gruppe B“ Neuronen konnten oben schon in Ca^{2+} -freier Standard-Lösung (siehe Kapitel 3.3) gezeigt werden, für die dieselbe Argumentation zutrifft.

Allerdings lassen sich in der Literatur Hinweise finden, die kontroverse Schlussfolgerungen bezüglich des Einflusses von Ethanol auf spannungsabhängige K^+ -Kanäle im Bereich klinischer Blutalkoholkonzentrationen aufzeigen. Anhand eines klonierten spannungsabhängigen K^+ -Kanals von *Drosophila* (Shaw2) konnte in Oozyten von *Xenopus* ebenfalls eine nach ca. 30 Sekunden eintretende Blockade dieses Kanals durch Ethanol (17-170 mM) beobachtet werden, die im Auswasch etwa innerhalb des gleichen Zeitraumes

vollständig reversibel war. Allerdings blieben weitere in derselben Studie untersuchte spannungsabhängige K^+ -Kanäle durch Ethanol unbeeinflusst (Covarrubias & Rubin, 1993).

4.5 Spannungsabhängige Kaliumströme nach Applikation von Staurosporin

Um auch hier die mögliche Einwirkung der PKC näher untersuchen zu können, wurde wiederum Staurosporin als Zusatz in der Außenlösung verwendet. Bei sechs Zellen (54,6%) wurden spannungsabhängige K^+ -Ströme registriert, die nach Präinkubation mit Staurosporin in Ethanol signifikant um ca. 30% erhöht waren. Weitere drei Neurone (27,3%) zeigten einen Rückgang der spannungsabhängigen K^+ -Ströme in Ethanol um ca. 14%. Damit liegt bei diesen Experimenten im Vergleich zu den in Kapitel 3.3 genannten Zellen ein umgekehrtes Verhältnis dieser beiden Gruppen von Neuronen bzw. der Modulation der Auswärtsströme vor. Bei diesen Experimenten ohne Verwendung von Staurosporin konnte bei zehn Neuronen (62,5%) eine erhöhte Stromamplitude in Ethanol gemessen werden, während bei sechs Neuronen (37,5%) eine Reduktion vorlag.

Bei zwei Zellen wurde durch Ethanol nach Präinkubation mit Staurosporin keine Veränderung ihrer Stromwerte hervorgerufen.

Das Ergebnis zeigt also trotz veränderter Anteile wieder eine Aufteilung in zwei Gruppen, bei denen entweder ein Anstieg oder eine Reduktion des Stroms nach Präinkubation mit Staurosporin und anschließender gemeinsamer Applikation von Ethanol und Staurosporin gemessen werden konnte.

Die oben beschriebenen divergenten Effekte lassen auf eine fehlende Wirkung von Staurosporin im Zusammenhang mit der Ethanolwirkung auf die spannungsabhängigen K^+ -Ströme schließen. Es zeigt sich im Vergleich zu den unter Kapitel 3.5 aufgeführten Experimenten keine wesentliche Veränderung. Daraus resultiert die Annahme, dass die Blockade spannungsabhängiger K^+ -Kanäle nicht über die PKC vermittelt wird.

Eine andere Möglichkeit wäre die, dass Staurosporin seine Bindungsstelle aufgrund einer Komplexierung durch intrazelluläres ATP nicht erreichen konnte. Als Innenlösung wurde High_{Ki} ATP verwendet. Eine mögliche kompetitive Bindung von ATP und Enzyminhibitoren wird von verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert. Bei der Inhibierung der Tyrosin-spezifischen Proteinkinasen (TPK) scheint Staurosporin nicht mit ATP um die Bindungsstelle zu konkurrieren (Fujita-Yamaguchi & Kathuria, 1988). Andere Autoren schließen ebenfalls aufgrund der hochpotenten Wirkung von Staurosporin auf die PKC bei gleichzeitiger intrazellulärer Konzentration von ATP in Höhe von bis zu 1 mM eine kompetitive Interaktion der beiden Substanzen an der Bindungsstelle von ATP aus (Ruegg & Burgess, 1989). Dagegen gibt es weitere Inhibitoren der PKC, wie zum Beispiel die Substanz K-252a, die an der ATP-Bindungsstelle der katalytischen Domäne angreifen sollen (Sezaki *et al.*, 1985). Aufgrund dieser Angaben in der Literatur scheint eine mögliche Interaktion von Staurosporin und ATP eher unwahrscheinlich zu sein.

4.6 Spannungsabhängige Kaliumströme nach Applikation von PMA

Das hier verwendete PMA ist aufgrund der Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade der PKC als hochpotenter Tumorpromoter unter anderem bei Hauttumoren der Maus bekannt (Furstenberger *et al.*, 1981).

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Neuronen ergab sich im Bezug auf die Modulation der spannungsabhängigen K⁺-Ströme durch Ethanol interessanterweise eine umgekehrte Aufteilung der Neurone im Vergleich zu den Experimenten zur Untersuchung der spannungsabhängigen K⁺-Ströme unter Verwendung von Staurosporin (siehe Kapitel 3.6).

Bei sechs Zellen (54,6%) konnte, ausgehend von der Cholinchlorid-Lösung durch die Applikation von Ethanol nach Präinkubation von PMA, eine signifikante Reduktion der spannungsabhängigen K⁺-Ströme um ca. 14% hervorgerufen werden. Drei Neurone (27,3%)

zeigten nach Applikation von Ethanol einen Anstieg der Stromamplitude um 9%, weitere zwei Zellen (18,1%) blieben durch Ethanol unbeeinflusst.

Kim *et al.* (2005) konnten anhand von PC12-Zellen zeigen, dass die PKC spannungsabhängige K^+ -Kanäle beeinflusst. Dabei handelt es sich aber um die $PKC\zeta$, die zur Gruppe der atypischen PKCs gehört. Damit unterscheidet sich diese Gruppe von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten *novel* PKCs.

Durch die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von DMSO (0,0125%) wurde nicht von einer Veränderung der Neuronen ausgegangen, denn selbst DMSO-Konzentrationen von 0,3% sollen Ca^{2+} -Ströme in Neuroblastomazellen nicht beeinflussen (Wu *et al.*, 1992). Die Blockade von APs am Froschnerven ist erst durch DMSO-Konzentrationen ab 15% nachgewiesen worden (Larsen *et al.*, 1996).

4.7 Einwärtsströme

Zur Untersuchung der Einwärtsströme wurde die Ca^{2+} -freie Standard-Lösung als Außenlösung verwendet, um den über Ca^{2+} -Kanäle vermittelten Effekt (Oakes & Pozos, 1982a) zu minimieren. Eine zusätzliche Blockade von Ca^{2+} -Kanälen wird durch die Mg^{2+} -Ionen (Lansman *et al.*, 1986; Hess *et al.*, 1986; Hille, 2001) in einer Konzentration von 5 mM erreicht, die hier wegen des Ausgleichs der Oberflächenladung bei reduzierter Ca^{2+} -Konzentration erhöht wurde.

In der vorliegenden Arbeit war auch an den Einwärtsströmen der schwerpunktmäßig untersuchten Neuronen der „Gruppe B“ ein deutlicher Effekt nachzuweisen, denn die gesamten Einwärtsströme wurden ausgehend von der Ca^{2+} -freien Standard-Lösung durch Ethanol signifikant um ca. 44% reduziert. Durch den Auswasch waren diese wieder um ca. 12% erhöht, womit hier im Gegensatz zu den Auswärtsströmen und APs ein- zumindest teilweise- reversibler Effekt vorliegt.

Oakes und Pozos haben ihre Untersuchungen an kultivierten, großen Neuronen des Hinterwurzelganglions durchgeführt (Oakes & Pozos, 1982a; Oakes & Pozos, 1982b), wodurch sich diese Zellpopulation von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten kleinen Neuronen des Hinterwurzelganglions unterschied und auch die Aufbereitung der Zellen von der in der vorliegenden Arbeit angewendeten *slice*-Präparation deutlich abweicht. Sie konnten bei den Experimenten an ihren Zellen bei verkürzter AP-Dauer nach Applikation von Ethanol einen damit einhergehenden verminderten Ca^{2+} -Strom messen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der bei einer in Ethanol verlängerten AP-Dauer die Einwärtsströme reduziert waren, fanden Oakes und Pozos also bei einer verkürzten AP-Dauer gleichzeitig einen reduzierten Einwärtsstrom bzw. Ca^{2+} -Strom als Komponente dessen (Oakes & Pozos, 1982b). In der vorliegenden Arbeit spielten die Ca^{2+} -Ströme wegen der verwendeten Ca^{2+} -freien Standard-Lösung keine Rolle.

Auch die Modifikation der Einwärtsströme wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von Staurosporin analysiert. Hier lag nach der Präinkubation mit Staurosporin eine signifikante Reduktion der Einwärtsströme in Ethanol um ca. 26% vor. Ein weitere leichte Reduktion um 8% war im anschließenden Auswasch zu verzeichnen.

Staurosporin war hier zwar nicht in der Lage, eine Reduktion der Einwärtsströme durch Ethanol zu verhindern, dennoch war die Reduktion der Einwärtsströme in Ethanol nach Präinkubation mit Staurosporin im Vergleich zu den Experimenten in Ca^{2+} -freier Standard-Lösung von ca. 44% auf ca. 26% vermindert. Dennoch besteht die Möglichkeit der Überlagerung eines über die PKC vermittelten Mechanismus mit weiteren, zur Zeit noch nicht bekannten Mechanismen.

4.8 TTX-resistente Natriumströme

Wu & Kendig (1998) untersuchten in ihrer Arbeit die Wirkung von Ethanol (200 mM) auf die Na^+ -Ströme TTXr und TTXs am Hinterwurzelganglion der Ratte. Der Maximalwert der von

ihnen gemessenen Na⁺-Ströme konnte nur um etwa 19% (TTXr) bzw. 9% (TTXs) reduziert werden. Dagegen zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bei Verwendung von 40 mM Ethanol eine wesentlich deutlichere Reduktion der TTXr Na⁺-Ströme um ca. 38%. Ein Einfluss der TTXr Na⁺-Ströme ist also anzunehmen, zumal dieser Typ von Na⁺-Kanälen in den hier untersuchten kleinen Neuronen des Hinterwurzelganglions vorherrschend ist (Scholz, 2001).

Auch Natura *et al.* (2005) konnten zeigen, dass im Hinterwurzelganglion der Ratte TTXr Na⁺-Ströme über die PKC beeinflusst werden. Am Beispiel der spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle des Hinterwurzelganglions konnte eine funktionelle Rolle der PKCε und PKCβII in der Modulation von Nav1.7 und Nav1.8 nachgewiesen werden (Vijayaragavan *et al.*, 2004). Bei kultivierten Neuronen des Hinterwurzelganglions der Ratte konnte ebenfalls eine regulatorische Funktion der PKCε gezeigt werden, indem ein erhöhter TTXr Na⁺-Strom durch einen PKCε-spezifischen Blocker unterbunden werden konnte (Khasar *et al.*, 1999).

4.9 Ausblick und Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Wirkung von Ethanol auf die schon durch Gruß *et al.* (2001) definierten Neurone der „Gruppe B“ und die Interaktion mit der PKC gelegt. Aufgrund der verwendeten Ca²⁺-freien Standard-Lösung als Außenlösung, Staurosporin als Inhibitor der PKC, dem PKC-Aktivator PMA und dem bei einem Teil der Experimente eingesetzten KF als Ca²⁺-Chelator in der Innenlösung war die Gruppe der potenziell involvierten Isoenzyme auf die PKCδ, ε, η, θ und μ, die zu der Gruppe der *novel* PKCs (nPKCs) gehören, begrenzt.

Durch Ethanol konnte nach vorheriger Applikation von Staurosporin bei den darauf untersuchten Zellen im Mittel die AP-Dauer reversibel verkürzt werden und damit die Verlängerung der AP-Dauer, wie es zuvor bei den Neuronen der „Gruppe B“ beobachtet werden konnte, verhindert werden. Mit dieser verkürzten AP-Dauer ging außerdem ein in

Ethanol reduzierter Auswärtsstrom einher, der im Auswasch eine leicht reversible Tendenz zeigte. Wenn bei diesen Experimenten die PKC durch Staurosporin inhibiert worden wäre, wäre bei den Auswärtsströmen und gleichzeitig verkürzter AP-Dauer eher ein reversibler Anstieg wie bei den „Gruppe A“ Neuronen, wenigstens aber keine Reduktion zu erwarten gewesen. Trotzdem lag hier eine verkürzte AP-Dauer vor, die schließlich durch eine Blockade des Einwärtsstroms erklärt werden konnte.

Im Hinblick auf die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle konnte mit Hilfe von Staurosporin und PMA kein eindeutiger Nachweis eines Einflusses der PKC erbracht werden, obwohl durch Präinkubation mit diesen beiden Substanzen im Vergleich eine exakt gegenläufige Wirkung von Ethanol erzielt wurde.

Bei den Einwärtsströmen konnte Staurosporin eine Reduktion durch Ethanol nicht vollständig verhindern, trotzdem konnte nach Präinkubation mit Staurosporin die Reduktion dieser Ströme um mehr als die Hälfte geringer gemessen werden.

Offensichtlich basiert der Einfluss von Ethanol auf die Neurone der „Gruppe B“ hauptsächlich im Bereich der Einwärtsströme auf einem *second-messenger* System unter Mitwirkung der PKC. Insbesondere die Blockade der TTXr Na^+ -Ströme durch Ethanol konnte in der vorliegenden Arbeit eindrucksvoll gezeigt werden. Dennoch ist ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen, bei dem die PKC als Teil eines Gesamtkomplexes anzusehen wäre, nicht auszuschließen.

5 Zusammenfassung

- 1) In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Ethanol (40mM) an den Ionenkanälen kleiner Neurone von Hinterwurzelganglien junger Ratten in einer Dünnschnittpräparation mit der patch-clamp Technik untersucht.
- 2) 40% der Neurone wurden wegen ihrer durch Ethanol verursachten irreversiblen Verlängerung der Aktionspotenzialdauer als Neurone der „Gruppe B“ bezeichnet. Bei 36% der untersuchten Neurone führte Ethanol zu einer reversiblen Verkürzung der AP-Dauer, die deshalb als „Gruppe A“ benannt wurden. 24% der Neurone blieben durch Ethanol unbeeinflusst.
- 3) Bei den Neuronen der „Gruppe B“ bewirkte Ethanol eine irreversible Blockade, bei den Neuronen der „Gruppe A“ eine reversible Erhöhung der Amplitude der Auswärtsströme.
- 4) Die Wirkung von Ethanol auf die Neurone der „Gruppe B“ standen im Mittelpunkt der durchgeführten Experimente, insbesondere wurden Mechanismen im Zusammenhang mit der Proteinkinase C untersucht.
- 5) Die Präinkubation mit Staurosporin, einem Inhibitor der Proteinkinase C, konnte bei über 90% der Neuronen eine Verlängerung der AP-Dauer durch Ethanol verhindern. Die Amplitude der Auswärtsströme in den Neuronen zeigten nach Präinkubation mit Staurosporin in Ethanol eine Reduktion.
- 6) Die spannungsabhängigen K^+ -Ströme zeigten unter Verwendung einer KF Innenlösung bei 50% der Neuronen in Ethanol eine irreversible Reduktion, bei der anderen Hälfte der Neuronen einen reversiblen Anstieg.
- 7) Trotz Präinkubation mit Staurosporin zeigten 27% der Neurone bei den spannungsabhängigen K^+ -Strömen nach Applikation von Ethanol eine Reduktion, 55% eine Erhöhung und 18% der Neurone eine unveränderte Amplitude.

- 8) Die Applikation von PMA, einem Aktivator der Proteinkinase C, rief bei den spannungsabhängigen K^+ -Strömen einen im Vergleich zu Staurosporin umgekehrten Effekt von Ethanol hervor: bei 55% der Neurone war eine Reduktion, bei 27% eine Erhöhung und bei 18% eine unveränderte Amplitude zu messen.
- 9) Bei den Neuronen der „Gruppe B“ wurde in Ethanol eine Reduktion der Amplitude der Einwärtsströme um etwa 44%, nach Präinkubation mit Staurosporin eine Reduktion um ca. 26% gemessen.
- 10) Außerdem konnte durch Ethanol eine Reduktion der Amplitude der TTXr Na^+ -Ströme um ca. 38% gezeigt werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wird angenommen, dass der Haupteffekt von Ethanol via $PKC\delta$, ϵ , η , θ oder μ im Bereich der Einwärtsströme bzw. Na^+ -Ströme liegt.

6 Summary

- 1) In this study the effects of ethanol (40mM) on ion channels of small diameter neurons of young rat's dorsal root ganglia were investigated in a thin slice-preparation by means of the *patch-clamp* method.
- 2) Ethanol caused an irreversible prolongation of action potential-duration in 40% of neurons. These were designated as "group B" neurons. 36% of neurons showed a reversible shortening of AP-duration after application of ethanol and were classified as "group A" neurons. In 24% of neurons ethanol did not change AP-duration.
- 3) Ethanol caused an irreversible block of outward-currents in "group B" neurons whereas ethanol led to a reversible increase of amplitude of outward-currents in "group A" neurons.
- 4) Experiments focussed on the effects of ethanol on "group B" neurons- especially the potential involvement of protein kinase C.
- 5) Preincubation with staurosporine, an inhibitor of protein kinase C, prevented in about 90% of neurons a prolongation of AP-duration due to ethanol. The amplitude of outward-currents of these neurons was reduced by ethanol after preincubation with staurosporine.
- 6) Voltage-gated K^+ -currents, separated by use of a KF pipette solution, showed an irreversible reduction of their amplitude in 50% of neurons in ethanol while the remaining half exhibited a reversible increase.
- 7) Despite the preincubation with staurosporine, 27% of neurons showed an amplitude reduction of voltage-gated K^+ -currents after application of ethanol while an increase was observed in 55% of neurons and 18% remained unchanged.

- 8) Application of PMA, an activator of PKC, revealed a contrary effect of ethanol on voltage-gated K^+ -currents relative to staurosporine: 55% of neurons showed a reduction, an increase was observed in 27% of neurons and 18% displayed no change of amplitude.
- 9) Application of ethanol resulted in a reduction of inward-current amplitude by about 44% in “group B” neurons. Preincubation with staurosporine reduced the effect of ethanol by 26%.
- 10) Furthermore, ethanol reduced TTXr Na^+ -current amplitude by about 38%.

It is therefore assumed that the main effect of ethanol is caused by PKC δ , ϵ , η , θ or μ on inward-currents and especially on Na^+ -currents.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Abbildungen

| | | |
|--------------|--|----|
| Abbildung 1 | <i>Second-messenger System</i> des Phosphoinositol (IP ₃) | 13 |
| Abbildung 2 | Durch Ethanol induzierte Veränderungen der kleinen DRG-Neurone | 20 |
| Abbildung 3 | Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus | 28 |
| Abbildung 4 | Sensorisches Neuron mit Pipette während eines <i>patch-clamp</i> Versuchs | 30 |
| Abbildung 5 | Aufbau der Experimentierkammer | 31 |
| Abbildung 6 | Beeinflussung der AP-Dauer durch Ethanol | 38 |
| Abbildung 7 | Reaktionen der Auswärtsströme nach Ethanolapplikation | 40 |
| Abbildung 8 | Blockade der Auswärtsströme von „Gruppe B“ Neuronen | 42 |
| Abbildung 9 | Normierte Auswärtsströme nach Staurosporingabe | 43 |
| Abbildung 10 | Staurosporin kann eine Verlängerung der AP-Dauer durch Ethanol verhindern | 45 |
| Abbildung 11 | Spannungsabhängige K ⁺ -Ströme | 47 |
| Abbildung 12 | Anstieg der spannungsabhängigen K ⁺ -Ströme | 49 |
| Abbildung 13 | Reduktion der spannungsabhängigen K ⁺ -Ströme | 50 |
| Abbildung 14 | Spannungsabhängige K ⁺ -Ströme und Applikation von PMA | 53 |
| Abbildung 15 | Einwärtsströme | 55 |
| Abbildung 16 | Einwärtsströme nach Staurosporingabe | 57 |
| Abbildung 17 | Blockade der TTXr Na ⁺ -Ströme nach Ethanolapplikation | 59 |

7.2 Verzeichnis der Tabellen

| | | |
|------------|---|----|
| Tabelle 1 | Größe und Ruhepotenzial der Zellen | 36 |
| Tabelle 2 | Auswärtsströme der Neuronen der „Gruppe A“ | 41 |
| Tabelle 3 | Auswärtsströme der Neuronen der „Gruppe B“ | 41 |
| Tabelle 4 | Auswärtsströme nach Präinkubation mit Staurosporin | 44 |
| Tabelle 5 | Spannungsabhängige K^+ -Ströme der Neurone der „Gruppe A“ | 48 |
| Tabelle 6 | Spannungsabhängige K^+ -Ströme der Neurone der „Gruppe B“ | 48 |
| Tabelle 7 | Anstieg der spannungsabhängigen K^+ -Ströme, die nach Präinkubation mit Staurosporin in Ethanol erhöht waren | 49 |
| Tabelle 8 | Spannungsabhängige K^+ -Ströme nach Präinkubation mit Staurosporin, bei denen eine Reduktion der Ströme in Ethanol vorlag | 51 |
| Tabelle 9 | Spannungsabhängige K^+ -Ströme nach Präinkubation mit Staurosporin, bei denen durch Ethanol keine Veränderung hervorgerufen wurde | 51 |
| Tabelle 10 | Spannungsabhängige K^+ -Ströme mit reduzierter Stromamplitude nach Applikation von PMA | 52 |
| Tabelle 11 | Spannungsabhängige K^+ -Ströme mit erhöhter Stromamplitude nach Applikation von PMA | 53 |
| Tabelle 12 | Spannungsabhängige K^+ -Ströme, bei denen PMA keine Wirkung zeigte | 54 |
| Tabelle 13 | Einwärtsströme der Neuronen der „Gruppe B“ | 56 |
| Tabelle 14 | Einwärtsströme nach Präinkubation mit Staurosporin | 57 |
| Tabelle 15 | TTXr Na^+ -Ströme unter dem Einfluss von Ethanol | 58 |

7.3 Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-------------------------------------|--|
| AP | Aktionspotenzial |
| AP-Dauer | Aktionspotenzialdauer |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BK_{Ca}-Kanal | <i>large conductance calcium activated K⁺-channel</i> , BK _{Ca} -Kanal |
| Ca²⁺-Ion | Kalzium-Ion |
| Cs⁺-Ion | Cäsium-Ion |
| DG | Diacylglycerin |
| DRG | <i>dorsal root ganglion</i> , Hinterwurzelganglion |
| F⁻-Ion | Fluorid-Ion |
| GABA_A (-Rezeptor) | γ -amino-Buttersäure-A (-Rezeptor) |
| K⁺-Ion | Kalium-Ion |
| KF | Kaliumfluorid |
| Na⁺-Ion | Natrium-Ion |
| NMDA | <i>N</i> -methyl-D-aspartat |
| PKC | Proteinkinase C; unterteilt in die Gruppen der klassischen (cPKC), <i>novel</i> (nPKC) und atypischen PKC |
| PMA | Phorbol 12-myristat 13-acetat |
| PNS | peripheres Nervensystem |
| PS | Phosphatidylserin |
| TTX | Tetrodotoxin |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

7.4 Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei der von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchung habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

7.5 Lebenslauf

Name: Julia Kristine Beuche

Geburtsdatum: 10.12.1974

Geburtsort: Lich

Eltern: Prof. Dipl.-Ing. Günter Beuche
Irmgard Beuche, geb. Doose

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1981-1985 Grundschule Giessen-Allendorf
1985-1991 Brüder-Grimm-Schule Giessen-Kl. Linden
1991-1994 Liebigsschule Giessen, Abitur 1994

Studium: 1994-2001 Studium der Zahnmedizin
Justus-Liebig-Universität Giessen
1996 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
1998 Zahnärztliche Vorprüfung
2001 Zahnärztliche Prüfung

Wissenschaftliche

Tätigkeit: August 2001-Februar 2006 Doktorandin
von PD Dr. A. Scholz am Physiologischen Institut
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Beruf: Mai 2002-Dezember 2005 Beschäftigung als
Assistenz Zahnärztin in freien Praxen;
seit Januar 2006 als selbstständige Zahnärztin
in Gemeinschaftspraxis tätig

7.6 Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Andreas Scholz für seine fachliche Beratung, wohlwollende Unterstützung und die regen Diskussionen rund um das Gebiet der Elektrophysiologie.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Marco Gruß für seine unermüdliche Anteilnahme an allen Sorgen während meiner Arbeit im Labor, für seine konstruktive Kritik und tatkräftigen Beistand bei anhaltenden Computerproblemen. Durch seine Einarbeitung in die Methode und die anschließende erfolgreiche und stets von Humor begleitete Zusammenarbeit wurde die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht.

Frau Brigitte Agari als Mitarbeiterin des Labors danke ich für die unentwegte freundliche Unterstützung mit ihrer fachlichen Kompetenz und Herrn Otto Becker für die hervorragende Umsetzung der technischen Anforderungen.

Danken möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor, die zu dem freundlichen Arbeitsklima im Labor beitragen.

Innigster Dank gilt meinem Freund Achim Roll, der vor allem mit seiner endlosen Geduld, seinem Verständnis und seiner ständigen Hilfsbereitschaft zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei meinen Eltern möchte ich mich aufrichtigst bedanken, da sie mir ohne Einschränkungen während meiner gesamten Ausbildung mit Rat und Tat zur Seite standen und mir damit diesen Werdegang ermöglicht haben; außerdem meinen Freunden, die mich immer wieder motiviert haben.

7.7 Literaturverzeichnis

- Andres, K. H. (1961). Untersuchungen über den Feinbau von Spinalganglien. *Zeitschrift für Zellforschung* **55**, 1-48.
- Bader, C. R., Bernheim, L., & Bertrand, D. (1985). Sodium-activated potassium current in cultured avian neurones. *Nature* **317**, 540-542.
- Baker, M. D. & Wood, J. N. (2001). Involvement of Na⁺ channels in pain pathways. *Trends in Pharmacological Sciences* **22**, 27-31.
- Brown, D. A. & Adams, P. R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* **283**, 673-676.
- Burns, D. J. & Bell, R. M. (1991). Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 18330-18338.
- Cantrell, A. R., Ma, J. Y., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1996). Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. *Neuron* **16**, 1019-1026.
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**, 13-25.
- Charness, M. E., Simon, R. P., & Greenberg, D. A. (1989). Ethanol and the nervous system. *New England Journal of Medicine* **321**, 442-454.
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz, d. M., & Rudy, B. (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* **868**, 233-285.

-
- Cole, K. S. (1949). Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Archives des Sciences Physiologiques* **3**, 253-258.
- Covarrubias, M. & Rubin, E. (1993). Ethanol selectively blocks a noninactivating K⁺ current expressed in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**, 6957-6960.
- Covernton, P. J. & Connolly, J. G. (1997). Differential modulation of rat neuronal nicotinic receptor subtypes by acute application of ethanol. *British Journal of Pharmacology* **122**, 1661-1668.
- D'Souza, N. B., Bautista, A. P., Lang, C. H., & Spitzer, J. J. (1992). Acute ethanol intoxication prevents lipopolysaccharide-induced down regulation of protein kinase C in rat Kupffer cells. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* **16**, 64-67.
- DePetrillo, P. B. & Liou, C. S. (1993). Ethanol exposure increases total protein kinase C activity in human lymphocytes. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* **17**, 351-354.
- Diochot, S., Richard, S., & Valmier, J. (1995). Diversity of voltage-gated calcium currents in large diameter embryonic mouse sensory neurons. *Neuroscience* **69**, 627-641.
- Domenicotti, C., Paola, D., Vitali, A., Nitti, M., Cottalasso, D., Melloni, E., Poli, G., Marinari, U. M., & Pronzato, M. A. (1998). Mechanisms of inactivation of hepatocyte protein kinase C isoforms following acute ethanol treatment. *Free Radical Biology and Medicine* **25**, 529-535.
- Dopico, A. M., Lemos, J. R., & Treistman, S. N. (1996). Ethanol increases the activity of large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels in isolated neurohypophysial terminals. *Molecular Pharmacology* **49**, 40-48.

-
- Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Dreyer, F. (1990). Peptide toxins and potassium channels. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **115**, 93-136.
- Dundee, J. W., Isaac, M., & Clarke, R. S. (1969). Use of alcohol in anesthesia. *Anesthesia & Analgesia* **48**, 665-669.
- Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B., & Takahashi, T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers Archiv* **414**, 600-612.
- Florio, S. K., Westbrook, C. D., Vasko, M. R., Bauer, R. J., & Kenyon, J. L. (1990). Transient potassium currents in avian sensory neurons. *Journal of Neurophysiology* **63**, 725-737.
- Fujita-Yamaguchi, Y. & Kathuria, S. (1988). Characterization of receptor tyrosine-specific protein kinases by the use of inhibitors. Staurosporine is a 100-times more potent inhibitor of insulin receptor than IGF-I receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **157**, 955-962.
- Furstenberger, G., Berry, D. L., Sorg, B., & Marks, F. (1981). Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 7722-7726.
- Gasser H.S & Erlanger, J. (1929). Role of fibre size in the establishment of nerve block by pressure or cocaine. *American Journal of Physiology* **88**, 581-591.
- Gasser H.S & Grundfest, H. (1939). Axon diameters in relation to the spike dimension and the conduction velocity in mammalian A-fibers. *American Journal of Physiology* **127**, 393.

-
- Gold, M. S., Shuster, M. J., & Levine, J. D. (1996a). Characterization of six voltage gated K⁺ currents in adult rat sensory neurons. *Journal of Neurophysiology* **75**, 2629-2646.
- Gold, M. S., Shuster, M. J., & Levine, J. D. (1996b). Role of a Ca²⁺ dependent slow afterhyperpolarization in prostaglandin E(2) induced sensitization of cultured rat sensory neurons. *Neuroscience Letters* **205**, 161-164.
- Goldman, D. E. (1943). Potential, impedance, and rectification in membranes. *Journal of General Physiology* **27**, 37-60.
- Gruß, M. (1998). Eigenschaften und Funktionen von BK_{Ca} Kanälen in kleinen Hinterwurzelganglienzellen junger Ratten: Untersuchungen in einer dünnen Schnittpräparation. *Dissertation Justus-Liebig-Universität Giessen*.
- Gruß, M., Henrich, M., König, P., Hempelmann, G., Vogel, W., & Scholz, A. (2001). Ethanol reduces excitability in a subgroup of primary sensory neurones by activation of BK_{Ca} channels. *European Journal of Neuroscience* 1246-1256.
- Haberberger, R. V. & Bodenbenner, M. (2000). Immunohistochemical localization of muscarinic receptors (M2) in the rat skin. *Cell Tissue Research* **300**, 389-396.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* **391**, 85-100.
- Harper, A. A. & Lawson, S. N. (1985). Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *Journal of Physiology* **359**, 31-46.
- Harris, R. A. (1999). Ethanol actions on multiple ion channels: Which are important? *Alcoholism Clinical and Experimental Research* **23**, 1563-1570.
- Harris, R. A., McQuilkin, S. J., Paylor, R., Abeliovich, A., Tonegawa, S., & Wehner, J. M. (1995). Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased

- behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-aminobutyrate type A receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3658-3662.
- Heginbotham, L., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**, 1152-1155.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical Journal* **66**, 1061-1067.
- Hemmings, H. C., Jr., Adamo, A. I., & Hoffman, M. M. (1995). Biochemical characterization of the stimulatory effects of halothane and propofol on purified brain protein kinase C. *Anesthesia & Analgesia* **81**, 1216-1222.
- Hess, P., Lansman, J. B., & Tsien, R. W. (1986). Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *Journal of General Physiology* **88**, 293-319.
- Hestrin, S. & Korenbrot, J. I. (1987). Voltage-activated potassium channels in the plasma membrane of rod outer segments: a possible effect of enzymatic cell dissociation. *Journal of Neuroscience* **7**, 3072-3080.
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes*, 3rd ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. ISBN 0-8789-3321-2
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *Journal of Physiology* **116**, 449-472.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., & Katz, B. (1949). Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Archives des Sciences Physiologiques* **3**, 129-150.

-
- Hodgkin, A. L. & Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *Journal of Physiology* **108**, 37-77.
- Hug, H. & Sarre, T. F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochemical Journal* **291**, 329-343.
- Ikeda, K., Kobayashi, T., Ichikawa, T., Usui, H., Abe, S., & Kumanishi, T. (1996). Comparison of the three mouse G-protein-activated K⁺ (GIRK) channels and functional couplings of the opioid receptors with the GIRK1 channel. *Annals of the New York Academy of Sciences* **801**, 95-109.
- James, M. F., Duthie, A. M., Duffy, B. L., McKeag, A. M., & Rice, C. P. (1978). Analgesic effect of ethyl alcohol. *British Journal of Anaesthesia* **50**, 139-141.
- Johannes, F. J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P., & Pfizenmaier, K. (1994). PKC ϵ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 6140-6148.
- Kameyama, M., Kakei, M., Sato, R., Shibasaki, T., Matsuda, H., & Irisawa, H. (1984). Intracellular Na⁺ activates a K⁺ channel in mammalian cardiac cells. *Nature* **309**, 354-356.
- Kazanietz, M. G., Wang, S., Milne, G. W., Lewin, N. E., Liu, H. L., & Blumberg, P. M. (1995). Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 21852-21859.
- Kerschbaum, H. H. & Hermann, A. (1997). Ethanol suppresses neuronal Ca²⁺ currents by effects on intracellular signal transduction. *Brain Research* **765**, 30-36.
- Khasar, S. G., Lin, Y. H., Martin, A., Dadgar, J., McMahon, T., Wang, D., Hundle, B., Aley, K. O., Isenberg, W., McCarter, G., Green, P. G., Hodge, C. W., Levine, J. D., &

-
- Messing, R. O. (1999). A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron* **24**, 253-260.
- Kim, Y., Park, M. K., Uhm, D. Y., Shin, J., & Chung, S. (2005). Modulation of delayed rectifier potassium channels by alpha1-adrenergic activation via protein kinase C zeta and p62 in PC12 cells. *Neuroscience Letters* **387**, 43-48.
- Kobayashi, T., Ikeda, K., Kojima, H., Niki, H., Yano, R., Yoshioka, T., & Kumanishi, T. (1999). Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Nature Neuroscience* **2**, 1091-1097.
- Kolb, H. A. (1990). Potassium channels in excitable and non-excitable cells. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **115**, 51-91.
- Kostyuk, P. G., Krishtal, O. A., & Doroshenko, P. A. (1974). Calcium currents in snail neurones. I. Identification of calcium current. *Pflügers Archiv* **348**, 83-93.
- Kostyuk, P. G., Krishtal, O. A., & Pidoplichko, V. I. (1977). Asymmetrical displacement currents in nerve cell membrane and effect of internal fluoride. *Nature* **267**, 70-72.
- Lansman, J. B., Hess, P., & Tsien, R. W. (1986). Blockade of current through single calcium channels by Cd²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *Journal of General Physiology* **88**, 321-347.
- Larsen, J., Gasser, K., & Hahin, R. (1996). An analysis of dimethylsulfoxide-induced action potential block: a comparative study of DMSO and other aliphatic water soluble solutes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **140**, 296-314.
- Little, H. J. (1991). Mechanisms that may underlie the behavioural effects of ethanol. *Progress in Neurobiology* **36**, 171-194.
- Lovinger, D. M. (1997). Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **356**, 267-282.

-
- Machu, T. K., Firestone, J. A., & Browning, M. D. (1993). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C phosphorylate a synthetic peptide corresponding to a sequence that is specific for the gamma 2L subunit of the GABA_A receptor. *Journal of Neurochemistry* **61**, 375-377.
- Machu, T. K., Olsen, R. W., & Browning, M. D. (1991). Ethanol has no effect on cAMP-dependent protein kinase-, protein kinase C-, or Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II-stimulated phosphorylation of highly purified substrates in vitro. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* **15**, 1040-1044.
- Marmont, G. (1949). Studies on the axon membrane. I. A new method. *Journal of Cellular Comparative Physiology* **34**, 351-382.
- Mellor, H. & Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochemical Journal* **332**, 281-292.
- Merchenthaler, I., Liposits, Z., Reid, J. J., & Wetsel, W. C. (1993). Light and electron microscopic immunocytochemical localization of PKC delta immunoreactivity in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* **336**, 378-399.
- Messing, R. O., Petersen, P. J., & Henrich, C. J. (1991). Chronic ethanol exposure increases levels of protein kinase C delta and epsilon and protein kinase C-mediated phosphorylation in cultured neural cells. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 23428-23432.
- Mihic, S. J., Ye, Q., Wick, M. J., Koltchine, V. V., Krasowski, M. A., Finn, S. E., Mascia, M. P., Valenzuela, C. F., Hanson, K. K., Greenblatt, E. P., Harris, R. A., & Harrison, N. L. (1997). Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA_A and glycine receptors. *Nature* **389**, 385-389.
- Minami, K., Gereau, R. W., Minami, M., Heinemann, S. F., & Harris, R. A. (1998). Effects of ethanol and anesthetics on type 1 and 5 metabotropic glutamate receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular Pharmacology* **53**, 148-156.

-
- Mintz, I. M., Adams, M. E., & Bean, B. P. (1992). P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* **9**, 85-95.
- Moss, S. J., Gorrie, G. H., Amato, A., & Smart, T. G. (1995). Modulation of GABA_A receptors by tyrosine phosphorylation. *Nature* **377**, 344-348.
- Narahashi, T., Moore, J. W., & Scott, W. R. (1964). Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *Journal of General Physiology* **47**, 965-974.
- Natura, G., von Banchet, G. S., & Schaible, H. G. (2005). Calcitonin gene-related peptide enhances TTX-resistant sodium currents in cultured dorsal root ganglion neurons from adult rats. *Pain*.
- Neher, E. & Sakmann, B. (1976). Single channel currents recorded from membranes of denervated frog muscle fibers. *Nature* **260**, 799-802.
- Nerbonne, J. M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *Journal of Physiology* **525**, 285-298.
- Newton, A. C. (1993). Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **22**, 1-25.
- Newton, A. C. (1996). Protein kinase C: ports of anchor in the cell. *Current Biology* **6**, 806-809.
- Niedel, J. E., Kuhn, L. J., & Vandenberg, G. R. (1983). Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 36-40.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**, 305-312.

-
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607-614.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **9**, 484-496.
- Noma, A. (1983). ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**, 147-148.
- North, R. A. (1989). Twelfth Gaddum memorial lecture. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. *British Journal of Pharmacology* **98**, 13-28.
- Nowycky, M. C., Fox, A. P., & Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**, 440-443.
- Oakes, S. G. & Pozos, R. S. (1982a). Electrophysiologic effects of acute ethanol exposure. I. Alterations in the action potentials of dorsal root ganglia neurons in dissociated culture. *Brain Research* **281**, 243-249.
- Oakes, S. G. & Pozos, R. S. (1982b). Electrophysiologic effects of acute ethanol exposure. II. Alterations in the calcium component of action potentials from sensory neurons in dissociated culture. *Brain Research* **281**, 251-255.
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y., & Masuma, R. (1977). A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **30**, 275-282.
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T. C., Suzuki, K., Kuroki, T., & Ohno, S. (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 3930-3938.

-
- Pallotta, B. S., Magleby, K. L., & Barrett, J. N. (1981). Single channel recordings of Ca^{2+} -activated K^+ currents in rat muscle cell culture. *Nature* **293**, 471-474.
- Pannese, E. (1960). Observations on the morphology, submicroscopic structure and biological properties of satellite cells (s.c.) in sensory ganglia of mammals. *Zeitschrift für Zellforschung und microscopische Anatomie* **52**, 597.
- Pennefather, P., Lancaster, B., Adams, P. R., & Nicoll, R. A. (1985). Two distinct Ca^{2+} -dependent K^+ currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 3040-3044.
- Peoples, R. W. & Weight, F. F. (1995). Cutoff in potency implicates alcohol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in alcohol intoxication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 2825-2829.
- Plenderleith, M. B. & Snow, P. J. (1993). The plant lectin *Bandeiraea simplicifolia* I-B4 identifies a subpopulation of small diameter primary sensory neurones which innervate the skin in the rat. *Neuroscience Letters* **159**, 17-20.
- Rennecke, J., Johannes, F. J., Richter, K. H., Kittstein, W., Marks, F., & Gschwendt, M. (1996). Immunological demonstration of protein kinase C μ in murine tissues and various cell lines. Differential recognition of phosphorylated forms and lack of down-regulation upon 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment of cells. *European Journal of Biochemistry* **242**, 428-432.
- Rudy, B. (1988). Diversity and ubiquity of K^+ channels. *Neuroscience* **25**, 729-749.
- Ruegg, U. T. & Burgess, G. M. (1989). Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends in Pharmacological Sciences* **10**, 218-220.

Safronov, B. V., Bischoff, U., & Vogel, W. (1996). Single voltage gated K⁺ channels and their functions in small dorsal root ganglion neurones of rat. *Journal of Physiology* **493**, 393-408.

Sakaue, Y., Sanada, M., Sasaki, T., Kashiwagi, A., & Yasuda, H. (2003). Amelioration of retarded neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons by overexpression of PKCdelta in diabetic rats. *Neuroreport* **14**, 431-436.

Schaap, D. & Parker, P. J. (1990). Expression, purification, and characterization of protein kinase C-epsilon. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 7301-7307.

Schmidt, R. F. & Thews, G. (1995). *Physiologie des Menschen*, 26. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. ISBN 3-5405-8034-4

Schnelle, N. (1965). Alcohol given intravenously for general anesthesia. *Surgical Clinics of North America* **45**, 1041-1049.

Scholz, A. (2001). *Ionenkanäle des primären sensorischen Neurons* Shaker Verlag, Aachen. ISBN 3-8265-9682-X

Scholz, A., Appel, N., & Vogel, W. (1997). R- and Q-type Ca²⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurones. *Pflügers Archiv* **433**, R143.

Scholz, A., Appel, N., & Vogel, W. (1998a). Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive Na⁺ channel in rat dorsal root ganglion neurons and their blockade by halothane. *European Journal of Neuroscience* **10**, 2547-2556.

Scholz, A., Groß, M., & Vogel, W. (1998b). Properties and functions of calcium-activated K⁺ channels in small neurones of rat dorsal root ganglion studied in a thin slice preparation. *Journal of Physiology* **513**, 55-69.

-
- Scholz, A., Krause, U., Reid, G., & Vogel, W. (1999). Somata of nociceptive neurons in an enzyme-free preparation of rat DRG show small responses to Capsaicin and protons. *Journal of Neuroscience* **25**, 1043.
- Sezaki, M., Sasaki, T., Nakazawa, T., Takeda, U., Iwata, M., Watanabe, T., Koyama, M., Kai, F., Shomura, T., & Kojima, M. (1985). A new antibiotic SF-2370 produced by *Actinomadura*. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **38**, 1437-1439.
- Skwish, S. & Shain, W. (1990). Ethanol and diolein stimulate PKC translocation in astroglial cells. *Life Sciences* **47**, 1037-1042.
- Slater, S. J., Cox, K. J., Lombardi, J. V., Ho, C., Kelly, M. B., Rubin, E., & Stubbs, C. D. (1993). Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. *Nature* **364**, 82-84.
- Slater, S. J., Kelly, M. B., Larkin, J. D., Ho, C., Mazurek, A., Taddeo, F. J., Yeager, M. D., & Stubbs, C. D. (1997). Interaction of alcohols and anesthetics with protein kinase Calpha. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 6167-6173.
- Slater, S. J., Kelly, M. B., Taddeo, F. J., Rubin, E., & Stubbs, C. D. (1994). Evidence for discrete diacylglycerol and phorbol ester activator sites on protein kinase C. Differences in effects of 1-alkanol inhibition, activation by phosphatidylethanolamine and calcium chelation. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 17160-17165.
- Snider, W. D. & McMahon, S. B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* **20**, 629-632.
- Steiner, J., Kirsteins, L., LaPaglia, N., Lawrence, A., Williams, D., Emanuele, N., & Emanuele, M. (1997). The effect of acute ethanol (EtOH) exposure on protein kinase C (PKC) activity in anterior pituitary. *Alcohol* **14**, 209-211.
- Suzuki, T. & Okumura-Noji, K. (1995). NMDA receptor subunits epsilon 1 (NR2A) and epsilon 2 (NR2B) are substrates for Fyn in the postsynaptic density fraction isolated

- from the rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **216**, 582-588.
- Tabakoff, B. & Hoffman, P. L. (1996). Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron* **16**, 909-912.
- Tamaoki, T. & Nakano, H. (1990). Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Biotechnology (N.Y.)* **8**, 732-735.
- Tanaka, C. & Nishizuka, Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annual Review of Neuroscience* **17**, 551-567.
- Taylor, S. S. & Radzio-Andzelm, E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*. **2**, 345-355.
- Treistman, S. N., Bayley, H., Lemos, J. R., Wang, X. M., Nordmann, J. J., & Grant, A. J. (1991). Effects of ethanol on calcium channels, potassium channels, and vasopressin release. *Annals of the New York Academy of Sciences* **625**, 249-263.
- Uehara, K., Yamagishi, S., Otsuki, S., Chin, S., & Yagihashi, S. (2004). Effects of polyol pathway hyperactivity on protein kinase C activity, nociceptive peptide expression, and neuronal structure in dorsal root ganglia in diabetic mice. *Diabetes* **53**, 3239-3247.
- Valenzuela, C. F., Machu, T. K., McKernan, R. M., Whiting, P., VanRenterghem, B. B., McManaman, J. L., Brozowski, S. J., Smith, G. B., Olsen, R. W., & Harris, R. A. (1995). Tyrosine kinase phosphorylation of GABA_A receptors. *Molecular Brain Research* **31**, 165-172.
- Valverde, A. M., Sinnott-Smith, J., Van Lint, J., & Rozengurt, E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 8572-8576.

-
- Vijayaragavan, K., Boutjdir, M., & Chahine, M. (2004). Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Journal of Neurophysiology* **91**, 1556-1569.
- Vogel, W. & Schwarz, J. R. (1995). Voltage-clamp studies in Axons: Macroscopic and single-channel currents. In *The Axon*, eds. Waxman, S. G., Kocsis, J. D., & Stys, P. K., pp. 257-280. Oxford University Press, Oxford.
- Wallner, M., Hancher, H. J., & Olsen, R. W. (2003). Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15218-15223.
- Wang, Y. T. & Salter, M. W. (1994). Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature* **369**, 233-235.
- Wang, Z. W., Kunkel, M. T., Wei, A., Butler, A., & Salkoff, L. (1999). Genomic organization of nematode 4TM K⁺ channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* **868**, 286-303.
- West, J. W., Numann, R., Murphy, B. J., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1991). A phosphorylation site in the Na⁺ channel required for modulation by protein kinase C. *Science* **254**, 866-868.
- Wetsel, W. C., Khan, W. A., Merchenthaler, I., Rivera, H., Halpern, A. E., Phung, H. M., Negro-Vilar, A., & Hannun, Y. A. (1992). Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *Journal of Cell Biology* **117**, 121-133.
- Wolff, H. G., Hardy, J. D., & Goodell, H. (1941). Measurement of the effect on the pain threshold of acetylsalicylic acid, acetanilid, acetophenetidin, aminopyrine, ethylalcohol, trichlorethylene, a barbiturate, quinine, ergotamine, tartrate and caffeine:

-
- an analysis of their relation to the pain experience. *Journal of Clinical Investigation* **20**, 63.
- Wolff, H. G., Hardy, J. D., & Goodell, H. (1942). Studies on pain: measurement of the effect of ethyl alcohol on the pain threshold and on the "alarm" reaction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **75**, 38.
- Woodrow, K. M. & Eltherington, L. G. (1988). Feeling no pain: alcohol as an analgesic. *Pain* **32**, 159-163.
- Wu, J. V. & Kendig, J. J. (1998). Differential sensitivities of TTX-resistant and TTX-sensitive sodium channels to anesthetic concentrations of ethanol in rat sensory neurons. *Journal of Neuroscience Research* **54**, 433-443.
- Wu, L., Karpinski, E., Wang, R., & Pang, P. K. (1992). Modification by solvents of the action of nifedipine on calcium channel currents in neuroblastoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **345**, 478-484.
- Yu, X. M., Askalan, R., Keil, G. J., & Salter, M. W. (1997). NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science* **275**, 674-678.
- Zhou, Y., Zhou, Z. S., & Zhao, Z. Q. (2001). PKC regulates capsaicin-induced currents of dorsal root ganglion neurons in rats. *Neuropharmacology* **41**, 601-608.

édition scientifique
WB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5080-0



9 783835 195080

