Molekulare Interaktion von Lidocain mit dem isolierten tetrodotoxinresistenten Natriumkanal vom Typ Nav1.8

exprimiert in humanen embryonalen Nierenstammzellen HEK293

JAN FRESE



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin 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 2007

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 2007

© 2007 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

Molekulare Interaktion von Lidocain mit dem isolierten tetrodotoxinresistenten Natriumkanal vom Typ Na_V1.8

exprimiert in humanen embryonalen Nierenstammzellen HEK293

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Jan Frese

aus Münster

Gießen, im September 2006

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

Gutachter:Priv.-Doz. Dr. M. E. BräuGutachter:Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation:18. Juni 2007, Bad Nauheim

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung und Motivation	1			
	1.1	Schmerz und Schmerztherapie				
	1.2	Anatomie und Physiologie der Nozizeption	3			
		1.2.1 Zellphysiologie	4			
		1.2.2 Erregungsleitung und Informationsverarbeitung	5			
	1.3	Lokalanästhetika	7			
	1.4	Ionenpermeation in Ionenkanälen	9			
		1.4.1 Multi-Ion-Single-File-Modell	9			
		1.4.2 Markov-Modelle	11			
	1.5	Der spannungssensitive Natriumkanal	13			
		1.5.1 Vorkommen und Bedeutung	14			
		1.5.2 Struktur und Funktion	16			
		1.5.3 Mechanismen der Natriumkanalblockade	20			
		1.5.4 Der tetrodotoxinresistente Natriumkanal	23			
	1.6	Aufgabenstellung	28			
2	Mat	erial und Methoden	31			
	2.1	Die "patch-clamp" - Technik	31			
	2.2	Experimenteller Aufbau	34			
		2.2.1 Lösungen und Lösungswechsel	~ ~			
			36			
		2.2.2 Datenerfassung und Auswertung	36 37			
	2.3	2.2.1 Dosungen und Dosungsweenser	36 37 38			
	2.3	2.2.1 Dosungen und Dosungsweenser	36 37 38 39			
	2.3	2.2.1Dosungen und Dosungsweenser	36 37 38 39 40			
3	2.3 Erge	2.2.1 Dostangen und Dostangsweenser	 36 37 38 39 40 			
3	2.3 Erge 3.1	2.2.1 Lossingen und Lossingsweenser	36 37 38 39 40 43 43			
3	2.3 Erge 3.1 3.2	2.2.1 Lossingen und Lossingsweenser	36 37 38 39 40 43 43 47			
3	2.3 Erge 3.1 3.2	2.2.1 Dostangen und Dostangsweenser	36 37 38 39 40 43 43 47 48			
3	2.3 Erge 3.1 3.2	2.2.1 Dostingsweenser 1 2.2.2 Datenerfassung und Auswertung 1 Humane embryonale Nierenstammzellen 1 2.3.1 Klonierung des Natriumkanals 1 2.3.2 Zellkultur 1 2.3.2 Zellkultur 1 bisse 1 Spannungsabhängige Aktivierung und Inaktivierung 1 3.2.1 Tonischer und phasischer Block 1 3.2.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Lidocainblockade 1	36 37 38 39 40 43 43 43 47 48 51			
3	2.3 Erge 3.1 3.2	2.2.1 Dosungen und Dosungsweenser	36 37 38 39 40 43 43 47 48 51 52			
3	2.3 Erge 3.1 3.2	2.2.1 Dosungen und Dosungsweenser	36 37 38 39 40 43 43 47 48 51 52 54			

		3.2.6	Refraktärzeit und Reaktivierung unter Lidocainwirkung	61
4	Disk	ussion		65
	4.1	Spann	ungsabhängigkeit der Natriumkanalfunktion	66
	4.2	Kanalt	blockade mit Lidocain	66
		4.2.1	Der tonische Block	66
		4.2.2	Der "use-dependent"-Block	67
		4.2.3	Der dynamische Block	68
	4.3	$Na_v 1.8$: klinische und therapeutische Aspekte	73
	4.4	Ausbli	ck	76
5	Zusa	ammen	fassung	79
Literaturverzeichnis				
Da	nksa	gung		95
Le	Lebenslauf			

Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformel von Lidocain	8
1.2	Energieprofil der Ionenpermeation	10
1.3	Aktivitätszustände eines Natriumkanals	13
1.4	Unterschied in den Aminosäurensequenzen von Natriumkanälen .	15
1.5	Sekundärstruktur des Natriumkanals	17
1.6	Tertiärstruktur des Natriumkanals	18
1.7	Bindungsstelle für Lokalanästhetika	21
1.8	Der japanische Kugelfisch	23
1.9	Aminosäurensequenz des Na _v 1.8 Kanals	24
2.1	Der "patch-clamp" - Versuchsstand	32
2.2	Die "patch-clamp" - Methode	33
2.3	Schaltbild der "whole-cell"-Ableitung	35
3.1	Impulsprotokoll und exemplarische Originalregistrierung	44
3.2	Strom-Spannungskurve der Na _v 1.8 Kanäle	46
3.3	Aktivierungs- und Inaktivierungskurven des Natriumstromes	48
3.4	Originalregistrierungen der Lidocainblockade	50
3.5	Konzentrations-Wirkungs-Beziehung am Natriumkanal	53
3.6	Dynamische Blockade des Natriumstromes	56
3.7	Konzentrations-Wirkungsbeziehung des dynamischen Blocks	60
3.8	Wiederauslösbarkeit des Nav 1.8-Natriumstromes	63
4.1	Blockade des Natriumkanals durch Lidocain	69

Tabellenverzeichnis

1.1	Klassifikation peripherer Nervenfasern	7
$2.1 \\ 2.2$	Zusammensetzung der kristallinen Lösungen	37 40
3.1	Halb maximale Blockierungskonzentration von Lidocain $\ .\ .\ .$.	52
3.2	Zeitkonstante und relativer Strom des Offenkanalblocks	55
3.3	Dosis-Wirkungsbeziehung des dynamischen Blocks	58
3.4	Erholungszeiten vom dvnamischen Block	62

Kapitel 1

Einleitung und Motivation

1.1 Schmerz und Schmerztherapie

Dem Schmerz als Symptom sowie dessen Linderung kommt in der modernen Medizin eine sehr große und stetig wachsende Bedeutung zu. Die Anästhesiologie befaßt sich als eigenständige klinische Disziplin mit der Vermeidung und Behandlung von Schmerzen.

Schmerz ist zunächst einmal ein physiologisch notwendiger Sinneseindruck, der eine Störung der physischen oder funktionellen Integrität des Körpers signalisiert. Eine Gewebsschädigung, z.B. durch Hitze, löst auf unbewußter Ebene einen Vermeidungsreflex aus, der das exponierte Körperteil von der Wärmequelle entfernt. Weiterhin wird die unangenehme Erinnerung an den Schmerz die betroffene Person in Zukunft vorsichtiger handeln lassen, zum Schutz vor weiteren Schädigungen. Sehr häufig ist der Schmerz der Anlaß für einen Menschen, sich einer medizinischen Untersuchung und Behandlung zu unterziehen. Aber auch medizinische Eingriffe selbst können sehr schmerzhaft sein und erfordern eine gezielte und wissenschaftlich fundierte Schmerztherapie.

Die Schmerzempfindung ist eine Leistung des Nervensystems. Schmerzen werden

durch periphere Nervenfasern elektrisch übertragen, ebenso wie andere eingehende Informationen wie Sinneseindrücke oder efferente Steuerbefehle an die Muskulatur. Diese elektrische Übertragung kann heute mit einer großen Bandbreite an Pharmaka beeinflußt werden, die mehr oder weniger spezifisch den Schmerz bekämpfen. Lokalanästhetika wie das hier verwendete Lidocain blockieren neben dem Schmerz auch alle anderen Qualitäten der Informationsvermittlung. Bei der lokalen Applikation wie bei Operationen in einem umgrenzten Gebiet ist dies von Vorteil, aber auch der Grund, warum es in einer zur Schmerztherapie nötigen Dosierung in der Regel nur lokal und kurzfristig eingesetzt werden kann.

Systemisch appliziert zeigt das Lidocain seine Wirkung auf verschiedene Systeme der Erregungsleitung, hier wird es zum Beispiel auch zur Therapie von Rhythmusstörungen eingesetzt. Bei chronischen Schmerzen ist eine lokale Schmerztherapie auch wegen der Beteiligung übergeordneter Reizverarbeitungssysteme oft nicht möglich, während eine systemische Schmerztherapie wegen der genannten Nebenwirkungen nur eingeschränkt erfolgen kann. Wünschenswert wäre ein Pharmakon, das die Schmerzen eines Patienten aufhebt oder lindert, ohne die dadurch gewonnene Lebensqualität durch eine Vielzahl unerwünschter Effekte zu beeinträchtigen. Das "ideale" Lokalanästhetikum, welches ausschließlich das nozizeptive System ausschaltet, ohne andere physiologische Erregungsleitungen zu stören, ist jedoch nicht erhältlich.

Zur Behandlung von chronifizierten Schmerzen, wie etwa durch Tumore ausgelösten Schmerzen oder bei rheumatischen Erkrankungen, werden daher andere, zentral wirksame Therapeutika wie Opioide (z.B. Morphin), Neuroleptika (z.B. Promethazin) und Antidepressiva (z.B. Amitriptylin) eingesetzt. Am schwierigsten gestaltet sich die Behandlung sogenannter neuropathischer Schmerzen, ein Begriff, der mit "Krankheit des Nerven" übersetzt werden könnte. Das pathologischanatomische Korrelat dieses Krankheitsbildes ist nur schwer auszumachen und beruht wahrscheinlich auf einer Änderung der molekularen Struktur der erkrankten peripheren Nervenzellen und auf veränderten Signalverarbeitungsprozessen im zentralen Nervensystem. Dies tritt etwa im Falle des Phantomschmerzes auf, in dem der Patient subjektiv Schmerzen in einem amputierten Körperteil empfindet. Diesen Patienten kann heute mit zunehmenden Erfolg mit neuen Therapiekonzepten geholfen werden.

Natriumkanalblocker, die den verschiedensten Bereichen der Pharmakotherapie entstammen, zeigen in der Therapie chronischer Schmerzen gute therapeutische Ergebnisse. Neben den klassischen Lokalanästhetika kommen Antiarrhythmika oder Antikonvulsiva wie Mexiletin, Carbamazepin [TANELIAN und BROSE 1991] und Phenytoin zum Einsatz. Andere auf ihre gute Wirksamkeit überprüfte Substanzen sind Antidepressiva wie Amitriptylin [RICHEIMER et al. 1997], bei dem eine natriumkanalblockierende Wirkung sehr wahrscheinlich ist [WANG et al. 2004], oder Memantin [CARLTON und HARGETT 1995] mit möglicher Natriumkanalblockade [BRÄU et al. 2001]. Andere Wirkmechanismen bei der Schmerzbekämpfung kennzeichnen das Gabapentin [ROSNER et al. 1996] und Pregabalin [FREYNHAGEN et al. 2005]. Sie blockieren spannungsabhängige Calciumkanäle [MCCLELLAND et al. 2004].

1.2 Anatomie und Physiologie der Nozizeption

Auslöser für Schmerzen sind Gewebsschädigungen, die mechanischer, thermischer chemischer oder entzündlicher Natur sein können. Lokal werden aus den beschädigten Zellen Substanzen (Kaliumionen, Protonen, Serotonin, Histamin) ausgeschüttet, die Nozizeptoren stimulieren. Auch bei Entzündungsvorgängen spielt die Änderung des chemischen Milieus eine bedeutende Rolle. Diese ist nicht allein Auslöser des Schmerzes, sondern führt durch Prostaglandin zu einer Sensibilisierung des schmerzvermittelnden Systems. Der Begriff Nozizeptor bezeichnet in seiner umfassenderen Bedeutung hierbei den Nervenzellkörper mit Axon und in die jeweiligen Gewebe vordringender freier Nervenendigung.

1.2.1 Zellphysiologie

Alle Gewebe und Zellen des menschlichen Körpers besitzen die für sie lebensnotwendige Fähigkeit, mittels aktiver oder passiver Transportvorgänge Konzentrationsgradienten von Ionen zwischen ihrem Soma und dem umgebenden Extrazellularraum aufzubauen. Dies kann etwa zur Nahrungsaufnahme oder zur Beseitigung von Abfallstoffen dienen. Im Falle der Nervenzellen werden die hieraus resultierenden elektrischen Membrandiffusionspotentiale zur Informationsübermittlung genutzt, wie bereits Bernstein [BERNSTEIN 1902] in seiner wegweisenden Membranhypothese postulierte.

In neuronalen Zellen herrscht durch den Ionengradienten an der Lipiddoppelmembran eine elektrische Potentialdifferenz von -60 mV bis -90 mV des Intrazellularraumes (IZR) gegenüber dem Extrazellularraum (EZR). Diese negative Innenladung wird hervorgerufen durch aktive Transporter, so die Natrium-Kalium-Ionenpumpe, die im Austausch Natriumionen nach außen und Kaliumionen nach innen transportiert. Die Konzentrationsverhältnisse im Innern gegenüber Außen liegen in einer gesunden Zelle für Kalium bei 35 zu 1, für Natrium dagegen bei 1 zu 28. Die Zellmembran ist im Ruhezustand für Kaliumionen durchlässig. Durch diesen Aufbau zweier Elektrolyträume, die durch eine für bestimmte Ionen durchlässige semipermeable Membran getrennt sind, wird eine elektrische Potentialdifferenz erzeugt. Das Ruhemembranpotential liegt nahe dem Gleichgewichtspotential von Kalium, entsprechend dem frei permeierenden Kaliumion. Mit Hilfe der Nernstschen Gleichung (Gleichung 1.1) und Kenntnis der vorliegenden Ionenkonzentrationen kann die Potentialdifferenz E_I berechnet werden.

Die entscheidende Funktion der Nervenzellen ist ihre Fähigkeit, auf Einwirkung von außen ihr Membranpotential zu verändern und diese Veränderung entlang des Axons elektrisch fortzuleiten. Wird die Zelle etwa durch einen mechanischen, thermischen, chemischen oder elektrischen Reiz erregt, so läuft lokal in ihren Ausläufern innerhalb einer Millisekunde eine komplexe Kaskade von Ionenverschie-

(1.1)
$$E_I = \frac{RT}{Fz_I} \times \ln \frac{[I_a]}{[I_i]}$$

 $\mathbf{R} = \text{allgemeine Gaskonstante } [8,315 \ \mathrm{J}\cdot\mathrm{mol}^{-1}\cdot\mathrm{K}^{-1}] \quad \mathbf{z}_I = \mathrm{Anzahl} \ \mathrm{der} \ \mathrm{Ladungen} \ \mathrm{des} \ \mathrm{Ions} \ \mathrm{I}$

 $F = Faraday-Konstante [9,64 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}]$

 $[I_a] =$ Außenkonzentration des Ions

T = absolute Temperatur [K]

 $[I_a]$ = Autenkonzentration des Ions $[I_i]$ = Innenkonzentration des Ions

bungen ab: Bei Erreichen eines Schwellenpotentials werden spannungsabhängige Natriumkanäle geöffnet; aufgrund des großen Konzentrationsgradienten strömen nun positiv geladene Natriumionen ein und über der Zellmembran findet eine Potentialumkehr statt. Als Aktionspotential (AP) bezeichnet man die Umkehrung des Membranpotentials in den positiven Bereich. Die Rückkehr zum Ruhemembranpotential, die Repolarisation, wird durch die Inaktivierung der Natriumkanäle eingeleitet. Darauf öffnen Kaliumkanäle, welche durch den Ausstrom positiv geladener Kaliumionen die Rückkehr zum negativen Membranpotential beschleunigen.

1.2.2 Erregungsleitung und Informationsverarbeitung

Das durch eine Reizung der Nervenzelle ausgelöste Aktionspotential wird durch eine sich fortschreitende Erregung der Membran des Axons fortgeleitet. Durch die lokale Membranumladung werden benachbarte Abschnitte der Zellmembran depolarisiert und lösen bei Erreichen der Schwellenspannung wiederum ein Aktionspotential aus. Der elektrische Impuls wird in nur in eine Richtung fortgeleitet, da sich die Ionenkanäle zurückliegender Membranabschnitte in einem inaktiven, nicht erregbaren Zustand befinden.

Die elektrischen Eigenschaften eines Axons sind durch seinen Durchmesser und durch den Aufbau der Lipiddoppelmembran bedingt, die den Intrazellularraum vom Extrazellularraum elektrisch isoliert. Je größer der Querschnitt eines Leiters, desto geringer ist der Leitungswiderstand, was zu einer höheren Überlei-

tungsgeschwindigkeit der fortschreitenden Erregung längs des Axons führt. Diese Geschwindigkeit wird auch durch die Umladungszeit über der Membran bestimmt, welche sich umgekehrt proportional zur Membrankapazität verhält. Der zweischichtige Aufbau der Zellmembran gleicht dem eines Kondensators: zwei gegensätzlich geladene Leiterflächen sind elektrisch voneinander isoliert. Eine gute Isolierung oder Vergrößerung des Abstandes beider Leiter führt zu einer kleineren Membrankapazität und damit einer höheren Leitungsgeschwindigkeit. Dies wird durch eine von Schwann-Zellen gebildete Myelinscheide erreicht, die das Axon zwiebelschalenartig umschließt. Die Myelinscheide bewirkt eine elektrische Isolierung der Nervenbahn und erhöht damit die Leitungsgeschwindigkeit der eingeschlossenen Faser. Der Einstrom von Natriumionen und die Potentialumkehr kann erst weit entfernt am nächsten freien Membranfleck, dem Ranvierschen Schnürring stattfinden (Saltatorische Erregungsleitung [HILLE 1992]). So werden die hohen Leitungsgeschwindigkeiten von 70-120 m/s etwa der Skelettmuskelefferenzen erreicht. In der Peripherie werden auf diese Weise durch die Axone der Neurone Informationen über weite Strecken übermittelt.

Anatomisch und funktionell unterscheidet man Nervenfasern mit und ohne Myelinscheide, die, determiniert durch ihre jeweiligen physikalischen Eigenschaften, unterschiedliche Information übermitteln. Nach der Einteilung der Faserqualitäten von [ERLANGER und GASSER 1932] sind an der Übertragung von Schmerzreizen vor allem dünne A δ -Fasern und nicht myelinisierte C-Fasern beteiligt (siehe Tabelle 1.1). Die Erregung von A δ -Fasern ruft eine schnell auftretende, gut lokalisierbare Schmerzempfindung hervor, die Erregung von C-Fasern führt zu einem dumpfen, schlecht lokalisierbaren und spät einsetzenden Schmerz [DUDEL 2000], [ZENKER et al. 1993]. Unter pathologischen Bedingungen können bei einer Verschiebung des Ruhemembranpotentials in den weniger negativen Bereich allein durch Überschreiten der Aktivierungsschwelle der Natriumkanäle spontane Aktionspotentiale ausgelöst werden [ELLIOTT 1997], welche als Schmerz empfunden werden. Die Stärke eines Sinneseindruckes wird durch die Anzahl der gleichförmigen elektrischen Impulse pro Zeiteinheit kodiert. Im zentralen Nervensystem ist das Aktionspotential Grundlage der Informationsverarbeitung: Durch Vernetzung vieler Neurone werden die vielen ankommenden Aktionspotentiale der afferenten Fasern aufsummiert und verrechnet, womit zum Beispiel eine gezielte Reaktion über efferente Neurone ausgelöst werden kann.

Fasertyp	Funktion	Durchmesser	Geschwindigkeit
		$[\mu m]$	[m/s]
$A\alpha$	Muskelspindelafferenzen, Skelettmuskelefferenzen	z 15	70 - 120
$A\beta$	Hautafferenz für Berührung und Druck	8	30 - 70
$A\gamma$	Muskelspindelefferenz	5	15 - 30
$A\delta$	Hautafferenz für Temperatur und Nozizeption	≤3	12 - 30
В	Präganglionäre sympathische Efferenz	3	3 - 15
С	Nozizeption, postganglionäre sympath. Efferen	nz 1	0,3 - 2

Tabelle 1.1: Klassifikation der peripheren Nervenfasern nach [ERLANGER und GASSER 1932].

1.3 Lokalanästhetika

Das pharmakologische Wirkprinzip von Lokalanästhetika ist die Verhinderung der Signalausbreitung entlang einer Nervenfaser durch Blockade von Natriumkanälen [HARRISON 1985]. Eine Reihe anderer Klassen von Pharmaka ist ebenfalls dazu in der Lage, wie Antiarrhythmika der Klasse I nach Vaughan Williams [VAUGHAN WILLIAMS 1984], Antikonvulsiva wie Carbamazepin und Antidepressiva wie Amitriptylin. Chemisch gemeinsam besitzen die Lokalanästhetika einen Benzolring mit unterschiedlich substituierten Seitenketten, darin eine Amid- oder Esterbindung. Das in dieser Arbeit verwendete Lidocain ist ein Lokalanästhetikum vom Amid-Typ (Abbildung 1.1) mit einer mittleren Wirkdauer von 120 Minuten, das als erster Vertreter dieser Gruppe 1941 von Nils Löfgren und Bengt Lundqvist synthetisiert wurde. Aufgrund seiner Wirkung auf kardiale Natriumkanäle wird es auch als Antiarrhythmikum eingesetzt (zum Überblick siehe [STRICHARTZ und COVINO 1987]). Es liegt bei physiologischem pH-Wert ungeladen und damit in lipophiler Form vor. Für seine Wirkung ist dies unerläßlich, da Lokalanästhetika die Lipiddoppelmembran der Zelle durch Diffusion durchdringen und ihren Wirkort von intrazellulär erreichen. In entzündetem Gewebe mit einem niedrigeren pH-Wert wird der Stickstoff des Lidocains stärker protoniert (99,9% bei einem pH von 5,0), das Molekül ist geladen und damit lipophob, was die Diffusion durch die Membranen der lokalen Schmerzfasern verhindert. So bringt es bei Entzündungsschmerz kaum Linderung.

Chemisch gesehen handelt es sich um 2-Diethylamino-N-[2,6-Dimethylphenyl]acetamid mit der Summenformel $C_{14}H_{22}N_2O$. Die Molekulare Masse beträgt 234,3 g/mol und der pK_a liegt bei 8,2. Über die anästhetische Wirkung hinausgehend sind für Lokalanästhetika immunmodulatorische und cerebroprotektive Eigenschaften beschrieben, deren Wirkmechanismus bisher nicht über die Natriumkanalblockade erklärt werden konnte [PECHER et al. 2004].



Abbildung 1.1: Strukturformel von Lidocain.

1.4 Ionenpermeation in Ionenkanälen

Zum Verständnis der Funktionsweise von Ionenkanäle sind für diese komplexen Proteine mathematische und biophysikalische Modelle entwickelt worden, die den Mechanismus des Transportes der Ionen durch den Kanal erklären sollen. Hodgkin und Huxley stellten nach ihrer Entdeckung der elektrischen Exzitation von Riesenaxonen das erste quantitative thermodynamische Modell vor [HODGKIN et al. 1952]. Dieses Modell betrachtet die Schaltvorgänge von Ionenkanälen unter den Grundsätzen der Thermodynamik in Bezug auf den Energieerhaltungssatz und den zweiten Hauptsatz der geringsten Entropie eines Systems. Für den Natriumkanal beschrieb Hille 1975 ein Energiestufenmodell, nach dem das Natriumion in der Pore von außen nach innen über vier geladene "Energiebarrieren" in den Intrazellularraum gelangt. Dabei kommt nur ein Ion zur gleichen Zeit in der Kanalpore vor. Dieser Vorgang ist zum Beispiel über das Membranpotential von außen beeinflußbar [HILLE 1975].

Neben diesem sogenannten Permeationsmodell sind weitere Gating-Modelle entwickelt worden. Permeationsmodelle beschreiben den Transport von Ionen durch den Kanal, während Gating-Modelle das Verhalten eines Ionenkanals bei Übergängen zwischen verschiedenen aktiven und inaktiven Zuständen zu erklären versuchen [DESTEXHE und HUGUENARD 2000]. Für diese Arbeit von Bedeutung sind das Verständnis der Ionenpermeation und die Markov-Modelle der Schaltvorgänge, die im folgenden erläutert werden. (Zum Überblick siehe [BEGENISICH 1987])

1.4.1 Multi-Ion-Single-File-Modell

In dem Energiestufenmodell von Hille 1975 als Vorläufer dieses Permeationsmodells wird von einem einzigen Ion ausgegangen, das die Pore durchquert. Weil dieses einfache Modell für die Beschreibung der elektrophysiologischen Eigenschaften



Abbildung 1.2: Erweitertes Energiestufenmodell der Ionenpermeation zweier verschiedener Kaliumkanäle nach [HILLE und SCHWARZ 1978]. Der Extrazellularraum befindet sich links (OUT) und der Intrazellularraum rechts (IN). Es existieren mehrere Bindungsstellen (in A zwei und in B drei Bindungsstellen), die jeweils von einem Ion besetzt werden können. G bezeichnet die freie Enthalpie (Gibb) der Energiebarrieren und der Bindungsstellen.

einiger Messungen nicht ausreichte, wurde das Multi-Ion-Single-File-Modell von Hille und Schwarz vorgeschlagen [HILLE und SCHWARZ 1978] und von anderen weiter modifiziert [URBAN und HLADKY 1979].

Es wird angenommen, daß mehrere Energiebarrieren im Kanal existieren (Abbildung 1.2), so daß sich mehrere Ionen gleichzeitig im Kanal aufhalten (Multi-Ion), einander aber nicht passieren können (Single-File). Gelangt ein Ion auf den energetisch niedrigsten Zustand zwischen zwei Barrieren, so spricht man von der Besetzung einer Bindungsstelle. Nach dem Multi-Ionen-Einporen-Modell können mehrere Bindungsstellen gleichzeitig besetzt werden. Die höchste Schwelle ist für den Eintritt in die Pore aus dem Extrazellularraum zu überwinden. Sobald sich das Ion auf der ersten Bindungsstelle befindet, kann es durch ein nachfolgendes Ion aus der Bindung geschlagen werden oder durch Coulombsche Feldkräfte getrieben weiter ins Innere zur nächsten freien Bindungsstelle wandern. Die notwendige Reaktionsenergie ist für den Wechsel von der ersten zur nächsten Bindungsstelle niedriger als die zum Wechsel zurück ins Außenmedium notwendige, wodurch eine nach innen gerichtete Diffusionskraft zusätzlich zum Konzentrationsgradienten entsteht. Die Ionen innerhalb des Kanals zeigen eine gegenseitige Abstoßung. Im geschlossenen Zustand ist das Energieprofil durch eine Konformationsänderung des Kanalproteins bezüglich der Eintrittsschwelle so ungünstig verändert, daß keine Ionenpermeation stattfinden kann. So wird die Existenz eines "Tores" postuliert, das bei spannungsabhängiger Aktivierung öffnet. Die mathematische Beschreibung dieses "Gating"-Prozesses wird durch die Definition eines Markovschen Schaltbildes beschrieben.

1.4.2 Markov-Modelle

Markov-Modelle beschreiben das Schaltverhalten eines Ionenkanals mathematisch und werden als formale Gating-Modelle bezeichnet [DESTEXHE et al. 1994]. Es werden verschiedene Aktivitätszustände postuliert, die der Kanal annehmen kann und die über meßbare physikalische Parameter voneinander differenziert werden können. Dies sind der geschlossene Kanal (Symbol **R**, kein Stromfluß), der offene Kanal (Symbol **O**, Stromfluß) und der inaktivierte Kanal (Symbol **I**, kein Stromfluß, keine erneute Aktivierung möglich). Darüber hinaus werden diese Grundzustände zur Erklärung gewisser elektrophysiologischer Phänomene im Ganzzell- und Einzelkanalexperiment noch unterteilt in sogenannte "hidden-Markov" oder "aggregated-Markov"-Zustände. Diese lassen sich mathematisch, nicht jedoch meßtechnisch voneinander unterscheiden und tragen das gleiche Symbol. Über stochastische Ratenkonstanten gehen diese Zustände linear oder verzweigt in einen anderen über.

Eine wichtige Grundannahme eines Markov-Modells ist, daß die Wahrscheinlich-

(1.2)
$$\frac{dP(t)}{dt} = P(t) \times K$$

$$(1.3) P(t) = e^{Kt}$$

keit eines Übergangs nicht von den Wahrscheinlichkeiten anderer Übergänge beeinflußt wird, das System also kein Gedächtnis besitzt. Eine weiter Voraussetzung ist die Linearität des Systems: Die Ratenkonstanten sind nicht von der vorbestehenden Besetzung der Zustände abhängig [COLQUHOUN und HAWKES 1977].

Im Falle eines einfachen hidden-Markov-Modells für den Natriumkanal (Abbildung 1.3) existieren zwei diskrete Ruhezustände. Wird die Zelle gereizt, so durchlaufen ihre Natriumkanäle vom Zustand $\mathbf{R_1}$ zunächst $\mathbf{R_2}$, bevor sie öffnen und Natriumionen fließen. Das Zeitverhalten des Modells (Gating) wird mathematisch durch ein System von Differentialgleichungen (Gleichung 1.2) beschrieben, das mit einer Exponentialfunktion gelöst werden kann (Gleichung 1.3).

Dabei ist P(t) ein Vektor, dessen Elemente aus den relativen Häufigkeiten für die Besetzung jeden Zustandes bestehen. Die Matrix K bildet sich aus den auf die Zeit t normierten Ratenkonstanten a,b,c [BLUNCK et al. 1998]. Die Bestimmung der Aufenthaltszeiten in einem Bereich des Modells benötigt eine Summe von Exponentialfunktionen, die im Falle des Natriumkanals unterschiedliche Zeitkonstanten aufweisen. Dies ist ein Hinweis auf voneinander unabhängige "hidden"-Zustände. Die empirischen Daten der "patch-clamp"-Experimente werden differenziert und ein bestmögliches Modell angepaßt [DESTEXHE und HUGUENARD 2000] [SCHRÖDER et al. 2004]. In der Abbildung 1.3 ist die Situation zweier aggregierter Ruhezustände wiedergegeben, die auch zur Erklärung einer nach Reizung verzögerten Öffnung des Kanals beitragen. [FAROKHI et al. 2000].



Abbildung 1.3: Markov-Schema der Aktivität eines Natriumkanals. Obere Reihe: In Abwesenheit eines Pharmakons existieren zwei diskrete Ruhezustände (R_1, R_2) , ein offener (O) und ein inaktiver Zustand (I). Die Übergänge erfolgen in beide Richtungen mit den Wahrscheinlichkeiten der Hinreaktion a_1 , b_1 , c_1 und denen der Rückreaktion a_{-1} , b_{-1} , c_{-1} . Untere Reihe: In Gegenwart eines Natriumkanalblockers (B) erscheinen die entsprechenden Zustände formal im blockierten Status (Zusatz -B). Das später erläuterte Konzept des dynamischen Blocks oder Offenkanalblocks legt nahe, daß zwischen R_2 und R_2B jedoch kein Übergang stattfinden kann, da es erst nach Öffnung des Kanals zur Blockade kommt $(O \rightleftharpoons OB)$.

1.5 Der spannungssensitive Natriumkanal

In den späten vierziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts konnte mit der neuentwickelten Technik der Spannungsklemme eine Änderung der Membranleitfähigkeit einer Nervenzelle während eines Aktionspotentials nachgewiesen werden [COLE 1949]. An Riesenaxonen der Tintenschnecke fanden Hodgkin, Huxley und Katz als Ursache dafür eine Änderung der Membrandurchlässigkeit für bestimmte Ionen [HODGKIN und HUXLEY 1952a] - [HODGKIN et al. 1952].

Unter anderem mit Hilfe der 'Patch-Clamp'-Technik (siehe Kapitel 2.1) konnte dieser Effekt Ionenkanälen mit spannungsabhängigen Öffnungsmechanismus, darunter in besonders großer Zahl spannungsabhängigen Natriumkanälen zugeschrieben werden. Bis heute wurde eine große Anzahl verschiedener Ionenkanäle des peripheren Nerven beschrieben [JONAS et al. 1989], [KOH et al. 1992], [VO-GEL und SCHWARZ 1995].

1.5.1 Vorkommen und Bedeutung

In den Neunziger Jahren nahm vor allem durch die Entwicklung molekularbiologischer Methoden das Wissen über Natriumkanäle sprunghaft zu. Es konnten verschiedene Natriumkanäle isoliert werden, die den unterschiedlichsten Geweben und Spezies entstammten. Mit der "Patch-Clamp" Methode wurden diese Kanäle auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften hin untersucht.

In elektrisch erregbaren Geweben gehören spannungsabhängige Natriumkanäle zu den am häufigsten vorkommenden Ionenkanälen. Natriumkanäle können aus einem nichtleitenden Ruhezustand in einen leitenden Offenzustand übergehen. Die Latenzzeit und der zeitliche Verlauf der Aktivierung werden durch die Zeitkonstanten der Aktivierung wiedergegeben. Nach dem Öffnen gehen die meisten Kanäle mit zunehmender Wahrscheinlichkeit in einen nichtleitenden Inaktivierungszustand über, aus dem heraus sie nicht erneut durch Depolarisation öffnen können. Nach der DNA- bzw. Aminosäurensequenz differenziert man heute mindestens neun verschiedene spannungsabhängige Subtypen einer Natriumkanalfamilie, die sich bei sonst hoher Übereinstimmung an wichtigen funktionellen Bereichen wie dem Spannungssensor oder der Kanalpore unterscheiden. Anhand charakteristischer Parameter wie der Offnungs- und Inaktivierungsgeschwindigkeit sowie der Affinität zu bestimmten Toxinen und Lokalanästhetika sind diese Unterschiede zum Teil bereits auch elektrophysiologisch nachgewiesen worden. Später einigte man sich auf eine einheitliche Nomenklatur nach phylogenetischen und funktionellen Kriterien [Goldin et al. 2000]. Alle Kanäle der Typen Na_v1.1 bis Na_v1.9 leiten selektiv Natriumionen (Na). Sie wurden der Familie (Eins) zu-



Abbildung 1.4: Relativer Unterschied in den Aminosäurensequenzen von Natriumkanälen. Verglichen werden die vier Domänen der α -Untereinheit spannungsgesteuerter Natriumkanäle der Typen Na_v1.1 - Na_v1.9 [GOLDIN et al. 2000]. Phylogenetisch scheinen sich alle Subtypen aus einem ursprünglichen Kanal entwickelt zu haben, mit einem hohen Verwandtschaftsgrad auch gegenüber anderen Kationenkanälen. Gemeinsam ist allen der modulare Aufbau, mit wiederkehrenden die Funktion bedingenden Motiven. Verhältnismäßig kleine Mutationen erzeugen verschiedene gewebsspezifische Kanaltypen, die ein individuelles Verhalten gegenüber natriumkanalblockierenden Substanzen zeigen, mit einer charakteristischen Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik bei erhaltener Grundfunktion und hoher Ionenselektivität. ZNS: zentrales Nervensystem, PNS: peripheres Nervensystem, DRG: Spinalganglien.

geordnet und nach der Reihenfolge der Entdeckung ihrer codierenden Chromosomabschnitte numeriert, das tiefgestellte "v" steht für die Spannungsabhängigkeit (siehe Abbildung 1.4, Seite 15). Darüber hinaus fand man in der Genomsequenzanalyse einige auch als Protein exprimierte Kanaltypen, die aber bisher nicht funktionell untersucht wurden (vorläufige Bezeichnung Na_x). Die Natriumkanalfamilie (Eins) zerfällt in mehrere Gruppen:

 Die auf Chromosom 2q codierten Kanalproteine 1.1, 1.2, 1.3 und 1.7 sind die engsten Verwandten der Familie und kommen in hohen Zahlen in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems vor. Sie sind hoch sensibel gegenüber dem Gift des japanischen Kugelfisches, Tetrodotoxin (siehe Kap. 1.5.4).

- 2. Zu einer anderen Untergruppe gehören die Kanäle 1.5 des Skelettmuskels sowie 1.8 in Spinalganglien und 1.9 im peripheren, sensorischen Nervensystem mit einer zu mehr als 74% identischen Aminosäurensequenz, codiert auf Chromosom 3p. Besonders 1.8 und 1.9 sind tetrodotoxinresistent.
- Immer noch zu mehr als 80% identisch mit anderen Kanälen, aber evolutionsbiologisch weiter entfernt stehen 1.4 des Skelettmuskels und 1.6 des ZNS, lokalisiert auf den Chromosomen 17q und 12q.

Der in dieser Arbeit behandelte Natriumkanal wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander erstmals kloniert. Die Arbeitsgruppe um John N. Wood (London, GB) klonierte ein 1957 Aminosäuren langes Kanalprotein der Ratte und nannte es α -SNS. Es ist in vivo in den Spinalganglienzellen neugeborener und erwachsener Ratten gefunden worden [AKOPIAN et al. 1996]. In Abbildung 1.9 auf Seite 24 und folgende ist die Aminosäurensequenz dargestellt. Die Gruppe um John C. Hunter (Palo Alto, USA) klonierte das um eine Aminosäure kürzere Kanalprotein PN3, das mit hoher Übereinstimmung in der Sequenz ebenfalls an kleinen Spinalganglienzellen der Ratte vorkommt [SANGAMESWARAN et al. 1996]. Heute hat sich für den hier untersuchten Natriumkanal meist die Bezeichnung "Na_v1.8" durchgesetzt.

1.5.2 Struktur und Funktion

Der molekulare Aufbau eines spannungsabhängigen Natriumkanals ist bereits gut untersucht, zum Überblick siehe [MARBAN et al. 1998] und [CATTERALL 2000]. Es handelt sich um ein Protein bestehend aus einer 260 kDa α -Untereinheit, die allein die funktionsfähige Kanalpore bildet und aus ein oder zwei intrazellulären



Abbildung 1.5: Modell der Sekundärstruktur der α -Untereinheit eines Natriumkanals (modifiziert nach [CATTERALL 1988]). Sie besteht aus vier sich ähnelnden Domänen I-IV, die jeweils sechs membrandurchspannende hydrophobe α -Helices besitzen. Die Segmente S4 aller Domänen tragen positive Nettoladungen und verändern bei Depolarisation ihre Position. So vermitteln sie die spannungsabhängige Öffnung des Kanals [STÜHMER et al. 1989].

Polypeptid-Untereinheiten β_1 und β_2 , die für eine schnelle Öffnungs- und Inaktivierungskinetik verantwortlich sind [ISOM et al. 1992]. Die Abbildung 1.5 zeigt die Sekundärstruktur der α -Untereinheit aus vier Domänen mit jeweils sechs Segmenten, die Abbildung 1.6 zeigt die ringförmige Anordnung der transmembranären α -Helices zu einem Ionenkanal. Dieser Aufbau ist nicht als statisch aufzufassen, entscheidend für die Funktion ist die hohe Flexibilität der Konformation des Proteins.

Zum molekularen Mechanismus der Kanalöffnung wurde die Existenz eines "Tores", postuliert, das sich spannungsabhängig öffnet und Natriumionen einströmen läßt. Die Kanalpore kann ihre Gestalt depolarisationsinduziert verändern mit den S4-Segmenten der Domänen I-IV als Spannungssensoren. Die Helix eines S4-Segmentes trägt wiederholte Motive von Aminosäuren mit positiv geladener Seitenkette gefolgt von zwei hydrophoben Aminosäuren. Dies formt eine zylindrische Röhre, in der das S4-Segment durch wechselseitige Anziehungs- und Ab-



Abbildung 1.6: Modell der Tertiärstruktur eines Natriumkanals. Der Kanal besteht aus vier ähnlichen Domänen mit 6 Segmenten (A). Die vier Domänen sind in der Membran zylinderförmig angeordnet (B) (modifiziert nach [ALSOBROOK und STEVENS 1988], [STEVENS 1991] und [MATTHEWS 1991]). Die Verbindungsschleifen der Segmente 5-6 oder P-Regionen der vier Domänen der α -Untereinheit des Natriumkanals bilden im Zentrum zusammen eine Kanalpore (Querschnitt C) [YAMAGISHI et al. 1997].

stoßungskräfte vertikal Richtung Zellinneres oder Richtung Extrazellularraum zu gleiten vermag. Im Ruhezustand zieht das negative Potential des Intrazellularraumes die positiven Ladungen der S4-Helix in die Membran hinein. Bei Veränderung der Potentialdifferenz zum Positiven vollführt die Helix eine spiralförmige Auswärtsbewegung, welche durch Konformationsänderung möglicherweise der gesamten Porenregion den Öffnungsvorgang einleitet [CATTERALL 1986] [GUY und SEETHARAMULU 1986].

Nach der Kanalöffnung strömen Natriumionen in die Zelle. Mit über die Zeit zunehmender Wahrscheinlichkeit kommt es zur Inaktivierung des Kanals. Über die ersten Hypothesen von Hodgkin und Huxley hinausgehend faßt man heute die Inaktivierung als von der Kanalöffnung abhängigen Prozeß auf [ALDRICH et al. 1983]. Man unterscheidet eine schnelle (innerhalb von Millisekunden) von einer langsamen (innerhalb von Sekunden und länger). Die langsame Inaktivierung findet während verlängerter Depolarisierung statt und ist möglicherweise Ausdruck von Konformationsänderungen des Kanalproteins, die nach der Aktivierung beginnen. Sie können als eine über die Öffnung hinausgehende übersteigerte Aktivierung interpretiert werden, die die Kanalpore von ihrer äußeren Öffnung verschließt, während die Affinität des Lokalanästhetika-Rezeptors immer noch gesteigert ist [ULBRICHT 2005]. Durch Mutationsexperimente konnte eine Beteiligung der P-Regionen gezeigt werden [TOMASELLI et al. 1995].

Unter physiologischen Bedingungen inaktiviert die überwiegende Mehrheit der Natriumkanäle nach dem schnellen Mechanismus. Die schnelle Inaktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle ist ein intrinsischer Offenkanalblock durch ein Aminosäurentriplett aus Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM), das sich in der cytoplasmatischen Verbindung der Domänen III und IV befindet MC-PHEE et al. 1995. Dieses IFM-Partikel soll sich aus seiner Position im Intrazellularraum in die Kanalpore bewegen und so einen funktionellen Verschluß der Kanalpore bewirken, noch bevor das Aktivierungstor geschlossen wird EAHOLTZ et al. 1994]. Als Rezeptor für das IFM-Partikel fand man einige Aminosäuren in den Verbindungsschleifen der Segmente S4-S5 der Domänen III und IV an der inneren Porenöffnung. So wird es zentral in der Kanalpore gebunden und verschließt diese von intrazellulär [ROHL et al. 1999]. Unterstützt wird diese Vorstellung von Experimenten, in denen durch Zugabe von Endopeptidasen an der inneren Zellmembran die Verbindungsschleifen der Domänen III und IV mit dem Inaktivierungspartikel lysiert und folgend Natriumströme ohne schnelle Inaktivierungskomponente registriert werden konnten. Ein ähnlicher Effekt wird bei genetisch modifizierten Kanälen ohne IFM-Partikel beobachtet GRANT et al. 2000].

Von Bedeutung für die gezeigte Koppelung der Aktivierung und Inaktivierung scheinen die bereits an der Kanalöffnung selbst beteiligten S4-Segmente zu sein: In Experimenten mit α -Skorpiontoxin, das an die Extrazellulärseite der Spannungssensoren bindet, fand man inaktivierungsdefiziente Natriumströme [Ro-GERS et al. 1996]. Das Toxin fixiert dabei das S4-Segment in einer Position, die zwar die Öffnung des Kanals zuläßt, nicht aber seine schnelle Inaktivierung.

1.5.3 Mechanismen der Natriumkanalblockade

Viele Lokalanästhetika verhindern die Leitung von Natriumionen durch den Natriumkanal. Man geht von der Existenz mindestens einer spezifischen Bindungsstelle im Innern der Kanalpore aus. Die Bindungsstelle für Lokalanästhetika konnte durch punktuelle Mutationen der sechs Segmente der Domäne IV gefunden werden [WANG et al. 1998] [WRIGHT et al. 1998] [LI et al. 1999]. In der α -Untereinheit des Typ-IIa-Kanals des Rattenhirns identifizierten Ragsdale et al. die Aminosäuren Phenylalanin (F) an Position 1764 und Tyrosin (Y) an Position 1771 im Segment 6 der Domäne IV als Bindungsstelle [RAGSDALE et al. 1994]. Diese Aminosäuren finden sich an ähnlicher Position und Anordnung in allen Natriumkanaltypen, so auch dem tetrodotoxinresistenten (TTX-R) Na_v1.8-Kanal. Der Austausch dieser Aminosäuren gegen Alanin führte zu einer deutlichen Reduktion der Affinität für Lidocain und Phenytoin, in geringerem Maße auch für Quinidin und Flecainid [RAGSDALE et al. 1996]. Sie sind damit wesentlicher Bestandteil einer komplexen Bindungsstelle im Innern der Pore (Abbildung 1.7, Seite 21).

Die Bindung eines Lokalanästhetikums im Lumen des Natriumkanals führt zu einem reversiblen Verschluß (tonische Blockade); das Einströmen von Natriumionen wird verhindert und somit die Erregungsleitung und -entstehung. Bei vielen Lokalanästhetika beobachtete man bei schneller repetitiver Reizung eine zunehmende Natriumstromblockade (phasische oder "use-dependent" Blockade) der ge-



Abbildung 1.7: Bindungsstelle des Natriumkanals für Lokalanästhetika in Domäne IV, Segment 6. Die Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) an Position 1712 und 1719 sind identisch mit den Aminosäuren 1764 und 1771 im Typ-IIa-Natriumkanal des Rattenhirns, wo sie den Rezeptor für Lokalanästhetika bilden. Sie liegen porenseitig in der membrandurchspannenden α -Helix im Abstand von zwei Helixwindungen (1,1 nm). Wahrscheinlich bindet die tertiäre Aminogruppe der Lokalanästhetika an das etwas tiefer in der Helix gelegene Phenylalanin und der aromatische Ring an das Richtung intrazelluläre Porenöffnung liegende Tyrosin. Das Lidocain-Molekül liegt in der Kanalpore. Modifiziert nach [RAGSDALE et al. 1994].

samten Kanalpopulation [BUTTERWORTH und STRICHARTZ 1990]. Die Stärke dieses Effektes ist von der Konzentration des Lokalanästhetikums, von Reizfrequenz, Reizdauer und Membranpotential abhängig.

Eine Theorie, die dies zu erklären versucht, ist die "modulated receptor hypothesis" von [HILLE 1977] und [HONDEGHEM und KATZUNG 1977]. Sie beschreibt drei verschiedene Konformationszustände des Natriumkanals, deren Bindungsvermögen zu Lokalanästhetika unterschiedlich ist. Der aktivierte und besonders der inaktivierte Kanal besitze eine höhere Affinität für Natriumkanalblocker. Nach einer ersten Aktivierung durch einen Reiz kommt es zur Blockade weiterer, nun inaktiver Kanäle. Die Blockade einer Anzahl von Kanälen nimmt so mit zunehmender Reizanzahl zu, der Natriumstrom nimmt ab. Nach einer gewissen Zeitspanne löst sich der Kanalblocker wieder, so daß sich ein Gleichgewichtszustand zwischen Neublockade und Abdiffusion einstellt.

Eine andere Erklärung gibt die "guarded receptor hypothesis" [STARMER et al. 1984], laut derer die Bindungsstelle für den Blocker erst durch Aktivierung des Kanals frei gegeben wird. Zunächst müssen Natriumkanäle geöffnet werden, bevor das Lokalanästhetikum in den Kanal diffundiert und diesen bei der nächsten Reizung blockieren kann. Die Affinität des Rezeptors für Lidocain konnte durch Mutationen, die den Kanal dauerhaft öffnen, gesteigert werden [WANG und WANG 1999]. Die Bindungsstelle selbst hat nach dieser Theorie in jedem Kanalzustand die gleiche Affinität für natriumkanalblockierende Substanzen. Diese könnten möglicherweise auch durch das Inaktivierungspartikel in der Kanalpore festgehalten werden, wodurch die blockierende Wirkung verlängert wird [COURT-NEY 1975].

Neuere Untersuchungen an mutierten, inaktivierungsdefizienten Natriumkanälen zeigten, das Lidocain die Koppelung von Aktivierung und Inaktivierung beeinflusst. Im Sinne einer allosterischen Rezeptorveränderung kann es die Wahrscheinlichkeit erhöhen, das der Kanal vom offenen in den inaktivierten Zustand übergeht. Beim an der DIII-DIV-Schleife mutierten und damit in der Inaktivierung behinderten Kanal bewirkt die "Behandlung" mit Lidocain eine scheinbare Wiederherstellung der Inaktivierung [BALSER et al. 1996].

1.5.4 Der tetrodotoxinresistente Natriumkanal

Das Gift Tetrodotoxin (TTX) des im Indischen Ozean beheimateten Kugelfisches (Abbildung 1.8) hat wesentlich zum Verständnis der Struktur und der Funktion von Natriumkanälen beigetragen. Es handelt sich um ein hochpotentes Neurotoxin, welches hochspezifisch Natriumströme zu blockieren vermag [NARAHASHI et al. 1964]. 1979 fand man in sensorischen Ganglien der Maus Aktionspotentiale, die gegenüber diesem Toxin relativ gesehen "resistent" zu sein scheinen [YOSHIDA und MATSUDA 1979]. Zur Blockade benötigte man im Vergleich zu den bereits beschriebenen TTX-sensiblen Natriumströmen eine 60.000fach höhere Konzentration, welche etwa in der Größenordnung der zur Blockade mit Lidocain verwendeten liegt. Heute kennt man die Aminosäurensequenzen von zwei tetrodotoxinresistenten Kanälen, Na_v1.8 und Na_v1.9 [TATE et al. 1998]. In elektrophysiologischen Experimenten fand man darüber hinaus noch mindestens einen weiteren Kanal, der sich funktionell von anderen tetrodotoxinresistenten unterscheidet [RUSH et al. 1998].

Native TTX-resistente Natriumströme in Spinalganglienzellen sind von mehre-



Abbildung 1.8: Der japanische Kugelfisch [Fugu] aus der Familie der Tetraodontidae in Verteidigungsstellung. Vor allem die Leber und Ovarien des wild lebenden Tieres speichern das bakteriell synthetisierte Alkaloid Tetrodotoxin, welches selektiv und reversibel Natriumströme tetrodotoxinsensitiver Natriumkanäle blockiert.

ren Arbeitsgruppen vor allem mit der "whole-cell"-Methode der "patch-clamp"-Technik (Kapitel 2.1) untersucht worden [SCHWARTZ et al. 1990] [CAFFREY et al. 1992] [ROY und NARAHASHI 1992] [OGATA und TATEBAYASHI 1993] [YOSHI-MURA et al. 1996] und sind mit den Strömen TTX-sensitiver Kanäle verglichen worden. Es fand sich eine um 20 - 30 mV höhere Aktivierungsschwelle der potentialabhängigen Öffnung; der TTX-sensitive Kanal öffnet bereits bei einem Membranpotential von -60 mV, der TTX-resistente dagegen erst bei -40 bis -30 mV. Letzterer zeigt außerdem eine deutlich langsamere Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung. Dagegen ist die Erholung von der Inaktivierung der TTXresistenten Ströme schneller als die der TTX-sensitiven [ELLIOTT und ELLIOTT 1993]. Bei Untersuchungen auf Einzelkanalebene [ROY et al. 1994] [MOTOMURA et al. 1995] [RUSH et al. 1998] entdeckte man unterschiedliche Einzelkanalleitfähigkeiten, der maximale Natriumionenfluß durch den TTX-resistenten Kanal ist nur etwa halb so groß.

Durch die Arbeiten von [AKOPIAN et al. 1996] und [SANGAMESWARAN et al. 1996] (siehe Kapitel 1.5.1) ist die Aminosäurensequenz des hier untersuchten Kanals mit hoher Übereinstimmung aufgeklärt worden. Letztere Arbeitsgruppe konnte seine Existenz auch im menschlichen peripheren Nervensystem nachweisen und den humanen Kanal klonieren [RABERT et al. 1998]. Damit gewinnt seine pharmakologische Untersuchung an Bedeutung für die klinische Forschung.

Abbildung 1.9: (nächste Seite) Aminosäurensequenz des α -SNS Proteins der Ratte (Rattus norvegicus) [AKOPIAN et al. 1996], mit hoher Übereinstimmung zur α -Untereinheit des Na_v1.8 Kanals. Die transmembranären Segmente und funktionellen Bereiche sind farbig hervorgehoben. Innerhalb des vermuteten Selektivitätsfilters für Natriumionen (violett gekennzeichnet) spielen die Aminosäuren K(Lysin) 1369 DIII (nach [HEINEMANN et al. 1992]) und 1663-67 an vergleichbaren Stellen des TTX-sensitiven Natriumkanals eine wichtige Rolle. Als Teil davon findet sich ein charakteristisches Motiv aus den Aminosäuren D-E-K-A (Aspartat, Glutamat, Lysin, Alanin) in den Domänen I-IV. Diese sollen einen inneren Ring in der Kanalpore bilden, der bevorzugt Na⁺ passieren lässt. Durch Mutation an diesen Stellen verliert der Kanal seine 100fach höhere Affinität für Natriumionen und leitet auch Ca²⁺ und andere Kationen [CHIAMVIMONVAT et al. 1996]. An Position 356 bewirkt die Aminosäure Serin die Resistenz gegenüber Tetrodotoxin.
1	¹ MELPFASVGT	TNFRRFTPES	LAEIEKQIAA	HRAAKKARTK	HRGQEDKGEK	PRPQLDLKDC
61	NQLPKFYGEL	PAELVGEPLE	DLDPFYSTHR	TFMVLNKSRT	ISRFSATWAL	WLFSPFNLIR
121	RTAIKVSVHS	WFSIFITITI	LVNCVCMTRT	DLPEKVEYVF	TVIYTFEALI	KILARGFCLN
181	EFTYLRDPWN	WLDFSVITLA	YVGAAIDLRG	ISGLRTFRVL	RALKTVSVIP	GLKVIVGALI
241	HSVRKLADVT	ILTVFCLSVF	ALVGLQLFKG	NLKNKCIRNG	TDPHKADNLS	SEMAEYIFIK
301	PGTTDPLLCG	NGSDAGHCPG	GYVCLKTPDN	PDFNYTSFDS	FAWAFLSLFR	LMTQ DS WERL
361	YQQTLRASGK	MYMVFFVLVI	FLGSFYLVNL	ILAVVTMAYE	EQSQATIAEI	EAKEKKFQEA
421	LEVLQKEQEV	LEALGIDTTS	LQSHSGSPLA	SKNANERRPR	VKSRVSEGST	DDNRSPQSDP
481	YNQRRMSFLG	LSSGRRRASH	GSVFHFRAPS	QDISFPDGIT	PDDGVFHGDQ	ESRRGSILLG
541	RGAGQTGPLP	RSPLPQSPNP	GRRHGEEGQL	GVPTGELTAG	APEGPALHTT	GQKSFLSAGY
601	LNEPFRAQRA	MSVVSIMTSV	IEELEESKLK	CPPCLISFAQ	KYLIWECCPK	WRKFKMALFE
661	LVTDPFAELT	ITLCIVVNTV	FMAMEHYPMT	DAFDAMLQAG	NIVFTVFFTM	EMAFKIIAFD
721	PYYYFQKKWN	IFDCVIVTVS	LLELSASKKG	SLSVLRTLRL	LRVFKLAKSW	PTLNTLIKII
781	GNSVGALGNL	TFILAIIVFI	FALVGKQLLS	EDYGCRKDGV	SVWNGEKLRW	HMCDFFHSFL
841	VVFRILĈĜ e W	IENMWVCMEV	SQKSICLILF	LTVMVLGNLV	VLNLFIALLL	NSFSADNLTA
901	PEDDGEVNNL	QLALARIQVL	GHRASRAIAS	YISSHCRFHW	PKVETQLGMK	PPLTSSEAKN
961	HIATDAVSAA	VGNLTKPALS	SPKENHGDFI	TDPNVWVSVP	IAEGESDLDE	LEEDMEQASQ
021	SSWQEEDPKG	QQEQLPQVQK	CENHQAARSP	ASMMSSEDLA	PYLGESWKRK	DSPQVPAEGV
081	DDTSSSEGST	VDCPDPEEIL	RKIPELADDL	DEPDDCFTEG	CTRRCPCCNV	NTSKSPWATG
141	WQVRKTCYRI	VEHSWFESFI	IFMILLSSGA	LAFEDNYLEE	KPRVKSVLEY	TDRVFTFIFV
201	FEMLLKWVAY	GFKKYFTNAW	CWLDFLIVNI	SLTSLIAKIL	EYSDVASIKA	LRTLRALRPL
261	RALSRFEGMR	VVVDALVGAI	PSIMNVLLVC	LIFWLIFSIM	GVNLFAGKFS	KCVDTRNNPF
321	SNVNSTMVNN	KSECHNQNST	GHFFWVNVKV	NFDNVAMGYL	allqvatf k g	WMDIMYAAVD
381	SGEINSQPNW	ENNLYMYLYF	VVFIIFGGFF	TLNLFVGVII	DNFNQQKKKL	ggqd iffm tee
441	QKKYYNAMKK	LGSKKPQKPI	PRPLNKYQGF	VFDIVTRQAF	DIIIMVLICL	NMITMMVETD
501	EQGEEKTKVL	GRINQFFVAV	FTGECVMKMF	ALRQYYFTNG	WNVFDFIVVI	LSIGSLLFSA
561	ILKSLENYFS	PTLFRVIRLA	RIGRILRLIR	AAKGIRTLLF	ALMMSLPALF	NIGLLLFLVM
621	FIYSIFGMAS	FANVVDEAGI	DDMFNFKTFG	NSMLCLFQIT	TS AGWDG LLS	PILNTGPPYC
681	DPNLPNSNGS	RGNCGSPAVG	IIFFTTYIII	S <mark>F</mark> LIVVNM Y I	AVILENFNVA	TEESTEPLSE
741	DDFDMFYETW	EKFDPEATQF	IAFSALSDFA	DTLSGPLRIP	KPNQNILIQM	DLPLVPGDKI
801	HCLDILFAFT	KNVLGESGEL	DSLKTNMEEK	FMATNLSKAS	YEPIATTLRW	KQEDLSATVI
861	QKAYRSYMLH	RSLTLSNTLH	VPRAEEDGVS	LPGEGYITFM	ANSGLPDKSE	TASATSFPPS
921	YDSVTRGLSD	RANINPSSSM	QNEDEVAAKE	GNSPGPQ ₁₉₅₇		
	Inaktivier	ungspartikel	ästho tiko	Segment	e 6 der Domän	en I-IV

Bei der Betrachtung auf Ebene der Primärstruktur des α -SNS Proteins (Abbildung 1.9, Seite 24) finden sich Übereinstimmungen der funktionellen Motive, die in TTX-sensitiven Kanälen nachgewiesen wurden: das Inaktivierungspartikel aus den Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM), der Selektivitätsfilter für Natriumionen und die Bindungsstellen für Lokalanästhetika.

Mit molekularbiologischen Methoden wurden mehrere Aminosäuren in der Porenregion der Domäne I gefunden, die für die Empfindlichkeit eines Natriumkanals gegenüber TTX entscheidend sind [LIPKIND und FOZZARD 1994]. Im Falle des Tetrodotoxin-sensitiven Kanals des Rattenhirns bindet die positiv geladene Guanidinium-Gruppe des Toxins an negativ geladenen Sauerstoff der Carboxylgruppe in unmittelbarer Nähe der äußeren Porenöffnung [Noda et al. 1989]. Dagegen bewirkt der Austausch von aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin gegen hydrophiles Cystein in der Porenregion eine hohe Resistenz eines vorher TTXempfindlichen Kanals BACKX et al. 1992. In der abgebildeten Aminosäurensequenz des Kanalproteins (Abbildung 1.9) ist an vergleichbarer Stelle das hydrophile Serin 356 für die TTX-Resistenz des Kanals verantwortlich SIVILOTTI et al. 1997]. Die Wirkung von Tetrodotoxin sowie die einiger anderer guanidiniumhaltigen Kanaltoxine folgt einem komplexen Modell; es kommt durch die Bindung an der äußeren Kanalpore und durch die Interaktion mit Aminosäuren des Selektivitätsfilters für Natriumionen zu einer Konformationsänderung, die Aktivierung und Passage von Natriumionen unmöglich macht [LIPKIND und FOZZARD 2000]. Obwohl seit 25 Jahren bekannt und genauestens in seinen elekrophysiologischen Eigenschaften untersucht, wurde dem tetrodotoxinresistenten Natriumkanal erst in jüngerer Zeit eine bedeutendere biologische Funktion zugemessen. Durch seinen Nachweis in kleinen Spinalganglienzellen, die mit schmerzleitenden A δ - und C-Fasern verbunden sind [HARPER und LAWSON 1985] und durch seine spezifischen anatomischen und funktionellen Eigenschaften vermutet man diese Funktion in der Entstehung und Weiterleitung von Exzitation im nozizeptiven System:

- In pathologisch veränderten Nervenfasern herrscht häufig ein weniger negatives Membranpotential. Durch sein deutlich höheres Aktivierungs- und Inaktivierungspotential kann dieser Kanal unter pathologischen elektrophysiologischen Bedingungen [NOVAKOVIC et al. 1998] noch Aktionspotentiale bilden, während andere Natriumkanäle bereits inaktiviert sind. Weiterhin führt die schnellere Erholung von der Inaktivierung zu einer schnellen Wiederauslösbarkeit des Natriumstromes. Diese Eigenschaften sind die Ursache, daß der Kanal spontan ohne äußeren Reiz repetitive Impulse auszulösen vermag, die als Schmerz empfunden werden [ELLIOTT 1997]. Dies sieht man heute als ein wichtiges Erklärungsmodell für die Entstehung neuropathischer Schmerzsyndrome.
- Die langsame Aktivierungs- und Inaktivierungsgeschwindigkeit des TTXresistenten Kanals [OGATA und TATEBAYASHI 1993] wäre für die schnelle Fortleitung der Aktionspotentiale in dicken myelinisierten Nerven nicht ausreichend, sehr wohl dagegen für die langsamen Aktionspotentiale der nozizeptiven C-Fasern (siehe Tabelle 1.1).
- In mehreren Spezies wurden an peripheren C-Fasern Summenaktionspotentiale gemessen, die gegenüber Tetrodotoxin resistent waren: Beim Frosch [KOBAYASHI et al. 1993], [BUCHANAN et al. 1996], Ratte und Kaninchen [GAUMANN et al. 1992] und auch in menschlichen C-Fasern [QUASTHOFF et al. 1995]. Weitere kleine afferente Fasern, deren zentrale Synapsen im Hinterhorn des Rückenmarks untersucht wurden, sind nicht durch Tetrodotoxin blockierbar [JEFTINIJA 1994b] und werden durch den Schmerzmediator Bradykinin aktiviert [JEFTINIJA 1994a]. Periphere afferente Fasern enthalten TTX-resistente Kanäle, die so zahlreich vorkommen, daß sie Aktionspotentiale auslösen können [BROCK et al. 1998].

- Durch Applikation verschiedener Schmerzmediatoren an peripheren Nerven wird die Erregbarkeit kleiner Spinalganglienzellen gesteigert. Prostaglandin E₂ sensibilisiert Nozizeptoren und führte bei Messung zentraler Neurone zu vermehrter TTX-resistenter Aktivität [ENGLAND et al. 1996], welche auf eine Kanalmodulation durch eine cAMP-Protein-Kinase zurückgeführt wird. Einen ähnlichen Effekt zeigen Adenosin und Serotonin [GOLD et al. 1996].
- Bei einer experimentellen Schädigung des Spinalnerven von Mäusen kommt es zu einer Umverteilung von Na_v1.8 Kanälen in die Peripherie intakter C-Fasern, dies führt dort zu messbaren TTX-resistenten Strömen [GOLD et al. 2003]. Mäuse, deren für den Kanal kodierendes Gen ausgeschaltet worden war, zeigten bei sonst unauffälligen Verhalten abgeschwächte Reaktionen gegenüber Schmerzreizen und eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber experimentell induziertem neuropathischen Schmerz [LAI et al. 2002].
- Durch intrathekale Applikation von Antisense-Oligonukleotiden zu Abschnitten der Na_v1.8-kodierenden DNA kommt es zu einer verminderten Expression dieser Kanäle in der Zellmembran. Die Untersuchung verschiedener Schmerzzustände an Ratten zeigte nach einer solchen Reduktion der Na_v1.8-Kanäle eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber experimentell induzierten neuropathischen Schmerzen. Akutschmerzen, der postoperative Schmerz sowie durch Chemotherapeutika ausgelöste Schmerzen waren dagegen unbeeinträchtigt [JOSHI et al. 2006].

1.6 Aufgabenstellung

Pharmakologische Interaktionen mit spannungsabhängigen Natriumkanälen sind komplex, da die verschiedenen Konformationszustände der Kanäle unterschiedlich durch Pharmaka beeinflusst werden. An TTX-sensitiven Natriumkanälen sowie Natriumkanälen des Herzmuskels sind diese Interaktionen bereits gut untersucht. Bei den TTX-resistenten Natriumkanälen des peripheren Nervensystems, die eine deutlich langsamere Kinetik aufweisen als TTX-sensitive, weiß man weit weniger über die Interaktion von Natriumkanal-blockierenden Pharmaka mit den verschieden Kanalzuständen. Der tetrodotoxinresistente Natriumkanal Na_v1.8 spielt nach heutigem Verständnis eine wesentliche Rolle in der Schmerzempfindung und besonders in der Entstehung von neuropathischen, chronifizierten Schmerz. Ihm kommt daher über die physiologische Grundlagenforschung hinaus eine große klinische Bedeutung in der Anästhesiologie und Schmerztherapie zu. Ziel dieser Arbeit war es, grundlegende Interaktionen des isoliert in HEK293 Zellen exprimierten Na_v1.8 Kanals mit dem klassischen Natriumkanalblocker Lidocain zu untersuchen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Die "patch-clamp" - Technik

Alle Experimente dieser Arbeit wurden mit der von Ernst Neher und Bert Sakmann entwickelten "patch-clamp" - Methode durchgeführt [NEHER und SAK-MANN 1976]. Sie erlaubte erstmals die genaue Messung von Strömen durch einzelne Ionenkanäle. Gegenüber der Mikroelektrodentechnik, bei der feine Elektroden in die Zelle eingestochen werden, was hohe Leckströme an der Verletzungsstelle zur Folge hat, ist die entscheidende Verbesserung dieser Technik die Schaffung einer dichten elektrisch leitenden Verbindung zum Intrazellularraum. Das sogenannte "gigaseal" bezeichnet den sehr hohen im Bereich von einigen Gigaohm liegenden Abdichtwiderstand des Elektroden-Zellkontaktes.

Hierzu wird eine feine speziell behandelte Glaspipette mit einem Spitzendurchmesser von etwa 1 μ m unter mikroskopischer Betrachtung an die Zelle herangefahren und aufgesetzt. Durch einen leichten Unterdruck wird dann die Zellmembran an die Pipette angesaugt und durch Mikroadhäsionskräfte zwischen Lipiddoppelmembran und Glas ein erstaunlich fester Verschluß geschaffen. So ist der Verletzungsstrom der Zelle vernachlässigbar klein, der gemessene Strom fließt



Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des "patch-clamp" - Versuchsstandes mit Ganzzellableitung einer HEK-Zelle nach dem Prinzip der Spannungsklemme. Von einem Computer wird das gewünschte Membranpotential über einen Digital-Analog-Wandler (DA-Wandler) an einen Verstärker ausgegeben. Dieser mißt über die Pipette die intrazelluläre Spannung und verstärkt gegebenenfalls eine vorhandene Differenz. In diesem Falle fließt über den Rückkopplungswiderstand ein Strom, bis das durch den PC vorgegebene Potential erreicht ist. Dieser verhält sich nach dem Ohmschen Gesetz proportional zur Spannung am Ausgang des Verstärkers. Dieses Spannungssignal wird weiter verstärkt, hochfrequentes Rauschen wird herausgefiltert, und schließlich kann es nach Digitalisierung durch einen Analog-Digital-Wandler (AD-Wandler) auf dem Computer dargestellt werden. Einwärtsströme werden dabei stets nach unten gerichtet abgebildet und mit negativem Vorzeichen versehen.

ausschließlich durch die Ionenkanäle der Zellmembran, deren Funktion bei Verwendung physiologischer intrazellulärer Lösungen kaum beeinträchtigt wird.

Das elektrische Rauschen ("Johnson Noise") verhält sich umgekehrt proportional zum Abdichtwiderstand und ist bei den hohen Widerständen, wie sie bei der "patch-clamp" - Technik erreicht werden, so klein, daß sogar Ströme durch einzelne Ionenkanäle sichtbar werden. Dazu wird ein Verstärker benötigt, mit dem der Zelle über die Pipette ein bestimmtes Membranpotential aufgezwungen wird. Jede Veränderung dieses Potentials durch die Aktivität von Ionenkanälen wird vom Verstärker ausgeglichen. Der dazu fließende Strom verhält sich proportional zu dem Ionenfluß durch die Kanäle der Zellmembran (Abbildung 2.1). Dieses Prinzip der Strommessung bei fest eingestellter Spannung bezeichnet man als Spannungsklemme ("voltage-clamp").

Die "patch-clamp" - Methode erlaubt nach [HAMILL et al. 1981] vier verschiedene Konfigurationen: die beiden zellverbundenen "cell-attached"- und "whole-cell"-Anordnungen, sowie die zellfreien "inside-out"- und "outside-out"-Konfigurationen, etwa für die Einzelkanalmessung verwendet werden können (Abbildung 2.2). Die Versuchsergebnisse sind hierbei um so besser, je weniger Ionenkanäle das abge-



Abbildung 2.2: Schematische Darstellung üblicher Konfigurationen der "patch-clamp" - Methode. Zunächst wird die Pipette vorsichtig der Zelle angenähert und aufgesetzt. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks an der Zelle entsteht das "gigaseal" zwischen Zellmembran und dem rund geschmolzenem Glasrand der Pipette. In dieser sogenannten "cell-attached" - Konfiguration können einzelne Ionenkanäle des angesaugten Membranflecks ("patch") gemessen werden. Zieht man nun die Pipette ruckartig zurück, wird dieses Stück aus der Membran herausgerissen und bleibt an der Spitze haften (Darstellung in höherer Vergrößerung). Dieser "inside-out" - Patch liegt mit der vormals intrazellulären Membranseite in der Badlösung. Durch andauernden Sog im "cell-attached" - Modus erzeugt man ein kleines Loch in der Membran und gewinnt Zugang zu den Ionenkanälen der gesamten Zelle - der "whole-cell" - Patch. Durch langsames Zurückziehen entsteht hieraus der "outside-out" - Patch, indem ein kleines Membranvesikel abgeschnürt wird, dessen Extrazellulärseite der externen Lösung zugewandt ist. Die Experimente dieser Arbeit wurden im "whole-cell"-Modus durchgeführt.

schnürte Membranvesikel enthält - im Idealfall nur einen.

Die Experimente dieser Arbeit wurden im "whole-cell"-Modus durchgeführt, welche die Messung des Summenstroms aller in der Zellmembran enthaltenen Ionenkanäle erlaubt. In der Pipette wurde ein dem intrazellulären Milieu angepaßtes Elektrolyt verwendet, da es durch die Eröffnung der Zellmembran rasch zum Austausch der intrazellulären Flüssigkeit kommt.

2.2 Experimenteller Aufbau

Der Serienwiderstand der Pipette und die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran sind entscheidend für die Qualität der Experimente (siehe Abbildung 2.3, Seite 35). Die durch die Membrankapazität auftretenden Umladungsströme wurden wie auch eventuell geringe Leckströme der Zell-Elektrodenverbindung bereits während der Aufzeichnung mittels des Verstärkers kompensiert. Als Verstärker wurden der Axopatch 200B und der Vorverstärker CV 203BU (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) verwendet.

Um Spannungsfehler durch einen zu hohen Serienwiderstand des Versuchsaufbaus zu vermeiden, wurden Pipetten mit großem Öffnungsdurchmesser und damit einem geringen elektrischen Widerstand hergestellt. Dazu wurden Borosilicatglas-Kapillaren der Marke *CEEBEE 101-PS* (Bardram Health Care, Svendborg, Dänemark) mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einer Wandstärke von 0,32 mm verwendet, die vor dem Experimentieren mit Methanol gereinigt und mit einem vertikalen Pipettenziehgerät (Feinmechanische Werkstatt des physiologischen Institutes) zu dünnen Spitzen ausgezogen wurden. Unmittelbar vor jedem Experiment wurden die Rohpipetten mittels eines an einem glühenden Platindraht befestigten Glaskügelchen unter mikroskopischer Kontrolle "poliert", um die Öffnung zu verjüngen, die Abruchkante rund zu schmelzen und Verunreinigungen zu entfernen.



Abbildung 2.3: Vereinfachte Darstellung des Schaltbildes der "whole-cell"-Ableitung. Der Widerstand des Zell-Pipettenkontaktes R_s ist vom Öffnungsdurchmesser sowie von in der Öffnung liegenden Membranbestandteilen abhängig. Die Zellmembran wird durch die von der Zelloberfläche bestimmten Membrankapazität C_m und einem parallel geschalteten, von der Leitfähigkeit aller lonenkanäle der Membran bestimmten Widerstand R_m beschrieben. Die verwendeten Pipetten mit großen Öffnungsdurchmesser und damit einer hohen Leitfähigkeit minimieren den Serienwiderstand.

Nach luftblasenfreier Füllung mit intrazellulärer Lösung wurde der mit einmolarer Kaliumchlorid-Lösung chlorierte Silberelektrodendraht eingebracht. Die so behandelten Pipetten besaßen nach Eintauchen in die Badlösung einen Widerstand zwischen 1 und 2 M Ω und wurden jeweils nur für ein Experiment verwendet. Mittels des Mikromanipulators HS6/2 (Fa. Maerzhäuser, Wetzlar), der manuell über einen Joystick gesteuert wurde, erfolgte die Annäherung der Pipette an die Zelle unter mikroskopischer Kontrolle mit dem invertierenden Mikroskop Modell IM (Zeiss, Oberkochen) mit bis zu 400facher Vergrößerung. Zur Schwingungsdämpfung war dieses System auf einem druckluftgelagerten Tisch aufgebaut. Um die Versuchsanordnung wurde nach dem Prinzip des Faradayschen Käfigs ein Metallgitter angebracht zur Abschwächung des Signalrauschen durch die elektromagnetische Strahlung der elektronischen Apparate und der Umwelt. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur von 22-24 °C durchgeführt.

2.2.1 Lösungen und Lösungswechsel

Alle zum Experimentieren sowie für die Zellkultur verwendeten Lösungen wurden aus im Physiologischen Institut destillierten Aqua bidestillata selbst hergestellt. Dies wurde bei der Herstellung des Zellkulturmediums (siehe Kapitel 2.3.2) und von Elektrolytlösungen nach der Zugabe aller kleinmolekularen Inhaltsstoffe wie Elektrolyte oder Trockenmedium steril filtriert. Dazu kam eine Vakuumanlage mit Cellulose-Acetat-Filter (Sartorius 11107-47-ACN) der Größe 22 Mikron zum Einsatz. Die so gewonnenen Lösungen konnten bis zu vier Wochen bei +4°C aufbewahrt werden.

Vor dem Experimentieren wurden die Badlösung (externe Tyrode) und die Pipettenlösung (interne KCl) auf Raumtemperatur angewärmt, auf auskristallisierte Salze geprüft und durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,2 μ m (Renner, Darmstadt) erneut filtriert. Die Zusammensetzung der kristallinen Lösungen ist in Tabelle 2.1 auf Seite 37 dargestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, bezogen.

In der Pipettenlösung ist EGTA (Ethylenglycol-Bis[β -Aminoethyl-Ether] - N,N, N',N' - Tetraacetat) enthalten, das als Chelatbildner freies Calcium komplexiert. Lidocain wurde aus einer bei +4°C konservierten 1:100 Stammlösung mit einer Mikroliterpipette in externer Tyrodelösung entsprechend verdünnt.

Zur Applikation von Lidocain und zum schnellen Wechsel zwischen den verschiedenen Konzentrationen wurde ein eigens entwickeltes System verwendet. In die Badlösung getaucht wurden sechs parallele Glasröhren, die über kurze Silikonschläuche mit handelsüblichen 5 ml Spritzen in einem Plexiglasblock verbunden waren. Über einen hydraulischen Stempel und einen Dauerinfusionsautomaten konnten die Spritzen mit jeweils 1,5 ml/h entleert werden, was in den Röhren einer Fließgeschwindigkeit von 20 mm/min entsprach.

Nachdem der "whole-cell" - Patch einer am Boden der Plexiglasschale haftenden

Zelle gelungen war, wurde diese vorsichtig angehoben und mittels des Mikromanipulators nacheinander in die Röhrenöffnungen gesteuert, wo jeweils Reizungen durchgeführt und Natriumströme aufgezeichnet wurden. Der Abdichtwiderstand änderte sich dabei nicht. Der Vorteil dieses Verfahrens war der einfache und innerhalb von Sekunden vollzogene Lösungswechsel.

	externe Tyrode	interne KCl	PBS
Na^+	145	10	137
K^+	5	140	2,7
Ca^{2+}	1		
Mg^{2+}	1		
Cl⁻	154	150	139,7
PO4 ³⁻			10
Glucose	6		
HEPES	10	10	
EGTA		3	
TEA	10		

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der verwendeten kristallinen Bad- und Pipettenlösung sowie für die Zellkultur phosphatgepufferte Salzlösung (PBS). Konzentrationen in mmol/I. Der pH-Wert wurde mit TRIS-Puffer (Tris[hydroxymethyl]aminomethan) auf 7,4 (ext. Tyrode, PBS) bzw. 7,2 (int. KCI) eingestellt. PBS wurde mit Salzsäure auf einen pH von 7,4 titriert. HEPES: 4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazin-Ethansulfonsäure, EGTA: Ethylenglycol-Bis[β -Aminoethyl-Ether]-N,N,N',N'-Tetraacetat, TEA: Tetraethylammonium zur Kaliumkanalblockade.

2.2.2 Datenerfassung und Auswertung

Die im Experiment gemessenen Natriumeinwärtsströme wurden über einen Verstärker und einen Tiefpaßfilter von 2 kHz in Echtzeit durch einen 12-bit Analog-Digital Wandler *TM-40* (Scientific Solutions, Solon, OH, USA) digitalisiert. Dies erfolgte mit 1024 Datenpunkten innerhalb des Digitalisierungszeitraumes von 40 ms. Die Abtastfrequenz ("Sample-Rate") lag somit bei 25,6 kHz und damit deutlich höher als die Filtereckfrequenz. Dadurch wurde dem Nyquist-Kriterium genüge getan, nach dem die Abtastfrequenz bei der Digitalisierung analoger Meßsignale wenigstens doppelt so hoch sein sollte wie die höchste Frequenz des gefilterten Signals. Ein unzureichendes Auflösungsvermögen führt zu Informationsverlust und zu Digitalisierungsartefakten.

Die Steuerung und Aufzeichnung der Experimente erfolgte mit dem auf einem handelsüblichen Personal Computer installierten Programmpaket pClamp 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Dieses erlaubte die Vorgabe von je nach Fragestellung wechselnden Impulsprotokollen zur Zellreizung sowie die digitale Speicherung und Auswertung der Ergebnisse. Zur graphischen Aufbereitung der Datenpunkte und zur Anpassung der Parameter entsprechender Kurvenfunktionen diente das Programm *FigP* 5.0 (Biosoft, Cambridge, GB). Abgebildete Datenpunkte sind Mittelwerte, die Fehlerbalken markieren den Standardfehler der Anpassung, soweit im Text nicht anders angegeben. Verfasst wurde diese Arbeit mithilfe des Textsatz-Systems ET_{FX} .

2.3 Humane embryonale Nierenstammzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen werden schon seit langem als gut zu kultivierende Basis für Untersuchungen an durch Transfektion exprimierten Proteinen verwendet. Humane embryonale Nierenstammzellen (Abk. HEK für engl. Human Embryonic Kidney cells) wurden erstmals von [GRAHAM et al. 1977] durch Transfektion mit Hilfe eines Adenovirus von ihrem Wildtyp in die dauerhafte Kulturform der Zellinie 293 gebracht. Zunächst wurde angenommen, diese Zellen seien Vorläufer des sich entwickelnden Nierenparenchyms. Später erkannte man jedoch durch die Entdeckung von neuronenspezifischen Protein wie z.B. Neurofilament-Untereinheiten in HEK-Zellen, daß es sich eher um Stammzellen eines intrinsischen Nervengewebes handeln könnte [SHAW et al. 2002].

HEK-Zellen enthalten in ihrer nativen Form eine Anzahl an ein- und auswärtsgerichteten Ionenkanälen, darunter fünf Chloridkanaltypen und zwei Kaliumkanäle. Diese Kanäle leiten in überwiegendem Maße Auswärtsströme und kommen in unterschiedlichen Anzahlen vor, im Falle der Kaliumkanäle in der "whole-cell"- Konfiguration mit Summenströmen von bis zu 400 pA. Unter Kenntnis der Existenz dieser nativen Kanalpopulationen eignen sich die HEK293 Zellen sehr gut für die Transfektion und Expression anderer neuronaler Ionenkanäle [ZHU et al. 1998].

2.3.1 Klonierung des Natriumkanals

Die Klonierung des Natriumkanals SNS/PN3 oder heute Na_v1.8 in das HEK293-Expressionssystem erfolgte mit dem Zytomegalievirus als Vektor durch [TATE et al. 1998]. Die stabil transfizierten Zellen des Typs HEK293T wurden uns von der Arbeitsgruppe um Simon Tate, damals Glaxo-Wellcome-Research (Stevenage, Herts, GB) freundlicherweise für elektrophysiologische Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Um die HEK-Zellkultur zu immortalisieren, wurde das Genom für das sogenannte "große T-Antigen" eines Papova-Virus (Simian Virus 40) in die Zellen transfiziert. Dieses fördert das Wachstum einer Zellkultur, indem es den selbstlimitierenden Regulationsmechanismus einer Zellpopulation bei zunehmend konfluierendem Zellrasen vermindert [MICROBIOLOGY@LEICESTER 2004].

Gegenüber der bis dahin untersuchten Expression in Eizellen des chinesischen Hamsters (CHO - Chinese Hamster Ovaries) oder amphibischen Eizellen mit einer gegenüber Säugetieren anderen Replikations- und Expressionsbiologie bot dies den Vorteil einer kleineren Wirtszelle, in der relativ weniger Kanäle in die Zellmembran gebracht werden. Dies kann die Aussagekraft von Ganzzellableitungen und besonders Einzelkanaluntersuchungen erhöhen und die Durchführung erleichtern.

Zur Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen wurde mit dem Vektor zugleich ein Resistenzfaktor gegenüber dem Aminoglykosid-Antibiotikum *Geneticin*[®] (G418) übertragen. Dies ist wirksam gegenüber Bakterien, Hefen, Protozoen und auch Säugetierzellen, so daß HEK-Zellen, die das Resistenzgen nicht oder nicht mehr

Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM		
+ Nährstoffmischung F-12 HAM 1:1		Sigma D-0547
mit L-Glutamin	$0,365 { m g/l}$	
Bicarbonat	1,2 g/l	
Geneticin [®] Disulfat	400 mg/l	Sigma G-5013
Penicillin	10.000 U/l	
Streptomycin	10 mg/l	
Fötales Kälberserum FCS	10%	
TRIS	bis pH 7,4 $$	Merck

Tabelle 2.2: Nährmedium für die Zellkultur von humanen embryonalen Nierenstammzellen (HEK293). Mengenangaben zur Herstellung des Mediums als Konzentration, dahinter Bestellnummern und Angaben zur Bezugsquelle: Fa. Sigma, Deisenhofen; Fa. Merck . Das Aminoglykosid-Antibiotikum *Geneticin*[®] dient zur Selektion erfolgreich mit dem Natriumkanal Na_v1.8 transfizierter Zellen, da diese zusätzlich mit einem Resistenzfaktor versehen wurden. Der pH-Wert wurde mit TRIS-Puffer (Tris[hydroxymethyl]aminomethan) auf 7,4 eingestellt.

besitzen, innerhalb von zwei bis drei Teilungszyklen abgetötet werden. In der Zellkultur wurde eine für nicht transfizierte HEK-Zellen letale Konzentration von 400 mg/l verwendet (siehe Tabelle 2.2).

2.3.2 Zellkultur

Die mit dem Natriumkanal Na_v1.8 transfizierten Zellen wurden von der Firma GlaxoSmithKline (Stevenage, Herts, GB) mit Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) konserviert und auf Trockeneis geliefert. Nach dem möglichst schonenden Abzentrifugieren des Kälteschutzmittels (DMSO) wurden verbliebenen vitale Zellen zunächst für zwei Wochen in einem Kulturmedium mit 20% Kälberserum kultiviert, bis eine stabile, konfluente Zellpopulation herangewachsen war.

Das zuvor auf Vorrat hergestellte Rohmedium wurde unter sterilen Kautelen wöchentlich mit mycoplasmenfreien fötalem Kälberserum versetzt (siehe Tabelle 2.2), das wegen seines reichen Gehaltes an Wachstumsfaktoren und Nährstoffen häufig in der Zellkultur verwendet wird. Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter einer zuvor mit 1-Propanol und UV-Licht desinfizierten Sterilbank (Ceag

(2.1)
$$pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

$$(2.2) [H_2CO_3] = S \times pCO_2$$

$$(2.3) \qquad [HCO_3^-] = S \times pCO_2 \times 10^{pH-pK}$$

pK = Dissoziationskonstante [6,1]
$$[HCO_3^-]$$
 = Bicarbonatkonzentration [mol/l]
pCO₂ = Kohlendioxid-Partialdruck [kPa] $[H_2CO_3]$ = Kohlensäurekonzentration [mol/l]
S = Löslichkeitskoeffizient von Kohlendioxid in Plasma [$\approx 0,203 \text{ mol}\cdot l^{-1}\cdot kPa^{-1}$]

Schirp Reinraumtechnik) durchgeführt. Die Kulturschalen wurden in einem Wärmeschrank BE400 (Memmert) bei 37 °C unter einer Glaskuppel mit Wasserreservoir und Begasung mit 5% Kohlendioxid und 21% Sauerstoff aufbewahrt. Die effektive mit diesem Aufbau erreichbare CO_2 -Konzentration lag bei 3,5 bis 4%. Nach diesem Wert wurde die notwendige Menge Natriumbicarbonat für das Kulturmedium berechnet. Den pH-Wert des Bicarbonat-Kohlensäure-Puffersystems liefert die Gleichung nach Henderson und Hasselbalch (Gleichung 2.1).

Die Kohlensäurekonzentration $[H_2CO_3]$ steht über den Löslichkeitskoeffizienten mit dem Kohlenstoffdioxidgehalt der Umgebung in Beziehung (Gleichung 2.2). Der Partialdruck wird in kPa angegeben, was näherungsweise dem prozentualen Gehalt entspricht. Nach Umformen (Gleichung 2.3) und Einsetzen der gegebenen Werte erhält man die Bicarbonatkonzentration zur Einstellung des gewünschten pH-Wertes von 7,4. Der Vorteil dieses Puffersystems ist weniger eine große Pufferkapazität als die Möglichkeit, den pH-Wert durch die leicht zu variierende gasförmige Komponente CO_2 gut beeinflussen zu können.

Alle zwei bis drei Tage wurde das Kulturmedium gewechselt und abhängig von der Dichte des Zellrasens eine Umsetzung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS - Phosphate Buffered Saline) gewaschen um Reste des Kulturmediums zu entfernen. Für eine Minute wurde dann EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Versene[®]) hinzugegeben, das als Calciumchelator bewirkt, daß die Zellen ihre Mikropodien und Ausläufer von den benachbarten Zellen zurückziehen.

Nach erneutem Waschen konnten die so "befreiten" HEK-Zellen leicht mit einer mit frischem Medium befüllten Pipette angesaugt und im Verhältnis 1:5 auf neue 10 cm Petrischalen (Greiner) verteilt werden. Dabei wurden auch kleine 3 cm Schalen beschickt, die nach dem Anwachsen der Zellen bis zu zwei Tage für "patch-clamp" - Experimente verwendet werden konnten. Die Zellkultur wurde so bis in die 35. Passage fortgeführt, bis die Zellen einen deutlichen Qualitätsverlust in Wachstum und Experimentierfreudigkeit sowie schrumpfende Natriumströme aufwiesen, letzteres am ehesten verursacht durch eine Abnahme der Dichte der exprimierten Kanäle.

Kapitel 3

Ergebnisse

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die elektrophysiologischen Eigenschaften des isolierten $Na_v 1.8$ -Natriumkanals zu charakterisieren. Dies soll den Vergleich mit in früheren Arbeiten gewonnenen Daten aus der vielfältigen Natriumkanalpopulation von Spinalganglien ermöglichen. Darauf aufbauend wird die Wirkung von Lidocain in variablen Konzentrationen und Haltepotentialen untersucht. Die physiologische Öffnung und die Inaktivierung werden durch Lidocain beeinflußt.

3.1 Spannungsabhängige Aktivierung und Inaktivierung

Um Natriumströme des isolierten Na_v1.8-Natriumkanals zu messen, wird nach erfolgreichen "whole-cell"-Patch einer Zelle über den "patch-clamp"-Verstärker nach dem Prinzip der Spannungsklemme ein negatives Membranpotential von -90 mV eingestellt. Über den PC wird die Zelle mit einem definierten Impulsprotokoll gereizt (Abbildung 3.1). Vor dem Testimpuls wird ein hyperpolarisierender Vorimpuls nach -110 mV von 20 ms Dauer ausgelöst. Durch den Vorimpuls nehmen



Abbildung 3.1: Exemplarische Darstellung der Natriumströme einer untersuchten HEK-Zelle, darüber die jeweiligen Impulsprotokolle. Linke Seite: Zur Gewinnung der Aktivierungskurve wird von einem Ruhemembranpotential von -90 mV ausgehend zunächst für 20 ms nach -110 mV hyperpolarisiert. Darauf folgen Testimpulse von 20 ms Dauer in 10 mV Schritten ansteigend von -60 mV bis 80 mV. Rechte Seite: Zur Messung der potentialabhängigen Inaktivierung wird die Zelle mit Vorimpulsen von -80 mV bis 20 mV gereizt. Gemessen wird der Maximalstrom auf den unmittelbar folgenden Testimpuls nach 20 mV und einer Dauer von 5 ms.

auch inaktivierte Natriumkanäle den Ruhezustand an und können durch den folgenden Testimpuls aktiviert werden.

Die Reizung der Zelle erfolgt durch das Impulsprotokoll wiederholt mit hyperpolarisierenden Vorimpuls und folgenden Hauptimpuls von 20 ms Dauer, der durch den Sprung zu einem depolarisierenden Membranpotential Natriumströme auslöst (15fache Wiederholung in 10mV-Schritten ansteigend von -60 mV bis +80 mV). Eine Aufzeichnung der so erhaltenen Natriumströme ist im linken Teil der Abbildung 3.1 exemplarisch dargestellt. Bei einer Natriumkonzentration von 145 mmol/l in der Badlösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.1, Seite 37) und einem Haltepotential von -90 mV werden Natriumspitzenströme mit Amplituden

$$G_{Na} = \frac{G_{max}}{1 + e^{\frac{E_{ha} - E}{k_a}}}$$

$$(3.2) I_{Na} = G_{Na} \times (E - E_{Na})$$

(3.3)
$$I_{Na} = \frac{G_{max}}{1 + e^{\frac{E_{ha} - E}{k_a}}} \times (E - E_{Na})$$

$$I_{Na} = \frac{I_{max}}{1 + e^{\frac{E - E_{hi}}{k_i}}}$$

 $\begin{array}{ll} I_{Na} = \operatorname{Natriumstrom} \left[\operatorname{nA} \right] & G_{Na} = \operatorname{Leitf\"{a}higkeit} \begin{array}{ll} f \\ \mbox{ir} & \operatorname{Natriumionen} \left[\operatorname{S} \right] \\ E = \operatorname{Membranpotential} \left[\operatorname{mV} \right] & G_{max} = \operatorname{maximale} \operatorname{Natriumleitf\"{a}higkeit} \left[\operatorname{S} \right] \\ E_{Na} = \operatorname{Umkehrpotential} \begin{array}{ll} f \\ \mbox{ir} & \operatorname{Natriumionen} \left[\operatorname{mV} \right] & k_a, \ k_i = \operatorname{Steigungskoeffizienten} \left[\operatorname{mV} \right] \\ E_{ha} = \operatorname{halbmaximales} \operatorname{Aktivierungspotential} \left[\operatorname{mV} \right] & I_{max} = \operatorname{maximaler} \operatorname{Natriumstrom} \left[\operatorname{nA} \right] \\ E_{hi} = \operatorname{halbmaximales} \operatorname{Inaktivierungspotential} \left[\operatorname{mV} \right] & \end{array}$

bis 1,2 nA bei einem Median von etwa 0,3 nA erzielt.

Die gewonnenen Daten dienen zur Untersuchung der Aktivierungsschwelle und der Abhängigkeit des Stromes vom Membranpotential. Trägt man die gemessenen Natriumspitzenströme gegen das Membranpotential des jeweiligen Testimpulses auf, erhält man die Strom-Spannungskurve der Abbildung 3.2 auf Seite 46. Der linke Teil der Strom-Spannungskurve zeigt die bei Depolarisierung des Membranpotentials zunehmende Öffnung der in der Zellmembran liegenden Kanäle. Die statistische Öffnung der Gesamtheit der Natriumkanäle beschreibt die Funktion von Ludwig Boltzmann (Gleichung 3.1). Der Parameter E_{ha} ist das Membranpotential, bei dem die Hälfte der in der Membran vorhandenen Natriumkanäle aktiviert sind. Der Steigungskoeffizient k_a gibt an, wie stark sich die Natriumleitfähigkeit in Abhängigkeit vom Membranpotential ändert.

Bei Membranpotentialen, die deutlich höher als die Aktivierungsschwelle liegen, kann man annehmen, daß praktisch alle Kanäle geöffnet sind und damit die ma-



Abbildung 3.2: Strom-Spannungskurve klonierter Na_v1.8 Kanäle. Aufgetragen ist der Natriumspitzenstrom I gegen das Testpotential E. Experimente in externer Tyrodelösung, Innenlösung interne KCI. Nach einem hyperpolarisierenden Vorimpuls von -110 mV werden Natriumströme ausgelöst mit wiederholten Testimpulsen, in 10 mV Schritten ansteigend von -60 mV bis +80 mV bei einem Haltepotential E=-90 mV.

ximale Natriumleitfähigkeit G_{max} erreicht ist. Der resultierende Strom verhält sich linear entsprechend der Potentialdifferenz und der Natriumleitfähigkeit G_{Na} (rechter Teil der Strom-Spannungskurve). Diese Beziehung beschreibt das Ohmsche Gesetz (Gleichung 3.2, Seite 45).

Das Einsetzen der Boltzmann-Funktion in Gleichung 3.2 ergibt die Funktionsgleichung der Strom-Spannungskurve (Gleichung 3.3, Seite 45). Die Parameter werden durch nicht-lineare Anpassung der Funktion an die Datenpunkte gewonnen. Die Nullstelle und damit das ermittelte Umkehr- bzw. Gleichgewichtspotential für Natriumionen liegt bei 46,2 \pm 6,9 mV (n=12). Für den isolierten tetrodotoxinresistenten Natriumkanal vom Typ Na_v1.8 ergibt sich ein halbmaximales Aktivierungspotential E_{ha} von -2,9 \pm 3,8 mV. Zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung wird ein anderes Impulsprotokoll verwendet. Anstelle eines hyperpolarisierenden Vorimpulses wird ein Vorimpuls zu verschiedenen depolarisierenden Potentialen ausgelöst. Dies geschieht repetitiv mit 11 Potentialen von -80 mV bis 20 mV über 20 ms Dauer. Dem Vorimpuls folgt ein Hauptimpuls nach 20 mV für 5 ms, bei dem der resultierende Natriumspitzenstrom gemessen wird. Das Impulsprotokoll sowie eine exemplarische Originalregistrierung sind im rechten Teil der Abbildung 3.1 auf Seite 44 dargestellt.

Die so ausgelösten Maximalströme mehrerer Experimente werden normalisiert und gegen das Potential des zugehörigen Vorimpulses aufgetragen. Das Anpassen der Parameter der Gleichung 3.4 auf Seite 45 an die normalisierten Meßdaten ergibt ein halbmaximales Inaktivierungspotential E_{hi} von -29,8 mit einem Standardfehler der Anpassung von $\pm 0,9$ mV und für die Steigung k_i einen Wert von $8,6 \pm 0,9$ mV (n=12). In der Abbildung 3.3 auf Seite 48 ist links die resultierende Inaktivierungskurve des Na_v1.8-Natriumstromes dargestellt.

Zum Vergleich der spannungsabhängigen Aktivierung mit der spannungsabhängigen Inaktivierung werden für die Erstellung der Aktivierungskurve die Daten der Strom-Spannungskurve verwendet (Abbildung 3.2). Mit dem halbmaximalen Aktivierungspotential E_{ha} wird die Aktivierung des Stromes gegen das Potential aufgetragen. Dargestellt ist die Aktivierungskurve rechts neben der Inaktivierungskurve in Abbildung 3.3.

3.2 Kanalblockade mit Lidocain

Die Lidocainblockade von Natriumkanälen in elektrisch erregbaren Geweben ist bereits gut untersucht worden. Der Natriumstrom dieses Kanals wird wie der Natriumstrom anderer Natriumkanäle durch Lidocain konzentrationsabhängig und reversibel blockiert.



Abbildung 3.3: Aktivierungs- und Inaktivierungskurve der normalisierten Na_v1.8 Natriumströme in der Kontrollösung. Zur Normalisierung der Aktivierungskurve wurden die Stromwerte der Strom-Spannungskurve aus Abbildung 3.2 bei jedem Potential auf die maximale Leitfähigkeit der Kurve angepaßt. Die Stromwerte der Inaktivierungskurve wurden auf den Maximalstrom bei einem Haltepotential von -90 mV normalisiert. Im Kasten angegeben das halbmaximale Inaktivierungspotential E_{hi} und das halbmaximale Aktivierungspotential E_{ha} . Erläuterungen im Text.

3.2.1 Tonischer und phasischer Block

Zur Messung der Blockade des Natriumstromes wird die Zelle in externer Tyrodelösung unter verschiedenen Außenkonzentrationen von Lidocain gereizt. Die Applikation der verschiedenen Lidocainkonzentrationen geschieht in einem röhrenförmigen Superfusionssystem (Kapitel 2.2.1, Seite 36). Zur Anwendung kommen neben der Kontrollösung ohne Lidocain verschiedene Lidocainlösungen in den Konzentrationen 30 μ mol/l, 100 μ mol/l, 300 μ mol/l, 1 mmol/l und 3 mmol/l. Zum Lösungswechsel wird die Pipette mit anhaftender Zelle mittels des Mikromanipulators aus der Röhre mit der Kontrollösung nacheinander in die fünf Röhren mit zunehmenden Lidocainkonzentrationen eingebracht, wobei nach einer Minute Einwaschzeit in jeder Röhre unter jeder der verwendeten Konzentrationen das unten erläuterte Impulsprotokoll ausgeführt wird.

Die Reizung der Zelle erfolgt nach einem hyperpolarisierenden Vorimpuls von 20 ms Dauer zu einem Potential von -110 mV. Die Natriumströme werden durch einen Hauptimpuls von 20 ms Dauer nach 20 mV ausgelöst und aufgezeichnet. Die resultierenden maximalen Natriumströme bei verschiedenen Lidocainkonzentrationen werden durch den Natriumspitzenstrom in Kontrollösung (ohne Lidocain) dividiert und von 1 subtrahiert, um den fraktionellen Block zu erhalten. Mit zunehmender Lidocainkonzentration kommt es zu einer zunehmenden Blockierung des Natriumspitzenstromes. Dies wird als tonischer Block bezeichnet.

Zur Messung des sequentiellen Blockadeverhaltens wurde die Zelle mit dem oben erwähnten Impulsprotokoll gleichförmig mit bis zu 10 Impulsen und einer Frequenz von 2 Hertz repetitiv weiter gereizt. Mit jedem Impuls kommt es bei gleichbleibender Lidocainkonzentration zu einer weiteren Zunahme der Blockierung. Die Stärke dieses Effektes nimmt mit der Lidocainkonzentration, er wird als phasischer oder "use-dependent"-Block bezeichnet. Der phasische Block als Charakteristikum des Lidocains und einiger anderer Lokalanästhetika wurde auch in Arbeiten an Spinalganglien beobachtet [DREIMANN 2001].

Nach den Versuchen in der höchsten angewendeten Lidocainkonzentration von 3 mmol/l wird die Zelle zurück in die Kontrollösung verbracht, wo nach einer Minute Auswaschzeit eine vollständige Erholung der Reizantwort eintritt. Die Lidocainblockade am Na_v1.8-Kanal ist somit reversibel.

Die Abbildung 3.4 auf Seite 50 zeigt die Originalregistrierungen der Lidocainblockade. Im oberen Abschnitt ist der bei zunehmenden Lidocainkonzentrationen abnehmende Natriumspitzenstrom des ersten Impulses dargestellt (Tonischer Block). Die untere Hälfte der Abbildung zeigt die Entwicklung des "usedependent"-Blocks. In einer 300 μ mol/l Lidocainlösung nimmt die Reizantwort bei repetitiver Reizung von Impuls zu Impuls ab. Der Natriumspitzenstrom nimmt in der Amplitude, der Auf- und Abstrich an Geschwindigkeit ab.



Abbildung 3.4: Originalregistrierungen der Lidocainblockade. Von -90 mV ausgehend wird die Zelle mit einem Testimpuls nach 20 mV über 50 ms Dauer gereizt. Dargestellt sind die Stromverläufe nach Reizung. A: tonischer Block bei verschiedenen Lidocainkonzentrationen und B: Verlauf der Entwicklung des phasischen oder "use-dependent"-Blocks bei 300 µmol/l nach repetitiver Reizung.

Zusammenfassend zeigt sich die Blockade des Natriumstromes durch Lidocain als reversibel und abhängig von Lidocainkonzentration und Impulsanzahl.

3.2.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Lidocainblockade

Die relative Blockierung des Natriumstromes durch Lidocain gegenüber dem Natriumspitzenstrom in Kontrollösung erhalten wir durch Division des blockierten durch den nichtblockierten Spitzenstrom und Subtraktion von 1. Mit den so gewonnenen Datenpunkten werden die Parameter der Hill-Gleichung (Gleichung 3.5) angepaßt, darunter der Wert der halbmaximalen Blockierungskonzentration IC_{50} . Diese gibt diejenige Wirkstoffkonzentration an, bei der statistisch die

(3.5)
$$B_{rel} = \frac{1}{1 + (\frac{IC_{50}}{c})^n}$$

 B_{rel} = relative Blockade IC_{50} = halbmaximale Blockierungskonzentration [mol/l] c = Wirkstoffkonzentration [mol/l] n = Hill-Koeffizient

Hälfte aller vorhandenen Natriumkanäle blockiert ist, das heißt, der resultierende Natriumstrom noch die Hälfte des Maximalstromes beträgt. Die IC_{50} ist ein wichtiger Parameter für die pharmakologische Potenz des Lidocains oder anderer Pharmaka. Der Parameter n der Hill-Gleichung ist Ausdruck für die Steilheit der Kurve und gibt einen Anhalt für die Zahl der mit einem Kanal interagierenden Wirkstoffmoleküle. Der Parameter n wird hier unter der Annahme, das ein Molekül Lidocain immer genau einen Natriumkanal blockiert, gleich Eins gesetzt. Die mit den Datenpunkten des ersten Impulses angepaßten Parameter dienen zur Erstellung der Konzentrations-Inhibitionskurve für den tonischen Block, die Datenpunkte des zehnten Impulses ergeben den Kurvenverlauf für den phasischen

Tabelle 3.1: Die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen von Lidocain (IC₅₀) in Abhängigkeit des experimentellen Ruhemembranpotentials. Darstellung der Werte für die IC₅₀ bei -60 mV, -90 mV und -110 mV als Wirkstoffkonzentrationen und dem Standardfehler der Anpassung in μ mol/I, Anzahl (n) der Experimente in Klammern.

Haltepotential	-60 mV	-90 mV	-110 mV
tonischer Block	$54,6 \pm 11,8$	$157,7 \pm 11,5$	$540,1 \pm 76,1$
phasischer Block	$44,6 \pm 7,9$	$77,3 \pm 14,0$	$153,6 \pm 32,9$
	(n=3)	(n=12)	(n=1)

oder "use-dependent"-Block.

3.2.3 Abhängigkeit der Lidocainblockade vom Haltepotential

Die Wirkung von Lokalanästhetika auf Natriumkanäle ist auch vom Haltepotential abhängig. Um zu untersuchen, inwieweit die Lidocainwirkung am TTXresistenten Na_v1.8-Kanal vom Haltepotential beeinflußt wird, werden die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen bei -90 mV, einem depolarisierenden Haltepotential von -60 mV und einem hyperpolarisierenden Haltepotential von -110 mV bestimmt und Konzentrations-Inhibitions-Kurven für Lidocain erstellt. Es läßt sich zeigen, daß es mit zunehmender Depolarisierung zu einer deutlichen Zunahme der tonischen und in geringerem Maße auch der phasischen Blockierungspotenz kommt. Die IC₅₀-Werte sind in Tabelle 3.1 dargestellt, die Konzentrations-Inhibitionskurven in Abbildung 3.5 auf Seite 53.



Abbildung 3.5: Konzentrations-Inhibitionskurven für tonische und phasische Blockade des Na_v1.8-Natriumstromes mit Lidocain bei Haltepotentialen von A: -60 mV, B: -90 mV und C: -110 mV. Dargestellt wird der relative Block des Spitzenstromes vom ersten (tonisch, quadratisches Symbol) und vom zehnten Impuls (phasisch, dreieckiges Symbol) mit einer Frequenz von 2 Hertz bei verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen. In D sind die in Tabelle 3.1 aufgeführten halbmaximalen Blockierungskonzentrationen IC₅₀ gegen die verwendeten Membran-Haltepotentiale aufgetragen.

3.2.4 Der dynamische Block

Unter einem dynamischen Block verstehen wir die Zunahme der Natriumstromblockade im Verlauf der Aktivierung des Natriumstromes, was einer zunehmenden Blockade nur der geöffneten Natriumkanäle gleichkommt. Die Mehrzahl der Natriumkanäle befindet sich beim Ruhemembranpotential im Ruhezustand. Dies gilt auch in Anwesenheit von Lidocain. Bei Depolarisation kommt es zu einer exponentiellen Öffnung einer großen Zahl spannungsabhängiger Natriumkanäle. Erst nach Öffnung eines Kanals kann ein Lidocainmolekül in die Kanalpore diffundieren und diese blockieren. In der Summe vieler Natriumkanäle kommt es im Zeitverlauf nach Aktivierung durch die zunehmende Blockade vieler einzelner Natriumkanäle zu einer zunehmenden Blockierung des Natriumstromes (Offenkanalblock). Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 3.6 auf Seite 56 dargestellt:

Der Abschnitt A zeigt im unteren Teil die Originalregistrierung des Natriumstromverlaufes in 300 μ mol/l Lidocain respektive Kontrollösung nach Reizung mit einem Impuls nach 20 mV. Durch Division beider Kurven erhält man den relativen Anteil noch aktiver Kanäle zu jedem Zeitpunkt des Stromverlaufes (obere, schwarze Kurve in Abschnitt A). Dieser Anteil nimmt ab dem Reizungszeitpunkt bis zum Erreichen eines gleichbleibenden Blockierungsniveaus kontinuierlich ab. Dieses Gleichgewicht der Blockierung zeigt den maximalen dynamischen Block oder Offenkanalblock. In der blau dargestellten Mittelung der Kurve ergibt sich eine asymptotische Exponentialfunktion, die in Richtung des Nullpunktes der X-Achse extrapoliert wird. Der relative Natriumstrom auf der Y-Achse liegt zum Zeitpunkt Null hier nahezu bei Eins (gestrichelt dargestellt). Es finden sich zum Reizungszeitpunkt vor der Stromauslösung also nur sehr wenige bereits mit Lidocain blockierte Kanäle. Die Extrapolation zeigt so die Lidocainblockade von Natriumkanälen im Ruhezustand.

In Abschnitt B der Abbildung 3.6 auf Seite 56 sind diese relativen Stromkurven vergleichend für die untersuchten Lidocainkonzentrationen abgebildet. Der relative Strom nach Erreichen des Gleichgewichts der Blockade sinkt mit zunehmender Konzentration. In der späten Messung bei 70 ms nach Reizbeginn ergibt dies bei 30 μ mol/l einen relativen Strom von 53,9%. Bei einer Konzentration von 100 μ mol/l liegt dieser noch bei 32,0%, bei 300 μ mol/l noch 18,6%. Bis 1000 μ mol/l fällt der Strom auf ca. 14,2% ab. (Standardfehler siehe Tab. 3.2). Der vordere, exponentielle Teil der Verlaufskurven des dynamischen Blocks verläuft bei höheren Lidocainkonzentrationen steiler, die Geschwindigkeit der Blockade des Stroms nimmt also mit steigender Konzentration zu. Die Steigungsfaktoren τ der Exponentialfunktionen nehmen ab: von 3,77 ms bei 30 μ mol/l über 3,40 ms bei 100 μ mol/l und 2,66 ms bei 300 μ mol/l bis hin zu 0,90 ms bei 1000 μ mol/l (Tabelle 3.2). Die Extrapolation der Kurven des dynamischen Blockes gegen den Nullpunkt der Zeitachse zeigt, daß der relative Natriumstrom bei höheren Lidocainkonzentrationen schon zu sehr frühen Zeitpunkten abnimmt, also bereits Natriumkanäle im blockierten Zustand vorliegen.

Tabelle 3.2: Relativer Strom und Zeitkonstante τ der Blockierung der späten Messung nach Erreichen des Gleichgewichtes zwischen blockierten und nichtblockierten Natriumkanälen (dynamischer Block oder Offenkanalblock). Bei verschiedenen Lidocainkonzentrationen ist der relative Strom gegenüber dem in Kontrollösung zum Zeitpunkt t = 10 ms nach Auslösung des Testimpulses angegeben. Darunter die Zeitkonstante τ der Steigung.

Lidocain n = 4	$ au \; [{ m ms}]$	relativer Strom
$30 \ \mu mol/l$	$3,77 \pm 0,25$	$0,539 \pm 0,107$
100 $\mu mol/l$	$3,40 \pm 0,69$	$0,320 \pm 0,069$
$300 \ \mu mol/l$	$2,\!66\pm0,\!23$	$0,186 \pm 0,059$
1000 $\mu mol/l$	$0{,}90\pm0{,}24$	$0,142 \pm 0,045$



Abbildung 3.6: Die dynamische Blockade des Natriumstromes durch Lidocain. A: Beispielhafte Darstellung der Verhältnisse bei einer Konzentration von 300 μ mol/I Lidocain. Im unteren Abschnitt die Originalregistrierungen der Stromverläufe in Kontrolle und bei einer Lidocainkonzentration von 300 μ mol/I Lidocain. Darüber dargestellt ist die Division beider Kurven. Die Mittelung und Kurvenanpassung stellt die blaue Linie dar. Gepunktet angedeutet ist die Extrapolation der Kurve gegen 1 im Verlauf der ersten 1,25 ms. B: Vergleich der Verläufe des abnehmenden relativen Stromes in Kontrolle gegenüber verschiedenen verwendeten Lidocainkonzentrationen.

3.2.5 Konzentrations-Wirkungsbeziehung des dynamischen Blocks

Die Konzentrationsabhängigkeit des dynamischen Blocks zeigt sich an Untersuchungen der Stromverlaufskurven bei verschiedenen Lidocainkonzentrationen. Die Blockade des Natriumstromes nimmt im Verlauf der Reizantwort deutlich zu, bis sich ein Gleichgewicht der Blockierung einstellt. Dies zeigt die maximale Blockierung von geöffneten Natriumkanälen an.

Durch Extrapolation der Stromverlaufskurven erhalten wir die Blockadewerte vor Aktivierung des Stromes, also die Blockade des ruhenden Natriumkanals. Durch Anpassung der Parameter zweier Hill-Funktionen (Gleichung 3.5, Seite 51) an die Datenpunkte erhalten wir zwei Konzentrations-Inhibitionskurven, die in Abschnitt A der Abbildung 3.7 auf Seite 60 dargestellt sind. Den Offenkanalblock nach Erreichen des Gleichgewichtes zeigt die obere Kurve an. Die halbmaximale Blockierungskonzentration IC_{50} liegt hier bei 46,4 ± 10,8 µmol/l (Tabelle 3.3). Die Blockade des ruhenden Kanals verläuft zum großen Teil außerhalb der untersuchten Lidocainkonzentrationen. Extrapoliert (gestrichelt dargestellt) gibt die untere Kurve die Blockade des ruhenden Kanals mit einer IC_{50} von 2247 ± 628 µmol/l wieder. Grau hinterlegt dargestellt sind zum Vergleich die Dosiswirkungskurven der phasischen (graue Quadrate) und tonischen Blockade (graue Kreise) des Natriumspitzenstromes bei einem Haltepotential von -90 mV (Abbildung 3.5, Seite 53). Die IC_{50} -Werte liegen zwischen denen des Offenkanalblocks und der Blockade des ruhenden Kanals.

Der untere Abschnitt B der Abbildung 3.7 zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit als Reziprokwert der Zeitkonstanten τ aufgetragen gegen die Lidocainkonzentration (Gleichung 3.6). Die Reaktionsgeschwindigkeit verhält sich linear proportional zur Konzentration des Lidocains im Sinne einer Reaktion erster Ordnung nach der kinetischen Ableitung des Massenwirkungsgesetz nach Guldberg und Waage (Gleichung 3.7). Die Steigung m der mit den Tau-Werten angepaßten Geraden entspricht der Geschwindigkeitskonstante k der Hinreaktion der Bindung des Lidocains an den Kanal. Sie beträgt $1,36 \cdot 10^6 \, \mathrm{l} \, \mathrm{mol}^{-1} \mathrm{s}^{-1}$. Der extrapolierte Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse entspricht der konzentrationsunabhängigen Geschwindigkeit der Rückreaktion der Trennung des Lidocains vom Natriumka-

Tabelle 3.3: Die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen IC_{50} von Lidocain für den maximalen dynamischen Block (Offenkanalblock) sowie die Blockierung des ruhenden Kanals vor Aktivierung. Alle Angaben in μ mol/I mit dem Standardfehler SE der Anpassung und der Anzahl n der Experimente in Klammern. Die Konzentrations-Inhibitionskurven sind in Abbildung 3.7 auf Seite 60 dargestellt.

	IC_{50}	SE	
dynamischer Block	46,4	± 10,8	n = 3
ruhender Kanal $[\mu \text{mol/l}]$	2247	± 628	n = 3

nal. Die Dissoziationsrate entspricht im Gleichgewichtszustand der Geschwindigkeit der Hinreaktion und beträgt hier 197 s⁻¹.

(3.6)
$$v(A) = \tau^{-1}$$

(3.7)
$$v(A) = -\frac{dc(A)}{dt} = k \times c(A)$$

 $\begin{array}{ll} v(A) = Geschwindigkeit \; der \; Reaktion \; von \; (A) & k = Geschwindigkeitskonstante \\ c(A) = Konzentration \; des \; Reaktionspartners \; (A) \end{array}$



Abbildung 3.7: Abschnitt A: Konzentrations-Inhibitionskurven für den maximalen dynamischen Block (Offenkanalblock, aufrechte Dreiecke) sowie die Blockierung vor Aktivierung des Stromes (Block des ruhenden Kanals, umgekehrte Dreiecke). Die IC₅₀-Werte sind in Tabelle 3.3 auf Seite 58 aufgeführt (n=3). Zum Vergleich wurden die Konzentrations-Inhibitionskurven für den tonischen (Kreise) und phasischen Block (Quadrate) bei -90 mV Haltepotential grau hinterlegt dargestellt (Entnahme aus Abbildung 3.5, Seite 53).

Abschnitt B: Lineare Beziehung der reziproken Zeitkonstanten gegen die Lidocainkonzentration. Die Steigung m der Geraden gibt die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion, der extrapolierte Schnittpunkt mit der Y-Achse die Geschwindigkeit der Rückreaktion an. (n=3)
3.2.6 Refraktärzeit und Reaktivierung unter Lidocainwirkung

Um die Refraktärzeit der Nichtauslösbarkeit des Natriumstromes nach einer vorangegangenen Kanalöffnung zu bestimmen, werden Impulsprotokolle mit einem Doppelimpuls mit dazwischenliegender variabler Erholungsphase verwendet. Dies geschieht sowohl in Kontrollösung, als auch in verschiedenen Lidocainkonzentrationen, um die Dissoziation des Lidocains vom Rezeptor zu untersuchen. Zwischen zwei depolarisierende Testimpulse von 50 ms und 5 ms Dauer nach 20 mV wird ein Erholungszeitraum mit Rückkehr zum Haltepotential von -90 mV eingeschaltet. Das Erholungsintervall wird dabei von 1 ms bis 3000 ms Dauer schrittweise vergrößert. Aus der Höhe des Ganzzellstromes auf den zweiten Impuls kann man auf die Zahl der wieder aktivierbaren Natriumkanäle schließen.

Die Erholung von der Inaktivierung verläuft dabei nach einer schnellen Komponente innerhalb der ersten 50 ms und einer langsamen Komponente, die wir über einen Zeitraum von 3000 ms beobachten.

Die Berechnung der Zeitkonstanten der langsamen und schnellen Erholungskomponenten erfolgt durch die Anpassung der Parameter einer doppelten Exponentialfunktion an die Meßwerte (Gleichung 3.8). Die beiden Komponenten ergänzen sich dabei zu einem relativen Strom I von Eins (Gleichung 3.9).

(3.8)
$$f(I) = A \times e^{\frac{-\tau_a}{t}} + B \times e^{\frac{-\tau_b}{t}}$$

 $\begin{aligned} \tau_a &= \text{Zeitkonstante schnelle Komponente [ms]} \quad \tau_b &= \text{Zeitkonstante langsame Komponente [ms]} \\ \text{A} &= \text{relativer Anteil schnelle Komponente} \quad \text{B} &= \text{relativer Anteil langsame Komponente} \end{aligned}$

In Kontrollösung erholen sich die Ströme sehr schnell mit $\tau_a = 4,01 \pm 0,51$ ms (siehe Tabelle 3.4, Seite 62). Dies entspricht der schnellen Aufhebung der Inaktivierung, die in diesem Fall bei nahezu allen Kanälen auftritt. Unter Zugabe von Lidocain verschiebt sich dies mit steigender Konzentration in Richtung der langsamen Komponente: bei 100 μ M beträgt der Anteil der schnellen Reaktivierung noch 83,9% und bei einer Lidocainkonzentration von 300 μ M noch 57,7% bei Zeitkonstanten τ_a von 5,09 ms und 6,9 ms. Die hier an 100 fehlenden Anteile erholen sich von der Inaktivierung nun nach einer langsameren Kinetik mit Zeitkonstanten τ_b von 1877 ± 2601 ms und 999 ± 913 ms. Grafisch dargestellt sind diese Lidocaineffekte in Abbildung 3.8 auf Seite 63.

Zusammenfassend kommt es unter Lidocaineinfluß zu einer Verlängerung der Erholungszeit von der Inaktivierung.

Tabelle 3.4: Zeitkonstanten τ für die Wiederauslösbarkeit des Natriumstromes nach einem variablen Erholungsintervall. τ_a für die schnelle Reaktivierung innerhalb der ersten 50 ms, τ_b für die langsame Komponente von bis zu 3 s Dauer. Relative Beteiligung beider Mechanismen an der Reaktivierung in A - schnelle Komponente und B - langsame Komponente.

Lidocain	schnelle Komponente		langsame Komponente	
(n=5)	$\tau_a [\mathrm{ms}]$	A [rel]	$\tau_b [\mathrm{ms}]$	B [rel]
Kontrolle	$\begin{array}{c} 4,01 \\ \pm \ 0,51 \end{array}$	$0,940 \pm 0,040$		
100 $\mu mol/l$	$5,09 \pm 0,50$	$0,839 \pm 0,023$	$1876,97 \pm 2601,26$	$0,197 \\ \pm 0,130$
$300 \ \mu mol/l$	$\begin{array}{c} 6,\!90 \\ \pm 2,\!60 \end{array}$	$0,577 \pm 0,070$	$998,80 \pm 912.83$	$0,423 \pm 0,126$



Abbildung 3.8: Wiederauslösbarkeit des Nav1.8-Natriumstromes nach Reizung und Blockade mit Lidocain in Konzentrationen von 100 μ mol/l und 300 μ mol/l respektive einer Kontrollösung. Dargestellt werden der relative Strom in Abhängigkeit von einer auf die Depolarisation folgenden Erholungsphase unterschiedlicher Dauer unter Angabe der Zeitkonstanten τ . Im Kasten oben rechts das verwendete Impulsprotokoll mit Reizung nach 20 mV für 50 ms, dann ein variables Erholungsintervall, dann erneute Reizung nach 50 ms für 5 ms Dauer. A: Erholungsintervall der schnellen Reaktivierung innerhalb der ersten 50 ms von B, kleiner Maßstab.

B: vollständiger Untersuchungszeitraum mit Erholungsintervall bis 3000 ms.

Kapitel 4

Diskussion

Die untersuchten mit dem Nav 1.8-Kanal transfizierten HEK-Zellen zeigen tetrodotoxinresistente Natriumströme, die native HEK-Zellinien nicht aufweisen ZHU et al. 1998]. Im Vergleich mit den Daten von [ELLIOTT und ELLIOTT 1993] von Strömen aus Spinalganglienzellen zeigen diese Natriumströme einige Charakteristika physiologisch vorkommender tetrodotoxinresistenter Natriumkanäle. Gegenüber den TTX-sensitiven Kanälen werden diese langsamer aktiviert und inaktiviert. Die maximale Stromamplitude wird durch die Zahl der in der Zellmembran liegenden Natriumkanäle bestimmt. Hier findet sich eine vergleichsweise kleine Kanalpopulation mit einem maximalen Natriumstrom bis 1,2 nA (Kapitel 3.1, Seite 43). Die Nullstelle der Strom-Spannungskurve (Abbildung 3.2, Seite 46) liegt mit 46,2 mV etwas niedriger als das mithilfe der Nernstschen Gleichung (Kapitel 1.2.2, Gleichung 1.1) für die vorliegenden Natriumionenkonzentrationen errechneten Gleichgewichtspotential. Hiernach ergibt sich bei einer Innenkonzentration der Natriumionen von 10 mmol/l und einer Außenkonzentration von 145 mmol/l ein Wert von 68,0 mV. Eine mögliche Erklärung sind auswärtsgerichtete Ströme durch native Ionenkanäle der HEK293-Zellen wie die in Kapitel 2.3 auf Seite 38 erwähnten Kaliumkanäle [ZHU et al. 1998].

4.1 Spannungsabhängigkeit der Natriumkanalfunktion

Das Potential, bei dem die Hälfte der vorhandenen Natriumkanäle aktiviert ist, liegt mit -2,9 \pm 3,8 mV geringfügig höher als das aus Vorarbeiten bekannte halbmaximale Aktivierungspotential (E_{ha}) von tetrodotoxinresistenten Kanälen an kleinen Spinalganglienzellen (-16 \pm 1 mV, [BRÄU 1998]). Die Aktivierungsschwelle liegt damit deutlich über derjenigen von tetrodotoxinsensitiven Natriumkanälen (-42 \pm 1 mV, [BRÄU et al. 1998]). Das halbmaximale Inaktivierungspotential liegt mit -29,8 mV ebenfalls höher (-65,4 \pm 1,7 mV, [KERKMANN 2005]. Bei einem Haltepotential von -90 mV befindet sich die überwiegende Mehrheit der Kanäle im geschlossenen Ruhezustand. Die Zahl der zufälligen Kanalöffnungen ist sehr gering.

4.2 Kanalblockade mit Lidocain

4.2.1 Der tonische Block

Der tonische Block ist bei TTX-sensitiven Natriumkanälen per Definition die Blockade des Natriumspitzenstroms bei niedriger Reizfrequenz (1/min oder darunter). Man geht davon aus, daß hierbei vor allem Natriumkanäle im geschlossenen Ruhezustand blockiert werden, da bei niedriger Reizfrequenz zum Zeitpunkt der erneuten Reizung keine Kanäle mehr vorhanden sind, die noch durch einen vorangegangenen Reiz im aktivierten und inaktivierten Zustand vorliegen. Eine Konzentrations-Inhibitionskurve, die mit niedriger Reizfrequenz an TTXsensitiven Natriumkanälen erstellt wurde, beschreibt daher die Affinität des Blockers zum spannungsabhängigen Natriumkanal in dessen Ruhezustand. Da TTX-resistente Natriumströme jedoch eine deutlich langsamere Aktivierungskinetik als TTX- sensitive haben, trifft dies für Erstere nur bedingt zu. Aufgrund der langsamen Aktivierungskinetik des Na_v1.8-Kanals und der schnellen Zeitkonstante des dynamischen Blocks ergibt sich zumindest ein Teil der gemessenen Spitzenstromreduktion unter Lidocaineinfluß durch den dynamischen Block. Die im Abschnitt 3.2.2 beschriebenen halbmaximalen Blockierungskonzentrationen IC₅₀ für den tonischen Block des Natriumspitzenstromes ausgelöst durch eine Einzelreizung repräsentieren einen gemischten Wert, zusammengesetzt aus den unterschiedlichen Affinitäten zum Lidocain sowohl des ruhenden als auch des geöffneten Kanals. Dieser Sachverhalt sowie die tatsächliche Affinität des geschlossenen Natriumkanals wird im Kapitel 4.2.3 über den dynamischen Block näher erläutert werden.

4.2.2 Der "use-dependent"-Block

Die bei Reizung mit hoher Frequenz (z.B. 2/s) zu beobachtende sequentiell zunehmende Blockade des Natriumstromes wird als phasischer oder "use-dependent"-Block bezeichnet. Der "use-dependent"-Block des Na_v1.8 Natriumstromes wie auch anderer Natriumkanäle durch Lidocain entsteht dadurch, daß während einer Depolarisation des Natriumkanals das Blockermolekül stärker bindet. Erst in der Repolarisationsphase nach der Depolarisation verlässt das Blockermolekül wieder langsam den Natriumkanal. Die Zeitkonstante für die Erholung von der Blockade wurde in dieser Arbeit für den Na_v1.8-Kanal konzentrationsabhängig mit etwa 1 bis 2 s bestimmt (Abbildung 3.8, Seite 63). Bei einer Reizfrequenz von 2 Hz, wo der Abstand der depolarisationen nur 0,5 s beträgt, bedeutet dies, daß noch ein Teil der Kanäle während des zweiten Reizes blockiert ist und so der Natriumstrom jetzt kleiner ist als beim ersten Reiz. Durch weitere Reize kumuliert dieser Effekt bis nach einigen Reizen ein Gleichgewicht erreicht wird. Diese, durch hohe Reizfrequenz verstärkte Blockade wird als "use-dependent"-Block bezeichnet. Die verlängerte Bindungszeit des Lidocains an den Natriumkanal kann zum einen verursacht sein durch eine sehr hohe Affinität der Lokalanästhetika-Bindungsstelle im inaktivierten Kanalzustand ("Modulated Receptor"-Hypothese [HILLE 1977]). Das Kanalprotein vollzieht während der Depolarisation eine starke Konformationsänderung, welche für die gesteigerte Affinität zum Lidocain verantwortlich sein kann. Möglich ist so auch ein "Einfangen" des Lidocainmoleküls in der Kanalpore durch Konformationsänderung des Porenausganges beim Wechsel in den inaktivierten oder ruhenden Zustand. Der Grund für den Einschluß des Lidocainmoleküls in der Kanalpore kann die positive Ladung seines terminalen Amins sein. Das Molekül wird so von der positiven Ladung des Aktivierungstores abgestoßen, welches die innere Kanalpore im Ruhezustand verschließt (Abbildung 4.1, Seite 69).

Eine große Rolle könnte hier auch das Inaktivierungspartikel spielen. Die schnelle Inaktivierung wird durch die schnell ablaufende Bindung des IFM-Partikels in der Kanalpore verursacht, was mit nur geringen Konformationsänderungen einhergeht. Diese Blockade der inneren Kanalöffnung würde das Lidocainmolekül in der Pore festhalten, ohne daß eine Änderung der Rezeptoraffinität erfolgt. Diese Schlußfolgerung wird weiter gestützt durch die Beobachtungen, daß in klonierten μ 1-Natriumkanälen nicht wie zuvor angenommen durch Lidocain der inaktivierte Zustand stabilisiert wird, und daß sich das IFM-Tripeptid aus der Bindung in der Kanalpore lösen kann, während ein Molekül des Lokalanästhetikums noch an den Kanal gebunden ist [VEDANTHAM und CANNON 1999].

4.2.3 Der dynamische Block

Als dynamischer Block wird in dieser Arbeit die Beschleunigung der Inaktivierung nach Lidocainzugabe bezeichnet (Abbildung 3.6, Seite 56). Hierbei sind zwei mögliche Mechanismen vorstellbar: Zum einen könnte Lidocain den Übergang des Kanals von dem geöffneten in den inaktivierten Zustand beschleunigen,



Abbildung 4.1: Modell der Aktivitätszustände eines Natriumkanals im zeitlichen Verlauf nach Aktivierung. Obere Reihe: Physiologischer Zustand, Untere Reihe: In Anwesenheit von Lidocain. Durch das Lidocainmolekül kommt es funktionell zu einem früheren Verschluß des Kanals und damit in der Summe der Kanäle zu einem verminderten Stromfluß. Die Grundlage der möglichen Aktivierungszustände und die Übergänge zwischen diesen bildet die in Abbildung 1.3 auf Seite 13 dargestellte Markov-Kette. Diese Aktivierungszustände finden ihr physiologisches Korrelat in den hier schematisch dargestellten Konformationsänderungen des Kanalproteins. In der oberen Reihe kommt es nach Kanalöffnung und einer vergleichsweise langen Offenzeit zum Verschluß der Pore durch das IFM-Partikel, später dann zur Rückkehr in den Ruhezustand mit geschlossenen Aktivierungstor. Unter Einfluß von Lidocain (untere Reihe) kommt es zu einer verkürzten Offenzeit durch den Verschluß der Pore durch ein Lidocainmolekül. Durch das nachfolgende IFM-Partikel und den Verschluß des Aktivierungstores wird dieses Molekül in der Kanalpore festgehalten. Bei wieder folgender Aktivierung kann kein Strom fließen. Für den Untersucher scheint es, als habe sich der Inaktivierungsvorgang des Kanals unter Lidocain beschleunigt.

zum anderen könnte Lidocain den geöffneten Kanal schneller blockieren als er inaktiviert, was sich wie eine Beschleunigung der Inaktivierung bemerkbar machen würde. Anhand der gemessenen Stromkurvenverläufe kann zwischen diesen beiden Modellen nicht unterschieden werden, jedoch sprechen einige Fakten aus Untersuchungen an anderen spannungsabhängigen Natriumkanälen für die letztere Annahme:

1. Der Zugang des Lokalanästhetikums zur Bindungsstelle wird durch das Aktivierungstor gesteuert. Die angenommene Bindungsstelle für Lokalanästhetika liegt auf den S6-Segmenten der einzelnen Domänen des spannungsabhängigen Natriumkanals, die die Porenwand bilden. Bisherige Modelle des Selektivitätsfilters für Natriumionen zeigen eine konsistente Anordnung der S6-Segmente im Kanalprotein [LIPKIND und FOZZARD 2000], wo sie unabhängig vom Aktivierungszustand unbeweglich vorliegen und so weniger wahrscheinlich an bedeutenden allosterischen Konformationsänderungen beteiligt sind. Darüber hinaus wird die Öffnung der Kanalpore von einem Aktivierungstor bestimmt, welches an der inneren Porenöffnung liegt (siehe [CATTERALL 1986], [GUY und SEETHARAMULU 1986] und [LIU et al. 1997]), während der Selektivitätsfilter für Natriumionen an der äußeren Öffnung lokalisiert ist [HEINEMANN et al. 1992] [CHIAMVIMONVAT et al. 1996]. Die Bindungsstelle für Lokalanästhetika ist somit zwischen Selektivitätsfilter und Aktivierungstor lokalisiert ([RAGSDALE et al. 1994], [LIPKIND und FOZZARD 2000]).

Das Selektivitätsfilter ist für die im Vergleich zu Natriumionen großvolumige Lokalanästhetikamoleküle nicht passierbar, so daß der Zugang zur Bindungsstelle von außen nicht möglich ist. Von der Innenseite des Moleküls ist die Bindungsstelle ebenfalls nicht erreichbar, da das geschlossene Aktivierungstor dies verhindert. Erst die Öffnung der Aktivierungstores ermöglicht den Zutritt des Lokalanästhetikums zur Bindungsstelle, was zu einer schnellen Blockierung des Kanals nach dessen Öffnung führt.

2. Die Funktion des Inaktivierungspartikels wird durch Lokalanästhetika nicht be-

einträchtigt. Wie bereits zuvor erwähnt, wird die Inaktivierung des Natriumkanals durch die IFM-Sequenz in der intrazellulären Schleife zwischen Domänen drei und vier hervorgerufen. Nach Aktivierung des Kanals kann diese IFM-Sequenz in der Pore binden und den Stromfluß wieder blockieren was als Inaktivierung bezeichnet wird. Vedantham und Cannon konnten an klonierten μ 1-Natriumkanälen zeigen, daß dieser Prozess nicht durch Lokalanästhetika beeinflusst wird [VEDANTHAM und CANNON 1999]. Eine direkte Wirkung des Lokalanästhetikums auf den Inaktivierungsprozess ist somit unwahrscheinlich.

In den weiteren Betrachtungen wird daher davon ausgegangen, daß der dynamische Block des Natriumkanals durch einen Offenkanalblock verursacht wird. Eine Modellvorstellung hierfür ist in Abbildung 4.1 auf Seite 69 dargestellt. Da sich bei der Blockierung die Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung des Natriumkanals mit der Blockierungskinetik des Blockers überlagern, wird der resultierende zeitliche Blockierungsverlauf zur Abgrenzung von tonischem und "use-dependent"-Block hier als dynamischer Block bezeichnet. Die Blockierungskinetik während der Kanalaktivierung ist somit abhängig von der Aktivierungskinetik und der Blockerkonzentration.

Die Aktivierungskinetik wird vor allem durch die Höhe des depolarisierenden Impulses bestimmt. Bei schwach depolarisierenden Potentialen verläuft die Aktivierungskinetik langsam wegen der langen Latenzzeit der ersten Kanalöffnungen. Da der dynamische Block aber erst nach Kanalöffnung eintritt, verläuft seine Kinetik hier ebenfalls langsamer. Eine langsame Kanalaktivierung hat daher auch eine langsame Zeitkonstante des dynamischen Blocks zur folge. Die Konzentration des Natriumkanalblockers beeinflußt ebenfalls die Zeitkonstanten des dynamischen Blocks. Bei höheren Wirkstoffkonzentrationen ist die Wahrscheinlichkeit der Bindung eines Moleküls an den Rezeptor in der Kanalpore deutlich höher, mit dem Resultat einer schnelleren Blockade nach Kanalöffnung.

Aufgrund des Hill-Koeffizienten von Eins in der Konzentrations-Wirkungskurve von Lidocain (Abbildung 3.5, Seite 53) kann von einer Bindungsstelle für ein Lidocainmolekül ausgegangen werden. Die Bindung des Lidocainmoleküls an den Rezeptor verläuft daher als Reaktion 1. Ordnung nach dem Massenwirkungsgesetz. Erhöht man die Blockerkonzentration, so erhöht sich die Assoziationsgeschwindigkeit, was in dieser Arbeit für Lidocain gezeigt werden konnte (Abbildung 3.6, Seite 56).

Als Assoziationsrate wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $1,36\cdot10^{6}$ l·mol⁻¹s⁻¹ bestimmt. Dies bedeutet, daß bei einer Konzentration von 1 mol/l in einer Sekunde $1,36\cdot10^{6}$ Lidocainmoleküle an einen Natriumkanal binden könnten. Ist die Konzentration nur 100 μ mol/l binden also nur noch 136 Moleküle in der Sekunde. Da die Öffnung des Kanals aber nur etwa 5 ms dauert bevor er inaktiviert, können in dieser Zeit durchschnittlich nur 0,7 Moleküle binden. Lässt man die Dissoziation des Moleküls vom Kanal außer acht, so bedeutet dies, daß bei einer Konzentration von 100 μ mol/l Lidocain nach Aktivierung des Natriumstromes 70% der Kanäle durch dynamischen Block blockiert wären, was wie in Abbildung 3.6 und Tabelle 3.2 zu sehen gut mit der Realität übereinstimmt.

Die Dissoziation des Blockermoleküls vom Rezeptor verläuft nach dem Massenwirkungsgesetz konzentrationsunabhängig. Für Lidocain wurde eine Dissoziationsrate von 197 s⁻¹ bestimmt, was einer Zeitkonstante von etwa 5 ms entspricht. Berücksichtigt man im obengenannten Beispiel die Rückreaktion, so würden in 10 ms fast zwei Moleküle wieder vom Kanal abdiffundieren und sich die Blockierung damit auf ein Niveau von deutlich unter 50% einstellen. Daß trotzdem ein Block von 70% erreicht wird, kann durch den Einfluss der Inaktivierung auf das Blockermolekül erklärt werden. Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, verhindert die einsetzende Inaktivierung des Kanals das Verlassen der Bindungsstelle; die Abdiffusion des Blockermoleküls wird unmöglich und kann daher außer acht gelassen werden.

Eine noch größere Diskrepanz tritt auf, wenn man die Erholungszeiten vom dynamischen Block untersucht. Wird die Inaktivierung in der Repolarisationsphase wieder aufgehoben, so müsste bei einer Dissoziationsrate von 197 Molekülen in der Sekunde die Zeitkonstante der Erholung 5 ms betragen. Tatsächlich aber liegt diese Zeitkonstante bei etwa 1000 ms und damit um den Faktor 200 höher (Abbildung 3.8, Seite 63).

Die früher vorherrschende Meinung, daß Lokalanästhetika die Inaktivierung stabilisieren, also zu einer Verlängerung der Bindung des IFM-Partikels führen ist unwahrscheinlich, da Vedantham und Cannon zeigen konnten, daß das Inaktivierungspartikel IFM auch unter Einfluß von Lokalanästhetika bereits wenige Millisekunden nach Repolarisation die Pore wieder verlässt, eine Stabilisierung des inaktivierten Zustandes also nicht eintritt [VEDANTHAM und CANNON 1999]. Als Erklärung bleibt daher, daß die Schließung der Aktivierungstore während der Repolarisation für die Behinderung der Abdiffusion verantwortlich ist. Genauso wie die Aktivierungstore den Zutritt zur Bindungsstelle vor der Aktivierung verhinderten, verhindern sie nach Bindung des Lokalanästhetikums nun das Verlassen der Bindungsstelle.

4.3 Na_v1.8: klinische und therapeutische Aspekte

Natriumkanäle an Muskel- und Nervenzellmembranen sind in der Pathogenese einer Reihe von Krankheiten und Symptomen ursächlich beteiligt. Dies können Mutationen in der Primärstruktur sein, die eine Veränderung der Tertiärstruktur nach sich ziehen. Funktionell kommt es häufig zum Beispiel zu einer Aufhebung der langsamen Inaktivierung und damit entweder zu repetitiver Aktionspotentialauslösung (Myotonie) oder elektrischer Nichterregbarkeit (Paralyse). Bei der Paramyotonia congenita führt die Aufhebung der langsamen Inaktivierung [HAY-WARD et al. 1997] über eine Verlängerung des Aktionspotentials zu Muskelsteifigkeit. Ein ähnlicher Defekt des kardialen Natriumkanals prädisponiert zu polymorphen ventrikulären Tachykardien [RODEN et al. 1996].

Chronische Schmerzsyndrome können ätiologisch durch eine pathologische Ver-

änderung der Struktur oder Funktion von Ionenkanälen ausgelöst werden. Ferner kommt es bei bekannten Modellen chronischer Schmerzen zu einer Umverteilung oder veränderten Expression von ansonsten normalen Natriumkanälen [LAI et al. 2002]. Neuropathischen Schmerzen liegen pathologische Aktionspotentiale zugrunde, die durch Lidocain blockiert werden können [NYSTROM und HAGBARTH 1981] [TANELIAN und MACIVER 1991]. Diese Aktionspotentiale sind Ausdruck einer abnormalen, spontanen Aktivität von funktionell oder strukturell geschädigten Nervenfasern [OCHOA et al. 1982]. Der Zusammenhang einer funktionellen Veränderung der Natriumkanalaktion mit der Schmerzentstehung ist gezeigt worden (zum Überblick [WAXMAN et al. 1999], [DUBNER und GOLD 1999]).

Tetrodotoxinresistente Natriumkanäle in Spinalganglien und peripheren Nerven sind möglicherweise in der Entstehung chronischer Schmerzsyndrome beteiligt. In peripheren Nervenendigungen können sie spontane Aktionspotentiale auslösen [BROCK et al. 1998] und pathologische Erregungen über C-Fasern weiterleiten [QUASTHOFF et al. 1995]. Durch Verschiebung funktionsfähiger Kanäle von der Membran des Zellkörpers auf Dendriten und Axone sowie einen vermehrten Einbau bereits synthetisierter im Zellsoma "bevorrateter" Kanalproteine in die Zellmembran treten TTX-resistente Natriumkanäle vermehrt an Verletzungsstellen von peripheren Nerven auf [NOVAKOVIC et al. 1998]. Die Erhöhung der Natriumleitfähigkeit durch Erhöhung der Kanalanzahl senkt die Aktivierungsschwelle [MATZNER und DEVOR 1992], sodaß eine spontane ektope Reizgenerierung stattfindet [MATZNER und DEVOR 1994].

Die Bedeutung wird ferner unterstrichen, daß knock-out-Mäuse ohne exprimierte TTX-R Kanäle kaum neuropathische Schmerzsymptomatik zu entwickeln scheinen. Dies betrifft vor allem den in dieser Arbeit untersuchten Na_v1.8-Natriumkanal. Durch intrathekale Applikation von Antisense-Oligodesoxynucleotiden gegen für ihn codierender DNA-Abschnitte kann die Synthese funktionsfähiger Kanalproteine der Ratte unterdrückt werden. Im Patch-Clamp-Versuch von Spinalganglien sind die TTX-R-Natriumströme deutlich kleiner, mit besonderer Verminderung der langsam inaktivierenden Komponente. Diese Tiere entwickeln bei Verletzung der Spinalnerven keine neuropathischen Schmerzen, während die Sensibilität und akute Schmerzreaktion unverändert bleiben [LAI et al. 2002]. Die Expression der tetrodotoxinresistenten Natriumkanalproteine von $Na_v 1.8$ und $Na_v 1.9$ wird in Neuronen verletzter Axone moduliert, während sie in benachbarten Neuronen unverändert bleibt [DECOSTERD et al. 2002]. Ein selektiver Inhibitor dieses Natriumkanals könnte also eine effektive Behandlung komplizierter Schmerzsyndrome ermöglichen, bei minimalen unerwünschten Wirkungen in anderen elektrisch erregbaren Geweben und Organen. Die bisher für die Therapie neuropathischer Schmerzen verwendeten Pharmaka sind bekannte Natriumkanalblocker wie Lokalanästhetika, Antiarrhythmika und Anticonvulsiva. Carbamazepin beispielsweise vermag in der Peripherie entstehende pathologische Aktionspotentiale zu blockieren [BURCHIEL 1988], aber auch Stoffe wie die trizyklischen Antidepressiva zeigten eine empirische Wirksamkeit. Die Blockierung von TTX-resistenten Natriumkanälen durch diese Pharmaka konnte erst später gezeigt werden BRÄU et al. 2001]. Die systemische Gabe von natriumkanalblockierenden Substanzen kann die ektope Reizentstehung pathologisch veränderter Nervenfasern verringern [DEVOR et al. 1992]. Bei deutlich depolarisierten Membranpotentialen ist die Aktivierbarkeit des tetrodotoxinresistenten Natriumkanals gegenüber den TTX-sensitiven Natriumkanälen erheblich gesteigert [SCHILD und KUNZE 1997], da letztere ihre Inaktivierungsschwelle bereits überschritten haben. Die Spannungsabhängigkeit besteht auch bei der Blockade mit Lidocain. Durch die Dauerdepolarisation des Membranpotentials geschädigter Nervenfasern wird die Potenz solcher Pharmaka gegenüber Natriumkanälen deutlich gesteigert, so daß es auch bei geringen Konzentrationen dort zu einer selektiven Blockade kommt. Das Konzept des dynamischen Blocks stellt einen möglichen Ansatz für die Erklärung dieses Phänomens dar. Wallace et al. zeigten 1996 die Wirksamkeit von systemischer Lidocaingabe bei 11 Patienten mit chronischen Schmerzsyndromen [WALLACE et al. 1996]. Die systemische Gabe zur Therapie chronischer Schmerzen zeigte sowohl bei Lidocain

als auch einigen Antikonvulsiva und Antidepressiva gute Wirksamkeit [ABDI et al. 1998], nicht jedoch die prophylaktische Einmalgabe vor willkürlicher Spinalnervenverletzung [ABDI et al. 2000], was die Theorie einer Schmerzentstehung durch peripher ektope Reizgeneratoren stützt.

4.4 Ausblick

Die Blockierung spannungsabhängiger Natriumkanäle stellt ein therapeutisches Prinzip dar, das bei vielen, auf einer Übererregbarkeit elektrisch aktiver Gewebe beruhenden Erkrankungen wie z.B. Epilepsie, Herzrhythmusstörungen oder neuropathischen Schmerzsyndromen wirksam ist. Da sich in letzter Zeit die Hinweise verdichten, daß neuropathische und andere chronische Schmerzsyndrome unter anderem auf die Übererregbarkeit TTX-resistenter Natriumkanäle vom Typ Na_v1.8 im peripheren sensorischen Nervensystem zurückzuführen sind, kommt der potenten Blockade diese Kanals erhebliche Bedeutung in der Therapie dieser Schmerzsyndrome zu. Neueste Untersuchungen chronischer Schmerzen an einem Rattenmodell zeigten eine Abschwächung chronisch-neuropathischer Schmerzen nach Hemmung der Transkription von Na_v1.8-Kanalprotein. Eine Linderung anderer Schmerzzustände konnte so jedoch nicht erreicht werden, was die besondere Bedeutung dieses Kanals in der Entstehung chronischer Schmerzen unterstreicht [JOSHI et al. 2006].

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zeigen erstmal am isolierten Kanal, daß der Na_v1.8-Kanal im Offenzustand eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Lidocain hat. Die weitere zukünftige Suche nach therapeutisch wirksamen Natriumkanalblockern sollte sich daher vor allem an der Offenkanalblockade orientieren. Potente Offenkanalblocker dieses Kanals könnten aufgrund der langen Öffnungszeit TTX-resistenter Natriumkanäle eine deutlich höhere Selektivität für das sensorische Nervensystem haben und damit eine geringere Nebenwirkungsrate. Ein Pharmakon, das hochselektiv über einer systemische Applikation die TTX-resistente Natriumkanalpopulation an peripheren oder zentralen Verletzungen von Nervenfasern zu blockieren vermag, könnte das ideale Schmerztherapeutikum chronischer Schmerzsyndrome werden, ohne unerwünschte kardiale oder neurologische Begleiterscheinungen. Die zukünftige elektrophysiologische Untersuchung der Wirkung anderer in der Therapie chronischer Schmerzen eingesetzten Substanzen auf den isolierten TTX-resistenten Natriumkanal Na_v1.8 könnte vielversprechende Fortschritte ermöglichen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Natriumkanäle in Nervenzellmembranen sind wesentlich an der Erregungsbildung und -weiterleitung im peripheren Nervensystem beteiligt. Bestimmte tetrodotoxinresistente (TTX-R) Subtypen scheinen in der Entstehung des neuropathischen und chronischen Schmerzes eine bedeutende Rolle zu spielen. Therapeutika dieser Schmerzzustände zeigen oft eine deutliche Wirkung auf Natriumkanäle, grundlegende Interaktionen dieser Substanzen mit TTX-R Natriumkanälen sind jedoch nicht gut untersucht. Thema dieser Arbeit ist es daher die Interaktionen des klassischen Natriumkanalblockers Lidocain mit dem tetrodotoxinresistenten Natriumkanal vom Typ Na_v1.8 zu untersuchen.

Um den Einfluß des Pharmakons ohne Beeinflussung durch andere physiologischerweise vorkommende Ionenknäle studieren zu können, wurden diese Kanäle isoliert in HEK293-Zellen exprimiert und mit der Whole-cell Patch-clamp-Methode untersucht.

Die Lidocainblockade zeigte sich auch in diesen Versuchen als konzentrationsabhängig und reversibel. Bei repetitiver Reizung konnte eine phasische oder "usedependent"-Blockierung beobachtet werden, also eine mit der Reizanzahl zunehmende Blockierung. Die tonische und phasische Blockade zeigt sich abhängig vom zuvor herrschenden Membranpotential; mit zunehmender Depolarisation sinken die zur Blockade der Hälfte aller Natriumkanäle (IC_{50}) notwendigen Lidocainkonzentrationen. Die IC_{50} -Werte der phasischen Blockade nähern sich mit zunehmender Depolarisation denen der tonischen Blockade an.

Die Blockade des isolierten Natriumkanals vom Typ Na_v1.8 mit Lidocain zeigte eine Zunahme der Blockierung im Zeitverlauf nach Reizung und Kanalöffnung. Dieser dynamische Block entsteht durch eine deutliche Zunahme der Affinitäten zu Lidocain des geöffneten gegenüber dem ruhenden Kanal. Die IC₅₀-Werte liegen für den geöffneten Kanal liegt bei 46,4 ± 10,8 µmol/l, für den ruhenden Kanal bei 2247 ± 628 µmol/l. Die Untersuchungen dienten zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion der Lidocainbindung an den Lokalanästhetikarezeptor im Innern der Kanalpore. Die Hinreaktion verläuft als Reaktion 1. Ordnung mit 1,36 · 10⁶ l mol⁻¹s⁻¹. Die Konstante der Trennung des Lidocains vom Natriumkanal beträgt hier 197 s⁻¹.

Die Refraktärzeit und Reaktivierung unter Lidocainwirkung zeigt eine Zunahme der langsamen Komponente der Inaktivierung. Es kommt zu einer Verlängerung der Erholungszeit von der Inaktivierung.

Na_v1.8-Kanäle zeigen zwei Aktivitätszustände mit fundamental verschiedenen Affinitäten gegenüber Lidocain: Im Ruhezustand findet sich eine niedrige, eine hohe Affinität dagegen während der Kanalöffnung. Der spannungsabhängige Prozess der Kanalöffnung selbst ist verantwortlich für die Änderung der Affinität gegenüber Lokalanästhetika und somit Grundlage einer statusabhängigen Blockierung des Kanals und der dynamischen Blockade während der Depolarisation.

Der Inaktivierungsprozess, etwa die Bindung des Inaktivierungspartikels, beeinflusst die Affinität des Kanals dagegen nicht, sondern fängt das Lidocainmolekül in der Kanalpore. Resultat ist ein ausgeprägter "use-dependent"-Block.

Abstract

Sodium channels in neuronal membranes are necessary for excitation and signal transduction. Channels resistant to tetrodotoxin (TTX-R) appear to play a crucial part in pathogenesis of chronic and neuropathic pain syndromes. Several drugs empirically used in the treatment of those syndromes are known as sodium channel blockers, basic interactions of these drugs and TTX-R channels are not yet examined. This study shows the interaction of the classical sodium channel blocker lidocaine with the TTX-R sodium channel type Na_v1.8.

To examine the influence of the drug without interference with other physiologic ion channels, cloned and in HEK293-cells expressed $Na_v 1.8$ were used. For experiments, we used the patch-clamp method in the whole-cell configuration.

Coherent to earlier studies with native dorsal root ganglia cells, the lidocaine block of sodium channel $Na_v 1.8$ showed concentration-dependance and full reversibility. During repetitive stimulation I found an increase of blockade over time, called use-dependent block. Tonic and use-dependent block are influenced by the resting membrane potential: In a highly depolarized state, the half-maximal blocking concentrations (IC₅₀) of both tonic and use-dependent block are significantly lower, and moreover, close together compared to the hyperpolarized state. Lidocaine showed an increase of blockade of sodium channel $Na_v 1.8$ during channel opening after excitation. This dynamic block develops through altered affinities with lidocaine in resting versus open state. In open state we found an IC₅₀ of $46.4 \pm 10.8 \ \mu \text{mol/l}$, compared to resting state IC₅₀ of $2247 \pm 628 \ \mu \text{mol/l}$. The rate constant for binding of lidocaine to its binding site on the sodium channel was concentration dependent $1.36 \cdot 10^6 \ \text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$. Unbinding of lidocaine was found to be 197 s⁻¹.

Lidocaine altered the time courses of the absolute refractory period and reactivation, respectively. The slow component of inactivation was increased, while the reactivation was slower.

 $Na_v 1.8$ channels exhibit two major affinity states to local anesthetics, a low affinity state at rest and a high affinity state during activation. It appears that the voltage dependent activation process itself modulates the channel's affinity to the drug and thus is essential for state dependent block, resulting in dynamic block during the depolarization. The fast inactivated channel may be viewed as an activated but intrinsically blocked channel. The inactivation process itself, i.e. binding of the inactivation particle, does not modulate the affinity, but rather traps charged drug molecules in the pore giving strong use-dependent block.

Literaturverzeichnis

[ABDI et al. 1998]

S. ABDI, D. H. LEE und J. M. CHUNG (1998). The anti-allodynic effects of amitriptyline, gabapentin, and lidocaine in a rat model of neuropathic pain. Anesth.Analg., 87(6):1360–1366. 76

[ABDI et al. 2000]

S. ABDI, D. H. LEE, S. K. PARK und J. M. CHUNG (2000). Lack of pre-emptive analgesic effects of local anaesthetics on neuropathic pain. Br.J.Anaesth., 85(4):620–623. 76

[Akopian et al. 1996]

A. N. AKOPIAN, L. SIVILOTTI und J. N. WOOD (1996). A tetrodotoxin-resistant voltagegated sodium channel expressed by sensory neurons. Nature, 379(6562):257–262. 16, 24

[Aldrich et al. 1983]

R. W. ALDRICH, D. P. COREY und C. F. STEVENS (1983). A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. Nature, 306(5942):436– 441. 19

[ALSOBROOK und STEVENS 1988]

J. P. ALSOBROOK und C. F. STEVENS (1988). *Cloning the calcium channel*. Trends Neurosci., 11(1):1–2. 18

[BACKX et al. 1992]

P. H. BACKX, D. T. YUE, J. H. LAWRENCE, E. MARBAN und G. F. TOMASELLI (1992). Molecular localization of an ion-binding site within the pore of mammalian sodium channels. Science, 257(5067):248–251. 26

[Balser et al. 1996]

J. R. BALSER, H. B. NUSS, D. W. ORIAS, D. C. JOHNS, E. MARBAN, G. F. TOMA-SELLI und J. H. LAWRENCE (1996). Local anesthetics as effectors of allosteric gating. Lidocaine effects on inactivation-deficient rat skeletal muscle Na channels. J.Clin.Invest., 98(12):2874–2886. 22

[Begenisich 1987]

T. BEGENISICH (1987). Molecular properties of ion permeation through sodium channels. Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem., 16:247–263. 9

[Bernstein 1902]

J. BERNSTEIN (1902). Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Erster Teil. Pflügers Arch., 92:561–562. 4

[Blunck et al. 1998]

R. BLUNCK, U. KIRST, T. RIESSNER und U. HANSEN (1998). How powerful is the dwell-time analysis of multichannel records?. J.Membr.Biol., 165(1):19–35. 12

[Bräu 1998]

M. E. BRÄU (1998). Pharmakologie Tetrodotoxin-resistenter Natriumkanäle: Bedeutung in der anästhesiologischen Schmerztherapie. Habilitationsschrift - Fachbereich Medizin, Bibliothek der Justus-Liebig-Universität, Giessen. 66

[BRÄU et al. 2001]

M. E. BRÄU, M. DREIMANN, A. OLSCHEWSKI, W. VOGEL und G. HEMPELMANN (2001). Effect of drugs used for neuropathic pain management on tetrodotoxin-resistant Na(+) currents in rat sensory neurons. Anesthesiology, 94(1):137–144. 3, 75

[BRÄU et al. 1998]

M. E. BRÄU, W. VOGEL und G. HEMPELMANN (1998). Fundamental properties of local anesthetics: half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na^+ and K^+ channels in peripheral nerve. Anesth.Analg., 87(4):885–889. 66

[Brock et al. 1998]

J. A. BROCK, E. M. MCLACHLAN und C. BELMONTE (1998). Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. J.Physiol., 512 (Pt 1):211–217. 27, 74

[BRONSTEIN und SEMENDJAJEW 2000]

I. N. BRONSTEIN und K. A. SEMENDJAJEW; G. MUSIOL (Hrsg.) und H. MÜH-LIG (Hrsg.) (2000). *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt am Main, 5. Auflage.

[BUCHANAN et al. 1996]

S. BUCHANAN, A. A. HARPER und J. R. ELLIOTT (1996). Differential effects of tetrodotoxin (TTX) and high external K^+ on A and C fibre compound action potential peaks in frog sciatic nerve. Neurosci.Lett., 219(2):131–134. 27

[Burchiel 1988]

K. J. BURCHIEL (1988). Carbamazepine inhibits spontaneous activity in experimental neuromas. Exp.Neurol., 102(2):249–253. 75

[BUTTERWORTH und STRICHARTZ 1990]

J. F. BUTTERWORTH und G. R. STRICHARTZ (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. Anesthesiology, 72(4):711–734. 21

[CAFFREY et al. 1992]

J. M. CAFFREY, D. L. ENG, J. A. BLACK, S. G. WAXMAN und J. D. KOCSIS (1992). Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. Brain Res., 592(1-2):283–297. 24

[CARLTON und HARGETT 1995]

S. M. CARLTON und G. L. HARGETT (1995). Treatment with the NMDA antagonist memantine attenuates nociceptive responses to mechanical stimulation in neuropathic rats. Neurosci.Lett., 198(2):115–118. 3

[Catterall 1986]

W. A. CATTERALL (1986). Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function. Trends Neurosci., 9:7–10. 18, 70

[Catterall 1988]

W. A. CATTERALL (1988). Structure and function of voltage-sensitive ion channels. Science, 242(4875):50-61. 17

[CATTERALL 2000]

W. A. CATTERALL (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron, 26(1):13–25. 16

[CHIAMVIMONVAT et al. 1996]

N. CHIAMVIMONVAT, M. T. PÉREZ-GARCÍA, G. F. TOMASELLI und E. MARBAN (1996). Control of ion flux and selectivity by negatively charged residues in the outer mouth of rat sodium channels. J.Physiol., 491 (Pt 1):51–59. 24, 70

[Cole 1949]

K. S. COLE (1949). Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. Archi.Sci.Physiol., 3:253–258. 13

[COLQUHOUN und HAWKES 1977]

D. COLQUHOUN und A. G. HAWKES (1977). Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci., 199(1135):231-262. 12

[Courtney 1975]

K. R. COURTNEY (1975). Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA. J.Pharmacol.Exp.Ther., 195(2):225–236. 22

[Decosterd et al. 2002]

I. DECOSTERD, R. R. JI, S. ABDI, S. TATE und C. J. WOOLF (2002). The pattern of expression of the voltage-gated sodium channels Na(v)1.8 and Na(v)1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models. Pain, 96(3):269–277. 75

[DESTEXHE und HUGUENARD 2000]

A. DESTEXHE und J. R. HUGUENARD (2000). Nonlinear thermodynamic models of voltage-dependent currents. J.Comput.Neurosci., 9(3):259–270. 9, 12

[Destexhe et al. 1994]

A. DESTEXHE, Z. F. MAINEN und T. J. SEJNOWSKI (1994). Synthesis of models for excitable membranes, synaptic transmission and neuromodulation using a common kinetic formalism. J.Comput.Neurosci., 1(3):195–230. 11

[DEVOR et al. 1992]

M. DEVOR, P. D. WALL und N. CATALAN (1992). Systemic lidocaine silences ectopic neuroma and DRG discharge without blocking nerve conduction. Pain, 48(2):261–268. 75

[Dreimann 2001]

M. DREIMANN (2001). Therapeutika des neuropathischen Schmerzes blockieren den TTXresistenten Natriumkanal des peripheren nozizeptiven Systems. Dissertationsschrift -Fachbereich Medizin, Elektronische Bibliothek der Justus-Liebig-Universität, Giessen. URN: urn:nbn:de:hebis:26-opus-5263. http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/ 2001/526. 49

[DUBNER und GOLD 1999]

R. DUBNER und M. GOLD (1999). The neurobiology of pain. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 96(14):7627–7630. 74

[DUDEL 2000]

J. DUDEL; R. F. SCHMIDT (Hrsg.), G. THEWS (Hrsg.) und F. LANG (Hrsg.) (2000). Informationsvermittlung durch elektrische Erregung. In: Physiologie des Menschen, S. 20–42. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 28. Auflage. 6

[Eaholtz et al. 1994]

G. EAHOLTZ, T. SCHEUER und W. A. CATTERALL (1994). Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. Neuron, 12(5):1041–1048. 19

[EDOC 2003]

EDOC (2003). Dokumenten- und Publikationsserver der Humboldt-Universität zu Berlin. http://edoc.hu-berlin.de/e_autoren/latex/index.php.

[Elliott und Elliott 1993]

A. A. ELLIOTT und J. R. ELLIOTT (1993). Characterization of TTX-sensitive and TTXresistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. J.Physiol., 463:39–56. 24, 65

[Elliott 1997]

J. R. ELLIOTT (1997). Slow Na⁺ channel inactivation and bursting discharge in a simple model axon: implications for neuropathic pain. Brain Res., 754(1-2):221–226. 6, 27

[ENGLAND et al. 1996]

S. ENGLAND, S. BEVAN und R. J. DOCHERTY (1996). PGE2 modulates the tetrodotoxinresistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMPprotein kinase A cascade. J.Physiol., 495 (Pt 2):429–440. 28

[ERLANGER und GASSER 1932]

J. ERLANGER und H. S. GASSER (1932). The compound nature of the action current of nerve as disclosed by the cathode ray oscillograph. Am.J.Physiol., 70:624–666. 6, 7

[FAROKHI et al. 2000]

A. FAROKHI, M. KEUNECKE und U. P. HANSEN (2000). The anomalous mole fraction effect in Chara: gating at the edge of temporal resolution. Biophys.J., 79(6):3072–3082. 12

[FREYNHAGEN et al. 2005]

R. FREYNHAGEN, K. STROJEK, T. GRIESING, E. WHALEN und M. BALKENOHL (2005). Efficacy of pregabalin in neuropathic pain evaluated in a 12-week, randomised, doubleblind, multicentre, placebo-controlled trial of flexible- and fixed-dose regimens. Pain, 115(3):254–263. 3

[GAUMANN et al. 1992]

D. M. GAUMANN, P. C. BRUNET und P. JIROUNEK (1992). Clonidine enhances the effects of lidocaine on C-fiber action potential. Anesth.Analg., 74(5):719–725. 27

[Gold et al. 1996]

M. S. GOLD, D. B. REICHLING, M. J. SHUSTER und J. D. LEVINE (1996). Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 93(3):1108–1112. 28

[GOLD et al. 2003]

M. S. GOLD, D. WEINREICH, C. S. KIM, R. WANG, J. TREANOR, F. PORRECA und J. LAI (2003). Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. J.Neurosci., 23(1):158–166. 28

[Goldin et al. 2000]

A. L. GOLDIN, R. L. BARCHI, J. H. CALDWELL, F. HOFMANN, J. R. HOWE, J. C. HUNTER, R. G. KALLEN, G. MANDEL, M. H. MEISLER, Y. B. NETTER, M. NODA, M. M. TAMKUN, S. G. WAXMAN, J. N. WOOD und W. A. CATTERALL (2000). No-menclature of voltage-gated sodium channels. Neuron, 28(2):365–368. 14, 15

[GRAHAM et al. 1977]

F. L. GRAHAM, J. SMILEY, W. C. RUSSELL und R. NAIRN (1977). *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J.Gen.Virol., 36(1):59–74. 38

[Grant et al. 2000]

A. O. GRANT, R. CHANDRA, C. KELLER, M. CARBONI und C. F. STARMER (2000). Block of wild-type and inactivation-deficient cardiac sodium channels IFM/QQQ stably expressed in mammalian cells. Biophys.J., 79(6):3019–3035. 19

[GUY und SEETHARAMULU 1986]

H. R. GUY und P. SEETHARAMULU (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A., 83(2):508–512. 18, 70

[HAMILL et al. 1981]

O. P. HAMILL, A. MARTY, E. NEHER, B. SAKMANN und F. J. SIGWORTH (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cellfree membrane patches. Pflügers Arch., 391(2):85–100. 33

[HARPER und LAWSON 1985]

A. A. HARPER und S. N. LAWSON (1985). Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. J.Physiol., 359:31–46. 26

[HARRISON 1985]

D. C. HARRISON (1985). Antiarrhythmic drug classification: new science and practical applications. Am.J.Cardiol., 56(1):185–187. 7

[HAYWARD et al. 1997]

L. J. HAYWARD, JR. BROWN, R. H. und S. C. CANNON (1997). Slow inactivation differs among mutant Na channels associated with myotonia and periodic paralysis. Biophys.J., 72(3):1204–1219. 73

[HEINEMANN et al. 1992]

S. H. HEINEMANN, H. TERLAU, W. STÜHMER, K. IMOTO und S. NUMA (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. Nature, 356(6368):441–443. 24, 70

[HILLE 1975]

B. HILLE (1975). Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A fourbarrier model. J.Gen.Physiol, 66(5):535–560. 9

[HILLE 1977]

B. HILLE (1977). Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drugreceptor reaction. J.Gen.Physiol., 69(4):497–515. 21, 68

[HILLE 1992]

B. HILLE (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA. 6

[HILLE und SCHWARZ 1978]

B. HILLE und W. SCHWARZ (1978). Potassium channels as multi-ion single-file pores. J.Gen.Physiol., 72(4):409–442. 10

[HODGKIN und HUXLEY 1952a]

A. L. HODGKIN und A. F. HUXLEY (1952a). The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. J.Physiol., 116(4):473–496. 13

[HODGKIN und HUXLEY 1952b]

A. L. HODGKIN und A. F. HUXLEY (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J.Physiol., 116(4):449–472.

[HODGKIN und HUXLEY 1952c]

A. L. HODGKIN und A. F. HUXLEY (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J.Physiol., 116(4):497–506.

[HODGKIN und HUXLEY 1952d]

A. L. HODGKIN und A. F. HUXLEY (1952d). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J.Physiol., 117(4):500–544.

[HODGKIN et al. 1952]

A. L. HODGKIN, A. F. HUXLEY und B. KATZ (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. J.Physiol., 116(4):424–448. 9, 13

[Hondeghem und Katzung 1977]

L. M. HONDEGHEM und B. G. KATZUNG (1977). *Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels*. Biochim.Biophys.Acta, 472(3-4):373–398. 21

[ISOM et al. 1992]

L. L. ISOM, K. S. DE JONGH, D. E. PATTON, B. F. REBER, J. OFFORD, H. CHAR-BONNEAU, K. WALSH, A. L. GOLDIN und W. A. CATTERALL (1992). *Primary structure* and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. Science, 256(5058):839–842. 17

[Jeftinija 1994a]

S. JEFTINIJA (1994a). Bradykinin excites tetrodotoxin-resistant primary afferent fibers. Brain Res., 665(1):69–76. 27

[Jeftinija 1994b]

S. JEFTINIJA (1994b). The role of tetrodotoxin-resistant sodium channels of small primary afferent fibers. Brain Res., 639(1):125–134. 27

[JONAS et al. 1989]

P. JONAS, M. E. BRÄU, M. HERMSTEINER und W. VOGEL (1989). Single-channel recording in myelinated nerve fibers reveals one type of Na channel but different K channels. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 86(18):7238–7242. 14

[JOSHI et al. 2006]

S. K. JOSHI, J. P. MIKUSA, G. HERNANDEZ, S. BAKER, C. C. SHIEH, T. NEELANDS, X. F. ZHANG, W. NIFORATOS, K. KAGE, P. HAN, D. KRAFTE, C. FALTYNEK, J. P. SULLIVAN, M. F. JARVIS und P. HONORE (2006). *Involvement of the TTX-resistant* sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. Pain, 123(1-2):75–82. 28, 76

H. KERKMANN (2005). Differentielle Interaktionen hochpotenter Lokalanästhetika mit TTX-sensitiven und TTX-resistenten Natriumströmen an Spinalganglienzellen der erwachsenen Ratte. Dissertationsschrift - Fachbereich Medizin, Elektronische Bibliothek der Justus-Liebig-Universität, Giessen. URN:nbn:de:hebis:26-opus-24668. http://geb. uni-giessen.de/geb/volltexte/2005/2466. 66

[Kobayashi et al. 1993]

J. KOBAYASHI, M. OHTA und Y. TERADA (1993). C fiber generates a slow Na^+ spike in the frog sciatic nerve. Neurosci.Lett., 162(1-2):93–96. 27

[[]Kerkmann 2005]

[Koh et al. 1992]

D. S. KOH, P. JONAS, M. E. BRÄU und W. VOGEL (1992). A TEA-insensitive flickering potassium channel active around the resting potential in myelinated nerve. J.Membr.Biol., 130(2):149–162. 14

[Kopka 1994]

H. KOPKA (1994). *HT_EX-Einführung*. Addison-Wesley (Deutschland), 1. Auflage.

[LAI et al. 2002]

J. LAI, M. S. GOLD, C. S. KIM, D. BIAN, M. H. OSSIPOV, J. C. HUNTER und F. POR-RECA (2002). Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxinresistant sodium channel, NaV1.8. Pain, 95(1-2):143–152. 28, 74, 75

[LI et al. 1999]

H. L. LI, A. GALUE, L. MEADOWS und D. S. RAGSDALE (1999). A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. Mol.Pharmacol., 55(1):134–141. 20

[LIPKIND und FOZZARD 1994]

G. M. LIPKIND und H. A. FOZZARD (1994). A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na⁺ channel. Biophys.J., 66(1):1–13. 26

[LIPKIND und FOZZARD 2000]

G. M. LIPKIND und H. A. FOZZARD (2000). KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na(+) channel pore. Biochemistry, 39(28):8161–8170. 26, 70

[LIU et al. 1997]

Y. LIU, M. HOLMGREN, M. E. JURMAN und G. YELLEN (1997). Gated access to the pore of a voltage-dependent K^+ channel. Neuron, 19(1):175–184. 70

[MARBAN et al. 1998]

E. MARBAN, T. YAMAGISHI und G. F. TOMASELLI (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels. J.Physiol., 508 (Pt 3):647–657. 16

[MATTHEWS 1991]

G. G. MATTHEWS (1991). Cellular physiology of nerve and muscle. Blackwell Scientific, Boston. 18

[MATZNER und DEVOR 1992]

O. MATZNER und M. DEVOR (1992). Na⁺ conductance and the threshold for repetitive neuronal firing. Brain Res., 597(1):92–98. 74

[MATZNER und DEVOR 1994]

O. MATZNER und M. DEVOR (1994). Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na^+ channels. J.Neurophysiol., 72(1):349–359. 74

[McClelland et al. 2004]

D. MCCLELLAND, R. M. EVANS, L. BARKWORTH, D. J. MARTIN und R. H. SCOTT (2004). A study comparing the actions of gabapentin and pregabalin on the electrophysiological properties of cultured DRG neurones from neonatal rats. BMC.Pharmacol., 4(1):14. 3

[MCPHEE et al. 1995]

J. C. MCPHEE, D. S. RAGSDALE, T. SCHEUER und W. A. CATTERALL (1995). A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. J.Biol.Chem., 270(20):12025–12034. 19

[MICROBIOLOGY@LEICESTER 2004]

MICROBIOLOGY@LEICESTER (2004). Department of Virology, University of Leicester, UK: web resources: Polyomaviruses. http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/ Polyomaviruses.html. 39

[MOTOMURA et al. 1995]

H. MOTOMURA, S. FUJIKAWA, N. TASHIRO, Y. ITO und N. OGATA (1995). Singlechannel analysis of two types of Na⁺ currents in rat dorsal root ganglia. Pflügers Arch., 431(2):221–229. 24

[NARAHASHI et al. 1964]

T. NARAHASHI, J. W. MOORE und W. R. SCOTT (1964). Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons. J.Gen.Physiol., 47:965–974. 23

[NEHER und SAKMANN 1976]

E. NEHER und B. SAKMANN (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature, 260(5554):799–802. 31

[NODA et al. 1989]

M. NODA, H. SUZUKI, S. NUMA und W. STÜHMER (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. FEBS Lett., 259(1):213–216. 26

[NOVAKOVIC et al. 1998]

S. D. NOVAKOVIC, E. TZOUMAKA, J. G. MCGIVERN, M. HARAGUCHI, L. SANGAMES-WARAN, K. R. GOGAS, R. M. EGLEN und J. C. HUNTER (1998). Distribution of the tetrodotoxin-resistant sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions. J.Neurosci., 18(6):2174–2187. 27, 74

[NYSTROM und HAGBARTH 1981]

B. NYSTROM und K. E. HAGBARTH (1981). Microelectrode recordings from transected nerves in amputees with phantom limb pain. Neurosci.Lett., 27(2):211–216. 74

[Ochoa et al. 1982]

J. OCHOA, H. E. TOREBJORK, W. J. CULP und W. SCHADY (1982). Abnormal spontaneous activity in single sensory nerve fibers in humans. Muscle Nerve, 5(9S):S74–S77. 74

[OGATA und TATEBAYASHI 1993]

N. OGATA und H. TATEBAYASHI (1993). Kinetic analysis of two types of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglia. J.Physiol., 466:9–37. 24, 27

[PECHER et al. 2004]

S. PECHER, B. W. BOTTIGER, B. GRAF und M. W. HOLLMANN (2004). "Alternative" Effekte von Lokalanästhetika. Anaesthesist, 53(4):316–325. 8

[QUASTHOFF et al. 1995]

S. QUASTHOFF, J. GROSSKREUTZ, J. M. SCHRÖDER, U. SCHNEIDER und P. GRAFE (1995). Calcium potentials and tetrodotoxin-resistant sodium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve. Neuroscience, 69(3):955–965. 27, 74

[RABERT et al. 1998]

D. K. RABERT, B. D. KOCH, M. ILNICKA, R. A. OBERNOLTE, S. L. NAYLOR, R. C. HERMAN, R. M. EGLEN, J. C. HUNTER und L. SANGAMESWARAN (1998). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel from human dorsal root ganglia, hPN3/SCN10A. Pain, 78(2):107–114. 24

[RAGSDALE et al. 1994]

D. S. RAGSDALE, J. C. MCPHEE, T. SCHEUER und W. A. CATTERALL (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. Science, 265(5179):1724–1728. 20, 21, 70

[RAGSDALE et al. 1996]

D. S. RAGSDALE, J. C. MCPHEE, T. SCHEUER und W. A. CATTERALL (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 93(17):9270–9275. 20

[RICHEIMER et al. 1997]

S. H. RICHEIMER, Z. H. BAJWA, S. S. KAHRAMAN, B. J. RANSIL und C. A. WARFIELD (1997). Utilization patterns of tricyclic antidepressants in a multidisciplinary pain clinic: a survey. Clin.J.Pain, 13(4):324–329. 3

[RODEN et al. 1996]

D. M. RODEN, R. LAZZARA, M. ROSEN, P. J. SCHWARTZ, J. TOWBIN und G. M. VINCENT (1996). Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. Circulation, 94(8):1996–2012. 73

[Rogers et al. 1996]

J. C. ROGERS, Y. QU, T. N. TANADA, T. SCHEUER und W. A. CATTERALL (1996). Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel alpha subunit. J.Biol.Chem., 271(27):15950–15962. 20

[Rohl et al. 1999]

C. A. ROHL, F. A. BOECKMAN, C. BAKER, T. SCHEUER, W. A. CATTERALL und R. E. KLEVIT (1999). Solution structure of the sodium channel inactivation gate. Biochemistry, 38(3):855–861. 19

[ROSNER et al. 1996]

H. ROSNER, L. RUBIN und A. KESTENBAUM (1996). Gabapentin adjunctive therapy in neuropathic pain states. Clin.J.Pain, 12(1):56–58. 3

[Roy und Narahashi 1992]

M. L. ROY und T. NARAHASHI (1992). Differential properties of tetrodotoxinsensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. J.Neurosci., 12(6):2104–2111. 24

[Roy et al. 1994]

M. L. ROY, E. REUVENY und T. NARAHASHI (1994). Single-channel analysis of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. Brain Res., 650(2):341–346. 24

[RUSH et al. 1998]

A. M. RUSH, M. E. BRÄU, A. A. ELLIOTT und J. R. ELLIOTT (1998). Electrophysiological properties of sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia. J.Physiol., 511 (Pt 3):771–789. 23, 24

[SANGAMESWARAN et al. 1996]

L. SANGAMESWARAN, S. G. DELGADO, L. M. FISH, B. D. KOCH, L. B. JAKEMAN, G. R. STEWART, P. SZE, J. C. HUNTER, R. M. EGLEN und R. C. HERMAN (1996). Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. J.Biol.Chem., 271(11):5953–5956. 16, 24

[SCHILD und KUNZE 1997]

J. H. SCHILD und D. L. KUNZE (1997). Experimental and modeling study of Na^+ current heterogeneity in rat nodose neurons and its impact on neuronal discharge. J.Neurophysiol., 78(6):3198–3209. 75

[Scholz et al. 1998]

A. SCHOLZ, N. APPEL und W. VOGEL (1998). Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive Na^+ channel in rat dorsal root ganglion neurons and their blockade by halothane. Eur.J.Neurosci., 10(8):2547–2556. 23

[SCHRÖDER et al. 2004]

I. SCHRÖDER, T. HUTH, V. SUITCHMEZIAN, J. JAROSIK, S. SCHNELL und U. P. HANSEN (2004). Distributions-per-level: a means of testing level detectors and models of patchclamp data. J.Membr.Biol., 197(1):49–58. 12

[SCHWARTZ et al. 1990]

A. SCHWARTZ, Y. PALTI und H. MEIRI (1990). Structural and developmental differences between three types of Na channels in dorsal root ganglion cells of newborn rats. J.Membr.Biol., 116(2):117–128. 24

[Shaw et al. 2002]

G. SHAW, S. MORSE, M. ARARAT und F. L. GRAHAM (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. FASEB J., 16(8):869–871. 38

[SIVILOTTI et al. 1997]

L. SIVILOTTI, K. OKUSE, A. N. AKOPIAN, S. MOSS und J. N. WOOD (1997). A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS. FEBS Lett., 409(1):49–52. 26

[STARMER et al. 1984]

C. F. STARMER, A. O. GRANT und H. C. STRAUSS (1984). Mechanisms of usedependent block of sodium channels in excitable membranes by local anesthetics. Biophys.J., 46(1):15–27. 22

[Stevens 1991]

C. F. STEVENS (1991). Ion channels. Making a submicroscopic hole in one. Nature, 349(6311):657–658. 18

[STRICHARTZ und COVINO 1987]

G. R. STRICHARTZ und B. G. COVINO; G. R. STRICHARTZ (Hrsg.) (1987). Local anesthetics. Handbook of experimental pharmacology, Bd. 81. Springer, Berlin. 8

[STÜHMER et al. 1989]

W. STÜHMER, F. CONTI, H. SUZUKI, X. D. WANG, M. NODA, N. YAHAGI, H. KUBO und S. NUMA (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. Nature, 339(6226):597–603. 17

[TANELIAN und BROSE 1991]

D. L. TANELIAN und W. G. BROSE (1991). Neuropathic pain can be relieved by drugs that are use-dependent sodium channel blockers: lidocaine, carbamazepine, and mexiletine. Anesthesiology, 74(5):949–951. 3

[TANELIAN und MACIVER 1991]

D. L. TANELIAN und M. B. MACIVER (1991). Analgesic concentrations of lidocaine suppress tonic A-delta and C fiber discharges produced by acute injury. Anesthesiology, 74(5):934–936. 74

[TATE et al. 1998]

S. TATE, S. BENN, C. HICK, D. TREZISE, V. JOHN, R. J. MANNION, M. COSTIGAN, C. PLUMPTON, D. GROSE, Z. GLADWELL, G. KENDALL, K. DALE, C. BOUNTRA und C. J. WOOLF (1998). Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. Nat.Neurosci., 1(8):653–655. 23, 39

[TOMASELLI et al. 1995]

G. F. TOMASELLI, N. CHIAMVIMONVAT, H. B. NUSS, J. R. BALSER, M. T. PÉREZ-GARCÍA, R. H. XU, D. W. ORIAS, P. H. BACKX und E. MARBAN (1995). A mutation in the pore of the sodium channel alters gating. Biophys.J., 68(5):1814–1827. 19

[Ulbricht 2005]

W. ULBRICHT (2005). Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. Physiol Rev., 85(4):1271–1301. 19

[URBAN und HLADKY 1979]

B. W. URBAN und S. B. HLADKY (1979). Ion transport in the simplest single file pore. Biochim.Biophys.Acta, 554(2):410–429. 10

[VAUGHAN WILLIAMS 1984]

E. M. VAUGHAN WILLIAMS (1984). A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drugs. J.Clin.Pharmacol., 24(4):129–147. 7

[VEDANTHAM und CANNON 1999]

V. VEDANTHAM und S. C. CANNON (1999). The position of the fast-inactivation gate during lidocaine block of voltage-gated Na⁺ channels. J.Gen.Physiol., 113(1):7–16. 68, 71, 73

[VOGEL und SCHWARZ 1995]

W. VOGEL und J. R. SCHWARZ; S. G. WAXMAN (Hrsg.), J. D. KOCSIS (Hrsg.) und P. K. STYS (Hrsg.) (1995). Voltage-clamp studies in Axons: Macroscopic and singlechannel currents. In: The Axon, S. 257–280. Oxford University Press, Oxford. 14

[WALLACE et al. 1996]

M. S. WALLACE, J. B. DYCK, S. S. ROSSI und T. L. YAKSH (1996). Computercontrolled lidocaine infusion for the evaluation of neuropathic pain after peripheral nerve injury. Pain, 66(1):69–77. 75

[WANG et al. 1998]

G. K. WANG, C. QUAN und S. Y. WANG (1998). Local anesthetic block of batrachotoxinresistant muscle Na⁺ channels. Mol.Pharmacol., 54(2):389–396. 20

[WANG et al. 2004]

G. K. WANG, C. RUSSELL und S. Y. WANG (2004). State-dependent block of voltagegated Na^+ channels by amitriptyline via the local anesthetic receptor and its implication for neuropathic pain. Pain, 110(1-2):166–174. 3

[WANG und WANG 1999]

S. Y. WANG und G. K. WANG (1999). Batrachotoxin-resistant Na⁺ channels derived from point mutations in transmembrane segment D4-S6. Biophys.J., 76(6):3141–3149. 22

[WAXMAN et al. 1999]

S. G. WAXMAN, S. DIB-HAJJ, T. R. CUMMINS und J. A. BLACK (1999). Sodium channels and pain. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 96(14):7635–7639. 74

[WRIGHT et al. 1998]

S. N. WRIGHT, S. Y. WANG und G. K. WANG (1998). Lysine point mutations in Na⁺ channel D4-S6 reduce inactivated channel block by local anesthetics. Mol.Pharmacol., 54(4):733-739. 20

[Yamagishi et al. 1997]

T. YAMAGISHI, M. JANECKI, E. MARBAN und G. F. TOMASELLI (1997). Topology of the P segments in the sodium channel pore revealed by cysteine mutagenesis. Biophys.J., 73(1):195–204. 18

[YOSHIDA und MATSUDA 1979]

S. YOSHIDA und Y. MATSUDA (1979). Studies on sensory neurons of the mouse with intracellular-recording and horseradish peroxidase-injection techniques. J.Neurophysiol., 42(4):1134–1145. 23

[YOSHIMURA et al. 1996]

N. YOSHIMURA, G. WHITE, F. F. WEIGHT und W. C. DE GROAT (1996). Different types of Na^+ and A-type K^+ currents in dorsal root ganglion neurones innervating the rat urinary bladder. J.Physiol., 494 (Pt 1):1–16. 24

[ZENKER et al. 1993]

W. ZENKER, R. MAYR, H. GRUBER, S. KUBIK, G. RAGER, W. NEUHUBER, K. AKERT, H. KÜNZLE, H. BRAAK, E. BRAAK, H. PETSCHE, E. VAN DER ZYPEN, W. FIR-BAS, P. FRITSCH, Z. HALATA und P. BÖCK; D. DRENCKHAHN (Hrsg.) und W. ZEN-KER (Hrsg.) (1993). Nervensystem, Haut, Paraganglien. In: Benninghoff, Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Bd. 2, S. 219–828. Urban & Fischer, München, Wien, Baltimore, 15. Auflage. 6

[Zhu et al. 1998]

G. ZHU, Y. ZHANG, H. XU und C. JIANG (1998). Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line. J.Neurosci.Methods, 81(1-2):73-83. 39, 65

Danksagung

Mein Dank gilt den vielen Menschen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael E. Bräu,

für die hervorragende Ausbildung am Natriumkanal und geduldige Anleitung dieser Dissertation.

Frau Kirstin Lots,

für die vielen kurzweiligen Stunden gemeinsamer Arbeit in der Zellkultur und am Patch-Clamp-Versuchsstand.

Herrn Prof. Dr. med. F. Dreyer und seiner Arbeitsgruppe,

für Unterstützung und Rat zur Vorbereitung der Experimente, besonders Frau Christiane Zibuschka als große Hilfe in der Kultur der Zellen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A. Scholz und allen Mitarbeitern des Labors für die Bereitstellung des Versuchsstandes und eine allzeit konstruktive Arbeitsatmosphäre. Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde auf dem Deutschen Schmerzkongreß am 19.10.2005 in Bremen vorgestellt:

P4.3 Lidocain zeigt einen ausgeprägten Offenkanalblock an NaV1.8 Kanälen des peripheren nozizeptiven Systems. J. Frese, G. Hempelmann, M. Bräu (Gießen).

Eine englischsprachige Publikation ist in Vorbereitung.

Ich erkläre: "Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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 den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen 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."
Lebenslauf

Jan Paul Bernhard Frese geboren am 05. Juli 1979 in Münster (Westfalen)

1985 - 1989	Grundschule Kirchschule Papenburg(Emsland)
1989 - 1991	Orientierungsstufe Kirchschule Papenburg
1991 - Juli 1998	Gymnasium Papenburg, Abitur
Juli 1998	Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Bundesmarine
- April 1999	in List auf Sylt und Fregatte "EMDEN"
April 1999	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der
	Justus-Liebig-Universität, Gießen
April 2001	Physikum
Mai 2001	Beginn der Dissertationsarbeit bei Herrn PD Dr. med. M.E. Bräu
	am physiologischen Institut der JLU, Gießen
April 2002	Erstes Staatsexamen
August 2003	Praxissemester in der Kinderchirurgie des Istituto
- Dezember 2003	Giannina Gaslini, Genua, Italien.
April 2004	Zweites Staatsexamen
Juli 2004	Chirurgischer Abschnitt des praktischen Jahres
- Dezember 2004	im Somerset Hospital, Kapstadt, Südafrika
Mai 2005	Drittes Staatsexamen, Approbation als Arzt
Ab September 2005	Assistenzarzt in der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im
	Universitätsklinikum Gießen bei Herrn Prof. Dr. med. W. Padberg

édition scientifique VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG STAUFENBERGRING 15 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890 redaktion@doktorverlag.de w w w . d o k t o r v e r l a g . d e

