

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Anästhesie und operative Intensivmedizin
-Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hugo Van Aken, FRCA, FANZA-

**Lokalanästhetika hemmen die Aktivität humaner NMDA-Rezeptoren
im *Xenopus laevis* Expressionssystem: Die Rolle der Protein Kinase C**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Svenja Katharina Schauerte

Werne
2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Anästhesie und operative Intensivmedizin
-Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hugo Van Aken, FRCA, FANZA-

**Lokalanästhetika hemmen die Aktivität humaner NMDA-Rezeptoren
im *Xenopus laevis* Expressionssystem: Die Rolle der Protein Kinase C**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Svenja Katharina Schauerte
Werne
2011

Gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. K. Hahnenkamp
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. C. Anthoni

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hugo van Aken, FRCA, FANZA-
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. K. Hahnenkamp
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. C. Anthoni

Zusammenfassung

Lokalanästhetika hemmen die Aktivität humaner NMDA-Rezeptoren im *Xenopus laevis* Expressionssystem: Die Rolle der Protein Kinase C

Svenja Katharina Schauerte

Einleitung: Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors trägt zur Empfindung von postoperativer Hyperalgesie bei. In Studien an freiwilligen Probanden konnte gezeigt werden, dass durch intravenöse Gabe von Lokalanästhetika (LA) die Entstehung gesteigerter Schmerzzustände verhindert wird. Eine mögliche Erklärung für diesen vorteilhaften Effekt ist die Hemmung der NMDA-Signaltransduktion durch LA. Aus diesem Grund wird in dieser Studie die Auswirkung von LA auf die NMDA-Rezeptorfunktion untersucht.

Methodik: Der im Menschen vorkommende NMDA-Rezeptorkomplex NR1A/2A wurde rekombinant in *Xenopus laevis* Oozyten expremiert. Nach der Rezeptorexpression wurden die Spitzenströme nach Stimulation mit Glutamat/Glyzin (EC_{50}) durch Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik bestimmt. Das Membranpotential wurde bei -70 mV gehalten. Zur Untersuchung der Wirkung der LA wurden die Zellen vor der Messung für 10 min in Bupivacain, Levobupivacain, S(-)-Ropivacain (10^{-9} - 10^{-4} M), R-(+)-Ropivacain (10^{-4} M) oder Procain (10^{-4} M) inkubiert. Der Einfluss des Protein Kinase C (PKC) Hemmstoffs Chelerythrine (5×10^{-5} M) und der Effekt des PKC-Aktivators Phorbol ester (10^{-6} M) wurde ebenfalls studiert.

Ergebnisse: Native Zellen reagierten nicht auf die Applikation des Agonisten. NMDA-Rezeptor expremierende Zellen antworteten mit Einwärtsströmen ($1,1 \pm 0,08 \mu A$). Alle getesteten LA hemmten die Antwort auf die Agonisten konzentrationsabhängig. Die Wirkung war reversibel und stereoselektiv. Der PKC Inhibitor hatte keinen zusätzlichen hemmenden Effekt zu dem von Bupivacain. Nach Inkubation in Bupivacain führte der PKC Aktivator zu keiner Stimulation.

Diskussion: Alle getesteten LA haben konzentrationsabhängig die Aktivierung des NMDA-Rezeptors gehemmt. Dieser Effekt könnte eine Rolle bei der verminderten Hyperalgesie und Opiattoleranz nach systemischer LA Gabe spielen. Der Mechanismus scheint über Hemmung der PKC zu laufen.

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2011

Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung der Bezirksregierung : A40/2000 vom 06.06.2000

Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die eidesstattliche Erklärung ab, dass ich meine Dissertation

Lokalanästhetika hemmen die Aktivität humaner NMDA Rezeptoren im *Xenopus laevis*
Expressionssystem: Die Rolle der Protein Kinase C

in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der
Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster unter Anleitung von
Priv.-Doz. Dr. med. Klaus Hahnenkamp

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hugo van Aken, FRCA, FANZA

1. selbständig angefertigt,
2. weder in der gegenwärtigen, noch in einer anderen Fassung als Dissertation,
Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt,
3. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und
sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
4. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe.

Dortmund, den 14.06.2011

Svenja Schauerte

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. METHODIK	3
2.1. <i>Xenopus laevis</i>	3
2.1.1. Eigenschaften	3
2.1.2. Haltung und Fütterung	4
2.1.3. Gewinnung der Oozyten.....	5
2.1.4. Aufbau der Oozyten	5
2.1.5. Präparation	6
2.2. Lösungen.....	7
2.2.1. Standardlösungen.....	8
2.2.2. Die Agonisten Glutamat und Glyzin.....	9
2.2.3. Lokalanästhetika	10
2.2.4. Der Protein Kinase C Inhibitor Chelerythrine.....	11
2.2.5. Der Protein Kinase C Aktivator PMA	11
2.3. Der NMDA-Rezeptor.....	11
2.3.1. Mikroinjektion	12
2.4. Elektrophysiologie	13
2.4.1. Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp	13
2.4.2. Software	15
2.5. Messvorrichtung.....	16
2.5.1. Messprotokoll.....	16
2.5.2. Studienprotokoll	17
2.6. Statistik	18
2.6.1. Deskriptive Statistik	18
2.6.2. Student´s t-Test	18
2.6.3. Rangsummen-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon).....	19
2.6.4. Hill-Gleichung	19

3. ERGEBNISSE	20
3.1. Native Oozyten exprimieren keinen NMDA-Rezeptor.....	20
3.2. NMDA-Rezeptor exprimierende Zellen reagieren auf Agonistenapplikation.....	20
3.3. Antworten auf den spezifischen und den physiologischen Agonisten sind identisch	22
3.4. Die Antwort der Oozyten ist von der Glutamatkonzentration abhängig	23
3.5. Die Antwort der Oozyten ist von der Glyzinkonzentration abhängig	24
3.6. Bolus- und Flow-Applikation des Agonisten erzeugen identische Ergebnisse	25
3.7. LA hemmen den NMDA-Rezeptor konzentrationsabhängig.....	27
3.8. Der Effekt der LA ist reversibel.....	29
3.9. Die Wirkung der LA ist stereoselektiv.....	31
3.10. Bupivacain hemmt die durch PMA erzeugte Stimulation der PKC.....	32
3.11. PKC-Inhibition und gleichzeitige LA-Anwendung führen zu keiner zusätzlichen Reduzierung des Signals.....	33
3.12. LA vom Ester- und Amidtyp zeigen die gleiche Wirkung.....	35
4. DISKUSSION	37
4.1. Modelldiskussion.....	37
4.1.1. Vor- und Nachteile des Modells.....	37
4.1.1.1. Die Expression des NMDA-Rezeptors	38
4.1.1.2. Das Studienprotokoll der elektrophysiologischen Messungen	39
4.1.1.3. Die Effekte von LA auf NMDA-Rezeptoren in anderen Modellen.....	39
4.1.1.4. Die Verwendung von Barium als Ladungsträger	40
4.1.1.5. Weitere Fehlerquellen	41
4.2. Der NMDA - Rezeptor.....	41
4.3. Lokalanästhetika.....	44
4.3.1. Die Effekte der LA vom Ester- und Amidtyp.....	44
4.4. Die Protein Kinase C	45
4.4.1. Der Wirkmechanismus der PKC.....	45
4.4.2. Der Aufbau der PKC.....	46
4.4.3. Die Regulation der PKC	46

4.4.4. Die Rolle der PKC.....	46
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	48
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	49
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	52
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	55
9. CURRICULUM VITAE.....	62
10. DANKSAGUNG.....	64
11. ANHANG.....	I
11.1. Tierversuchsgenehmigung der Bezirksregierung Münster.....	I

1. EINLEITUNG

Lokalanästhetika (LA) haben neben der allgemein bekannten Blockade von Natriumkanälen noch weitere interessante Effekte. Sie modulieren über unterschiedliche Mechanismen eine Vielzahl zellulärer Abläufe, wie die Gerinnung, die Entzündungsreaktion, die Fibrinolyse, die Plättchenaggregation und die Mikrozirkulation (24,25,28). Zusätzlich beeinflussen sie die Entstehung von Schmerzempfindungen. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl nach systemischer Gabe von niedrig dosiertem Lidocain, als auch nach einer Einzeldosis eines LA im Rahmen einer Spinalanalgesie deutlich seltener Hyperalgesien auftreten (11,21,37,38,75). Auch der postoperative Analgetikabedarf sinkt und Patienten klagen über weniger Schmerzen (11,22). Die genauen Mechanismen, die diesen Effekt verantworten, sind allerdings noch unbekannt.

Durch Koppert et al. wurde 1999 gezeigt, dass niedrig dosierte systemische LA das Auftreten von gesteigerter Schmerzempfindlichkeit über einen zentralen Wirkmechanismus reduzieren (37).

Kombiniert man dieses Ergebnis mit der Erkenntnis, dass NMDA-Rezeptoren an der Entstehung von Hyperalgesie und Opiattoleranz beteiligt sind (1,2,8,12,20,22,61,77), liegt die Vermutung nahe, dass der positive Effekt von LA auf postoperative Schmerzzustände teilweise auf die Hemmung der NMDA-Rezeptoraktivierung zurückzuführen ist und wird experimentell untersucht. Auch die Frage, ob es Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener LA gibt, wird berücksichtigt. So werden nicht nur LA vom Amid- und Estertyp miteinander verglichen, sondern auch der Einfluss der Stereoisomerie näher studiert.

Weiterhin wird untersucht, über welchen Mechanismus LA ihren hemmenden Einfluss auf die Rezeptoren ausüben. Bekannt ist, dass die Funktion der NMDA-Rezeptoren größtenteils über den Zustand der Phosphorylierung geregelt wird (81,83). Eine bedeutende Rolle spielt hierbei die Protein Kinase C (PKC). Sie aktiviert den Rezeptor durch Phosphorylierung des C – terminalen Segments (45,47). Daher untersucht diese Studie zusätzlich die Hypothese, dass LA die Aktivität des NMDA-Rezeptors indirekt über Hemmung der PKC beeinflussen.

Folgende Fragen liegen der Arbeit zugrunde:

1. Wie wirken sich LA auf die Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch die physiologischen Agonisten Glutamat und Glyzin aus?
2. Ist der Effekt der LA reversibel?
3. Besteht ein Wirkungsunterschied zwischen LA vom Amid- und Estertyp?
4. Wie ist der Wirkmechanismus der LA?

2. METHODIK

2.1. *Xenopus laevis*

Für die Arbeiten und Experimente lag die Genehmigung der Bezirksregierung Münster mit der Referenznummer A 40/2000 vor.

2.1.1. Eigenschaften

Die Untersuchungen werden an Oozyten des Südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* durchgeführt. Sie gehören zu der Gattung der Zungenlosen (Pipidae). Krallenfrösche sind aquatile (also ständig unter Wasser lebende) Tiere. Sie atmen über Lungen und zum Teil auch über die Haut. Der Körper ist eiförmig und trägt einen kleinen Kopf. An den schwachen Vorderbeinen befinden sich die vier Finger ohne Schwimmhäute mit den 3 namensgebenden dunklen Krallen. Sie dienen der Futtersuche und helfen beim Fressen. Die Hinterbeine hingegen sind stark muskulös. Zwischen den fünf Zehen befinden sich Schwimmhäute. Der Rücken ist dunkel (braun-grau-grünlich), der Bauch und die Schenkelunterseiten meist beige. Die Weibchen wachsen schneller als die Männchen und sind zusätzlich an der ausgestülpten, wulstigen Kloakenpapille zu erkennen. In der Forschung sind *Xenopus laevis* beliebte Versuchstiere. Früher nutzte man die Reaktion der Frösche auf das Humane Choriongonadotropin (HCG) in der Schwangerschaftsdiagnostik (65). Daher kam auch die Bezeichnung Apothekerfrosch. Mittlerweile werden die Eizellen wegen des guten Translationsapparates geschätzt. Nach Injektion von artfremder messenger-RNA exprimieren sie das korrespondierende Protein (23,50). Dadurch wurde in elektrophysiologischen Untersuchungen an Oozyten ein wichtiger Beitrag zum Verständnis G-protein-gekoppelter Rezeptoren und anderer Membranproteine geleistet. Es gelingt sogar die Expression von funktionellen Neurotransmitterrezeptoren und Ionenkanälen in Oozyten (6,72). Auch bei der Identifizierung von Gensequenzen und der Kontrolle von Genen bei der DNA-Klonierung (23,50) spielen sie eine entscheidende Rolle.

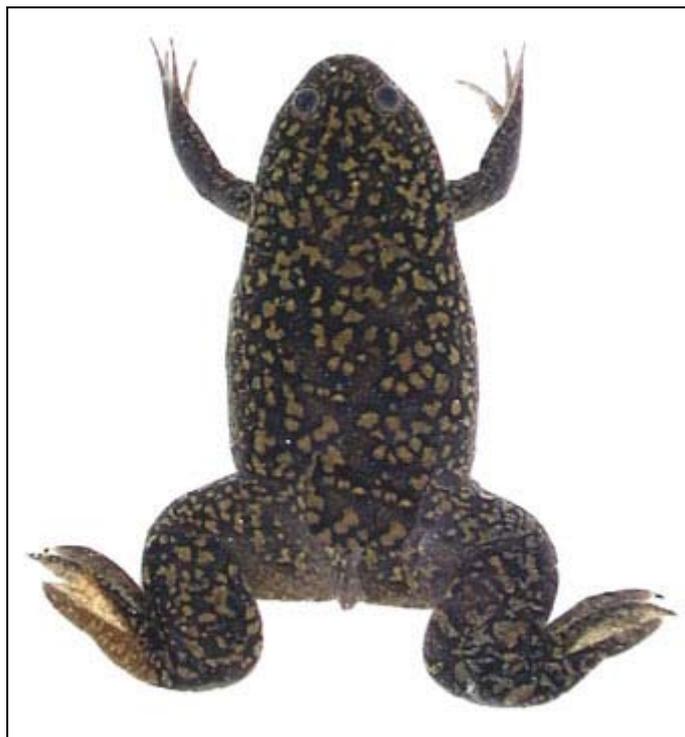


Abbildung 1: *Xenopus laevis*, ausgewachsenes Weibchen

2.1.2. Haltung und Fütterung

Die Tiere der Gattung *Xenopus laevis* werden von der Firma Kähler (20249 Hamburg, Deutschland) bezogen. Die Kolonie besteht aus sechs weiblichen Tieren des afrikanischen Krallenfrosches und wird in einem 250 l fassenden Tank gehalten. Der Behälter ist zu 2/3 mit Wasser gefüllt. Dieses muss zuvor mindestens 48 h abstehen. Die Qualität wird durch eine chemische Aufbereitung (Aqua-Safe[®], Tetra GmbH; 43904 Melle, Deutschland) und einen Ionenaustauscher (Klarfilter 77SN, Cillit; 69191 Schriesheim, Deutschland) gesichert. Um das Herausspringen der Frösche aus dem Becken zu vermeiden, ist es mit einer Plexiglasscheibe zugedeckt. Zusätzlich sind Tonrohre und -ziegel als Versteckmöglichkeiten eingebracht. Eine an eine Zeitschaltuhr (Typ 46402, Unitec; 63450 Hanau, Deutschland) gekoppelte Leuchtstoffröhre (Typ Multilux, Juwel Aquarium GmbH; 27356 Rotenburg/Wümme, Deutschland) imitiert einen 12 h Tag-/ Nachtrhythmus. Die Raumtemperatur liegt konstant zwischen 18 - 20° C. Durch eine Saugpumpe (Typ 2224, Eheim GmbH; 73779 Deizisau, Deutschland) wird das Wasser kontinuierlich umgewälzt, gefiltert und mit Sauerstoff angereichert. Die Fütterung findet 2-mal pro Woche mit handelsüblichem Froschfutter statt. Um die Frösche unterscheiden zu können, werden sie

in Narkose mit flüssigem Stickstoff auf dem Rücken markiert. In der gleichen Sitzung injiziert man den Weibchen 500 IE Gonadotropin (Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH; 30926 Seelze, Deutschland) in den dorsalen Lymphsack, um die Follikelreifung zu stimulieren und bessere Erträge bei der Oozytengewinnung zu erzielen (66).

2.1.3. Gewinnung der Oozyten

Der zu operierende Frosch wird für ca. 15 – 20 min in ein separates Becken mit einer 0,2 prozentigen Methyl-3-Benzooat-Lösung (WA 17475, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH; 30926 Seelze, Deutschland) gesetzt. Das Betäubungsmittel wird über die Schleimhaut absorbiert. Die ausreichende Narkosetiefe wird durch ausbleibende Reaktionen auf leichte Schmerzreize bestätigt. Für die Operation lagert man das Weibchen in Rückenlage auf zerstoßenem Eis. Die Hypothermie wirkt unterstützend auf die Narkose. Der Operationsbereich im unteren lateralen Bauchbereich wird gesäubert und über einen 1 cm langen Hautschnitt erfolgt die schichtweise Präparation der Faszien, Muskeln und des Peritoneums. Besondere Vorsicht gilt hierbei dem Darm, der unter keinen Umständen verletzt werden darf. Ist das Peritoneum geöffnet, entnimmt man mit Hilfe einer Pinzette einen ca. 200 Eizellen umfassenden Lappen aus dem Ovar. Die Wunde wird in zwei Schichten mit resorbierbaren Einzelknopfnähten (Vicryl 4-0, Ethicon GmbH; 22851 Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Nach Beendigung des Eingriffs wird das Tier zum Abbau der Narkose für 24 h in einem eigenen Becken mit frischem Wasser gehalten und bei einem weiteren unauffälligen Verlauf in die Kolonie zurückgesetzt.

2.1.4. Aufbau der Oozyten

Die Oogenese von *Xenopus laevis* kann in sechs Stadien unterteilt werden. Die in dieser Studie benutzten Oozyten der Reifestadien V und VI (17) haben einen Durchmesser von ca. 1 mm. Sie besitzen einen animalischen, durch zytoplasmatische Granula bräunlich pigmentierten und einen vegetativen, hell gelblich-grünen Pol. Die beiden Hemisphären sind durch ein unpigmentiertes Äquatorialband voneinander getrennt (79). Im Bereich des helleren Pols befindet sich überwiegend die zelluläre RNA (10). Der Zellkern und große Teile des endoplasmatischen Retikulums liegen in der dunklen Hemisphäre (69). Die Zelle

ist von mehreren Hüllen umgeben (15,18). Von innen nach außen finden sich folgende Schichten (15):

- eine glykoproteinhaltige Vitellinmembran
- die Follikelzellschicht, über Gap-junctions mit der Oocyte in Kontakt
- die Theka, bestehend aus kollagenem Bindegewebe, Fibroblasten, Nerven- und Gefäßzellen und glatter Muskulatur
- das einschichtige Plattenepithel des inneren Ovariepithels

Diese Hüllen stabilisieren einerseits die Oozyte (48,68), behindern jedoch die elektrophysiologischen Untersuchungen (51,53). Deshalb werden bis auf die Vitellinmembran alle Schichten durch proteolytische Enzyme entfernt, siehe hierzu den Abschnitt Präparation.

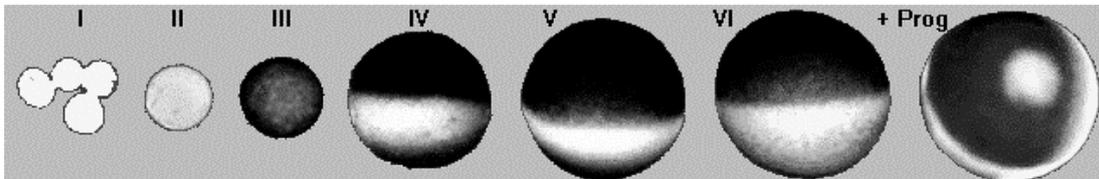


Abbildung 2: *Xenopus laevis* Oozyten, schematische Einteilung nach Dumont

2.1.5. Präparation

Der Vorgang, die Oozyten von ihren verschiedenen Follikelhüllen zu befreien, wird Defollikulation genannt. Es besteht die Möglichkeit dies entweder mechanisch oder enzymatisch zu unternehmen (15,17). Die von uns verwendeten Zellen wurden ausschließlich enzymatisch durch Kollagenase (Clostridiopeptidase A, EC 3.4.24.3 von *Clostridium histolyticum*, Boehringer Mannheim GmbH; 68298 Mannheim, Deutschland) defollikuliert.

Mit 2 Pinzetten trennt man das Follikelläppchen vorsichtig in kleinere Stücke. Dadurch vergrößert sich die Angriffsfläche für die Kollagenaselösung. Das Enzym Kollagenase wird in Oocyte-Ringer-Solution 2 (OR-2-Lösung) in der Konzentration 1 mg/ml gelöst. Die Einwirkzeit der Lösung auf die Oozyten beträgt bis zu 2 h, in denen das Gemisch auf einem IKA-Schüttler (Modell MTS 4; IKA-Werke, 79219 Staufen, Deutschland) behutsam geschwenkt wird. Unter dem Mikroskop lässt sich der Defollikulationsgrad kontrollieren. Ist dieser ausreichend, werden die Zellen mehrmals mit OR-2-Lösung gespült. Dadurch wird die Enzymwirkung gestoppt und übrige Follikelhaut- und Zellbestandteile können

abgegossen werden. Die vollständig defollikulierten Zellen werden in einer mit Modifizierter-Barth-Lösung (MBS) gefüllten Petrischale bei 16 – 18° C in einem Inkubator aufbewahrt. Bevor die Oozyten für elektrophysiologische Experimente oder mRNS -Injektionen benutzt werden können, müssen sie für ca. eine Stunde ruhen (79).



Abbildung 3: Defollikulierte Oozyten des Stadiums V und VI

2.2. Lösungen

Die Grundlage aller Lösungen bildet destilliertes und deionisiertes Wasser. Die jeweiligen Substanzen werden gemäß den weiter unten angegebenen Konzentrationen abgewogen und unter Durchmischung mit einem Magnetrührer (RH basic 2 IKAMAG[®], IKA[®] Werke GmbH & Co. KG; 79219 Staufen, Deutschland) in der entsprechenden Menge Wasser gelöst. Mit einem pH-Meter (Knick, Typ 507; 48249 Dülmen, Deutschland. pH-Elektrode von Schott, Blueline 12 pH; 55122 Mainz, Deutschland) ermittelt man den pH-Wert und korrigiert diesen gegebenenfalls durch Zugabe von 1 molarer NaOH- bzw. HCl-Lösung auf den benötigten Wert.

Levobupivacain wurde bezogen von Abbott (Eindhoven, Netherlands), S-(-)-Ropivacain von der Fa. AstraZeneca, Deutschland und R-(+)-Ropivacain von Astra USA (Astra USA Inc., Westborough, USA). Alle anderen Chemikalien stammen von der Fa. Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH; 30926 Seelze, Deutschland).

2.2.1. Standardlösungen

Barium-Tyrodes (Tyr-Ba):

Die calcium- und magnesiumfreie-Tyrodes-Lösung dient neben der Verdünnung von Konzentrationsreihen hauptsächlich als Spülflüssigkeit bei den Messungen. Die Oozyten von *Xenopus laevis* besitzen physiologischer Weise calciumabhängige Chloridkanäle (44,79). In der Spülflüssigkeit enthaltenes Calcium würde diese Kanäle aktivieren und die Messergebnisse verfälschen. Barium hat nur einen sehr geringen bis gar keinen Einfluss auf diese Kanäle (79). Daher haben wir den Ladungsträger Calcium durch Barium ersetzt. Der Verzicht auf Magnesium erklärt sich durch die dadurch hervorgerufene Rezeptorblockade. Die genaue Zusammensetzung lautet wie folgt:

Substanz	Menge
Bariumchlorid (BaCl ₂)	10 mM
Dextrose	10 mM
Kaliumchlorid (KCl)	5 mM
Natriumchlorid (NaCl)	150 mM
Tris-HEPES	10 mM

pH-Wert 7,4

Modified Barth Solution (MBS):

Hauptsächlicher Verwendungszweck der MBS ist die Aufbewahrung der Oozyten. Gerade nach der Defollikulation und Mikroinjektion sind die Zellen aufgrund der angegriffenen Zellmembran besonders gefährdet durch bakteriellen Befall. Daher werden der Lösung Antibiotika zugesetzt. Bevor dies geschieht wird die Lösung autoklaviert, um potenzielle Erreger schon im Vorfeld abzutöten. Der pH-Wert ist auf 7,4 einzustellen.

Substanz	Menge
Calciumchlorid (CaCl ₂)	0,41 mM
Calciumnitrat (Ca ₂ NO ₃)	0,3 mM
Gentamicin	0,1 mg/ml
Kaliumchlorid (KCl)	1 mM
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	0,82 mM
Natriumchlorid (NaCl)	88 mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	2,4 mM
Penicillin	0,1 mg/ml
Tris-HEPES	15 mM

Oocytes-Ringer-Solution (OR-2):

Die OR-2-Lösung ist bei der Defollikulation von Bedeutung. In ihr wird die Kollagenase gelöst. Weiterhin dient sie als Spülflüssigkeit, um die Kollagenasereaktion zu stoppen. Auch diese Lösung ist frei von Calcium, da es durch Calcium zur Aktivierung von Proteasen kommt, welche die Oozyten schädigen (51). Der pH-Wert wird auf 7,5 eingestellt.

Substanz	Menge
Kaliumchlorid (KCl)	2 mM
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1 mM
Natriumchlorid (NaCl)	82,5 mM
Tris-HEPES	5 mM

2.2.2. Die Agonisten Glutamat und Glyzin

Am NMDA-Rezeptor unterscheidet man den spezifischen Agonisten NMDA vom physiologischen Agonisten Glutamat und Glyzin. Im Körper wird Glutamat auf einen adäquaten Stimulus hin aus nozizeptiven Schmerzfasern in den synaptischen Spalt ausgeschüttet (64). Glyzin hingegen liegt ständig in ausreichender Konzentration im

synaptischen Spalt vor, sodass bei gleichzeitiger Anwesenheit der Rezeptor aktiviert werden kann (30). Nur wenn beide Agonisten anwesend sind, kann es zur erfolgreichen Stimulation kommen. Man spricht in diesem Fall von Co-Agonisten.

Glutamat und Glyzin werden in Tyr-Ba verdünnt und miteinander zu einer 10^{-5} molaren Lösung gemischt. Die Agonistenlösung wird mehrmals in der Woche erneuert, um einen Wirkungsverlust zu vermeiden.

2.2.3. Lokalanästhetika

Lokalanästhetika sind schwach basische Amine, die lipophil sind. Als saures Salz reagieren sie hydrophil. In der wässrigen Injektionslösung bildet sich ein Gleichgewicht zwischen dem dissoziierten, wasserlöslichen Kation und der nichtdissoziierten, lipidlöslichen Base. Sie unterliegen der Henderson-Hasselbach-Gleichung, bei der die nichtionisierte und ionisierte Form im Gleichgewicht stehen:

$$\text{pH} = 6,11 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

Bestimmt wird dieses Gleichgewicht durch die Dissoziationskonstante K_a , einer substanzspezifischen Größe, welche gemäß dem Massenwirkungsgesetz in Abhängigkeit zum pH-Wert steht. Liegen gleich viele Moleküle in ionisierter und nicht ionisierter Form vor, ist der pH-Wert gleich dem $\text{p}K_a$ -Wert. Für die meisten LA liegt dieser Wert zwischen dem pH-Wert 7,5 und 9. Da nur lipophile, somit nichtionisierte Moleküle die Zellmembran ohne Hilfe von Pumpen oder Kanälen durchdringen können, ist es für unsere Versuche also wichtig, möglichst wenig ionisierte Moleküle in der Lösung vorliegen zu haben und trotzdem nah am physiologischen pH-Wert zu bleiben. Nachdem die ungeladenen Moleküle den Lipidlayer passiert haben, werden sie gemäß der Henderson-Hasselbach-Gleichung bei dem dort vorherrschenden Milieu zum größten Teil wieder in die ionisierte und aktive Form überführt.

Die Versuche werden mit den in der klinischen Praxis am häufigsten benutzten LA durchgeführt.

Ausgehend vom kristallinen Pulver der jeweiligen LA wird eine 0,5 prozentige Lösung hergestellt (0,5 g/100 ml Tyr-Ba). Durch schrittweises Verdünnen um den Faktor 10 werden Verdünnungsreihen im Bereich von mM bis μM angesetzt.

2.2.4. Der Protein Kinase C Inhibitor Chelerythrine

Die Protein Kinase C aktiviert den NMDA-Rezeptor über die Phosphorylierung des C-terminalen Segments (45,47). Chelerythrine als Inhibitor der Protein Kinase C reduziert den Phosphorylierungsgrad und damit die Aktivität des Rezeptors.

Chelerythrine liegt als orangenes, schwer lösliches Pulver vor und wird in DMSO und Wasser zu einer 5×10^{-5} M Lösung verdünnt.

2.2.5. Der Protein Kinase C Aktivator PMA

Der Phorbolster PMA gilt als Aktivator der Protein Kinase C. Er sorgt für eine Zunahme der Phosphorylierung der PKC und aktiviert somit indirekt den NMDA-Rezeptor. PMA wird in MBS zu einer 10^{-6} M Lösung verdünnt.

2.3. Der NMDA-Rezeptor

Der getestete NMDA-Rezeptor besteht aus NR1 und NR2 Untereinheiten. Die von uns benutzten Subtypen NR1A, bestehend aus ca. 3000 Basenpaaren (bp), und NR2A, ca. 5500 bp, erhielten wir von Dr. P. J. Whiting (Neuroscience Research Centre, Merck Sharp & Dohme, Harlow, Essex, UK) als komplementäre DNS (cDNA) in pcDNA1/Amp Vektoren. Die Plasmide wurden in pBluescript transformiert und positive Klone auf einem Nährmedium angezüchtet. Sie konnten so auf die gewünschte Menge amplifiziert werden. Um mittels In-Vitro-Transkription eine komplementäre RNS (cRNA) zu erhalten, mussten die Plasmide zuvor mit Restriktionsenzymen linearisiert werden. Die Nuklease XbaI durchtrennt die Plasmidringe der Untereinheit NR1A an einer definierten Stelle. Ebenso verfährt die Nuklease EcoRV mit den Plasmiden der Untereinheit NR2A. Die Umschreibung in RNS geschah unter Einbeziehung eines kommerziell erhältlichen Kits (mMessage mMachine™ T7 Kit; Ambion Inc., Austin Texas, USA). Darin enthalten waren die Startsequenz, die Ribonukleotide ATP, UTP, GTP und CTP, die Bakteriophagen-

RNA-Polymerase T7 und der Ribonukleaseinhibitor RNAsin. Zusammen mit der aufgearbeiteten cDNA wurden diese Substanzen für 1 h im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Durch Hydrolyse der als Matrize dienenden cDNA wird die mRNA-Synthese gestoppt. Dies geschah durch 15-minütige DNase-Zugabe. Nach Hitzedenaturierung wurde eine 7-Methylguanosingruppe an das Kopfende geheftet. Das 3'-OH-Ende hingegen wurde polyadeniert. Im Weiteren wurden 25 µl Lithiumchloridlösung und 30 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und das Gemisch für 1 h bei -20° C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren bei 15000 U/min wurde der Überstand abpipettiert, das Sediment mit 70 prozentigem Ethanol aufgefüllt und erneut zentrifugiert, um freie Ribonukleotide zu entfernen. Anschließend wurde der Alkohol vaporisiert und das entstandene Pellet in RNase-freiem Wasser gelöst. Die Konzentration der so erhaltenen mRNA wurde photometrisch ermittelt und anschließend mit RNase freiem Wasser auf 0,2 ng/µl verdünnt. Beide Untereinheiten wurden in einem Gewichtsverhältnis von 1:5 gemischt, zentrifugiert und bis zum Gebrauch bei -80° C portionsweise aufbewahrt. Dieses Verhältnis ist notwendig, um einer homomeren Rezeptorexpression vorzubeugen.

2.3.1. Mikroinjektion

Ziel der Mikroinjektion ist die Expression des NMDA-Rezeptorkomplexes auf der Oozytenmembran. Dazu werden den zuvor defollikulierten Oozyten des Stadiums V und VI nach Dumont (17) mittels eines halbautomatischen Microinjectors (Nanoject; Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) 32,2 nl der vorbereiteten NR 1A/2A kodierenden mRNA injiziert. Dies entspricht 6 ng der NR1/NR2A Untereinheiten in einem Verhältnis von 1:5, gelöst in 30 nl RNase freiem Wasser.

In einem vertikalen, mikroprozessor-gesteuerten Elektrodenpuller (Micropipette Puller, P 30, Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA) werden Silikatglaskapillaren (Hilgenberg GmbH; 34323 Malsfeld, Deutschland) ausgezogen. Unter Sicht durch eine Stereolupe (Stereo-Zoom 4, Leica Microsystems GmbH; 64625 Bensheim, Deutschland) wird die Spitze der Kapillare in einen Wassertropfen getaucht und auf einen Durchmesser von ca. 10 µm gebrochen. Die blasenfrei mit Mineralöl (M 5904, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH; 30926 Seelze, Deutschland) befüllte Kapillare spannt man in den Microinjector ein. Die Spitze des Injektors gleitet in der Glaskapillare und ermöglicht es, je nach Programmierung, genau definierte Mengen der RNS zu injizieren.

Auf eine mit sterilem Laborfilm (Parafilm M, Laboratory Film, American National Can; Greenwich, CT, USA) beklebte Petrischale werden mit einer Handpipette 2-3 μ l der aufgetauten mRNA gegeben. Mittels des Mikromanipulators (MN-3333, Narishige International USA INC.; East Meadow, NY, USA) taucht man die Spitze der Kapillare in den Tropfen. Dieser wird daraufhin durch den Mikroinjektor in die Injektionskapillare gesogen. Man kann dabei deutlich die Bildung eines Öl-Wasser-Spiegels erkennen. Bei der Injektion schwimmen die Oozyten in einer mit MBS gefüllten Petrischale und werden unter der Stereolupe positioniert. Die Spitze der Kapillare wird in die helle Hemisphäre der Zelle eingestochen und nach betätigen des Injektors wird die gewünschte Menge von 32,2 nl mRNA injiziert. Das erfolgreiche Einbringen der mRNA ist anhand der Größenzunahme des Eizelldurchmessers zu kontrollieren. Bevor die Zellen für die Messungen zu Verfügung stehen, werden sie für 48-72 h in MBS bei 16° C inkubiert. Täglicher Wechsel des Mediums und das Entfernen beschädigter Zellen erhöhen den Ertrag brauchbarer Zellen.

2.4. Elektrophysiologie

2.4.1. Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp

Die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik ist eine etablierte Methode zur Untersuchung von Membranpotentialen großer Zellen (60). Das Grundprinzip funktioniert folgendermaßen:

Das Membranpotential der Zellen wird konstant bei einem bestimmten Wert gehalten (geclamped) und der Strom gemessen, der zur Aufrechterhaltung dieses Potentials notwendig ist (27). Die Ladungsverluste über Kanalöffnungen werden ausgeglichen und die dafür notwendige Ladung als Messparameter aufgezeichnet. Der Begriff Membranpotential bezeichnet die Spannung, bei welcher der Ladungsaustausch über die Membran in beide Richtungen gleich groß ist. In dieser Studie werden die Oozyten auf einem Membranpotential von -70 mV gehalten. Dazu benötigt man zwei Elektrodenpaare, von denen jeweils eine intrazellulär und eine extrazellulär liegt. Die intrazellulär liegenden Elektroden bezeichnet man auch als Mikroelektroden. Die Spannungselektrode mit einem Widerstand (R) von 1-2 M Ω hat einen Spitzendurchmesser von 3-5 μ m. Der Durchmesser der Spitze der Stromelektrode soll bei 7-9 μ m liegen. Der Widerstand beträgt 0,5-0,7 M Ω . Die Elektroden werden blasenfrei mit 3 molarer Kaliumchloridlösung gefüllt und in die

Elektrodenhalter (ESW-FxxV für die Spannungs- und E45W-FxxVH für die Stromelektrode; Warner Instrument Corporation) eingespannt, welche wiederum auf den Mikromanipulatoren (MN-3333; Narishige International USA INC., East Meadow, NY, USA) befestigt sind. Dadurch ist es möglich unter Sicht durch eine Stereolupe (Stereo-Zoom 4, Leica Microsystems GmbH; 64625 Bensheim, Deutschland) die Mikroelektroden präzise in die Eizellen einzustechen. Um die elektrische Leitung zu gewährleisten taucht ein Silberdraht (AGT10-W, Harvard Apparatus LTD) in die Kaliumchloridlösung. Durch Chlorierung des Drahtes wird das Potential zur Lösung erniedrigt und es kommt zu einem reibungslosen Stromverlauf. Zwei Silberdrähte in der Messkammer bilden die jeweiligen extrazellulär liegenden Elektrodenpartner. Eine bildet die Erdungselektrode und die andere die Bezugselektrode für die Spannungselektrode und dient der Ermittlung des Membranpotentials. Der dafür benötigte Strom wird über die Strom- und Erdungselektrode bestimmt. Die Elektroden sind mit dem Oozyten-Klemm-Verstärker (Oocyte Clamp Amplifier Model OC-725C; Warner Instrument Corporation) verbunden, mit dem sich ein Membranpotential einstellen und die dazu nötige Ladungsmengen applizieren lässt. Um die Messungen auch erfassen und in einem PC speichern zu können, ist noch ein Artefakte reduzierender Filter (WIC: LPF-100B: Low Pass Bessel Filter, 4-Pole) nachgeschaltet.

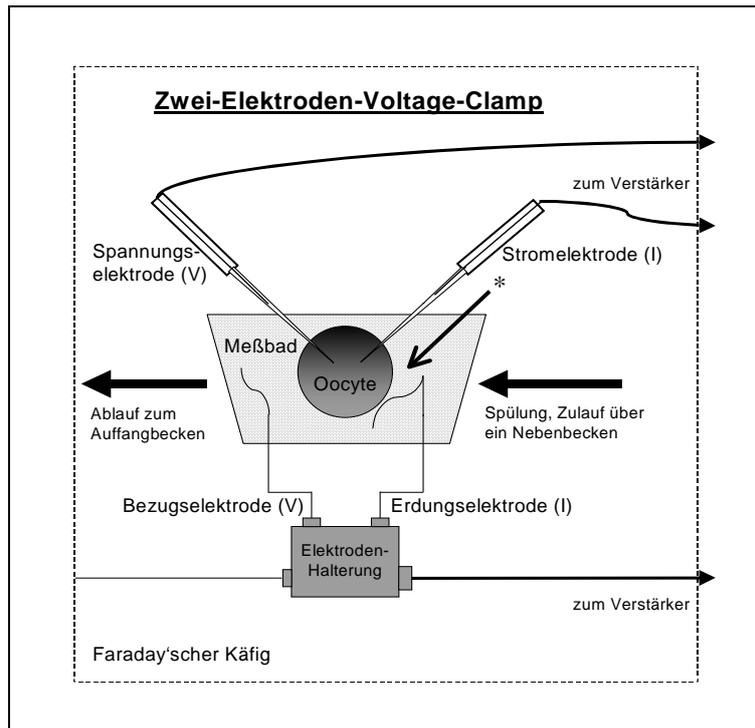


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik. Die Oocyte wird im Meßbad von der Spülflüssigkeit umspült und mit beiden Elektroden punktiert. Das Membranpotential wird durch die Spannungs- und Bezugselektrode bestimmt. Der Strom, der notwendig ist, um das Membranpotential auf -70 mV zu halten, wird über die Stromelektrode zugeführt. Die benötigte Strommenge errechnet der Verstärker durch Verschaltung mit der Erdungselektrode. Die in ihrer Wirkung auf die expremierten NMDA-Rezeptoren zu untersuchenden Substanzen werden in das Meßbad gegeben (*).

2.4.2. Software

Mit der oben beschriebenen Methode können Ionenströme über die Membran elektrophysiologisch erfasst werden. An die dafür verwendete Software werden besondere Anforderungen gestellt. Die Oozyten haben ein großes Volumen und dadurch auch eine große Membrankapazität. Das Programm muss also große Ströme verarbeiten können. Weiterhin dauern rezeptorgesteuerte Potentialsteuerungen oft über Minuten an. Die von uns genutzte Ooclamp-Software ist auf diese Anforderungen abgestimmt worden (19). Um Störeinflüsse durch das normale Stromnetz zu minimieren, wird das Signal mit 125 Hz aufgezeichnet. Aufgezeichnet und gespeichert wird ein Intervall von 120 sec, wobei die Messung schon 5 sec vor der Agonistengabe beginnt. Das Signal wird umgehend graphisch dargestellt, d.h. die Messungen können in Echtzeit verfolgt werden. Dadurch können

Messungen mit Zellen, die nicht in der Lage sind, das Membranpotential zu halten, direkt erkannt und jederzeit abgebrochen werden. Gleichzeitig ermöglicht das Programm eine einfache Auswertung der Daten. Die Veränderung des Membranpotentials durch einen Bariumstrom in die Zelle nach entsprechender Aktivierung des Rezeptors wird in μA gemessen und sowohl durch das Integral als auch durch den Wert des maximalen Einwärtsstroms widerspiegelt.

2.5. Messvorrichtung

Im Zentrum der Messvorrichtung befindet sich ein Kunststoffbad mit einem Volumen von 0,5 ml, in welches in eine mittige Vertiefung die Oozyte gelegt wird. Die Mikroelektroden werden an beiden Seiten so positioniert, dass sie problemlos in die Zellen eingestochen werden können. Eine Stereolupe erleichtert die Beobachtung. Der Zulauf für die Spülflüssigkeit (Tyr-Ba) und die Agonisten befindet sich an der linken Seite des Wasserbades. Um ein gleichmäßiges Umspülen der Zelle und Durchlaufen der Messkammer zu garantieren wird der Fluss auf 5 ml/min eingestellt. An der gegenüberliegenden Seite des Bades befindet sich eine Vakuumpumpe, die überflüssige Flüssigkeit absaugt und so einen kontinuierlichen Fluss ermöglicht. Die für die elektrophysiologischen Messungen benötigte Apparatur ist im Kapitel 2.4. beschrieben.

2.5.1. Messprotokoll

Eine einzelne Oozyte wird in die 0,5 ml fassende Messkammer gelegt und mit der Spüllösung mit einem konstanten Fluss von 5 ml/min umspült. Die Spülflüssigkeit (Tyr-Ba) ist frei von Magnesium- (Mg^{2+} blockiert den NMDA-Rezeptorkomplex) und Kalziumionen (Kalzium stimuliert endogen vorhandene Chloridkanäle). Als Ladungsträger dienen Bariumionen. Am Boden der Kammer findet sich eine kleine Einkerbung, damit die Zelle nicht wegschwimmt. Die dunkle nach oben zeigende Hemisphäre besitzt die größere Rezeptordichte und wird von den Mikroelektroden penetriert. Vor dem Einstechen werden sie jedoch in der Spüllösung kalibriert. Halten die Zellen über 1 min das Membranpotential von -70 mV und wird dazu kein größerer Strom als $1 \mu\text{A}$ benötigt, sind sie für die Messungen geeignet. Die Messung wird gestartet und die Zelle nach 5 sec für 20 sec mit dem Agonisten perfundiert. Der Fluss beträgt ebenfalls 5 ml/min. Der Agonist wird durch

die Spüllösung wieder ausgewaschen und die Messung läuft weiter, sodass eine Messung insgesamt 120 sec andauert. Gemessen wird die Veränderung des Membranpotentials durch einen Bariumeinstrom in die Zelle nach entsprechender Aktivierung des Rezeptors. Die Ströme zur Wiederherstellung des Ausgangswertes werden registriert, der Spitzenstrom ermittelt und die Daten gespeichert. Dieser Messvorgang wiederholt sich ständig, sowohl bei den Kontrollzellen, als auch bei zuvor in verschiedenen Medien inkubierten Zellen.

2.5.2. Studienprotokoll

Die vorbereiteten Oozyten wurden in die Messvorrichtung eingespannt. Messungen erfolgten zunächst mit dem physiologischen Agonisten Glutamat (10^{-5} M), bzw. dem rezeptorselektiven Agonisten NMDA (10^{-3} M), in Kombination mit dem obligatorischen Co-Agonisten Glyzin (10^{-5} M) in EC_{50} Konzentration. Die EC_{50} Konzentrationen der Agonisten Glutamat und Glyzin wurden in anderen Untersuchungen für dieses Modell ermittelt. Als Kontrollgruppe wurden NMDA-Rezeptor exprimierende Zellen gemäß dem obigen Messprotokoll mit den physiologischen Co-Agonisten Glutamat und Glyzin (jeweils 10^{-5} M) für 20 sec umspült und die Messung aufgezeichnet.

Um die Wirkung der LA zu untersuchen, wurden NMDA-Rezeptor exprimierende Oozyten zunächst für jeweils 10 min in den verschiedenen LA inkubiert und dann gemäß dem Protokoll gemessen. Es wurden Bupivacain, Levobupivacain und S-(-)-Ropivacain in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-4} M, R-(+)-Ropivacain 10^{-4} M und Procain 10^{-4} M getestet. Der Einfluss der Protein Kinase C (PKC) wurde untersucht. Vor der Messung erfolgte die Inkubation der Zellen im PKC Hemmstoff Chelerythrine (5×10^{-5} M) für zunächst 50 min und daraufhin für weitere 10 min in einem Gemisch aus Chelerythrine (5×10^{-5} M) und Bupivacain 10^{-4} M.

Zur Beurteilung des hemmenden Effektes der LA bzgl. der PKC Aktivierung in NMDA-Rezeptor exprimierenden Oozyten gab es zwei Ansätze. Die erste Gruppe der Zellen wurde zunächst für 5 min in ein Gemisch aus PMA (10^{-6} M) (PKC-Aktivator, Phorbol ester) und Bupivacain (10^{-4} M) gefolgt von weiteren 5 min in Bupivacain (10^{-4} M) eingelegt. In der zweiten Gruppe erfolgte eine nacheinander folgende Inkubation von 5 min in 10^{-6} M PMA und 10 min 10^{-4} M Bupivacain.

Für die Reversibilitätstestung wurde das Studienprotokoll leicht abgewandelt, es erfolgten mehrere Messungen an einer Zelle. Zunächst erfolgte die Messung der Antwort auf den

Agonisten, diese diente als Kontrollwert. Nach 10-minütiger Inkubation des LA 10^{-4} M erfolgte die erneute Messung der Antwort auf Agonistengabe, gefolgt von einer weiteren Messung nach 10-minütiger Auswaschung des LA durch MBS.

2.6. Statistik

Die Daten werden mittels eines IBM kompatiblen PC erfasst und ausgewertet. Zur weiteren statistischen Auswertung und graphischen Darstellung werden die Computerprogramme Sigmaplot 5.0 und Sigmastat (Statistical Solutions; Saugus, MA, USA) verwendet.

2.6.1. Deskriptive Statistik

Die deskriptive Statistik dient der ersten Veranschaulichung, ob es zwischen zwei Gruppen verschiedene Häufigkeitsverteilungen bzgl. bestimmter Merkmale gibt. Mittelwert, Median, Standardabweichung und Minimal- bzw. Maximalwerte der Variablen werden bestimmt. Offenbaren sich Unterschiede zwischen den Gruppen, folgt eine weitere Analyse hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p liegt bei $p \leq 0,05$.

Alle Ergebnisse bestehen aus Messungen an mindestens 10 Oozyten von wenigstens 3 nicht identischen Fröschen. Dieses Vorgehen dient der Berücksichtigung der allgemeinen Variabilität, da sich sowohl die Zellen verschiedener Tiere, als auch die eines Tieres bzgl. Größe, Reifestadium und Alter stark unterscheiden können.

2.6.2. Student's t-Test

Die Studentische Verteilung ist eine statistische Methode zur Beurteilung und Auswertung von Messergebnissen unter Berücksichtigung der vorliegenden Anzahl von Einzelergebnissen und der Freiheitsgrade des Systems. Unter den Freiheitsgraden f wird die Anzahl der frei und unabhängig voneinander variablen Messwerte einer Messreihe verstanden. In dieser Studie wird der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Getestet wird, ob in normalverteilten (parametrischen) Ergebnisreihen, bezogen auf den

Mittelwert und die Standardabweichung, eine Abweichung zwischen zwei Gruppen zufällig besteht.

2.6.3. Rangsummen-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon)

Der Rangsummen-Test wird hinzugezogen, wenn es sich um nicht normalverteilte Ergebnisreihen handelt. Es handelt sich um einen Test für unverbundene Stichproben mit stetigen Merkmalen. Die Varianz soll in den beiden zugehörigen Grundgesamtheiten gleich verteilt sein. Eine Überprüfung auf Übereinstimmung der Lage findet ebenfalls statt.

2.6.4. Hill-Gleichung

Die Dosis-Wirkungskurven werden mit Hilfe der Hill-Gleichung erstellt:

$$f(x) = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) \left(1 - \frac{x^n}{x_{50} + x^n} \right)$$

Wobei y_{\min} und y_{\max} die Extremwerte der Antworten, n den Hillkoeffizienten und x_{50} den Punkt der halbmaximalen Antwort darstellen. Sind y_{\min} und y_{\max} bekannt und ist x_{50} abzuschätzen, kann mittels Näherung aus den Werten der Ordinate und der Abszisse der optimale Kurvenverlauf sowie die Abweichungen von der Kurve quantifiziert werden. Der Hillkoeffizient n ist außerdem ein Maß dafür, wie viele Liganden benötigt werden, um den Rezeptor zu stimulieren. Er sollte unter optimalen Bedingungen also möglichst gut einer ganzen Zahl entsprechen ($n = 1, 2, 3$ etc.). Die Güte der angepassten Kurve bezeichnet man auch als Fitting. Sie wird als r^2 ausgedrückt und liegt im Idealfall bei 1.

3. ERGEBNISSE

3.1. Native Oozyten exprimieren keinen NMDA-Rezeptor

Oozyten, denen keine NMDA-Rezeptor kodierende mRNA injiziert wurde, reagieren nicht auf die Zugabe von Glutamat und Glyzin. Ebenfalls zeigen sie keine Einwärtsströme nach Applikation des spezifischen Agonisten NMDA und Glyzin.

Defollikulierte Zellen, denen nur die Trägerlösung für die NMDA-Rezeptor-RNA injiziert wurde (RNase-freies Wasser), zeigen ebenfalls keine Reaktion auf Glutamat und Glyzin bzw. NMDA und Glyzin.

3.2. NMDA-Rezeptor exprimierende Zellen reagieren auf Agonistenapplikation

Zellen, denen 48 – 72 h zuvor NMDA-Rezeptor kodierende mRNA vom Typ NR1A/2A injiziert wurde, reagieren mit einwärtsgerichteten Bariumströmen auf die Zugabe von Glutamat und Glyzin bzw. NMDA und Glyzin.

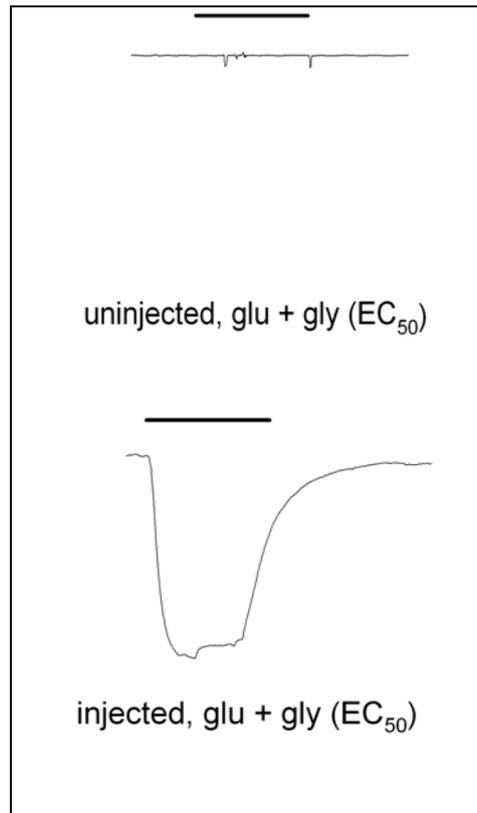


Abbildung 5: Antworten verschiedener Oozyten auf Agonistengabe. Native Oozyten von *Xenopus laevis* antworten nicht auf die Zugabe von Glutamat und Glyzin bzw. NMDA und Glyzin. Bei mit NMDA kodierender mRNA der Untereinheiten NR1A/2A injizierten Oozyten ruft die EC₅₀ Applikation von Glutamat und Glyzin Einwärtsströme hervor.

3.3. Antworten auf den spezifischen und den physiologischen Agonisten sind identisch

Die Antwort auf den selektiven Agonisten NMDA (10^{-5} M) in Kombination mit Glyzin (10^{-5} M) dient der pharmakologischen Identifizierung und der funktionellen Überprüfung des NMDA-Rezeptors. Es besteht kein Unterschied zu den Antworten, die durch die physiologischen Agonisten Glutamat und Glyzin der EC_{50} hervorgerufen werden.

Im Weiteren erfolgt daher die Verwendung des physiologischen Agonisten Glutamat in Kombination mit Glyzin.

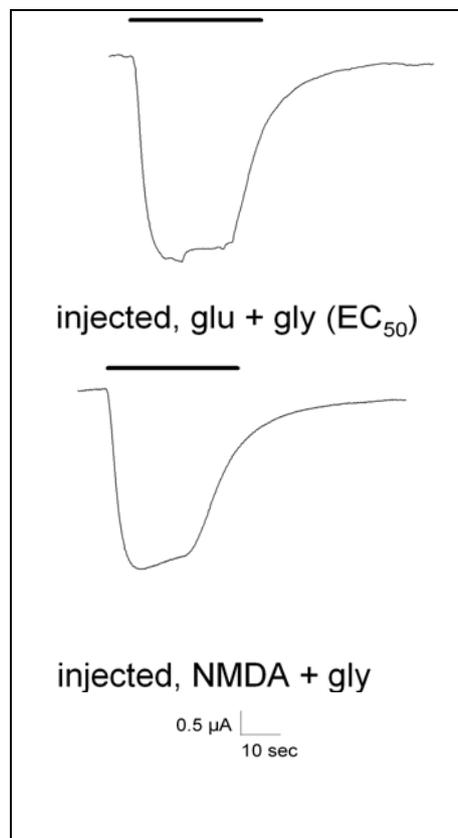


Abbildung 6: Identische Rezeptorantworten auf den spezifischen und physiologischen Agonisten. Der selektive Agonist NMDA (10^{-5} M) erzeugt in Kombination mit Glyzin (10^{-5} M) identische Rezeptorantworten im Vergleich zu denen der physiologischen Agonisten Glutamat und Glyzin (EC_{50}).

3.4. Die Antwort der Oozyten ist von der Glutamatkonzentration abhängig

Ist der Glyzinanteil in der Agonistenlösung konstant, reagieren die Oozyten, welche den NMDA-Rezeptor exprimieren, konzentrationsabhängig auf verschiedene Glutamatkonzentrationen. Die Konzentration von Glyzin liegt konstant bei $10\ \mu\text{M}$. Die Wirkung von Glutamat wird in einer Konzentrationsspanne von $1\ \text{nM} - 1\ \text{mM}$ untersucht. Mit Hilfe der Hill-Gleichung konnte die EC_{50} von Glutamat bei konstant gehaltener Glyzinkonzentration für den NR1A/2A-Subtyp des NMDA-Rezeptors bestimmt werden. Sie liegt bei $8,0 \times 10^{-6}\ \text{M}$ mit einem SEM (Standardfehler des Mittelwertes/standard error of mean) von $\pm 2,9 \times 10^{-6}\ \text{M}$. Der für den NR1A/2A-Subtyp ermittelte Maximaleffekt (E_{max}) liegt bei $2,0 \pm 0,16\ \mu\text{A}$. Gleiche Ergebnisse wurden für den Rezeptorsubtyp NR1/2B erzielt.

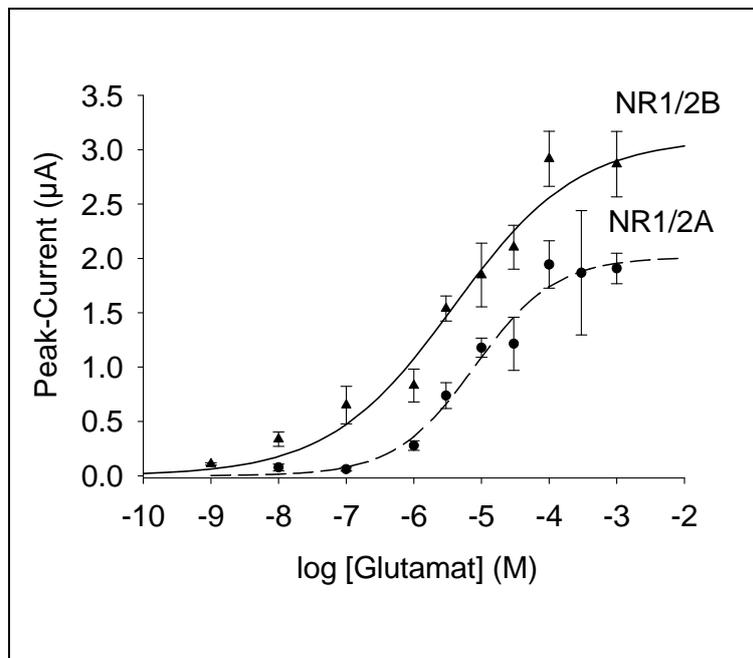


Abbildung 7: Die Rezeptorantwort ist abhängig von der Glutamatkonzentration. Untersuchte Glutamatkonzentrationen $1\ \text{nM} - 1\ \text{mM}$ bei konstanter Glyzinkonzentration ($10\ \mu\text{M}$). Beide Rezeptorsubtypen reagieren konzentrationsabhängig auf Glutamat. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied für die EC_{50} der beiden Subtypen, wohl aber für die E_{max} , die für NR1/2B höher als für NR1/2A liegt.

3.5. Die Antwort der Oozyten ist von der Glyzinkonzentration abhängig

Bei variierender Glyzin- (1 nM - 1 mM) und fester Glutamatkonzentration (10 μ M) zeigt sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Rezeptor-Subtypen. Die EC_{50} für den NR1/2A-Subtyp beträgt $1,2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M, für den NR1/2B-Subtyp liegt die EC_{50} bei $1,9 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M.

Die E_{max} des NR1/2A-Subtyps ist mit $1,9 \pm 0,2 \mu$ A in einem statistisch signifikanten Maße höher als die des NR1/2b-Subtyps mit $1,5 \pm 0,1 \mu$ A ($p < 0,05$). Für die weiteren Versuche wird die in den Kapiteln 3.4. und 3.5. ermittelte EC_{50} von Glutamat und Glyzin als Referenzpunkt verwendet.

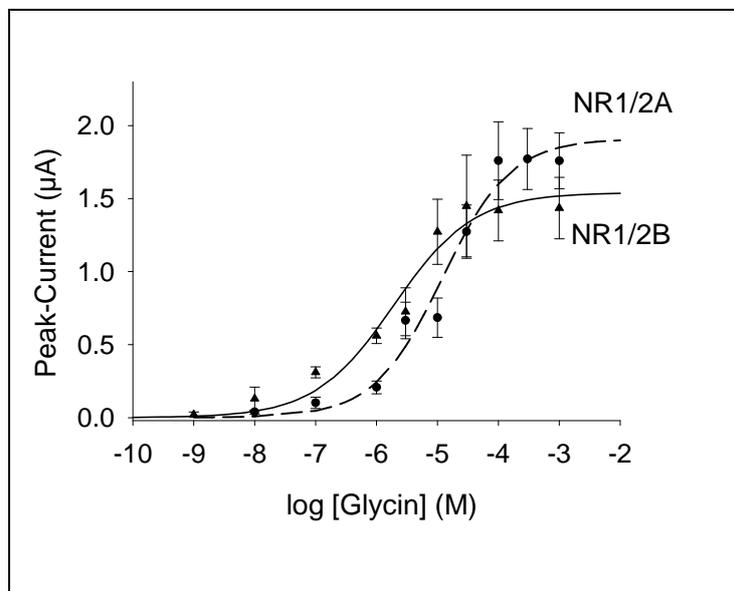


Abbildung 8: Die Rezeptorantwort ist abhängig von der Glyzinkonzentration. Es wurde die Antwort des NMDA-Rezeptors auf unterschiedliche Glyzinkonzentrationen (1 nM - 1 mM) bei konstanter Glutamatkonzentration (10 μ M) untersucht. Beide Rezeptorsubtypen reagieren konzentrationsabhängig auf Glyzin. Die E_{max} für NR1/2A liegt höher als für NR1/2B. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die EC_{50} beträgt $1,2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M für den NR1/2A- und $1,9 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M für den NR1/2B-Subtyp.

3.6. Bolus- und Flow-Applikation des Agonisten erzeugen identische Ergebnisse

Es bestehen zwei Möglichkeiten den Agonisten zu applizieren, um eine Rezeptorantwort hervorzurufen. Bei der Ersten wird die Substanz mit Hilfe einer Handpipette als 50 µl Bolus in die Messkammer pipettiert und langsam durch die Spülflüssigkeit (Tyr-Ba) ausgewaschen. Dabei muss man sehr vorsichtig vorgehen, da es durch mechanische Irritationen der Oozytenmembran leicht zur Bildung von Artefakten kommen kann, welche die Messergebnisse verfälschen. Die schonendere Variante ist es, wenn die Oozyte für einen bestimmten Zeitraum mit den Agonisten umgeben wird. Die Agonisten werden über ein System direkt in die Messkammer geleitet und umspülen gleichmäßig die Zelle, bis sie auch hier durch die Spülflüssigkeit ausgewaschen werden. Dieses Verfahren wird Flow-Messung genannt.

Beide Applikationsweisen erzeugen gleiche Spitzenströme und sind somit gleichberechtigt anwendbar. Die Ergebnisse dieser Studie sind durch Flow-Messungen erhoben worden.

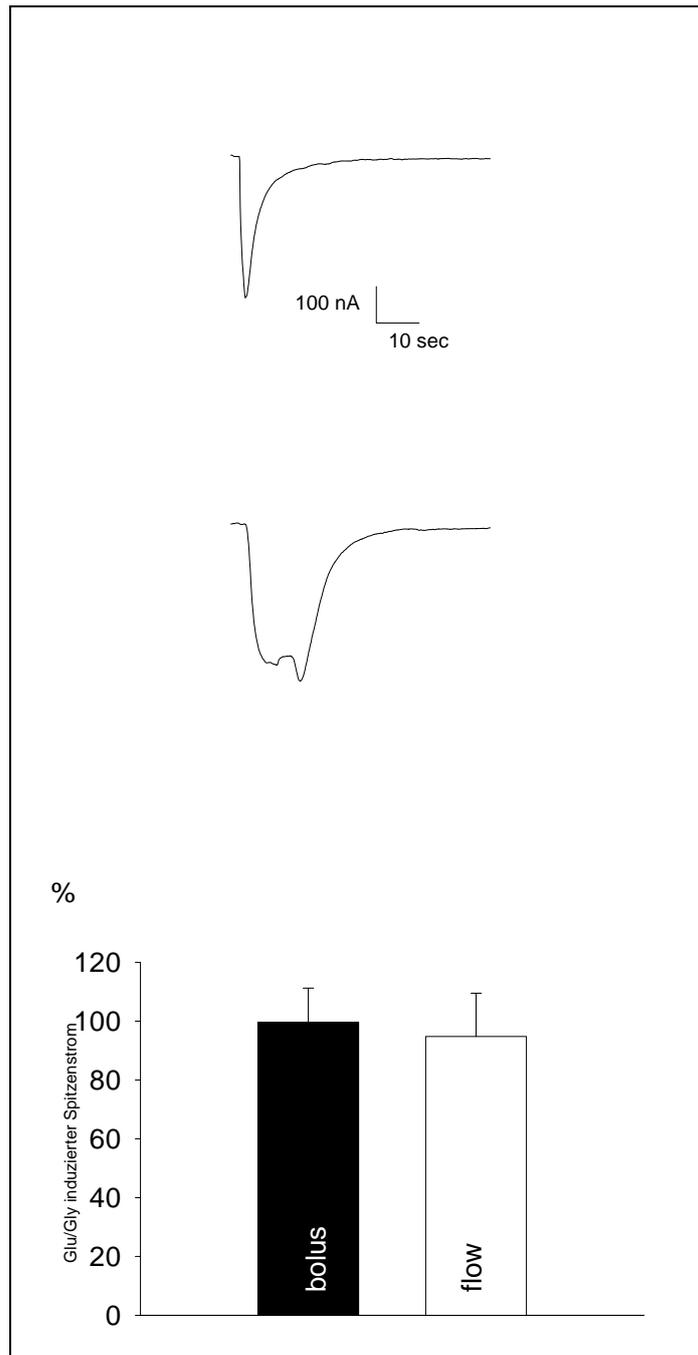


Abbildung 9: Bolus- und Flow-Applikation des Agonisten erzeugen identische Ergebnisse. Mit Blick auf die Größe des Spitzenstroms (Peak-Current) macht es keinen Unterschied, ob die Agonisten Glutamat und Glyzin (jeweils 10^{-5} M) als Bolus (50 μ l) oder als Flow (20 sec; 5 ml/min) appliziert werden.

3.7. LA hemmen den NMDA-Rezeptor konzentrationsabhängig

Zellen, die den NMDA-Rezeptor vom Typ NR1A/2A exprimieren, reagieren auf die Applikation von Glutamat und Glyzin mit einem Bariumstrom in die Zelle. Der Effekt ist konzentrationsabhängig. Wir untersuchten die Wirkung der LA auf die Rezeptorantwort hervorgerufen durch Glutamat und Glyzin in der EC_{50} (Glutamat 8×10^{-6} M und Glyzin 12×10^{-6} M).

Nach 10-minütiger Inkubation der Oozyten in den jeweiligen LA verschiedener Konzentrationen nimmt die Rezeptorantwort auf Stimulation mit dem gleichen Agonisten ab. S-(-)-Ropivacain und Levobupivacain der Konzentration 10^{-6} M verringern die Signalübertragung signifikant auf $66 \pm 2,9$ % bzw. $72 \pm 7,4$ %.

Durch Bupivacain der Konzentration 10^{-7} M wird die Antwort auf $72 \pm 6,4$ % reduziert. Der Effekt der Lokalanästhetika ist konzentrationsabhängig.

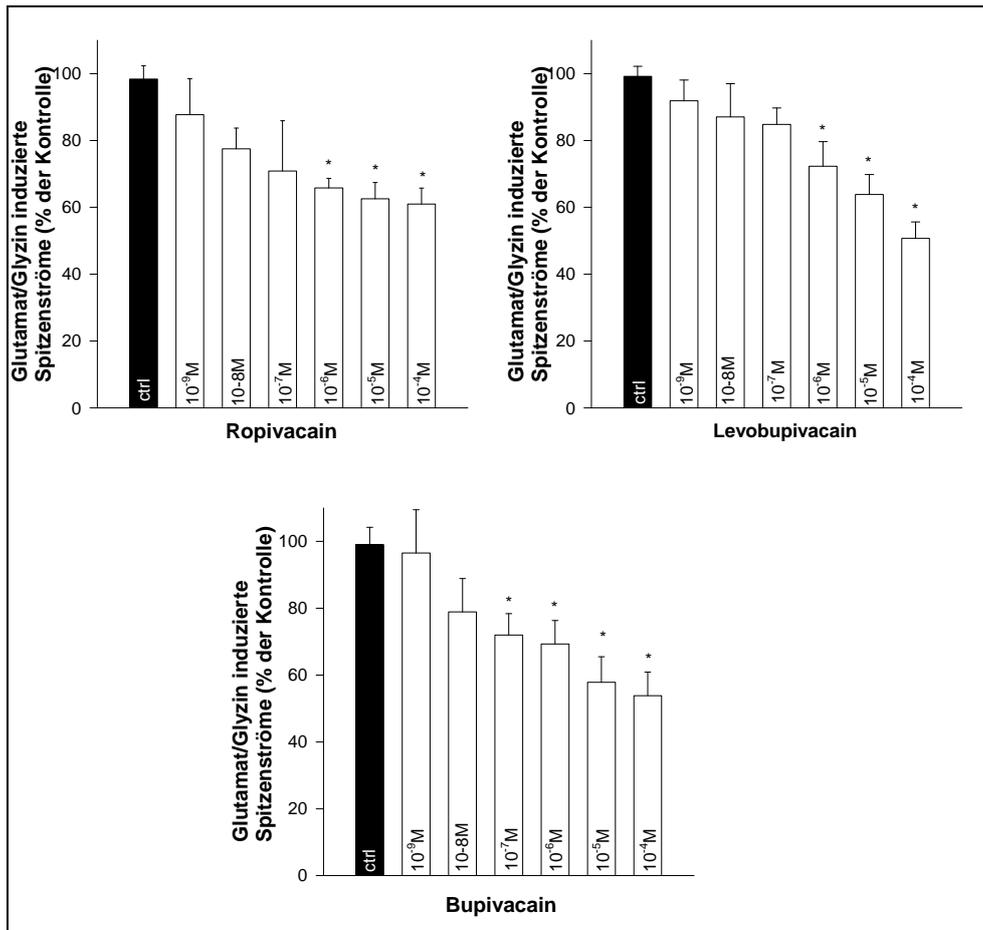


Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Rezeptorhemmung durch LA. Alle getesteten LA hemmen konzentrationsabhängig die Rezeptoraktivierung (NR1A/2A) durch Glutamat/Glyzin (EC₅₀). Die Ergebnisse sind in Prozent der Kontrollgruppe angegeben. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse der Kontrollgruppe. Die weißen Balken stellen die Antworten auf die Agonisten nach 10 min Inkubation in den verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen LA dar. (* = p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle)

3.8. Der Effekt der LA ist reversibel

Um zu testen, ob der hemmende Effekt der LA auf die NMDA-Rezeptorantwort reversibel ist, werden die vorbereiteten Oozyten für 10 min in dem jeweiligen LA der Konzentration 10^{-4} M inkubiert. Anschließend legt man die Zellen ebenfalls für 10 min in MBS, um das Lokalanästhetikum auszuwaschen. Die hiernach gemessenen Antworten auf den Agonisten sind vergleichbar zu denen der Kontrollzellen ($p < 0,05$, t-Test).

Gleiche Ergebnisse erhält man, wenn alle drei Messungen an der gleichen Zelle durchgeführt werden.

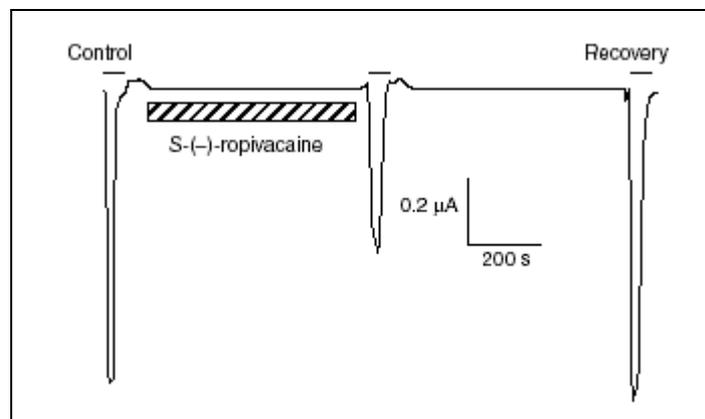


Abbildung 11: Beispielgraph der Reversibilitätsprüfung. Beispielmessung einer durch EC_{50} von Glutamat und Glyzin hervorgerufenen Antwort einer einzelnen den NMDA-Rezeptor (NR1A/2A) exprimierenden Oozyte. Die Antwort wurde auf 57% reduziert nach 10 min Inkubation in S-(-)-Ropivacain (10^{-4} M) und erholte sich nach einer Auswaschphase von 10 min in MBS.

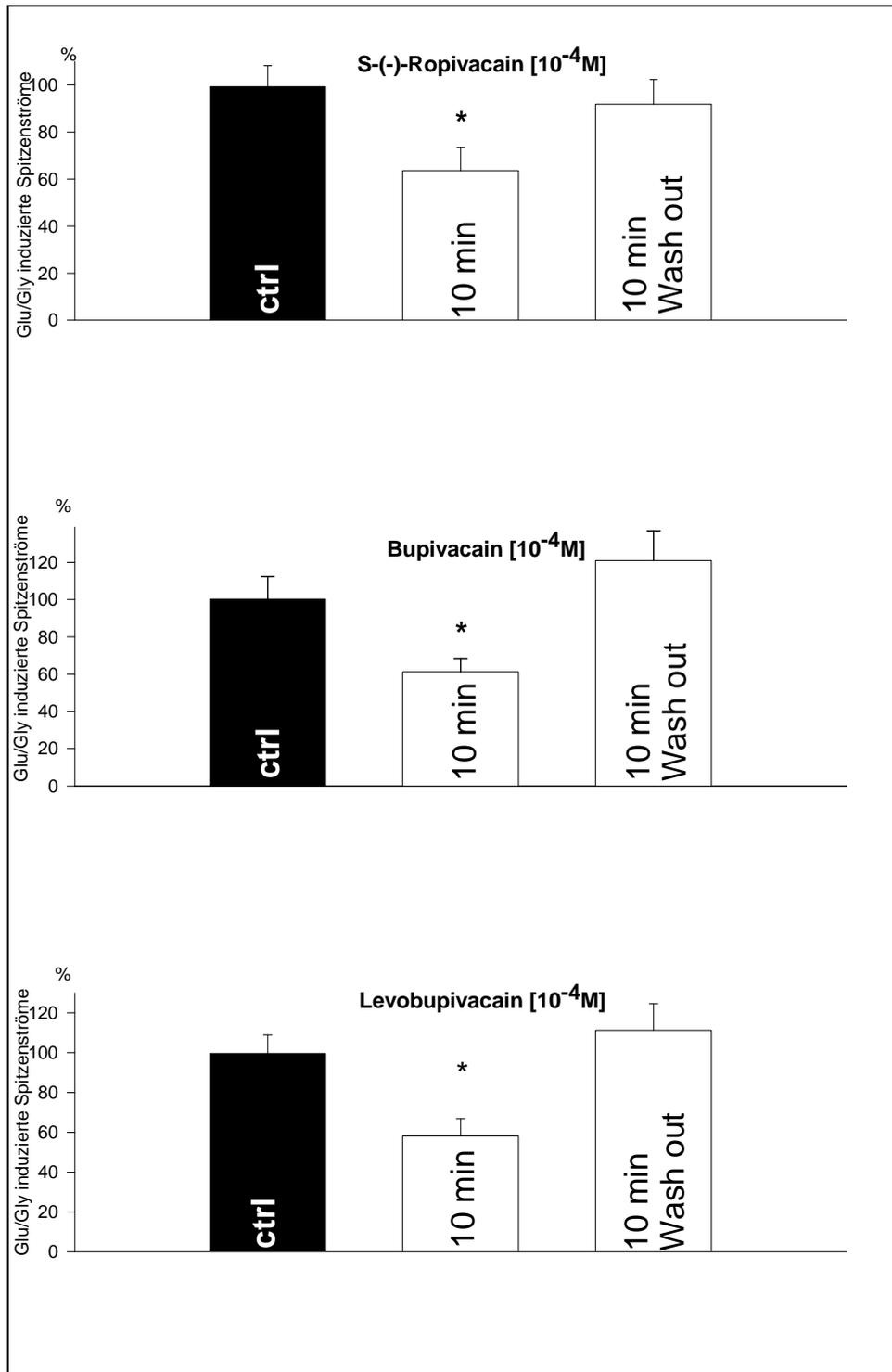


Abbildung 12: Reversibilität der Rezeptorhemmung durch LA. Die durch die EC₅₀ von Glutamat und Glyzin hervorgerufene Hemmung am NMDA-Rezeptor vom Typ NR1A/2A ist reversibel. Nach 10 min Inkubation in allen LA (10⁻⁴ M) folgt eine jeweils 10 min andauernde Auswaschphase in MBS. (* = p < 0,05; LA vs. ctrl und LA + Wash out)

3.9. Die Wirkung der LA ist stereoselektiv

Die Stereoisomere R-(+)- und S-(-)-Ropivacain wurden verwendet, um einen stereoselektiven Effekt zu untersuchen. Oozyten, die den Rezeptor der NR1A/2A Untereinheit exprimieren, werden jeweils 10 min in den 10^{-4} M konzentrierten Stereoisomeren inkubiert. R-(+)-Ropivacain zeigt keinen hemmenden Effekt am NMDA-Rezeptor. Die Zellen zeigen im Vergleich zu der Kontrollgruppe identische Antworten auf die Stimulation mit Glutamat und Glyzin (EC_{50}). Das in der Klinik benutzte S-(-)-Ropivacain hingegen reduziert die Rezeptorantwort signifikant auf 61 ± 9 % der Kontrolle (* = $p < 0,05$).

Aufgrund der unerwartet hohen Stereoselektivität wurden die Versuche diesbezüglich dreimal mit gleichem Ergebnis wiederholt.

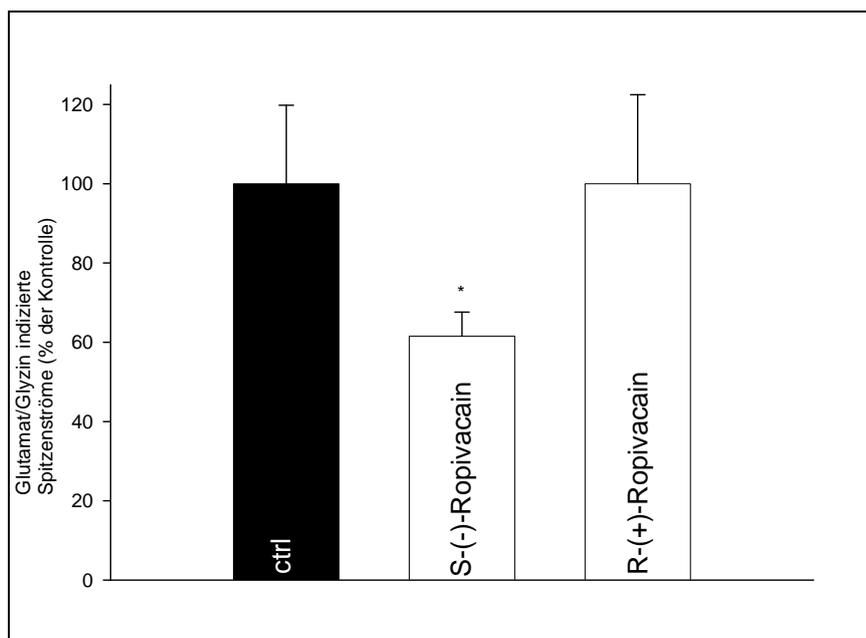


Abbildung 13: Die Wirkung der LA am NMDA-Rezeptor ist stereoselektiv. Antwort von NR1A/2A exprimierenden Oozyten auf Stimulation mit EC_{50} Glu/Gly. Nach 10 min Inkubation in 10^{-4} M R-(+)-Ropivacain ist kein Effekt zu erkennen. Inkubation in 10^{-4} M S-(-)-Ropivacain hemmt die Antworten signifikant (*= $p < 0,05$).

3.10. Bupivacain hemmt die durch PMA erzeugte Stimulation der PKC

Der Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ist ein Aktivator der Protein Kinase C. Untersucht wird der Einfluss von Bupivacain auf NMDA-Rezeptoren, die über PKC-Stimulation durch PMA aktiviert worden sind. Bupivacain (10^{-4} M) allein verringert nach 10 min Inkubation die Rezeptorantwort des Subtyps NR1A/2A auf 55 ± 10 % der Kontrolle. PMA (10^{-6} M für 5 min) verursacht einen signifikanten Anstieg der Reaktion auf 188 ± 10 % nach Aktivierung mit Glutamat und Glyzin (EC_{50}).

Durch zwei Methoden wird die Auswirkung von Bupivacain auf den stimulierenden Effekt von PMA untersucht. In der ersten Gruppe werden die Zellen 5 min in PMA 10^{-6} M eingelegt und nachfolgend für 10 min in eine 10^{-4} M Bupivacain Lösung gegeben. Der stimulierende Effekt des PMA bleibt dabei bestehen (178 ± 18 %). Vermutlich kann Bupivacain die Signalübertragung nicht hemmen, wenn einmal die PKC-Aktivierung aufgetreten und der Rezeptor phosphoryliert ist.

Die zweite Gruppe wird zuerst 5 min einem Gemisch aus PMA (10^{-6} M) und Bupivacain (10^{-4} M) ausgesetzt und anschließend noch 5 min mit Bupivacain (10^{-4} M) behandelt. Es wird deutlich, dass der stimulierende Effekt des PKC-Aktivators PMA am NMDA-Rezeptor ausbleibt (105 ± 15 %).

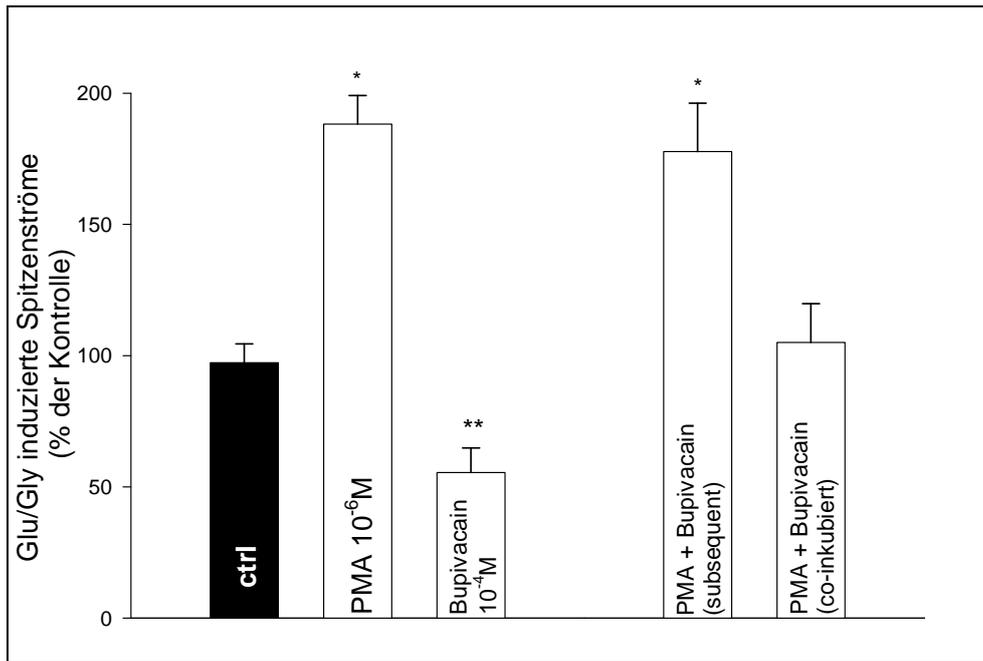


Abbildung 14: Die Wirkung von Bupivacain auf PMA aktivierte NMDA-Rezeptoren. Alle getesteten Zellen exprimieren den NR1A/2A NMDA-Rezeptor. Bupivacain 10^{-4} M allein hemmt die Antworten auf 55 ± 10 % der Kontrolle. PMA (10^{-6} M für 5 min) induziert einen signifikanten Anstieg der Antworten auf 188 ± 10 %. Subsequente Behandlung der Zellen führt zu keiner Abnahme des stimulierenden Effekts von PMA (178 ± 18 %). Bei der co-incubierten Gruppe wird der stimulierende Effekt von PMA komplett unterdrückt (105 ± 15 %). (* = $p < 0.05$ vs. ctrl; ** = $p < 0,05$ vs. PMA und ctrl)

3.11. PKC-Inhibition und gleichzeitige LA-Anwendung führen zu keiner zusätzlichen Reduzierung des Signals

Um festzustellen, ob LA die PKC und folglich auch den NMDA-Rezeptor hemmen, überprüfen wir den Effekt der PKC-Inhibition auf die hemmende Wirkung von Bupivacain (10^{-4} M). Verglichen werden die Auswirkungen auf die Signalleitung hervorgerufen durch:

1. 10 min Inkubation in Bupivacain (10^{-4} M)
2. Vorbehandlung (1 h) mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrine (5×10^{-5} M) und
3. die Kombination von PKC-Inhibitor und Bupivacain.

Bupivacain verursacht eine Signalabnahme nach Agonistengabe auf 57 ± 9 % der Kontrollzellen. Chelerythrine verringert die Antworten auf 66 ± 7 % der Kontrolle. Die Kombination der jeweiligen Komponenten führt zu keiner weiteren Reduzierung der Reaktion auf NMDA-Rezeptoragonisten (62 ± 9 %). Ähnliche Ergebnisse ergaben

Versuche mit den strukturell unterschiedlichen PKC-Inhibitoren Calphostin C (3×10^{-6} M) und Ro 31-8220 (10^{-7} M).

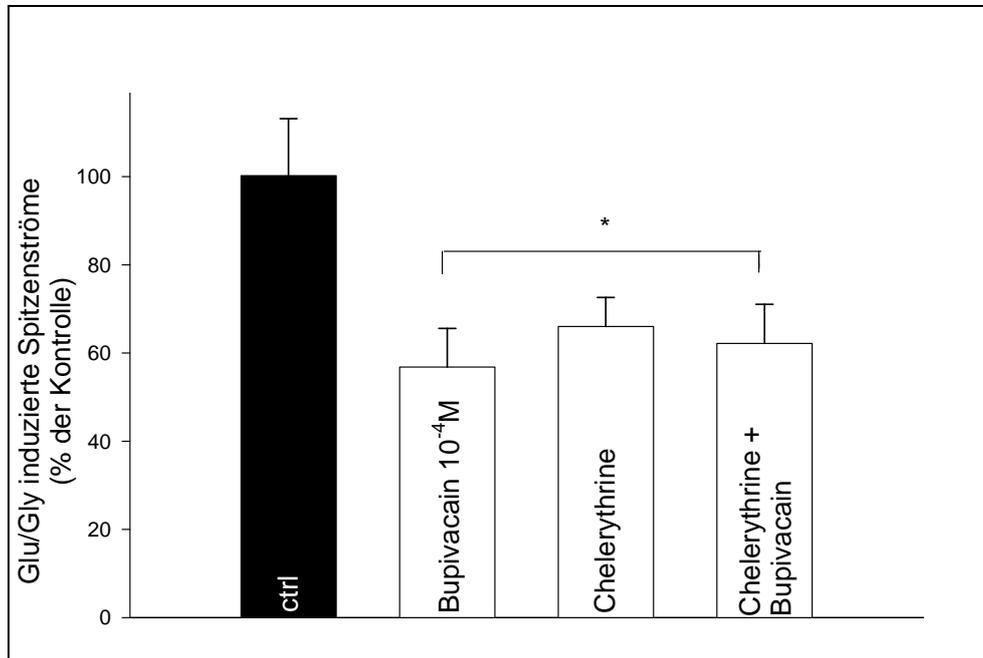


Abbildung 15: Effekt von PKC-Inhibitoren auf die Wirkung von LA. Bupivacain (10^{-4} M) verursacht nach 10 min Inkubationszeit eine Signalabnahme nach Agonistengabe auf 57% der Kontrollzellen. Chelerythrine (5×10^{-5} M; 1h) verringert die Antworten auf 66 %. Die Kombination der Komponenten führt zu keiner weiteren Reduzierung der Reaktion auf NMDA-Rezeptoragonisten (62 %). (* = $p < 0,05$).

3.12. LA vom Ester- und Amidtyp zeigen die gleiche Wirkung

Überprüft wird, ob LA vom Estertyp, in diesem Fall Procain, den gleichen Effekt und den gleichen Wirkmechanismus besitzen, wie Amide. Zusätzlich wird die Auswirkung von Procain (10^{-4} M) auf den PKC-Aktivator PMA (10^{-6} M) bzw. auf den PKC-Inhibitor Chelerythrine (5×10^{-5} M) getestet. Nach 10 min Inkubation hemmt Procain die Antwort auf Glutamat und Glyzin in NR1A/2A NMDA-Rezeptor exprimierenden Oozyten auf 60 ± 6 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Hemmung der PKC durch Chelerythrine nach 60 min Einwirkzeit erzeugt einen Abfall der Reaktion auf 47 ± 5 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kombination der beiden Substanzen zeigt keine verstärkte Hemmwirkung. Die Kombination von Procain und dem PKC-Aktivator PMA verursacht Antworten von 93 ± 12 % der Kontrolle und löscht damit den stimulierenden Effekt von PMA (168 ± 13 %) auf Rezeptorströme aus. Die Ergebnisse stimmen mit denen der LA vom Amidtyp überein.

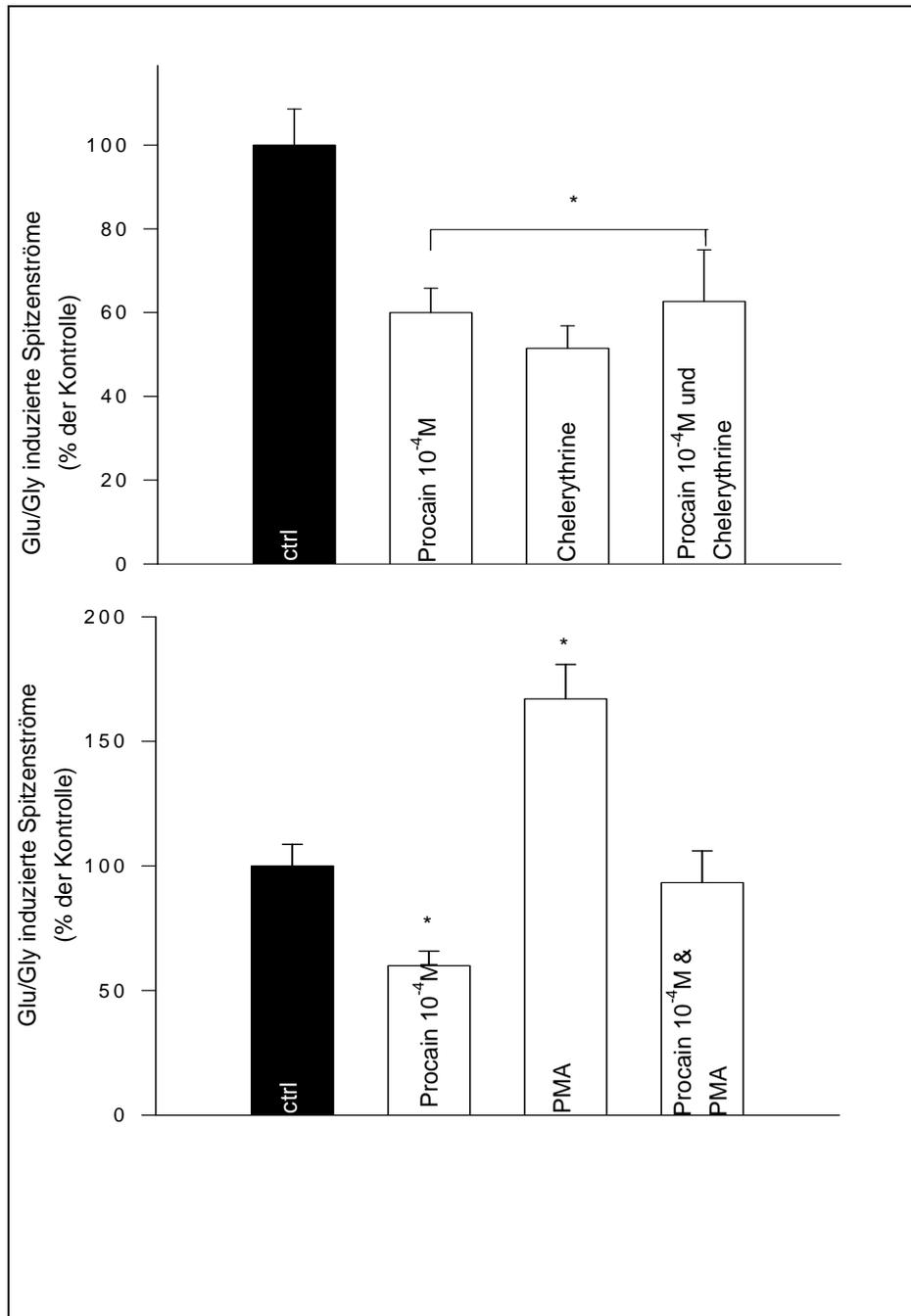


Abbildung 16: LA vom Ester- und Amidtyp zeigen die gleiche Wirkung. Untersucht wird der Einfluss von Procain als Vertreter der LA vom Ester-Typ auf PKC Aktivierung durch PMA und PKC Hemmung durch Chelerythrine. Procain (10⁻⁴ M, 10 min Inkubation) verringert die Antworten auf 60±6%. Chelerythrine (5x10⁻⁵ M, 60 min) reduziert Reaktionen auf 47±5%. Kombination beider Substanzen führt zu gleichen Ergebnissen. Die Kombination von Procain und PMA verursacht Antworten von 93% der Kontrolle und löscht den stimulierenden Effekt von PMA (168%) auf Rezeptorströme aus.

4. DISKUSSION

Unsere Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige und reversible Hemmwirkung von LA auf eine durch Glutamat/Glyzin hervorgerufene NMDA-Rezeptor (NR1A/2A) Aktivierung. Dieser Effekt ist stereoselektiv.

Viele Studien haben bewiesen, dass LA in der Lage sind, gesteigerte Schmerzzustände und sekundäre Hyperalgesien zu unterdrücken (34,37,62). Die hier gewonnenen Ergebnisse könnten teilweise eine Erklärung für die nach LA-Gabe beobachtete reduzierte Schmerzempfindlichkeit und Opiattoleranz bieten (37,38,75).

Die in dieser Studie ermittelten Konzentrationen der LA, die zu einer signifikanten Hemmung der NMDA-Rezeptoraktivierung führen, entsprechen den im Blut gemessenen Dosen während einer Epiduralanästhesie (63).

4.1. Modelldiskussion

Obwohl es sich bei der NMDA-Rezeptorexpression in *Xenopus laevis* Oozyten um ein angesehenes Modell handelt (32,33,82), sind trotzdem einige Schwachstellen zu erwähnen. Nachfolgend werden die Vor- und Nachteile dieses Versuchsaufbaus diskutiert.

4.1.1. Vor- und Nachteile des Modells

Das *Xenopus* Modell ist hervorragend dazu geeignet, intrazelluläre Signalkaskaden und Abläufe an rekombinant expremierten Rezeptoren zu untersuchen. Dies erklärt sich hauptsächlich durch die problemlose Rezeptorexpression. Nach der mRNA oder DNA Injektion produziert die Oozyte einen Rezeptor oder ein Transportprotein, welches bzw. welches biochemisch funktionsfähig ist und die entsprechenden pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften besitzt (15,79). Der ausgesprochen leistungsstarke Translationsapparat kommt dieser Eigenschaft zugute (23,41,50). Die Pflege der Zellen ist im Vergleich zu anderen Zellkulturen einfach. Sie sind innerhalb weniger Stunden verfügbar und bedürfen keiner aufwendigen Kultivierung (79). Die gewonnenen Oozyten sind relativ resistent und gut haltbar. Dies betrifft auch die Froschweibchen selbst. Sie sind problemlos zu beziehen und auch ihre Haltung ist ohne große Umstände möglich.

Native Oozyten verfügen über wenig physiologisch vorhandene Membrankanäle (53,68), so dass eine Verfälschung der Ergebnisse durch fremde Ionenströme weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

Weiterhin ist die unkomplizierte Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen in großen Mengen zu erwähnen. Durch die Größe der Oozyten, ca. 1,3 mm im Durchmesser, ist nicht nur das Einbringen von Mikroelektroden zur Injektion verschiedenster Substanzen, sondern auch die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik erleichtert (4,15).

4.1.1.1. Die Expression des NMDA-Rezeptors

Der NMDA-Rezeptor ist ein aus zwei Untereinheiten zusammengesetzter Proteinkomplex. Bei den Untereinheiten unterscheidet man die essentielle Komponente NR1 und die Komponente NR2, welcher jedoch nur ein modulierender Effekt zugesprochen wird. Es existieren hier die vier unterschiedlichen Typen A-D. Die NR2 Untereinheiten allein sind nicht in der Lage, einen funktionierenden Ionenkanal zu formen, sie erweitern jedoch die NR1 Aktivität und verantworten die funktionale Variabilität der NMDA-Rezeptoren.

In dieser Studie wurde die NR1 zusammen mit der NR2A Untereinheit exprimiert. Diese Kombination ist größtenteils im Gehirn und dem Hinterhorn ansässig und wird für die Entwicklung von Schmerzzuständen und akuter Opiattoleranz verantwortlich gemacht (74,78).

Obwohl die Expression von NMDA-Rezeptoren auf *Xenopus* Oozyten ein angesehenes Modell ist (82), müssen einige Einschränkungen der Modellbewertung genannt werden.

Die Experimente werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Dies entspricht zwar der physiologischen Temperatur der Oozyte und ist somit ein Vorteil gegenüber Säugetierzellkulturen (58), die normale Körpertemperatur des Menschen, welcher der Rezeptor normalerweise ausgesetzt ist, liegt jedoch bei 37° C und mehr. Theoretisch könnte dies die Funktionsweise beeinflussen. Für diese Studie schien es allerdings wichtiger, die Zellmembran in ihrer physiologischen Beschaffenheit vorliegen zu haben.

NR1 und NR2 Untereinheiten werden kombiniert, um die Rezeptorströme zu vergrößern und eine physiologische Rezeptorkonfiguration zu erreichen (54). Um einen heteromeren Rezeptoraufbau zu erreichen, wird die mRNA in einem Gewichtsverhältnis von 1:5 zwischen NR1A und NR2A in die Oozyte injiziert (46). Allerdings wurde weder die

Rezeptordichte auf der Oberfläche noch die Stöchiometrie der Kombination der Einheiten analytisch bestimmt. Daher ist es möglich, dass es während der Experimente zu Schwankungen im Verhältnis zwischen NR1A und NR2A Untereinheiten gekommen ist.

4.1.1.2. Das Studienprotokoll der elektrophysiologischen Messungen

Die Rezeptorexpression und -funktionsfähigkeit unterliegt starken saisonalen Schwankungen, was unerklärliche Änderungen der zellulären Funktion verantwortet (58). Neben diesen qualitativen Unterschieden werden zusätzlich saisonabhängige Differenzen bezüglich des Membranpotentials der Zellen erwähnt (68,79). Sowohl die erzielten Ergebnisse von Zellen unterschiedlicher Weibchen, als auch die eines Tieres können große Unterschiede aufweisen (68,79). Ein Erklärungsversuch besagt, dass Reste der Follikelzellschicht und verschiedene Expressionsstadien der Rezeptoren für diese Differenzen verantwortlich sein können (49). Um Schwankungen in der Rezeptorexpression zu vermeiden, sollten möglichst Zellen des gleichen Reifegrads verwendet werden, da in den unterschiedlichen Stadien eine deutliche Differenz im Proteinsyntheseapparat besteht (31).

Die Oozytenqualität wird durch sorgfältige Behandlung positiv beeinflusst. Nicht nur regelmäßiger Wechsel des Nährmediums und die Entfernung beschädigter Zellen trägt dazu bei, sondern auch das Vorgehen bei der Injektion und den Messungen. Schließlich wird hierbei die Zellmembran mehrmals perforiert und nur feine Elektrodenspitzen und korrektes Einstechen der Elektroden ermöglichen die Erholung der Zellmembran und Erhebung verwertbarer Daten (79).

Kritiker dieses Modells bemängeln die Möglichkeit, dass die erzielten Ergebnisse von der großen Variabilität der Oozyten abhängen. Um diesen Vorwurf zu entkräften, wurden zur Kontrolle Messungen mit allen LA der Konzentration 10^{-4} M durchgeführt, in denen die Oozyten als eigene Kontrollgruppe gemessen wurden (Messprotokoll der Reversibilitätsversuche).

4.1.1.3. Die Effekte von LA auf NMDA-Rezeptoren in anderen Modellen

Im Gegensatz zu den hier gewonnenen Ergebnissen konnten Nishizawa und Kollegen mittels Patch Clamp Technik an CA1 Pyramidenbahnneuronen der Maus keinen

hemmenden Effekt von klinisch relevanten Konzentrationen von Bupivacain und Lidocain auf NMDA induzierte Rezeptorantworten nachweisen. Bupivacain hemmte die Rezeptoraktivität erst ab einer 1mM Konzentration (57). Als Erklärung hierfür kommen das unterschiedliche Modell, Unterschiede in den benutzten Rezeptoruntereinheiten und die Wahl des verwendeten Agonisten in Betracht. Während in dieser Studie die physiologischen Agonisten Glutamat und Glyzin verwendet wurden, testete Nishizawa den spezifischen, jedoch nicht physiologischen Agonisten NMDA. Die mögliche konzentrationsabhängige Hemmung, hervorgerufen durch höhere Konzentrationen, der LA konnte im Mäusemodell aufgrund zunehmender Durchlässigkeit der Neuronen nicht weiter untersucht werden.

4.1.1.4. Die Verwendung von Barium als Ladungsträger

Die in dieser Arbeit verwendete Spüllösung ist frei von Kalzium- und Magnesiumionen. Unter normalen Bedingungen ist der NMDA-Rezeptor hauptsächlich durchlässig für Kalziumionen. In der Auswahl der Ionen, welche die Kanalpore nutzen können, ist er allerdings nicht sonderlich selektiv. Barium ersetzt in diesem Fall die Kalziumionen als Ladungsträger. Dabei handelt es sich um ein gängiges Verfahren bei Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten, die den NMDA-Rezeptor exprimieren (80). Der Hauptgrund des Ionenaustausches liegt allerdings darin, endogen vorkommende Ionenkanäle auszuschalten, da sie in aktiver Form das Membranpotential beeinflussen und zu verfälschten Messergebnissen führen. Die Oozyten von *Xenopus laevis* besitzen kalziumabhängige Chloridkanäle, welche durch den Verzicht auf Kalziumionen nicht mehr aktiviert werden können. Dies gelingt durch dieses Vorgehen jedoch nur inkomplett, da die Zellen über Kalziumspeicher im endoplasmatischen Retikulum verfügen. Werden diese freigesetzt und aktivieren die Kanäle, kann es zu Veränderungen im Membranpotential kommen. Zusätzlich liegen in der Oozytenmembran endogene Kaliumkanäle vor, die durch Bariumionen geblockt werden (15,80) und so das Membranpotential nicht weiter beeinflussen.

Der Grund für den Verzicht auf Magnesiumionen liegt in der durch Magnesium hervorgerufenen Blockade des NMDA-Rezeptors. Im Ruhezustand verschließt Magnesium die Ionenpore. Erst bei zunehmender Depolarisation nimmt die Affinität zur

Bindungsstelle ab. Liegt erst gar kein Magnesium in der Spüllösung vor, ist die Pore auch im Ruhezustand durchgängig (29,46).

4.1.1.5. Weitere Fehlerquellen

Sicherlich finden sich in dieser Arbeit, wie auch in jeder anderen Studie, eine Vielzahl potentieller Fehlerquellen. Es ist an dieser Stelle nicht möglich auf sämtliche einzugehen. Daher sollen nur die Wichtigsten näher erläutert werden.

Eine große Gefahr liegt in der Fehlinterpretation von Messergebnissen. Dies wäre möglicherweise der Fall, wenn es in den Zellen Proteine gäbe, die ähnlich dem NMDA-Rezeptor reagieren würden. Die Möglichkeit, dass vorhandene Ionenkanäle durch unerwünschte Aktivität zu ungenauen Ergebnissen führen, wird durch die Verwendung von Barium Tyrodes als Lösung vermindert.

Außerdem muss berücksichtigt werden, dass das Oozytenmodell nicht zu 100 % auf den Menschen übertragbar ist. Es besteht z.B. die Möglichkeit, dass im Vergleich zum Säuger Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation bestehen (70).

Ebenfalls von großer Relevanz ist die gründliche Defollikulierung der Zellen. Wie schon zuvor erwähnt ist die Oozyte von verschiedenen Schichten umgeben. Reste dieser Schichten sind bei elektrophysiologischen Messungen extrem hinderlich. Sie erschweren nicht nur das Einbringen der Mikroelektroden, sondern reduzieren ebenfalls die Wirkung von Pharmaka auf Ionenkanäle bis zu 90 % (49).

Dennoch sind wir der Meinung, dass das Oozyten Modell ein geeignetes Verfahren darstellt, die Funktionsweise von NMDA-Rezeptoren in einem Neuron zu imitieren. Die Antwort des Rezeptors auf den spezifischen Agonisten NMDA, die adäquaten Antworten auf verschiedene Antagonisten und die beobachteten Antworten auf Glutamat und Glyzin unterstützen diese Annahme.

4.2. Der NMDA - Rezeptor

NMDA-Rezeptoren sind ligandenkontrollierte und spannungsabhängige Ionenkanäle. Gemeinsam mit den Non-NMDA-Rezeptoren gehören sie zu den Glutamatrezeptoren und vermitteln als solche den größten Teil der exzitatorischen Neurotransmission im Gehirn

(16). Zu den Non-NMDA-Rezeptoren zählen die α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptoren (AMPA-Rezeptoren) und die Kainat-Rezeptoren (7).

Der NMDA-Rezeptor ist ein Heterooligomer. Der Proteinkomplex wird aus mindestens zwei Typen der Untereinheiten zusammengesetzt (4).

Neben den Subtypen NR1 und NR2 sind ebenfalls die Einheiten NR3A und 3B bekannt (16). Da die letztgenannten in dieser Arbeit allerdings keine Rolle spielen, wird auf sie nicht weiter eingegangen. Die Einheit NR1, die in mehreren Splicevarianten vorkommt, stellt den essentiellen Anteil dar, bei der NR2 Einheit existieren die vier Varianten A-D. Diese in verschiedenen Kompositionen zusammengesetzten Subtypen formen funktionell unterschiedliche NMDA-Rezeptoren (14). Die NR2 Homomere allein sind nicht in der Lage, einen funktionstüchtigen Ionenkanal zu formen, potenzieren jedoch die Aktivität der NR1 Untereinheit und sorgen für die funktionellen Unterschiede des NMDA-Rezeptorkomplex (40,54). In dieser Studie wird die NR1A mit der NR2A Einheit kombiniert. Dieser Komplex gehört zu den im Menschen am häufigsten auftretenden und relevantesten Kombinationen. Besonders verbreitet ist er im Gehirn und im Hinterhorn des Rückenmarks (66). Weiterhin wird ihm eine besondere Rolle bei der Entstehung von akuter Opiattoleranz, Hyperalgesie und dem „wind-up“ Phänomen zugesprochen (74,78). Unter dem Begriff „wind-up“ versteht man eine zentrale Hypersensibilisierung, die durch eine NMDA-Rezeptoraktivierung im Hinterhorn des Rückenmarks hervorgerufen werden kann (35). Weitere Aufgaben des Rezeptors finden sich bei Lernvorgängen, Gedächtnisleistungen (43), sowie bei der Entwicklung des ZNS (76).

Der NMDA-Rezeptor bildet einen Ionenkanal, der eine hohe Permeabilität für Kalzium aufweist, welches wichtige zelluläre Vorgänge triggert (4). Jedoch auch Natrium und Kalium können die Kanalpore durchströmen (43). Im Ruhezustand ist die Kanalpore durch Magnesium verschlossen. Allerdings nimmt bei zunehmender Depolarisation diese Blockade ab (52,59). Kalziumionen können nur dann durch den Kanal strömen, wenn folgende zwei Bedingungen gleichzeitig erfüllt sind. Die Agonisten müssen an den Rezeptorkanal binden und die Membran der Nervenzelle muss depolarisiert sein, um den Magnesiumblock aufzuheben. Bei starken Schmerzreizen sind beide Bedingungen erfüllt (64). Bei den Agonisten unterscheidet man den spezifischen Agonisten NMDA, der zur pharmakologischen Charakterisierung des Rezeptors dient von den physiologischen Co-Agonisten Glutamat und Glyzin. Nur Glutamat wird bei jeder Erregung aus den Nervenfasern in den synaptischen Spalt entleert. Glyzin liegt dauerhaft in ausreichender

Konzentration vor. Die Bindungsstelle für Glyzin befindet sich auf der NR1-, die für Glutamat auf der NR2-Untereinheit (4,26,39,42). Außerdem wird die Rezeptorfunktion durch eine Vielzahl von Antagonisten beeinflusst. Dazu zählen D-AP5 als kompetitiver Antagonist an der Glutamatbindungsstelle, und 7-CK entsprechend an der Glyzinbindungsstelle. Zink hingegen ist ein nicht kompetitiver Antagonist des Ionenkanals. Unter anderem spielen noch Polyamide und die Konzentration von Wasserstoffionen, also der pH-Wert, eine Rolle in der Modulation der Rezeptorfunktion. MK-801 blockt ähnlich wie Magnesium den offenen Kanal und verhindert so den Ioneneinstrom (43).

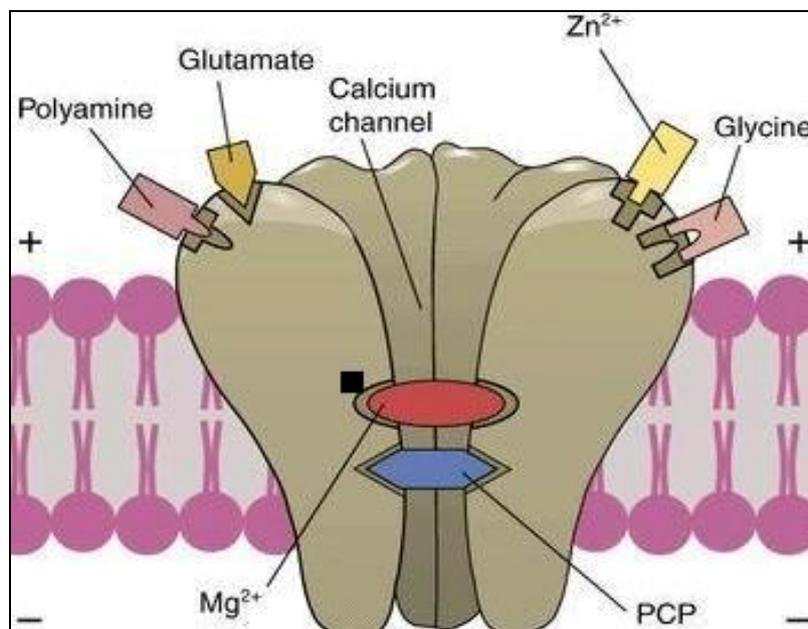


Abbildung 17: Schematischer Querschnitt durch den NMDA-Rezeptor. Die Kanalpore wird durch die Untereinheiten gebildet. Ist die Zellmembran nicht depolarisiert, verschließt ein Magnesiumion (Mg^{2+}) die Kanalpore. Im offenen Zustand ist sie für Calcium (Ca^{2+}) hoch permeabel. Die Bindungsstelle für Glutamat befindet sich auf der NR2-, die für Glycin auf der NR1-Untereinheit. Zusätzliche Bindungsstellen bestehen für Polyamine, Zink (Zn^{2+}), PCP und NMDA. MK-801 blockt wie Mg^{2+} die Kanalpore, 7-CK antagonisiert Gly and dessen Bindungsstelle, D-AP5 antagonisiert Glu an der NR2-Untereinheit.

4.3. Lokalanästhetika

LA hemmen die Bildung und Fortleitung von Aktionspotentialen durch Blockade von Natriumkanälen in nozizeptiven Nerven. Diese Blockade ist örtlich begrenzt und reversibel, teilweise oder vollständig. Es wird jedoch nur die Schmerzauslösung und nicht die Schmerzperzeption gehemmt.

LA sind amphiphile Substanzen. Sie bestehen aus einem aromatischen, hydrophoben Anteil, der über eine kurze Zwischenkette mit einer protonierbaren Aminogruppe verbunden ist. Die protonierte Form ist hydrophil und sorgt für die Blockade des Natriumkanals. Der ungeladene Zustand ist notwendig, damit das LA die Zellmembran durchdringen kann, um an seinen Wirkort zu gelangen. Daraus ergeben sich folgende Eigenschaften:

1. Ständig geladene Moleküle sind unwirksam, da sie die Zellmembran nicht durchdringen können.
2. Die Wirkung ist umso stärker, je hydrophober das aromatische Ringsystem ist, da LA so leicht in die Zelle gelangen und sie ungern wieder verlassen.

Bei einem physiologischen pH-Wert liegen die LA sowohl in geladener als auch in ungeladener Form vor.

Unter Stereoisomeren versteht man Moleküle, sog. Isomere mit identischer Summenformel und Konstitution, also gleicher Reihenfolge der Atome bzw. Atomgruppen, welche jedoch unterschiedlich räumlich angeordnet sind. Vergleichen kann man dieses Phänomen mit einem rechten und linken Handschuh. Beide verhalten sich wie Bild und Spiegelbild und sind nicht zur Deckung zu bringen (Inkongruenz).

4.3.1. Die Effekte der LA vom Ester- und Amidtyp

Die Einteilung der LA in den Ester- und den Amidtyp ergibt sich über die Bindung an der Zwischenkette. Liegt dort eine Esterbindung vor, handelt es sich um ein LA vom Estertyp, befindet sich dort eine Aminogruppe, so spricht man von LA vom Amidtyp. Dieser Bindungstyp ist ebenfalls verantwortlich für die Potenz der Natriumkanalblockade. Estertyp LA rufen eine stärkere Kanalblockade hervor, als LA vom Amidtyp. Sugimoto et al. fanden heraus, dass LA vom Estertyp die NMDA-Rezeptorantwort stärker hemmen, als LA vom Amidtyp. Dafür wurden zwei unterschiedliche extrazelluläre Wirkmechanismen

verantwortlich gemacht (71). Diese Ergebnisse stimmen nicht mit denen dieser Studie überein. Sie zeigen, dass kein Unterschied in der Stärke der Hemmwirkung auf den NMDA-Rezeptor besteht.

Wie in Studien gezeigt, liegt die Wirkseite intrazellulär und beide Typen bedienen sich des gleichen Wirkmechanismus (24). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass die Gruppe um Sugimoto LA in Konzentrationen von 10^{-4} M und höher benutzt hat. Bei Konzentrationen von 10^{-1} M waren die Antworten fast vollständig unterdrückt. Diese hohen Konzentrationen sind der Grund dafür, dass unspezifische Membraneffekte nicht ausgeschlossen und mechanische Rückschlüsse wahrscheinlich nicht gezogen werden können.

4.4. Die Protein Kinase C

Protein Kinasen sind Enzyme, die andere Proteine durch Zufügen von Phosphatgruppen modulieren. Diesen Vorgang nennt man Phosphorylierung. Phosphatgruppen werden von Adenosintriphosphat (ATP) abgespalten und auf Aminosäuren mit freien Hydroxylgruppen, wie z.B. Serin, Treonin, Thyrosin, übertragen (73). Dies führt bei den Proteinen zu funktionellen Änderungen durch veränderte Enzymaktivität oder Verknüpfung mit anderen Proteinen.

4.4.1. Der Wirkmechanismus der PKC

Die PKC reguliert eine Menge zellulärer Abläufe, besonders jene, die bei der Signaltransduktion von Bedeutung sind. Dadurch erklärt sich auch die Bedeutung, die den Protein Kinasen bei Vorgängen wie dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und dem Zellzyklus zukommt (9).

Bindet ein Hormon oder ein anderes Effektormolekül an den Membranrezeptor, kommt es über Kopplung an ein G-Protein zur Aktivierung der Phospholipase C. Sie spaltet das membranständige PIP₂ in DAG und IP₃, welches für die Freisetzung von Kalzium aus den zellulären Speichern verantwortlich ist. Kalzium wiederum vermittelt den Einbau von zytosolisch vorliegenden Protein Kinasen in die Membran. Dort agiert die PKC mit DAG und ist so in die vollständig aktivierte Form übergetreten. Die so aktivierte PKC phosphoryliert eine Vielzahl intrazellulärer Proteine. Zu den Angriffspunkten zählen eine

große Menge der Komponenten, die eine Rolle in der Signalübertragung der Zelle spielen, z.B. Ionenkanal regulierende Proteine, Kalzium- und Calmodulin-bindende Proteine oder Bestandteile des Translationsapparates (5,36). Es sind mehr als zehn Isozyme der PKC bekannt, von denen einige eine Gewebespezifität aufweisen.

4.4.2. Der Aufbau der PKC

Die PKC besteht aus einer N-terminalen regulatorischen und einer C-terminalen katalytischen Domäne, welche über eine Scharnierregion miteinander verbunden sind. Liegen keine aktivierenden Substanzen vor, befindet sich der Großteil der PKC im Zytosol und die regulatorische Einheit bindet sich so an die katalytische Domäne, dass kein Substrat gebunden werden kann und die PKC dadurch inaktiviert ist (56).

4.4.3. Die Regulation der PKC

Aufgrund dieser tiefgreifenden Einflüsse auf die Zelle, ist die Aktivität von Protein Kinasen streng reguliert. Sie werden durch Phosphorylierung oder Bindung von aktivierenden bzw. hemmenden Proteinen in ihrer Funktion kontrolliert. Zu den aktivierenden Substanzen gehören z.B. Kalzium, DAG, Phospholipide und Phorbolster (56). Die Enzyme der PKC bleiben länger aktiv, als das originale Aktivierungssignal andauert. Man spricht in diesem Falle von Long-term activation.

Bei disregulierter PKC-Aktivität kann es zu Krankheiten oder auch onkogenen Prozessen kommen (5).

4.4.4. Die Rolle der PKC

Abschnitte des NMDA-Rezeptors werden PKC abhängig phosphoryliert. Dadurch kommt es zu gesteigerten Ionenströmen durch die Kanalpore, was gleichzusetzen ist mit einer verstärkten Rezeptorantwort (45). Im Gegensatz dazu führt die Hemmung der PKC zu einer verminderten Rezeptortätigkeit nach Agonistenapplikation. Dies wurde sowohl in Neuronen des Trigemini und des Hinterhorns im Rückenmark (13), als auch in Oozyten, die rekombinant den NMDA-Rezeptor exprimieren (55), gezeigt.

Diese Studie zeigt, dass durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit LA und dem PKC-Inhibitor Chelerythrine kein additiver Effekt bezogen auf die Rezeptorfunktion erzielt werden kann. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die beiden Substanzen den gleichen Wirkmechanismus teilen. Es scheint, dass der hemmende Effekt der LA auf die Rezeptorfunktion indirekt über die Hemmung der PKC vermittelt wird. Trotz einer Vielzahl an verschiedenen Experimenten, die sich mit der PKC beschäftigen, bleiben die genauen Vorgänge, welche zur Beeinflussung der Rezeptorfunktion führen, noch ungeklärt. Offen ist weiterhin, ob die PKC-Wirkung direkt über direkte Phosphorylierung am Rezeptor (45), indirekt über eine PKC abhängige Aktivierung einer nachgeschalteten Signalkaskade vom Typ der non-receptor tyrosine kinase (Src) (47), oder durch eine Kombination beider Mechanismen vermittelt wird (3). Diesen Versuchen liegt die Klärung dieser Frage nicht zu Grunde, sie zeigen jedoch, dass die Hemmung der PKC höchst wahrscheinlich ein beteiligter Mechanismus des hemmenden Effekts der LA ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Entstehung der postoperativen Hyperalgesie und Opiattoleranz wird die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren verantwortlich gemacht. Intravenös verabreichte LA können diese hyperalgetischen Zustände unterbinden. Dadurch erklärt sich das besondere Interesse am NMDA-Rezeptor. Diese Arbeit stellt die Hypothese auf, dass LA die NMDA-Rezeptoraktivierung hemmen und somit einen positiven Effekt auf postoperative Schmerzzustände ausüben. Weiterhin wird untersucht, über welchen Wirkmechanismus diese Wirkung erzielt wird.

Für die Experimente wurden humane NMDA-Rezeptoren des Subtyps NR1A/2A rekombinant in *Xenopus laevis* Oozyten expremiert. Nativen Oozyten wurde in-vitro hergestellte messenger-RNA injiziert. Nach der Rezeptorexpression wurden die Spitzenströme nach Stimulation mit Glutamat/Glyzin (EC_{50}) durch Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik bestimmt. Das Membranpotential wurde bei -70 mV gehalten. Im Verlauf wird der Einfluss der handelsüblichen LA in klinisch relevanten Konzentrationen auf die Rezeptoraktivität betrachtet. Außerdem wird die Wirkung von Stereoisomeren und LA vom Estertyp untersucht. Die Rolle der PKC wird durch Experimente mit Aktivatoren und Inhibitoren bestimmt.

Dabei zeigt sich, dass native Zellen nicht auf die Applikation des Agonisten reagierten. NMDA-Rezeptor expremierende Zellen antworteten auf die Applikation von Glutamat und Glyzin (1 nM – 1mM) konzentrationsabhängig mit Einwärtsströmen.

Alle LA hemmen die Antwort des NMDA-Rezeptors auf die Gabe der Agonisten konzentrationsabhängig. Die Wirkung ist reversibel und stereoselektiv.

Der PKC-Inhibitor hat keinen zusätzlich hemmenden Effekt zu dem von Bupivacain. Nach Inkubation in Bupivacain führt der PKC-Aktivator zu keiner weiteren Stimulation des Rezeptors.

Die Ergebnisse zeigen, dass LA konzentrationsabhängig und reversibel die durch Glutamat und Glyzin hervorgerufene Aktivierung des NMDA-Rezeptorkanals hemmen. Der Effekt ist stereoselektiv. Die Hemmung der PKC scheint eine entscheidende Rolle bei diesen Vorgängen zu spielen. In mehreren Arbeitsgruppen wurde bisher gezeigt, dass LA in der Lage sind, Hyperalgesien und teilweise auch sekundäre Hyperalgesien zu unterdrücken. Die Ergebnisse dieser Studie könnten einen Teil zum Verständnis der reduzierten Hyperalgesie und Opiattoleranz nach Applikation von LA beitragen.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	Mikro
μA	Mikroampere
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BaCl_2	Bariumchlorid
Bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca_2NO_3	Kalziumnitrat
CaCl_2	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTP	Cytidintriphosphat
D-AP5	D-2-Amino-5-Phosphonopentanoat
DAG	Diazylglyzerol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC_{50}	halbmaximale Effektivdosis
E_{max}	maximale Wirkung
Glu	Glutamat
Gly	Glyzin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit
IP_3	Inositol-1,4,5-Trisphosphate
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter

LA	Lokalanästhetika
MK-801	Dizocilpin
M	Molar
MBS	Modified Barth Solution
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mm	Millimeter
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
Nl	Nanoliter
NMDA-Rezeptor	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Aspartat - Rezeptor
OP	Operation
OR2	Oocytes Ringer
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphate
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-14-Azetat
R	Widerstand
RNS	Ribonukleinsäure
Sec	Sekunde
SEM	standard error of mean (Standardfehler des Mittelwertes)
Tris-HEPES	Tris-4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethan-Sulfonsäure
Tyr-Ba	Barium Tyrodes
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
v.a.	vor allem

z.B.

zum Beispiel

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: <i>Xenopus laevis</i> , ausgewachsenes Weibchen	4
Abbildung 2: <i>Xenopus laevis</i> Oozyten, schematische Einteilung nach Dumont	6
Abbildung 3: Defollikulierte Oozyten des Stadiums V und VI	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik. Die Oozyte wird im Meßbad von der Spülflüssigkeit umspült und mit beiden Elektroden punktiert. Das Membranpotential wird durch die Spannungs- und Bezugselektrode bestimmt. Der Strom, der notwendig ist, um das Membranpotential auf -70 mV zu halten, wird über die Stromelektrode zugeführt. Die benötigte Strommenge errechnet der Verstärker durch Verschaltung mit der Erdungselektrode. Die in ihrer Wirkung auf die exprimierten NMDA-Rezeptoren zu untersuchenden Substanzen werden in das Meßbad gegeben (*).....	15
Abbildung 5: Antworten verschiedener Oozyten auf Agonistengabe. Native Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> antworten nicht auf die Zugabe von Glutamat und Glyzin bzw. NMDA und Glyzin. Bei mit NMDA kodierender mRNA der Untereinheiten NR1A/2A injizierten Oozyten ruft die EC ₅₀ Applikation von Glutamat und Glyzin Einwärtsströme hervor.	21
Abbildung 6: Identische Rezeptorantworten auf den spezifischen und physiologischen Agonisten. Der selektive Agonist NMDA (10 ⁻⁵ M) erzeugt in Kombination mit Glyzin (10 ⁻⁵ M) identische Rezeptorantworten im Vergleich zu denen der physiologischen Agonisten Glutamat und Glyzin (EC ₅₀).	22
Abbildung 7: Die Rezeptorantwort ist abhängig von der Glutamatkonzentration. Untersuchte Glutamatkonzentrationen 1 nM - 1 mM bei konstanter Glyzinkonzentration (10 µM). Beide Rezeptorsubtypen reagieren konzentrationsabhängig auf Glutamat. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied für die EC ₅₀ der beiden Subtypen, wohl aber für die E _{max} , die für NR1/2B höher als für NR1/2A liegt.....	23
Abbildung 8: Die Rezeptorantwort ist abhängig von der Glyzinkonzentration. Es wurde die Antwort des NMDA-Rezeptors auf unterschiedliche Glyzinkonzentrationen (1 nM - 1 mM) bei konstanter Glutamatkonzentration (10 µM) untersucht. Beide Rezeptorsubtypen reagieren konzentrationsabhängig auf Glyzin. Die E _{max} für NR1/2A liegt höher als für NR1/2B. Der Unterschied ist statistisch signifikant (p < 0,05). Die EC ₅₀ beträgt 1,2 ± 0,4 x 10 ⁻⁵ M für den NR1/2A- und 1,9 ± 0,7 x 10 ⁻⁶ M für den NR1/2B-Subtyp.	24
Abbildung 9: Bolus- und Flow-Applikation des Agonisten erzeugen identische Ergebnisse. Mit Blick auf die Größe des Spitzenstroms (Peak-Current) macht es keinen Unterschied,	

	ob die Agonisten Glutamat und Glyzin (jeweils 10^{-5} M) als Bolus (50 μ l) oder als Flow (20 sec; 5 ml/min) appliziert werden.	26
Abbildung 10:	Konzentrationsabhängige Rezeptorhemmung durch LA. Alle getesteten LA hemmen konzentrationsabhängig die Rezeptoraktivierung (NR1A/2A) durch Glutamat/Glyzin (EC_{50}). Die Ergebnisse sind in Prozent der Kontrollgruppe angegeben. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse der Kontrollgruppe. Die weißen Balken stellen die Antworten auf die Agonisten nach 10 min Inkubation in den verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen LA dar. (* = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle)	28
Abbildung 11:	Beispielgraph der Reversibilitätsprüfung. Beispielmessung einer durch EC_{50} von Glutamat und Glyzin hervorgerufenen Antwort einer einzelnen den NMDA-Rezeptor (NR1A/2A) exprimierenden Oozyte. Die Antwort wurde auf 57% reduziert nach 10 min Inkubation in S-(-)-Ropivacain (10^{-4} M) und erholte sich nach einer Auswaschphase von 10 min in MBS.	29
Abbildung 12:	Reversibilität der Rezeptorhemmung durch LA. Die durch die EC_{50} von Glutamat und Glyzin hervorgerufene Hemmung am NMDA-Rezeptor vom Typ NR1A/2A ist reversibel. Nach 10 min Inkubation in allen LA (10^{-4} M) folgt eine jeweils 10 min andauernde Auswaschphase in MBS. (* = $p < 0,05$; LA vs. ctrl und LA + Wash out)	30
Abbildung 13:	Die Wirkung der LA am NMDA-Rezeptor ist stereoselektiv. Antwort von NR1A/2A exprimierenden Oozyten auf Stimulation mit EC_{50} Glu/Gly. Nach 10 min Inkubation in 10^{-4} M R-(+)-Ropivacain ist kein Effekt zu erkennen. Inkubation in 10^{-4} M S-(-)-Ropivacain hemmt die Antworten signifikant (*= $p < 0,05$).	31
Abbildung 14:	Die Wirkung von Bupivacain auf PMA aktivierte NMDA-Rezeptoren. Alle getesteten Zellen exprimieren den NR1A/2A NMDA-Rezeptor. Bupivacain 10^{-4} M allein hemmt die Antworten auf 55 ± 10 % der Kontrolle. PMA (10^{-6} M für 5 min) induziert einen signifikanten Anstieg der Antworten auf 188 ± 10 %. Subsequente Behandlung der Zellen führt zu keiner Abnahme des stimulierenden Effekts von PMA (178 ± 18 %). Bei der co-inkubierten Gruppe wird der stimulierende Effekt von PMA komplett unterdrückt (105 ± 15 %). (* = $p < 0,05$ vs. ctrl; ** = $p < 0,05$ vs. PMA und ctrl).....	33
Abbildung 15:	Effekt von PKC-Inhibitoren auf die Wirkung von LA. Bupivacain (10^{-4} M) verursacht nach 10 min Inkubationszeit eine Signalabnahme nach Agonistengabe auf 57% der Kontrollzellen. Chelerythrine (5×10^{-5} M; 1h) verringert die Antworten auf 66 %. Die Kombination der Komponenten führt zu keiner weiteren Reduzierung der Reaktion auf NMDA-Rezeptoragonisten (62 %). (* = $p < 0,05$).	34

Abbildung 16: LA vom Ester- und Amidtyp zeigen die gleiche Wirkung. Untersucht wird der Einfluss von Procain als Vertreter der LA vom Ester-Typ auf PKC Aktivierung durch PMA und PKC Hemmung durch Chelerythrine. Procain (10^{-4} M, 10 min Inkubation) verringert die Antworten auf $60 \pm 6\%$. Chelerythrine (5×10^{-5} M, 60 min) reduziert Reaktionen auf $47 \pm 5\%$. Kombination beider Substanzen führt zu gleichen Ergebnissen. Die Kombination von Procain und PMA verursacht Antworten von 93% der Kontrolle und löscht den stimulierenden Effekt von PMA (168%) auf Rezeptorströme aus.36

Abbildung 17: Schematischer Querschnitt durch den NMDA-Rezeptor. Die Kanalpore wird durch die Untereinheiten gebildet. Ist die Zellmembran nicht depolarisiert, verschließt ein Magnesiumion (Mg^{2+}) die Kanalpore. Im offenen Zustand ist sie für Calcium (Ca^{2+}) hoch permeabel. Die Bindungsstelle für Glutamat befindet sich auf der NR2-, die für Glycin auf der NR1-Untereinheit. Zusätzliche Bindungsstellen bestehen für Polyamine, Zink (Zn^{2+}), PCP und NMDA. MK-801 blockt wie Mg^{2+} die Kanalpore, 7-CK antagonisiert Gly and dessen Bindungsstelle, D-AP5 antagonisiert Glu an der NR2-Untereinheit.43

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aanonsen LM, Wilcox GL. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 243: 9-19, 1987.
2. Advokat C, Rhein FQ. Potentiation of morphine-induced antinociception in acute spinal rats by the NMDA antagonist dextrorphan. *Brain Res* 699: 157-60, 1995.
3. Ali DW, Salter MW. NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 11: 336-42, 2001.
4. Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 18: 581-9, 1998.
5. Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C. The protein kinase C family. *Eur J Biochem* 208: 547-57, 1992.
6. Barnard EA, Miledi R., Sumikawa K. Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 215: 241-6, 1982.
7. Bekkers JM, Stevens CF. NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus, 33. *Nature* 341: 230-3, 1989.
8. Bespalov JB, Kudryashova M, Zvartau E. Prolongation of morphine analgesia by competitive NMDA receptor antagonist D-CP-Pene (SDZ EAA 494) in rats. *Eur J Pharmacol* 351: 299-305, 1998.
9. Black JD. Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci* 5: D406-D423, 2000.
10. Capco DG, Jeffrey WR. Transient localizations of messenger RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol* 89: 1-12, 1982.
11. Cassuto J, Wallin G, Hogstrom S, Faxen A, Rimback G. Inhibition of postoperative pain by continuous low-dose intravenous infusion of lidocaine. *Anesth Analg* 64: 971-4, 1985.
12. Célèrier E, Laulin JP, Larcher A, Le Moal M, Simonnet G. Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats. *Brain Res* 847: 18-25, 1999.
13. Chen L, Huang LY. Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356: 521-3, 1992.

14. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11: 327-35, 2001.
15. Dascal N. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22: 317-87, 1987.
16. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61, 1999.
17. Dumont JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153-79, 1972.
18. Dumont JN, Brummett AR. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J Morphol* 155: 73-97, 1978.
19. Durieux ME. OoClamp: an IBM-compatible software system for electrophysiologic receptor studies in *Xenopus* oocytes. *Comput Methods Programs Biomed* 41: 101-5, 1993.
20. Fletcher D, Pinaud M, Scherpereel P, Clytis N, Chauvin M. The efficacy of intravenous 0.15 versus 0.25 mg/kg intraoperative morphine for immediate postoperative analgesia after remifentanyl-based anesthesia for major surgery. *Anesth Analg* 90: 666-71, 2000.
21. Groudine SB, Fisher HA, Kaufman RP, Jr., Patel MK, Wilkins LJ, Mehta SA, Lumb PD. Intravenous lidocaine speeds the return of bowel function, decreases postoperative pain, and shortens hospital stay in patients undergoing radical retropubic prostatectomy. *Anesth Analg* 86: 235-9, 1998.
22. Guignard B, Bossard AE, Coste C, Sessler DI, Lebrault C, Alfonsi P, Fletcher D, Chauvin M. Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanyl increases postoperative pain and morphine requirement. *Anesthesiology* 93: 409-17, 2000.
23. Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177-82, 1971.
24. Hahnenkamp K, Durieux ME, Hahnenkamp A, Schauerte SK, Hoenemann CW, Vegh V, Theilmeier G, Hollmann MW. Local anaesthetics inhibit signalling of human NMDA receptors recombinantly expressed in *Xenopus laevis* oocytes: role of protein kinase C. *Br J Anaesth* 96: 77-87, 2006.
25. Hahnenkamp K, Van Aken H, Theilmeier G, Hoenemann CW. Effects of local anesthetics on perioperative coagulation, inflammation and microcirculation. *Anesth Analg* 94: 1441-7, 2002.
26. Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J. The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of

- co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region, 56. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6031-6, 1996.
27. Hodgkin AL, Huxley AF, KATZ B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116: 424-48, 1952.
 28. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology* 93: 858-75, 2000.
 29. Hollmann MW, Liu HT, Hoenemann CW, Liu WH, Durieux ME. Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium. Part II: interactions with volatile anesthetics. *Anesth Analg* 92: 1182-91, 2001.
 30. Huettner JE. Competitive antagonism of glycine at the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, 12. *Biochem Pharmacol* 41: 9-16, 1991.
 31. Ibanez, CF et al., Expression of neurotrophin-4 mRNA during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol*, 1992. 36(2): p. 239-45.
 32. Kang TH, Murakami Y, Matsumoto K, Takayama H, Kitajima M, Aimi N, Watanabe H. Rhynchophylline and isorhynchophylline inhibit NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 455: 27-34, 2002.
 33. Kashiwagi K, Masuko T, Nguyen CD, Kuno T, Tanaka I, Igarashi K, Williams K. Channel blockers acting at N-methyl-D-aspartate receptors: differential effects of mutations in the vestibule and ion channel pore. *Mol Pharmacol* 61: 533-45, 2002.
 34. Kastrup J, Petersen P, Dejjard A, Angelo HR, Hilsted J. Intravenous lidocaine infusion--a new treatment of chronic painful diabetic neuropathy? *Pain* 28: 69-75, 1987.
 35. Kelly DJ, Ahmad M, Brull SJ. Preemptive analgesia I: physiological pathways and pharmacological modalities. *Can J Anaesth* 48: 1000-10, 2001.
 36. Kikkawa U, Nishizuka Y. The role of protein kinase C in transmembrane signalling. *Annu Rev Cell Biol* 2: 149-78, 1986.
 37. Koppert W, Ostermeier N, Sittl R, Weidner C, Schmelz M. Low dose lidocaine reduces secondary hyperalgesia by a central mode of action. *Pain* 85: 217-24, 2000.
 38. Koppert W, Zeck S, Sittl R, Likar R, Knoll R, Schmelz M. Low-dose lidocaine suppresses experimentally induced hyperalgesia in humans. *Anesthesiology* 89: 1345-53, 1998.
 39. Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J. Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins, 24. *Neuron* 12: 1291-300, 1994.

40. Kus L, Saxon D, Beitz AJ. NMDA R1 mRNA distribution in motor and thalamic-projecting sensory neurons in the rat spinal cord and brain stem. *Neurosci Lett* 196: 201-4, 1995.
41. Kushner, L., et al., Coexpression of N-methyl-D-aspartate and phencyclidine receptors in *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(9): p. 3250-4.
42. Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18: 493-503, 2001.
43. Le Bourdelles B, Wafford KA, Kemp JA, Marshall G, Bain C, Wilcox AS, Sikela JM, Whiting PJ. Cloning, functional coexpression, and pharmacological characterisation of human cDNA encoding NMDA receptor NR1 and NR2A subunits. *J Neurochem* 62: 2091-8, 1994.
44. Leonard JP, Kelso SR. Apparent desensitization of NMDA responses in *Xenopus laevis* oocytes involves calcium -dependent chloride current. *Neuron* 4: 53-60, 1990.
45. Liao GY, Wagner DA, Hsu MH, Leonard JP. Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Mol Pharmacol* 59: 960-4, 2001.
46. Liu HT, Hollmann MW, Liu WH, Hoeneemann CW, Durieux ME. Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium: Part I. *Anesth Analg* 92: 1173-81, 2001.
47. Lu WY, Xiong ZG, Lei S, Orser BA, Dudek E, Browning MD, MacDonald JF. G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nat Neurosci* 2: 331-8, 1999.
48. Madeja M, Musshoff U, Speckmann EJ. A concentration-clamp system allowing two-electrode voltage-clamp investigations in oocytes of *Xenopus laevis*. *J Neurosci Methods* 38: 267-9, 1991.
49. Madeja M, Musshoff U, Speckmann EJ. Follicular tissues reduce drug effects on ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*, 70. *Eur J Neurosci* 9: 599-604, 1997.
50. Masu Y, Nakayama K, Tamaki H, Harada Y, Kuno M, Nakanishi S. cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature* 329: 836-8, 1987.
51. Masui Y. Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J Exp Zool* 166: 365-75, 1967.
52. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261-3, 1984.

53. Methfessel C, Witzemann V, Takahashi T, Mishina M, Numa S, Sakmann B. Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflugers Arch* 407: 577-88, 1986.
54. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529-40, 1994.
55. Mori H, Yamakura T, Masaki H, Mishina M. Involvement of the carboxyl-terminal region in modulation by TPA of the NMDA receptor channel. *Neuroreport* 4: 519-22, 1993.
56. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270: 28495-8, 1995.
57. Nishizawa N, Shirasaki T, Nakao S, Matsuda H, Shingu K. The inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor channel by local anaesthetics in mouse CA I pyramidal neurons. *Anesth Analg* 2002; 94:325-30
58. Nietgen GW, Honemann CW, Durieux ME. Influence of anesthetics on endogenous and recombinantly expressed G protein-coupled receptors in the *Xenopus* oocyte. *Toxicol Lett* 100-101: 319-27, 1998.
59. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-5, 1984.
60. Pancrazio JJ. Techniques of cellular electrophysiologic investigation. 1997.
61. Petersen K, Jones B, Segredo V, Jorgen B, Rowbotham DJ. Effect of remifentanil on pain and secondary hyperalgesia associated with the heat-capsaicin sensitization model in healthy volunteers. *Anesthesiology* 94: 15-20, 2001.
62. Rowbotham MC, Reisner-Keller LA, Fields HL. Both intravenous lidocaine and morphine reduce the pain of postherpetic neuralgia. *Neurology* 41: 1024-8, 1991.
63. Rygnestad T, Zahlsen K, Bergslien O, Dale O. Focus on mobilisation after lower abdominal surgery. A double-blind randomised comparison of epidural bupivacaine with morphine vs. lidocaine with morphine for postoperative analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 43: 380-7, 1999.
64. Sandkühler J. Schmerzgedächtnis: Entstehung, Vermeidung und Löschung. *Deutsches Ärzteblatt* Jg. 98: A2725-30, 2001.
65. SCHADE H. [Possibility of definite pregnancy diagnosis with *Xenopus laevis*] 1. *Z Geburtshilfe Gynakol* 134: 300-3, 1951.

66. Schito AM, Pizzuti A, Di Maria E, Schenone A, Ratti A, Defferrari R, Bellone E, Mancardi GL, Ajmar F, Mandich P. mRNA distribution in adult human brain of GRIN2B, a N-methyl-D- aspartate (NMDA) receptor subunit. *Neurosci Lett* 239: 49-53, 1997.
67. Schmalzing G, Eckard P, Kroner S, Passow H. Downregulation of surface sodium pumps by endocytosis during meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes, 45. *Am J Physiol* 258: C179-C184, 1990.
68. Sigel E. Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membr Biol* 117: 201-21, 1990.
69. Soreq H, Seidman S. *Xenopus* oocyte microinjection: from gene to protein. *Methods Enzymol* 207: 225-65, 1992.
70. Soreq, H., The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit Rev Biochem*, 1985. 18(3): p. 199-238.
71. Sugimoto M, Uchida I, Mashimo T. Local anaesthetics have different mechanisms and sites of action at the recombinant N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Br J Pharmacol* 138: 876-82, 2003.
72. Sumikawa K., Houghton M., Emtage J.S., Richards B.M., Barnard E.A. Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* 292: 862-4, 1981.
73. Taylor SS, Radzio-Andzelm E, Hunter T. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase, 116. *FASEB J* 9: 1255-66, 1995.
74. Tolle TR, Berthele A, Zieglansberger W, Seeburg PH, Wisden W. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci* 13: 5009-28, 1993.
75. Vaida SJ, Ben David B, Somri M, Croitoru M, Sabo E, Gaitini L. The influence of preemptive spinal anesthesia on postoperative pain. *J Clin Anesth* 12: 374-7, 2000.
76. Vallano ML. Developmental aspects of NMDA receptor function. *Crit Rev Neurobiol* 12: 177-204, 1998.
77. Vinik HR, Kissin I. Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanyl infusion in humans. *Anesth Analg* 86: 1307-11, 1998.
78. Watanabe M, Mishina M, Inoue Y. Distinct spatiotemporal distributions of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the mouse cervical cord. *J Comp Neurol* 345: 314-9, 1994.
79. Weber W. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421: 213-33, 1999.

80. Weber WM. Endogenous ion channels in oocytes of xenopus laevis: recent developments. *J Membr Biol* 170: 1-12, 1999.
81. Xiong ZG, Raouf R, Lu WY, Wang LY, Orser BA, Dudek EM, Browning MD, MacDonald JF. Regulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by constitutively active protein kinase C. *Mol Pharmacol* 54: 1055-63, 1998.
82. Yamakura T, Harris RA. Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. *Anesthesiology* 93: 1095-101, 2000.
83. Yamakura T, Bertaccini E, Trudell JR, Harris RA. Anesthetics and ion channels: molecular models and sites of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 23-51, 2001.

9. CURRICULUM VITAE

10. DANKSAGUNG

Es war ein langer und nicht immer leichter Weg, den ich ohne Unterstützung und Hilfe sicher nicht bis zum Ende gegangen wäre. Doch nun ist es geschafft und ich möchte die Gelegenheit nutzen, mich bei allen Beteiligten zu bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Klaus Hahnenkamp nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für die gute Betreuung, Geduld und Motivation „dran zu bleiben“. Er war mir stets ein zuverlässiger Ansprechpartner, stand mir mit seinem Fachwissen zur Seite und hat so manche freie Stunde geopfert.

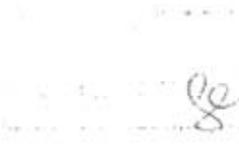
Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt und mir das Studium ermöglicht haben.

Ich danke meiner Schwester Sandra, die mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit unterstützt hat.

Dank an alle Freunde und ganz besonders Julia für Formatierungshilfen, Korrektur lesen, und moralische Unterstützung.

11. ANHANG

11.1. Tierversuchsgenehmigung der Bezirksregierung Münster



DER
OBERBÜRGERMEISTER

STADT MÜNSTER

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
z.H. Frau Dr. Bettina Linck
Domagkstr. 12
48149 Münster

VETERINÄR- UND
LEBENSMITTEL-
ÜBERWACHUNGSAMT

Schulmensteige 1
Auskunft erteilt:
Frau Heumann
Zimmer: 100
Telefon: 02534/971 - 301
Telefax: 02534/971 - 300
E-Mail: Amt_39@stadt-
muenster.de
Spracharten:
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:
12.03.2000 an die Bezirksregierung
hier eingegangen am 05.04.2000

Mein Zeichen (Bitte angeben):
39/401 a)

Münster,
12.04.2000

Tierschutzgesetz:

Tierversuch G 34/2000 Antragsteller: Prof. Dr. W. Schmitz und Prof. Dr. H. Van Aken

Versuchsleiterin: Dr. Bettina Linck, Pharmakologie u. Toxikologie	Stellvertreter: Prof. Dr. J. Neumann
2. Versuchsleiter: Dr. Ch. Hönemann, Anästhesiologie und op. Intensivmedizin	Prof. Dr. T. Möllhoff, Anästhesiologie und op. Intensivmedizin

Sehr geehrte Frau Dr. Linck,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung von

78 afrikanischen Krallenfröschen.

Folgende Auflagen sind einzuhalten:

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Pfleger des Tierstalls Ihres Institutes zuständig.
2. Die medizinische Versorgung hat durch Herrn Prof. Dr. Richter zu erfolgen.
3. Die Käfige sind mit der Nummer der Versuchsgenehmigung zu kennzeichnen.
4. Über die bezogenen Tiere und ihren Verbleib sind Aufzeichnungen zu machen.
5. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei Tierart und -zahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.

Diese Erlaubnis gilt für die Laufzeit des genehmigten Versuches. Bitte beachten Sie, dass der Versuch erst begonnen werden kann, wenn Ihnen die Genehmigung der Bezirksregierung Münster vorliegt.

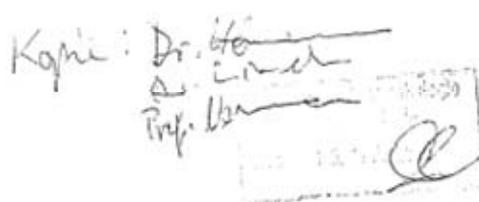
Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag


Dr. Otto
Stadt Veterinärdirektor

Konten der Stadtkasse		Zentrale Verbindungen	
Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 752	Sparkasse Münster	* Hauptverbindung (0253) 400 0
Landesbank für Westfalen Münster	Kto.-Nr. 42 301 700	Sparkasse Münster	(0253) 402-7700
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 1 36-881	Sparkasse Münster	1251432*
Bank für Genossenschaft	Kto.-Nr. 1 010 263 106	Sparkasse Münster	C 4901
Bankhaus Lampe Münster	Kto.-Nr. 204 902	Sparkasse Münster	Stadtkasse@stb1.muenster.de
Commerzbank Münster	BLZ 480 501 50	Sparkasse Münster	BLZ 480 400 016
Deutsche Bank Münster	BLZ 482 900 00	Sparkasse Münster	BLZ 400 700 80
Dresdner Bank Münster	BLZ 442 100 48	Sparkasse Münster	BLZ 400 800 40
Volksbank Münster eG	BLZ 482 101 17	Sparkasse Münster	BLZ 481 800 50
Westfälische Landesbank Münster	BLZ 480 201 57	Sparkasse Münster	BLZ 480 300 00
Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 393 210 000	Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 4 200 840
Deutsche Bank Münster	Kto.-Nr. 5470 005	Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 81 226
Dresdner Bank Münster	Kto.-Nr. 606 400 605	Sparkasse Münster	
Volksbank Münster eG	Kto.-Nr. 4 200 840	Sparkasse Münster	
Westfälische Landesbank Münster	Kto.-Nr. 81 226	Sparkasse Münster	

Kopie: Dr. Otto
 Dr. Schmitz
 Prof. Van Aken



DER
 OBERBÜRGERMEISTER
STADT MÜNSTER

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Herrn
 Prof. Dr. W. Schmitz oder Vertreter
 Institut für Pharmakologie und Toxikologie
 Domagkstr. 12

48149 Münster

VETERINÄR- UND
 LEBENSMITTEL-
 ÜBERWACHUNGSAMT

Scheiwenstraße 1

Auskunft erteilt:
 Frau Heumann
 Zimmer: 106
 Telefon: 02534/971 - 301
 Telefax: 02534/971 - 399
 E-Mail:
 Amt_35@stadt-muenster.de
 Sprechzeiten:
 nach Vereinbarung

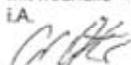
Datum und Zeichen Ihres Schreibens: 12.03.2000 an die Bezirksregierung
 Mein Zeichen (Bitte angeben): 39.401 a)
 Münster, 12.04.2000

Tierschutz:
 hier: Versuchsvorhaben: Untersuchungen von Membranproteinen (G-Protein gekoppelte Rezeptoren - GPR, Liganden - und Spannungs-kontrollierte Ionenkanäle) und deren Beeinflussung durch Anästhetika
 - Antragsteller: Prof. Dr. med. W. Schmitz und Prof. Dr. med. H. Van Aken

Sehr geehrter Herr Professor Schmitz,

beifügt erhalten Sie die Genehmigung zur Haltung von afrikanischen Krallenfröschen für obigen Versuch. Da für mich Ansprechpartner und Verantwortlicher eines Versuches grundsätzlich der Leiter eines Versuches bzw. sein Stellvertreter ist, habe ich die Genehmigung auf Frau Dr. Bettina Link ausgestellt. Bitte leiten Sie das Schreiben an sie weiter.

Mit freundlichen Grüßen

i.A.

 Dr. Otto
 Städt. Veterinärdirektor

Konten der Stadtkasse		Zentrale Verbindungen	
Stadtkasse Münster	Kto.-Nr. 752	BLZ 400 801 80	Deutscher Sparkassenverband
LEBENSVERSICHERUNG MÜNSTER	Kto.-Nr. 42 201 705	BLZ 400 800 00	Deutsche Bank Münster
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 1 35-481	BLZ 440 100 40	Deutscher Sparkassenverband
Bank für Gemeinnützige	Kto.-Nr. 1 613 300 100	BLZ 400 101 10	Volkswagen Leasing AG
Bankhaus Lohmann Münster	Kto.-Nr. 300 000	BLZ 400 801 80	Walddeutsche Leasingbank Münster
		Kto.-Nr. 300 510 900	BLZ 400 400 30
		Kto.-Nr. 0470 005	BLZ 400 700 80
		Kto.-Nr. 006 403 900	BLZ 400 800 40
		Kto.-Nr. 4 700 800	BLZ 401 000 00
		Kto.-Nr. 61 330	BLZ 400 800 00
			Telefax (0251) 493-7790
			E-Mail: Stadtkass@stadt-muenster.de



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster - 48129 Münster

Herrn Prof. Dr. med. W. Schmitz
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Westf. Wilhelms-Universität Münster
Domagkstr. 12
48129 Münster

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefax: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möller
Aktenzeichen
23.03552.0 (A 40200)

Herrn Prof. Dr. med. H. Van Aken
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
und operative Intensivmedizin
Albert-Schweitzer-Str. 33
48129 Münster

6. Juni 2000

Betr.: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren;
hier: Anzeige von Versuchsvorhaben gemäß § 10a Tier-
schutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Be-
kanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105)
Versuchsvorhaben:
"Untersuchungen von Membranproteinen (G-Protein
gekoppelte Rezeptoren - GPR, Liganden - und
Spannungs - kontrollierte Ionenkanäle) und deren
Beeinflussung durch Anästhetika"

Bezug: Ihr Antrag auf Genehmigung von Versuchsvorhaben gemäß
§ 8 Abs. 1 TierSchG vom 12.03. 2000, hier eingegangen
am 03.04.2000

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Schmitz,
sehr geehrter Herr Prof. Dr. Van Aken,

ich habe Ihren o.a. Antrag geprüft und festgestellt, dass das
von Ihnen geplante Versuchsvorhaben nicht genehmigungspflichtig
nach § 8 TierSchG ist, sondern unter die Bestimmung des § 10a
TierSchG fällt und somit lediglich anzeigepflichtig ist.

Die geplanten Eingriffe und Behandlungen dürfen jedoch nur
vorgenommen werden, wenn die Voraussetzungen des § 7 Abs. 2 und
3 (zulässiger Verwendungszweck, Unerlässlichkeit, ethische
Vertretbarkeit) vorliegen.

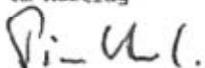
Grüne Umwelttelefon: (0251) 411-3390
e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • X-400: C=de, A=de, P=de.nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle • Telefax (0251) 411-2525
Kassen der Regierungskasse Münster:
Landesprüfamtlich Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520
Westfälische Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820
Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1, 5, 6, 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2, 10, 11, 14, 21, 64 bis Domplatz

Da nach Ihren Antragsangaben auf das Vorliegen der genannten Voraussetzungen geschlossen werden kann, bestätige ich gemäß § 10a TierSchG das o.g. Versuchsvorhaben.

Das Versuchsvorhaben läuft jetzt unter der Nummer A 40/2000.

Herr Dr. Lücke als zuständiger Tierschutzbeauftragter und die Stadt Münster - Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt - (Erlaubnisbehörde gemäß § 11 TierSchG) erhalten jeweils eine Durchschrift dieser Bestätigung.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



Dr. Piontkowski



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Frau
PD Dr. med. B. Link
Institut für Pharmakologie und
Toxikologie
Universitätsklinikum Münster
Domagkstr. 12

48149 Münster

Dienstgebäude:
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2104
Telefax:
Kam: 423
Auskunft erteilt:
Kerstin Stichling
E-Mail:
kerstin.stichling@bezreg-muenster.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.2.0 (A 40/2000)

21. Mai 2003

Anderungsanzeige zu Versuchsvorhaben gem. § 8a Abs. 4 Tierschutzgesetz (TierSchG)

Ihre Anzeige vom 29.04.2003, hier eingegangen am 21.05.2003
A 40/2000

Sehr geehrte Frau Dr. Link,

Ihre o.a. Anzeige wird hiermit bestätigt.
Für den laufenden Tierversuch A 40/2000 sind Sie als Stellvertreterin und Herr Dr.
Hahnenkamp als Leiter benannt.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

Stichling
Stichling

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300
E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
zentrale Telefonnummer: (0251) 411-2525
Konten der Landeskasse Münster:
Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 530
Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820
OPNV ab Hof: Linien 14 • 20 bis Halterelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis
Halterelle Wobbehorststraße (Haus K), Linie 7 bis Halterelle Wiener Str. (Haus W).

