

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie I
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape

**Modulierung von heterolog exprimierten
spannungsabhängigen K^+ -Kanälen durch das
nicht-opiate Schmerzmittel Diclofenac**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Daniel Leifkes

aus Ahaus

2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz
1. Berichterstatter: em. Univ.-Prof. Dr. med. Erwin Speckmann
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Eckardt
Tag der mündlichen Prüfung: 03.08.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie I
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape
Referent: em. Univ.-Prof. Dr. med. Erwin Speckmann
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Eckardt

Zusammenfassung

Modulierung von heterolog exprimierten spannungsabhängigen K⁺-Kanälen durch das nicht-opiate Schmerzmittel Diclofenac

Daniel Leifkes

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind an der Entstehung und Modulation von neuronalen Aktionspotentialen beteiligt und damit möglicherweise auch an der peripheren Schmerzverarbeitung und -weiterleitung. In dieser Arbeit wurde ein möglicher direkter Effekt des nicht-opioiden Schmerzmittels Diclofenac auf die Aktivität spannungsabhängiger Kaliumkanäle (K_v) getestet. Hierzu wurde cDNA verschiedener gängiger K_v-Kanäle (K_v1.1, K_v1.3, K_v2.1, K_v3.1 und K_v4.2) transkribiert und die so gewonnene cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert, die als heterologes Expressionssystem dienen.

Die exprimierenden Oozyten wurden mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik elektrophysiologisch unter Kontrollbedingung (ND96), 1 mM Diclofenac und Inhibitor-Gabe (5 mM 4-AP) gemessen und analysiert.

Die Applikation von Diclofenac bewirkte beim K_v1.1 eine ~25%ige und beim K_v1.3 eine ~50%ige Inhibierung des Kanalstromes. Eine Aktivierung von ~30% wurde beim K_v2.1 gemessen, beim K_v3.1 zeigte sich eine Aktivierung von ~10% und beim K_v4.2 eine Aktivierung von ~50%.

Als „low-voltage-activated“ Kaliumkanäle aktivieren K_v1.X um den Schwellenwert von Aktionspotentialen. Eine Herunterregulierung von K_v1-Strömen würde die Membranschwelle für die Aktionspotentiale erniedrigen und damit eine höhere Rate von spontanen inhibitorischen postsynaptischen Strömen (sIPSCs) in der Schmerzverarbeitung ermöglicht werden.

Der K_v2.1 und K_v3.1 gehören zu den „high-voltage-activated“-Kaliumkanälen. Diese Kanäle aktivieren erst in der Depolarisationsphase und regulieren somit die Breite von präsynaptischen Aktionspotentialen. Eine deutliche Erhöhung des Ganzzellstromes durch Diclofenac beim K_v3.1 und K_v2.1 Kanal unterstützt die These, dass Diclofenac durch eine Verringerung der Transmitterausschüttung an der präsynaptischen Seite und damit eine verringerte Signalübertragung auf das nachfolgende Neuron, eine schmerzreduzierende Wirkung entfaltet.

A-Typ Kanäle, zu denen K_v4.2 zählt, aktivieren bei Depolarisation und gehen dann in eine schnelle spannungsabhängige Inaktivierung über. Eine Steigerung der K_v4.2-Aktivität führt zu einer Verringerung der Aktionspotentialbreite, präsynaptisch käme es zu einer Verringerung des Ca²⁺-Eintritts und in Folge zu einer geringeren Neuropeptidfreisetzung. Eine verringerte Signalübertragung auf das nachfolgende Neuron würde eine Schmerzentfaltung eingrenzen.

Tag der mündlichen Prüfung: 03.08.2010

Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidenten Münster genehmigt (AZ 23.0835.1.0 (G 32/97) vom 23.10.1997).

Diese Dissertation ist in Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Schmerz und Nozizeption.....	1
1.2	Periphere Nozizeption	1
1.3	Schmerzweiterleitung	3
1.4	Synaptische Übertragung der Nozizeption	4
1.5	Schmerzmittel.....	4
1.6	Spannungsabhängige Kaliumkanäle.....	6
1.7	Ziel der Arbeit	9
2	Material und Methoden	12
2.1	Molekularbiologie	12
2.1.1	Verwendete K _v -cDNA Klone	13
2.1.2	Plasmid-Linearisierung.....	13
2.1.3	DNA-Extraktion	13
2.1.4	DNA-Gel und Dokumentation.....	13
2.1.5	Synthese von <i>in-vitro</i> cRNA.....	14
2.1.6	Denaturierendes RNA-Agarosegel	15
2.1.7	Fluorimetrische Quantifizierung von RNA	15
2.1.8	Verwendete Lösungen für die Molekularbiologie	17
2.2	Kultivierung von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	18
2.3	Defollikulierung von Oozyten	19
2.4	RNA-Injektion in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	20
2.4.1	Herstellen der Injektionskapillaren.....	20
2.4.2	RNA-Injektion in die Oozyte mit Drumont-Pipette	20
2.5	Elektrophysiologie.....	21
2.5.1	Messung der Ionenströme mit der Voltage-Clamp-Methode	21
2.5.2	Aufbau des Oozytenmessstandes.....	23
2.5.3	Herstellung von Ableitelektroden.....	24
2.5.4	Experimentelle Durchführung der Versuche	25
2.5.5	Messprotokolle	26

2.5.6	Auswertung der Stromregistrierung	27
2.5.7	Verwendete Lösungen für Elektrophysiologie	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Darstellung der Wirkung von Diclofenac auf den $K_v1.1$ Kanal	30
3.2	Darstellung der Wirkung von Diclofenac auf den $K_v1.3$ Kanal	33
3.3	Darstellung der Wirkung von Diclofenac auf den $K_v2.1$ Kanal	35
3.4	Darstellung der Wirkung von Diclofenac auf den $K_v3.1$ Kanal	37
3.5	Darstellung der Wirkung von Diclofenac auf den $K_v4.2$ Kanal	39
4	Diskussion.....	41
5	Zusammenfassung	48
6	Literaturverzeichnis	51
7	Anhang.....	I
7.1	Plasmidkarten der verwendeten cDNA-Kaliumkanalklone.....	I
7.2	Verzeichnis der im Text verwendeten Abbildungen	III
7.3	Verzeichnis der im Text verwendeten Tabellen	III
7.4	Abkürzungsverzeichnis	III
7.5	Lebenslauf.....	IV
7.6	Danksagung	V
7.7	Genehmigung von tierexperimentellen Arbeiten.....	VI

1 Einleitung

1.1 Schmerz und Nozizeption

“Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist, oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“ [36].

Im Allgemeinen unterscheidet man somatische und viszerale Schmerzen, die der Körper in Form der somatoviszeralen Sensibilität erfasst. Bei der somatischen Sensibilität unterscheidet man die Sensibilität der Haut (Oberflächensensibilität) und die Sensibilität der Skelettmuskulatur, der Knochen, der Sehnen, der Gelenke und Faszien (Tiefensensibilität). Der viszerale Schmerz tritt durch Überdehnung der glatten Muskulatur von Hohlorganen (Koliken), bei Mangeldurchblutung des Herz- oder Glattmuskelgewebes (Ischämie) oder bei Entzündungen auf [85].

Ebenso unterscheidet man akute und chronische Schmerzen. Der akute Schmerz ist kurzzeitig und entsteht durch Erregung von freien Nervenendigungen, den Nozizeptoren [32, 57]. Diese sind spezifische Sensoren und die zugehörigen afferenten Neurone, die bei unterschiedlich intensiven noxischen Reizen unterschiedlich stark erregt werden. Ihre Erregungen können somit Reize diskriminieren und kodieren, die als unterschiedlich schmerzhaft empfunden werden. Chronische Schmerzen halten über Monate bzw. Jahre an. Sie werden entweder durch kontinuierliche Reizung von Nozizeptoren, oder durch Schädigung des schmerzleitenden und verarbeitenden neuronalen Systems hervorgerufen [38].

1.2 Periphere Nozizeption

Peripherer Schmerz wird von Hinterhornneuronen (*dorsal root ganglion neuron*, DRG-N) registriert und an das zentrale Nervensystem (ZNS) übermittelt. Dieser Prozess ist auf drei subzelluläre Kompartimente des Neurons verteilt: 1. der periphere Nozizeptor, der die schmerzauslösenden Faktoren detektiert; 2. das Axon, das der Schmerzweiterleitung dient; und 3. die präsynaptische Nervenendigung, welche das Signal auf das nächste Neuron überträgt (**Abb. 1.1**).

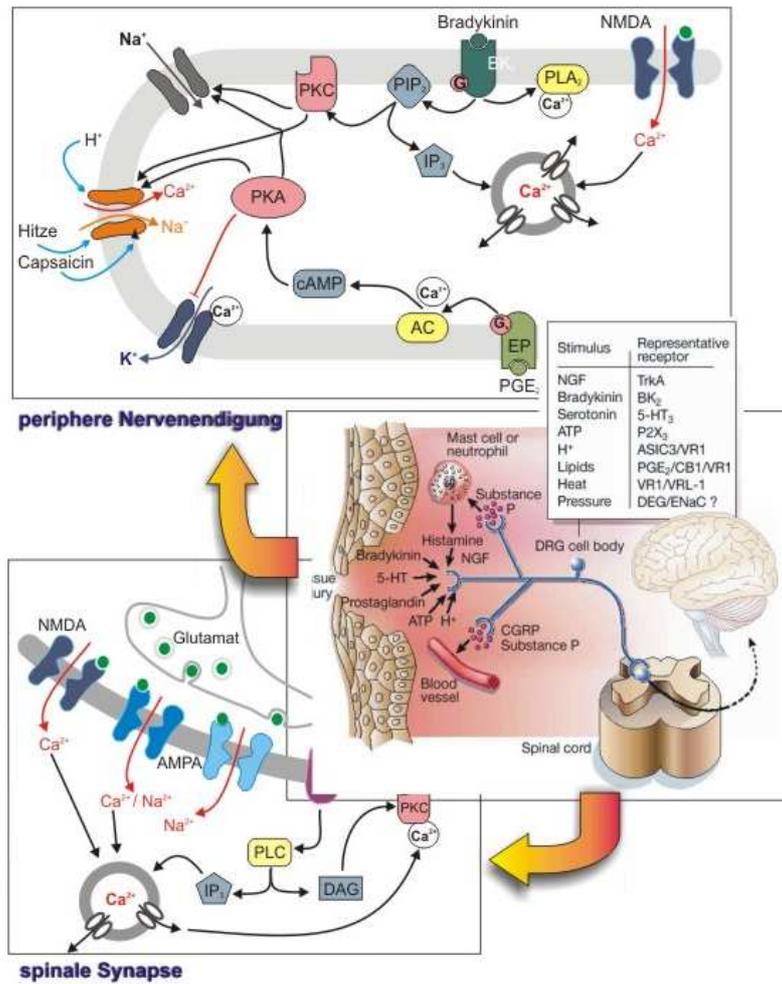


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Nozizeption und ihrer Weiterleitung (verändert nach Schmidt & Unsicker [58] und Silbernagel & Despopoulos [80])

Mitte: Freisetzung von schmerz-induzierenden Botenstoffen aufgrund von Gewebeschädigungen und Ausschüttung von pro-inflammatorischen Neuropeptiden. Durch die Schädigung zellulärer Strukturen werden die Botenstoffe Bradykinin, Serotonin (5-HT), Prostaglandin (PGE₂), ATP und Protonen (H⁺) freigesetzt und wirken auf nozizeptive-afferente Nervenendigungen. Diese Stimuli zielen jeweils auf einen diskreten Rezeptor. Infolge der Aktivierung der Nervenendigung werden Neuropeptide wie die Substanz P und CGRP (Calcitonin-Genes Related Peptide) über einen Ca²⁺-abhängigen Mechanismus ausgeschüttet und über das Gefäßsystem im Körper verteilt. Die Aktivierung von Mastzellen- bzw. neutrophilen Granulozyten durch die Substanz P bewirkt eine zusätzliche Stimulanz der Nervenendigung. **Oben:** Intrazelluläre Vorgänge bei der Stimulierung von Nozizeptoren durch verschiedene chemische Reize und Hitze. Hitze, Protonen, Capsaicin und Serotonin (5-HT) öffnen Ionenkanäle direkt. Bradykinine und Prostaglandine (PGE₂) induzieren Signalkaskaden, durch die intrazelluläre Calciumspeicher entleert und Ionenkanäle phosphoryliert werden. **Unten:** Nozizeptive Erregungsübertragung im Hinterhorn des Rückenmarks. Die zentralen Endigungen der DRG-Zellen bilden mit Interneuronen und den aufsteigenden zentralen Neuronen Synapsen, deren Haupttransmitter Glutamat ist. Glutamat bindet an vier verschiedene Rezeptoren: AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren sind liganden- (Glutamat) aktivierte Ionenkanäle und der „metabotrope Glutamatrezeptor“. Dieser ist über ein G-Protein an die Phospholipase C und den nachfolgenden IP₃-Signaltransduktionskette gekoppelt. Die volle Wirkung der synaptischen Übertragung kommt erst bei einer Kooperation aller Rezeptoren und auch mit den Co-Transmittern Substanz P und CGRP zustande. (Abkürzungen siehe Anhang 7.4).

Schmerzen werden durch mechanische, thermische oder chemische Gewebeschädigungen (Noxen) ausgelöst. Bei diesen unterschiedlichen Einflüssen werden aus den geschädigten Zellen und efferenten Nervenendigungen schmerz-induzierende Botenstoffe in den Extrazellularraum freigesetzt, bzw. ausgeschüttet (**Abb. 1.1 Mitte**). Diese Schmerzmediatoren binden an Nozizeptoren der afferenten Nervenendigungen (**Abb. 1.1 Oben**). Zusammengenommen führen diese Prozesse zu einer Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionsketten, die durch die Modulierung von Ionenkanälen (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) bzw. -Rezeptoren (NMDA) zu einer Veränderung der Ionenleitfähigkeit und damit zur Ausbildung von Aktionspotentialen an den Nervenendigungen führt.

Zum Beispiel führt die Ausschüttung von Arachidonsäuremetaboliten wie PGE_2 zur Aktivierung der PKA und Ausschüttung von Bradykinin zur Aktivierung der PKC, was zu einer Modulation von K^+ - und Na^+ -Kanälen führt [55]. Diese freigesetzten Modulatoren spielen ebenfalls eine Schlüsselrolle bei Entzündungsprozessen [45, 83]. Temperaturänderungen, Veränderung des pH-Wertes oder auch die Applikation von körperfremden chemischen Modulatoren wie Capsaicin [8] modulieren auf einem direkten Weg die Na^+ - und Ca^{2+} -Leitfähigkeit der Rezeptormembran (**Abb. 1.1 Oben**).

1.3 Schmerzweiterleitung

An der Schmerzweiterleitung sind nicht-myelinisierte Fasern (C-Fasern, Leitungsgeschwindigkeit 0,5 - 2 m/s) und myelinisierte Fasern ($\text{A}\alpha$ -, $\text{A}\beta$ -Fasern z.B. in Muskeln, 30 – 120 m/s und $\text{A}\delta$ -Fasern z.B. in der Haut, 12 - 30 m/s) beteiligt [27, 81]. Die Zellkörper dieser bipolaren nozizeptiven afferenten ersten Neurone liegen in den Spinalganglien und werden als DRG-Neurone (s.o.) bezeichnet. Ihre zentralen Endigungen bilden im Rückenmark mit Interneuronen und aufsteigenden Neuronen Synapsen (**Abb 1.1, Unten**), deren Transmitter Glutamat, Substanz P und ATP sind [13]. Nach Umschaltung auf ein Folgeuron in den Laminae I, II, IV und VI des Hinterhorns und einem Seitenwechsel, ziehen die Axone des zentralen Neurons im *Tractus spinothalamicus* oder *Tractus spinoreticularis* zum Gehirn (**Abb. 1.1, Mitte**) [31, 60]. Der Thalamus spielt für die Weiterleitung und Verarbeitung von sensorischen Informationen eine wichtige Rolle. Im somatosensorischen Kortex und weiteren

Hirnregionen, wie limbisches System, Hypothalamus, Insula und anterioren cingulären Kortex (ACC), findet die bewusste Schmerzempfindung, Lokalisation und Registrierung der Stärke von Schmerz statt [77].

1.4 Synaptische Übertragung der Nozizeption

Nervenzellen geben Informationen zumeist in Form von chemischen Signalen weiter. Der Ort der Informationsübertragung wird als Synapse bezeichnet (**Abb. 1.1, unten**). Präsynaptisch wurden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle identifiziert, welche die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat induzieren [47]. Postsynaptisch, also am ersten zentralen Neuron, führt die Aktivierung von ionotropen Kanalrezeptoren wie NMDA-, AMPA- und Kainat zu einem Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} sowie zu einem Ausstrom von K^+ . Die Aktivierung des metabotropen Glutamatrezeptors aktiviert den G-Protein-abhängigen IP_3 -Signalzyklus, was u.a. eine intrazelluläre Freisetzung von Calcium bewirkt. Diese Vorgänge führen zu einer Depolarisierung der postsynaptischen Membran und damit zur Entstehung eines gradierten Potentials.

1.5 Schmerzmittel

Es werden opioidartige und nicht-opioidartige Analgetika unterschieden. Opioide sind Alkaloide aus dem Saft des Schlafmohns *Papaver somniferum* (Morphin, Codein, Papaverin) und deren Derivate (z.B. Fentanyl). Die analgetische Wirkung dieser körperfremden Opiate und Opioide ist auf eine Affinität zu Rezeptoren für endogene Opioide (Enkephaline, Endorphine, Dynorphine) zurückzuführen, die eine Veränderung der Ionenströme zur Folge haben können. Diese Rezeptoren (μ -, χ - und γ -Rezeptoren) befinden sich vorwiegend im ZNS, aber auch peripher an primären afferenten Endigungen. Zum Beispiel erzeugt die Aktivierung eines peripheren μ -Opioid Rezeptors eine lokale Antinozizeption [44].

Nicht-opioidartige Analgetika

Die nicht-opiaten Analgetika werden in antipyretische Analgetika (u.a. Paracetamol, Ibuprofen, Metamizol) und nicht-steroidale Antiphlogistika (u.a. Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen) eingeteilt. Häufig ist die Wirkung dieser Substanzen in

unterschiedlichem Maße überlappend analgetisch, antipyretisch und größtenteils auch anti-inflammatorisch [68]. Die Gruppe der nicht-opiaten Schmerzmittel hat eine periphere und/oder zentrale Wirkung. Sie hemmen zum einen die Enzyme Cyclooxygenase-1 (COX-1) und/oder Cyclooxygenase -2 (COX-2) in unterschiedlichem Maße und somit die Prostaglandinsynthese (**Abb. 1.1**, [69]), zum anderen unterdrücken sie die Erregungsleitung [63].

NSAIDs

Nicht-steroidale-Antiphlogistika (*non steroidal anti inflammatory drugs*, NSAIDs) sind Inhibitoren von Cyclooxygenasen [90]. Ihre anti-inflammatorische und analgetische Wirkung beruht somit auf einem Eingriff in die Prostaglandinsynthese durch Inhibierung der Oxygenierung von Arachidonsäure zu Prostaglandin G_2/H_2 am Beginn des Syntheseweges. Es wird vermutet, dass NSAIDs auch auf andere Ziele wirken. Zum Beispiel zeigen genetische *knock-out* Mäuse „ohne“ COX-1 und COX-2 immer noch einen analgetischen Effekt auf NSAID [2]. Anwendung von NSAIDs verringert sowohl kutanen- [70], als auch cornealen Schmerz [9], induziert durch einen sauren pH-Wert bei Abwesenheit von Entzündung. Man geht davon aus, dass zwei Effekte eine wichtige Rolle beim antinozizeptiven Effekt von NSAID spielen: Zum einen eine direkte Ionenkanalblockierung, zum anderen eine Inhibierung der Entzündungs-induzierten Expression von pH-aktivierten Ionenkanälen (*acid-sensing ion channels*, ASICs) [16].

Diclofenac

Der Wirkstoff Diclofenac gehört zur Gruppe der nicht-opioiden Analgetika und wird bei leichten bis mittleren Schmerzen und Entzündungen angewendet. Diclofenac hat eine starke analgetische, antipyretische und anti-inflammatorische Aktivität [56, 87]. Der Name des Arzneistoffes leitet sich von seiner chemischen Struktur ab:

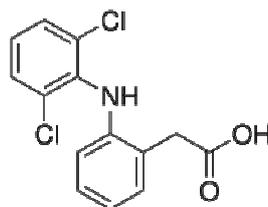


Abb. 1.2: Chemische Struktur von Diclofenac
2-[2-[(2,6-Dichlorphenyl)amino]phenyl]essigsäure (IUPAC).

Der erste Schritt in der Prostaglandinsynthese ist die Freisetzung von Arachidonsäure, ein Lipidbestandteil von Phospholipiden, aus der Zellmembran durch die Phospholipase A₂. Die entzündungshemmende Wirkung von Glucocorticoiden beruht auf der Hemmung dieses enzymatischen Schrittes. Der zweite Syntheseschritt ist die Oxygenierung von Arachidonsäure durch Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) zu Prostaglandin G₂/H₂. Verantwortlich für die Wirksamkeit von Diclofenac ist die reversible Inhibierung der COX-1 und COX-2, wodurch die Synthese entzündungsfördernder Prostaglandine gehemmt wird. Das Enzym COX-1 ist konstitutiv exprimiert, hingegen wird die COX-2 durch Gewebsschädigung und Entzündung induziert. Beide Isoformen der COX reagieren gleich stark auf Diclofenac [62].

Der analgetische Effekt von Diclofenac kann nicht nur durch die Hemmung der Cyclooxygenasen erklärt werden. Tonussi und Ferreira [88] diskutieren auch einen direkten Einfluss auf eine Lipoxygenase, die an der Synthese von Leukotrienen aus Arachidonsäure beteiligt ist. Leukotriene sind wiederum Botenstoffe, die an allergischen- und entzündlichen Reaktionen beteiligt sind.

Ergebnisse aus weiteren Studien lassen vermuten, dass der periphere nozizeptive Effekt von Diclofenac aus einer Aktivierung von verschiedenen K⁺-Kanälen resultiert [63]. Es sind bisher aber keine Daten über spannungsabhängige K⁺-Kanäle in diesem Zusammenhang bekannt.

1.6 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Kaliumkanäle spielen eine wichtige Rolle in der Steuerung der Zellfunktionen von elektrisch erregbaren und nicht-erregbaren Zellen. Hierzu zählen die Kontrolle des Membranruhepotentials, die Steuerung der Sekretion von Hormonen (z.B. Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas), die Regulation des Salz und Wasserhaltes in den Nieren, die Regulation elektrischer Erregbarkeit von Neuronen und deren synaptische Plastizität [72].

Es werden üblicherweise vier Familien von Kaliumkanälen anhand verschiedener Strukturen, funktioneller Charakteristika und pharmakologischer Empfindlichkeit in Neuronen unterschieden:

- spannungsabhängige (K_v) K_v1.x - K_v12.x
- calcium-aktivierte (K_{Ca}) K_{Ca}1.x - K_{Ca}5.x
- einwärtsgerichtete (K_{ir}) K_{ir}1.x - K_{ir}7.x
- Zweiporen-Kanäle (K_{2P}) K_{2P}1.x - K_{2P}17.x

Abgeleitet von Taufliegen- (*Drosophila melanogaster*) Mutanten erfolgte zunächst eine Einteilung der klonierten spannungsabhängigen Kaliumkanäle in sechs Unterfamilien: *Shaker* (K_v1.1 - 1.7), *Shab* (K_v2.1 - 2.2), *Shal* (K_v3.1 - 3.4), *Shaw* (K_v4.1 - 4.3), *ether à go go* und *slow poke* [71, 79]. Es wurden in den letzten Jahren weitere α -Untereinheiten für spannungsabhängige Kaliumkanäle kloniert und in die Nomenklatur eingearbeitet. Insgesamt sind bis jetzt mindestens 38 verschiedene α -Untereinheiten bekannt, die anhand von Sequenzhomologien in zwölf Gruppen (K_v1 - K_v12) unterteilt werden [37].

Der klassische *shaker*-Kanal [23] besteht aus vier α -Untereinheiten mit jeweils sechs α -helikalen Transmembransegmenten (S1 - S6) [40] und einem zytoplasmatischen C- und N-Terminus (**Abb. 1.3**). Zwischen S5 und S6 befindet sich der so genannte P-Loop, der auch als H5-Domäne bezeichnet wird [51]. Dieser ragt in die Membran hinein, durchspannt sie jedoch nicht. Das H5-Segment bildet mit dem Linker zwischen S4 und S5 und dem carboxyterminalen Bereich des S6-Segments die Kanalpore aus [52, 66]. Der Spannungssensor S4 weist eine regelmäßige Abfolge positiv geladener (hydrophober) Aminosäuren (4 - 7x R/KXX) auf [49, 65, 89]. Die positiven Ladungen von S4 werden bei Depolarisation neutralisiert, wodurch es zu einer Konformationsänderung und damit zur Kanalöffnung kommt [3, 94]. Als mögliche Aktivierungsmodelle werden zur Zeit das *original helical screw model* [24] und das *paddle model* [42] diskutiert.

Die α -Untereinheiten lagern sich zur Ausbildung aktiver Kanäle zu tetrameren Komplexen zusammen [50, 71]. Kanäle aus vier gleichen Untereinheiten werden als homotetramere Kanäle bezeichnet. Heterotetramere Kanäle lagern sich hingegen aus verschiedenen α -Untereinheiten zusammen [64], wobei nur α -Untereinheiten aus einer Subfamilie einen heterotetrameren Kanal bilden können. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, dass eine Vielzahl von K⁺-Kanälen mit neuen Eigenschaften entsteht. Die

α -Untereinheiten ordnen sich symmetrisch an und bilden so die zentrale Pore aus. Die Pore (P) weist bei Kaliumkanälen eine deutlich höhere Selektivität für Kaliumionen gegenüber den kleineren Natriumionen auf [20]. Die Selektivität wird durch eine in allen Kaliumkanälen konservierte so genannte Signatursequenz [67] vermittelt, die innerhalb der P-Region liegt. Die Kristallstrukturen in verschiedenen ionischen Lösungen zeigen, dass der Selektivitätsfilter zwei verschiedene Konformationen einnehmen kann, leitend und nicht-leitend.

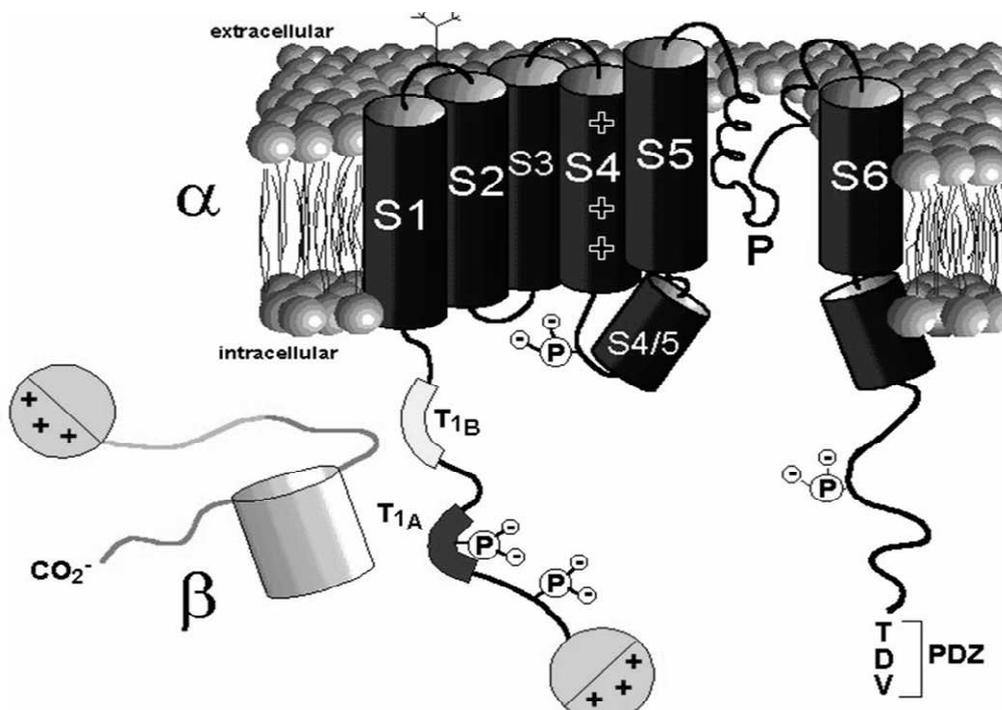


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Topologie einer *shaker*-Typ-Kaliumkanaluntereinheit [67]

Vier Untereinheiten bilden den funktionellen Kaliumkanal. Gezeigt wird eine α -Untereinheit mit ihren sechs Transmembransegmenten (S1-S6), dem Spannungssensor S4 mit seinen positiven Ladungen, der Porenregion (P), dem intrazellulären N-Terminus mit den Tetramerisierungsdomänen T1A und T1B und dem Ballmodell am Ende, bei dem man vermutet, dass er in die Pore hineinschwingt und diese dadurch verstopft. Des Weiteren sind der C-Terminus mit der PDZ-Domäne am Ende und eine assoziierende β -Untereinheit, die ebenfalls eine Art Ball bildet, der in die Pore hineinschwingen kann, dargestellt. Der innere Poreneingang wird wahrscheinlich von Aminosäuren des S4-S5-Loops unter Beteiligung von Aminosäuren am C-Terminus des S6-Segmentes gebildet.

Die Ionenbindungsstellen im leitenden Zustand sind nicht kompatibel mit dem kleineren Radius von Na^+ -Ionen ($0,95 \text{ \AA}$), nur K^+ ($1,33 \text{ \AA}$) passt [48, 51, 89]. Durch die zusätzliche Kombination mit akzessorischen β -Untereinheiten, wird die Komplexität der

K_v-Kanäle deutlich erhöht. Die α/β -Interaktion kann die kinetischen Eigenschaften der Kanäle dramatisch beeinflussen. So kann durch die Assoziation der β -Untereinheiten ein nicht inaktivierender Kanal zu einem sehr schnell inaktivierenden Kanal umgewandelt werden [71]. Die β -Untereinheiten sind zytoplasmatische, an die α -Untereinheit assoziierte Proteine [26]. Für die Sekundärstruktur lagern sich acht β -Faltblattstrukturen parallel an, denen je eine α -Helix folgt. Dadurch bildet sich eine Faserstruktur aus (sog. TIM, *triose phosphate isomerase barrel*). Die β -Untereinheiten interagieren über eine konservierte C-terminale Domäne mit einem Teilbereich des N-Terminus der α -Untereinheiten. Der Mechanismus der Interaktion ist bislang ungeklärt.

Bei den spannungsgesteuerten Ionenkanälen ist die Offenwahrscheinlichkeit (P_o) der Kanäle abhängig vom Potential und dem Inaktivierungsmechanismus. Es existieren zwei Mechanismen, die je nach der Beteiligung des N-Terminus oder eines mehr am C-Terminus gelegenen Bereichs des Kanalproteins, als N- oder C-Typ-Inaktivierung bezeichnet werden. Für die N-Typ-Inaktivierung wurde ein Ball-Kette-Mechanismus [4] beschrieben, bei dem eine Inaktivierungsdomäne in die Pore hineinschwingt und diese verschließt [33, 74]. Bei der C-Typ-Inaktivierung, die meist langsamer erfolgt als die N-Typ-Inaktivierung, führt eine Änderung der Porenkonformation an der extrazellulären Seite zu einem Schließen des Kanals.

1.7 Ziel der Arbeit

Neben der klassischen Wirkung von Diclofenac auf COX-1 und COX-2 bei Entzündung gibt es auch andere Mechanismen, die noch nicht vollständig geklärt sind. Berichtet wird unter anderem von einem Einfluss auf die Kaliumkanäle vom Typ K_{2p} (ASICS) und K_{ir}. Über einen möglichen Einfluss von Diclofenac auf spannungsgesteuerte Kaliumkanäle wurde bisher nicht berichtet.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind generell an der Entstehung und Modulation von neuronalen Aktionspotentialen beteiligt. Damit sind sie in den Schmerzfasern präsynaptisch an der Entstehung des „ersten“ noxen-bedingten Aktionspotentials beteiligt. Indirekt regulieren sie die Ausschüttung von Neurotransmittern in den Axonterminalen über die Beeinflussung der Aktionspotentialbreite und -frequenz.

Postsynaptisch nehmen sie ebenfalls an der neuronalen Weiterleitung und Verarbeitung des Schmerzsignals teil.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen möglichen direkten Einfluss von Diclofenac auf die Funktion von K_v -Kanälen herauszuarbeiten.

Wenn man diesen Einfluss im strukturellen Kontext der Nozizeption darstellen möchte, bieten sich z.B. pharmakologische Experimente an isolierten Ratten-Hinterhornneuronen an. Die experimentelle Isolierung eines direkten Effektes auf K_v -Kanäle ist jedoch in diesem System komplex, da spannungsabhängige Kaliumströme durch spezielle Pulsprotokolle und pharmakologisch von dem Gesamtstrom des Neurons isoliert werden müssen. Die längliche Form der Neuronen beeinträchtigt zusätzlich, aus elektrophysikalischen Gründen, Messungen in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Konfiguration. Des Weiteren ist die Präparation von Hinterhornneuronen sehr zeitaufwendig. Die experimentelle Stabilität der Neurone ist zeitlich begrenzt und erschwert damit die Durchführung der Experimente.

Zur Darstellung eines direkten, isolierten pharmakologischen Effektes eignet sich daher ein heterologes System. Das *Xenopus laevis* Oozyten Expressionssystem bietet sich aus folgenden Gründen an:

- 1) Expression einer einzelnen Kanalspezies über cRNA-Klone ist durchführbar, d.h. ein direkter Effekt auf den Kanal ist möglich.
- 2) Humane K_v -Kanalklone sind kommerziell erhältlich.
- 3) Der technische Aufwand ist weitaus geringer als mit einem vergleichbaren Säugerzellkultur-System.
- 4) Die Oozyten sind über ein Perfusionssystem leicht zugänglich für pharmakologische Substanzen.
- 5) Das System ist etabliert und robust.
- 6) Experimentelle Literatur über das Oozytensystem, sowie die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften von K_v -Kanälen sind umfangreich.

Diese Arbeit soll eine mögliche Veränderung des Kaliumamplitudenstromes durch Diclofenac bei den Kanälen $K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v2.1$, $K_v3.1$ und $K_v4.2$ zeigen. Die

Ergebnisse sollen diejenigen K_v -Kanäle identifizieren, welche sich für weiterfolgende Projekte bezüglich der elektrophysiologischen Charakterisierung von Kanalströmen, in Abhängigkeit von Diclofenac, anbieten. Die Experimente können dann die Grundlage für weitere Experimente an isolierten Hinterhornneuronen sein, um die pharmakologische Wirkung von Diclofenac *in-situ* darzustellen.

2 Material und Methoden

In dieser Arbeit soll dargestellt werden, ob es einen möglichen Einfluss von Diclofenac auf heterolog exprimierte Kaliumkanäle gibt. Dieses soll Aufschluss geben, ob Kaliumkanäle bei der Nozizeption eine mögliche dämpfende Rolle spielen (**siehe Kap. 1.5 – 1.7**). Um Kaliumkanäle eines Typus betrachten zu können, werden diese jeweils im heterologen Expressionssystem von *Xenopus laevis* exprimiert (**Abb. 2.1**). Dazu wurden cDNA-Klone der verschiedenen gängigen Kaliumkanäle bei der Firma Protinac erworben. Plasmid-DNA wurde linearisiert, extrahiert und daraus *in-vitro* cRNA synthetisiert (**siehe Kap. 2.1**). Die hergestellte cRNA wurde in die Oozyten injiziert. Nach einer Inkubationsphase der Oozyten wurden die exprimierten Kanäle elektrophysiologisch untersucht.

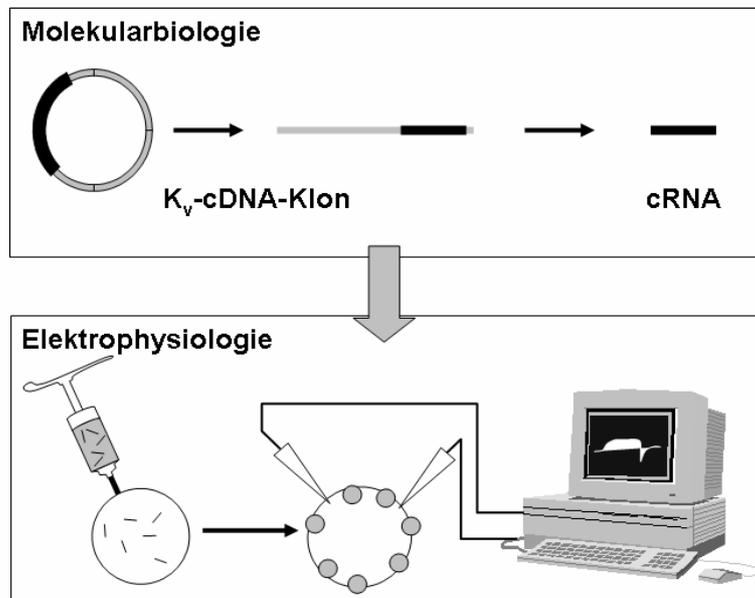


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes

2.1 Molekularbiologie

Zur Expression der Ionenkanäle wurde jeweils 50 nl (2,5 ng/ μ l) cRNA in eine Oozyte injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 3 – 4 Tagen konnten Ionenströme mittels Voltage-Clamp-Technik unter Applikation von Diclofenac gemessen und am Computer analysiert werden (**siehe Kap. 2.5**).

2.1.1 Verwendete K_v-cDNA Klone

Humane K_v1.1, K_v1.3, K_v2.1, K_v4.2 und Ratten K_v3.1 cDNA Klone wurde bei der Firma Protenac (Hamburg) erworben. Die cDNAs wurden in einen pGEM-Vektor mit T7- und Sp6-Promotor sowie einem Poly A-Schwanz kloniert. Die jeweiligen Plasmid-Karten befinden sich im **Anhang 7.1**.

2.1.2 Plasmid-Linearisierung

Für die spätere *in-vitro* Transkription wurde zunächst die Plasmid-DNA linearisiert (*SpeI*: hK_v1.1; *NotI*: hK_v1.3, hK_v2.1, hK_v4.2, rK_v3.1). Es wurden 2,5 µL (1 µg/µL) des Plasmids mit 10 -fach Enzympuffer und 1 µL Restriktionsenzym (10 u/µL) in 100 µL Reaktionsvolumen (H₂O) versetzt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Zur Überprüfung der Linearisierung wurde ein 5 µL Aliquot auf einem Agarosegel analysiert (**siehe 2.1.4**).

Restriktionsansatz			
2,5	µL	DNA	(1 µg/µL)
10,0	µL	Enzympuffer	(10x)
1,0	µL	Restriktionsenzym	(10 u/µl)
86,5	µL	H ₂ O	
100,0	µL	Ansatzvolumen	

2.1.3 DNA-Extraktion

Zur Proteinfällung im Linearisierungsansatz wurden die Proteine mit 100 µL Phenol gefällt. Der wässrige Überstand wurde nach rigorem Durchmischen und anschließender Phasentrennung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der DNA wurden 300 µL Ethanol und 30 µL Natriumacetat (3 M) zugegeben und für 30 min bei -70°C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (15.300 rpm, 4°C, 20 min) und Waschen mit 500 µL 70%igem Ethanol wurde das DNA-Pellet an Luft getrocknet und in 6,5 µL RNase-freiem H₂O aufgenommen. Nach fünf Minuten Lösungszeit wurde ein 0,5 µL Aliquot zur Überprüfung in einem Agarosegel analysiert (**siehe 2.1.4**).

2.1.4 DNA-Gel und Dokumentation

Die elektrophoretische Auftrennung der linearisierten und extrahierten DNA erfolgte jeweils in einem horizontalen 0,75%igen Agarosegel (35 mL) in TAE-Puffer mit 20 µL

Ethidiumbromid (10 mg/ μL) als Nachweisreagenz. Für die optimale Auftrennung der DNA, die je nach Klon ca. 4,5 - 6,5 kb lang war, wurde eine Agarose-Konzentration von 0,75% gewählt. Der Kalibrierstandard (λ -Phagen-DNA, geschnitten mit *BstEII*) war eine freundliche Spende von Dr. Boris Skryabin, UK Münster.

Ansätze	DNA aus 2.1.2	DNA aus 2.1.3	Standard
DNA	5,0 μL	0,5 μL	
6x Beladungspuffer	2,0 μL	2,0 μL	2,0 μL
H ₂ O		4,5 μL	
Standard			5,0 μL
Ansatzvolumen:	7,0 μL	7,0 μL	7,0 μL

Die Ansätze wurden gut durchmischt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgte über 90 min bei 50 mV. Die Dokumentation der Gele erfolgte auf einem UV-Tisch (Biometra TI 3) bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ mit dem dazugehörigen Video-Kamera-System und der Software BioDocAnalyze (Biometra).

2.1.5 Synthese von *in-vitro* cRNA

Es wurde das *mMessage mMachine in-vitro*-Transkriptionssystem (Ambion) verwendet. Für die Transkription wurde jeweils die T7-Promoterregion der Kv-pGEM-Plasmide genutzt. In einem Reaktionsvolumen von 20 μL wurde die aufgereinigte, linearisierte DNA (6 μL , 1-2 μg) mit 2 μL 10-fach Enzym Mix (T7-Polymerase), 2 μL 10-fach Transkriptionspuffer und 10 μL 2-fach Ribonucleotide-Mix für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Zum Abbau der Matrizen-DNA wurde 1 μL DNase hinzugegeben, 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend 80 μL DEPC-H₂O zugefügt. Für die Fällung der RNA wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden die Proteine mit 100 μl Phenol gefällt. Der wässrige Überstand wurde nach Durchmischen und Phasentrennung abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann erfolgte eine zweite Proteinfällung mittels 100 μl Chloroform. Wieder wurde der Überstand in ein neues Gefäß aufgenommen. Zur Präzipitation der RNA wurden 330 μl Ethanol und 10 μl Natriumacetat hinzugegeben und über eine Stunde bei -70°C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (15.300 rpm, 4°C, 20 min) wurde der Überstand abgenommen und mit 500 μl 70%igem Ethanol

gewaschen. Nach dem erneuten Zentrifugieren (15.300 rpm, 4°C, 5 min) wurde der Überstand abgenommen, das RNA-Pellet getrocknet und in 20 µl RNase-freies H₂O aufgenommen. Davon wurden je 1 µL für ein RNA-Agarosegel (**siehe 2.1.6**) und 1 µL für eine Ribo-Green-Bestimmung (**siehe 2.1.7**) abgenommen.

2.1.6 Denaturierendes RNA-Agarosegel

Zur Analyse der RNA wurde ein 1 µL Aliquot mit 19.4 µL Premixpuffer (s.u.) und 4 µL RNase-freiem H₂O versetzt und für 10 min bei 60°C denaturiert, dann auf Eis abgekühlt. Zur Probe wurden noch 5 µl Beladungspuffer (*mMessage mMachine-Kit*) hinzugegeben. Als Marker wurden 2 µl einer Mausleber-RNA-Präparation (~0,5 µg/µl) wie die Probe behandelt und auf das Gel aufgetragen. Der Marker war eine freundliche Spende von Dr. D. Isbrandt (ZMNH Hamburg, UKE).

Probe		Standard	
1,0 µL	RNA-Aliquot	2,0 µL	RNAMarker
19,4 µL	Premix	19,4 µL	Premix
4,0 µL	DEPC-H ₂ O	3,0 µL	DEPC-H ₂ O
5,0 µL	Beladungspuffer	5,0 µL	Beladungspuffer

Die Gelkammer wurde mit 0,3% Wasserstoffsuperoxid ausgewaschen. Die Auftrennung erfolgte in einem horizontalen 0,75%igen Formamid-Agarosegel mit MOPS als Laufpuffer und Ethidiumbromid (20 µl, 10 µg/mL) als Nachweisreagenz. Die Auftrennung erfolgte über 90 min bei einer angelegten Spannung von 50 V.

2.1.7 Fluorimetrische Quantifizierung von RNA

Die Konzentration der transkribierten RNA wurde mit dem RiboGreen RNA Quantification Kit (Molecular Probes) bestimmt. Die Detektion beruht auf der chemischen Umsetzung der RNA mit einem fluoreszierenden Farbstoff. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Probenvorbereitung

Zunächst wurde 1 µL RNA-Aliquot 1:1000 mit Tris-EDTA-Puffer (TE) verdünnt (Probenverdünnung, P1) und dann in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte auf ein Endvolumen von 100 µL weiter auf 1:50 und 1:20 mit TE-Puffer verdünnt (Probenverdünnung, P2). Für die Farbreaktion wurde das gleiche Volumen an verdünntem RiboGreen-Reagenz (1:2000 mit TE-Puffer) zugefügt.

Probenverdünnung, P2			
1:20		1:50	
10,0 µL	P1	4,0 µL	P1
90,0 µL	1x TE	96,0 µL	1x TE
100,0 µL	RiboGreen	100,0 µL	RiboGreen

Erstellung einer RNA-Eichgeraden

Unter Verwendung der mitgelieferten Standard-RNA (16 S und 23 S rRNA aus *E.coli*) und dem Lösungspuffer TE wurde eine Eichgerade erstellt (0-50 ng/mL RNA) und die Konzentrationen der Transkriptionsansätze anhand dieser ermittelt. Dazu wurde den hergestellten Eichverdünnungen (s.u.) das gleiche Volumen an verdünntem RiboGreen-Reagenz (s.o.) zugefügt.

RNA-Vorverdünnungen:			
V1		(1,0 ng/µL)	
1,0 µL	Stammlösung	(100 ng/µL)	
99,0 µL	TE	(1x)	
V2		(0,1 ng/µL)	
40,0 µL	V1	(1,0 ng/µL)	
360,0 µL	TE	(1x)	

RNA-Eichlösungen:			
Konz.	V2	1xTE	RiboGreen
0,0 ng/µL	0,0 µL	100,0 µL	100,0 µL
1,0 ng/µL	2,0 µL	98,0 µL	100,0 µL
5,0 ng/µL	10,0 µL	90,0 µL	100,0 µL
25,0 ng/µL	50,0 µL	50,0 µL	100,0 µL
50,0 ng/µL	100,0 µL	0,0 µL	100,0 µL

Probenmessung

Die Proben wurden mit RiboGreen-Reagenz versetzt und 5 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit einem automatischen 96 Well-Mikrotiterplatten- Lesegerät (Fluoroscan, Fa. Thermo Labsystems) bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ gemessen.

2.1.8 Verwendete Lösungen für die Molekularbiologie10x MOPS- Laufpuffer

Fertigkonzentrat entspricht:

10,00	mL	1,0 M	MOPS	pH 7,0
0,83	mL	3,0 M	NaAcetat	pH 4,8
1,00	mL	0,5 M	EDTA	pH 8,0
38,17	mL		DEPC-H ₂ O	

Premixpuffer

12,9	μL	10x MOPS-Laufpuffer
22,6	μL	37% Formaldehyd
64,5	μL	Formamid, deionisiert

in 1 L DEPC-H₂O (RNase freies Aqua bi-distillata: 100 μL DEPC auf 1 L H₂O, über Nacht rühren und anschließend autoklavieren)

DNA-Probenpuffer (5x)

20,0	%	Ficoll (w/v)
100,0	mM	EDTA
0,025	%	Bromphenolblau (w/v)
0,025	%	Xylenxyanol (w/v)

Tris-Acetat Laufpuffer (50x)

2,0	M	Tris-Acetat, pH 8
100,0	mM	EDTA

2.2 Kultivierung von *Xenopus laevis* Oozyten

Für die Experimente wurden weit entwickelte, aber noch unreife Eizellen (Stadium V und VI, siehe Abb. 2.1) des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) verwendet [21]. Die ausgewachsenen, nicht hormonbehandelten Tiere wurden im Tierkeller des Instituts für Physiologie in Münster in Tanks mit 2-3 l Wasser pro Frosch und einem zwölfstündigen alternierenden Wechsel zwischen Dunkelheit und Kunstlicht gehalten. Zweimal die Woche wurden die Frösche mit Fisch-Pellets und einmal monatlich mit Rinderherz gefüttert. Anschließend wurde das Wasser in den Tanks ausgetauscht. Montags und freitags wurde jeweils ein Frosch zur Entnahme eines Ovarlobulus herangezogen. Vor dem chirurgischen Eingriff wurde der Frosch in einem Tauchbad mit dem Lokalanästhetikum Tricain (MS 222, Sigma), 0,26%, anästhesiert (ca. 10 bis 20 min, je nach Größe des Frosches). Dann wurde eine ca. 1 cm lange Inzision diagonal durch das Abdomen von der Mitte ausgehend zur Flanke hin vorgenommen. Nach Durchtrennung der Fascia kamen die Ovarien zum Vorschein. Nach Entnahme eines Ovarlobulus mit Schere und Pinzette wurden die Wundränder schichtgerecht von innen nach außen adaptiert und mit einem 5,0-Faden vernäht. Der Frosch wurde in ein kleines Becken gesetzt, in dem er sich, solange die Anästhesie noch wirkte, von dem Eingriff erholen konnte. Erst dann wurde er wieder zurück in den Tank zu den anderen Fröschen gesetzt.

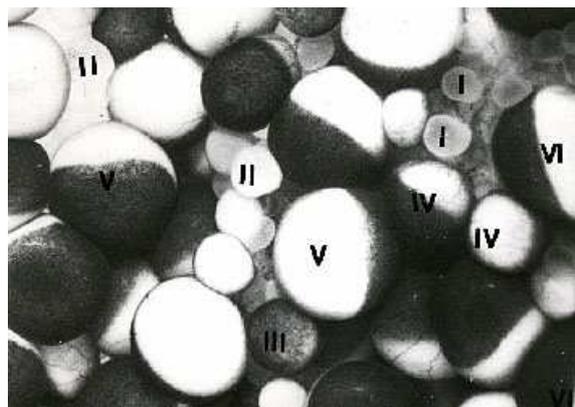


Abb. 2.2: Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* in den Reifestadien I bis VI
(nach Dumont, 1972 [21]; Foto aus dem Institut für Physiologie I in Münster, Prof. Madeja)

Von den so entnommenen Oozyten, die vergleichbar zu Weintrauben an einer Rebe aufgehängt und von zellulären und bindegewebigen Hüllen umgeben waren, wurden solche der Entwicklungsstadien V und VI ausgewählt. Diese waren aufgrund ihrer Größe (Durchmesser > 1mm) und der scharfen Trennung in eine dunkle animalische und eine helle vegetative Hälfte schon makroskopisch leicht zu identifizieren [30]. Sie wurden durch manuelle Präparation mit Hilfe zweier Uhrmacherpinzetten (Dumont #5) unter einem Binokular (40-fache Vergrößerung) vereinzelt. Die separierten Zellen wurden in eine Petrischale mit dem Kulturmedium gegeben und, unter Zugabe von Penicillin (10 mg/mL) und Streptomycin (100 mg/mL) zur Verhinderung einer bakteriellen oder mykotischen Infektion, bei einer Temperatur von 19°C kultiviert. Den operierten Fröschen konnte nach einer Erholungszeit von mindestens zwei Monaten erneut Oozyten entnommen werden, da diese sich regenerieren können [53].

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden im Rahmen des Versuchsvorhabens Experimentelle Epilepsieforschung vom Regierungspräsidenten Münster genehmigt (Az.:23.0835.1.0 (G 32/97) vom 23.10.1997).

2.3 Defollikulierung von Oozyten

Die Oozyten sind von mehreren Hüllschichten umgeben [22]. Die äusserste Schicht bildet das sogenannte innere Ovarieneithel, darunter liegen die Theka, eine Schicht aus Fibroblasten und Kollagenfasern, und nachfolgend eine Follikelzellschicht. Die Vitelinmembran liegt der eigentlichen Oozytenmembran auf. Die umhüllenden Zellschichten stellen eine Diffusionsbarriere für von aussen applizierte Agentien dar. Aus diesem Grund wurden nach der Methode von Choe und Sackin [11] die Zellschichten mit einer Kollagenase/Hyaluronidase-Lösung (1-4 mg/ml in OR2-Puffer ohne Ca^{2+} für 20 -60 min) angedaut und anschließend unter optischer Kontrolle mechanisch entfernt. Die Vitelinmembran wurde zur Erhaltung der Stabilität der Oozyten nicht entfernt.

2.4 RNA-Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten

2.4.1 Herstellen der Injektionskapillaren

Die Glaspipetten für die mRNA-Injektion wurden mit einem vollautomatischen programmierbaren Pipettenziehgerät (DMZ Universal Puller, Zeitz Instrumente GmbH) hergestellt. Hierzu wurden Kapillaren aus Borosilikatglas (Fa. Drummont, mit Filament) mit einer Länge von 150 mm in die Halter des Pullers gelegt. Nach Auswahl des entsprechenden Ziehprogramms wurde die Glaskapillare an beiden Enden fixiert. In ihrer Mitte wurde die Kapillare von einem glühenden Filament umschlossen und unter kontrollierter Hitzewirkung und Zug (Kraft-Weg) wurde sie in zwei Ziehschritten haarfein ausgezogen. Die Kapillaren wurden nun noch auf eine 12-16 µm große Öffnung unter einem Lichtmikroskop (Micro Zoom, Bausch und Lomb) mit Hilfe eines Manipulators zurückgebrochen und bis zu ihrer Verwendung staubgeschützt in einer Schale aufbewahrt.

2.4.2 RNA-Injektion in die Oozyte mit Drummont-Pipette

Zur Injektion von RNA wurde eine Drummont-Pipette mit RNA „beladen“. Hierzu wurden die ersten 1,5 cm der Pipettenkapillare (**siehe 2.4.1**) mit einer Spritze mit Öl befüllt („back-filling“). Das entstehende Luftpolster zwischen Ölschicht und Kapillarenspitze wurde durch „Vorschieben“ der Ölschicht aus der Kapillare verdrängt. Die so vorbereitete Pipette wurde auf einen Drei-Wegemanipulator befestigt, tiefgefrorene RNA wurde aufgetaut und ein Tropfen auf eine Plastikpetrischale platziert. Mit Hilfe des Manipulators und der Pipette wurde der RNA-Tropfen in die Kapillare eingesogen.

Die zu injizierenden Oozyten wurde in die Nute eines Plexiglasblockes gelegt. Die Kapillare wurde über die Manipulatorfunktion an die Oozyte angenähert und diese wurde unter mikroskopischer Kontrolle angestochen. Jeweils 50 nl (2,5 ng/µl) RNA-Lösung wurden in die Oozyten injiziert. Die injizierten Oozyten wurden in eine Glaspetrischale mit frischem Kulturmedium (OR2 mit Ca²⁺) und Gentamycin gegeben und bei 19°C inkubiert.

2.5 Elektrophysiologie

2.5.1 Messung der Ionenströme mit der Voltage-Clamp-Methode

Ströme über die Membran werden durch integrale Membranproteine (Ionenkanäle) vermittelt. Eine direkte Messung dieser Membranströme erlaubt die Spannungsklemme. Da der tatsächlich geflossene Membranstrom nicht direkt messbar ist, wurde die Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmenteknik (*two electrode voltage clamp* TEVC) entwickelt. Ziel der Voltage-Clamp-Messung ist es, ein der Zelle extern aufgezwungenes Klemmpotential aufrecht zu erhalten und dabei den dazu nötigen Kompensationsstrom zu messen, der ein Maß für den tatsächlich geflossenen Membranstrom ist. Hierdurch wird die wechselseitige Beeinflussung von Membranpotential und Strömen über die Oozytenmembran verhindert.

Bei der Messung von schnellen Membranpotentialveränderungen entstehen sowohl Ströme durch die Membrankapazität C_m , als auch durch Ladungsverschiebungen, vermittelt durch Ionenkanäle I_{ion} . Der Gesamtmembranstrom I_m ist die Summe aus diesen beiden Komponenten:

$$I_m = I_{ion} + C_m \delta V / \delta t \quad (1)$$

Bei den Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme hält man das Membranpotential auf einem bestimmten konstanten Wert, sodass die Änderung des Membranpotentials über die Zeit ($\delta V / \delta t$) gleich Null ist. Dadurch hat man keinen Kapazitätsstrom und der gemessene Strom ist rein ionisch [1].

Unter der Spannungsklemmenbedingung ($U = \text{konst.}$) bedeutet dieses für die Abhängigkeit des Stromes vom Widerstand ($1/\text{Leitwert}$), dass der Leitwert G proportional zum gemessenen Strom I ist. Das Ohm'sche Gesetz beschreibt diesen Zusammenhang. Eine biologische Membran kann als ein geregelter (veränderbarer) Widerstand angesehen werden:

$$\frac{I}{U} = \frac{1}{R} = G \quad (2)$$

$$\text{wenn } U = \text{konstant} \Rightarrow I \sim G$$

Eine biologische Zelle kann somit als ein einfacher Schaltkreis aus Stromquelle, Kondensator und Widerstand beschrieben werden.

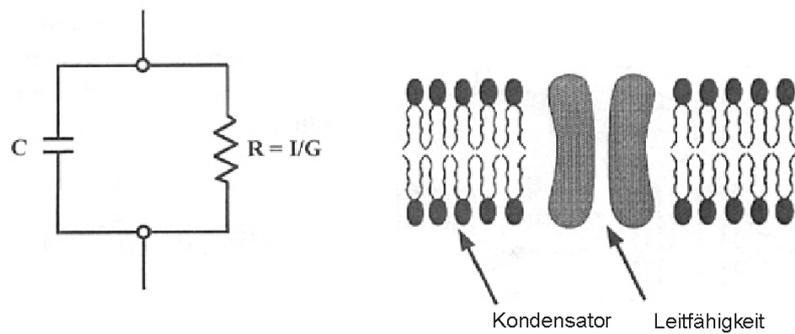


Abb. 2.3: Äquivalenter Schaltkreis für eine biologische Zelle ($C = R$)
(Molecules In Action; Aidley, DJ, Stanfield, PR 1996 [1])

Technisch wurde dieses Prinzip über einen doppelrückgekoppelten Operationsverstärker (**siehe Abbildung 2.4**) umgesetzt. Das Ruhemembranpotential wurde als Potentialdifferenz zwischen dem Intrazellulärraum und einer extrazellulären Referenzelektrode (Ref.) über die Spannungselektrode (U-EL) abgegriffen und mit Hilfe des ersten Operationsverstärkers (OP_1) verstärkt. Noch kam es dem Betrag nach nicht zu einem Ionenfluss über die Membran, d.h. der transmembrane Ionenstrom war konstant null. Dieser Modus wird auch als Stromklemmen-Modus (Current-Clamp-Modus) bezeichnet.

Beim Umschalten in den Voltage-Clamp-Modus wurde über die Stromelektrode so viel Strom in die Zelle injiziert, dass diese konstant auf einem Membranpotential von -80 mV (Haltepotential V_h) gehalten wurde. Dazu war eine Kopplung beider Elektroden nötig, die über die Verbindung des Verstärkers der Spannungselektrode (OP_1) und des Verstärkers der Stromelektrode (OP_2) erreicht wurde. Dadurch war es möglich, eventuell auftretende Abweichungen des Membranpotentials vom Haltepotential (-80 mV) durch eine entsprechende Injektion von Strom auszugleichen. Der Betrag an Strom, der zur Aufrechterhaltung des vorgegebenen Potentials in die Zelle injiziert werden muss, ist der aufgezeichnete Parameter, der dem transmembranen Ionenfluss entspricht.

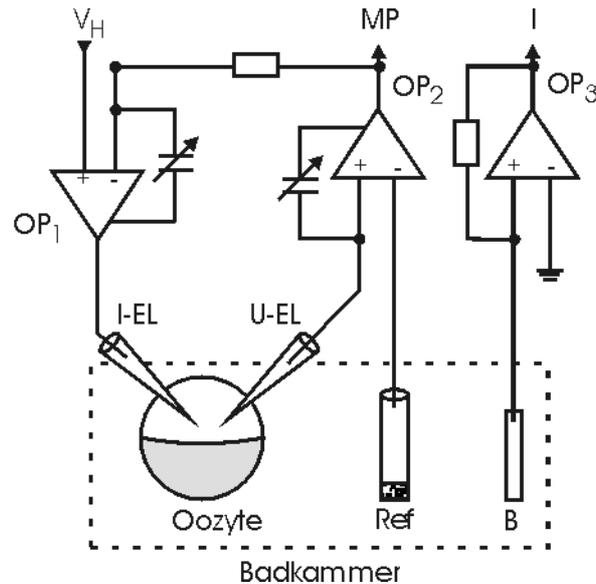


Abb. 2.4: Blockschaltbild zum elektrophysiologischen Versuchsaufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (OP₁, Operationsverstärker zur Messung des Membranpotentials; OP₂, Operationsverstärker zur Einstellung des Haltepotentials V_h ; OP₃, Operationsverstärker zur Messung des injizierten Stroms; Ref., Referenzelektrode; U - EL, Spannungselektrode; I - EL, Stromelektrode; B, Badelektrode. MP, abgegriffenes Membranpotential; I, abgelesener Strom).

2.5.2 Aufbau des Oozytenmessstandes

Der TEVC-Messplatz bestand aus mechanischen, optischen und elektronischen Komponenten:

Zu den mechanischen Komponenten zählten ein Faraday-Käfig (Eigenbau aus dem Institut für Physiologie), ein schwingungsgedämpfter Eisentisch (Eigenbau), eine Durchflussmesskammer, Magnetstative und Manipulatoren.

Die optischen Komponenten setzten sich aus einem Binokular (Carl Zeiss, Jena) und einer Kaltlichtquelle zusammen.

Die elektronischen Komponenten umfassten einen Verstärker für die elektrischen Signale, ein Oszilloskop, einen Analog-Digital-Wandler und einen Computer mit der dazugehörigen Software.

Der Faraday-Käfig schützt die gesamte Messeinrichtung vor externen Störsignalen, wie z.B. „Netzbrummen“. Die Messkammer selber stand auf einem schwingungsgedämpften Eisentisch.

Die Eizelle wurde in die Vertiefung der Messkammer (Eigenbau) platziert. Das Volumen der Kammer betrug ~1,5 mL. Sie war über einen Perfusionsschlauch an ein

Reservoir, gefüllt mit ND96-Elektrolyt, angeschlossen. Auf der gegenüberliegenden Seite wurde die Lösung über eine Glaskapillare kontinuierlich wieder abgesaugt. Die Superfusionsrate war auf 1 mL/min eingestellt.

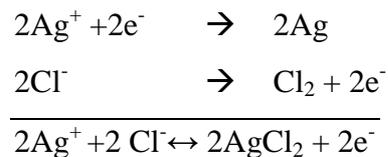
Um das Einstechen der Elektroden in die Oozyten zu erleichtern, war eine Halogen-Kaltlichtquelle (Fa. Schott, Mainz, KL150B) auf die Zelle ausgerichtet. Der schrittweisen Translation der Elektroden dienten mechanische 3-Wege-Manipulatoren (M-33, Fa. Märzhäuser), die über magnetische Standfüße am Tisch fixiert waren.

Zur Registrierung des Membranstroms und der tatsächlichen Membranspannung diente ein Verstärker für elektrische Signale (TURBO TEC-05, NPI-Electronics). Über einen Analog-Digital-Wandler (DigiData 1200, Axon Instruments) wurde das Signal zum Computer (IBM-Typ Computer) geleitet. Umgekehrt konnte man über den PC der Zelle ein Kommandopotential software-gesteuert (Clampex 8.2, Axon Instruments) auferlegen. Für die visuelle Kontrolle wurde ein digitales Speicheroszilloskop (Hameg HM 205-3) verwendet.

2.5.3 Herstellung von Ableitelektroden

Die Mikroelektroden für die Experimente mit der Voltage-Clamp-Technik wurden mit einem vollautomatischen programmierbaren Pipettenziehgerät hergestellt. Dazu wurden Glaskapillaren aus Borosilikatglas (Fa. Hilgenberg) mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm, einer Wandstärke von 0,315 mm und einer Länge von 100 mm in die Glashalter des Pullers gelegt. Nachdem ein passendes Ziehprogramm ausgewählt worden war, wurden die Borosilikatkapillaren in drei Ziehschritten zu Pipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 1 μm ausgezogen. Für die Spannungselektrode wurde ein elektrischer Widerstand von 1-2 $\text{M}\Omega$ und für die Stromelektrode ein Widerstand von 0,5-1,5 $\text{M}\Omega$ benötigt [78]. Um diese Werte zu erreichen, mussten die Spitzen der Pipetten unter einem Mikroskop noch manuell mit einem Manipulator (Ernst Lutz, Wetzlar) auf einen Außendurchmesser von 3-4 μm (Spannungselektrode) bzw. 4-6 μm (Stromelektrode) abgebrochen werden. Bis zu ihrem Gebrauch wurden sie staubgeschützt in einer Schale aufbewahrt. Für die Experimente wurden sie dann luftblasenfrei mit 2 M KCl als Elektrolyt gefüllt.

Um das Herauslecken der hochkonzentrierten KCl-Lösung in die Oozyte zu vermeiden, wurden die gezogenen Pipetten zu so genannten „cushion“-Messelektroden weiterentwickelt. Dazu wurde 1%ig niedragschmelzende Agarose (Fluka) in 2 M KCl gelöst und in die Elektroden mit Unterdruck aufgenommen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode war, dass die Elektroden den ganzen Tag über einen stabilen Widerstand hatten und so ein „driften“ der Elektrodenpotentiale vermieden werden konnte. Die Glaselektroden wurden in Elektrodenhaltern (Warner Instruments) mittels Quetschdichtung fixiert. Als eigentliche Elektroden fungierten Silberdrähte, die in 1 M HCl-Lösung mit einem kontrollierten Spannungsgerät (Eigenbau, Institut für Physiologie I, Münster) chloriert wurden. Hierbei lagerte sich bei 1,6 V in einem zeitbegrenzten Rahmen Silberchlorid auf der Oberfläche des Silberdrahtes an. Bei 6 V und umgekehrter Polung erfolgte eine Reinigung der Elektroden. Die nachfolgende Redox-Reaktionsgleichung zeigt die Elektrochemie einer Silber-Silber/Chlorid-Elektrode.



Hierbei handelte es sich um ein Daniell-Element, einem Beispiel einer elektrochemischen Zelle, in dem es zu einer Redox-Reaktion kommt. Bringt man einen Silberdraht in eine wässrige Lösung mit HCL, so gehen Chloridionen in Lösung und elementares Silber geht eine Verbindung mit dem Chlorid aus der Salzsäure ein, womit sich Silberchlorid am Silberdraht anlagert.

2.5.4 Experimentelle Durchführung der Versuche

Nach der Positionierung der Oozyte in der Durchflusskammer wurden die Messelektroden unter optischer Kontrolle mittels der Mikromanipulatoren in einem Winkel von 45° an die Oozyte herangeführt. Dann wurde die Superfusion mit ND96 mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min eingestellt. Eventuell auftretende „offset“-Elektrodenpotentiale wurden durch Anlegen einer Korrekturspannung abgeglichen, so dass bei einem nicht angelegten Kommandopotential die Elektrodenpotentiale, ebenso wie der gemessene Strom, Null waren.

Unter optischer Kontrolle wurde nun die Oozyte von den beiden Messelektroden angestochen und das Ruhemembranpotential (RMP) beobachtet. Es erfolgte das stufenweise Klemmen des Membranpotentials auf das Haltepotential von -80 mV. Dieser Wert entspricht in etwa dem Ruhemembranpotential einer Nervenzelle.

Traten zu große Leckströme auf ($>0,3 \mu\text{A}$), ein Hinweis auf eine gestörte Membranintegrität, wurde die Zelle verworfen. Bei einem stabilen Ruhemembranpotential wurde das jeweils ausgewählte Pulsprotokoll über die pClamp-Software gestartet. Die registrierten Ionenströme wurden mit einer oberen Grenzfrequenz von 1 kHz gefiltert.

2.5.5 Messprotokolle

Am dritten und vierten Tag nach Injektion der RNA in die Oozyten wurde ein repetitives Aktivierungsprotokoll aufgenommen. Die nachfolgende Tabelle und der Graph zeigen die verwendeten Pulsparameter der Aktivierungsprotokolle für die jeweils untersuchten K_v -Kanäle:

Tab. 1: Parameter der verwendeten Aktivierungsprotokolle

V_h = Haltepotential V_{pp} = Präpuls, V_p = Testpotential, V_{tail} = Tailpotential, MP = Membranpotential.

Kanal	V_h		V_{pp}		V_p		V_{tail}	
	time [ms]	MP [mV]	time [ms]	MP [mV]	time [ms]	MP [mV]	time [ms]	MP [mV]
$K_v1.1$	50	-80	500	-100	250	+10	125	-80
$K_v1.3$	50	-80	500	-100	250	+0	125	-80
$K_v3.1$	50	-80	500	-100	250	+10	125	-80
$K_v2.1$	50	-80	500	-100	250	+10	125	-80
$K_v4.2$	50	-80	500	-100	250	+10	125	-80

Ausgehend von einem Haltepotential ($V_h = -80 \text{ mV}$) für 50 ms folgte ein Potentialsprung auf -100 mV für 500 ms. Dieser Präpuls (V_{pp}) diente zur vollständigen Deaktivierung der jeweils exprimierten K_v -Kanäle. Daraufhin folgte ein Aktivierungspotential (V_p) für 250 ms. Das Aktivierungspotential wurde so gewählt, dass sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibierung des Stromes durch das Pharmakon dargestellt werden kann. Abschließend wurde zur Deaktivierung der K_v -Kanäle ein Rücksprung (V_t) auf -80 V durchgeführt.

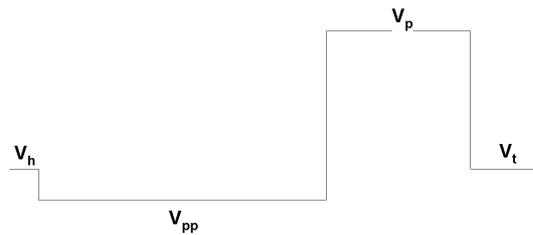


Abb. 2.5: Graphische Darstellung der verwendeten Aktivierungsprotokolle

Zur Darstellung der Wirkung von Diclofenac wurde folgendes Applikationsprotokoll verwendet:

- 1) Pulse 1 -9 dienen zur Findung eines Gleichgewichtes unter Kontrollbedingung.
- 2) Während der Pulse 10 -28 wurde die Messkammer mit Diclofenac-Lösung durchgespült. Das Ziel ist die Feststellung der pharmakologischen Wirkung.
- 3) Während der Pulse 29 -47 wird die Kammer mit Kontrolllösung durchgespült, diese dient der Darstellung einer möglichen Reversibilität.
- 4) Während der Pulse 48 -58 wurde 4-AP-Lösung (5 mM) in die Messkammer appliziert. Das Zellgift 4-AP dient der Positivkontrolle. Es wird die Ansprechbarkeit der Ionenkanäle überprüft.
- 5) Während der Pulse 59 -70 wurde die Kammer wiederum mit Kontrolllösung gespült.

Der Messpuls wurde alle 30 s gestartet, was eine vollständige Erholung aus einer potentiell auftretenden Inaktivierung ermöglicht.

2.5.6 Auswertung der Stromregistrierung

- 1) Aus den Einzelmessungen (einzelner Puls) wurde bei nicht und bei wenig inaktivierenden Kanälen ($K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v2.1$, $K_v3.1$) die Amplitude in der Gleichgewichtsphase bestimmt (**Abb. 3.1 A**), bei dem inaktivierenden $K_v4.2$ wurde die Spitzenamplitude gemessen (**Abb. 3.5 A**). Über das gesamte Applikationsprotokoll konnte so für jeden einzelnen Messpuls die Amplitude gemessen werden.
- 2) Die Amplitudenwerte eines Applikationsprotokolls wurden auf den Wert des neunten Pulses normiert. Dieses dient dem Zusammenführen der Daten von mehreren Oozyten.

- 3) Aus den jetzt normierten Amplitudenwerten der verschiedenen Oozyten wurden die Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM = standard error of the mean) berechnet und gegen die Zeit aufgetragen (**Abb. 3.1 B**).
- 4) Da in dem Normierungspunkt (Puls Nr. 9, erstes ▲-Symbol) kein statistischer Fehler berechnet werden kann, wurde der Fehler aus dem Vorlauf (Pulse Nr.1 - Nr. 9) berechnet.
- 5) Zum statistischen Vergleich der Wirkung von Diclofenac und 4-AP mit dem Kontrollwert wurden die Mittelwerte des Pulses Nr. 9 (Kontrolle, erstes ▲-Symbol) mit dem Puls Nr. 28 (Diclofenac, zweites ▲-Symbol) und dem Puls Nr.58 (4-AP, drittes ▲-Symbol) verglichen (**Abb. 3.1 C**).
- 6) Um die Signifikanz der Wirkung von Diclofenac im Vergleich zum Kontrollwert zu bestimmen, wurde ein ungepaarter ANOVA- (*analysis of variances*) Test mit anschließendem *Holm-Sidak*- Nachtest angewendet (SigmaStat 3.0, SPSS Inc.). In den Abbildungen ist der „p“-Wert gegeben (**Abb. 3.1 C**).

2.5.7 Verwendete Lösungen für Elektrophysiologie

Anästhetikum für die Frösche

3-Aminobenzoic Acid Ethyl Ester Methanesulfonate Salt (MS 222)

0,26% in Leitungswasser gelöst (5 mM)

Kulturmedium

88,0	mM	NaCl
1,0	mM	KCl
0,8	mM	MgSO ₄
1,4	mM	CaCl ₂
5,0	mM	HEPES

plus Penicillin (10 mg/mL) und Streptomycin (100 mg/mL)

Messlösung (ND96)

96,0	mM	NaCl
2,0	mM	KCl

1,0	mM	MgCl ₂
1,8	mM	CaCl ₂
5,0	mM	HEPES

Durch Zugabe von 1M NaOH wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7,3 titriert.

Intrazelluläre Pipettenlösung

2,0	M	KCl
-----	---	-----

Hersteller- und Bezugsquellenverzeichnis

Ambion	Warner Instruments
Biometra	Fa. Schott, Mainz
Molecular Probes	Carl Zeiss
ThermoLabsystems	Fa. Märzhäuser
Dumont	Hameg
Zeitz Instrumente GmbH	Fa. IKA Labortechnik
Fa. Hilgenberg	Electronics, TAMM, Thüringen
Bausch und Lomb	Axon Instruments
Eppendorf	Microsoft
Ernst Lutz, Wetzlar	Wave Metrics

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit soll die Wirkung von Diclofenac auf verschiedene heterolog exprimierte Kaliumkanäle getestet werden. Eine mögliche Rolle der Kaliumkanäle auf die Nozizeption soll so verdeutlicht werden. Hierzu wurden fünf K_v -Kanäle ($K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v2.1$, $K_v3.1$, $K_v4.2$) untersucht, deren Ergebnisse in den Abschnitten **3.1 - 3.5** aufgezeigt werden:

Der **Abbildungsteil 3.X A** zeigt jeweils den Vergleich der Stromantworten einer exprimierenden Oozyte auf den Messpuls unter Kontrollbedingung (ND96), Diclofenac- und Inhibitor-Gabe (4-AP). Dieses entspricht den Messpulsen Nummer 9, 28, 58 (\blacktriangle , Dreiecke in Abbildungsteil B).

Im **Abbildungsteil 3.X B** sind die normierten und gemittelten Amplitudenwerte verschiedener Oozyten einer Messreihe über das gesamte Applikationsprotokoll dargestellt, wobei ein durchgeführtes Pulsprotokoll 30 Sekunden entspricht. Der einzelne Messwert wurde am Ende des jeweiligen Testpotentials bestimmt.

Abbildungsteil 3.X C stellt den statistischen Vergleich (ANOVA-Test) der in **B** dargestellten Mittelwerte unter den drei Versuchsbedingungen Kontrolle, Diclofenac und Inhibitor (4-AP) dar.

3.1 Darstellung der Wirkung von Diclofenac auf den $K_v1.1$ Kanal

Der $K_v1.1$ Kanal gehört zur Familie der „spannungsabhängigen verzögerten Gleichrichter“ (voltage-dependend/gated delayed rectifier) mit einer langsamen C-Typ Inaktivierung [33]. Die **Abb. 3.1 A** zeigt einen für diesen Kanal typischen Verlauf, mit einem schnellen Anstieg des Stromflusses unter Spannungsaktivierung und einem sehr langsamen Abfall des Stromflusses, der als Inaktivierung bezeichnet wird. Dargestellt ist ebenso die Stromantwort unter Diclofenac- und 4-AP-Gabe. Unter Diclofenac nimmt die Höhe der Spitzenamplitude nur gering ab. Es zeigt sich eine Veränderung des Inaktivierungsverhaltens: Einerseits im Ausmaß, das Verhältnis Spitzenstrom zu Gleichgewichtsstrom ist größer als unter Kontrollbedingung, und andererseits ist die initiale Inaktivierung stark beschleunigt. Dieses geschieht vermutlich durch die Verstärkung, bzw. Induzierung einer schnellen Komponente durch Diclofenac. Unter 4-AP-Gabe findet eine deutliche Hemmung sowohl der Spitzenamplitude, als auch des

Gleichgewichtsstromes statt. Der Grad der Hemmung durch Diclofenac und 4-AP ist in **Abb. 3.1 B** dargestellt und der statistische Vergleich erfolgt in **Abb. 3.1 C**.

In **Abb. 3.1 B** sind die normierten und gemittelten Amplituden von fünf Oozyten über den gesamten Zeitraum des Experiments dargestellt. Die ersten neun Pulse unter ND96 zeigen eine geringe Variabilität ($100 \pm 1,4\%$), während der Gabe von Diclofenac nehmen die Amplituden stetig ab und erreichen bei Puls 28 nahezu ein Gleichgewicht ($74,4 \pm 3,6\%$). Die aufgetretene „Kinetik“ der Wirkung von Diclofenac ist einerseits von dem Austausch der Lösungen im Schlauchsystem und der Messkammer abhängig, und andererseits von Diffusionswiderständen an der Oozyte sowie der eigentlichen pharmakologischen Wirkung am Kanalprotein selber. Die nahezu vollständige Reversibilität der Wirkung von Diclofenac wurde durch Waschen mit ND96 gezeigt. Die nachfolgende Gabe von 4-AP dient als Positiv-Kontrolle, d.h. es wird die Ansprechbarkeit der Ionenkanäle überprüft. Es zeigt sich wiederum ein „Anfluten“ des Effekts und eine fast vollständige Hemmung ($11,4 \pm 4,0\%$) der spannungsabhängigen Ströme.

Der statistische Vergleich in **Abb. 3.1 C** zeigt eine hohe Signifikanz (p -Wert $< 0,001$) für die inhibierende Wirkung von Diclofenac auf den $K_v1.1$ Kanal.

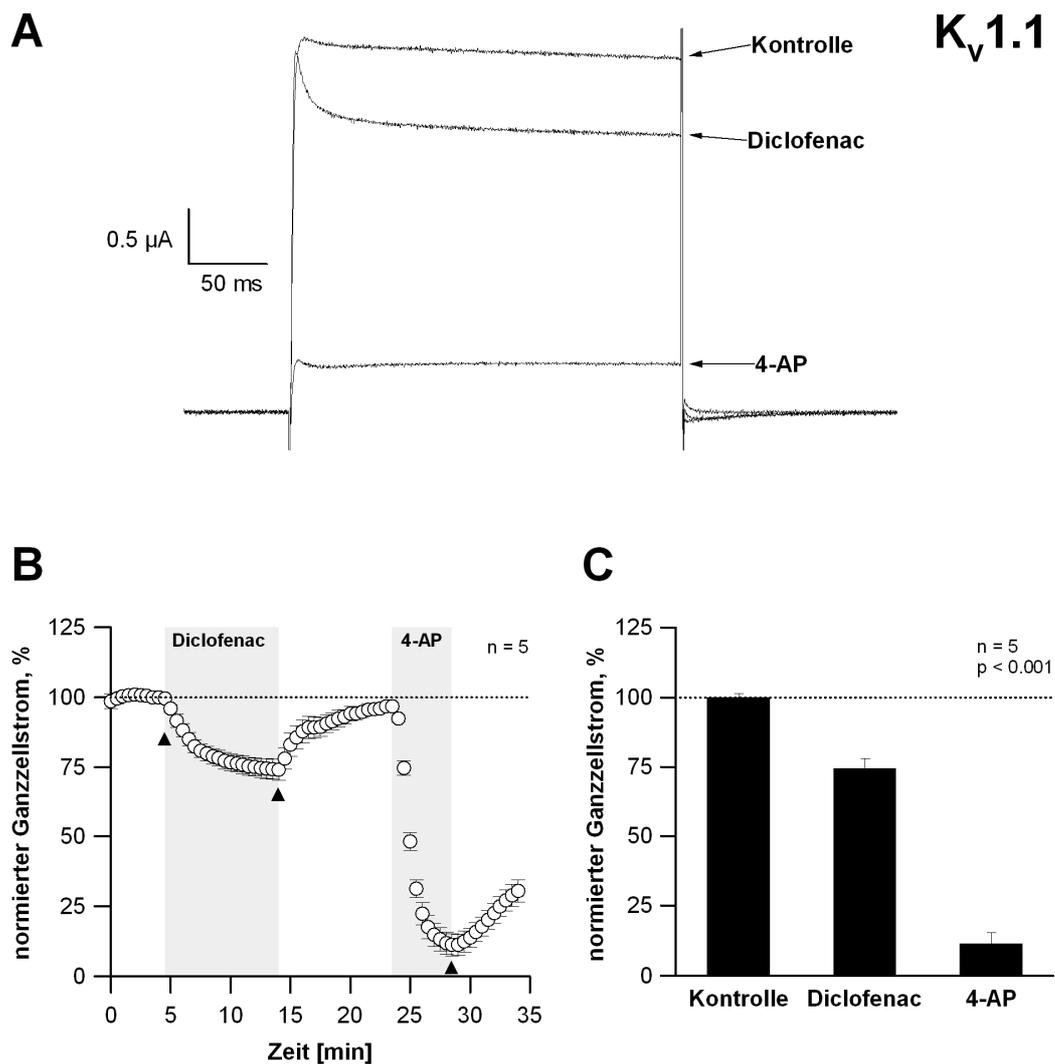


Abb. 3.1: Darstellung und Quantifizierung der Wirkung von Diclofenac auf den spannungsabhängigen K_v1.1 Kanal

A Vergleich der Ganzzellströme einer K_v1.1-exprimierenden Oozyte unter Kontrollbedingung (ND96), Diclofenac und Inhibitor-Gabe (4-AP). Hierzu wurden die gemessenen Ströme aus den Pulsen 9, 28, 58 (siehe „▲“ in Abb. B) übereinandergelegt. Ausgehend von einem Haltepotential ($V_h = -80$ mV) für 50 ms folgte ein Potentialsprung auf -100 mV für 500 ms. Dieser Präpuls (V_{pp}) dient der vollständigen Deaktivierung von K_v1.1. Daraufhin folgte ein Aktivierungspuls ($V_p = +10$ mV) für 250 ms. Dieses Potential wurde so gewählt, dass sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibierung des Stromes durch das Pharmakon festgestellt werden konnte und entspricht ungefähr dem halbmaximalen Aktivierungspotential. Abschließend wurde auf das Haltepotential zurückgesprungen. Gezeigt ist die Stromantwort ab dem Präpuls (V_{pp}). B Stromamplitudenwerte von fünf Oozyten, gemessen am Ende der Testpulse, wurden auf den Amplitudenwert des 9. Pulses normiert und gegen die Zeit (30 s = 1x Pulsprotokoll) aufgetragen. Diclofenac wurde vom 10. – 28. Pulsprotokoll und 4-AP vom 48. – 58. appliziert. C Statistischer Vergleich (ANOVA-Test) der gemittelten Stromamplituden von n = 5 Oozyten unter Kontrollbedingung (Mittelwert beim Testpuls 9), Diclofenac (28) und 4-AP (58).

3.2 Darstellung der Wirkung von Diclofenac auf den $K_v1.3$ Kanal

Der $K_v1.3$ Kanal gehört ebenfalls zur Familie der spannungsabhängigen verzögerten Gleichrichter mit einer langsamen C-Typ Inaktivierung [33]. Die **Abb. 3.2 A** zeigt unter Kontrollbedingung eine Stromantwort mit einem schnellen Anstieg des Stromflusses bis zur Spitzenamplitude bei einer überschwelligen Aktivierung. Der Anstieg ist jedoch im Vergleich zu $K_v1.1$ nicht so steil, somit aktiviert der Kanal etwas „langsamer“. Es folgt eine langsame Inaktivierung, die etwas ausgeprägter ist als beim $K_v1.1$. Bei Gabe von Diclofenac ist eine deutliche Reduktion der Spitzenamplitude um ca.1/3 gegenüber der ND96 Kontrolllösung zu erkennen. Die späte Aktivierungsphase verlangsamt sich geringfügig. Es zeigt sich eine deutliche Vergrößerung des Spitzen-Gleichgewichtsstrom-Verhältnisses, ähnlich wie schon beim $K_v1.1$ beobachtet. Dieses geschieht vermutlich durch die Verstärkung, bzw. Induzierung einer schnellen Inhibierungskomponente. 4-AP hemmt den Kanal fast vollständig.

In **Abb. 3.2 B** sind die normierten und gemittelten Amplituden von 7 Oozyten über den gesamten Zeitraum dargestellt. Der Vorlauf der ersten neun Pulse unter ND96 zeigt eine Stabilisierung mit einer geringen Variabilität ($100 \pm 1,6\%$), während der Gabe von Diclofenac nehmen die Amplituden stetig ab und erreichen beim Puls 28 einen Tiefpunkt ($53,3 \pm 9,2\%$), wobei während dieser Pulse eine höhere Variabilität zu erkennen ist. Die vollständige Reversibilität der Wirkung von Diclofenac wurde durch Waschen mit ND96 gezeigt, die nachfolgende Gabe von 4-AP bewirkt eine fast vollständige Hemmung der Stromantwort ($8,1 \pm 3,2\%$).

Der statistische Vergleich in **Abb. 3.2 C** zeigt eine hohe Signifikanz (p -Wert $< 0,001$) für die inhibierende Wirkung von Diclofenac auf den $K_v1.3$ Kanal.

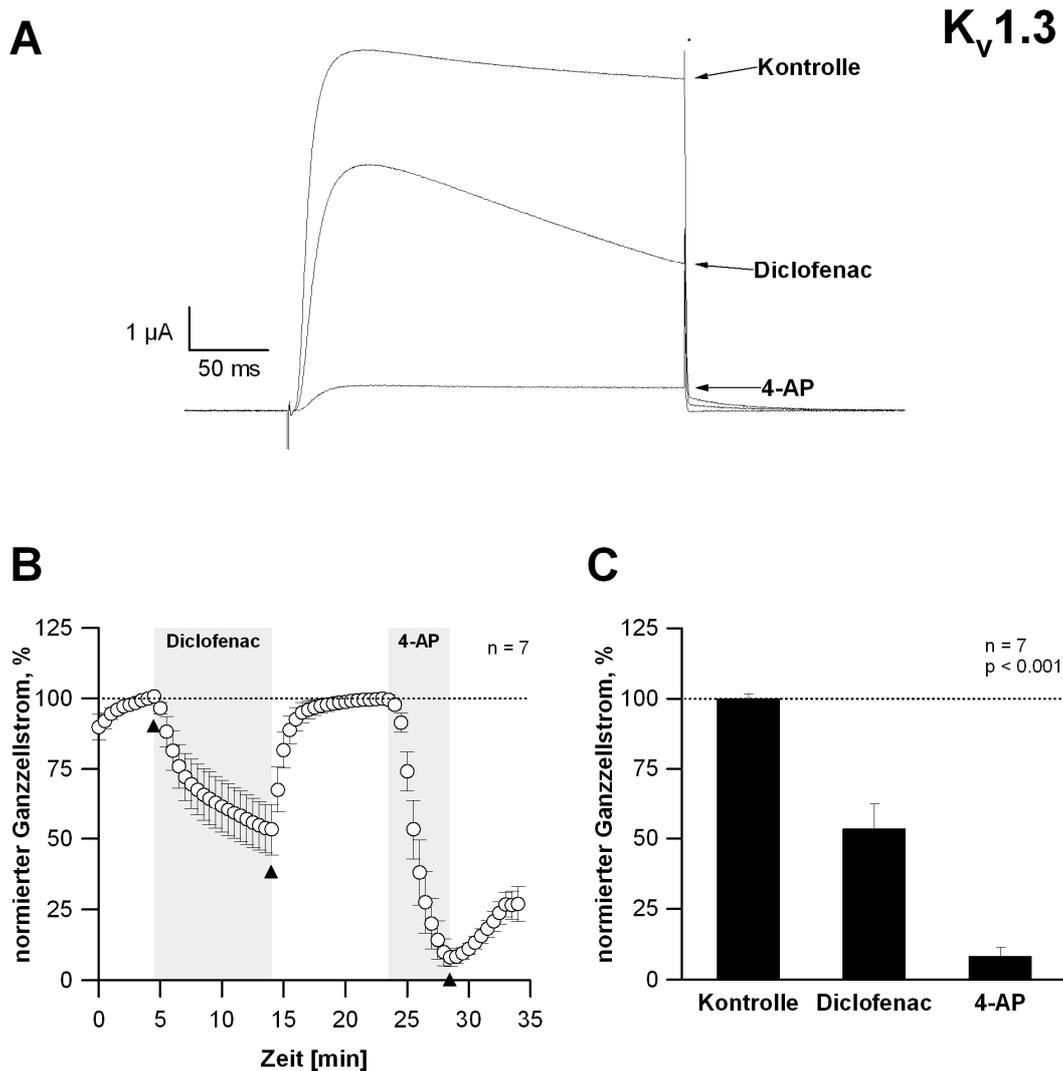


Abb. 3.2: Darstellung und Quantifizierung der Wirkung von Diclofenac auf den spannungsabhängigen $K_v1.3$ Kanal

A Vergleich der Ganzzellströme einer $K_v1.3$ -exprimierenden Oozyte unter Kontrollbedingung (ND96), Diclofenac und Inhibitor-Gabe (4-AP). Hierzu wurden die gemessenen Ströme aus den Pulsen 9, 28, 58 (siehe „▲“ in **Abb. B**) übereinandergelegt. Ausgehend von einem Haltepotential ($V_h = -80$ mV) für 50 ms folgte ein Potentialsprung auf -100 mV für 500 ms. Dieser Präpuls (V_{pp}) dient der vollständigen Deaktivierung von $K_v1.1$. Daraufhin folgte ein Aktivierungspuls ($V_p = 0$ mV) für 250 ms. Dieses Potential wurde so gewählt, dass sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibierung des Stromes durch das Pharmakon festgestellt werden konnte und entspricht ungefähr dem halbmaximalen Aktivierungspotential. Abschließend wurde auf das Haltepotential zurückgesprungen. Gezeigt ist die Stromantwort ab dem Präpuls (V_{pp}). **B** Stromamplitudenwerte von sieben Oozyten, gemessen am Ende der Testpulse, wurden auf den Amplitudenwert des 9. Pulses normiert und gegen die Zeit (30 s = 1x Pulsprotokoll) aufgetragen. Diclofenac wurde vom 10.–28. Pulsprotokoll und 4-AP vom 48.–58. appliziert. **C** Statistischer Vergleich (ANOVA-Test) der gemittelten Stromamplituden von $n = 7$ Oozyten unter Kontrollbedingung (Mittelwert beim Testpuls 9), Diclofenac (28) und 4-AP (58).

3.3 Darstellung der Wirkung von Diclofenac auf den $K_v2.1$ Kanal

Der $K_v2.1$ ist ebenfalls ein spannungsabhängiger verzögerter Gleichrichter. Die **Abb. 3.3 A** zeigt unter Kontrolllösung eine Stromantwort mit einem schnellen Anstieg und einem fließenden Übergang in ein Gleichgewicht des Stromflusses. Eine C-Typ Inaktivierung wie bei den vorher beschriebenen $K_v1.1$ und $K_v1.3$ trat nicht auf [33], unter allen Bedingungen wird ein Gleichgewichtszustand bei der Aktivierung erreicht. Unter Diclofenac nimmt die Höhe der Spitzenamplitude um ca. 30% zu, jedoch verlangsamt sich die zu Beginn schnellere Aktivierungskinetik im Vergleich zur ND96 Gabe in der späteren Phase. Wie beim $K_v1.1$ und $K_v1.3$ beschrieben, bewirkte Diclofenac eine Zunahme der Inaktivierung. Dieser Effekt war hier nicht zu beobachten. Der generell aktivierende Einfluss von Diclofenac war vollständig reversibel. 4-AP hemmt den Kanal fast vollständig.

In **Abb. 3.3 B** sind die normierten und gemittelten Amplituden von 10 Oozyten über den gesamten Zeitraum dargestellt. Die Vorlaufphase unter ND96 zeigt eine geringe Variabilität ($100 \pm 0,8\%$), während der Gabe von Diclofenac nehmen die Amplituden stetig zu und erreichen bei Puls 28 nahezu ein Gleichgewicht ($130,7 \pm 1,8\%$). Die Gabe von 4-AP bewirkte wie auch bei $K_v1.1$ und $K_v1.3$ beschrieben eine fast vollständige Hemmung ($9,9 \pm 2,2\%$) der spannungsabhängigen Ströme.

Der statistische Vergleich in **Abb. 3.3 C** zeigt eine hohe Signifikanz (p -Wert $< 0,001$) für die aktivierende Wirkung von Diclofenac auf den $K_v2.1$ Kanal.

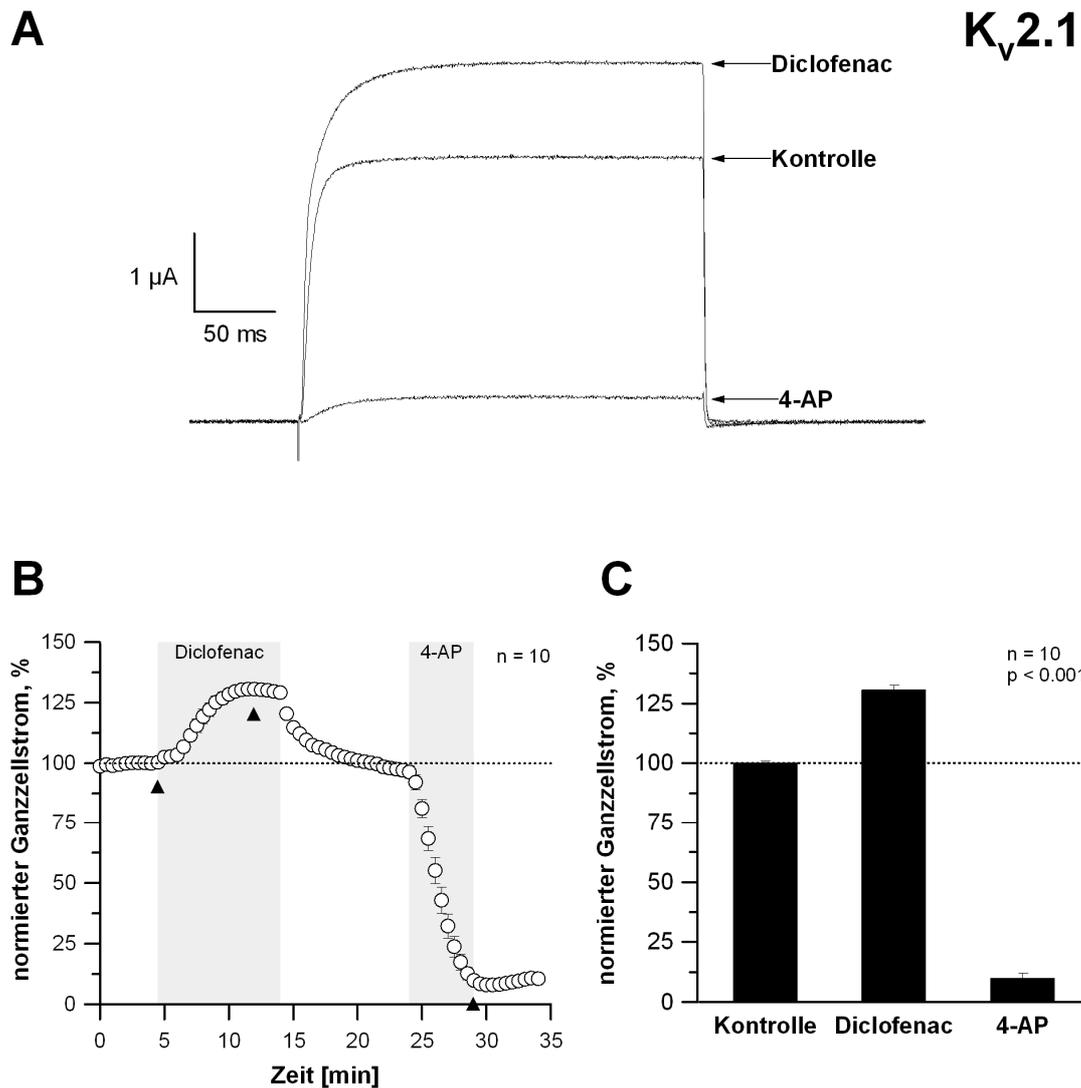


Abb. 3.3: Darstellung und Quantifizierung der Wirkung von Diclofenac auf den spannungsabhängigen K_v2.1 Kanal

A Vergleich der Ganzzellströme einer K_v2.1-exprimierenden Oozyte unter Kontrollbedingung (ND96), Diclofenac und Inhibitor-Gabe (4-AP). Hierzu wurden die gemessenen Ströme aus den Pulsen 9, 28, 58 (siehe „▲“ in Abb. B) übereinandergelagt. Ausgehend von einem Haltepotential ($V_h = -80$ mV) für 50 ms folgte ein Potentialsprung auf -100 mV für 50 ms. Dieser Präpuls (V_{pp}) dient der vollständigen Deaktivierung von K_v2.1. Daraufhin folgte ein Aktivierungspuls ($V_p = +10$ mV) für 250 ms. Dieses Potential wurde so gewählt, dass sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibierung des Stromes durch das Pharmakon festgestellt werden konnte und entspricht ungefähr dem halbmaximalen Aktivierungspotential. Abschließend wurde auf das Haltepotential zurückgesprungen. Gezeigt ist die Stromantwort ab dem Präpuls (V_{pp}).

B Stromamplitudenwerte von zehn Oozyten, gemessen am Ende der Testpulse, wurden auf den Amplitudenwert des 9. Pulses normiert und gegen die Zeit (30 s = 1x Pulsprotokoll) aufgetragen. Diclofenac wurde vom 10.–28. Pulsprotokoll und 4-AP vom 48.–58. appliziert. **C** Statistischer Vergleich (ANOVA-Test) der gemittelten Stromamplituden von $n = 10$ Oozyten unter Kontrollbedingung (Mittelwert beim Testpuls 9), Diclofenac (28) und 4-AP (58).

3.4 Darstellung der Wirkung von Diclofenac auf den $K_v3.1$ Kanal

Der $K_v3.1$ Kanal zeigt wiederum das Verhalten eines spannungsabhängigen verzögerten Gleichrichters mit einer schwach ausgeprägten langsamen C-Typ Inaktivierung [33]. Die **Abb. 3.4 A** zeigt unter Kontrollgabe einen typischen Verlauf mit schnellem Anstieg des Stromflusses unter Spannungsaktivierung bis zur Spitzenamplitude. Im Vergleich zum $K_v1.1$ ist die Aktivierungskinetik leicht verlangsamt und entspricht ungefähr dem der Aktivierung von $K_v2.1$ und $K_v1.3$. Das Ausmaß der Inaktivierung ist ausgeprägter als beim $K_v1.1$. Im Verlauf lässt sich sogar eine ganz langsame Aktivierung vermuten, die in einen Gleichgewichtszustand übergeht. Unter der Gabe von Diclofenac bleibt die Aktivierungskinetik konstant, die Spitzenamplitude ist um ca. 10 % höher als unter Gabe von ND96. Augenscheinlich wird die Kinetik des Kanals durch Diclofenac nicht beeinflusst. Es zeigt sich keine Veränderung des Inaktivierungsverhaltens, einerseits im Ausmaß (Verhältnis Spitzenstrom/Gleichgewichtsstrom), andererseits in der Kinetik der Inaktivierung. 4-AP hemmt den Kanal nur gering. Die Aktivierungskinetik ist leicht verlangsamt, die Spitzenamplitude liegt ca. 10% unter dem Wert der Kontrolllösung. Die Inaktivierungskinetik weist eine geringere schnelle Komponente auf. In **Abb. 3.4 B** sind die normierten und gemittelten Amplituden von 10 Oozyten über den gesamten Zeitraum dargestellt. Die ersten neun Pulse unter ND96 zeigen eine geringe Variabilität ($100 \pm 0,5\%$), während der Gabe von Diclofenac nehmen die Amplituden leicht zu und erreichen bei Puls 28 nahezu ein Gleichgewicht ($111,7 \pm 1,8\%$). Die fast vollständige Reversibilität der Wirkung von Diclofenac wurde durch Waschen mit ND96 gezeigt. Es zeigt sich eine nur geringe Hemmung ($86,9 \pm 1,5\%$) der spannungsabhängigen Ströme von 4-AP auf den $K_v3.1$ Kanal. Der statistische Vergleich in **Abb. 3.1 C** zeigt eine hohe Signifikanz (p-Wert $< 0,001$) für die aktivierende Wirkung von Diclofenac auf den $K_v3.1$ Kanal.

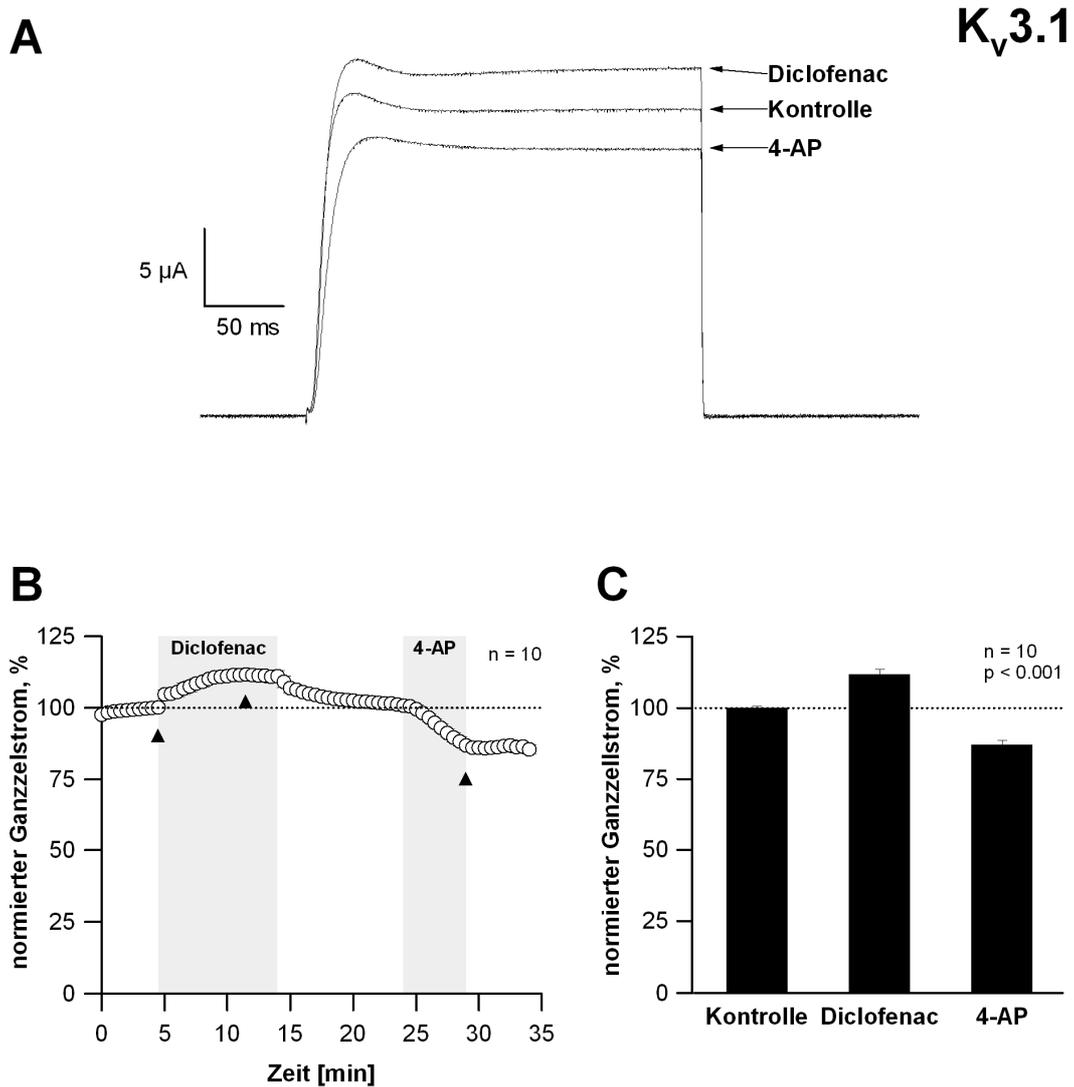


Abb. 3.4: Darstellung und Quantifizierung der Wirkung von Diclofenac auf den spannungsabhängigen K_v3.1 Kanal

A Vergleich der Ganzzellströme einer K_v3.1-exprimierenden Oozyte unter Kontrollbedingung (ND96), Diclofenac und Inhibitor-Gabe (4-AP). Hierzu wurden die gemessenen Ströme aus den Pulsen 9, 28, 58 (siehe „▲“ in **Abb. B**) übereinander gelegt. Ausgehend von einem Haltepotential ($V_h = -80$ mV) für 50 ms folgte ein Potentialsprung auf -100 mV für 500 ms. Dieser Präpuls (V_{pp}) dient der vollständigen Deaktivierung von K_v3.1. Daraufhin folgte ein Aktivierungspuls ($V_p = +10$ mV) für 250 ms. Dieses Potential wurde so gewählt, dass sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibierung des Stromes durch das Pharmakon festgestellt werden konnte und entspricht ungefähr dem halbmaximalen Aktivierungspotential. Abschließend wurde auf das Haltepotential zurückgesprungen. Gezeigt ist die Stromantwort ab dem Präpuls (V_{pp}). **B** Stromamplitudenwerte von zehn Oozyten, gemessen am Ende der Testpulse, wurden auf den Amplitudenwert des 9. Pulses normiert und gegen die Zeit (30 s = 1x Pulsprotokoll) aufgetragen. Diclofenac wurde vom 10. – 28. Pulsprotokoll und 4-AP vom 48. – 58. appliziert. **C** Statistischer Vergleich (ANOVA-Test) der gemittelten Stromamplituden von n = 10 Oozyten unter Kontrollbedingung (Mittelwert beim Testpuls 9), Diclofenac (28) und 4-AP (58).

3.5 Darstellung der Wirkung von Diclofenac auf den $K_v4.2$ Kanal

Der $K_v4.2$ Kanal gehört zur Familie der „spannungsabhängigen schnell inaktivierenden A-Typ-Kanäle“ (*rapidly inactivating transient voltage sensitive A-type K_v -channel*) [5]. Die **Abb. 3.5 A** zeigt unter Kontrollgabe einen für diesen Kanal typischen Verlauf mit schnellem Anstieg des Stromflusses unter Spannungsaktivierung bis zur Spitzenamplitude. Die Aktivierungskinetik ist im Vergleich zu $K_v1.1$ leicht verlangsamt. Einen deutlichen Unterschied zum Verlauf des $K_v1.1$ -Kanals stellt die schnelle N/C-Typ Inaktivierung [41] dar. Unter der Gabe von Diclofenac bleibt die Aktivierungskinetik konstant. Eine Erhöhung der Spitzenamplitude um ca.1/3 gegenüber der Gabe von ND96 ist zu erkennen. Zudem zeigt sich eine Veränderung des Inaktivierungsverhaltens. Die schnelle Komponente des $K_v4.2$ bei der Inaktivierung ist unter Diclofenac-Gabe leicht verlangsamt. In **Abb. 3.5 B** sind die normierten und gemittelten Amplituden von acht Oozyten über den gesamten Zeitraum dargestellt. Die ersten neun Pulse unter ND96 zeigen eine geringe Variabilität ($100 \pm 1,1\%$), während der Gabe von Diclofenac nehmen die Amplituden zunächst deutlich zu und erreichen ein Maximum [siehe „▲“] bei Puls 28 ($149,2 \pm 4,1\%$). Die nahezu vollständige Reversibilität der Wirkung von Diclofenac wurde durch Waschen mit ND96 gezeigt. Jedoch zeigte sich eine negative „Drift“ der Stromantwort während der Experimente, was möglicherweise an einer fortschreitenden Akkumulierung von Kanälen in einem geschlossen-inaktiven Zustand liegt. Somit stehen diese Kanäle nicht mehr für einen nächsten Aktivierungspuls zur „Verfügung“. Es zeigt sich im Vergleich zu $K_v1.1$ keine absolute Hemmung durch 4-AP, sondern eine mittelstarke Wirkung auf die Spitzenströme ($63,8 \pm 4,8\%$). Der persistierende Gleichgewichtsstrom wurde nicht gehemmt. Im statistischen Vergleich (**Abb. 3.5 C**) zeigt sich eine hohe Signifikanz (p-Wert $< 0,001$) für die aktivierende Wirkung von Diclofenac auf den $K_v4.2$ Kanal.

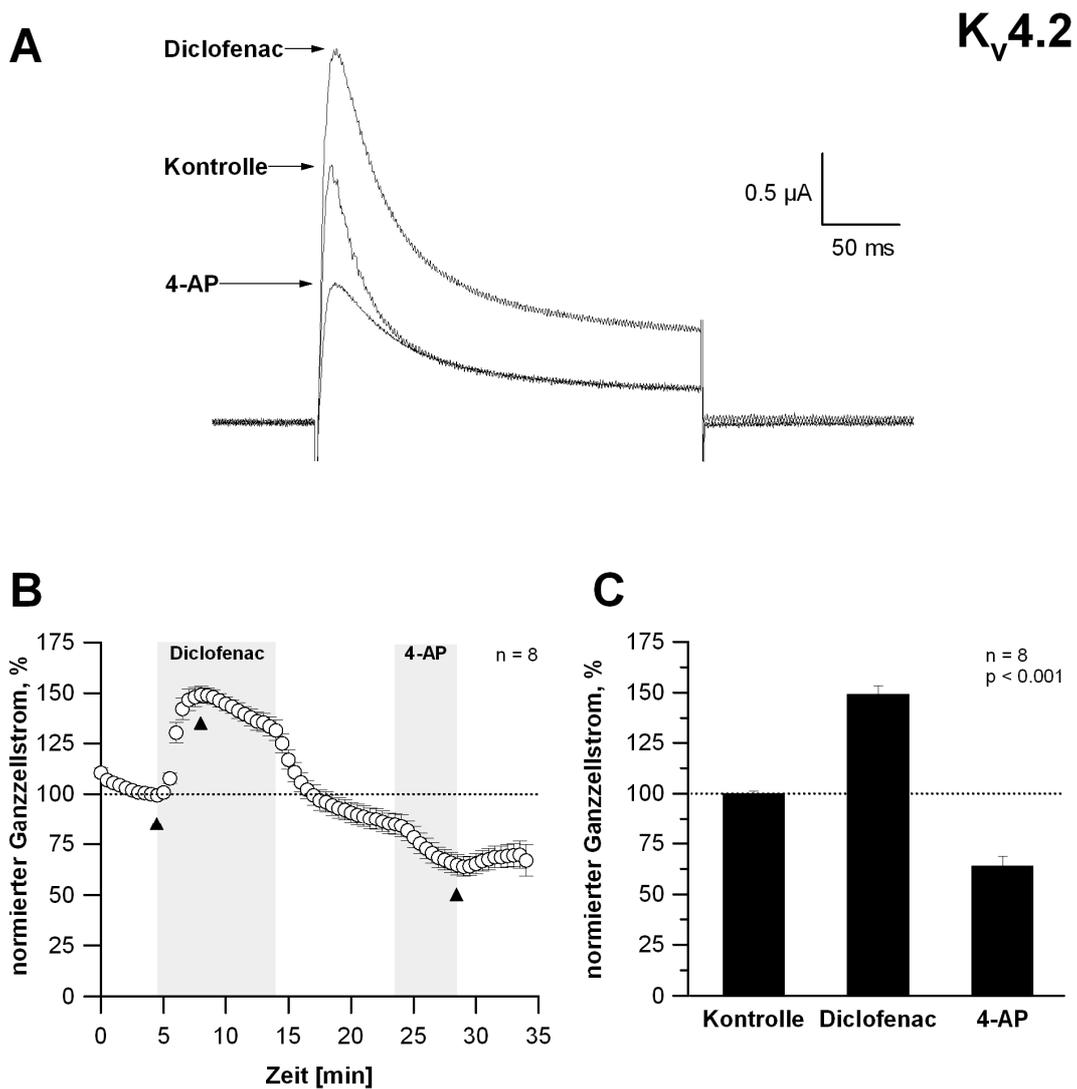


Abb. 3.5: Darstellung und Quantifizierung der Wirkung von Diclofenac auf den spannungsabhängigen K_v4.2 Kanal

A Vergleich der Ganzzellströme einer K_v4.2-exprimierenden Oozyte unter Kontrollbedingung (ND96), Diclofenac und Inhibitor-Gabe (4-AP). Hierzu wurden die gemessenen Ströme aus den Pulsen 9, 28, 58 (siehe „▲“ in **Abb. B**) übereinander gelegt. Ausgehend von einem Haltepotential ($V_h = -80$ mV) für 50 ms folgte ein Potentialsprung auf -100 mV für 500 ms. Dieser Präpuls (V_{pp}) dient der vollständigen Deaktivierung von K_v4.2. Daraufhin folgte ein Aktivierungspuls ($V_p = +10$ mV) für 250 ms. Dieses Potential wurde so gewählt, dass sowohl eine Aktivierung als auch Inhibierung des Stromes durch das Pharmakon festgestellt werden konnte und entspricht ungefähr dem halbmaximalen Aktivierungspotential. Abschließend wurde auf das Haltepotential zurückgesprungen. Gezeigt ist die Stromantwort ab dem Präpuls (V_{pp}). **B** Stromamplitudenwerte von acht Oozyten, gemessen am Ende der Testpulse, wurden auf den Amplitudenwert des 9. Pulses normiert und gegen die Zeit (30 s = 1x Pulsprotokoll) aufgetragen. Diclofenac wurde vom 10. – 28. Pulsprotokoll und 4-AP vom 48. – 58. appliziert. **C** Statistischer Vergleich (ANOVA-Test) der gemittelten Stromamplituden von n = 8 Oozyten unter Kontrollbedingung (Mittelwert beim Testpuls 9), Diclofenac (28) und 4-AP (58).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die direkte Wirkung des nicht-opiaten Schmerzmittels Diclofenac auf fünf heterolog exprimierte, spannungsabhängige K_v -Kanäle $K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v2.1$, $K_v3.1$ und $K_v4.2$ getestet. Die Messungen im heterologen System ermöglichen im Gegensatz zu Messungen an intakten Neuronen eine Separation der Wirkung von Diclofenac auf eine Kanalspezies. Da spannungsabhängige Kaliumkanäle auch in peripheren Neuronen exprimiert sind, soll durch den Nachweis der Wirkung von Diclofenac eine mögliche Rolle in der Nozizeption und Schmerzverarbeitung sowie -weiterleitung diskutiert werden.

Die Messungen zeigten typische Stromantworten bei Standardpulsprotokollen des jeweiligen Kanals. Die Applikation von Diclofenac (1 mM) bewirkte beim $K_v1.1$ eine ~25%ige und beim $K_v1.3$ eine ~50%ige Inhibierung des Kanalstromes. Eine Aktivierung von ~30% wurde beim $K_v2.1$ gemessen, beim $K_v3.1$ zeigte sich eine Aktivierung von ~10% und beim $K_v4.2$ eine Aktivierung von ~50%.

Die therapeutische Plasmakonzentration von Diclofenac- Na^+ wird in der Fachinformation von Novartis Pharma mit einem Spitzenwert von ungefähr 0,02 mM angegeben. Dieser Wert gilt bei einer Gabe von 50 mg nach ca. zwei Stunden. Üblich ist es, dass Tagesdosen von 50 – 150 mg Diclofenac verschrieben werden. Bei den Experimenten dieser Arbeit wurde also eine 17 - bis 50 - fache höhere Konzentration von Diclofenac (1 mM) im Vergleich zum Plasmaspiegel verwendet. In einer Dissertation von Claudius Middelberg [59] wurde der Einfluss verschiedener Antiarrhythmika auf die Aktivität des $K_v2.1$ Kanals, welcher ebenfalls in *Xenopus*-Oozyten exprimiert wurde, beschrieben. In seiner Arbeit lagen die Substanzkonzentrationen zur halbmaximalen Hemmung (IC_{50} -Wert) jeweils um den Faktor 50-100 über den therapeutischen Dosen. Die Konzentration von Diclofenac in der hier vorliegenden Arbeit fällt dementsprechend in einen vergleichbaren Bereich im Verhältnis zur Plasmakonzentration.

Es ist weder bekannt an welchen Stellen der Kaliumkanäle Diclofenac seine Wirkung entfaltet, noch in welchem Masse und über welchen Diffusions- bzw. Transportweg Diclofenac in die Oozyte gelangt. Zudem ist die Plasmamembran der *Xenopus*-Oozyte stark gefaltet [84], wodurch bestimmte Membranabschnitte entstehen, die für hydrophile

Substanzen nicht zugänglich sind. Madeja et al. [54] zeigten an isolierten Membranabschnitten und an ganzen Oozyten, dass für eine Wirkung von Propafenon auf $K_{V2.1}$ -Kanäle, an bestimmten Membranabschnitten, eine geringere Substanzkonzentration notwendig ist. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen bei der Wirkung von Diclofenac stabile und konstante Antworten, sodass zumindest von einer gleichbleibenden Konzentration von Diclofenac am Wirkort, über die Dauer des einzelnen Experimentes, ausgegangen werden kann. Um Aussagen über die Wirkung von Diclofenac im therapeutischen Konzentrationsbereich machen zu können, müssten konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt werden. Des Weiteren bieten sich Experimente an Säugerzell-Zellkulturen (CHO, HEK 293) an, die auf pharmakologische Experimente empfindlicher reagieren [59].

Die *Xenopus*-Oozyte als heterologes Expressionssystem für Ionenkanäle ist nicht vergleichbar mit dem „System“ Neuron. Denn im Neuron sind verschiedene Ionenkanäle exprimiert, wobei nicht von einer gleichmäßigen räumlichen Verteilung ausgegangen werden kann. Die Veränderung der Aktivität bei einer Kanalspezies, z.B. durch die Wirkung eines Pharmakons, hat eine Auswirkung auf die elektrophysiologische Aktivität (Aktionspotentialfrequenz und -form) des Neurons. Hieraus resultiert eine Modulation der synaptischen Übertragung im Neuronenverband und damit eine Beeinflussung des Schmerzsignals.

Ein myelinisiertes Axon kann vereinfacht in drei funktionelle Kompartimente unterteilt werden (**Abb. 4.1**). Ein Anfangssegment, an dem sich somatische Informationen summieren und ein Aktionspotential initiieren, ein myelinisiertes Axon von variabler Länge, das zuverlässig Informationen als eine Folge von Aktionspotentialen weiterleitet und ein Endsegment, das den terminalen präsynaptischen Bereich bildet [18].

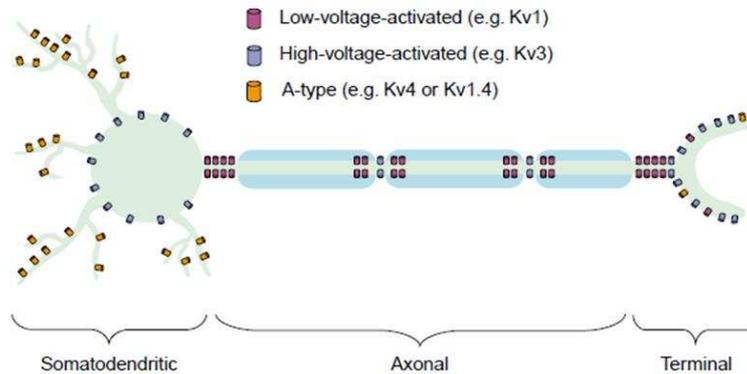


Abb. 4.1: Lokalisation von K_v -Kanälen an einem präsynaptischen, myelinisierten Axon [18]

Strukturell gibt es Ähnlichkeiten zwischen dem Initial- und dem Terminalsegment, da die elektrische Kapazität durch die somatischen und terminalen Membranen erhöht ist und somit in diesem Bereich eine Regulation der Exzitabilität nötig ist [14]. Dementsprechend sind in diesen Bereichen eher „high-voltage-activated“ ($K_v3.X$) und A-Typ K_v -Kanäle ($K_v1.4$, $K_v4.X$) zu finden. „Low-voltage-activated“ Kaliumkanäle ($K_v1.X$) sind überwiegend axonal lokalisiert [18].

„Low-voltage-activated“ Kaliumkanäle ($K_v1.X$) aktivieren um den Schwellenwert von Aktionspotentialen. Somatische Ableitungen zeigten, dass postsynaptische $K_v1.X$ -Ströme eine wichtige Rolle in der Regulation von Aktionspotentialfrequenzen spielen, u.a. auch in einigen Neuronen im Hinterhornganglion [28]. Eine Blockierung von K_v1 -Strömen in Purkinje Neuronen führte zu einer Erhöhung der Frequenz und Amplitude von spontanen inhibitorischen postsynaptischen Strömen (sIPSCs) [82]. K_v1 -Kanäle in den internodalen Abschnitten und am Axonende reduzieren das depolarisierende Nachpotential (*depolarizing after-potential*, DAP). Sie erhöhen den Schwellenwert von Aktionspotentialen und verhindern damit eine abweichende Aktionspotentialrate, ohne dabei die Aktionspotentialform zu verändern [17, 19]. In DRG-Neuronen der Ratte wurden alle $K_v1.X$ Spezies nachgewiesen, wobei $K_v1.1$ und $K_v1.2$ die Hauptanteile der toxin-sensitiven Kaliumkanäle sind [93].

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten für $K_v1.1$ und $K_v1.3$ eine Verringerung des Stromes durch Diclofenac. Einem möglichen Wirkmechanismus von Diclofenac würde

somit eine Rolle bei inhibitorischen Neuronen zukommen, wobei eine Herunterregulierung von K_v1 -Strömen eine höhere Rate von IPSCs bedingen würde.

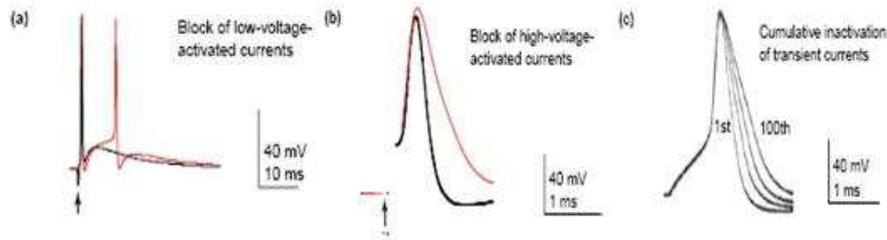


Abb. 4.2: Regulation der Aktionspotentialfrequenz und -breite durch präsynaptische Kaliumkanäle [18]

Eine Neurotransmitterfreisetzung kann auch durch die Modulation von präsynaptischen K^+ -Strömen beeinflusst werden. Applikation von 5-HT (Serotonin) bewirkt z.B. an thalamokortikalen Endknöpfchen eine lokale Erregung, die vergleichbar mit der Blockierung von präsynaptischen $K_v1.2$ Kanälen ist [46].

Bei taktilen, thermalen und chemischen Schmerzverhaltenstests an $K_v1.1$ knockout Mäusen zeigte sich jedoch eine Hyperalgesie, was eine Hyperexzitabilität der sensorischen Neurone nahe legt [12]. Aufgrund dieses Ergebnisses am Tier erscheint die hemmende Wirkung von Diclofenac auf $K_v1.1$ und $K_v1.3$, wie in dieser Arbeit gezeigt, und damit eine Schmerzreduzierung durch die Aktivierung von inhibitorischen Interneuronen als nicht wahrscheinlich.

Kanäle mit einer hohen Aktivierungsschwelle werden entsprechend erst in der Depolarisationsphase von Aktionspotentialen aktiviert. Somit regulieren sie die Breite und damit die Frequenz der Aktionspotentiale (**Abb. 4.2 B**). Zu diesen „high-voltage-activated“ Kanälen gehören der $K_v2.1$ [61] und der $K_v3.1$ [73], die in dieser Arbeit unter Diclofenacgabe eine deutliche Erhöhung des Gesamtzellstromes zeigten. Für den $K_v2.1$ Kanal ist eine Expression in Hinterhornneuronen der Maus gezeigt worden [7]. Ein direkter Zusammenhang der Expression und Funktion von K_v3 Kanälen mit der Aktionspotentialfrequenz wurde für verschiedene Neurone gezeigt [73, 91]. Zum Beispiel wurde an der *Calyx von Held* eine extrem kurze Repolarisierung von ungefähr 260 μ s gemessen. Eine Blockierung des „high-voltage-activated“ Stromes bewirkt eine Verbreiterung des präsynaptischen Aktionspotentials und eine Potenzierung der

Neurotransmitterfreisetzung. Idealerweise wären die K_v3 Kanäle neben den Ca^{2+} -Kanälen lokalisiert um deren Aktivität durch ein Herabsetzen der Membranschwelle zu verringern, was für Neuronen des Trapezoidkörpers bei Ratten gezeigt wurde [25].

Die in dieser Arbeit gemessene deutliche Erhöhung des Ganzzellstromes beim $K_v2.1$ und $K_v3.1$ Kanal unterstützt die These einer schmerzreduzierenden Wirkung durch Diclofenac. Neben der bekannten Wirkung von Diclofenac auf COX, könnte durch die Verringerung der Transmitterausschüttung an präsynaptischer Seite eine verringerte Signalübertragung auf das nachfolgende Neuron erfolgen. Dieser Mechanismus würde für eine einfache Neuronenabfolge gelten. Für einen Neuronenverband mit inhibierenden Synapsen und Interneuronen müsste diese These jedoch experimentell bewiesen werden. Bisher sind keine zur $K_v1.1$ knockout Maus vergleichbaren Experimente mit einer $K_v2.1$, bzw. $K_v3.1$ knockout Maus bekannt.

Zu den A-Typ K^+ -Kanälen gehören der $K_v1.4$, der $K_v3.4$ [92] und die Mitglieder der K_v4X -Familie ($K_v4.1$, $K_v4.2$ und $K_v4.3$) [5]. A-Typ Kanäle aktivieren bei Depolarisation und gehen dann in eine schnelle spannungsabhängige Deaktivierung über. Akkumulierende Inaktivierung während einer Reihe von Aktionspotentialen führt zu aktivitätsabhängigen Wechseln in der Dauer eines Aktionspotentials und somit in der Freisetzung von Neurotransmittern [29, 39]. A-Typ Ströme bieten einen Mechanismus gradierte Potentiale (Rezeptorpotentiale) in Aktionspotentialfrequenz zu übersetzen [15]. Eine Inaktivierung von präsynaptischen A-Typ Kanälen führt zu einer Verbreiterung der Aktionspotentialwellenform von 37% [39], Erhöhung des Ca^{2+} -Eintritts und einer Steigerung der Neuropeptidfreisetzung.

Kim *et al.* (2002) [43] wiesen als Erste die Expression von $K_v4.1$, $K_v4.2$ und $K_v4.3$ in lumbalen DRG-Neuronen der Ratte nach. Ebenso wurde die Expression vom A-Typ Kanal $K_v3.4$ [10] gezeigt. Im Hinterhorn wurden $K_v4.2$ und $K_v4.3$ histologisch überwiegend in der Lamina II nachgewiesen [35]. $K_v4.3$ -positive Neurone gehörten zu einer Gruppe von exzitatorischen Interneuronen, die ERK 2 und den mGlu 5-Rezeptorkanal exprimieren. Diese Rezeptoren sind an der nozizeptiven Plastizität beteiligt[35].

In dieser Arbeit wurde der Ganzzellstrom am $K_v4.2$ Kanal gemessen, unter Diclofenacgabe zeigte sich eine deutliche Erhöhung des Gesamtzellstromes. Neben der Wirkung von Diclofenac auf COX, würde eine Steigerung der Aktivität zu einer Verkürzung des Aktionspotentials führen (**Abb. 4.2 C**). Präsynaptisch käme es zu einer Verringerung des Ca^{2+} -Eintritts und in Folge zu einer geringeren Neuropeptidfreisetzung. Eine verringerte Signalübertragung auf das nachfolgende Neuron durch die Aktivierung von A-Typ Kanälen, verursacht durch Diclofenac, würde eine Schmerzentfaltung eingrenzen (**Abb. 1.1**).

In $K_v4.2$ knockout Mäusen wurde eine erhöhte Erregbarkeit der Hinterhornneurone gegenüber Neuronen von WT-Mäusen festgestellt. Elektrophysiologische Messungen an den kultivierten Neuronen zeigten eine Verringerung der Rheobase bei Neuronen der knockout Mäuse. Bei taktilen und thermalen Verhaltenstests an diesen Mäusen wurde entsprechend eine Hypersensitivität festgestellt [34]. Zumindest für Hinterhornneurone ist aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse [10, 35, 43] eine Wirkung von Diclofenac auf die Neurone sehr wahrscheinlich. Da diese Neurone in der Schmerzweiterleitung involviert sind, ist die analgetische Wirkung von Diclofenac neben der Wirkung auf COX, möglicherweise auch auf die Aktivierung von A-Typ Kanälen zurückzuführen.

Eine Inhibierung von A-Typ Kanälen und die damit verbundene Verbreiterung der Summenaktionspotentiale könnte an der Induzierung von synaptischer Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP) beteiligt sein [86]. Die LTP stellt einen neurophysiologischen Mechanismus dar, dem lang anhaltende Umbauvorgänge in den synaptischen Umschaltstellen zugrunde liegen. In der Tat weiß man aus Tierversuchen, dass im Rückenmark Genexpression und Veränderung in der Proteinsynthese durch lang anhaltende Schmerzreize induziert werden. Genetische Elimination von $K_v4.2$ in Mäusen führte zu einer Verringerung der A-Typ Ströme und zu einer erhöhten Erregbarkeit von Rückenmarksneuronen [34]. Es wurden LTP-induzierende Stimuli gefunden, welche die Aktionspotentialfrequenz von multirezeptiven Neuronen im „tiefen dorsalen Horn“ erleichtern [76]. Bliss und Collingridge (1993) [6] stellten heraus, dass der gleiche Mechanismus im Hippocampus für das Lernen und das Gedächtnis verantwortlich ist. Starke und lang

anhaltende Schmerzen können somit Spuren im „Schmerzgedächtnis“ hinterlassen [75]. Eine Aktivitätserhöhung des $K_v4.2$ Kanals würde der Induzierung von LTP entgegen wirken.

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Effekt von Diclofenac auf fünf exprimierte K_v -Kanäle $K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v2.1$, $K_v3.1$ und $K_v4.2$ experimentell darzustellen. Für eine vollständige elektrophysiologische Charakterisierung unter der Gabe von Diclofenac müssten Experimente zur Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, bei A-Typ Kanälen der Inaktivierung, durchgeführt werden. Ferner müsste eine Beeinflussung der Kanalkinetik untersucht werden. Interessant wäre es, den Wirkort (intra-, extrazellulär) von Diclofenac, durch z.B. ein nicht-membranpermeables Derivat, experimentell herausstellen zu können. Zur Vervollständigung der Pharmakologie sollte jeweils die halbmaximale Inhibierungskonstante ermittelt werden.

Neben der „Basis“-Charakterisierung könnten Versuche an DRG- und Hinterhornneuronen angedacht werden. Besonders interessant wäre es, die Wirkung von Diclofenac auf den A-Typ Strom zu untersuchen. Zu diesem Strom und den einzelnen A-Typ Kanälen in DRG- und Hinterhornneuronen liegt eine umfangreiche Literatur vor. Außerdem gibt es bereits experimentelle Befunde anderer Arbeitsgruppen.

5 Zusammenfassung

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind an der Entstehung und Modulation von neuronalen Aktionspotentialen beteiligt und damit möglicherweise auch an der peripheren Schmerzverarbeitung und -weiterleitung. In dieser Arbeit wurde ein möglicher direkter Effekt des nicht-opiaten Schmerzmittels Diclofenac auf die Aktivität heterolog exprimierter spannungsabhängiger Kaliumkanäle (K_v) getestet. Die Ergebnisse sollen Aufschluss darüber geben, ob Kaliumkanäle prinzipiell bei der Nozizeption eine beeinflussende Rolle spielen könnten.

Hierzu wurde cDNA verschiedener gängiger K_v -Kanäle ($K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v2.1$, $K_v3.1$ und $K_v4.2$) transkribiert und die so gewonnene cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert, die als heterologes Expressionssystem dienen. Nach einer Inkubationszeit von 3–4 Tagen wurden die exprimierenden Oozyten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik elektrophysiologisch unter Kontrollbedingung (ND96), 1 mM Diclofenac und Inhibitor-Gabe (5 mM 4-AP) gemessen und analysiert.

Die Kontrollmessungen zeigten typische Stromantworten bei Standardpulsprotokollen des jeweiligen Kanals. Die Applikation von Diclofenac bewirkte beim $K_v1.1$ eine ~25%ige und beim $K_v1.3$ eine ~50%ige Inhibierung des Kanalstromes. Eine Aktivierung von ~30% wurde beim $K_v2.1$ gemessen, beim $K_v3.1$ zeigte sich eine Aktivierung von ~10% und beim $K_v4.2$ eine Aktivierung von ~50%.

Postsynaptische $K_v1.X$ -Ströme spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Aktionspotentialfrequenzen. Eine Blockierung von K_v1 -Strömen in Purkinje Neuronen führte zu einer Erhöhung der Frequenz und Amplitude von spontanen inhibitorischen postsynaptischen Strömen (sIPSCs). Die Ergebnisse zeigten für $K_v1.1$ und $K_v1.3$ eine Verringerung der Ströme durch Diclofenac. Als „low-voltage-activated“ Kaliumkanäle aktivieren $K_v1.X$ um den Schwellenwert von Aktionspotentialen, was zu einer „Erhöhung“ der Membranschwelle für Aktionspotentiale führt. Einem möglichen Wirkmechanismus würde damit eine Rolle bei inhibitorischen Neuronen in der Schmerzverarbeitung zukommen: Eine Herunterregulierung von K_v1 -Strömen würde die Membranschwelle für Aktionspotentiale erniedrigen und damit eine höhere Rate von IPSCs ermöglicht werden.

Der $K_v2.1$ und $K_v3.1$ gehören zu den „high-voltage-activated“-Kaliumkanälen. Diese Kanäle aktivieren erst in der Depolarisationsphase und regulieren somit die Breite von präsynaptischen Aktionspotentialen. Eine Blockierung dieser Kanäle verlängert die Repolarisierungsphase und führt damit zu einer verlängerten Aktivierung von spannungsabhängigen Ca_v -Kanälen. Der damit verbundene erhöhte Einstrom von Ca^{2+} erhöht eine Neurotransmitterfreisetzung. Idealerweise wären die K_v3 -Kanäle neben den Ca_v -Kanälen lokalisiert um deren Aktivität durch ein Herabsetzen der Membranschwelle zu verringern, was für Neuronen des Trapezoidkörpers bei Ratten gezeigt wurde. Die in dieser Arbeit gemessene deutliche Erhöhung des Ganzzellstromes durch Diclofenac beim $K_v3.1$ und $K_v2.1$ Kanal unterstützt die These, dass Diclofenac durch eine Verringerung der Transmitterausschüttung an der präsynaptischen Seite und damit eine verringerte Signalübertragung auf das nachfolgende Neuron, eine schmerzreduzierende Wirkung entfaltet.

A-Typ Kanäle, zu denen $K_v4.2$ zählt, aktivieren bei Depolarisation und gehen dann in eine schnelle spannungsabhängige Inaktivierung über. Die akkumulierende Inaktivierung von präsynaptischen A-Typ Kanälen führt zu einer Verbreiterung des Aktionspotentials, z.B. in präsynaptischen Terminalen von Hypophyseneuronen, was zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Eintritts und damit zu einer Steigerung der Neuropeptidfreisetzung führt. In $K_v4.2$ knockout Mäusen wurde eine erhöhte Erregbarkeit der Hinterhornneurone gegenüber Neuronen von WT-Mäusen festgestellt. Bei taktilen und thermalen Verhaltenstests an $K_v4.2$ knockout Mäusen wurde eine Hypersensitivität festgestellt. Da Hinterhornneurone in der Schmerzweiterleitung involviert sind, ist die analgetische Wirkung von Diclofenac neben der Wirkung auf COX, möglicherweise auch auf die Aktivierung von A-Typ Kanälen zurückzuführen.

In dieser Arbeit wurde eine Aktivierung des Ganzzellstromes des $K_v4.2$ Kanals unter Diclofenacgabe gezeigt. Eine Steigerung der $K_v4.2$ -Aktivität führt zu einer Verringerung der Aktionspotentialbreite, präsynaptisch käme es zu einer Verringerung des Ca^{2+} -Eintritts und in Folge zu einer geringeren Neuropeptidfreisetzung. Eine verringerte Signalübertragung auf das nachfolgende Neuron würde eine Schmerzentfaltung eingrenzen. Eine Verbreiterung der Aktionspotentiale durch die Inhibierung von A-Typ-Kanälen könnte an der Induzierung von synaptischer Langzeitpotenzierung

(*long-term potentiation*, LTP) beteiligt sein. Starke und lang anhaltende Schmerzen können auf diese Weise Spuren im „Schmerzgedächtnis“ hinterlassen. Eine Aktivitätserhöhung des $K_v4.2$ Kanals würde der Induzierung von LTP entgegen wirken.

6 Literaturverzeichnis

1. Aidley DJ, Stanfield PR (1996) Ion Channels Molecules in Action. *Cambridge University Press*. 1. Auflage.
2. Ballou LR (2000) The regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in knockout cells and cyclooxygenase and fever in knockout mice. *Ernst Schering Res Found Workshop* **31**:97-124.
3. Bezanilla F (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* **80**:555-592.
4. Bezanilla F, Armstrong CM (1977) Inactivation of the sodium channel. *J Gen Physiol* **70**:549-566.
5. Birnbaum SG, Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, Sweatt JD Schrader LA (2004) Structure and function of K_v4-family transient potassium channels. *Physiol Rev* **84**:803-833.
6. Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**:31-39.
7. Bocksteins E, Raes AL, Van de Vijver G, Bruyns T, Van Bogaert PP, Snyders DJ (2009) K_v2.1 and silent K_v units underlie the delayed rectifier K⁺ current in cultured small mouse DRG neurons. *Am J Physiol*. **296**:1271-1278.
8. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: A heat activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**:816-824.
9. Chen X, Gallar J, Belmonte C (1997) Reduction by antiinflammatory drugs of the response of corneal sensory nerve fibers to chemical irritation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:1944-1953.
10. Chien LJ, Cheng JK, Chu D, Cheng CF, Tsaur ML (2007) Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity. *J Neurosci* **27**:9855-9865.
11. Choe H, Sackin H (1997) Improved preparation of *Xenopus laevis* oocytes for patch-clamp recording. *Pflugers Arch* **433**:648-652.
12. Clark JD, Tempel BL (1998) Hyperalgesia in mice lacking the K_v1.1 potassium channel gene. *Neurosci Lett* **251**:121-124.
13. Coderre TJ, Van Empel I (1994) The utility of excitatory amino acid (EAA) as analgesic agents. I.: Comparison of the antinociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. *Pain* **59**:345-352.
14. Colbert CM, Johnston D (1996) Axonal action-potential initiation and Na⁺-channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *J Neurosci* **16**:6676-6686.
15. Connor JA, Stevens CF (1971) Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp study of isolated neuron somata. *J Physiol* **213**:31-53.
16. Costigan M, Woolf CJ (2000) Pain: Molecular Mechanisms. *J Pain* (3. Auflage):33-44.
17. David G, Modney B, Scappaticci KA, Barrett JN, Barrett EF (1995) Electrical and morphological factors influencing the depolarizing afterpotential in rat and lizard myelinated axons. *J Physiol* **489**:141-157.
18. Dodson PD, Forsythe ID (2004) Presynaptic K⁺-channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends Neurosci* **27**:210-217.
19. Dodson PD, Barker MC, Forsythe ID (2002) Two heteromeric K_v1 potassium channels differentially regulate action potential firing. *J Neurosci* **22**:6953-6961.
20. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**:69-77.
21. Dumont JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis*. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* **136**:153-179.
22. Dumont JN, Brummett AR (1978) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J Morphol* **155**:73-97.

23. Durell SR, Guy HR (1992) Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys J* **62**:238-250.
24. Durell SR, Shrivastava IH, Guy HR (2004) Models of the structure and voltage-gating mechanism of the shaker K⁺-channel. *Biophys J* **87**:2116-2130.
25. Elezgarai I, Diez J, Puente N, Azkue JJ, Benitez R, Bilbao A, Knöpfel T, Donate-Oliver F, Grandes P (2003) Subcellular localization of the voltage-dependent potassium channel K_v3.1b in postnatal and adult rat medial nucleus of the trapezoid body. *Neuroscience* **118**:889-898.
26. England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM (1992) Characterization of a voltage-gated K⁺ channel beta subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:6309-6313.
27. Erlanger J, Gasser HS (2003) Molekulare und zelluläre Grundlagen des Nervensystems. in *Lehrbuch Vorklinik*, Schmidt, Unsicker (Hrsg), Deutscher Ärzte Verlag, 1. Auflage Teil B:24.
28. Everill B, Rizzo MA, Kocsis JD (1998) Morphologically identified cutaneous afferent DRG neurons express three different potassium currents in varying proportions. *J Neurophysiol* **79**:1814-1824.
29. Geiger JR, Jonas P (2000) Dynamic control of presynaptic Ca²⁺ inflow by fast-inactivating K⁺-channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* **28**:927-939.
30. Goldin AL (1992) Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol* **207**:266-279.
31. Guirimand F, Le Bars D (1996) Physiology of nociception. *Ann Fr Anesth Reanim* **15**:1048-1079.
32. Handwerker H.O.(1999) Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes. *Springer*.
33. Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich R (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**:533-538.
34. Hu HJ, Carrasquillo Y, Karim F, Jung WE, Nerbonne JM, Schwarz TL, Gereau RW (2006) The K_v4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron* **50**:89-100.
35. Huang HY, Cheng JK, Shih YH, Chen PH, Wang CL, Tsaur ML (2005). Expression of A-type K⁺-channel alpha units K_v4.2 and k_v4.3 in rat spinal lamina II excitatory interneurons and colocalization with pain-modulating molecules. *Eur J Neurosci* **22**:1149-1157.
36. International Association for the study of pain (1979) *Pain* **6**:249-252.
37. International Union of Pharmacology (2002) Potassium channels. *The IUPHAR Ion Channel Compendium*:59-63.
38. Illes P, Allgaier C (2005) Pathophysiologie des Schmerzes in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke (Hrsg.), Urban & Fischer, 9. Auflage:232-234.
39. Jackson M, Konnerth A, Augustine GJ (1991) Action potential broadening and frequency-dependent facilitation of calcium signals in pituitary nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:380-384.
40. Jan LY, Jan YN (1992) Tracing the roots of ion channels. *Cell* **69**: 715-718.
41. Jerng HH, Covarrubias M (1997) K⁺-channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N-and C-terminal domains. *Biophys J* **72**:163-174.
42. Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R (2003) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺-channel. *Nature* **423**:42-48.
43. Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ (2002) Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* **105**:146-152.
44. Kopf A, Janson W, Stein C (2003) Opioid therapy in chronic non-malignant pain. *Anaesthesist* **52**:103-114.
45. Kress M, Reeh PW (1996) More sensory competence for nociceptive neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:15435-15439.

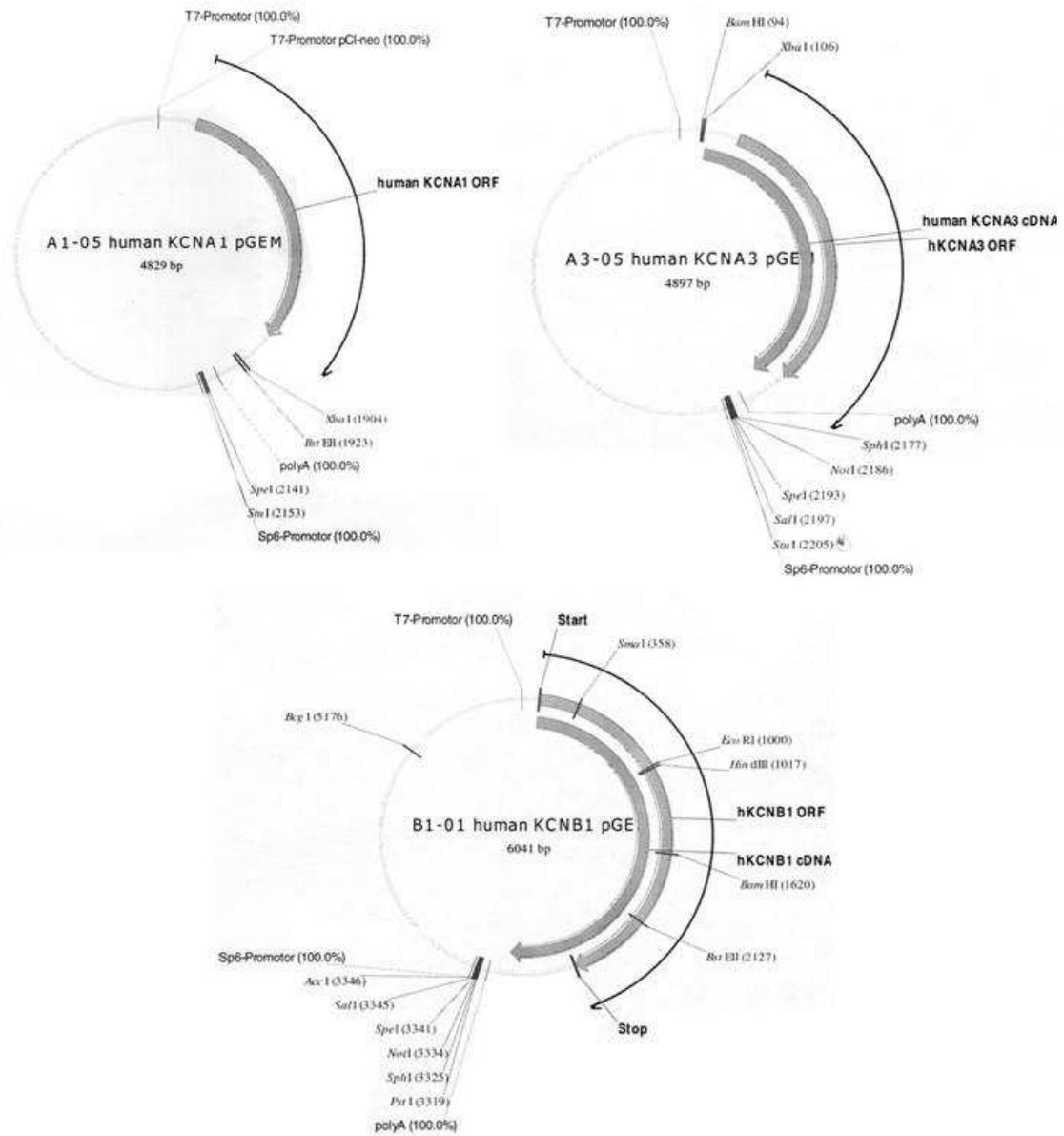
46. Lambe EK, Aghajanian GK (2001) The role of K_v1.2 containing potassium channels in serotonin-induced glutamate release from thalamocortical terminals in rat frontal cortex. *J Neurosci* **21**:9955-9963.
47. Lee A, Zhou H, Scheuer T, Catterall WA (2003) Molecular determinants of Ca²⁺/Calmodulin-dependent regulation of Ca_v2.1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:16059-16064.
48. Lockless SW, Zhou M, MacKinnon R (2007) Structural and thermodynamic properties of selective ion binding in a K⁺-channel. *PLoS Biol* **5**:1079-1088.
49. Long SB, Campbell EB, MacKinnon R (2005) Voltage sensor of K_v1.2: Structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**:903-908.
50. MacKinnon R (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**:232-235.
51. MacKinnon R (1995) Pore loops: an emerging theme in ion channel structure. *Neuron* **14**:889-892.
52. MacKinnon R (2004) Nobel Lecture: Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction. *Bioscience Reports* **24**:75-100.
53. Madeja M und Mußhoff U (1992) Die Eizelle des Krallenfrosches als Modell in der Neurophysiologie. *EEG-Labor* **14**.
54. Madeja M, Leichler T, Friedrich P, Punke MA, Haverkamp W, Musshoff U, Breithardt G, Speckmann EJ (2003) Molecular site of action of the antiarrhythmic drug propafenone at the voltage-operated potassium channel K_v2.1. *Mol Pharmacol* **63**:547-556.
55. McCleskey EW, Gold MS (1999) Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* **61**:835-856.
56. Menassé R, Hedwall PR, Kraetz J, Pericin C, Riesterer L, Sallmann A, Ziel R, Jaques R. (1978) Pharmacological properties of Diclofenac Sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol Suppl* **22**:5-16.
57. Messlinger K (1997) Was ist ein Nozizeptor? *Der Anästhesist* **46**:142-153.
58. Messlinger K (2003) Nozizeption und Schmerz. in *Lehrbuch Vorklinik*, Schmidt, Unsicker (Hrsg), Deutscher Ärzte Verlag, 1. Auflage Teil B:193-204.
59. Middelberg C (2004) Die Bedeutung der Hüllschichten der Xenopus-Oozyte für den Effekt der Antiarrhythmika Propafenon, Flecainid und Verapamil auf den klonierten Kaliumkanal K_v2.1. Dissertationsschrift aus dem Physiologischen Institut I in Münster. *urn:nbn:de:hbz:6-00709414650*.
60. Millan MJ (1999) The induction of pain, an Integrative Review. *Prog Neurobiol* **57**:1-164.
61. Misonou H, Mohapatra DP, Trimmer JS (2005) K_v2.1: a voltage-gated K⁺-channel critical to dynamic control of neuronal excitability. *Neurotoxicology* **26**:743-752.
62. Mitchell JA, Warner TD (1999) Cyclo-oxygenase-2: Pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* **128**:1121-1132.
63. Ortiz MI, Torres-Lopez JE, Castaneda-Hernandez G, Rosas R, Vidal-Cantu GC, Granados-Soto V (2002) Pharmacological evidence for the activation of K⁺-channels by Diclofenac. *Eur J Pharmacol* **438**:85-91.
64. Ottschytsch N, Raes A, Van Hoorick D, Snyders DJ (2002) Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized K_v channel α -subunits identified in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:7986-7991.
65. Papazian DM et al. (1991) Molecular basis of gating charge immobilization in Shaker potassium channels. *Science* **254**:679-683.
66. Pongs O (1992) Structural basis of voltage-gated K⁺-channel pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **13**:359-365.
67. Pongs O (1997) Strukturmerkmale Kalium-selektiver Ionenkanäle. *Biospektrum* **3**:97.
68. Rainsford KD (2007) Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem* **42**:3-27.

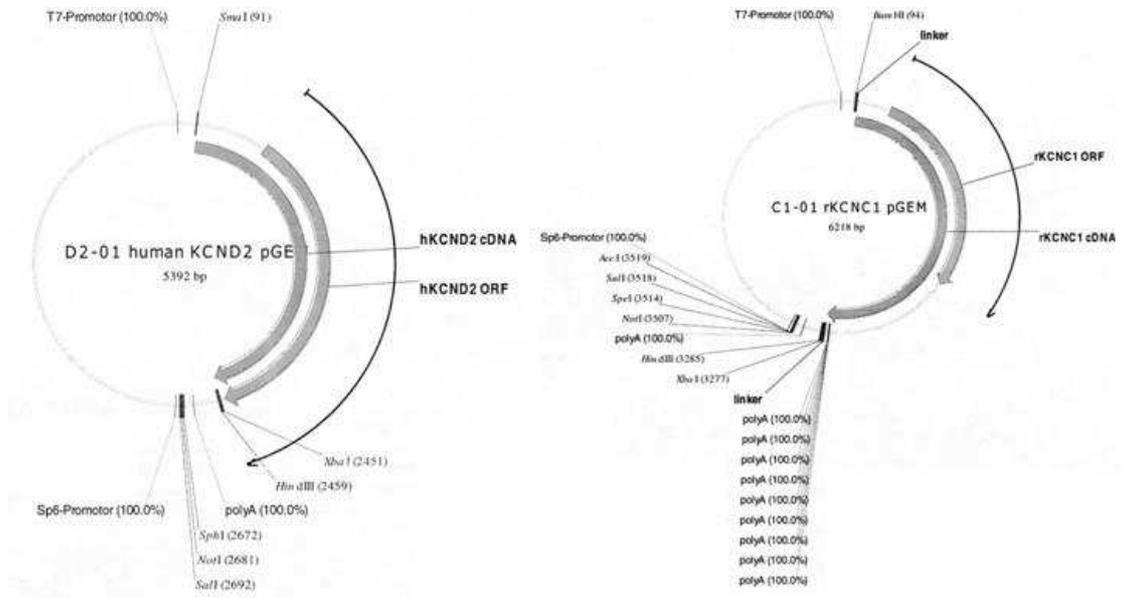
69. Rao P, Knaus EE (2008) Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci* **11**:81-110.
70. Reeh PW, Steen KH (1996) Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog Brain Res* **113**:143-151.
71. Roeper J, Pongs O (1996) Presynaptic potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* **6**:338-341.
72. Rudy B (1988) Diversity and ubiquity of K⁺-channels. *Neuroscience* **25**:729-749.
73. Rudy B, Mc Bain CJ (2001) K_v3 channels: voltage-gated K⁺-channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci* **24**:517-526.
74. Ruppertsberg JP, Stocker M, Pongs O, Heinemann SH, Frank R, Koenen M (1991) *Nature* **352**:711-714.
75. Sandkühler J (2001) Learning and memory in pain pathways. *Pain* **88**:113-118.
76. Sandkühler J (2007) Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain* **3**:3-9.
77. Schnitzler A, Ploner M (2000) Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *J Clin Neurophysiol* **17**:592-603.
78. Schreibmayer W, Lester HA, Dascal N (1994) Voltage clamping of *Xenopus laevis* oocytes utilizing agarose-cushion electrodes. *Pflugers Arch.* **426**:453-458.
79. Sewing S, Röper J, Pongs O (1996) Struktur und Funktion spannungsabhängiger K⁺-Kanäle. *Neuroforum* **2**:21-28.
80. Silbernagl S, Despopoulos A (2007) Abbildung in *Taschenatlas der Physiologie*, Thieme Verlag, 7.Auflage.
81. Snider D, McMahon S (1998) Tackling Pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* **20**:629-632.
82. Southan AP, Robertson B (1998) Modulation of inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) in mouse cerebellar Purkinje and basket cells by snake and scorpion toxin K⁺-channel blockers. *Br J Pharmacol* **125**:1375-1381.
83. Steen KH, Steen AE, Reeh PW (1995) A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci* **5**:3982-3989.
84. Stühmer W (1992) Electrophysiological recording from *xenopus* oocytes. *Methods Enzymol* **207**:319-339.
85. ten Bruggencate G (1999) Sensorisches System. In *Physiologie*, Deetjen und Speckmann (Hrsg), Urban & Fischer, 3. Auflage:60.
86. Thorn PJ, Wang XM, Lemos JR. (1991) A fast transient K⁺-current in neurohypophysial nerve terminals of the rat. *J Physiol* **432**:313-326.
87. Todd PA, Sorkin EM (1988) Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* **35**:244-285.
88. Tonussi FR, Ferreira SH (1994) Mechanism of Diclofenac analgesia: Direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* **251**:173-179.
89. Valiyaveetil FI, Leonetti M, Muir TW, MacKinnon R (2006) Ion selectivity in a semisynthetic K⁺ channel locked in the conductive conformation. *Science* **314**:1004-1007.
90. Vane JR, Botting RM (1998) Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Thromb Res* **110**:255-258.
91. Wang LY, Gan L, Forsythe ID, Kaczmarek LK (1998) Contribution of the K_v3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurons. *J Physiol* **509**:183-194.
92. Xie W (2007) Ion channels in pain transmission. *Int Anesthesiol Clin* **45**:107-120.
93. Yang EK, Takimoto K, Hayashi Y, de Groat WC, Yoshimura N (2004) Altered expression of potassium channel subunit mRNA and alpha-dendrotoxin sensitivity of potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons after axotomy. *Neuroscience* **123**:867-874.

-
94. Yarov-Yarovoy V, Baker D, Catterall WA (2006) Voltage sensor conformation in the open and closed state of structural models of K⁺-channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:7292-7297.

7 Anhang

7.1 Plasmidkarten der verwendeten cDNA-Kaliumkanalklone





7.2 Verzeichnis der im Text verwendeten Abbildungen

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung der Nozizeption und ihrer Weiterleitung	2
Abb. 1.2:	Chemische Struktur von Diclofenac	5
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der Topologie einer <i>shaker</i> -Typ-Kaliumkanaluntereinheit.....	8
Abb. 2.1:	Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes.....	12
Abb. 2.2:	Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i> in den Reifestadien I bis VI..	18
Abb. 2.3:	Äquivalenter Schaltkreis für eine biologische Zelle (C = R).....	22
Abb. 2.4:	Blockschaltbild zum elektrophysiologischen Versuchsaufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik.....	23
Abb. 2.5:	Graphische Darstellung der verwendeten Aktivierungsprotokolle	27
Abb. 3.1:	Darstellung und Quantifizierung der Wirkung von Diclofenac auf den spannungsabhängigen K _v 1.1 Kanal	32
Abb. 3.2:	Darstellung und Quantifizierung der Wirkung von Diclofenac auf den spannungsabhängigen K _v 1.3 Kanal	34
Abb. 3.3:	Darstellung und Quantifizierung der Wirkung von Diclofenac auf den spannungsabhängigen K _v 2.1 Kanal	36
Abb. 3.4:	Darstellung und Quantifizierung der Wirkung von Diclofenac auf den spannungsabhängigen K _v 3.1 Kanal	38
Abb. 3.5:	Darstellung und Quantifizierung der Wirkung von Diclofenac auf den spannungsabhängigen K _v 4.2 Kanal	40
Abb. 4.1:	Lokalisation von K _v -Kanälen an einem präsynaptischen, myelinisierten Axon.....	43
Abb. 4.2:	Regulation der Aktionspotentialfrequenz und -breite durch präsynaptische Kaliumkanäle	44

7.3 Verzeichnis der im Text verwendeten Tabellen

Tab. 1:	Parameter der verwendeten Aktivierungsprotokolle.....	26
---------	---	----

7.4 Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin	EP	Prostaglandinrezeptor
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)	ERK 2	Extrazelluläre Signalregulierte Kinase 2
AC	Adenylatcyclase	HEK	Humane embryonale Nierenzellkulturen
ASICs	Acid Sensing Ion Channels	IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ATP	Adenosintriphosphat	mGlu 5	metabotroper Glutamatrezeptor 5
BK	Bradykininrezeptor	NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
cAMP	klisches Adenosinmonophosphat	PKA	Proteinkinase A
CGRP	Calcitonin-Gen-Reguliertes Peptid	PKC	Proteinkinase C
CHO	Chinesische Hamster Ovarien	PLA ₂	Phospholipase A ₂
DAG	Diacylglycerin	PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

7.5 Lebenslauf

7.6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Erwin-Josef Speckmann möchte ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten im Institut für Physiologie I danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Martin Schwarz, der mich in all den Jahren mit großem Engagement unterstützt hat. Seine Betreuung war eine unverzichtbare Stütze bei der Fertigstellung dieser Dissertation. Mit seiner offenen und freundlichen Art war er immer eine große Hilfe bei Fragen und Diskussionen. Zudem möchte ich ihm für seine unermüdliche Geduld danken, die er mir über die ganze Zeit entgegenbrachte.

Im Weiteren möchte ich Frau Alexandra Markovic zum einen für ihre Unterstützung bei der Laborarbeit, als auch für die Vorbereitung der Frosch-Eizellen danken.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Physiologie I möchte ich mich für die freundliche und immer hilfsbereite Art bedanken. Sie gaben mir das Gefühl als Doktorand im Institut stets willkommen und integriert zu sein.

Linda und Marco Hilbring danke ich für die großartige Möglichkeit, die diversen Versionen dieser Dissertation zu drucken. Das Korrekturlesen hat mir die Augen für notwendige Detailverbesserungen geöffnet.

Meinen Eltern und meinem Bruder Sebastian möchte ich ganz besonders für die liebevolle und tatkräftige Unterstützung über die Jahre meiner akademischen Laufbahn danken. Bei Misserfolgen haben sie mir stets Mut gemacht das Studium weiter voranzutreiben.

Meiner Freundin Pia Hoffschlag danke ich von ganzem Herzen für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihre Liebe und Motivation. Ohne sie wäre ich bis heute nicht soweit gekommen.

7.7 Genehmigung von tierexperimentellen Arbeiten



Bezirksregierung Münster



Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

Herrn
 Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann
 Institut für Physiologie der
 Westf. Wilhelms-Universität Münster
 Robert-Koch-Str. 27 a

Dienstgebäude
 Domplatz 1-3
 Telefon: (0251) 411-0
 Durchwahl: 2110
 Zimmer: 431
 Frau Möllers
 Aktenzeichen
 23.0835.1.0 (G 32/97)

48149 Münster

7. September 2000

Betr.: Tierschutz;
 hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren
Verlängerung des Tierversuchs G 32/97:
 " Experimentelle Epilepsieforschung "

Bezug: Antrag vom 24.08.2000
 Mein Genehmigungsbescheid vom 23.10.1997 - Az.: w. o. -

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekannt-
 machung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren
 Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a.
 Versuchsvorhabens bis zum 31.10.2001.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Piontkowski

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche 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