

Strukturelle und physikochemische Determinanten von Substanzen für
die Blockade TTX-resistenter Natriumkanäle

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

vorgelegt von Sibylle Häfner

aus Heidelberg

Giessen 2003

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

Gutachter: PD Dr. M. Bräu

Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

Tag der Disputation: 07.05.2003

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</u>	4
1.1	<u>SCHMERZ</u>	4
1.2	<u>PHYSIOLOGIE DER NOZIZEPTION</u>	5
1.3	<u>SCHMERZ UNTER PATHOPHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN:</u>	5
1.3.1	<u>Transduktion und Transformation</u>	6
1.3.2	<u>Konduktion</u>	6
1.4	<u>DER NATRIUMKANAL</u>	6
1.5	<u>STRUKTUR DES NATRIUMKANALS</u>	8
1.6	<u>DER TTX-RESISTENTE NATRIUMKANAL</u>	10
1.7	<u>NATRIUMKANAL-BLOCKIERENDE PHARMAKA</u>	12
1.8	<u>PHYSIKOCHEMISCHE PARAMETER NATRIUMKANAL-BLOCKIERENDER PHARMAKA</u>	14
1.8.1	<u>pK-Wert</u>	14
1.8.2	<u>Hydrophobizität</u>	15
1.8.3	<u>Molekülmasse</u>	16
1.9	<u>STRUKTURMERKMALE NATRIUMKANAL-BLOCKIERENDER PHARMAKA</u>	16
1.9.1	<u>aromatischer Ring:</u>	16
1.9.2	<u>terminales Amin:</u>	17
1.9.3	<u>Amid-, Ester-, Etherbindung:</u>	17
1.10	<u>AUFGABENSTELLUNG</u>	18
2	<u>METHODEN</u>	19
2.1	<u>DIE PRÄPARATION</u>	19
2.2	<u>”PATCH-CLAMP”-TECHNIK</u>	20
2.2.1	<u>Das Funktionsprinzip des Patch-Clamp- Verstärkers:</u>	22
2.2.2	<u>Elektrische Eigenschaften der whole-cell-Ableitung:</u>	23
2.3	<u>PIPETTEN:</u>	25
2.4	<u>LÖSUNGEN UND LÖSUNGSWECHSEL</u>	25
2.4.1	<u>Nährmedium:</u>	25
2.4.2	<u>Kristalline Lösungen:</u>	25
2.5	<u>ELEKTRODEN</u>	27
2.6	<u>SUPERFUSIONSYSTEM</u>	27
2.7	<u>PHARMAKA</u>	28
2.8	<u>DATENVERARBEITUNG UND STATISTIK</u>	29
2.9	<u>CHARAKTERISIERUNG DER ZELLEN</u>	29
2.10	<u>UNTERSUCHUNG DER SUBSTANZEN:</u>	33
3	<u>ERGEBNISSE</u>	35
4	<u>DISKUSSION</u>	50
4.1	<u>PHYSIKOCHEMISCHE PARAMETER UND POTENZ</u>	50
4.1.1	<u>Molekulargewicht</u>	50
4.1.2	<u>pK-Wert</u>	50
4.1.3	<u>Lipophilie:</u>	51
4.2	<u>STRUKTURELLE EIGENSCHAFTEN:</u>	52
4.2.1	<u>Strukturmerkmale und phasische Blockade</u>	54
4.2.2	<u>Phenylethylendiamin und Phenylpropylamin</u>	55
4.2.3	<u>Phenylethylendiamin und Phenylpiperazin</u>	56
4.2.4	<u>Diphenhydramin</u>	56
4.2.5	<u>Phenylethylamin und Phenylharnstoff</u>	57
4.2.6	<u>Anilin und 1-Naphtylamin</u>	57
4.3	<u>BESCHRÄNKUNG</u>	58
4.4	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	58
5	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	60
6	<u>LEBENS LAUF</u>	64
7	<u>DANKSAGUNG</u>	66

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Schmerz

Schmerz ist das häufigste Symptom, weswegen Patienten sich in ärztliche Behandlung geben. Schmerz ist eine Sinnesempfindung unseres Körpers. Schmerzwahrnehmung dient dazu, Bedrohungen des Organismus von außen als auch von innen zu erkennen. So unangenehm der Schmerz für das einzelne Individuum ist, so lebensnotwendig ist er. Schmerz hat Melde- und Warnfunktion. Menschen, deren Schmerzwahrnehmung genetisch reduziert ist, stehen ständig in Gefahr, sich selbst zu verletzen. Wahrnehmung von Schmerz ist nicht nur eine einfache Reiz-Reaktionsbeziehung, vielmehr handelt es sich um ein komplexes Geschehen. Schmerzerleben setzt sich aus vielen Komponenten zusammen. Die durch einen noxischen Reiz in afferenten Nervenfasern und zentralen Neuronen ausgelösten Impulse vermitteln Information über die Lokalisation, Dauer und Intensität eines schmerzhaften Reizes (sensorisch-diskriminative Komponente). Die Wahrnehmung des Schmerzes ist mit den entsprechenden unlustbetonten Gefühlen verbunden (affektive Komponente). Der aktuelle Schmerz wird mit den im Gedächtnis gespeicherten Schmerzerfahrungen und ihren Folgen verglichen (kognitive Komponente). Bei entsprechend starken Schmerzen erweitern sich die Pupillen, der Blutdruck steigt, das Herz schlägt schneller (vegetative Komponente). Schließlich wird der Mensch alles tun, um den Schmerzreiz so schnell wie möglich zu beenden. Flucht- und Schutzreflexe setzen ein (motorische Komponente). Die Erfahrung eines Schmerzerlebnisses wird uns davon überzeugen, in Zukunft die Auslösefaktoren zu meiden. – In bestimmten Situationen wird Schmerz zu einem behandlungsbedürftigen Symptom. Das ist dann der Fall, wenn sich der Auslöser nicht vermeiden lässt (z.B. Operation), oder wenn pathologische Veränderungen von Körpergewebe wie Tumoren, Neuropathien, Nervenverletzungen usw. zu unerträglichen chronischen Schmerzzuständen führen. Hier beginnt das Feld der klinischen Anästhesiologie. Sie hat zum Ziel, Schmerzen zu unterdrücken, bzw auf ein erträgliches Maß zu reduzieren.

1.2 Physiologie der Nozizeption

Schmerzreize werden von Schmerzrezeptoren (Nozizeptoren) registriert und an das zentrale Nervensystem weitergeleitet. Bei den Nozizeptoren handelt es sich um freie Nervenendigungen, die hauptsächlich in der Adventitia kleiner Blut- und Lymphgefäße lokalisiert sind. Schmerzreize können sowohl von außen auf den Körper einwirken (mechanische, thermische Reize), als auch durch körpereigene Entzündungsmediatoren (z.B. Prostaglandin, Bradykinin, Serotonin) im Körper selbst entstehen. Ist der Reiz groß genug, wird ein Aktionspotential generiert. Die ausgelöste Impulsaktivität wird über A δ - und C-Fasern zum Rückenmark geleitet. A δ -Fasern sind myelinisiert, dadurch schnell leitend und für den hellen, gut lokalisierbaren, epikritischen Sofortschmerz verantwortlich. Die nicht myelinisierten, daher langsam leitenden C-Fasern vermitteln dagegen den dumpfen, schlecht lokalisierbaren, protopathischen Zweitschmerz. Die schmerzleitenden afferenten Fasern treten über die Hinterwurzeln ins Rückenmark ein und werden in der *substantia gelatinosa* des Hinterhorns auf die zweiten Neurone umgeschaltet. Die zweiten Neurone kreuzen im jeweiligen Rückenmarkssegment auf die Gegenseite und steigen im kontralateralen Vorderseitenstrang zu den Thalamuskernen auf. Die zweiten Neurone haben auf dem entsprechenden Rückenmarkssegment auch Verbindungen zu den motorischen und sympathischen Efferenzen, die motorische Fluchtreflexe und sympathische Reflexe auslösen können. Der Vorderseitenstrang gibt auf dem Weg zu den Thalamuskernen Kollaterale zur *formatio reticularis* des Hirnstamms und zum aufsteigenden retikulären aktivierenden System ab. Dadurch werden bei Schmerzen das Atem- und Kreislaufzentrum und der Wachheitsgrad beeinflusst. Von den Thalamuskernen aus verlaufen Bahnen zum somatosensorischen Kortex, wo der Entstehungsort des Schmerzes erkannt wird, sowie zum limbischen System, wo die affektiv-emotionale Komponente des Schmerzes bewertet wird. Ferner wird bei Schmerzen das endokrine System stimuliert: Der Hypophysenvorderlappen schüttet ACTH und β -Endorphin ins Blut aus.

1.3 Schmerz unter pathophysiologischen Bedingungen:

Unter physiologischen Bedingungen folgt Schmerzmeldung und -wahrnehmung über die oben beschriebenen Reiz- Reaktionskette. Häufig jedoch verursacht der schmerzauslösende Stimulus darüber hinaus Entzündung oder Nervenverletzung. Dann setzen zusätzliche

Vorgänge ein, die zu einer verstärkte Schmerzmeldung beitragen. Auf der Ebene der sensiblen Afferenzen sind 2 Mechanismen bekannt.

1.3.1 Transduktion und Transformation

Nozizeptoren sind keine einheitliche Sensorpopulation. Die Erregungsschwellen für mechanische, thermische und chemische Stimuli variieren. Dementsprechend spricht man von sogenannten high- and low- threshold- Nozizeptoren. Kommt es zu einer Gewebeschädigung, wird eine Entzündungsreaktion in Gang gesetzt. Entzündungsmediatoren wie Bradykinin, Prostaglandine, Leukotriene, Substanz P, Serotonin, etc werden frei gesetzt. Sie erniedrigen die Erregungsschwelle von sogenannten high- threshold- Nozizeptoren. Leichte Stimuli, die normalerweise keinen Schmerz auslösen, werden jetzt als schmerzvoll wahrgenommen (Raja *et al.*, 1988).

1.3.2 Konduktion

Nach Verletzung eines Axons exprimieren die dazugehörigen sensorischen Neurone vermehrt Natriumkanäle (Gallego *et al.*, 1987). An der Verletzungsstelle kommt es zu einer abnormalen Akkumulation von Natriumkanälen (England *et al.*, 1996). Die Natriumleitfähigkeit steigt. Es kommt zu ektopter Bildung von Aktionspotentialen im Nerven, Steigerung der Erregbarkeit und repetitivem Feuern. (Matzner & Devor, 1994).

Auch auf den anderen Ebenen der Schmerzleitung und -wahrnehmung setzen unter pathophysiologischen Umständen zusätzliche Mechanismen ein, die mit den beschriebenen Mechanismen zusammen dazu beitragen, ein unerträgliches Schmerzsyndrom zu erzeugen.

Letztgenannter Mechanismus bietet jedoch einen hervorragenden Ansatzpunkt zur Behandlung von Schmerzen: den Natriumkanal.

1.4 Der Natriumkanal

Natriumkanäle sind spannungsabhängige Kanäle, die entscheidend für die Entstehung eines Aktionspotentials, dem Grundbaustein für Erregungsleitung, sind. An der Membran einer Nervenzelle finden wir im Ruhezustand eine Potentialdifferenz von ca. 70 mV. Das Zellinnere ist gegenüber der Außenseite negativ. Dieses Potential entsteht im Zusammenspiel einer Natrium-Kalium-Pumpe, einer hohen Konzentration an intrazellulären Anionen, die nicht durch die Membran diffundieren können, und potentialunabhängigen Kaliumkanälen. Aufgrund der hohen Kalium-Ionen-Leitfähigkeit der Zellmembran liegt das Potential in der Nähe des Kalium-Gleichgewichtspotentials. Ist ein Reiz stark genug, wird ein

Aktionspotential generiert. Dann öffnen sich die spannungsabhängigen Natriumkanäle und lassen selektiv Natrium-Ionen durch die Membran hindurch. Durch den Anstieg der Natrium-Ionen - Leitfähigkeit bricht das Membranpotential zusammen und erreicht kurzfristig sogar positive Werte (overshoot). Schon vor Erreichen des Overshoots sinkt die Natrium-Leitfähigkeit. Die Natriumkanäle inaktivieren. Gleichzeitig öffnen sich spannungsabhängige Kaliumkanäle und Kalium strömt entsprechend seinem elektrochemischen Gradienten nach außen, so dass das Ruhemembranpotential wieder aufgebaut wird. Um die hohen Leitungsgeschwindigkeiten von myelinisierten Nerven zu erreichen, muss das Aktionspotential kurz sein und eine steile Anstiegsflanke haben. Natriumkanäle mit schneller Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik haben die entsprechenden Eigenschaften.

Der zeitliche Verlauf des Natriumstromes wird im Wesentlichen durch 2 Determinanten bestimmt:

1. durch den Prozess der Aktivierung und Inaktivierung der Natriumkanäle. Zunächst aktivieren die Kanäle. Es kommt zu einem starken Anstieg der Natrium-Leitfähigkeit. Nach einer gewissen Offenzeit inaktivieren die Kanäle. Folglich nimmt die Leitfähigkeit ab.
2. durch die Differenz zwischen dem vorgegebenen Potential und dem Natrium-Gleichgewichtspotential als treibende Kraft für den Ionenstrom.

zu 1.:

Die Membran enthält eine bestimmte Anzahl von Natriumkanälen. Diese können unterschiedliche Konformationszustände annehmen. Man unterscheidet grob einen ruhenden Zustand (R), einen aktivierten oder offenen Zustand (O) und einen inaktivierten Zustand (I). Einzig im aktivierten Zustand leitet der Kanal Natrium-Ionen und trägt damit zum Stromfluss durch die Membran bei.

Der Konformationszustand des Kanals hängt vom Membranpotential und der Zeit ab. Der Kanal im ruhenden Zustand wird bei Depolarisation aktiviert. Durch die Pore können jetzt Natrium-Ionen fließen. Nach einer charakteristischen Offenzeit inaktiviert der Kanal spontan. Zwischen den einzelnen Konformationszuständen der Kanäle besteht ein Gleichgewicht. Verschiebt sich das Membranpotential in Richtung Depolarisation, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass der einzelne Kanal vom ruhenden über den offenen Zustand in den inaktivierten Zustand wechselt. Der Kanal kann auch direkt vom geschlossenen in den

inaktivierten Zustand übergehen. Insgesamt verschiebt sich damit das Gleichgewicht zwischen den einzelnen Zuständen zugunsten des inaktivierten Zustands. Wenn die Membran repolarisiert ist, kehren die Kanäle langsam vom inaktivierten in den ruhenden Zustand zurück. Auch die Geschwindigkeit, mit der ein Kanal von einem Zustand in den anderen wechselt, ist abhängig vom Membranpotential. Umso größer der Depolarisationssprung, desto schneller aktiviert und inaktiviert der Kanal.

1.5 Struktur des Natriumkanals

Spannungsabhängige Natriumkanäle finden sich überall dort, wo Zellmembranen schnell erregbar sein müssen. Bei Natriumkanälen handelt es sich um eine Familie von Subtypen, die entsprechend ihrer unterschiedliche Funktion in den einzelnen Gewebe unterschiedlich spezialisiert sind. Die Natriumkanal-Subtypen unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur, ihren biophysikalischen Eigenschaften und ihrer Sensitivität gegenüber Tetrodotoxin, einem Neurotoxin. Allen Natriumkanälen gemein ist eine α -Untereinheit (200-300 kDa), die das funktionelle Kanalprotein darstellt. Zusätzlich haben die Kanäle gewöhnlich noch eine oder mehrere β -Untereinheiten (33-36 kDa), die die funktionellen Eigenschaften, wie zum Beispiel die Kinetik des Kanals mitbestimmen (Marban *et al.*, 1998). Abbildung 1 zeigt die Sekundärstruktur der α -Untereinheit eines Natriumkanals.

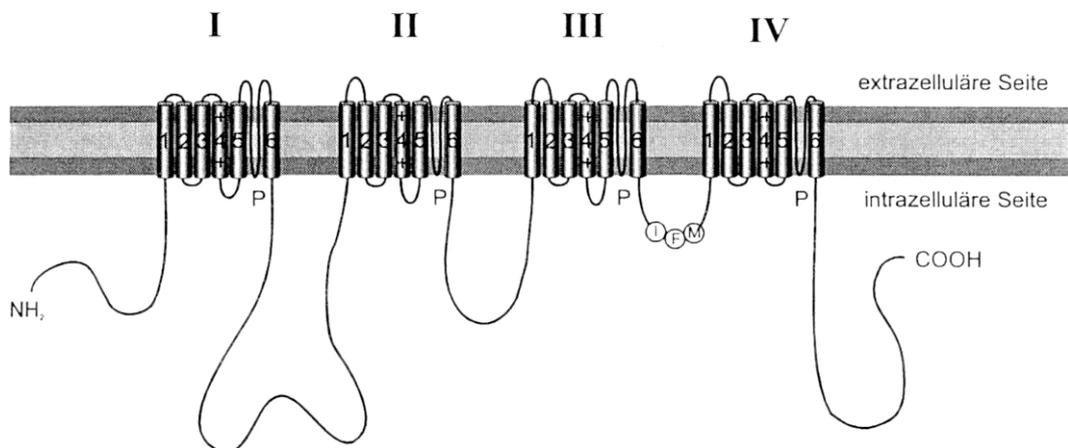


Abbildung 1: Sekundärstruktur der α -Untereinheit eines Natriumkanals:

Die α -Untereinheit ist ein Glycoprotein, das aus 4 homologen Domänen (DI-IV) besteht. Jede Domäne setzt sich aus sechs hydrophoben α -Helices zusammen, die die Membran durchspannen (S1-6). Schlüsselmerkmale sind:

- Eine Schleife zwischen S5 und S6, die von extrazellulär in die Membran hineinragt. Sie ist Porenwand des Kanals und Selektivitätsfilter für Natriumionen (P-Segment) (Yellen *et al.*, 1991).
- Positiv geladene Aminosäurereste auf den S4-Segmenten. Sie liegen im elektrischen Feld der Membran und dienen dem Kanal als Spannungssensoren (Stühmer *et al.*, 1989). Bei Spannungsänderung verschieben sich die positiv geladenen Gruppen. Die Verschiebung ist messbar und wird als sogenannter „gating current“ bezeichnet.
- Eine intrazelluläre Schleife zwischen D-III und D-IV. Sie enthält die Sequenz Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM-Sequenz). Die Schleife wird als das „Inaktivierungstor“ des Natriumkanals bezeichnet. Bei schneller Inaktivierung (innerhalb von Millisekunden) dockt die IFM-Sequenz an einen Rezeptor, der von der Verbindung zwischen S4 und S5 der D-IV gebildet wird (McPhee *et al.*, 1996). Darüber hinaus kann der Natriumkanal in langsame Inaktivierungsprozesse (innerhalb von Sekunden) eintreten. Die strukturellen Determinanten der langsamen Inaktivierung sind weniger genau lokalisiert.
- Die Bindungsstelle für TTX bei den TTX-sensitiven Kanälen. Es handelt dabei sich um einen Glutaminsäurerest auf dem P-Segment der Domäne I. Mit seiner negativen Ladung geht der Glutaminsäurerest eine starke Bindung mit der positiv geladenen Guanidiniumgruppe des TTX-Moleküls ein (Noda *et al.*, 1989).

Tetrodotoxin ist ein Gift, das hauptsächlich von einigen Meerestierarten sowohl zum Zwecke der Selbstverteidigung als auch als Hilfsmittel beim Beutefang eingesetzt wird. Am häufigsten tritt sein Name in Zusammenhang mit dem Kugelfisch auf. Dieser speichert das Gift in den Ovarien, der Leber und gelegentlich auch in der Haut. Tetrodotoxin ist ein Alkaloid. Seine hochpotente Wirksamkeit beruht einzig und allein auf seiner Fähigkeit, Natriumkanäle zu blockieren. Dabei geht die positiv geladene Guanidiniumgruppe des Tetrodotoxins mit der negativ geladenen und in der Porenregion gelegenen Aminosäure Glutaminsäure des TTX-sensitiven Natriumkanals eine stark polare Bindung ein. TTX-resistente Natriumkanäle haben anstelle der Glutaminsäure eine andere, nicht geladene Aminosäure.

1.6 Der TTX-resistente Natriumkanal

Mit Hilfe der differentiellen Blockade der TTX-sensitiven Kanäle durch TTX kann der TTX-resistente Natriumstrom separat untersucht werden. TTX-resistente Ströme werden in der Spinalganglienzelle durch unterschiedliche TTX-resistente Natriumkanalsubtypen erzeugt.

TTX-resistente Ströme zeigen im Vergleich zu TTX-sensitiven Strömen eine langsamere Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik. Die Strom-Spannungskurve ist insgesamt zu depolarisierteren Potentialen verschoben. Die Kanäle erholen sich schneller von der Inaktivierung als TTX-sensitive Kanäle. Sie verleihen Neuronen die Eigenschaft, bei depolarisierenden Reizen lange Folgen von Aktionspotentialen zu feuern (Yoshida 1994, Elliott & Elliott 1993). Die TTX-resistenten Ströme von Spinalganglienzellen lassen sich elektrophysiologisch in 3 Arten unterscheiden, genannt R1, R2, R3.

In Spinalganglienzellen sind inzwischen die Gensequenzen der α - subunits von TTX-resistenten Natriumkanälen bekannt. Das erste wurde SNS (sensory- neuron- specific) (Akopian *et al.* 1996) bzw. PN3 (Sangameswaran *et al.* 1996) genannt, das zweite wurde NaN (Dib- Hajj *et al.* 1998) genannt. Akopian und Mitarbeiter konnten später beweisen, dass das α - subunit SNS verantwortlich für den R1- Strom ist (Akopian *et al.* 1999). Etwa zeitgleich konnten Cummins und Mitarbeiter an SNS-Nullmutanten zeigen, dass der Stromkurvenverlauf R3 wahrscheinlich vom α - subunit NaN stammt (Cummins *et al.*, 1999).

Mehrere Fakten sprechen dafür, dass die TTX-resistenten Natriumströme bei der Impulststehung und Weiterleitung von Schmerzen eine entscheidende Rolle spielen:

1. TTX-resistente Natriumströme kommen hauptsächlich an kleinen Spinalganglienzellen vor. Deren Axone verlaufen in A δ - und C-Fasern, die für die Schmerzleitung zuständig sind. Auch die Fasern sind gegenüber TTX resistent. Schnell leitende Fasern, zuständig für die Druckempfindlichkeit, sind dagegen TTX-sensitiv (Strassmann & Raymond 1999). Beim Test auf die Sensitivität gegenüber Capsaicin, einem Stoff, der selektiv polymodale Nozizeptoren stimuliert, ist der Großteil der Zellen mit TTX-resistenten Strömen Capsaicin-sensitiv (Arbuckle & Docherty, 1995).
2. Wie schon erwähnt, ist die Kinetik TTX-resistenter Kanäle langsamer als die von TTX-sensitiven Kanälen. Die Geschwindigkeit der Aktivierung als auch die der Inaktivierung ist bei den TTX-resistenten Natriumkanälen deutlich niedriger als bei den TTX-sensitiven Kanälen. Die Kinetik wäre für schnell fortgeleitete Aktionspotentiale (20-100 m/s) dicker

myelinisierter Nerven zu langsam, für die langsame Fortleitung in nozizeptiven Fasern (1 m/s) ist sie jedoch völlig ausreichend.

3. Substanzen, die Nozizeptoren sensibilisieren, aktivieren TTX-resistente Natriumkanäle. Prostaglandin E₂, aber auch Adenosin und Serotonin sind in der Lage, den TTX-resistenten Natriumstrom in kleinen Spinalganglienzellen zu verstärken und dessen Aktivierungskurve in Richtung negativere Potentiale zu verschieben. Das kann zu einer gesteigerten Erregbarkeit führen (England *et al.*, 1996).
4. Wird ein Nerv verletzt, kommt es auf Segmentebene des verletzten Nerven initial zu einer Reduktion des PN3-Proteins im Zellinneren mit folgender Umverteilung und Akkumulation im peripheren Nerven proximal der Verletzung. Die Umverteilung korreliert zeitlich sehr eng mit dem Aufkommen von Hyperalgesie (Novakovic *et al.*, 1998).
5. Während auf Segmentebene des verletzten Nervens die Expression von PN3 abnimmt, wird in den großen Spinalganglienzellen der benachbarten Segmente eine Zunahme von PN3 beobachtet. Die Zunahme von PN3 in den großen Spinalganglienzellen könnte das Auftreten taktiler Allodynie erklären (Yoon *et al.*, 1996). Wie es zu dieser Umverteilung kommt, ist unklar. Wahrscheinlich spielt der NGF (nerve growth factor) hierbei eine Rolle. Er reguliert die Expression von PN3 und anderen Natriumkanaltypen und wird von verletztem Gewebe ausgeschüttet (Black *et al.*, 1997).
6. Wird Ratten nach Spinalnervligatur die Gegensequenz der PN3-Sequenz appliziert, kann die Kanalexpression blockiert werden. Bei den behandelten Ratten entwickelt sich weder die nach Spinalnervligatur typische Hyperalgesie, noch die Allodynie (Porreca *et al.*, 1999).

TTX-resistente Natriumströme scheinen demnach im Nervensystem im Gegensatz zu TTX-sensitiven Natriumströmen hauptsächlich für Impulsentstehung und Weiterleitung von Schmerzen zuständig zu sein. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass TTX-resistente Natriumkanäle auch bei der Entstehung pathologischer Schmerzen beteiligt sind. Eine Substanz, die ausschließlich TTX-resistente Natriumkanäle blockiert, könnte neue Perspektiven in der Schmerztherapie eröffnen. Leider sind die TTX-resistenten Natriumkanäle nicht die einzigen Natriumkanäle, die an der Entstehung pathologischer Schmerzen beteiligt sind. Nach Durchtrennung eines peripheren Nervens verändern sich auch die Eigenschaften des TTX-sensitiven Stroms. Die TTX-sensitiven Kanäle erholen sich schneller aus dem Zustand der Inaktivierung. Daran scheint ein TTX-sensitiver Natriumkanal (Nav_v1.3) beteiligt zu sein, der normalerweise nicht in der Spinalganglienzelle vorkommt.

Dieser Kanal ist 7-12 Tage nach Durchtrennung eines peripheren Nervens mit immunhistochemischen Methoden verstärkt nachweisbar (Black *et al.*, 1999). Unterschiedliche Verletzungen wirken sich unterschiedlich auf die Expression von verschiedenen Natriumkanaltypen aus. Ein einheitliches Modellsystem läßt sich wahrscheinlich nicht entwerfen (Waxman *et al.*, 1999). Um so wichtiger ist es, die Rollen der Natriumkanäle bei der Schmerzentstehung einzeln zu untersuchen. Eine Substanz, die selektiv TTX-resistente Natriumkanäle blockt, könnte hierbei von großer Hilfe sein.

1.7 Natriumkanal-blockierende Pharmaka

Zahlreiche Substanzen sind bekannt, die Natriumkanäle blockieren können: Lokalanästhetika (p-Aminobenzoesäure-, Anilid- und Thiophenreihe), Antiarrhythmika (Klasse I, z.B. Ajmalin, Flecainid), Antiepileptika (Hydantoine, Dibenzazepincarboxamid-Derivate) und Antidepressiva (Derivate des Iminodibenzyl, Derivate des Iminostilben). Die ersten Medikamente, die angewandt wurden, um durch Blockade der Nervenleitung akute Schmerzen zu verhindern, waren Lokalanästhetika. Systemisch applizierte Lokalanästhetika wirken auch bei einigen Arten von chronischen Schmerzen: Bei schmerzhafter diabetischer Neuropathie (Kastrup *et al.*, 1987, Bach *et al.*, 1990), bei neuralgischen Schmerzen (Rowbotham *et al.*, 1995, Marchettini *et al.*, 1992), bei peripheren Nervenverletzungen (Chabal *et al.*, 1992, Galer *et al.*, 1996) und bei vielen anderen Arten neuropathischer Schmerzen. Lidocain ist ein Lokalanästhetikum, das zur Behandlung akuter und chronischer Schmerzen eingesetzt wird. Erstaunlich bei der Anwendung von Lidocain ist, dass es in einigen Fällen zusätzlich zum akuten Effekt den Schmerz für einen Zeitraum beseitigt, der deutlich über dem Zeitraum liegt, den der Körper braucht, um das Medikament aus dem Plasma zu eliminieren (Arner *et al.*, 1990). Wie dieses Phänomen zustande kommt, ist unklar. Das Dilemma bei der Anwendung von Lidocain liegt in der Anzahl seiner Nebenwirkungen: Nausea, Erbrechen, Benommenheit, Somnolenz, Ataxie, Tinnitus sind Beispiele aus einer weiten Palette. Grund für die Vielzahl der Nebenwirkungen ist, dass Lidocain nicht nur die Natriumkanäle im peripheren Nerven, sondern auch die Natriumkanäle im zentralen Nervensystem, im Reizleitungssystem des Herzens, etc. blockiert. Bei einer Substanz, die selektiv nur die TTX-resistenten Natriumkanäle blockiert, würde man wesentlich weniger Nebenwirkungen erwarten. Bei der Suche nach einem selektiven Blocker TTX-resistenter Natriumkanäle ist zunächst das Verständnis der Mechanismen wichtig, mit denen nicht selektive Natriumkanalblocker Natriumkanäle blockieren.

Lokalanästhetika binden wahrscheinlich an einen Rezeptor in der Pore des Natriumkanals. Die Blockade ist konzentrationsabhängig und reversibel. Die Blockade, die beim erstmaligen Öffnen des Kanals vorhanden ist, wird als tonische Blockade bezeichnet. Wird der Natriumstrom mehrere Male hintereinander ausgelöst, nimmt die Anzahl der blockierten Natriumkanäle zu. Diese Art der Blockade wird als phasische Blockade (use-dependent block) bezeichnet. Sie ist abhängig von der Reizfrequenz, der Reizdauer, dem Membranpotential und der Art des Lokalanästhetikums. Es gibt hauptsächlich zwei Modelle, die das Phänomen des use-dependent-block zu erklären suchten: Die "Modulated Receptor Hypothesis" (Hille, 1977b; Hondeghem & Katzung, 1977), und die "Guarded Receptor Hypothesis" (Starmer *et al.*, 1984). Nach der "Guarded Receptor Hypothesis" ist dem Lokalanästhetikum der Weg zum Rezeptor versperrt, solange sich der Kanal im Ruhezustand befindet. Erst, wenn der Kanal aktiviert und anschließend inaktiviert, kann das Lokalanästhetikum zu seiner Bindungsstelle vordringen. Die Bindungsstelle hat dabei immer die gleiche Affinität zum Lokalanästhetikum. Nach diesem Mechanismus blockieren wahrscheinlich die Antiarrhythmika Chinidin und Flecainid Natriumkanäle (Ragsdale *et al.*, 1996).

Nach der "Modulated Receptor Hypothesis" ist das Lokalanästhetikum je nach Konformationszustand des Kanals unterschiedlich affin zur Bindungsstelle. Hille postulierte, dass das Lokalanästhetikum zum Kanal im aktivierten und besonders im inaktivierten Zustand eine deutlich höhere Affinität besitzt.

Kleinmolekulare Natriumkanal-blockierende Pharmaka haben typische Strukturmerkmale (Covino & Vasallo, 1976):

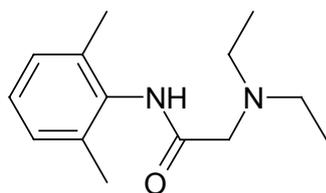


Abbildung 2: Lidocain

Die Moleküle sind amphipatisch: Eine hydrophile tertiäre Aminogruppe ist durch eine Zwischenkette mit einem lipophilen aromatischen Ring verbunden. Die Zwischenkette enthält

eine Amid-, Ester-, oder Etherbindung. Die tertiäre Aminogruppe ist für die basischen Eigenschaften des Moleküls verantwortlich. Durch die Aufnahme eines Protons wird das Molekül zum Kation.

1.8 Physikochemische Parameter Natriumkanal-blockierender Pharmaka

Kleine Strukturunterschiede zwischen den unterschiedlichen Lokalanästhetika verändern physikochemische Eigenschaften und Potenz der Substanzen. Die Lokalanästhetikaforschung versuchte, zwischen den physikochemischen Eigenschaften und der Potenz der Substanzen Zusammenhänge zu finden. Zu den physikochemischen Eigenschaften zählen:

- pK-Wert
- Hydrophobizität
- Molekulargewicht

1.8.1 pK-Wert

Eine Base ist ein Molekül, das in wässriger Lösung Hydronium-Ionen bindet. Je nach molekularer Struktur ist die Affinität der Substanz zu Hydronium-Ionen und damit der Anteil der protonierten Moleküle an der Gesamtmenge der gelösten Moleküle in wässriger Lösung größer oder kleiner. Der Anteil der protonierten Moleküle an der Gesamtmenge der gelösten Moleküle hängt darüber hinaus vom pH- Wert der Lösung ab. Dieser Zusammenhang wird mittels nachfolgender Formel (Henderson- Hasselbach- Gleichung) beschrieben. Dabei ist der pK- Wert der Base der negativ dekadische Logarithmus der Dissoziationskonstante der Base.

$$pK_A = pH + \log [BH^+]/[B]$$

$[BH^+]$ entspricht hierbei der Konzentration protonierter Moleküle einer Base, $[B]$ der Konzentration der ungeladenen Moleküle.

Nach der Hypothese von Hille gibt es für Lokalanästhetika 2 Wege um an den Rezeptor zu gelangen. Zum einen besteht die Möglichkeit, zunächst im nichtprotonierten Zustand die Membran zu passieren. Dann werden die Moleküle im vergleichsweise „sauren“ Milieu intrazellulär ($pH = 7,3$) protoniert und gelangen im protonierten Zustand durch den geöffneten Kanal an den Rezeptor. Dieser Weg ist nur bei geöffneten Kanal möglich. Lokalanästhetika, die diesen Weg gehen, dürften aus diesem Grund eher eine phasische Blockade machen.

Der hydrophobe Weg geht von außen direkt durch die Membran an den Rezeptor. Lokalanästhetika können auf gleichem Wege wieder abdiffundieren. Dies könnte der Weg der Teilchen sein, die eine tonische Blockade machen. (Hille, 1977b) Substanzen blockierten auf diese Weise um so besser tonisch, um so mehr das Gleichgewicht auf Seiten der neutralen Moleküle liegt, das heißt um so niedriger der pK_A -Wert der Substanz ist. Die phasische Blockade wäre um so besser, um so größer der Anteil an protonierten Teilchen ist, das heißt, um so höher der pK -Wert der Substanz ist.

1.8.2 Hydrophobizität

Innerhalb der Gruppe der Lokalanästhetika, die in der Zwischenkette eine Amidbindung haben, besteht zwischen Lipophilie und Potenz für den tonischen Block eine positive Korrelation (Courtney, 1980). Courtney konnte sich zur Erklärung dieses Phänomens zwei mögliche Ursachen vorstellen. Entweder gelangt die neutrale lipidlösliche Substanz während des geschlossenen Zustands des Kanals auf einem lipophilen Weg zum Rezeptor, oder im geschlossenen Kanalzustand kommt es an der Bindungsstelle zu einer zusätzlichen hydrophoben Interaktion. Inzwischen ist mehr über die Interaktion zwischen Lokalanästhetikum und Kanal bekannt. Durch gezielte Mutationen einzelner Aminosäurereste fand man heraus, welche Aminosäurereste eine Rolle spielen. Ein Phenylalanin- und ein Tyrosinrest in D-IV S6 sind entscheidend an der Interaktion mit dem Lokalanästhetikum beteiligt (Ragsdale *et al.*, 1994). Während die Aromatizität des Phenylalanins die Affinität des Lokalanästhetikums für den offenen und inaktivierten Kanalzustand erhöht, ist die Hydrophobizität des Phenylalanins mit der Affinität des Lokalanästhetikums im ruhenden Kanalzustand assoziiert (Li *et al.*, 1999). Wahrscheinlich ändert sich mit dem Kanalzustand die Position und damit die Art der Interaktion des Phenylalanins mit dem Lokalanästhetikum. Das Phenylalanin könnte sowohl als Teil der Bindungsstelle mit dem Lokalanästhetikum eine hydrophob-hydrophobe Interaktion eingehen als auch Teil des hydrophoben Zugangswegs für das Lokalanästhetikum sein. Die Beziehung zwischen dem Tyrosinrest und dem Lokalanästhetikum ist weniger eindeutig. Wahrscheinlich ist Tyrosin indirekt an der Interaktion mit dem Lokalanästhetikum beteiligt.

Die Hydrophobizität eines Stoffes läßt sich durch den Partitionskoeffizienten P beschreiben:

$$P = (\text{Stoff in hydrophober Phase}) / (\text{neutraler Stoff in hydrophiler Phase})$$

Durch Logarithmieren erhält man den $\log P$, der also dekadisch die relative Verteilung einer Substanz zwischen einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase beschreibt.

1.8.3 Molekülmasse

Die Zunahme des Molekulargewichts innerhalb einer homologen Serie von Substanzen, in der Kohlenstoffatome entweder an den aromatischen Ring oder an das tertiäre Amin angehängt werden, korreliert mit der Potenz der Substanz, den Natriumkanal zu blockieren (Covino & Vasallo, 1978). Aber die Beziehung ist nicht eindeutig, da sich mit dem Anhängen von Kohlenstoffatomen weitere Eigenschaften des Moleküls ändern. Auch Hydrophobizität, pK_A und strukturelle Merkmale ändern sich. Dementsprechend widersprüchlich sind die Ergebnisse späterer Untersuchungen. Courtney fand zwischen der Geschwindigkeit, mit der ein Molekül vom Rezeptor dissoziiert, und dem Molekulargewicht des Moleküls eine positive Korrelation (Courtney, 1980). Die Korrelation war zwar signifikant, aber mit großen Abweichungen. Bokesch konnte in ihren Untersuchungen keine Korrelation zwischen Potenz und Molekulargewicht der Substanzen finden (Bokesch *et al.*, 1986). Besonders am Molekulargewicht wird die Problematik des Umgangs mit physikochemischen Parametern deutlich. Nie kann man einen physikochemischen Parameter einer Substanz einzeln verändern. Immer werden damit auch andere Parameter verändert. Mit der Bestimmung des physikochemischer Parameter einer Substanz wird über die Substanz eine quantitative Aussage getroffen. Die Lokalanästhetika-Rezeptor-Interaktion ist eine spezifische Interaktion. Für die spezifische Interaktion müssen spezifische Determinanten vorhanden sein:

1.9 Strukturmerkmale Natriumkanal-blockierender Pharmaka

Wie bereits erwähnt, bestehen kleinmolekulare Natriumkanalblocker aus einer hydrophilen tertiären Aminogruppe, die durch eine Zwischenkette mit einem lipophilen aromatischen Ring verbunden ist. Ergebnisse von Struktur-Aktivitätsstudien lassen darauf schließen, dass sowohl das tertiäre Amin, als auch der aromatische Teil des Lokalanästhetikums an der Interaktion mit dem Natriumkanal beteiligt sind (Courtney, 1980, Sheldon *et al.*, 1991).

1.9.1 aromatischer Ring:

Er könnte mit dem aromatischen Ring des Phenylalanins in eine hydrophobe Interaktion treten (Ragsdale *et al.*, 1994).

1.9.2 terminales Amin:

Hille postulierte, dass die geladene Form des Lokalanästhetikums die stabilere Bindung mit der Rezeptorstelle einzugehen vermag (Hille, 1977b). Durch Protonierung wird das terminale Amin des Lokalanästhetikums zum positiv geladenen Ammoniumion. Die geladene Form des Lokalanästhetikums blockiert den Kanal bevorzugt im Offenzustand. Wird das Phenylalanin an der Position 1710 in D-IV S6 des Rattenhirn-IIa Natrium-Kanal Subtyps durch eine nicht-aromatische Aminosäure ersetzt, ist die Affinität des Lokalanästhetikums für den mutierten Kanal im offenen und inaktivierten Zustand stark reduziert. Eine Kation- π -Interaktion zwischen dem Ammoniumion und dem aromatischen Ring würde die Beobachtungen am einfachsten erklären (Li *et al.*, 1999). Bei der Kation- π -Interaktion handelt es sich um sehr starke Anziehungskräfte zwischen der π -Elektronenwolke eines aromatischen Ringsystems und einem Kation. Ist der Aromat Teil der Seitenkette eines Proteins, kann das Protein seine Struktur derart ändern, dass das Kation in eine hydrophobe Umgebung gezogen wird, so dass der Aromat nicht mehr mit der Lösungsenergie von Ionen und polaren Gruppen kompetitieren muß (Dougherty 1996). Nau vermutet weitere Interaktionspartner für die quarternäre Ammoniumgruppe an anderer Stelle (Nau *et al.*, 1999). Wird der Asparaginrest an der Position 403 in D-I S6 des $\mu 1$ -Natriumkanals durch Mutation gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht, hat das Lokalanästhetikum zum mutierten Kanal eine andere Affinität. Aminosäurereste mit negativer Ladung und aromatische Ringe erhöhen die Affinität des Lokalanästhetikums für den mutierten Kanal. Positiv geladene Reste erniedrigen die Affinität. Die einfachste Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass das positiv geladene Ammoniumion des Lokalanästhetikums der entsprechende Bindungspartner zum Asparagin ist.

1.9.3 Amid-, Ester-, Etherbindung:

Amid-gebundene Lokalanästhetika sind um so potenter, je hydrophober sie sind. Zyklische Amide sind bei gleicher Löslichkeit weniger potent als lineare Amide. Nicht-amid-Verbindungen, wie Ether (z. B. Mexiletine) oder Ester (z.B. Procain) sind potenter als lineare Amide mit gleicher Hydrophobizität. Es könnte sein, dass die Amidbindung im Gegensatz zur Ester- oder Etherbindung die Anästhetika-Rezeptor-Interaktion behindert. Amid-gebundene Lokalanästhetika sind dann am potentesten, wenn die Zwischenkette zusätzlich zur Amidbindung noch aus 2 Kohlenstoffatomen besteht (Sheldon *et al.*, 1991). Dieser Befund spricht dafür, dass der aromatische Ring und das terminale Amin zur gleichen Zeit mit 2

Punkten im Kanal interagieren. Die beiden Punkte sind wahrscheinlich die Länge einer Zwischenkette voneinander entfernt.

Über die Interaktion von Lokalanästhetika mit Natriumkanälen existieren viele einzelne Untersuchungen an unterschiedliche Natriumkanalsubtypen. Nicht alle Ergebnisse von Untersuchungen an einem Natriumkanalsubtyp lassen sich auf die Allgemeinheit aller Natriumkanalsubtypen übertragen. Zwischen den Wirkungen von Lokalanästhetika an einzelnen Natriumkanalsubtypen gibt es feine Unterschiede. So ist z. B. Mexiletin doppelt so affin zum h-Natriumkanal des Rattenherzens, wie zum Rattenhirn IIA-Kanal. Die Affinität zum inaktivierten Zustand des h-Kanals ist 35-mal höher wie zum Ruhezustand, zum inaktivierten Zustand des Rattenhirn IIA-Kanals ist Mexiletin nur 26-mal affiner wie zum ruhenden Zustand. Mutationen von F1762 des h-Kanals veränderten die Dissoziationskonstante von Mexiletin. Mutationen des korrespondierenden F1764 des IIA-Kanals veränderten die Assoziationskonstante von Mexiletin (Weiser *et al.*, 1999).

Die Existenz der Unterschiede zwischen der Wirkung der Lokalanästhetika auf die einzelnen Kanalsubtypen ist Voraussetzung für die Entwicklung spezifischer Blocker einzelner Natriumkanalsubtypen.

1.10 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Bestimmung physikochemischer und struktureller Determinanten von Substanzen für die Blockade TTX-resistenter Natriumkanäle. Dazu werden physikochemische Parameter, chemische Strukturen und Blockierungspotenz unterschiedlicher Substanzen miteinander verglichen. Anschließend werden die Ergebnisse mit den bisherigen Kenntnissen über Blocker TTX-sensitiver Kanäle verglichen.

2 Methoden

2.1. Die Präparation

Die Spinalganglien stammten von 6-8 Wochen alten männlichen und weiblichen Wistarratten, deren Gewicht zwischen 200 bis 350 g lag. Die Tiere wurden zunächst durch Komotion betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Dann wurde die Wirbelsäule von ventral freigelegt, Fell und Haut wurden geteilt und Thorax- und Beckeneingeweide entfernt. Der Rückenmarkskanal wurde mit einer Schere links und rechts eröffnet. Die Wirbelsäule wurde in eine ventrale und dorsale Hälfte geteilt. Auf diese Weise wurde ein Zugang zu den Hinterwurzeln geschaffen. Ein Zug an den Hinterwurzeln legte die Spinalganglien frei. Die Spinalganglien wurden vom Spinalnerven und der Hinterwurzel abgetrennt und in einem Gefäß mit Tyrodelösung (siehe Kap. 2. 3.: Lösungen und Lösungswechsel) gesammelt. Im Schnitt ließen sich pro Ratte 20-30 Spinalganglien gewinnen. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Ganglien unter dem Mikroskop von sichtbarem Bindegewebe und restlichen Nerventeilen befreit. Die sauberen Ganglien wurden dann in einer Calcium- und Magnesium-freien Tyrodelösung mit 3 mg/ml Kollagenase (Worthington Typ CLS-II, 280 U/ l, Biochrom Berlin) und 1 mg/ml Trypsin Typ-III-S (Sigma-Deisenhofen) für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Während dieser Zeit konnten die Enzyme die restlichen, nicht sichtbaren Kollagenstrukturen aufdauen. Das Töten der Ratten und die Organentnahme wurden dem zuständigen Regierungspräsidium gemeldet. Nach der 30minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen 3mal gespült und dann im Nährmedium (Kapitel 2. 3) mit Trypsin-Inhibitor II-S (100 g/l, Sigma) zur Inaktivierung der Enzyme und Desoxyribonuclease II (80 g/l, Fluka, Buchs, Schweiz) inkubiert. Danach ließ sich der Ganglienzellhaufen leicht in eine Zellsuspension umwandeln, indem er nacheinander durch 3 Glaspipetten mit kleiner werdendem Durchmesser durchgetrieben wurde. Nachdem sich die einzelnen Zellen auf dem Boden abgesetzt hatten, wurde der Überstand abpipettiert, die Zellen mit Tyrodelösung suspendiert und dann auf mit Nährmedium gefüllte Petrischalen (35 mm) verteilt. Die Zellen ließen sich unter Carbogenbegasung (95% O₂, 5% CO₂) bei 24°C bis zu 72 h aufbewahren.

2.2. "Patch-Clamp"-Technik

Alle Experimente wurden mit der Patch-Clamp-Methode durchgeführt. Mit dieser Methode lassen sich elektrische Eigenschaften von einzelnen Zellen oder bestimmten Zellarealen bestimmen. Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelten diese Technik ausgehend von der Spannungsklemme (Voltage- Clamp). Prinzip aller Voltage- Clamp- Verfahren ist, das Membranpotential der untersuchten Zelle konstant zu halten. Dies wird durch Erzeugung eines Kompensationsstroms erreicht. Dieser ist so groß wie der durch die Membran fließende Strom, ist diesem aber entgegengerichtet.

Die Patch- Clamp- Methode ist im Vergleich zu herkömmlichen Voltage- Clamp- Verfahren eine besonders rauscharme Methode. Die Verminderung des Rauschens wird durch 2 Dinge erreicht. Zum einen ist bei der Patch- Clamp- Technik die Möglichkeit gegeben, neben der Ganzzelleableitung die Ströme eines kleinen Abschnitts (patch) der Zelle isoliert darzustellen. Zum anderen wird das Hintergrundrauschen durch eine sehr dichte Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran, dem Gigaseal minimiert.

Der hohe Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zelle wird durch folgende Schritte erreicht: Eine feine Glaspipette, deren Spitze einen Durchmesser von ungefähr einem μm hat, wird unter Sicht durch ein invertiertes Mikroskop an die Membran einer Zelle herangeführt. Wenn die Pipette die Zelle berührt, wird die Zelle durch Anlegen eines leichten Unterdrucks in der Pipette an die Pipettenöffnung angesaugt. Durch den Sog kann sich der extrem hohe Abdichtwiderstand ausbilden.

Voraussetzungen für die Bildung eines Gigaseals sind:

1. eine glatte Oberfläche der Zelle
2. saubere Pipettenspitzen
3. klare, von Schmutzpartikeln freie Lösungen

Nach dem Aufsetzen der Pipette lassen sich durch gezielte Manipulationen die Messkonfigurationen variieren. Die Ausgangssituation nach Etablieren eines Gigaseals bezeichnet man als Cell-Attached Konfiguration. In dieser Konfiguration werden die Ionenkanäle erfasst, die sich im Zellmembranareal unterhalb der Pipettenöffnung befinden.

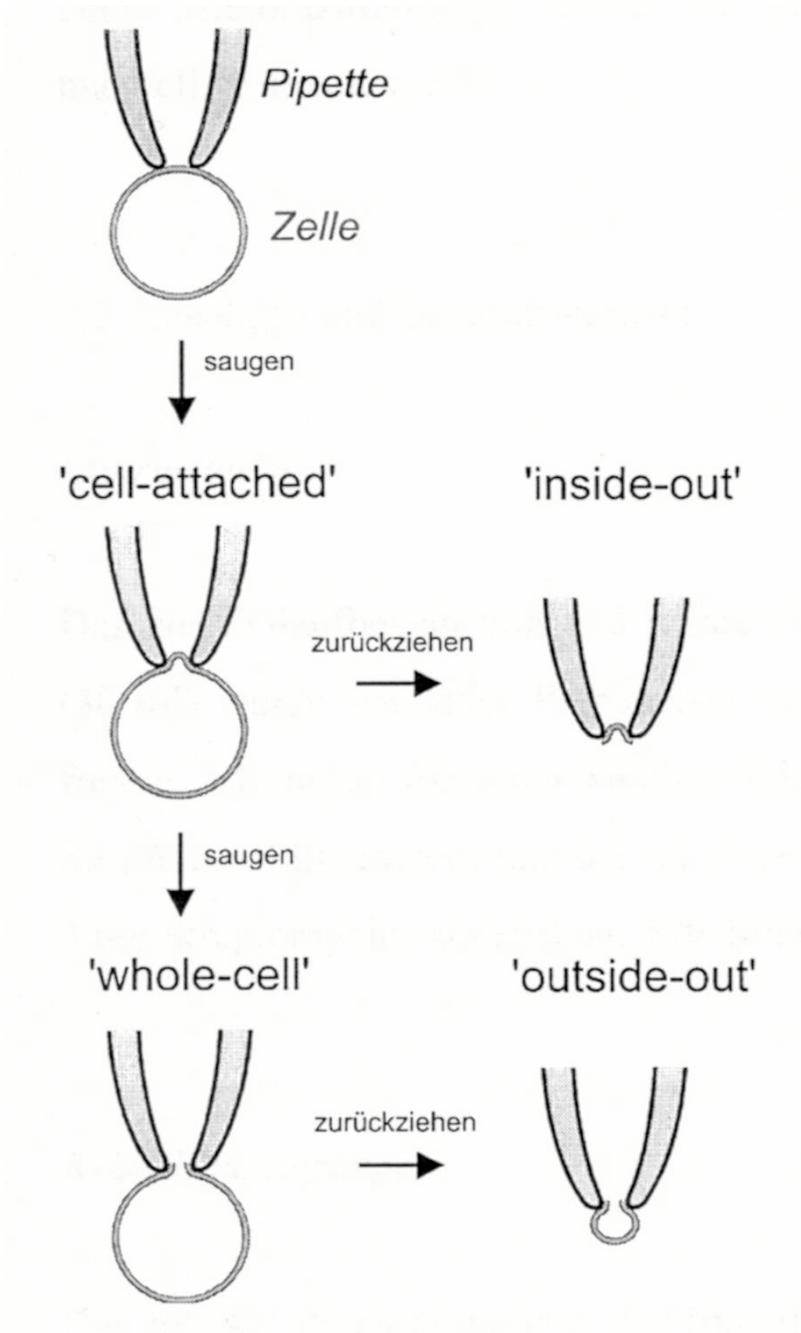


Abbildung 3: Patch-Konfigurationen

Bei diesen Experimenten wurde ausschließlich die Whole-Cell-Konfiguration verwendet. Mit der Ausbildung des Gigaseals zwischen Pipette und Zellmembran befindet sich das Präparat in der Cell-Attached-Konfiguration. Als nächsten Schritt stellt man den Verstärker auf den Voltage-Clamp-Modus und gibt eine Sollspannung von -90 mV vor. Im Pipetteninneren herrscht jetzt ein Potential, das ungefähr dem Ruhemembranpotential der Zelle entspricht. Dieser Schritt ist die notwendige Vorbereitung zum anschließenden Durchbruch. Im Pipetteninneren wird ein leichter Unterdruck erzeugt. Die Zellmembran unter der Pipette reißt ein. Durch die vorgegebene Sollspannung ist die Potentialdifferenz zwischen Zellinnerem und der Pipette minimal. Wenn das Seal erhalten bleibt, misst man jetzt den Strom, der durch die gesamte Membranoberfläche fließt. Da bei jeder Spannungsänderung zuerst die gesamte Fläche der Zellmembran umgeladen werden muss, sind jetzt im Gegensatz zur Cell-Attached-Konfiguration größere kapazitive Ladungsströme sichtbar. Das Cytoplasma ist nach ca. 50 sec durch Pipettenlösung ersetzt. Dieser Vorgang garantiert eine klare Definition und Kontrolle der Zusammensetzung des Zellinneren. Nachteil ist jedoch, dass durch das Auswaschen intrazelluläre Substanzen (z.B. ATP, IP₃) verloren gehen, die für die normale Funktion der Ionenkanäle von Bedeutung sein könnten.

2.2.1 Das Funktionsprinzip des Patch-Clamp- Verstärkers:

Wie bereits erwähnt, wurde die Patch-clamp-Technik ausgehend von voltage-clamp-Verfahren entwickelt. Bei den Voltage-Clamp-Verfahren wird das Membranpotential auf einen bestimmten Wert U_{soll} geklemmt. Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das gemessene Membranpotential mit der Sollspannung verglichen wird, wird ein Kompensationsstrom, der dem durch die Membran fließenden Strom mit entgegengesetzter Polarität entspricht, in die Zelle injiziert. Für die Kontrolle und die Regulation des Membranpotentials ist ein Operationsverstärker verantwortlich. Er besitzt einen hohen Eingangswiderstand, um beim Messen der anliegenden Spannungen den „eigenen“ Stromfluß zu minimieren. Am einen Eingang liegt die vom PC vorgegebene Sollspannung U_{soll} . Diese ist zuvor durch einen Digital- Analog- Wandler (DA- Wandler) von einer digitalen 12-bit-Zahl in ein analoges Spannungssignal umgewandelt worden. Am anderen Eingang liegt die gemessene Pipettenspannung U_{pip} . Bei einer Spannungsdifferenz $U_{\text{pip}} - U_{\text{soll}}$ entsteht am Ausgang des Operationsverstärkers eine um ein Vielfaches verstärkte proportionale Spannung (Steuerspannung) U_{st} . Durch den Rückkopplungswiderstand R_f ist diese Spannung proportional dem Strom, der in die Pipette fließt. Die Ausgangsspannung U_{aus} kann als Meßgröße für den geflossenen Membranstrom verwendet werden. Mit einem Tiefpassfilter

wird hochfrequentes Rauschen entfernt. Nach Digitalisierung mit einem 12-bit Analog-Digital-Wandler (AD-Wandler) wird das Signal als digitale Größe auf der Festplatte desselben PCs abgespeichert.

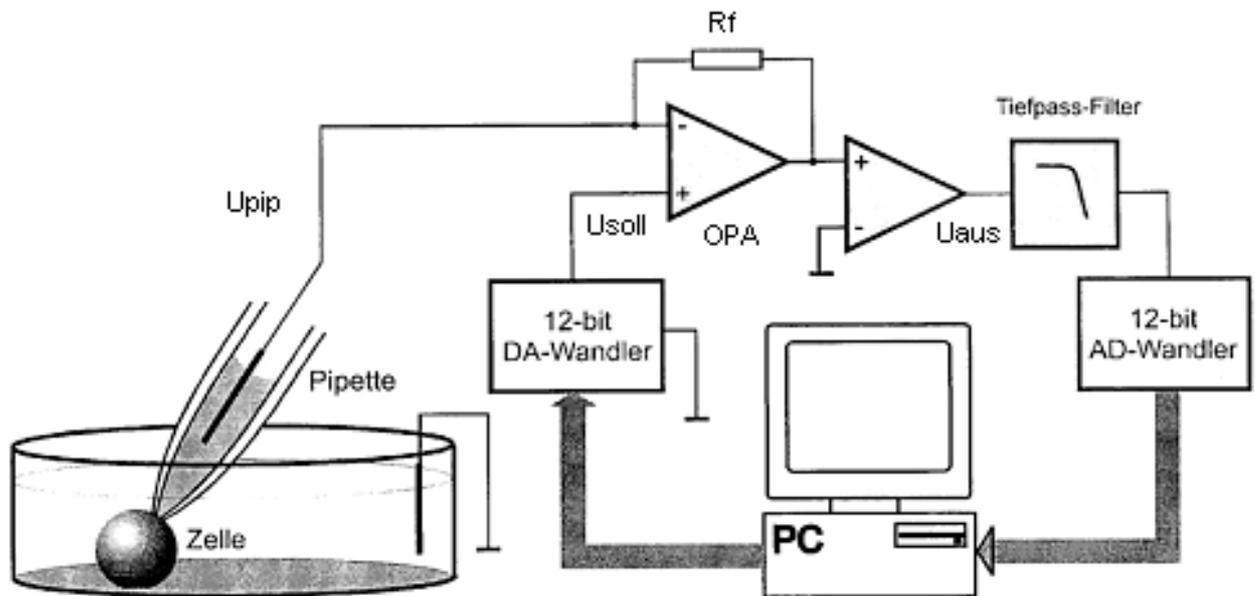


Abbildung 4: Voltage-Clamp- Schaltkreis

Als Patch-Clamp-Verstärker wurde der Axo-Patch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) benutzt.

2.2.2 Elektrische Eigenschaften der whole-cell-Ableitung:

Leider kommt es bei der Messung des Membranpotentials und dem Vergleich mit der Sollspannung zu Verzerrungen. Diese werden folgendermaßen verursacht:

Die Zellmembran kann elektrisch durch ihren Widerstand R_M und der dazu parallel geschalteten Kapazität C_S dargestellt werden. Die Pipette ist im Whole-Cell- Modus mit dem Zellinneren leitend verbunden, wobei zwischen Silberdraht und Zellsoma ein Widerstand

liegt, der Serienwiderstand R_s . Dieser entspricht dem Pipettewiderstand R_{pip} und dem Widerstand, der durch Membranbestandteile entsteht, die beim Durchbruch der Zelle in den Mündungsbereich der Pipette gelangen.

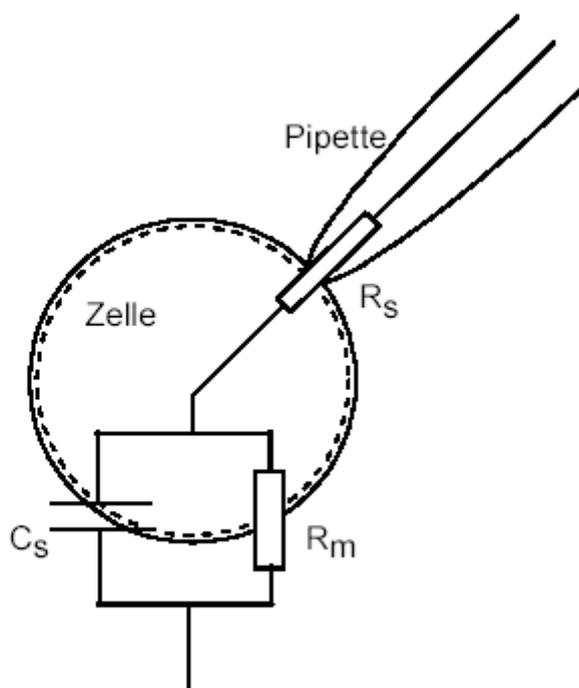


Abbildung 5: elektrische Eigenschaften der Whole-Cell-Ableitung

Bei jeder Spannungsänderung muss die Kapazität C_s umgeladen werden. Die benötigte Ladungsmenge hängt von der Größe der Zelle ab. Die Geschwindigkeit ist durch das Nadelöhr der Pipette, den Seriewiderstand R_s begrenzt. Kapazitive Ströme wurden durch die Kapazitätskompensationsfunktion des Verstärkers kompensiert. Dabei wird ein transienter Strom am Operationsverstärker vorbei direkt in die Pipette gespeist. Kapazitive Ströme erscheinen auf diese Weise nicht mehr als Signal im Strom-Spannungs-Wandler. Zur Minimierung der Serienwiderstände wurden sehr große Pipetten verwendet. Weiterhin wurde die Serienwiderstandskompensation des Verstärkers benutzt, um 80-90% des Serienwiderstands zu kompensieren.

2.3. Pipetten:

Für die Herstellung der Pipetten wurden Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einer Wandstärke von 0,32 mm (CEE BEE 101-PS, Chr. Bardram, Svendborg, Dänemark) verwendet. Die Pipetten wurden kurz vor dem Experiment mit einem horizontale Pipettenziehgerät (Brown-Flaming Micropipette Puller Model P-97, Sutter Instrument Company, USA) gezogen. Dann wurden die Ränder der Spitze mit Hilfe einer Mikroforge rundgeschmolzen. Eine Mikroforge ist ein Mikroskop mit Pipettenhalter und Mikromanipulator. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Pipettenspitze an ein Filament aus Platin herangeführt. Dieses Filament wurde vorher durch einen regelbaren Transformator zum Glühen gebracht. Durch die Hitze schmolzen die Ränder der Pipettenspitze rund. Mit Hilfe einer Stahlkanüle wurden die Pipetten dann von hinten mit Pipettenlösung gefüllt. Nach Eintauchen in die Badlösung wiesen die Pipetten in der Regel einen Widerstand zwischen 0.7 und 1.8 Megaohm auf. Die Annäherung der Pipettenspitze an die Zellen wurde unter Sicht durch ein invertiertes Mikroskop (Modell IM, Zeiss, Oberkochen) bei 400facher Vergrößerung durchgeführt. Die Pipette wurde über einen Mikromanipulator HS 6/2 (Fa. Maerzhäuser, Wetzlar) mittels eines Joystick manuell gesteuert.

2.4. Lösungen und Lösungswechsel

2.4.1 Nährmedium:

Das Nährmedium für Zellaufbewahrung und Präparation wurde vor jeder Präparation frisch hergestellt. Die Basis bildeten 13 ml einer glutaminfreien "Minimum Essential Medium Eagle". Dazu wurden 0.3 ml einer 200 mmol/l L-Glutamin-Lösung, 1.5 ml fötales Kälberserum und 0.15 ml einer Penicillin-Streptomycin Lösung (1500 IE Penicillin; 1.5 mg Streptomycin) zugegeben. Alle Substanzen wurden von Sigma, Deisenhofen bezogen.

2.4.2 Kristalline Lösungen:

Alle Lösungen, die für die Experimente und die Präparation benötigt wurden, wurden selbst hergestellt, indem die entsprechenden Mengen an Salzen und Chemikalien zu aqua bidestillata zugefügt wurden. Die Lösungen wurden alle 2 Wochen erneuert. Der pH-Wert

wurde täglich vor den Experimenten kontrolliert. Um die TTX-resistenten Natriumströme isoliert darstellen zu können, wurden die extra- und intrazellulären Lösungen gegenüber natürlichen Verhältnissen stark modifiziert. Die Ionenkonzentrationen sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 1: Ionenzusammensetzung der verwendeten Extrazellulärlösungen in mmol/l

Ion	Tyrode	Tyrode Ca-,Mg-frei	35-Tyrode	35-Tyrode-TTX
Natrium	145	145	35	35
Cholin			110	110
Kalium	5	5	5	5
Calcium	1		1	1
Magnesium	1		1	1
Chlorid	154	150	164	164
Glucose	6	6	6	6
HEPES	10	10	10	10
TEA			10	10
TTX				0,0001

Mit Hilfe von TRIS (Trishydroxymethylaminomethan) wurde der pH-Wert in allen Lösungen auf 7,4 eingestellt. Hepes: 4-2-Hydroxyethyl-1-Piperazin-ethansulfonsäure. TEA: Tetraethylammonium, TTX: Tetrodotoxin.

In der Konzentration von 100 nmol/l blockiert TTX selektiv die TTX-sensitiven Natriumströme. Die spannungsabhängigen Kaliumströme wurden durch den Zusatz von 10 mmol/l TEA blockiert. Durch die Senkung der Na-Konzentration bis auf 35 mmol/l wurden die Natriumströme vermindert und dadurch die Voltage-Clamp-Bedingungen verbessert. Die Osmolarität wurde durch die Zugabe von Cholinchlorid ausgeglichen. Um eine ausreichende Stabilität des Gigaseals zu erreichen, wurde die Ca^{2+} -Konzentration nicht unter 1 mmol/l gesenkt.

Tabelle 2: Intrazellulärlösung

Substanz	Konzentration (mmol/l)
Cäsiumfluorid	140
NaCl	10
EGTA	3
HEPES	10

EGTA: Ethylenglycol-Bis-beta-Aminoethyl-Ether-N, N, N', N'-Tetraacetat. Der pH der Lösung wurde mit TRIS auf 7,2 eingestellt.

Die Cäsium-Ionen hatten die Aufgabe, die Kaliumströme zu blockieren. Die Fluorid-Ionen dienten der Blockade der Calciumströme. Durch den Zusatz von EGTA wurde die effektive intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf nominell null gesenkt.

2.5 Elektroden

Als Elektroden werden die metallischen Leiter bezeichnet, die den Vorverstärker mit der Pipettenlösung und den Erdleiter mit der Badlösung verbinden. Um Offsetpotentiale zu vermeiden oder konstant zu halten, wurden Silberdrähte benutzt, die am Morgen des Experimentiertags chloriert wurden. Ein mit Sandpapier geschliffener Silberdraht wurde mit der Anode einer Batterie verbunden und in eine Chloridlösung hineingetaucht. Ein mit der Kathode verbundener Draht wurde in dieselbe Lösung hineingetaucht. Durch den Elektronenzug bildete sich an der Anode Silberchlorid. Die Badelektrode wurde in ein separates Bad eingetaucht und über eine Agarbrücke mit dem eigentlichen Versuchsbad verbunden.

2.6. Superfusionsystem

Um die Wirkung der Chemikalien auf den Natriumstrom zu untersuchen, wurde ein Superfusionsystem benutzt, das aus 6 nebeneinanderliegenden gebogenen Glasröhren mit 1 mm Durchmesser bestand. Diese Glasröhren waren über Schlauchverbindungen mit einem Plexiglasblock verbunden. Diese Bohrungen dienten als Halter für sechs 5-ml Spritzen. In den Spritzen befanden sich die Chemikalien in unterschiedlichen Konzentrationen. Die

Spritzen wurden über ein hydraulisches System langsam entleert. Der Fluß lag bei ca. 20 ml/min. Ein Haftmagnet am Boden des Plexiglasblocks sicherte den festen Stand auf dem Objektisch des Mikroskops. Die Ganglienzellen wurden zunächst in Whole-Cell-Konfiguration gebracht, dann wurden sie vorsichtig, mit Hilfe der Pipette, an der sie hafteten, vom Boden der Petrischale angehoben. Sealwiderstand und Stromstärke wurden durch das Anheben nicht beeinflußt. Die Zellen wurden nacheinander in die unterschiedlichen Röhren hineingeschoben und damit den unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt. In den Röhren war der vollständige Lösungswechsel innerhalb einer Sekunde abgeschlossen.

2.7. Pharmaka

Die Substanzen wurden von verschiedenen Chemieunternehmen und Pharmakonzernen bezogen. Nachstehend eine Tabelle der verwendeten Pharmaka und ihre Herkunft:

Tabelle 3: Herkunft der Pharmaka

2- Phenylethylamin	Sigma, Deisenhofen
Alpha-Naphtylamin	Sigma, Deisenhofen
Anilin	Sigma, Deisenhofen
Benzylamin Hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Benzylethylamin	Merck-Schuchard, D-85662 Hohenbrunn
Diphenhydramine-Hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Lidocain	Sigma, Deisenhofen
MEGX (Monoethyl-Glycinoxylidid)	Fa. ASTRA Pain Control, Södertälje, Schweden
Mexiletin	Sigma, Deisenhofen
N- Phenylethylendiamin	Merck- Schuchard, D-85662 Hohenbrunn
N-Methylbenzylamin	Merck-Schuchard, D-85662 Hohenbrunn
N-N-Dimethylbenzylamin	Sigma, Deisenhofen
Phenylbutylamin	Sigma, Deisenhofen
Phenylharnstoff	Fluka- Chemie-AG, CH-9471 Buchs
Phenylpiperazin	Merck-Schuchard, D-85662 Hohenbrunn
Phenylpropylamin	Fluka-Chemie-AG, CH-9471 Buchs

Von den Substanzen wurden je nach Löslichkeitsverhalten Stammlösungen in Konzentrationen von 10-100 mmol/l in *aqua bidestillata* hergestellt. Vor jedem Experiment wurden die Lösungen durch einen Spritzenfilter, Porengröße 0,2 µm (Renner, Darmstadt) getrieben, um die Sauberkeit zu erhöhen und damit den Sealprozeß zu erleichtern.

2.8. Datenverarbeitung und Statistik

Die Meßdaten wurden mit einem handelsüblichen IBM-kompatiblen Computer erfasst und ausgewertet. Um die Ströme vom Computer erfassen zu können, wurden sie während des Experiments mit Hilfe eines 12bit Analog-Digital-Wandlers (TM-40 AD/ DA board, Scientific Solutions, Solon, OH, USA) online digitalisiert. Die Anzahl der digitalisierten Datenpunkte in der Sekunde betrug mindestens das Doppelte der Filtereckfrequenz. Damit wurde dem Nyquist-Kriterium entsprochen (ein Signal, das sich mit einer bestimmten Geschwindigkeit ändert, muß mit einer ausreichend höheren Frequenz digitalisiert werden, damit keine Information verloren geht, und der Charakter des Signals verändert wird. Nach Nyquist muß die Frequenz mehr als doppelt so hoch wie die höchste im Signal vorkommende Frequenz sein). Um die Natriumströme auszulösen, wurden mit dem PC und einem 12bit Digital-Analog-Wandler Spannungsimpulse auf die Zelle gegeben. Für das Reizen der Zellen, die Akquisition der Meßdaten und das Vermessen der Natriumströme wurden Programme aus dem pClamp 6.0 Softwarepaket (Axon Instruments) benutzt. Die Abbildungen und die nichtlineare Anpassung der Datenpunkte wurden mit dem Programm Fig P 5.0 (Biosoft, Cambridge, UK) angefertigt.

2.9. Charakterisierung der Zellen

Spinalganglienzellen können anhand der elektrophysiologischen Eigenschaften in zwei Typen unterteilt werden. Große DRG-Zellen ($d > 50 \mu\text{m}$) weisen TTX-sensitive Ströme mit schneller Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik auf. Kleine und mittelgroße Spinalganglienzellen ($d < 50 \mu\text{m}$) verfügen sowohl über schnelle TTX-sensitive als auch über langsame TTX-resistente Ströme. In dieser Arbeit wurden TTX-resistente Natriumströme kleiner und mittelgroßer Neurone untersucht. Durch die Blockade der TTX-sensitiven Kanäle mit 100 nmol/l TTX konnten die TTX-resistenten Ströme der Zellen isoliert dargestellt werden. Den pharmakologischen Untersuchungen des Stromes ging die Ermittlung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle voraus. Nach Herstellung des whole-cell-

patches einer kleinen bis mittelgroßen Zelle wurde die Abhängigkeit des Stroms vom Membranpotential bestimmt.

Die Untersuchungen wurden alle bei einem Haltepotential von -90 mV im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst einem kurzen, hyperpolarisierenden Vorimpuls nach -110 mV ausgesetzt. Dieser hatte den Zweck, alle Kanäle in den ruhenden, aber aktivierbaren Zustand zu versetzen. Dann wurden die Stromantworten der Zellen durch 15 Potentialsprünge zwischen -80 bis +60mV in einem Abstand von jeweils 10 mV ausgelöst. Die durch die Testimpulse ausgelösten Natriumströme sind in folgender Abbildung dargestellt.

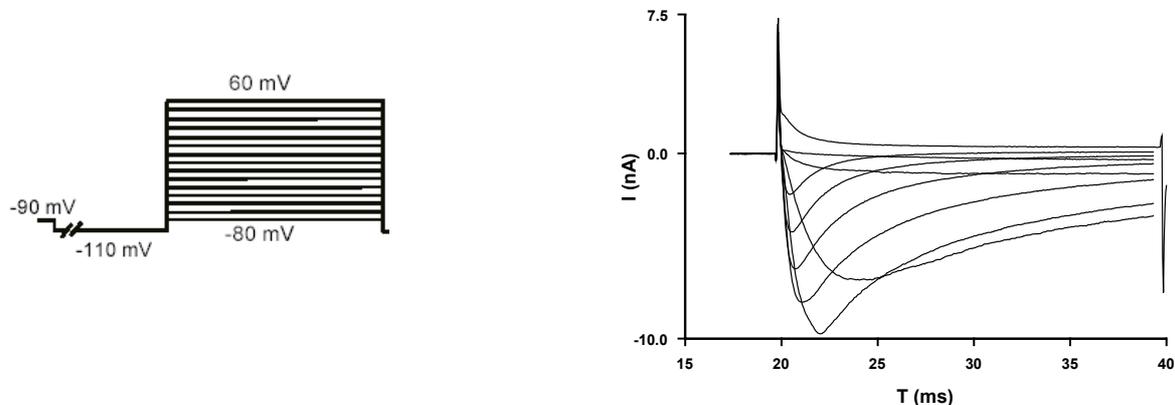


Abbildung 6: Natriumstrom-Originalregistrierung. Durch Testimpulse zu verschiedenen Potentialen wurden in Abhängigkeit vom Potential TTX-resistente Natriumströme ausgelöst.

Durch Auftragen des Spitzenwertes der Natriumströme (I_{Na}) gegen das Potential des Testimpulses (E) erhält man eine Strom-Spannungs-Kurve, aus der die Potentialabhängigkeit des Natriumstromes erkannt werden kann. Dabei wird der Natriumstrom (I_{Na}) in Abhängigkeit vom Potential (E) durch das Ohmsche Gesetz beschrieben.

$$I_{Na}(E) = G_{Na} \cdot (E - E_{Na}) \quad \text{Gleichung 1}$$

$I_{Na}(E)$ Funktion, die die Abhängigkeit des gemessenen Stromes (I_{Na}) vom Membranpotential (E) beschreibt
 E_{Na} Gleichgewichtspotential (mV)

E_{Na} stellt das Gleichgewichtspotential und G_{Na} die Natriumleitfähigkeit dar. Treibende Kraft für den Natriumstrom ist die Differenz zwischen dem aktuellen Membranpotential (E) und

dem Natrium-Gleichgewichtspotential (E_{Na}). Das Natrium-Gleichgewichtspotential lässt sich mit Hilfe der Nernstschen Gleichung bestimmen:

$$E_{Na} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[Na^+]_{ext}}{[Na^+]_{int}} \quad \text{Gleichung 2}$$

R: Gaskonstante ($8,314 \text{ V} \cdot \text{C} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 F: Faraday-Konstante ($9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 T: absolute Temperatur in Kelvin
 z: Wertigkeit des Ions (+1 für Natriumionen)

Bei den bei den Experimenten verwandten Natriumkonzentrationen ($[Na]_{ext} = 35 \text{ mmol/l}$, $[Na]_{int} = 10 \text{ mmol/l}$) und einer Temperatur von 22° Celsius (295 Kelvin) errechnet sich bei Verwendung der Nernstschen Gleichung ein Natrium-Gleichgewichtspotential von $E_{Na} = 31,9 \text{ mV}$.

G_{Na} ist ebenfalls von E abhängig und kann mit der Boltzmann Funktion beschrieben werden.

$$G_{Na}(E) = \frac{G_{Na, \max}}{1 + e^{\frac{E_{h,a} - E}{k_a}}} \quad \text{Gleichung 3}$$

$G_{Na, \max}$ =maximale Natriumleitfähigkeit (S)
 k_a =Steilheitsfaktor (mV)
 E =Membranpotential
 $E_{h,a}$ =halbmaximales Aktivierungspotential (mV)

Setzt man Gleichung 3 in Gleichung 1 ein, so erhält man Gleichung 4.

$$I_{Na}(E) = \frac{G_{Na, \max}}{1 + e^{\frac{E_{h,a} - E}{k_a}}} \cdot (E - E_{Na}) \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Parameter der Gleichung können durch nicht-lineare Kurvenanpassung an die Datenpunkte der Strom- Spannungskurve gewonnen werden.

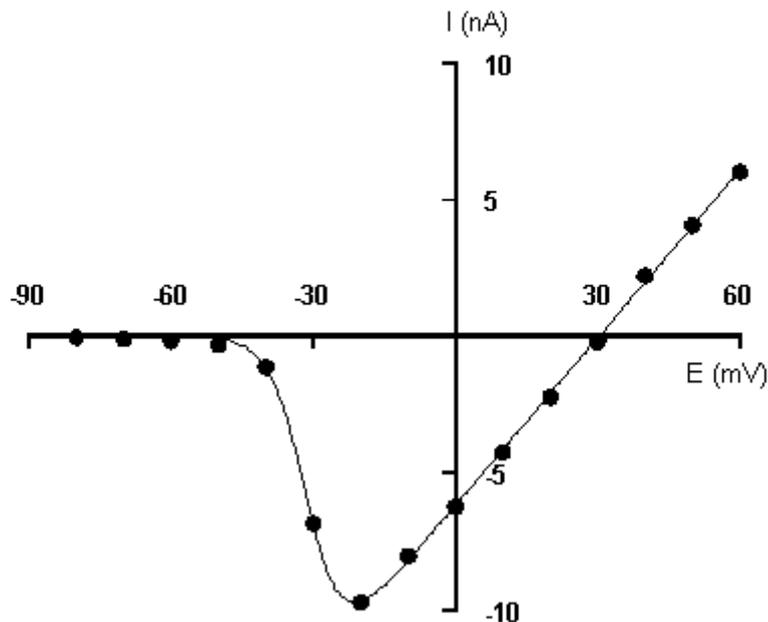


Abbildung 7: Strom-Spannungskurve des Natriumstroms

Durch Messung des Natriumspitzenstroms des jeweiligen Reizes und Auftragen gegen deren Testpotential (E) lässt sich die Strom-Spannungskurve des Natriumstromes darstellen. Die durchgezogene Linie repräsentiert die nicht-lineare Anpassung von Gleichung 4 an die Datenpunkte.

Das mittlere halbmaximale Aktivierungspotential $E_{h,a}$ betrug $-22,1 \pm 7,2$ mV ($n = 35$) und ist damit typisch für TTX-resistente Natriumkanäle. Das gemessene Umkehrpotential kommt mit $32,2 \pm 4,3$ mV ($n = 35$) dem theoretischen Umkehrpotential von 31,9 mV sehr nahe, was beweist, dass es sich bei den gemessenen Strömen um Natriumströme handelt.

Die Abhängigkeit der schnellen Inaktivierung vom Membranpotential wurde ebenfalls an jeder Zelle untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Membran zunächst durch verschiedene Potentialsprünge von -130 bis +10 mV in 10 mV Schritten und für jeweils 50 ms depolarisiert. Nach jedem Potentialsprung wurde dann der Natriumstrom durch einen 5 ms dauernden Testimpuls nach -10 mV ausgelöst und gemessen. Der Natrium-Spitzenstrom (I_{Na}) wurde gegen das Potential des Vorimpulses (E) aufgetragen. Die Kurve wurde mit Hilfe der Boltzmann-Funktion angepasst.

$$I_{Na}(E) = \frac{I_{Na, \max}}{1 + e^{\frac{E - E_{h,i}}{k_i}}} \quad \text{Gleichung 5}$$

I_{Na}	Natriumspitzenstrom (nA)
$E_{h,i}$	halbmaximales Inaktivierungspotential (mV)
k_i	Steilheitsfaktor (mV)

$E_{h,i}$ ist das halbmaximale Inaktivierungspotential, also das Potential, bei dem die Hälfte aller Kanäle in den Inaktivierungszustand übergegangen sind. k_i beschreibt die Stärke der Abhängigkeit der Inaktivierung vom Potential. Das halbmaximale Inaktivierungspotential $E_{h,i}$ betrug im Mittel $27,5 \pm 5,0$ mV ($n = 35$).

2.10. Untersuchung der Substanzen:

Ziel der durchgeführten Experimente war es, Substanzen auf ihre Blockierungseigenschaften an TTX-resistenten Natriumkanälen zu untersuchen. Messgröße war der TTX-resistente Natriumstrom der Nervenzellen.

Nachdem die Natriumströme einer Zelle elektrophysiologisch charakterisiert worden waren, wurde die Wirkung der einzelnen Testsubstanzen untersucht. Dazu wurde die Zelle mit der Patchpipette nacheinander in die Röhren des Superfusionssystems mit den jeweils unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz eingeführt. Bei einem vorgegebenen Haltepotential von -90 mV wurde in jeder Röhre 10mal im Abstand von $0,5$ s ein 50 ms dauernder hyperpolarisierender Vorimpuls nach -110 mV gefolgt von einem 50 ms dauernden depolarisierenden Testimpuls nach -10 mV appliziert und der damit ausgelöste Natriumstrom registriert. Durch dieses Reizprogrammes konnte sowohl der Block nach erstmaligen Öffnen (tonischer Block) als auch den Block nach wiederholtem Aktivieren des Kanals (phasischer Block) bestimmt werden. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung wurde anhand von 4 unterschiedlichen Konzentrationen pro Substanz bestimmt (z.B. $100, 300, 1.000, 3.000$ $\mu\text{mol/l}$ oder $300, 1.000, 3.000, 10.000$ $\mu\text{mol/l}$). Zwischen den einzelnen Konzentrationsschritten wurde eine Äquilibrierungszeit von mindestens einer Minute abgewartet. Jede Testreihe wurde an mindestens drei Zellen durchgeführt.

Die Abhängigkeit der Blockade von der Konzentration der einzelnen Substanzen wurde anhand von Konzentrations-Inhibitions-Kurven bestimmt. Aus der folgenden Gleichung ließ sich eine Konzentrations-Inhibitions-Kurve erstellen:

$$fB(c) = \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{c}\right)^p}$$

Gleichung 6

IC ₅₀	=halbmaximale Blockierungskonzentration
c	=Konzentration
p	=Hill-Koeffizient
fB	=fraktionelle Blockade

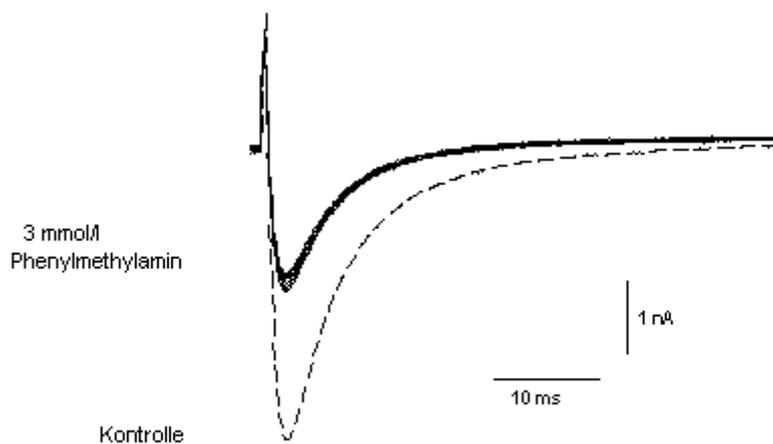
Das Ausmaß der in der jeweiligen Konzentration gemessenen Natriumstromverminderung wurde in bezug auf den Natriumspitzenstrom der Kontrolle als fraktionelle Blockade (fB) gesetzt und gegen die logarithmisch dargestellte Konzentration aufgetragen. Durch nichtlineare Anpassung der Gleichung 6 an die entsprechende Konzentrationswirkungskurve können die halbmaximalen Blockierungskonzentrationen (IC₅₀) der jeweiligen Substanzen bestimmt werden.

Der Exponent p entspricht dem Hill-Koeffizienten und gibt die Steilheit der Kurve an. Beträgt der Hill-Koeffizient 1, dann reicht ein Molekül aus, um den Kanal zu blockieren.

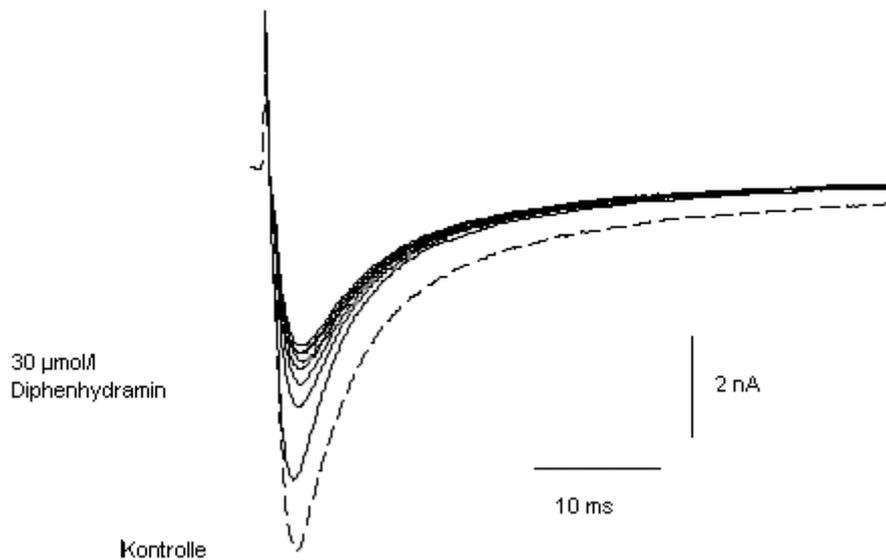
3 Ergebnisse

Wie bereits erwähnt, wurden die Zellen nach Charakterisierung der Natriumströme 4 unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen ausgesetzt. Mit einem speziellen Reizprogramm (s. Methoden) wurden die Natriumkanäle aktiviert. Meßgröße war der Natriumstrom der gesamten Zelle.

In den Abbildungen 8 und 9 sind als Beispiel die Natriumstromkurvenverläufe vor und nach Gabe der zwei Substanzen Phenylethylamin und Diphenhydramin dargestellt.



*Abbildung 8: Blockade des TTX-resistenten Natriumstroms durch Phenylmethylamin
Natriumstromkurvenverlauf vor und nach Zugabe von Phenylmethylamin, einer Substanz, die nur tonische Blockierungspotenz besitzt.*



*Abbildung 9: Blockade des TTX-resistenten Natriumstroms durch Diphenhydramin
Natriumstromkurvenverlauf vor und nach Zugabe von Diphenhydramin, die auch phasische
Blockierungspotenz besitzt.*

Zur Quantifizierung der Blockade wurde der Natriumspitzenstrom, ausgelöst durch den ersten Impuls (tonische Blockade) und des zehnten Impuls (phasische Blockade) in den einzelnen Konzentrationen, jeweils durch den Natriumstrom in Kontrolle dividiert, das Ergebnis von 1 subtrahiert und gegen die logarithmisch dargestellte Konzentration der Substanz aufgetragen. Durch Anpassung von Gleichung 6 an die Datenpunkte ließen sich halbmaximale Blockierungskonzentrationen für den tonischen und phasischen Block bestimmen.

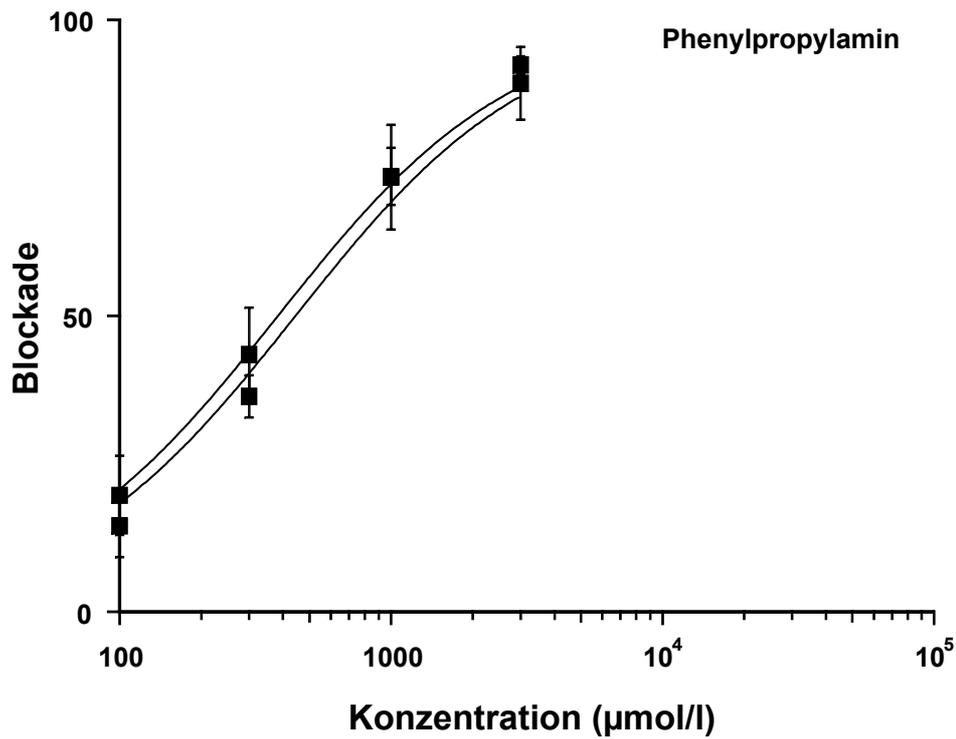


Abbildung 10: Konzentrations-Inhibitionskurven von Phenylpropylamin. Die linke Kurve entspricht der phasischen, die rechte der tonischen Blockade.

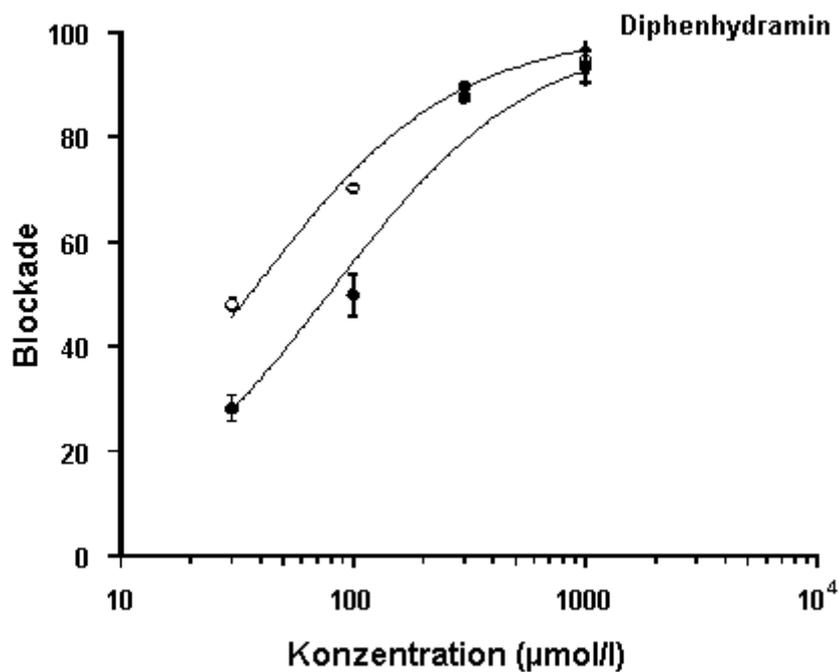
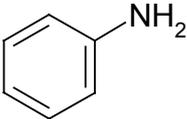
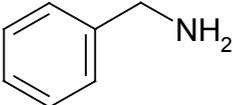
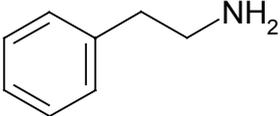
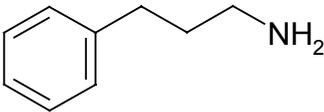
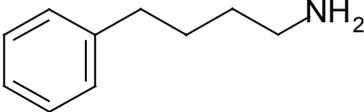


Abbildung 11: Konzentrations-Inhibitionskurven von Diphenhydramin. Die linke Kurve entspricht der phasischen, die rechte der tonischen Blockade.

Gezeigt sind in Abbildung 10 und 11 die Konzentrations-Inhibitionkurven von Diphenhydramin und Phenylpropylamin. Während es bei Phenylpropylamin einen nur geringen Unterschied in der Potenz der Substanz bei tonischer und phasischer Blockade gibt, zeigt Diphenylhydramin einen im Vergleich zum tonischen deutlich stärkeren phasischen Block. Um den Unterschied zwischen tonischem und phasischen Block zu quantifizieren und damit die Substanzen untereinander vergleichen zu können, wurde jeweils die halbmaximale Blockierungskonzentration des phasischen Blockes durch die halbmaximale Blockierungskonzentration des tonischen Blockes dividiert.

Alle Ergebnisse wurden in Tabellen zusammengefaßt. Da es in der Arbeit um die Beziehung zwischen der Blockierungspotenz, der Struktur und den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen ging, wurde jede Substanz in der Tabelle durch die Struktur, die Lipophilie, den pK-Wert und das Molekulargewicht charakterisiert. Die Tabellen sind in mehrere Untertabellen gegliedert. Zweck ist, strukturähnliche Substanzen im direkten Vergleich miteinander zu sehen.

Tabelle 4: Struktur, log P, pK, IC₅₀-Werte für tonischen und phasischen Block sowie Molekulargewicht von Substanzen, die sich durch die Anzahl der C-Atome der Zwischenkette unterscheiden.

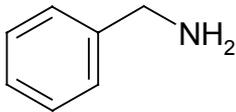
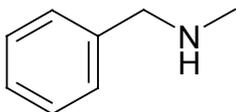
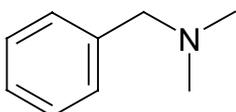
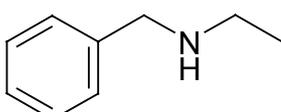
Substanz	Struktur	LogP	pKa	IC _{50,ton.} (μmol/l)	IC _{50,ph.} (μmol/l)	IC _{50ton.} /IC _{50ph.}	MolGew (g/mol)
Anilin		0,9	4,63	1520	1507	1,0	93
Phenylmethyl-amin		1,09	9,33	3713	2644	1,8	107
2-Phenylethyl-amin		1,41		1897	1040	1,8	121
3-Phenylpropyl-amin		1,83	10,32	445	383	1,2	135
4-Phenylbutyl-amin		2,4	10,42	278	159	1,7	149

In dieser Tabelle wurden Substanzen zusammengefaßt, denen ein aromatischer Ring und ein primäres Amin gemein sind, die jedoch in der Anzahl der Kohlenstoffatome der Zwischenkette variieren. Mit der Struktur verändern sich die physikochemischen Parameter. Lipophilie und Molekulargewicht nehmen mit der Anzahl der Kohlenstoffatome zu.

Auch die Basizität wächst mit der Länge der Kohlenstoffkette, da die Kohlenstoffkette einen mit der Länge der Kette zunehmenden elektronenschiebenden Effekt (+I-Effekt) auf das terminale Amin ausübt. Die Differenz der Basizität zwischen dem Anilin und dem Phenylmethylamin ist besonders groß. Ursache dafür ist der +M-Effekt. Beim Anilin kann

das π -Elektronensystem des aromatischen Rings das freie Elektronenpaar des Stickstoffs miteinbeziehen. Die Elektronegativität des Stickstoffs wird geringer und dadurch auch die Bereitschaft des Stickstoffs, ein positiv geladenes Wasserstoffion zu binden.

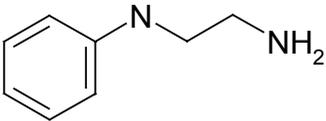
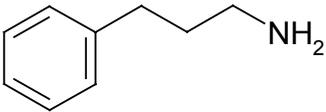
Tabelle 5: Struktur, log P, pK, IC_{50} -Werte und Molekulargewicht von Substanzen, die sich durch die Ketten am terminalen Amin unterscheiden.

Substanz	Struktur	LogP	pKa	$IC_{50,ton.}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$IC_{50,ph.}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$IC_{50ton.}/IC_{50ph.}$	MolGew (g/mol)
Phenylmethylamin		1,09	9,33	3713	2644	1,8	107
N-Methylbenzylamin		1,52	9,71	3112	2186	1,4	121
N,N-Dimethylbenzylamin		1,98	6,65	1867	1347	1,4	135
N-Ethylbenzylamin		1,82	9,83	1991	1334	1,5	135

Hier wurden primäre, sekundäre und tertiäre Amine miteinander verglichen. Log P und Molekulargewicht korrelieren auch hier mit der Anzahl der Kohlenstoffatome.

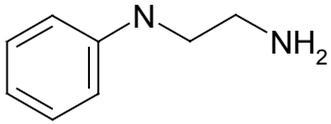
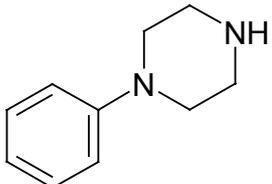
Durch den additiven Effekt von 2 elektronenschiebenden Kohlenstoffketten haben sekundäre Amine eine höhere Basizität als primäre Amine. Tertiäre Amine sind dagegen in wässriger Lösung weniger basisch: die 3 Alkylketten behindern sterisch die Interaktion zwischen Wasserstoffionen in Lösung und dem freien Elektronenpaar am Stickstoff.

Tabelle 6: Struktur, log P, pK, IC₅₀-Werte und Molekulargewicht zweier Substanzen, die sich durch ein Stickstoffatom in der Zwischenkette unterscheiden.

Substanz	Struktur	LogP	PKa	IC _{50,ton.} (μmol/l)	IC _{50,ph.} (μmol/l)	IC _{50ton.} /IC _{50ph.}	MolGew (g/mol)
N-Phenyl-ethylendiamin		0,64		773	355	2,2	136
3-Phenyl-propylamin		1,83	10,32	445	383	1,2	135

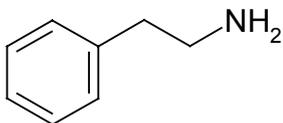
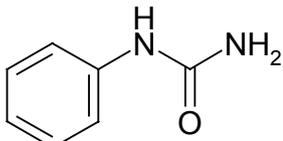
Einziger struktureller Unterschied zwischen beiden Stoffen besteht darin, dass das erste Kohlenstoffatom der Zwischenkette durch ein Stickstoffatom ausgetauscht ist. Durch den zusätzlichen Stickstoff nimmt die Lipophilie des Moleküls deutlich ab, denn jetzt besitzt das Molekül noch ein zweites Atom, das aufgrund seiner Elektronegativität und seines freien Elektronenpaars polare Beziehungen mit elektropositiveren Partnern eingeht (Wasserstoffbrücken, etc). Die Elektronegativität des terminalen Amins dagegen wird durch den zusätzlichen Stickstoff gemindert. Dieser hat einen elektronenziehenden Effekt, der dem elektronenschiebenden Effekt der Carbonylgruppe entgegenwirkt.

Tabelle 7: Struktur, log P, pK, IC₅₀-Werte und Molekulargewicht von zwei Substanzen, die sich durch die Bildung eines zweiten Ringes unterscheiden.

Substanz	Struktur	LogP	pKa	IC _{50,ton.} (μmol/l)	IC _{50,ph.} (μmol/l)	IC _{50ton.} /IC _{50ph.}	MolGew (g/mol)
N-Phenylethylen-diamin		0,64		773	355	2,2	136
Phenylpiperazin		1,10	8,56	1271	877	1,45	162

Wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Molekülen besteht darin, dass der Stickstoff beim Phenylpiperazin durch den Ring stärker in seiner Beweglichkeit eingeschränkt ist als der Stickstoff im Phenylethylen-diamin. Lipophilie und Basizität sind beim Phenylpiperazin durch die zusätzliche Kohlenstoffkette im Vergleich zum Phenylethylen-diamin höher.

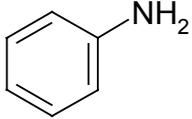
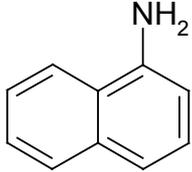
Tabelle 8: Struktur, log P, pK, IC 50-Werte und Molekulargewicht zweier Substanzen, die sich durch eine Amidbindung in der Zwischenkette unterscheiden.

Substanz	Struktur	LogP	pKa	IC _{50,ton.} (μmol/l)	IC _{50,ph.} (μmol/l)	IC _{50ton.} /IC _{50ph.}	MolGew (g/mol)
2-Phenylethyl-amin		1,41		1897	1040	1,8	121
Phenylharnstoff		0,83		>10000			136

Diese beiden Moleküle unterscheiden sich darin voneinander, dass in die Zwischenkette zwischen dem aromatischen Ring und dem Amin eine Amidbindung eingebaut ist. Die zusätzliche Amidbindung führt zu einer Abnahme der Lipophilie. Gleichzeitig ist eine

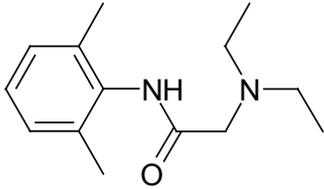
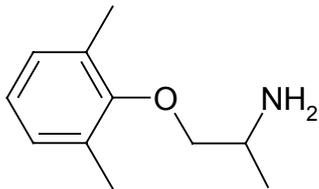
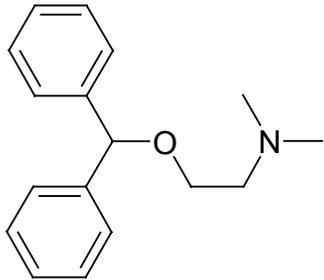
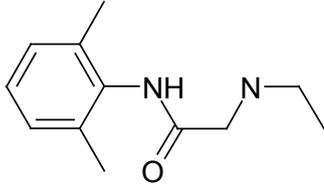
Abnahme der Basizität zu erwarten, da der zusätzliche Sauerstoff und der zusätzliche Stickstoff Elektronen ziehen. Das terminale Amin wird elektropositiver und somit bereit, Protonen aufzunehmen.

Tabelle 9: Struktur, log P, pK, IC 50-Werte und Molekulargewicht von zwei Substanzen, die sich durch die Größe des aromatischen Rings voneinander unterscheiden:

Substanz	Struktur	LogP	pKa	IC _{50,ton.} (μmol/l)	IC _{50,ph.} (μmol/l)	IC _{50ton.} /IC _{50ph.}	MolGew (g/mol)
Anilin		0,9	4,63	1520	1507	1,0	93
1-Naphtylamin		2,25	3.86	3692	2772	1,3	143

Hier wurden zwei Substanzen miteinander verglichen, die sich in der Struktur allein in der Größe des aromatischen Ringsystem unterscheiden. Beide Substanzen sind schwache Basen, da das freie Elektronenpaar des Stickstoffs in das π-Elektronensystem einbezogen wird. Das größere π-Elektronensystem des Naphtylamins hat den größeren +M-Effekt.

Tabelle 10: Struktur, log P, pK, IC₅₀-Werte und Molekulargewicht von bekannten Lokalanästhetika:

Substanz	Struktur	LogP	pKa	IC _{50,ton.} (μmol/l)	IC _{50,ph.} (μmol/l)	IC _{50ton.} /IC _{50ph.}	MolGew (g/mol)
Lidocain		2,26	8,2	277	79	3,5	234
Mexiletine		2,15	9,2	258	142	1,8	179
Diphen- hydramin		3,27	8,6	78	36	2,18	255
MEGX (Monoethyl- Glycinxylylidid)		1,32		212	109	1,94	206

In dieser Tabelle sind bekannte Natriumkanalblocker zusammengefasst. Sie sind in ihrer Struktur komplexer und daher schwieriger zu vergleichen. Wichtige Unterschiede findet man zwischen Amid- und Etherbindung, der Wertigkeit des terminalen Amins und in der Größe des lipophilen Teils.

Zwischen den folgenden physikochemischen Eigenschaften der Substanzen und ihrer tonischen und phasischen Blockierungspotenz wurden Korrelationen aufgestellt:

- log P
- pKA
- Molekulargewicht

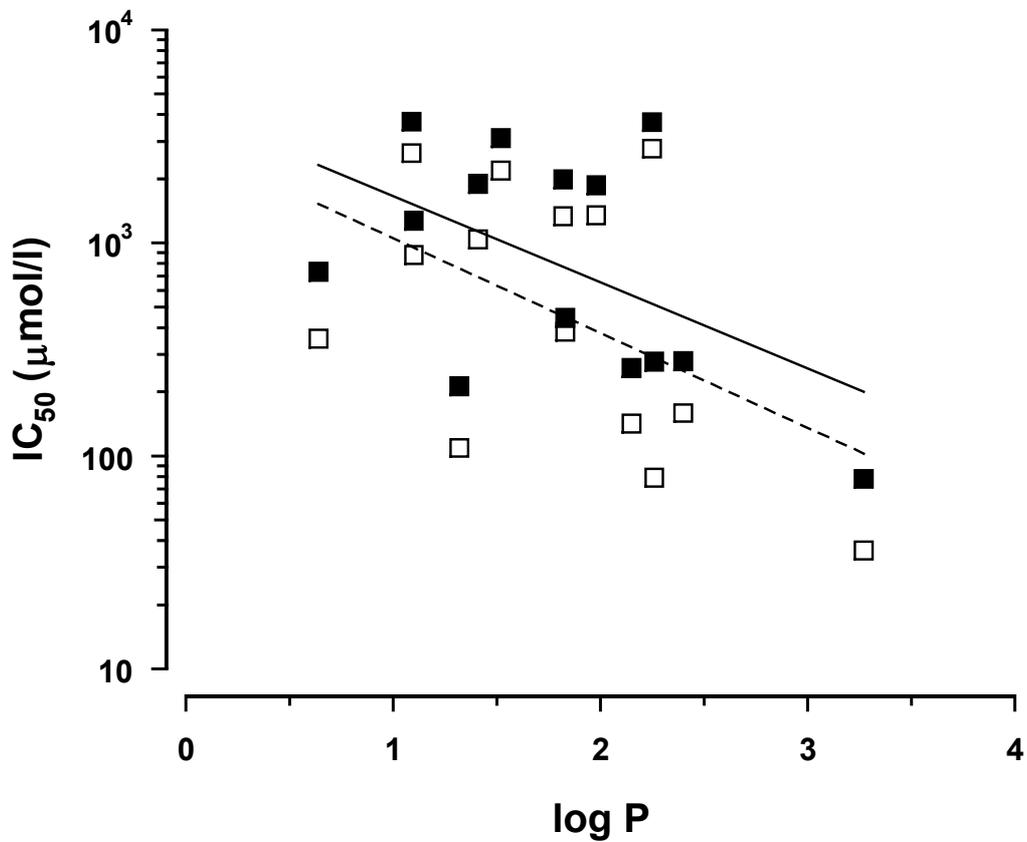


Abbildung 12: Korrelation zwischen tonischer Phase und log P sowie Korrelation zwischen phasischer Blockade und log P für alle untersuchten Substanzen

■ tonischer Block

□ : phasischer Block

Korrelation tonischer Block:

$$\log y = -0,405 x + 3,63$$

$$r = -0,50$$

Korrelation phasischer Block:

$$\log y = -0,44 x + 3,47$$

$$r = -0,48$$

Strukturähnliche Stoffe wurden zu Untergruppen zusammengefasst. Die Untergruppen wurden noch mal gesondert mit dem log P in Korrelation gesetzt:

1. Phenylmethyl-, Phenylethyl-, Phenylpropyl- und Phenylbutylamin unterschieden sich in Struktur allein durch die Länge der Zwischenkette.
2. Phenylmethylamin, N-Methylbenzylamin, N,N-Dimethylbenzylamin und N-Ethylbenzylamin unterscheiden sich in ihrer Struktur allein durch die an den Stickstoff gebundene Anzahl der Kohlenstoffatome

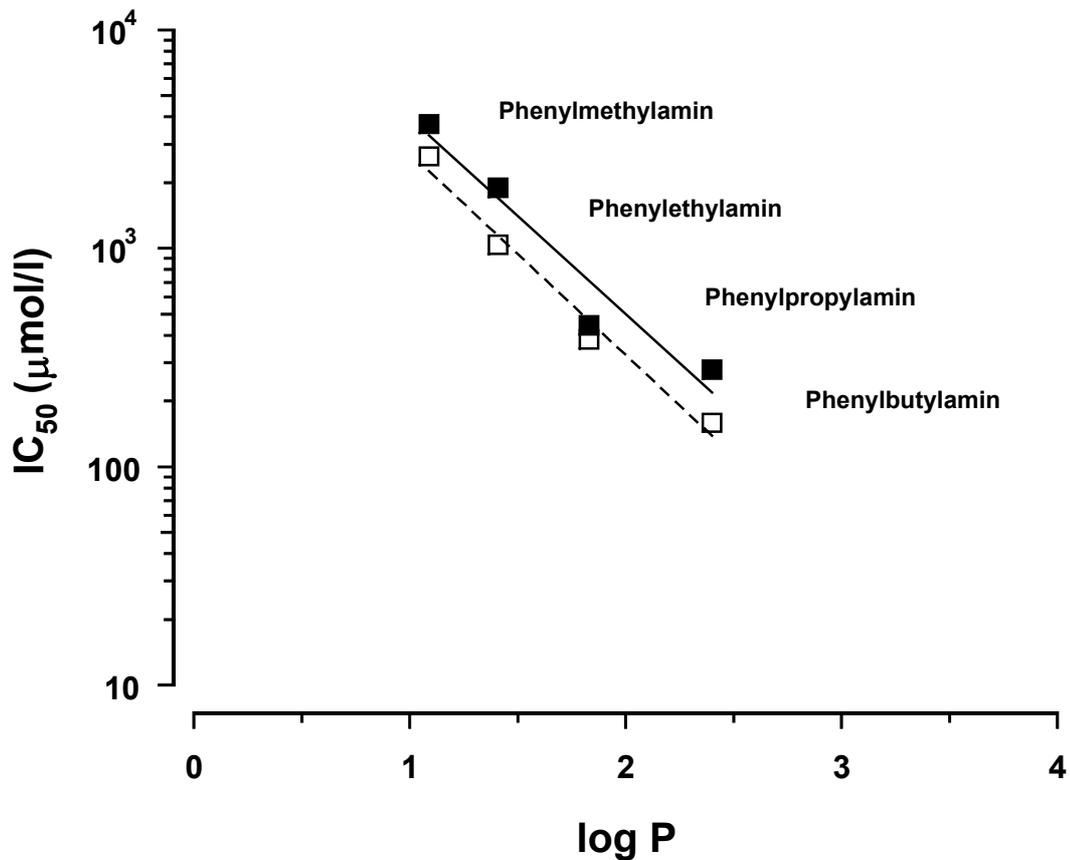


Abbildung 13: Korrelation zwischen log P und Blockierungspotenz für Substanzen mit unterschiedlicher Länge der Zwischenkette

■ tonischer Block

□ : phasischer Block

Korrelation tonischer Block:

$$\log y = -0,9 x + 4,5$$

$$r = -0,96$$

Korrelation phasischer Block:

$$\log y = -0,92 x + 4,36$$

$$r = -1$$

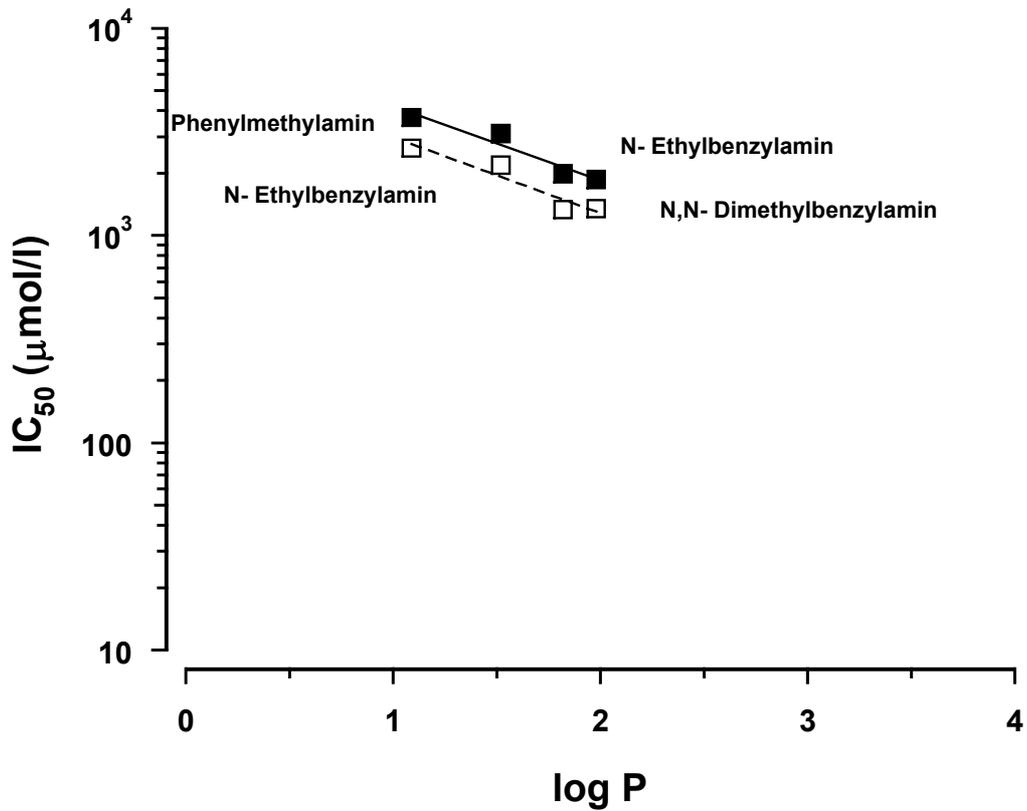


Abbildung 14: Korrelation zwischen $\log P$ und Blockierungspotenz von Substanzen, die sich durch die Seitenketten am terminalen Amin unterscheiden

■ tonischer Block

□ : phasischer Block

Korrelation tonischer Block:

$$\log y = -0,36 x + 3,98$$

$$r = -0,96$$

Korrelation phasischer Block:

$$\log y = -0,37 x + 3,84$$

$$r = -0,95$$

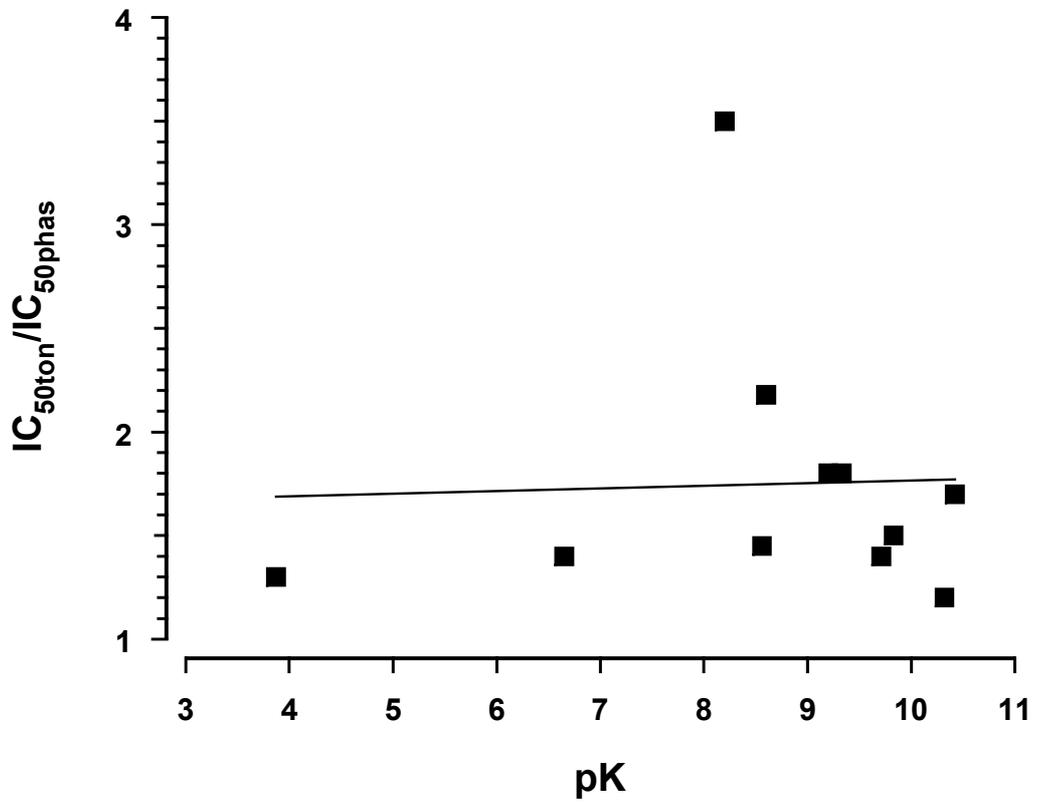


Abbildung 15: Korrelation zwischen tonischem sowie phasischem Block und dem pK_A -Wert für alle Substanzen

$$y = 0,0013 x + 1,64$$

$$r = 0,037$$

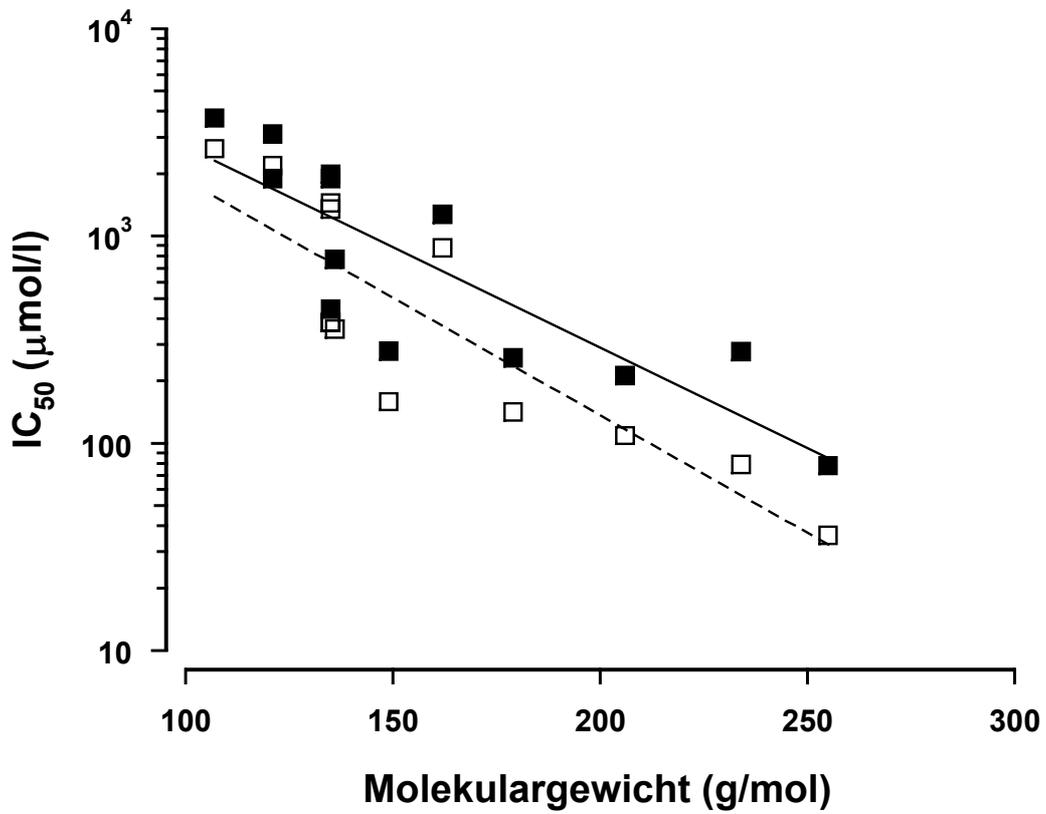


Abbildung 16: Korrelation zwischen tonischer und phasischer Blockade und dem Molekulargewicht für alle Substanzen

■ tonischer Block

□ : phasischer Block

Korrelation Mol.Gew. - Tonischer Block: Korrelation Mol.Gew. - Phasischer Block

$$y = -0,026 x + 10,14$$

$$y = -0.022 x + 10,13$$

$$r = 0,86$$

$$r = 0,85$$

4 Diskussion

Für die Experimente wurden ausschließlich kleine Spinalganglienzellen verwendet. Die Ströme der Zellen wurden anhand ihrer Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik charakterisiert. Die meisten Zellen zeigten Ströme, deren Eigenschaften den Kriterien für TTX-resistenten Natriumstrom entsprachen. An diesen Zellen wurde die Wirkung der 14 Substanzen auf den TTX-resistenten Natriumstrom getestet. Alle 14 untersuchten Substanzen konnten den TTX-resistenten Natriumstrom reduzieren. Für jede Substanz wurde die Potenz für tonischen und use-dependent Block evaluiert. Die IC_{50} -Werte für tonischen und use-dependent Block wurden mit den physikochemischen Parametern in Tabellen zusammengefaßt. Zusätzlich wurden Korrelationen zwischen den physikochemischen Parametern und den Potenzen für tonischen und phasischen Block aufgestellt.

4.1 physikochemische Parameter und Potenz

Da in der Lokalanästhetikaforschung immer wieder Zusammenhänge zwischen physikochemischen Parametern und Potenz postuliert wurden, haben wir unsere Substanzen auf diese Zusammenhänge hin untersucht:

4.1.1 Molekulargewicht

Molekulargewicht und Potenz korrelierten nicht miteinander. Das entspricht den Ergebnissen von Bokesch (Bokesch *et al.*, 1986). Covino und Vasallo fanden in ihren Untersuchungen eine positive Korrelation zwischen Molekulargewicht und Potenz (Covino et Vasallo 1978). Sie untersuchten Substanzen, die sich in der Länge der Seitenketten am aromatischen Ring und am terminalen Amin unterschieden. Die Korrelation zwischen Molekulargewicht und Potenz ist nur bei sehr bestimmten strukturellen Veränderungen zu finden. Es ist fraglich, ob es sich hierbei tatsächlich um eine direkte Beziehung zwischen Molekulargewicht und Potenz handelt. Wahrscheinlicher ist, dass die Ursache der Potenzzunahme bei Covino und Vasallo in der Art der Strukturunterschiede liegt.

4.1.2 pK-Wert

Das Verhältnis tonischer zu phasischer (use-dependent) Blockade stand bei unseren Untersuchungen in keiner Korrelation zum pK-Wert. Nach der Hypothese von Hille müßte bei niedrigem pK-Wert der tonische Block überwiegen, bei hohem pK-Wert der phasische

Block (Hille, 1977 a, b). Wie zuvor bereits erklärt, beschreibt der pK-Wert den Dissoziationsgrad einer Base in einer wässrigen Lösung mit einem bestimmten pH-Wert. Die Bedingungen, die in einer wässrigen Lösung herrschen, sind nicht gleich den Bedingungen, die an der Oberfläche der Zellmembran und in der Zellmembran herrschen. An der Oberfläche der Zellmembran überwiegen die negative Ladungen gegenüber den positiven Ladungen. 15% der Phospholipide der Nervenzellmembran tragen mindestens eine negative Ladung. Diese negativen Ladungen ziehen sowohl Hydroxoniumionen, als auch protonierte Lokalanästhetikamoleküle an. Folglich ist an der Oberfläche der Membranen der effektive pK-Wert erhöht. Im Inneren der Membran herrschen andere Bedingungen. In diesem niedrig dielektrischen Medium befinden sich die geladenen Moleküle in einem Zustand höherer Energie. Besonders davon betroffen ist das kleine Hydroxoniumion, weniger das größere Lokalanästhetikummolekül. Verhältnismäßig muß insgesamt eine höhere Hydroxoniumionenkonzentration herrschen, um das Lokalanästhetikum im Inneren zu protonieren. Der effektive pK-Wert ist reduziert. Da das Lokalanästhetikum zwischen innen und außen ständig hin und her wechselt, liegt der effektive pK-Wert irgendwo zwischen dem effektiven pK-Wert an der Außenseite und dem effektiven pK-Wert innerhalb der Membran. Der pK-Wert für eine Base in wässriger Lösung ist ein für die gegebenen Bedingungen recht ungenaues Maß für den Grad der Dissoziation der Base (Strichartz *et al.*, 1990). Auch in anderen Untersuchungen konnte zwischen dem pK-Wert und der Potenz von Lokalanästhetika keine Korrelation aufgestellt werden (Bokesch *et al.*, 1986).

4.1.3 Lipophilie:

Für drei Gruppen wurden Korrelationen zwischen Lipophilie und Potenz aufgestellt:

1. Korrelation für alle 14 Substanzen (Abb. 12)
2. Korrelation für die Untergruppe der Substanzen, die sich allein durch die Anzahl der Kohlenstoffe in der Zwischenkette unterscheiden (Abb. 13)
3. Korrelation für die Untergruppe der Substanzen, die sich durch die Anzahl der Kohlenstoffatome, die an den terminalen Stickstoff gebunden sind, unterscheiden (Abb. 14)

Die Korrelation in der 1. Gruppe war nicht signifikant. Die Korrelationen in der 2. und 3. Gruppe waren sowohl für den tonischen als auch für den phasischen Block signifikant. Die Steigungen der Korrelationsgeraden für tonischen und phasischen Block waren in der gleichen Größenordnung.

Nach diesen Ergebnissen scheint Hydrophobizität nur in Zusammenhang mit bestimmten strukturellen Veränderungen die Potenz des Lokalanästhetikums zu erhöhen. Die Korrelation

in der 3. Gruppe zeigt, dass die Potenz einer Substanz für tonischen und phasischen Block um so größer ist, je höher die Hydrophobizität der Seitenketten am terminalen Amin ist. In der Gruppe 2 nimmt parallel zur Hydrophobizität der Abstand zwischen dem terminalen Amin und dem aromatischen Ring zu. Vergleicht man zwei einzelne Substanzen mit nahezu gleicher Hydrophobizität, aber mit unterschiedlichem Abstand zwischen terminalem Amin und aromatischem Ring, die Substanzen Phenylpropylamin und N-Ethylbenzylamin, blockiert die Substanz mit dem größeren Abstand, das Phenylpropylamin, tonisch um das 4-fache, phasisch um das 3-fache besser. Folglich ist in Gruppe 2 wahrscheinlich nicht die Hydrophobizität sondern der Abstand zwischen dem terminalen Amin und dem aromatischen Ring der ausschlaggebende Faktor.

4.2 Strukturelle Eigenschaften:

Die Ergebnisse zeigen, dass es nahezu unmöglich ist, von allgemeinen physikochemischen Eigenschaften auf die Potenz eines Lokalanästhetikums zu schließen. Vielmehr scheinen einzelne strukturelle Determinanten die Potenz zu beeinflussen. Eine der Determinanten ist wahrscheinlich der Abstand zwischen terminalem Amin und aromatischem Ring. In der Reihe von Substanzen, die sich in der Länge der Zwischenkette unterscheiden, besitzt Phenylbutylamin mit einer Zwischenkette von vier C-Atomen die höchste Blockierungspotenz für tonischen und phasischen Block. Das entspricht den Untersuchungen von Sheldon und Mitarbeitern an den Natriumkanälen von kardialen Muskelzellen (Sheldon *et al.*, 1991). Die Substanzen, die untersucht wurden, blockierten am besten, wenn die Zwischenkette zwischen terminalem Amin und aromatischem Ring zusätzlich zur Amidbindung noch zwei Kohlenstoffatome hatte, also auch insgesamt 4 Atome lang war. Ursache dafür ist wahrscheinlich eine Zwei-Punkte-Interaktion des Lokalanästhetikums mit dem Kanal. Der aromatische Ring auf der einen Seite und das terminale Amin auf der anderen Seite interagieren mit zwei unterschiedlichen Stellen im Kanal, die ungefähr eine Länge von 4 Atomen voneinander entfernt sind. Auf der Seite des Kanals sind sehr wahrscheinlich die Aminosäurereste Phenylalanin und Tyrosin die entsprechenden Interaktionspartner. Im Natriumkanalsubtyp des Rattenhirns sind die beiden Aminosäurereste ungefähr die Länge einer Zwischenkette voneinander entfernt. Beide sind an der Interaktion mit dem Lokalanästhetikum beteiligt (Ragsdale *et al.*, 1994). Zur Blockade TTX-resistenter Natriumkanäle sind also dieselben strukturellen Determinanten wie zur Blockade TTX-sensitiver Kanäle von Nöten: Ein aromatischer Ring, ein terminales Amin, und eine Zwischenkette der Länge von vier Atomen.

Innerhalb der Gruppe 3 korreliert die Potenz der Substanzen sowohl für den tonischen als auch für den phasischen Block positiv mit der Hydrophobizität der Seitenketten des terminalen Amins. Die Anordnung der Seitenketten hat keinen Einfluß. Obwohl die Kohlenstoffatome am terminalen Amin unterschiedlich verteilt sind, haben N,N-Dimethylbenzylamin und Ethylbenzylamin nahezu gleiche Potenz.

Leider standen uns von Substanzen mit der Grundstruktur der Gruppe 3 nur solche mit N-terminalen Seitenketten bis insgesamt zwei C-Atomen zur Verfügung. Dass auch über die Anzahl von zwei hinaus die Potenz mit steigender Hydrophobizität weiter zunimmt, wird beim Vergleich von MEGX und Lidocain deutlich. Lidocain trägt in den N-terminalen Seitenketten zwei Kohlenstoffatome mehr. Seine phasische Blockierungspotenz liegt deutlich über der des MEGX. Erstaunlicherweise ist Lidocain in der tonischen Blockade schwächer als MEGX.

Sheldon *et al.* machten ähnliche Beobachtungen an den Natriumkanälen von kardialen Myozyten. Unter den von ihnen untersuchten Substanzen hatten jene die größte Potenz, deren N-terminale Seitenketten insgesamt aus mindestens vier Kohlenstoffatomen bestanden (Sheldon *et al.*, 1991). Die genaue Anordnung der Seitenketten spielte, wie bei unseren Ergebnissen, keine Rolle. Ist die von Dougherty beschriebene starke Interaktion zwischen Kation und π -Elektronensystem die Interaktion, die die Bindung zwischen Lokalanästhetikum und Rezeptor ausmacht, dann wird das Stickstoff-Kation stark vom π -Elektronensystem des aromatischen Restes einer Aminosäure im Kanalprotein angezogen. Nach Dougherty ist die Anziehungskraft größer als die Kräfte, die das Kation in Lösung halten. Um das Kation den entgegengesetzt wirkenden Kräften der wässrigen Umgebung zu entziehen, faltet sich das Protein so um, dass das Kation in eine hydrophobe Umgebung gelangt (Dougherty 1996). Möglicherweise stabilisieren die Kohlenstoffreste am Stickstoffatom dessen Lage durch hydrophob-hydrophobe Interaktionen. Doughertys These könnte auch die scheinbar paradoxe Abnahme der tonischen Blockierungspotenz bei weiter steigender phasischer Blockierungspotenz erklären. Die Bindung an den Rezeptor könnte in zwei Schritten verlaufen: Zunächst findet eine einfache Interaktion zwischen Kation und aromatischem Ringsystem statt. Dann ändert das Kanalprotein seine Konformation, wodurch das Kation in eine hydrophobe Umgebung gebracht wird. So wird die Interaktion zwischen den beiden Partnern stabilisiert. Der erste Kontakt zwischen Lokalanästhetikum und Rezeptor könnte den tonischen Block ausmachen, durch die folgende Stabilisierung der Bindung könnte der phasische Block zustande kommen. Die Hypothese stimmt mit den Vermutungen von Balser überein, nach denen die Interaktion zwischen Kanal und Lokalanästhetikum eine allosterische

Konformationsänderung des Kanals bewirkt (Balsler *et al.*, 1996). Warum ist dann die tonische Blockierungspotenz von Lidocain niedriger als erwartet? Die zwei Seitenketten könnten die ersten Kontaktaufnahme des Kations mit dem aromatischen Ring sterisch behindern. Der Vorteil ihrer Hydrophobizität kommt erst zur Geltung, wenn sie nach Konformationsänderung des Kanals die Interaktion der beiden Partner durch hydrophob-hydrophobe Interaktion mit der jetzt hydrophoben Umgebung stabilisieren.

4.2.1 Strukturmerkmale und phasische Blockade

Pathophysiologische Grundlage pathologischer Schmerzen auf der Ebene der Nervenmembran ist Steigerung der Erregbarkeit und repetitives Feuern (Rizzo *et al.*, 1996, Matzner & Devor, 1994). Substanzen, die bevorzugt phasisch blockieren, eignen sich dazu, selektiv das repetitive Feuern zu unterbinden. Deshalb ist es von besonderem Interesse, die gemeinsame Strukturmerkmale guter phasischer Blocker zu finden. Bei unseren Untersuchungen gab es drei Blocker, deren Potenz in der phasischen Blockade mehr als doppelt so groß war wie in der tonischen Blockade: Lidocain, Diphenhydramin, und N-Phenylethylendiamin. Diese Substanzen zeigen beachtliche Unterschiede in der chemischen Struktur. Um so schwieriger ist es, ein gemeinsames Merkmal auszumachen, das verantwortlich für die gute phasische Blockade sein könnte. Über das Verständnis des Mechanismus der phasischen Blockade läßt sich der Frage näher kommen. Der englische Begriff "use-dependent-block" entspricht im Deutschen etwa "eine vom Gebrauch abhängige Blockade". Im Gebrauch durchläuft ein Kanal zunächst den aktivierten, dann den inaktivierten Zustand. Substanzen, die im Gebrauch gut blockieren, binden entweder an den aktivierten oder an den inaktivierten Kanalzustand besonders gut. Das Ausmaß der phasischen Blockade wird aber nicht nur von der unterschiedlichen Affinität der Substanz zu einzelnen Konformationszuständen des Kanals bestimmt, sondern auch von der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit der Substanz an den Rezeptor. Eine Substanz, die sehr schnell bindet und auch sehr schnell wieder von der Bindungsstelle abdissoziiert, wird einen geringen phasischen Block verursachen, auch wenn sie hauptsächlich an den inaktivierten oder offenen Kanal bindet, da sie zu kurz am Rezeptor ist, um zu akkumulieren. Eine Substanz dagegen, die eine geringe Dissoziationsgeschwindigkeit hat, wird entsprechend eine starke phasische Blockade verursachen, da sie gut akkumuliert. Die Geschwindigkeit der Blockade und die Dissoziationsgeschwindigkeit wiederum sind nicht nur durch die Art der Substanz, sondern auch durch die Höhe des Membranpotentials bestimmt. So konnte Zamponi zeigen, dass die Geschwindigkeit der Procainamid-Blockade mit der Stärke der Depolarisation ansteigt

(Zamponi *et al.*, 1993). Da die Procainamid-Moleküle sich unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich im geladenen Zustand befinden, liegt es nahe, die Erklärung für das Phänomen in der Interaktion zwischen geladenem Moleküle und Spannung zu suchen. Ein positiv geladener Blocker verläßt das negativ geladene intrazelluläre Medium eher, je weniger negative Ladungen ihn zurückhalten. Bei negativeren Potentialen war wiederum die Dissoziation der Substanz beschleunigt. Am Vorgang der phasischen Blockade wirken viele Faktoren mit. Unterschiedliche Strukturmerkmale machen Substanzen auf unterschiedliche Weise zu guten phasischen Blockern. Dementsprechend schwierig ist es, gemeinsame Strukturmerkmale guter phasischer Blocker ausfindig zu machen. Ein Vergleich einzelner Substanzen und ihrer Blockierungspotenz untereinander mag mehr Aufschluß geben.

4.2.2 Phenylethylendiamin und Phenylpropylamin

Während Phenylethylendiamin und Phenylpropylamin ungefähr gleich stark in der phasischen Blockade sind, ist Phenylethylendiamin sehr viel schlechter in der tonischen Blockade, obwohl beide fast gleiche Strukturen aufweisen. Wie läßt sich das Phänomen erklären? Beim Vergleich der chemischen Strukturen von Phenylethylendiamin und Phenylpropylamin, fällt auf, dass der einzige strukturelle Unterschied, der zusätzliche Stickstoff, Phenylethylendiamin zu einer äußerst hydrophilen Substanz macht. Drei Erklärungsmöglichkeiten bieten sich an:

1. Das Phenylethylendiamin kann aufgrund seiner Hydrophilie die Rezeptorstelle während des geschlossenen Kanalzustandes nicht erreichen. Erst, wenn der Kanal öffnet, kann es den hydrophilen Weg durch die Pore wählen. Das lipophile Phenylpropylamin dagegen kann direkt zu jeder Zeit an die Rezeptorstelle gelangen. Und auf gleichem Wege wieder, auch zu jeder Zeit, schnell abdissoziieren. Das Phenylethylendiamin dagegen wäre während des geschlossenen Kanalzustands in der Pore gefangen, würde akkumulieren, was sich im Experiment in einem ausgeprägten phasischen Block zeigt. Diese Erklärungsweise entspräche der Theorie von Courtney (Courtney, 1980).
2. Der tonische Block ist das Ergebnis einer lipophilen Interaktion zwischen Lokalanästhetikum und Rezeptor: Li und Mitarbeiter (Li *et al.*, 1999) haben versucht, dem Problem der Herkunft des tonischen und phasischen Blocks von der Seite des Kanals näherzukommen: Er ersetzte das Phenylalanin F1710 des Natriumkanals durch unterschiedlichste Aminosäuren. Die mutierten Kanäle blockierte er mit Tetracain und wertete anschließend aus, welche Mutationen am besten blockiert wurden: Erstaunlicherweise blockierte tonisch Tetracain um so besser, um so hydrophober der Ersatz an der Phenylalaninposition war. Der phasische Block war dagegen bei den aromatischen Resten am größten. Es könnte also sein, dass Phenylethylendiamin aufgrund

seiner schwach ausgeprägten Lipophilie nur noch eine schwache hydrophob-hydrophobe Interaktion mit dem Rezeptor eingehen kann.

3. Der Stickstoff an sich stört in dieser Position die Interaktion zwischen Molekül und Rezeptor, die für die tonische Blockade verantwortlich ist. Lidocain und MEGX haben an gleicher Stelle einen Stickstoff. Besonders das Lidocain, aber auch das MEGX zeigen einen deutlichen phasischen Block. In dieser Hinsicht wäre es interessant, eine Substanz zu synthetisieren, die sich vom Lidocain allein darin unterscheidet, dass sich an der Stelle des Stickstoffs ein Kohlenstoff befindet. Leider fehlten uns die Möglichkeiten, eine solche Substanz zu synthetisieren.

4.2.3 Phenylethylendiamin und Phenylpiperazin

Beide Substanzen verfügen über einen aromatischen Ring, haben an Position 1 der Seitenkette des aromatischen Ring einen Stickstoff und an Position 4 das terminale Amin. Dabei handelt es sich beim terminalen Amin des Phenylethylendiamin um ein primäres Amin, während es sich beim terminalen Amin des Phenylpiperazins um ein sekundäres Amin handelt. Nach der bisherigen Theorie müsste Phenylpiperazin potenter als Phenylethylendiamin sein, da beide einen aromatischen Ring besitzen, beide den gleichen Abstand zwischen dem terminalen Amin und dem aromatischen Ring haben, das terminale Amin von Phenylpiperazin aber im Gegensatz zu dem des Phenylethylendiamins sekundär ist. Phenylethylendiamin ist jedoch ungefähr doppelt so potent wie Phenylpiperazin. Wie kommt es dazu? Der einzige weitere Unterschied zwischen den beiden Molekülen besteht darin, dass das terminale Amin des Phenylpiperazins Teil eines einfachen Rings ist. Damit ist es sehr viel stärker fixiert als in einer einzelnen Bindung. Die Rigidität des Moleküls könnte die Interaktion mit der Rezeptorstelle behindern.

4.2.4 Diphenhydramin

Diphenhydramin ist eine Substanz, die weder stark hydrophil ist, noch einen Stickstoff an auffälliger Stelle hat, der die Ausbildung des tonischen Blocks hindern könnte. Trotzdem macht es einen ausgeprägt starken phasischen Block. Daneben ist es unter den untersuchten Substanzen der stärkste Blocker überhaupt. Auffällig bei der Betrachtung der chemischen Struktur des Diphenhydramins ist, dass das Diphenhydramin im Unterschied zu den restlichen geprüften Substanzen 2 aromatische Ringe besitzt, die durch ein Kohlenstoffatom miteinander verbunden sind. Zwei Phenylringe, die durch ein oder zwei Kohlenstoffe oder Stickstoffe voneinander getrennt sind, kommen nicht nur beim Diphenhydramin, sondern auch beim Carbamazepin, Diclofenac, Tripelenamin, etc. vor. Alle diese Substanzen sind bei der

Blockade von Natriumkanälen außerordentlich potent. Kuo und Mitarbeiter (Kuo *et al.*, 2000) erkannten die strukturelle Gemeinsamkeit und schlossen daraus, dass beide Phenylgruppen an der Interaktion mit dem Rezeptor beteiligt sind. Die Substanzen sind besonders gute phasische Blocker, weil sie außerordentlich affin zum Kanal im inaktivierten Zustand sind. Gerade dieses Ergebnis zeigt, dass neben den bekannten Strukturmerkmalen auch andere Strukturmerkmale eine gute phasische Blockade bewirken können.

4.2.5 Phenylethylamin und Phenylharnstoff

Auch dies sind zwei Substanzen mit ähnlicher Struktur. Beide haben einen aromatischen Ring und ein terminales Amin, die durch eine Zwischenkette von zwei Atomen voneinander getrennt sind. Während aber die Zwischenkette beim Phenylethylamin aus zwei Kohlenstoffen besteht, besteht die Zwischenkette beim Phenylharnstoff aus einer Amidbindung. Die Potenz der beiden Substanzen ist äußerst unterschiedlich. Um die gleiche Anzahl an Kanälen zu blockieren, werden vom Phenylharnstoff fünf- bis zehnfach höhere Konzentrationen benötigt. Die Lipophilie des Phenylharnstoffs ist durch die Amidbindung reduziert, jedoch wurde bereits gezeigt, dass Lipophilie für sich Unterschiede in der Blockadepotenz nicht ausreichend erklären kann. Ist die Amidgruppe an sich der störende Faktor? Amidgruppen kommen auch bei herkömmlichen Lokalanästhetika als Zwischenketten vor, z.B. beim Lidocain und beim MEGX. Diese Substanzen sind trotz Amidgruppe relativ potent. Im Unterschied zum Phenylharnstoff sind aber terminales Amin und Amidbindung von Lidocain und MEGX durch eine Zwischenkette von mindestens einem Kohlenstoffatom getrennt. Das terminale Amin ist sehr wahrscheinlich maßgeblich an der Lokalanästhetika-Rezeptor-Interaktion beteiligt. Die Amidbindung in allernächster Nähe könnte diese Interaktion auf vielfältige Weise beeinträchtigen: Vorstellbar wäre eine sterische Behinderung, London-Kräfte oder die Ausbildung von Wasserstoffbrücken.

4.2.6 Anilin und 1-Naphtylamin

Nach unseren Erwartungen hätte Anilin in seiner Blockierungspotenz sowohl unter der Blockierungspotenz von Phenylmethylamin als auch unter der von Naphtylamin liegen müssen. Anilin trägt keine Zwischenkette zwischen dem aromatischen Ring und dem terminalen Amin. Naphtylamin verfügt über das größere aromatische Ringsystem, mit dem es mit dem Rezeptor die stärkere aromatisch-aromatische Interaktion eingehen könnte. Wider Erwarten lag die Blockierungspotenz von Anilin im Bereich der Blockierungspotenz von Phenylethylamin. Naphtylamin dagegen lag im Bereich von Phenylmethylamin. Das Ergebnis

von Naphtylamin läßt sich nachvollziehen, geht man davon aus, dass der Nachteil der fehlenden Zwischenkette durch das größere Ringsystem wettgemacht wird. Wie läßt sich die Wirkung von Anilin erklären? Auffällig war die Tatsache, dass die Zellen unter Anilin in kürzester Zeit zugrunde gingen. Wir nehmen an, dass die unerwarte hohen Blockierungspotenz des Anilins durch die voranschreitende Schädigung der Zellen durch das Anilin zustande kamen und nicht die tatsächliche Affinität des Moleküls zum Kanal widerspiegelt.

4.3 Beschränkung

Bei der Arbeit gab es zwei Hauptprobleme: Zum einen hatten wir nicht die Möglichkeiten, selbst Substanzen zu synthetisieren. Die Substanzen, die wir zur Verfügung hatten, zeichneten sich durch teilweise beträchtliche Strukturunterschiede aus. Aus dem Grunde bedürfen die Aussagen dieser Arbeit weiterer systematischer Überprüfung an einer größeren Zahl von Substanzen, die sich in ihrer Struktur ähnlicher sind. Zum anderen existieren zwar viele einzelne Arbeiten über die Wirkung von unterschiedlichen Substanzen an unterschiedlichen Natriumkanalsubtypen. Leider ist auch die Aussagekraft dieser Arbeiten häufig begrenzt durch die geringe Anzahl der jeweils untersuchten Substanzen. Auch wurde bisher wenig Wert auf die Unterschiede zwischen einzelnen Kanalsubtypen gelegt. Aus der Vielzahl kleiner Arbeiten resultieren teilweise recht widersprüchliche Aussagen. Das führte zu Schwierigkeiten beim Vergleich der Ergebnisse unserer Untersuchungen mit den Ergebnissen von Untersuchungen an anderen Natriumkanalsubtypen. Insgesamt sind große systematische Studien mit einer Vielzahl von Substanzen an den unterschiedlichen Kanalsubtypen von Nöten, um besonders die feinen Unterschiede zwischen den Kanalsubtypen herauszuarbeiten.

4.4 Zusammenfassung

Inhalt der Doktorarbeit war die Untersuchung von Substanzen, die spezifisch TTX-resistente Kanäle blockieren. Anhand von physikochemischen Parametern und Vergleich der Strukturen und Blockierungspotenzen der Substanzen untereinander sollten die Charakteristika bestimmt werden, die Substanzen zu potenten Blockern TTX-resistenter Kanäle machen. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Blockern TTX-resistenter und TTX-sensitiver Kanäle sollten erfaßt werden. Hierzu wurde die Whole-Cell Patch-Clamp Methode

an kleinen enzymatisch dissoziierten Spinalganglienzellen adulter Ratten eingesetzt um TTX-resistente Natriumströme darzustellen und pharmakologisch zu untersuchen.

Die wichtigsten Ergebnisse unserer Arbeit sind, dass die Blocker TTX-resistenter Kanäle die gleichen allgemeinen Strukturmerkmale besitzen müssen wie die Blocker TTX-sensitiver Kanäle: ein aromatischer Ring, verbunden mit einem terminalen Amin durch eine Zwischenkette von der Länge von vier Atomen. Hydrophobe Gruppen am terminalen Amin erhöhen die Potenz des Blockers. Rigidität durch Ringbildung der Zwischenkette und eine Amidbindung in allernächster Nähe des terminalenamins erniedrigen die Potenz. Die phasische Blockierungspotenz einer Substanz lässt sich nicht auf ein bestimmtes Strukturmerkmal zurückführen. Die Ursache liegt in der unterschiedlichen Art der Entstehung der phasischen Blockade. Die Wirksamkeit eines Lokalanästhetikums lässt sich nicht an allgemeinen physikochemischen Parametern messen. Bestimmte physikochemische Eigenschaften sind aber Voraussetzung für die Wirksamkeit: das terminale Amin, das an der Interaktion mit dem Kanal beteiligt ist, verleiht den Lokalanästhetika basische Eigenschaften. Lokalanästhetika haben hydrophobe Gruppen, die zum einen an der Interaktion mit dem Kanal beteiligt sind, zum anderen gewährleisten, dass die Substanz die hydrophobe Membran passieren kann, bevor sie von innen an den Rezeptor gelangt.

5 Literaturverzeichnis

Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN (1996) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 18;379(6562):257-62.

Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J, Smith A, Kerr BJ, McMahon SB, Boyce S, Hill R, Stanfa LC, Dickenson AH, Wood JN (1999) The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathway. *Nature Neurosci* 2: 541-548

Arbuckle JB, Docherty RJ (1995) Expression of TTX-resistant sodium channels in capsaicin-sensitive dorsal root ganglion neurones of adult rats. *Neurosci Lett* 185: 70-73

Arner S, Lindblom U, Meyerson A, Molander C (1990) Prolonged relief of neuralgia after regional anaesthetic block. A call for further experimental and systematic clinical studies. *Pain* 43: 287-297

Bach F, Jensen T, Kastrup J, Stigsby B, Dejgard A (1990) The effect of intravenous lidocaine infusion on nociceptive processing in diabetic neuropathy. *Pain* 40: 29-34

Balser JR, Bradley Nuss H, Orias DW, Johns DC, Marban E, Tomaselli GF, Lawrence JH (1996) Local anesthetics as effectors of allosteric gating. *J Clin Invest* 98: 2874-2886

Black J, Cummins T, Plumpton C, Chen Y, Hormuzdiar W, Clare J, Waxman S (1999) Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central nerve injury in DRG-neurons. *J Neurophysiol* 82: 2776-2785

Black J, Langworthy K, Hinson AW, Dib-Hajj S, Waxman S (1997) NGF has opposing effects on sodium-channel III and SNS gene expression in spinal sensory neurons. *Neuroreport* 7: 2331-2335

Bokesch P, Post C, Strichartz G (1986) Structure-activity relationship of lidocaine homologs producing tonic and frequency-dependent impulse blockade in nerve. *J of Pharm and Exp Ther* 237: 773-780

Chabal C, Jacobson L, Russell L, Burchiel K (1992) Pain in response to perineuromal injection of normal saline, epinephrine, and lidocaine in humans. *Pain* 49: 9-12

Courtney K (1980) Structure-activity relations for frequency-dependent sodium channel block in nerve by local anesthetics. *J of Pharm. and Exp. Ther* 213: 114-119

Covino B, Vasallo H (1976) Local anesthetics, mechanism of action and clinical use. *New York, San Francisco, London, Grune & Stratton Inc*

Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, Akopian AN, Wood JN, Waxman SG (1999) A novel persisting tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *J Neurosci* 19: RC 41, 1-6

Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Black JA, Waxman SG (1998) NaN, a novel voltage-gated sodium channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and downregulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8963-8968

- Dougherty D (1996) Cation- π -interaction in chemistry and biology: a new view of benzene, phe, tyr, and tryp. *Science* 271: 163-167
- Elliott AA, Elliott JR (1993) Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol* 463: 39-56
- England JD, Happel LT, Kline DG, Gamboni F, Thouron CL, Liu ZP, Levinson SR (1996) Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas. *Neurol* 47: 272-276
- Galer B, Harle J, Rowbotham M (1996) Response to intravenous lidocaine perfusion predicts subsequent response to oral mexiletine: a prospective study *J Pain Symp Manag* 12: 161-167
- Gallego R, Ivorra I, Morales A (1987) Effects of central or peripheral axotomy on membrane properties of sensory neurones in the petrosal ganglion of the cat. *J Physiol* 391: 39-56
- Hille B (1977a) The pH-dependent rate of action of local anaesthetics on the node of ranvier. *J Gen Physiol* 69: 475-496
- Hille B (1977b) Local anaesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor-reaction. *J Gen Physiol* 69: 497-515
- Hondeghem LM, Katzung BG (1977) Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 472: 373-398
- Kastrup J, Petersen P, Dejgard A, Angelo H, Hilsted J (1987) Intravenous lidocaine- infusion, a new treatment of chronic painful diabetic neuropathy. *Pain* 28: 69-75
- Kuo C-C, Huang R-C, Lou B-S (2000) Inhibition of sodium currents by diphenhydramine and other diphenyl compounds: molecular determinants of selective binding to the inactivated channel. *Mol Pharm* 57: 135-143
- Li H-L, Galue A, Meadows L (1999) A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. *Mol Pharm* 55: 134-141
- Marban E, Yamagishi T, Tomaselli G (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J of Phys* 508. 3: 647-657
- Marchettini P, Lazarenza M, Marangoni C, Pellegata G, Sotgio M, Smirne S (1992) Lidocaine test in neuralgia. *Pain* 48: 377-382
- Matzner O, Devor M (1994) Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive sodium channels. *J Neurophysiol* 72: 349-359
- McPhee J, Ragsdale D, Scheuer T, Catterall W (1996) A role for intracellular loop IV S 4- S 5 of the sodium channel α -subunit in fast inactivation *Biophys J* 70: 318a
- Nau K, Wang S-Y, Strichartz G (1999) Point mutations at N434 in D1-S6 of α 1- sodium channels modulate binding affinity and stereoselectivity of local anaesthetic enantiomers. *Mol Pharm* 56: 404-413

- Noda M, Suzuki H, Numa S, Stuhmer W (1989) A single point mutation confers TTX and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* 259: 213-216
- Novakovic SD, Tzoumaka E, McGivern JG, Haraguchi M, Sangameswaram L, Gogas KR, Eglen RM, Hunter JC (1998) Distribution of the TTX-resistant sodium channel PN3 in normal and neuropathic conditions. *J Neurosci* 18: 2174-2187
- Porreca F, Lai J, Bian D, Wegert S, Ossipov M, Eglen R (1999) A comparison of the potential role of the TTX-insensitive sodium channels PN3 / SNS and NaN / SNS2 in rat models of chronic pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7640-7644
- Raja S, Meyer R, Campbell J (1988) Peripheral mechanism of somatic pain. *Anesth* 68: 571-590
- Ragsdale D, McPhee J, Scheuer T, Catterall W (1994) Molecular determinants of state dependent block of sodium channels by local anesthetics. *Science* 265: 1724-1728
- Ragsdale D, McPhee J, Scheuer T, Catterall W (1996) Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated sodium channels. *Proc Natl Acad Sci* 93: 9270-927
- Rizzo MA, Kocsis JD, Waxman SG (1996) Mechanism of paraesthesiae, dysaesthesiae and hyperaesthesiae: role of sodium channel heterogeneity *Eur Neurol* 36: 3-12
- Rowbotham M, Davies P, Fields H (1995) Topical lidocaine gel relieves postherpetic neuralgia. *Ann Neurol* 37: 247-253
- Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, Stewart GR, Sze P, Hunter JC, Eglen RM, Herman RC (1996) Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J Biol Chem* 271(11):5953-6
- Sheldon R, Hill R, Taouis M (1991) Aminoalkyl structural requirements for interaction of lidocaine with the class 1 antiarrhythmic drug receptor on rat cardiac myocytes. *Mol Pharm* 39: 609-614
- Starmer CF, Grant AO, Strauss HC (1984) Mechanism of use-dependent block of sodium channels in excitable membranes by local anesthetics. *Biophys J* 46: 15-27
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339: 597-603
- Strassman A, Raymond A (1999) Electrophysiological evidence for TTX-resistant sodium channels in slowly conducting dorsal sensory fibers. *J Neurophysiol* 81: 413-424
- Strichartz GR, Sanchez V, Arthur GR, Chafetz R, Martin D (1990) Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:buffer partition coefficients and pKa values of clinically used drugs. *Anesthesia Analgesia* 71: 158-170

Waxman S, Dib-Hajj S, Cummins T, Black J (1999) Sodium channels and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7635-7639

Weiser T, Yusheng Qu, Catterall W (1999) Differential interaction of r-mexiletine with the local anesthetic receptor site on brain and heart sodium channel α -subunits. *Mol Pharm* 56: 1238-1244

Yellen G, Jurman M, Abramson T, McKinnon R (1991) Mutation affecting internal TEA-blockade identify the probable pore-forming region of a K-channel. *Science* 251: 939-942

Yoon YW, Na HS, Chung J (1996) Contribution of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model. *Pain* 64: 27-36

Yoshida S (1994) Tetrodotoxin-resistant sodium channels. *Cell Mol Neurobiol* 14: 227-241

Zamponi G, Sui X, Coddling P (1993) Dual action of procainamide on batrachotoxin-activated sodium channels: open channel block and prevention of inactivation. *Biophys J* 65: 2324-2334

6 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sibylle Häfner
Geburtsdatum: 17.11.73
Geburtsort: Heidelberg
Wohnort: Hirschbergstr. 8
80634 München
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch

Ausbildung:

1980 - 1984: Neckarschule Heidelberg- Ziegelhausen
1984 - 1993: Kurfürst- Friedrich- Gymnasium Heidelberg
Mai 1993: allgemeine Hochschulreife (Note: 1.6)
1993 - 2001: Studium der Medizin in Giessen
Sept. 1995: Physikum (Note: 2.00)
Aug. 1996: 1. Staatsexamen (Note: 2.00)
Sept. 1996 - Juli 1997: Studium am Royal Free Hospital, London, UK
Sept. 1999: 2. Staatsexamen (Note: 1.66)
April 2001: 3. Staatsexamen (Note: 1)

Preise:

Scheffelpreis für besondere Leistungen in deutscher Sprache und gute literarische Kenntnisse zum Abitur

Praktika:

26.07- 27.09.1993: Krankenpflegepraktikum an der Universitätsklinik Heidelberg
01.09.-23.09.1994: Praktikum an der Universitätsklinik Straßbourg, Frankreich (Chirurgie)

Famulaturen:

26.02.1996 - 26.03.1996: Innere Medizin am Klinikum Passau
04.08.1997 - 12.09.1997: Innere Medizin am All India Institute, Neu-Delhi, Indien
03.03.1998 - 09.04.1998: Neurologie am Addenbrooke's Hospital, Cambridge, England
09.09.1998 - 09.10.1998: Praxisfamulatur in Gynäkologie und Geburtshilfe in Giessen

Praktisches Jahr:

April - August 2000: Hospital Universitario, 12 De Octubre, Madrid, Spanien, Chirurgie
August - Dezember 2000: Medizinische Klinik- Innenstadt der LMU München, Innere Medizin
Dez. 2000 - März 2001: Psychiatrische Klinik und Poliklinik der LMU München, Psychiatrie

ÄiP:

15.08.2001- 15.02.2003 Innere Medizin, Poliklinik, Klinikum Innenstadt

Assistenzzeit:

15.02.2003 – 31.07.2003 Innere Medizin, Poliklinik, Klinikum Innenstadt,

sonstige Interessen und Kenntnisse:

April 1995 – Febr. 2000: Studium der Philosophie als 2. Fach an der JLU, Gießen
1997-2000: Mitglied im Arbeitskreis "Ethik in der Medizin" der JLU, Gießen

7 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt:

PD Dr. Michael Bräu,

für die exzellente Ausbildung bezüglich elektrophysiologischer Methoden und des TTX-resistenten Natriumkanals als auch für die konstante wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit

Prof Dr. Werner Vogel und Mitarbeitern

für die Bereitstellung eines elektrophysiologischen Arbeitsplatzes, fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen und die stete Unterstützung bei der Durchführung meines wissenschaftlichen Vorhabens,

meinen Eltern,

die mir den langen Ausbildungsweg in Medizin und Wissenschaft ermöglicht haben und mir auch bei der Durchführung der Dissertationsarbeit eine große Unterstützung waren.

Harald Hentschke

für das Korrekturlesen der Arbeit und die vielen hilfreichen Tipps bei der Gestaltung des Layouts.

meinen damaligen Mitbewohnern Barbara Pfundt und Rainer Suennen

für die große praktische und emotionale Unterstützung in den Zeiten, in denen ich meine Frustrationstoleranz unter Beweis stellen musste.