

**Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)**

**Beeinflussung der LPA-Signalübertragung in Xenopus  
Oozyten durch Lokalanästhetika**

Bedeutung der Stereoselektivität und des Ionisierungsgrades von  
Lokalanästhetika

Andreas Berger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. M. Rust

2. Univ.-Prof. Dr. E. Kochs

Die Dissertation wurde am 02.05.2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.06.2006 angenommen.

Meinen lieben Großeltern

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	4
1. Einleitung .....	5
2. Material und Methoden .....	10
2.1. Oozytengewinnung.....	10
2.2. Testsubstanzen .....	11
2.3. Read-out der LPA-Rezeptoraktivität.....	13
2.3. Voltage-Clamp Technik .....	15
2.5. Experimenteller Aufbau .....	18
2.5.1. LPA-Wirkung unter Kontrollbedingungen .....	18
2.5.2 . LPA-Wirkung nach Inkubation mit Lokalanästhetika.....	18
2.6 Datenanalyse .....	20
3. Ergebnisse.....	22
3.1. Stereoselektive Hemmung der LPA-Signaltransduktion durch Ropivacain .....	23
3.2. Nicht-kompetitive Hemmung der LPA-Signaltransduktion durch S(-)-Ropivacain .....	24
3.3. Hemmung der LPA-Rezeptoraktivität durch Lidocain in Abhängigkeit vom Ionisierungsgrad.....	26
3.3.1. Einfluß des pH-Wertes auf die LPA-Kontrollantwort.....	26
3.3.2 Einfluß des Ionisierungsgrades von Lidocain auf seine Hemmwirkung am LPA-Rezeptor .....	27
4.Diskussion .....	30
4.1. Stereoselektive Hemmung der LPA-Signaltransduktion.....	31
4.2. Nicht-kompetitive Hemmung der LPA-Signaltransduktion.....	34
4.3 pH-Wert und Hemmung der LPA-Signaltransduktion.....	35
4.4 Methodenkritik.....	36
4.5 Ausblick und klinischer Bezug .....	37
4.6 Schlussfolgerung .....	39
5. Zusammenfassung.....	40
6. Abbildungsverzeichnis .....	41
7. Tabellenverzeichnis.....	43
8. Literaturverzeichnis.....	44
8. Literaturverzeichnis.....	44
Lebenslauf .....	54
Lebenslauf .....	54
Danksagung .....	55

## Abkürzungsverzeichnis

Ca<sup>2+</sup>: Kalziumion

CaCl<sub>2</sub>: Kalziumchlorid

cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat

Cl<sup>-</sup>: Chloridion

DAG: Diacylglycerin

EC50: halbmaximale Effekt- Wirkungskonzentration

GDP: Guanosindiphosphat

G-Protein: Guaninnucleotid bindendes Protein

GTP: Guanosintriphosphat

IC50: halbmaximale Inhibitionskonzentration

IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat

KCl: Kaliumchlorid

LPA: Lysophosphatidsäure

M: mol/ molar

MgCl<sub>2</sub>: Magnesiumchlorid

MgSO<sub>4</sub>: Magnesiumsulfat

MΩ: Megaohm

NaCl: Natriumchlorid

NaHCO<sub>3</sub>: Natriumhydrogencarbonat

P: Phosphor/ Phosphat

PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositolbiphosphat

pKa: Säuredissoziationskonstante

PLC: Phospholipase C

QX314: experimentelles Lokalanästhetikum, dauerhaft ionisiertes Lidocainanalogon

SD: Standardabweichung

μA: Mikroampere

## 1. Einleitung

**Lokalanästhetika** wirken analgetisch und antiarrhythmisch durch Blockade spannungsabhängiger Ionenkanäle (Butterworth 1990; Strichartz 1987; Tinker 1993; Zamponi 1996). Darüber hinaus werden „alternative“ Wirkungen diskutiert, die sich klinisch u.a. als Verzögerung der Wundheilung (Chvapil 1979; Drucker 1998; Morris 1980), antiinflammatorische Aktivität (Hollmann 2000), Abschwächung bronchialer Hyperreagibilität (Groeben 1996), Neuroprotektion und Gerinnungshemmung (Chen 1998; Cooke 1977; Hollmann 2001; Modig 1983) manifestieren können. Eine Blockade des Natriumkanals allein erklärt diese Wirkungen nicht. Es werden daher Einflüsse von Lokalanästhetika auf andere Signalkaskaden diskutiert.

Einleitend sollen einige „alternative“ Wirkungen von Lokalanästhetika im Einzelnen näher beleuchtet werden.

### ***Effekte von Lokalanästhetika auf die Entzündungsreaktion:***

Einer der am besten untersuchten „alternativen“ Effekte von Lokalanästhetika betrifft ihre antiinflammatorische Wirkung. Die physiologische Entzündungsreaktion des Organismus auf eine Gewebsverletzung ist essentiell für die Wundheilung. Überschießende Reaktionen können jedoch auch Auslöser postoperativer Komplikationen sein, wie das systemische Inflammationssyndrom (SIRS), das akute Atemnotsyndrom (ARDS), oder das Multiorganversagen (MOF). Als Mediatoren dieser hyperinflammatorischen Prozesse wirken insbesondere Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8 und der Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) (Herroeder 2002). Lokalanästhetika greifen an verschiedenen Punkten in den Ablauf der Entzündungsreaktion ein. Es kommt u.a. zu einer Verminderung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die Adhäsion der Neutrophilen am Endothel wird reduziert und die Chemotaxis wird gehemmt. Die physiologische Aktivierung von Neutrophilen scheint nicht durch Lokalanästhetika gehemmt zu werden. Vielmehr wird ein selektiver, hemmender Einfluss auf das ‚Priming‘ von Neutrophilen, d.h. eine Reduzierung der Ausschüttung freier Radikale, wie  $O^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$  und HOCL beobachtet (Fischer 2001; Hollmann 2001). Die Effekte von Lokalanästhetika auf humane Neutrophile können beispielhaft als ein definitiv Natriumkanal unabhängiger Effekt aufgeführt werden, da diese Zellen keine Natriumkanäle exprimieren (Krause 1993).

### ***Einfluss von Lokalanästhetika auf Lungenschädigung und mikrovaskuläre Permeabilität***

In tierexperimentellen Studien an Kaninchen zeigten sich bakteriell-, sowie chemisch induzierte Lungenschädigungen in deutlich reduzierter Ausprägung nach intravenöser Lidocaingabe im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Behandlung mit Lokalanästhetika. Durch Lidocaingabe wurde die Superoxidanionproduktion gesenkt, die Lungencompliance verbessert und allgemein die Lungenödembildung reduziert (Mikawa 1994; Nishina 1998; Schmidt 1997; Takao 1996).

### ***Einfluss von Lokalanästhetika auf entzündliche Darmerkrankungen***

Klinische Studien zeigten, daß topisch appliziertes Lidocain- und Ropivacaingel die klinische Symptomatik der Colitis ulcerosa und auch die mukosale Integrität bei entzündlichen Darmerkrankungen verbesserten (Arlander 1996; Bjorck 2002; Bjorck 1992). Weiterhin konnte ein hemmender Einfluss auf das Wachstum humaner Adenokarzinome durch Ropivacain im in vitro Modell gezeigt werden (Martinsson 1999).

Als weiterer Einfluss von Lokalanästhetika auf den Gastrointestinaltrakt wird eine schnellere postoperative Wiederaufnahme der Darmmotilität nach Epiduralanästhesie beschrieben (Carpenter 1996; Udassin 1994; Wattwil 1989). Dieser Effekt wird zum einen dem verminderten Bedarf an Opiaten, zum anderen jedoch auch einer systemischen Resorption des epidural applizierten Lokalanästhetikums zugeschrieben (Groudine 1994). Studien mit kontinuierlichen perioperativen Lidocaingaben konnten diesen Effekt bestätigen. Die Patienten der Behandlungsgruppe mit Lidocain zeigten eine schnellere Erholung der Darmfunktion mit konsekutiv früherem Kostaufbau und kürzerem Krankenhausaufenthalt (Groudine 1998).

### ***Einfluss von Lokalanästhetika auf die Wundheilung***

Die meisten in vitro Studien berichten über negative Effekte auf die Wundheilung nach lokaler Infiltration mit Lokalanästhetika durch Reduktion der Mukopolysaccharid- und Kollagensynthese (Chvapil 1979; Morris 1980; Morris 1977). Im Gegensatz hierzu zeigten jedoch die meisten in vivo- und klinischen Studien lediglich histopathologische Veränderungen ohne Reduzierung der Zugfestigkeit der Wunden (Drucker 1998; Pettersson 1998).

### ***Lokalanästhetika und antithrombotische Aktivität***

Die Epiduralanästhesie kann die Inzidenz thrombembolischer Komplikationen senken (Hollmann 2001; Rosenfeld 1996; Tuman 1991). In vitro Studien zeigten, daß Lokalanästhetika die Thrombozytenaggregation inhibieren. (Kohrs 1999). Klinische Studien zeigten bereits 1977 eine Reduktion der Thromboseinzidenz unter kontinuierlicher Lidocainapplikation (Cooke 1977). Weitere klinische Studien zeigten eine Inzidenzminderung tiefer Beinvenenthrombosen nach Hüftoperationen, sowie eine Hemmung der operationsbedingten Hyperkoagulation durch Epiduralanästhesie. (Hollmann 2001; Modig 1983).

### ***Einfluss von Lokalanästhetika auf das Zentralnervensystem***

Ältere Studien zeigten bereits, daß durch intravenöse Gabe von Lokalanästhetika die Menge an Narkotika für die Allgemeinanästhesie reduziert werden kann (Himes 1977; Phillips 1960). Eine lokalanästhetikainduzierte Inhibition muskarinerger Rezeptoren im Zentralnervensystem wird als ein zugrunde liegender Mechanismus diskutiert (Hollmann 2000; Hollmann 2001).

### ***Neuroprotektion durch Lokalanästhetika***

Im Rattenmodell konnte durch Behandlung mit Lidocain nach einer transienten zerebralen Ischämie mit anschließender Reperfusion die Infarktgröße reduziert und ein besseres neurologisches Outcome erzielt werden (Lei 2001; Lei 2002; Lei 2004). Ein reduzierender Einfluss der Lokalanästhetika auf den apoptotischen Zelltod wird hier diskutiert. Eine klinische Studie mit herzchirurgischen Patienten zeigte einen neuroprotektiven Effekt durch perioperative Lidocaininfusionen mit nachfolgender Verbesserung der kognitiven Funktionen der Patienten (Mitchell 1999).

### ***Einfluss von Lokalanästhetika auf das Bronchialsystem***

Mehrere Studien konnten die Reduzierung bronchialer Hyperreagibilität durch intravenöse, oder inhalative Gabe von Lokalanästhetika zeigen (Caranza 1997; Groeben 1996; Jee 2003). Neben dem lokalanästhetischen Effekt wird eine darüber hinausgehende spezifische Reduzierung des histamininduzierten Bronchospasmus durch Lokalanästhetika diskutiert. (Groeben 2001).

Auf der Suche nach den genauen Wirkmechanismen dieser heterogenen Wirkungen zeigte sich, daß Lokalanästhetika den Signalübertragungsweg verschiedener an G-Protein-gekoppelter Rezeptoren blockieren, und zwar bereits in Konzentrationen, die weit unter jenen liegen, die eine Natriumkanalblockade auslösen.

Zu diesen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören u.a. der Rezeptor der Lysophosphatidsäure (LPA), der bei der Wundheilung und bei mannigfaltigen Zellinteraktionen eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Nietgen 1997), der Thromboxan A-2 Rezeptor (Honemann 1999; Nietgen 1998) und die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren M1 und M3 (Hollmann 2000; Hollmann 2001).

Zur genaueren Aufschlüsselung der Interaktion zwischen Lokalanästhetika und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren haben wir für diese Arbeit den LPA-Rezeptor als Modell gewählt, da dieser als klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor bekannt ist und auf *Xenopus* Oozyten endogen exprimiert wird. Er dient uns somit als Modell für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit bekannter intrazellulärer Signalkaskade, der für elektrophysiologische Messungen in Voltage-Clamp Technik sehr gut geeignet ist. LPA ist ein Phospholipidmediator, welcher aus aktivierten Thrombozyten und Fibroblasten freigesetzt wird (Moolenaar 1994; Moolenaar 1992). Unter anderem wirkt LPA mitogen auf Fibroblasten (van Corven 1989; van Corven 1992), und greift über Induktion der Thrombozytenaggregation (Simon 1982) in die Wundheilung ein. Lokalanästhetika können die durch LPA ausgelöste Signalkaskade hemmen, was vorausgegangene Studien unserer Arbeitsgruppe bereits zeigten (Nietgen 1997; Sullivan 1999). Am wahrscheinlichsten wurde eine direkte Interaktion zwischen dem Lokalanästhetikum und dem Rezeptorprotein selbst, oder mit seinem intrazellulärem G-Protein angenommen (Hollmann 2001; Sullivan 1999). Die genaue Interaktion mit dem G-Protein gekoppeltem Rezeptor ist jedoch noch nicht entschlüsselt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob - und wenn ja an welcher Stelle - Lokalanästhetika an den Rezeptor oder das G-Protein binden. Die Rezeptoraktivität wurde über die Änderung des transmembranären Chloridionen-Stromflusses als Folge der Aktivierung  $Ca^{2+}$ -abhängiger Chloridkanäle quantifiziert. Die Untersuchungen wurden *in vitro* an *Xenopus* Oozyten durchgeführt. Dieses Verfahren war in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Durieux 1993; Durieux 1992) validiert worden.



Drei Fragen wurden untersucht:

- (1) Handelt es sich um eine spezifische Bindung des Lokalanästhetikums?  
Der Nachweis einer Stereoselektivität macht eine spezifische Interaktion zwischen Ligand einerseits und Rezeptor (Protein) andererseits wahrscheinlich (Durieux 1999). Wir haben deshalb im ersten Experiment untersucht, ob Enantiomere des Ropivacain unterschiedlich auf die LPA-Rezeptoren oder daran gekoppeltes G-Protein wirken.
- (2) Konkurrieren Lokalanästhetikum und LPA um dieselbe Bindungsstelle?  
Haben mehrere Liganden dieselbe Bindungsstelle an einem Rezeptor, können sie sich gegenseitig verdrängen und so in ihrer Wirkung beeinflussen. Wir haben deshalb im zweiten Setup untersucht, ob hohe Dosen von LPA die Wirkung von Ropivacain auf die LPA-Rezeptoren aufheben.
- (3) Binden Lokalanästhetika intra- oder extrazellulär?  
Liganden können sowohl extra- als auch intrazellulär an ihren Rezeptor binden. Der Ionisierungsgrad der Lokalanästhetika ist pH-abhängig und beeinflusst die Fähigkeit, die Zellmembran zu durchdringen (nicht ionisierte Moleküle überwinden in der Regel leichter die Membran). Wäre die Wirkung der Lokalanästhetika eindeutig pH-abhängig, ließe dies Schlüsse über den Bindungsort zu. Wir haben deshalb im dritten Setup untersucht, ob der pH-Wert (und damit der Ionisierungsgrad von Lidocain) die Wirkung auf die LPA-Rezeptoren beeinflusst.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Oozytengewinnung**

Alle Untersuchungen wurden an Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches der Gattung *Xenopus laevis* durchgeführt. Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden am Department of Anesthesiology der University of Virginia, USA durchgeführt. Das experimentelle Protokoll unterlag der Genehmigung der zuständigen Tierschutz- und Ethikkommission der University of Virginia, USA.

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche von Xenopus I (Ann Arbor, MI USA) wurden in etablierten Froschkolonien gehalten und zweimal wöchentlich mit handelsüblichem Froschfutter ernährt. Zur Gewinnung der Oozyten wurden die Frösche höchstens einmal in zwei Monaten operiert, wobei die Gesamtzahl von maximal sechs Operationen pro Frosch nicht überschritten wurde.

Zur operativen Vorbereitung wurde ein einzelner Frosch durch ein Bad in einer Lösung von 0,2%igem 3-Amino-benzoe-methyl-ester anästhesiert. Die Frösche wurden intraoperativ auf Eis gelagert, um den Stoffwechsel herabzusetzen und den Blutverlust zu minimieren. Der operative Zugang erfolgte im unteren abdominellen Quadranten. Aus dem Ovarialsack wurde ein Lappen mit ungefähr 500 Oozyten entnommen und in kalziumfreier OR2-Lösung (Zusammensetzung in mM: NaCl 82,5; KCl 2,0; MgCl<sub>2</sub> 1,0; HEPES 5,0; pH 7,5) aufbewahrt.

Nach schichtweisem Wundverschluss wurde der Frosch über Nacht zur Erholung in einem separatem Tank gehalten. Die Defollikulierung der Oozyten erfolgte in einem zweistündigen Vortexer-Schüttelbad in 0,1%iger Kollagenaselösung (Kollagenase Typ Ia). Anschließend wurden die Oozyten in OR2-Lösung gewaschen, um die Kollagenase und mögliche Gewebereste zu entfernen. Schließlich wurden die Oozyten in modifizierter Barth'scher Lösung (Zusammensetzung in mM: NaCl 88; KCl 1; NaHCO<sub>3</sub> 2,4; CaCl<sub>2</sub> 0,41; MgSO<sub>4</sub> 0,82, Gentamycin 0,1, HEPES 15; pH 7,6) aufbewahrt und bei 16° C inkubiert.

## 2.2. Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden verwendet:

### ***Lysophosphatidsäure (LPA):***

Lysophosphatidsäure (LPA) ist ein Lysophospholipid-Mediator, der in Albumin-gebundener Form in einer Konzentration von bis zu 10µM im menschlichen Serum zu finden ist. Es wird von aktivierten Thrombozyten, Leukozyten oder anderen Zellen gebildet und freigesetzt. Die mannigfaltigen biologischen Funktionen dieses Phospholipidmediators sind in der folgenden Tabelle dargestellt und im Text näher erläutert.

Regulation der Zellmorphologie	Regulation des Zellwachstums
Stimulation der Chemotaxis	Stimulation/Hemmung der Proliferation
Förderung der Adhäsion	Förderung des Überlebens
Induktion von Kontraktion/Aggregation	Hemmung der Apoptose
Induktion der Sekretion	Änderung der Zelldifferenzierung

**Tabelle 1: Zelluläre Wirkungen der Lysophospholipide**

LPA ist ein Wachstumsfaktor, der die Mitoserate einer Vielzahl von Zelltypen wie zum Beispiel glatter Gefäßmuskelzellen steigert (Gennero 1999; Guo 1998; Tokumura 1994) und ist einer der wichtigsten im Serum vorhandenen Wachstumsfaktoren für Fibroblasten (Jalink 1994; Michell 1994). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind die Produktion und Sekretion von Peptidwachstumsfaktoren und die Expression von “early genes“ durch Aktivierung von “serum response elements“. LPA schützt Endothelzellen (Hisano 1999), T-Lymphozyten (Cuvillier 1998; Goetzl 1999) und Makrophagen (Cuvillier 1996; Koh 1998) vor Apoptose.

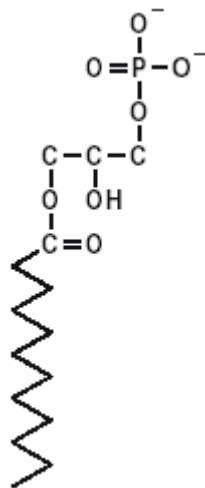
### **Lysophospholipid-Rezeptoren:**

In den letzten Jahren wurde eine Familie von Rezeptoren für Lysophospholipide beschrieben. Diese wird als “ endothelial differentiation gene“ -Familie (Edg-Familie) bezeichnet (Goetzl 1998). Bisher wurden insgesamt 8 Edg-Rezeptoren beschrieben, die eine gewebsspezifische Verteilung zeigen. Edg-2, -4 und -7 sind spezifische Rezeptoren für LPA (Erickson 1998; Goetzl 1999; Im 2000). Darüber hinaus ist zu erwähnen, daß die Aktivierung von Zellen durch dasselbe Lysophospholipid über Stimulation unterschiedlicher Edg-Rezeptoren teilweise zu gegensätzlichen Effekten führt. So hat

die LPA-Aktivierung von Edg-2 und Edg-4-Rezeptoren in Jurkat T-Zellen gegensätzliche Wirkungen auf die Migration der Jurkat Zellen (Zheng 2001). Guo et al gelang es einen hochaffinen LPA-Rezeptor aus *Xenopus* Oozyten zu dekodieren, genannt xPSP24, der in diesen Zellen Chloridströme über Ca<sup>2+</sup>-abhängige Ionenkanäle auslöst (Guo 1996).

### **LPA-Testsubstanz**

1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) verdünnt in einer 1%-iger boviner Serumalbumin-Lösung (BSA; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA).



**Abbildung 1: Strukturformel von LPA**

### **Lokalanästhetika:**

**Lidocain:** SIGMA (St. Louis, MO, USA), nach Bedarf Verdünnung mit Tyrode's Lösung.

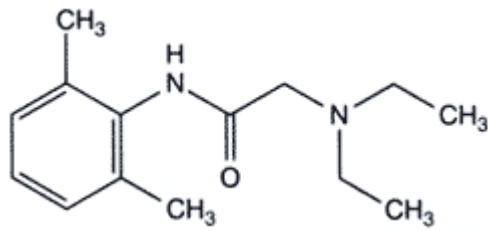


Abbildung 2: Strukturformel von Lidocain

**Ropivacain:** (Naropin<sup>®</sup>, SIGMA, St. Louis, MO, USA), nach Bedarf Verdünnung mit Tyrode's Lösung.

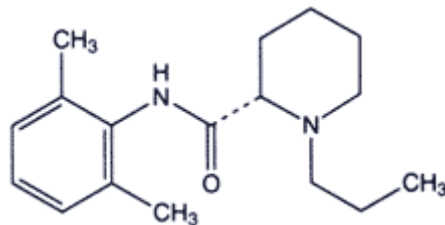
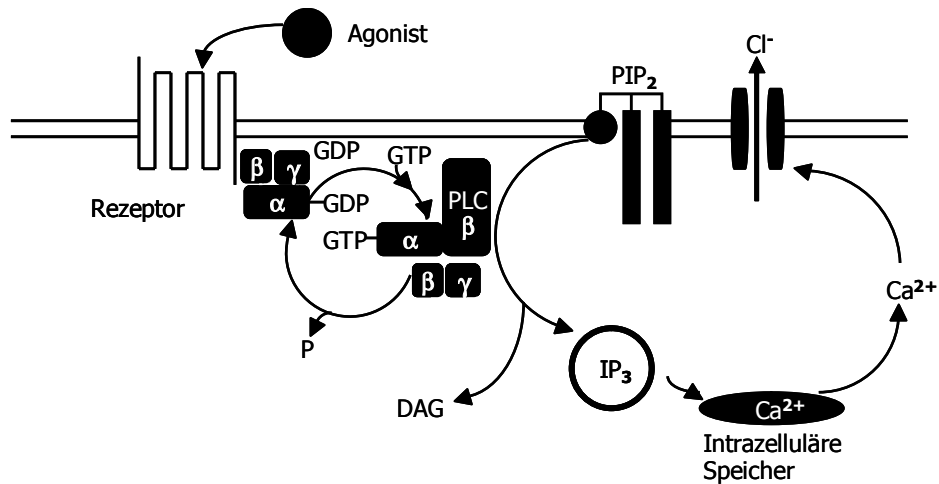


Abbildung 3: Strukturformel von Ropivacain

### 2.3. Read-out der LPA-Rezeptoraktivität

Der LPA-Rezeptor, welcher endogen in *Xenopus* Oozyten exprimiert wird, besteht aus sieben transmembranären Domänen mit drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen. Das N-terminale Segment liegt extrazellulär, das C-terminale intrazellulär. Das G-Protein besteht aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) und bindet intrazellulär an der dritten Schleife und am C-terminalen Ende am LPA-Rezeptor (Durieux 1993; Moolenaar 1995).

LPA bindet extrazellulär an den LPA-Rezeptor (Durieux 1992; Tigyi 1992). Diese Interaktion führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Dadurch wird die intrazelluläre Bindung heterotrimerer G-Proteine (Moolenaar 1997) und in der Folge die Dissoziation der  $\alpha$ -Kette des G-Proteins vom  $\beta\gamma$ -Komplex ermöglicht und hierdurch Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) umgewandelt (siehe Abbildung 1).



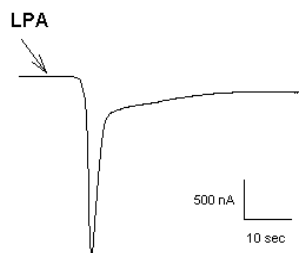
**Abbildung 4: Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**, schematische Darstellung des Signalübertragungsweges eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors nach Stimulation durch den entsprechenden Agonisten.

Der aus der  $\alpha$ -Untereinheit und GTP bestehende Komplex aktiviert die Phospholipase C- $\beta 1$ , der  $\beta\gamma$ -Komplex die Phospholipase C-  $\beta 2$ , was zu einer Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) aus membranständigen Phosphatidylinositolbisphosphaten (PIP<sub>2</sub>) führt. IP<sub>3</sub> bindet an einen Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum und setzt so durch Öffnung eines Ca<sup>2+</sup>-Kanals Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern frei. Diacylglycerol (DAG) aktiviert die Proteinkinase C, über die eine hemmende Rückkoppelung über Phosphorylierung des Rezeptors abläuft (Moolenaar 1997).

Die zyttoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steigt IP<sub>3</sub>-vermittelt an und induziert über Ca<sup>2+</sup>-abhängige Cl<sup>-</sup>-Kanäle einen Cl<sup>-</sup>-Auswärtsstrom (Moolenaar 1997; Tigyi 1992). Dieser Ionenstrom ist direkt proportional zur Aktivierung des Rezeptors. Der durch Voltage-Clamp Technik gemessene Cl<sup>-</sup>-Strom dient als indirekter Nachweis der Rezeptoraktivierung.

Neben dieser beschriebenen Signalkaskade sind weitere bekannt, welche über verschiedene G-Proteine-Untereinheiten aktiviert werden (An 1998; Fischer 1998;

Hooks 1998). Die oben beschriebene Kaskade mit Aktivierung der Phospholipase C wird durch die  $G_{\alpha q}$ -Untereinheit des G-Proteins vermittelt (An 1998). Davon unabhängige Signalkaskaden werden über die G-Protein-Untereinheiten  $G_i$  und  $G_{\alpha_{12/13}}$  aktiviert (Moolenaar 1997). Die Untereinheit  $G_i$  aktiviert die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) und reduziert die intrazelluläre Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP).  $G_{\alpha_{12/13}}$  aktiviert die kleine GTPase Rho worüber u.a. zytoskelettale Umbauvorgänge gesteuert werden (An 1997; Hill 1995; Ridley 1994).



**Abbildung 5: Beispiel eines typischen  $Cl^-$ -Membranstroms (digitalisiert mit OoClamp Software) nach LPA-Stimulation in *Xenopus* Oozyten. Aufgezeichnet ist die Veränderung des Membranstroms in nA (y-Achse) im Verhältnis zur Zeit in sec (x-Achse).**

### 2.3. Voltage-Clamp Technik

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt. Die defollikulierte Eizelle wurde in eine Durchflußkammer von 0,5 ml Volumen gegeben, die mit Tyrode's Lösung (Zusammensetzung in mM: NaCl 150; KCl 5;  $CaCl_2$  2;  $MgSO_4$  1; Dextrose 10; HEPES 10; pH 7,4) superfundiert wurde (Flussgeschwindigkeit 3 ml/min). An einer Seite des Bades befand sich ein Einlaß für die Versuchslösung, welche mit 5 ml/min die Versuchszelle umspülte und an der gegenüberliegenden Seite aufgesaugt wurde.

Nach  $4,8 \pm 0,4$  Sekunden wurde ein vollständiger Kontakt zwischen Oozyten und Agonist erreicht.

Die zur Voltage-Clamp Messung erforderlichen Mikroelektroden wurden in unserem Labor hergestellt. Hierzu wurden Glaskapillaren (Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) mittels eines Mikropipettenautomaten (Micropipette Puller P-30, Sutter Instrument, Novato, CA, USA) gezogen. Die Elektrodenspitzen wurden auf einen Durchmesser von 10  $\mu m$  zugeschnitten und mit 3 M KCl-Lösung gefüllt. Der

Widerstand der Elektroden betrug gewöhnlich 1-3 M $\Omega$ . Über Silberdrähte wurden die Elektroden mit den jeweiligen Meßinstrumenten verbunden. Zwei Mikroelektroden (Spannungs- und Stromelektrode) wurden an einen *voltage-clamp*-Verstärker (OC725A; Warner Corporation, New Haven, CT, USA) angeschlossen und unter Auflichtmikroskopie in die Oozyte eingestochen.

Die Aufzeichnung und Auswertung erfolgte mittels eines IBM-kompatiblen Computers mit entsprechender Hard- und Software (DAS-8A/D Umwandler, Keithley-Metrabyte, Taunton, MA und OoClamp Software (Durieux 1993).

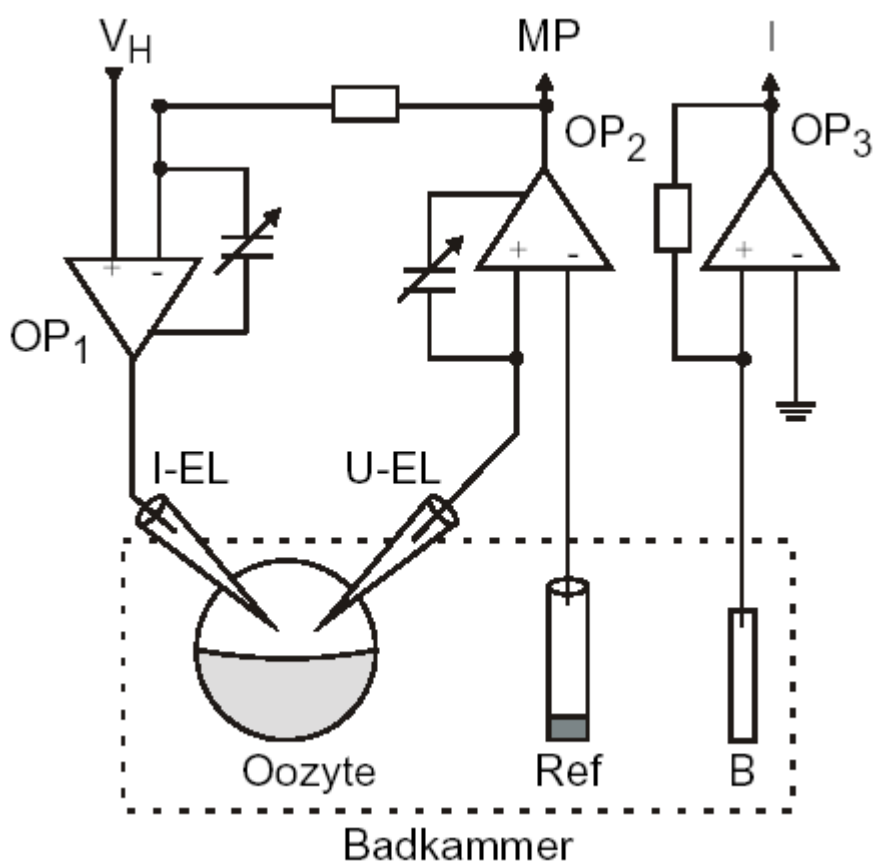


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Blockschaltbildes zur Registrierung transmembranöser Ionenströme. I-EL - Stromelektrode. U-EL - Spannungselektrode. B - virtuelle Badelektrode. Ref - Referenzelektrode. OP1 - Operationsverstärker zur Einstellung des Haltpotentials (V). OP2 - Operationsverstärker zur Messung des Membranpotentials (MP). OP3 - Operationsverstärker zur Strommessung (I).

Die Messung transmembranöser Ionenströme wurde mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Technik realisiert. Die Versuchsanordnung ermöglicht bei konstant



gehaltenem Haltepotential die Registrierung von Ionenströmen über der Plasmamembran der Oozyte.

Abbildung 6 verdeutlicht den Versuchsaufbau der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Methode. Der Versuchsaufbau besteht aus zwei Badelektroden und zwei Injektionselektroden. Eine der beiden Injektionselektroden diente als Spannungselektrode (U-EL), die andere als Stromelektrode (I-EL). Das Membranpotential (MP) der jeweiligen Eizelle wurde zunächst als Spannung zwischen der extrazellulären Badelektrode als Referenzelektrode (Ref) und der intrazellulären Spannungselektrode (U-EL) bestimmt. Die zwischen beiden Elektroden abgegriffene Spannung wurde durch den Operationsverstärker OP2 verstärkt.

Zur Einstellung des Membranpotentials auf ein bestimmtes Haltepotential wurde über den Operationsverstärker OP1 und die Stromelektrode I-EL ein Strom in die Zelle injiziert. Als Haltepotential wurden für die Messungen  $-70$  mV gewählt. Eine Rückkopplungsschaltung "berechnete" den Stromfluß über die Elektrode I-EL, der notwendig war, um die Zelle auf dem vorgebenen Haltepotential von  $-70$  mV zu halten. Der injizierte Strom floß über die Badelektrode B ab und wurde durch den Operationsverstärker OP3 in ein Spannungssignal überführt und verstärkt. Rohdaten wurden im  $0,1$ kHz Bereich gefiltert (LPF-100A, Warner Corporation, New Haven, CT, USA) und mit einer Abtastrate von  $125$ Hz digitalisiert.

Zellen, die zur Aufrechterhaltung des vorgegebenen Membranpotentials in der Äquilibrierungszeit einen Ruhestrom von mehr als  $0,5\mu\text{A}$  erforderten, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

## **2.5. Experimenteller Aufbau**

### **2.5.1. LPA-Wirkung unter Kontrollbedingungen**

In allen Versuchen wurden die Messdaten nach der gleichen Versuchsanordnung erhoben. Gemessen wurde die Veränderung des Membranpotentials nach LPA-Applikation auf die Oozyten. Die Oozyten wurden bei stabilem Membranpotential von  $-70\text{mV}$  mit LPA als Rezeptoragonist stimuliert. Zur Bestimmung des Konzentrations-Wirkungs-Verhältnisses wurden die Oozyten nach Voltage-Clamping für jeweils zehn Sekunden mit ansteigenden Konzentrationen von LPA in der Durchflußkammer umspült. Die Aufzeichnung des Membranstroms begann fünf Sekunden vor Applikation des LPA und endete nach 60 Sekunden. Nach Darstellung der Messdaten in Form einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurde die halbmaximale Wirkungskonzentration (EC50) mittels der Hill-Gleichung errechnet. Die so erhobenen Messdaten von LPA-Reizantworten ohne Lokalanästhetikaeinwirkung dienten in sämtlichen Versuchen als Kontrollen.

### **2.5.2 . LPA-Wirkung nach Inkubation mit Lokalanästhetika**

#### **2.5.2.1. Untersuchungen zur Stereoselektivität der Wirkung des Lokalanästhetikums**

Für die Untersuchungen zur Stereoselektivität wählten wir Ropivacain als Testsubstanz, ein Lokalanästhetikum, das in Form der reinen Enantiomere S(-) und R(+) erhältlich ist. Ropivacain wird im klinischen Alltag häufig verwendet und zwar - im Gegensatz zu den meisten anderen Lokalanästhetika - nicht als Razemat, sondern als reines S(-)-Enantiomer (Abbildung 3).

Gruppen von Oozyten wurden für jeweils 10 Minuten in ansteigenden Konzentrationen mit den Ropivacain-Stereoisomeren inkubiert und mit der halbmaximalen Wirkungs-dosis (EC50) von LPA stimuliert. Anschließend wurden die halbmaximalen Inhibitions-konzentrationen (IC50) für S(-)- und R(+)-Ropivacain bestimmt.

### **2.5.2.2. Untersuchungen zum Antagonismus zwischen Lokalanästhetikum und LPA**

Für die Untersuchungen, ob LPA und Lokalanästhetika an derselben Stelle am LPA-Rezeptor binden, wurde versucht, S(-)-Ropivacain durch hohe Dosen von LPA zu verdrängen. Zu diesem Zweck wurden Oozyten nach jeweils zehnmütiger Inkubation in einer S(-)-Ropivacain-Lösung mit der IC<sub>50</sub>, in einer Versuchsreihe mit ansteigenden LPA Konzentrationen stimuliert. Die so generierte Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurde mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Als Kontrolle dienten Messungen mit identischem Versuchsaufbau ohne vorherige Inkubation der Oozyten mit Ropivacain.

### **2.5.2.3. Untersuchungen zum Einfluß des Ionisationsgrades auf die Wirkung des Lokalanästhetikums**

Liganden können sowohl extra- als auch intrazellulär an ihren Rezeptor binden. Der pH-Wert ist entscheidend für den Ionisierungsgrad der Lokalanästhetika und beeinflusst die Fähigkeit, die Zellmembran zu durchdringen. Bei niedrigen pH-Werten liegt das Lokalanästhetikum-Molekül vermehrt ionisiert vor. Es ist bekannt, daß nicht-ionisierte Moleküle leichter die Zellmembran durchdringen. Zur Klärung, ob Lokalanästhetika intra- oder extrazellulär am LPA-Rezeptor binden, wurde die Abhängigkeit des Ionisierungsgrads des Lidocains vom pH-Wert genutzt.

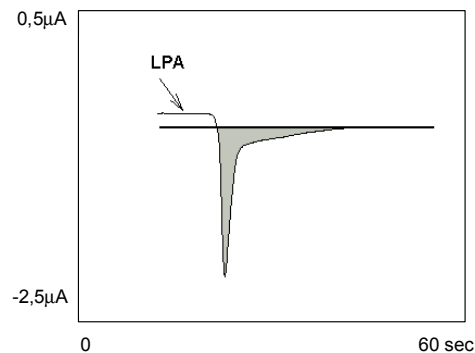
Oozyten wurden in einer Lidocainlösung mit aufsteigenden pH-Werten (5, 6, 7, 8, 9) für je 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Oozyten durch die halbmaximale Wirkungskonzentration (EC<sub>50</sub>) von LPA. Die Hemmwirkung des Lidocains weist einen sigmoidalen Verlauf auf. Der steilste Abschnitt der Kurve findet sich bei einer Konzentration von 5,9 mM. Für unsere Versuche zum Einfluß des Ionisationsgrades auf die Wirkung des Lidocains wählten wir 10 mM, einen etwas höheren aber noch im aufsteigenden Bereich der Konzentrations-Wirkungskurve gelegenen Wert. Diese Wahl sollte gewährleisten, daß einerseits eine ausreichende Blockierung des Rezeptors zu erwarten ist und andererseits mögliche Einflüsse des pH-Wertes auf den Blockierungsgrad erfasst werden können.

Um auszuschließen, dass die Wirkung von LPA durch den pH-Wert beeinflusst wird, wurden Kontrollantworten mit der EC50 von LPA bei pH 5, pH 7,4 und pH 9 erhoben.

## **2.6 Datenanalyse**

### **Besonderheiten der OoClamp-Software**

Da auf Oozyten endogen kalziumabhängige Chloridkanäle exprimiert werden, erzeugen alle Vorgänge, die Einfluß auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration haben, zwangsläufig eine Änderung des Chloridstroms über der Membran. Diese Modulationen können mit dem oben beschriebenen Setup elektrophysiologisch erfaßt werden. Dabei sind besondere Anforderungen an die Analysesoftware zu stellen. Zum einen haben Oozyten im Vergleich zu anderen Zellen ein verhältnismäßig großes Volumen und damit auch eine größere Membrankapazität – das Programm muß also mit relativ großen Strömen operieren können - zum anderen erstrecken sich rezeptorgesteuerte Potentialänderungen oft über Minuten, im Gegensatz zu spannungs- und ligandengesteuerten Kanälen, die im Millisekunden- bis Sekundenbereich operieren. Die Ooclamp-Software (Durieux 1993) ist für solche Anforderungen geschrieben worden. Sie bietet zudem noch den Vorteil, das eingehende Signal mit 125 Hz aufzuzeichnen und sofort graphisch darzustellen - so werden Störeinflüsse von 50- 60 Hz minimiert. Ein separates Oszilloskop war nicht nötig. Zellen, die das Ruhemembranpotential nicht halten konnten, wurden sofort erkannt und verworfen (Zeitersparnis). Die Software ermöglichte ferner auf unkomplizierte Weise die Integration der Fläche unter der Kurve als Maß für die Aktivierung der Rezeptoren.. Das Ergebnis einer solchen Messung ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Signalantwort eines durch LPA induzierten Chloridstromes in Oozyten (Bildschirmausgabe von OoClamp). Die Ordinate gibt die Stromstärke in  $\mu\text{A}$ , die Abszisse die Zeit in Sekunden wieder. Der maximale Einwärtsstrom beträgt hier ca.  $1,5 \mu\text{A}$ . Integriert wurde die Fläche unterhalb der Horizontalen zwischen den Pfeilen. Die in der Zeit zwischen  $9,4$  und  $35,4 \text{ sec}$  bewegte Ladung über die Zellmembran betrug  $4,3 \mu\text{C}$ (Area).**

Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD). Für jeden Datenpunkt wurden die Spitzenströme in  $\mu\text{A}$ , bzw. die integrierten Ladungstransfers in  $\mu\text{C}$  (Fläche unter der Kurve) von mindestens zwölf Oozyten gemittelt. Erfasst wurden die Daten mit dem Programm SigmaPlot3.0 (Systat Software Inc). Die Mittelwerte wurden mit dem t-Test verglichen, der Unterschied wurde als signifikant angesehen, wenn ein  $p < 0,05$  (t-test) erreicht wurde. Alle statistischen Analysen wurden mittels SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt.

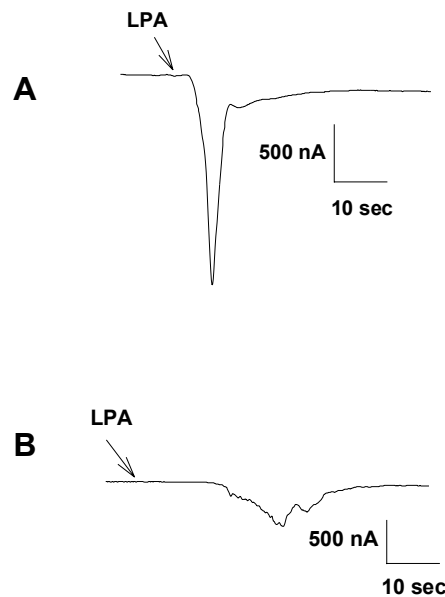
Konzentrations-Wirkungs-Verhältnisse wurden nach folgender Gleichung (modifizierte Hill-Gleichung) berechnet (Weiss 1997):

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

wobei  $y_{\min}$  das Minimum und  $y_{\max}$  das Maximum der erhaltenen Antworten,  $n$  der Hill-Koeffizient und  $x_{50}$  die halbmaximale Effektkonzentration des Agonisten (EC50) oder die halbmaximale Inhibitionskonzentration des Antagonisten (IC50) ist.

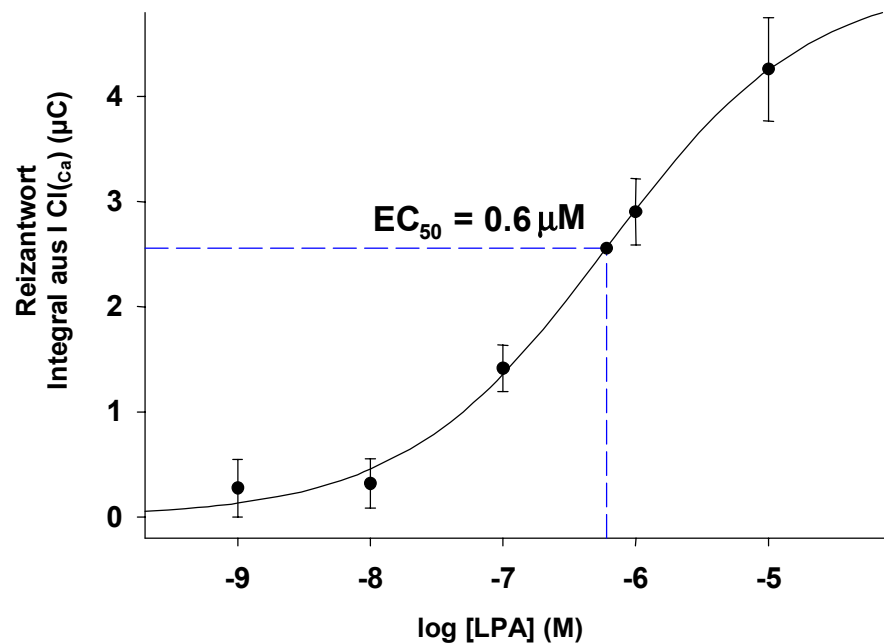
### 3. Ergebnisse

Oozyten antworteten auf Stimulation mit LPA mit einem kurzdauernden Chloridstrom  $I_{Cl(Ca)}$ . Wie in Abschnitt 2.1. beschrieben, entsteht dieser Strom durch Öffnung eines  $Cl^-$ -Kanals (Fernhout 1992). Die Öffnung des  $Cl^-$ -Kanals ist die Endstrecke der Rezeptor- und G-Protein-abhängigen Signalkaskade, die durch Bindung von LPA an den Rezeptor angestoßen wird.



**Abbildung 8: A: Membranstrom nach LPA-Stimulation in Abhängigkeit von der Zeit; B: gehemmte LPA-Reizantwort nach Inkubation mit Lokalanästhetika**

Die Stärke des Stroms ist abhängig von der Menge des bindenden LPA. Der maximale Ladungstransfer pro Zeiteinheit ergab  $4,3 \pm 0,5 \mu C$  und wurde bei einer LPA-Konzentration von  $10 \mu M$  erreicht. Aus der Konzentrations-Wirkungskurve wurde mittels Hill-Gleichung die halbmaximale Wirkungskonzentration ( $EC_{50}$ ) von  $0,6 \pm 3,3 \times 10^{-6} M$  berechnet (Hill-Koeffizient  $0,57 \pm 0,08$ ) (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungskurve von LPA (Kontrollbedingungen).** Oozyten wurden mit steigenden Konzentrationen von LPA (x-Achse) stimuliert und der Ladungstransfer durch den Cl<sup>-</sup>-Strom (y-Achse) gemessen. Die Reizantwortgröße wurde integriert als Veränderung des Stromflusses über der Zeit in µC angegeben. Die halbmaximale Reizkonzentration (EC<sub>50</sub> von 0,6 µM) ist eingezeichnet.

### 3.1. Stereoselektive Hemmung der LPA-Signaltransduktion durch Ropivacain

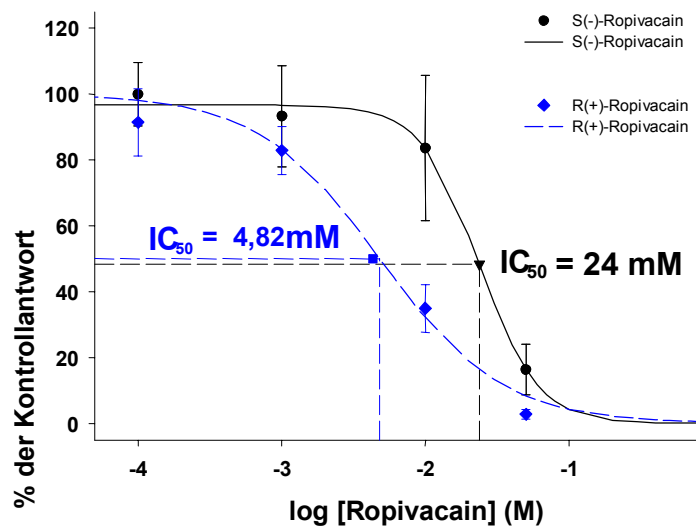
Um zu testen, ob Lokalanästhetika eine spezifische Bindung mit dem LPA-Rezeptor eingehen, haben wir uns zu Nutze gemacht, dass Ropivacain in seinen einzelnen Enantiomeren erhältlich ist. Sollten die S(-)- und R(+)-Enantiomere eine unterschiedliche Hemmung des Reizstromes erzeugen, würde dies für die Spezifität der Bindung am Rezeptor oder an seinem G-Protein sprechen.

Die Oozyten wurden in einzelnen Gruppen mit aufsteigenden Konzentrationen von Ropivacain-Stereoisomeren inkubiert und anschließend mit der EC<sub>50</sub> von LPA (0,6µM) stimuliert. Beide Isomere hemmten konzentrationsabhängig den LPA-Rezeptor (Abbildung 10), wobei sich ein signifikanter Unterschied der halbmaximalen Hemmkonzentration zeigte. Die IC<sub>50</sub> für S(-)-Ropivacain (23,8±0,3 mM) war 5-fach größer als die des R(+)-Ropivacain (4,8±0,2mM). Der Unterschied der IC<sub>50</sub> zwischen S(-)- und R(+)- Ropivacain war signifikant (p=0,001, t-test). Die Mittelwerte (±SD) der

Reizantwortgrößen für eine Konzentration des Ropivacain-Isomers wurden jeweils in Prozent zur Kontrolle normalisiert.

Ropivacain-Stereoisomer	IC <sub>50</sub> auf LPA Signalantwort
S(-)- Ropivacain	23,8±0,3 mM
R(+)- Ropivacain	4,8±0,2mM

Tabelle 2: IC<sub>50</sub> von S(-)-Ropivacain und R(+)-Ropivacain auf LPA



**Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Hemmung durch die Stereoisomere S(-) und R(+).** Oozyten wurden mit ansteigenden Konzentrationen von S(-)- und R(+)-Isomeren inkubiert und anschließend mit der EC<sub>50</sub> von LPA stimuliert. Auf der x-Achse sind die Messdaten in Prozent zur Kontrolle angegeben. Die y-Achse zeigt die Konzentrationen von den Ropivacain-Stereoisomeren.

### 3.2. Nicht-kompetitive Hemmung der LPA-Signaltransduktion durch S(-)-Ropivacain



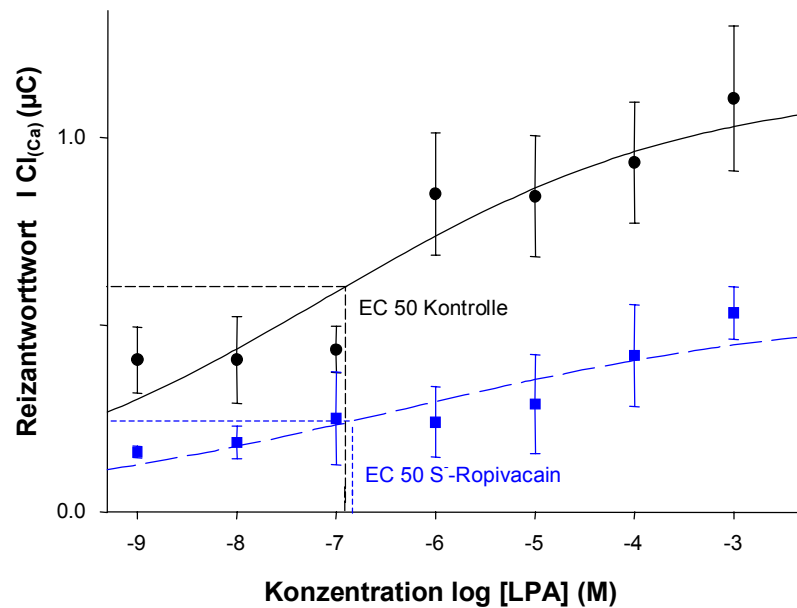
Um zu testen, ob Lokalanästhetika an dieselbe Stelle des LPA-Rezeptors binden wie LPA, haben wir versucht, Ropivacain durch Zugabe von LPA in steigender Konzentration vom Rezeptor zu verdrängen. Im Falle eines rein kompetitiven Antagonismus mit identischem Bindungsort müssten hohe Dosen von LPA die hemmende Wirkung von S(-)-Ropivacain aufheben.

Dies war nicht der Fall: die maximale Reizantwort von S(-)-Ropivacain-gehemmten Oozyten war auch unter Höchstdosen von LPA (1 mM) signifikant niedriger als unter Kontrollbedingungen (nicht gehemmte Oozyten, Abbildung 11).

Die maximale Reizantwort lag bei rund 50% der Kontrollantwort ( $0,6 \pm 0,03 \mu\text{A}$  versus  $1,1 \pm 0,1 \mu\text{A}$ ,  $p < 0,001$ ) bei praktisch identischer  $EC_{50}$  ( $1,7 \pm 0,9 \times 10^{-7} \text{ M}$  versus  $1,6 \pm 0,2 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $p = 0,744$ ).

	EC 50 LPA ( $p = 0,744$ )	max. Reizantwort ( $p < 0,001$ )
Kontrolle	$1,6 \pm 0,2 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1,1 \pm 0,1 \mu\text{A}$
Hemmung mit Ropivacain	$1,7 \pm 0,9 \times 10^{-7} \text{ M}$	$0,6 \pm 0,03 \mu\text{A}$

**Tabelle 3: EC 50 und maximale Reizantwort von LPA mit und ohne Hemmung durch Ropivacain**

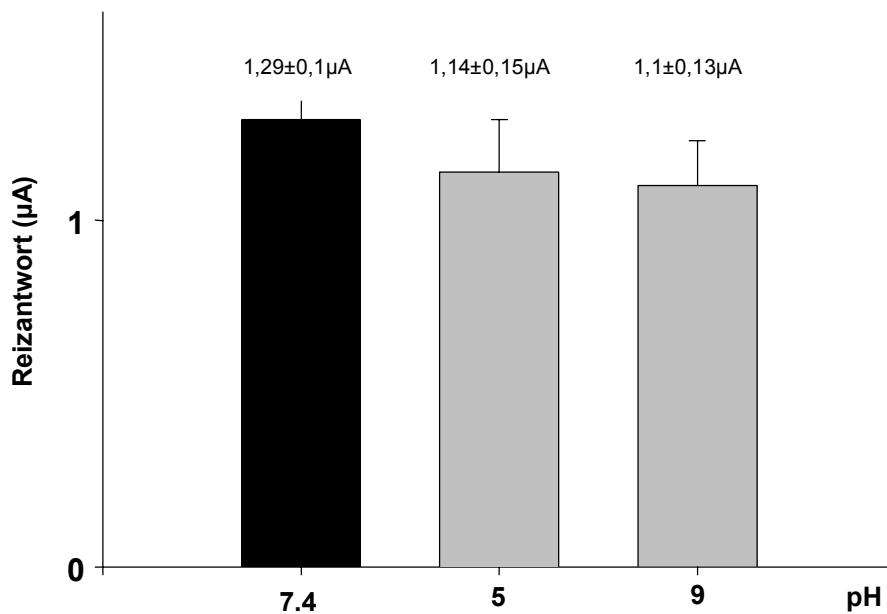


**Abbildung 11: Nicht-kompetitive Wirkung des S(-)-Ropivacains.** S(-)-Ropivacain-inkubierte (quadratische Punkte und gestrichelte Linie) oder nicht inkubierte (schwarze Punkte und durchgehende Linie) Oozyten wurden steigenden Konzentrationen von LPA (x-Achse) ausgesetzt und der Ladungstransfer durch den Cl<sup>-</sup>-Strom (y-Achse) gemessen. Die halbmaximalen Reizkonzentrationen (EC<sub>50</sub>) sind eingezeichnet.

### 3.3. Hemmung der LPA-Rezeptoraktivität durch Lidocain in Abhängigkeit vom Ionisierungsgrad

#### 3.3.1. Einfluß des pH-Wertes auf die LPA-Kontrollantwort

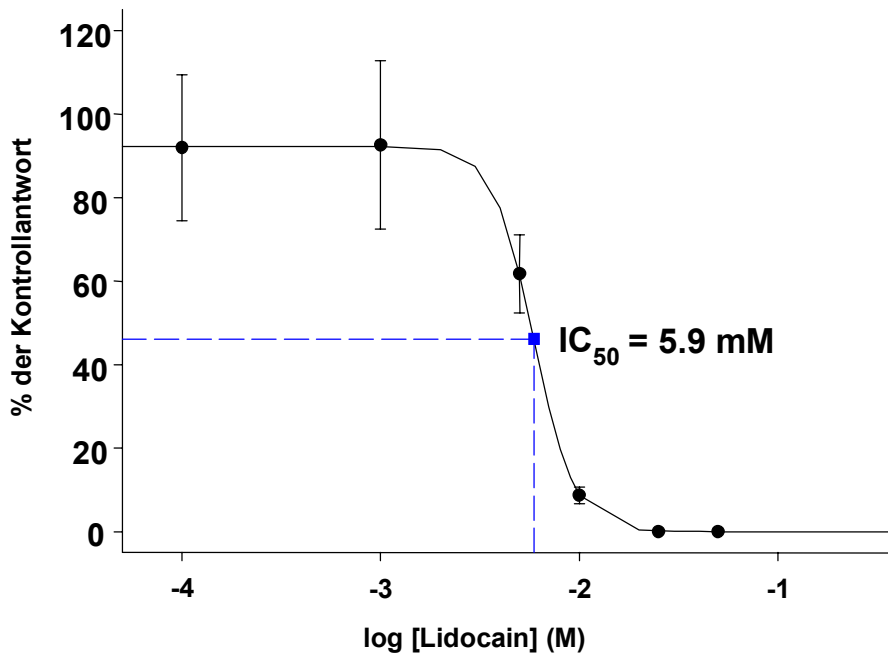
Um eine Aussage über den Einfluß des pH-Wertes auf die Wirkung von Lokalanästhetika auf LPA-Rezeptoren treffen zu können, wurde zunächst untersucht, ob die Signaltransduktion von LPA unter Kontrollbedingungen durch den pH-Wert verändert wird. Zu diesem Zweck wurden die Reizantworten nach Stimulation mit LPA (EC<sub>50</sub>) bei pH 5, pH 7,4 und pH 9 gemessen. Wie in Abbildung 12 zu sehen, wird die LPA-Signalübertragung durch verschiedene pH-Werte nicht signifikant beeinflusst.



**Abbildung 12: Reizantworten bei pH 5, pH 7,4 und pH 9.** Oozyten wurden bei den angegebenen pH-Werten (x-Achse) mit der EC50 von LPA stimuliert und der der Mittelwert des  $\text{Cl}^-$ -Stromes aus 12 Oozyten als Balkendiagramm in  $\mu\text{A}$  dargestellt (y-Achse)

### 3.3.2 Einfluß des Ionisierungsgrades von Lidocain auf seine Hemmwirkung am LPA-Rezeptor

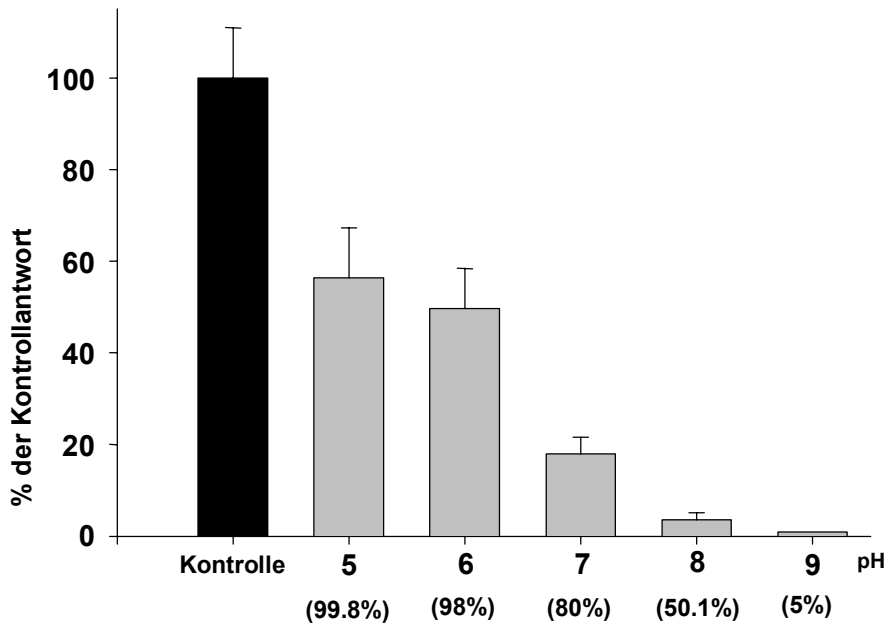
Liganden können sowohl extra- als auch intrazellulär an den Rezeptor binden. Der Ionisierungsgrad der Lokalanästhetika ist pH-abhängig und beeinflusst die Fähigkeit, die Zellmembran zu durchdringen (nicht ionisierte Moleküle überwinden in der Regel leichter die Membran). Wäre die Bindung von Lokalanästhetika an den LPA-Rezeptor eindeutig pH-abhängig, ließe dies Schlüsse auf die Lokalisation der Interaktion mit dem Rezeptor zu. Wir haben deshalb untersucht, ob der pH-Wert (und damit der Ionisierungsgrad von Lidocain) die Wirkung auf die LPA-Rezeptoren beeinflusst. Dieser Versuch wurde mit Lidocain als Test-Lokalanästhetikum durchgeführt, da Ropivacain im basischen Milieu ausfallen kann und sich für diesen Versuch nicht eignet. Zur Bestimmung der IC50 von Lidocain in unserer Versuchsreihe wurde zuerst die Dosis-Wirkungskurve von Lidocain bestimmt. Lidocain wies hierbei ein ähnliches Verhalten auf wie Ropivacain. Die IC50 betrug 5,9 mM (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Hemmung durch Lidocain.** Mit ansteigenden Konzentrationen von Lidocain (x-Achse) inkubierte Oozyten wurden mit der EC<sub>50</sub> von LPA stimuliert und der Cl<sup>-</sup>-Strom gemessen. Die Meßgrößen wurden in Prozent zur Kontrolle(y-Achse) normalisiert. Die halbmaximale Hemmkonzentration von Lidocain ist als IC<sub>50</sub> eingezeichnet.

Die Hemmwirkung von Lidocain (10mM) auf LPA Rezeptoren in Xenopus Oozyten war eindeutig abhängig vom pH-Wert. Kontrollantworten bei pH 7,4 ergaben eine mittlere Stromgröße von  $1,65 \pm 0,18 \mu\text{A}$ . Bei pH 5 zeigte sich eine Hemmung auf 56,4% der Kontrollantwort ( $0,93 \pm 0,18 \mu\text{A}$ ), bei pH 7 auf 18,2% ( $0,21 \pm 0,06 \mu\text{A}$ ), bei pH 8 auf 3,6% ( $0,06 \pm 0,02 \mu\text{A}$ ) und bei pH 9 auf 1,0% ( $0,02 \pm 0,01 \mu\text{A}$ ) der Kontrollantwort (Abbildung 14).

Mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ( $\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$ ) lässt sich bei bekanntem pK<sub>a</sub>-Wert und pH-Wert der Umgebung das Verhältnis zwischen ungeladenem und geladenem Anteil der Lokalanästhetika berechnen. Lidocain hat einen pK<sub>a</sub>-Wert von 7,7 und liegt bei pH5 zu 99,8%, bei pH6 zu 98%, bei pH7 zu 80%, bei pH8 zu 50% und bei pH9 zu 5% in der ionisierten Form vor.



**Abbildung 14: pH-abhängige Hemmung durch Lidocain.** Cl<sup>-</sup>-Strom bei Blockade durch Lidocain (graue Balken) bei den angegebenen pH-Werten (x-Achse) in Prozent der Kontrolle ohne Lidocain bei pH 7,4 (schwarzer Balken, y-Achse). Die Prozentangaben in Klammern unterhalb der pH-Werte geben den Anteil an ionisiertem Lidocain an.

pH-Wert von Lidocain	LPA-Signalantwortgrößen in Prozent zur Kontrolle
pH5	56,4
pH6	49,7
pH7	18,2
pH8	3,6
pH9	1,0

**Tabelle 4: LPA-Signalantwort in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lidocainlösung in Prozent der Kontrolle.**

## 4. Diskussion

Lokalanästhetika haben „alternative“ Wirkungen (Chen 1998; Chvapil 1979; Cooke 1977; Drucker 1998; Groeben 1996; Hollmann 2000; Hollmann 2001; Modig 1983; Morris 1980 A), die nicht mit der Natriumkanal-Blockade erklärt werden können. Ursache könnte die Blockierung von Signalkaskaden verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sein, wobei die Interaktion wahrscheinlich direkt am Rezeptor oder G-Protein stattfindet.

Der Lysophosphatidsäure (LPA)-Rezeptor ist ein solcher G-Protein-gekoppelter Rezeptor, bei dem in vorausgegangenen Studien eine direkte Interaktion mit Lokalanästhetika vermutet wurde (Nietgen 1997; Sullivan 1999).

Lysophosphatidsäure (LPA) wird u.a. aus aktivierten Thrombozyten und Fibroblasten freigesetzt (Moolenaar 1994; Moolenaar 1992). Die Bindung erfolgt extrazellulär, wobei eine Reihe von Rezeptor-Subtypen bekannt ist (An 1998; Hooks 1998; Lee 1998; Zondag 1998). LPA kommt im Serum in Konzentrationen im  $\mu\text{M}$  Bereich vor. Die biologischen Wirkungen von LPA sind mannigfaltig. Die LPA-vermittelte Signaltransduktion beeinflusst u.a. die Bildung von Strukturproteinen in Bindegewebs- und Muskelzellen und deren Proliferationsfähigkeit. Beschrieben sind unter anderem Effekte auf den Zellzyklus mit mitogener (van Corven 1992) und antimitogener (Tigyi 1994) Wirkung. In *Xenopus* Oozyten löst LPA  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Chloridströme aus (Tigyi 1992), was in der vorliegenden Studie als Modell zur Messung der Rezeptoraktivierung genutzt wurde. Auf glatte Muskelzellen wirkt LPA kontraktile und mitogen (Seewald 1997; Tokumura 1980; Tokumura 1994). Die Neurotransmitterausschüttung kann ebenfalls durch das Phospholipid LPA beeinflusst werden (Shiono 1993). Auf das Cytoskelett kann LPA modulierend auf die Zellform einwirken und Zellrundung, Axonretraktion und Remodelierung des Aktinfaserzytoskeletts auslösen (Gohla 1998). In der Wundheilung scheint LPA eine besondere Rolle zu spielen, da es stimulierend auf das Wachstum von Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und Keratinozyten (Piazza 1995) wirkt und außerdem eine positive Beeinflussung auf die Fibronectinbindung an der Zelloberfläche beschrieben wurde (Kolodney 1993; Zhang 1994). Die Arbeitsgruppe um Tigyi konnte im Tierexperiment erhöhte LPA-Konzentrationen im Kammerwasser nach

Korneaverletzungen nachweisen mit einem daraus resultierendem proliferativen Einfluss auf die Keratozyten (Liliom 1998).

Wir wählten LPA und seinen Rezeptor als Modell, da die Bindungsstelle (extrazellulär) am Rezeptor bekannt ist, ebenso wie die intrazelluläre Signalkaskade. In *Xenopus* Oozyten wird ein LPA-Rezeptor endogen exprimiert, was ihn somit leicht zugänglich macht. Darüber hinaus ist die Endstrecke der Signalkaskade, ein Chloridstrom, leicht mit Voltage-Clamp Technik messbar. Der LPA-Rezeptor ist somit besonders gut geeignet, Art und Lokalisation der Bindung von Lokalanästhetika an einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor zu untersuchen.

Die Hauptergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Lokalanästhetika binden am LPA-Rezeptor oder seinem G-Protein
2. Die Bindungsstelle ist nicht identisch mit der LPA-Bindungsstelle
3. Die Bindungsstelle liegt intrazellulär.

#### **4.1. Stereoselektive Hemmung der LPA-Signaltransduktion**

Zwei vorausgegangene Studien der Arbeitsgruppe um Durieux konnten mit der gleichen Methodik bereits die Inhibition der LPA-Signalübertragung in *Xenopus* Oozyten durch Lokalanästhetika zeigen (Nietgen 1997; Sullivan 1999). Die Lokalanästhetika Lidocain, Bupivacain, Benzocain und QX314 hemmten die LPA-Signalübertragung konzentrationsabhängig. In diesen Arbeiten konnte bereits eine Beeinflussung der Signalkaskade distal der Phospholipase C weitestgehend ausgeschlossen werden. Intrazelluläre Injektionen von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) in die Oozyten lösten in diesem Setup identische Membranpotentialveränderungen über Chloridströme aus, wie durch extrazelluläre LPA-Applikation. Jedoch ließen sich die so ausgelösten Signalantworten, welche in ihrer Entstehung die Rezeptoraktivierung und die G-Protein vermittelte Signalkaskade übersprungen haben, nicht durch extra- oder intrazelluläre Lokalanästhetikaapplikation beeinflussen.

GTPγS ist ein nichthydrolyzierbares Trinukleotid, welches eine irreversible G-Protein Aktivierung auslöst (Yost 1993). Intrazelluläre Injektionen von GTPγS in Oozyten zeigten in gleichem Versuchsaufbau eine konzentrationsabhängige Auslösung der LPA-Signalkaskade mit typischen Membranpotentialveränderungen, welche als

Chloridströme gemessen wurden. Die durch  $GTP\gamma S$  ausgelöste Signalkaskade konnte ebenfalls nicht durch Lokalanästhetikaapplikation gehemmt werden (Nietgen 1997; Sullivan 1999).

Die LPA-Rezeptorfunktion wird durch eine Rückkoppelung mittels Phosphorylierung durch die Proteinkinase C moduliert (Hahnenkamp 2004). Es wäre somit auch denkbar, daß die lokalanästhetikainduzierte Inhibition der LPA-Rezeptoren indirekt über Aktivierung der Proteinkinase C abläuft. Nach Ausschaltung der Proteinkinase C durch den Inhibitor Chelerythrine zeigten sich jedoch unveränderte inhibitorische Effekte der Lokalanästhetika.

Diese Ergebnisse schließen somit die Proteinkinase C und die distal der Phospholipase C ablaufenden Schritte in der Signalkaskade ( $IP_3$ , intrazelluläre Kalziumausschüttung aus dem ER, Chloridkanal) als Lokalanästhetikawirkort aus. Der Wirkort der Lokalanästhetika muss also weiter proximal in der Signalkaskade liegen.

Als Wirkort der Lokalanästhetika wurde dadurch der LPA-Rezeptor selbst, oder der involvierte G-Protein-Komplex immer wahrscheinlicher. Ziel dieser Arbeit war es die postulierte spezifische Interaktion der Lokalanästhetika mit dem Rezeptor, oder seinem G-Protein weiter zu untersuchen.

Stereoselektive Wirkung eines Liganden gilt als Hinweis auf eine spezifische Interaktion mit einer komplexen Proteinstruktur (Fischer 2000; Hollmann 2001; Ibarra 2005; Nau 1999; Nau 2003; Wang 1990; Wang 1992; Zink 2005).

Einige vergleichende Studien sollen hierzu näher erläutert werden:

Am isolierten Lungenperfusionsmodell der Ratte konnte eine - durch ein Thromboxan-A<sub>2</sub> Analogon ausgelöste - pulmonale Vasokonstriktion stereospezifisch durch das S(-)-Enantiomer von Ropivacain gehemmt werden. Eine Proteinbindungsstelle am Thromboxan-A<sub>2</sub> Rezeptor als Lokalanästhetikawirkort wurde hier vom Autor postuliert (Fischer 2000).

Bei dem Lokalanästhetikum Bupivacain konnte eine stereoselektive Wirkung auf Kaliumkanäle, nicht aber auf Natriumkanäle gezeigt werden (Nau 1999). Diese Ionenkanäle unterscheiden sich in ihrer Proteinstruktur, was eine unterschiedliche stereospezifische Wirkung des gleichen Liganden auf die einzelnen Proteinstrukturen zur Folge hat. Nau et al konnten zeigen, daß Punktmutationen in Natriumkanälen die



Bindungsaffinität von Lokalanästhetika und ihre Stereoselektivität auf diese Proteinstrukturen beeinflussten (Nau 1999; Nau 2003). Konfigurationsveränderungen des Rezeptors auf Proteinebene ergeben somit eine Veränderung der stereoselektiven Wirkweise von Lokalanästhetika auf diesen Rezeptor. Aktuelle Studien konnten stereoselektive Unterschiede bei Bupivacain und Ropivacain auf deren Beeinflussung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischem Retikulum im Skelettmuskel feststellen. Aufgrund der Stereoselektivität ihrer Wirkung wird von den Autoren der Ryanodine Ry1- Rezeptor und die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Pumpe (auf Proteinebene) als spezifischer Wirkort der Lokalanästhetika diskutiert (Ibarra 2005; Zink 2005). Analog zu diesen Studien erlaubt eine nachgewiesene stereoselektive Wirkung eines Liganden allgemein Rückschlüsse auf eine spezifische Rezeptor/Proteinbindung.

Deshalb untersuchten wir die reinen Enantiomere des Lokalanästhetikums Ropivacain auf deren Einfluß auf die LPA-Signalkaskade.

In unseren Experimenten konnten wir die Stereoselektivität der Enantiomere des Ropivacains auf die LPA-Signalkaskade zweifelsfrei nachweisen. Die  $\text{IC}_{50}$  des S(-)-Enantiomers von Ropivacain betrug 23,8mM und die des R(+)-Enantiomers 4,8mM. Dieser Unterschied war signifikant ( $p=0,001$ ). Wir interpretieren diese Ergebnisse als starken Hinweis auf eine spezifische Interaktion des Lokalanästhetikums mit dem Rezeptor oder seinem G-Protein.

Aus vorausgegangenen Arbeiten ist bekannt, daß Lokalanästhetika inhibitorisch auf die Signalübertragung verschiedenster G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, wie z.B. den Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor, den muskarinergen M<sub>1</sub>- und M<sub>3</sub>-Rezeptor und den LPA-Rezeptor wirken (Fischer 2001; Hollmann 2000; Hollmann 2001; Honemann 2004). Aufgrund der sehr unterschiedlichen Morphologie in ihrer Proteinstruktur wird ihr gemeinsames G-Protein als Wirkort der Lokalanästhetika diskutiert. Interessanterweise zeigten verschiedene Lokalanästhetika auf den Angiotensin AT<sub>1A</sub>-Rezeptor keinen hemmenden Einfluss (Durieux 1996; Nietgen 1997). Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor vermittelt seine Signalkaskade über eine andere G-Protein-Untereinheit, als die oben genannten Rezeptoren, welche durch Lokalanästhetika gehemmt werden. Der Angiotensinrezeptor vermittelt seine Signalkaskade hauptsächlich über die  $\text{G}\alpha_0$  und  $\text{G}\alpha_{14}$  Untereinheit, wohingegen die LPA- und muskarine Signalübertragung im Oozytenmodell vermehrt über  $\text{G}\alpha_q$  abläuft (Hollmann 2002; Hollmann 2001; Shapira

1998). Das G-Protein mit seinen Untereinheiten, speziell die  $G\alpha_q$ -Untereinheit, ist daher als ein möglicher Lokalanästhetikawirkort anzunehmen. Die in unserer Arbeit gezeigte stereoselektive Wirkung des Ropivacains auf die LPA-Signalkaskade ist nicht beweisend für eine Proteinbindung, denn in Ausnahmefällen kann eine Stereoselektivität auch dann vorliegen, wenn der Ligand, der ein chirales Kohlenstoffatom enthält, an eine organisierte Phospholipid-Doppelmembran bindet (Dickinson 1994; Dluzewski 1983). In diesem Fall wäre aber nicht zu erwarten, daß - wie in unserem Fall - eine rezeptorspezifische Signalkaskade konzentrationsabhängig beeinflusst wird.

Die meisten handelsüblichen Lokalanästhetika weisen abhängig von ihren molekularen Eigenschaften eine gewisse Lipidlöslichkeit auf, was sich in ihrem Octanol/Puffer Verteilungskoeffizienten ausdrückt. Eine unspezifische Hemmung der LPA-Signalkaskade über Lipidbindung durch Interaktion der Lokalanästhetika mit der Lipiddoppelmembran kann in unserer Studie mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Zum einen haben Enantiomere eine identische Lipophilie (stereoselektive Wirkung der Enantiomere über Lipidbindung wird somit unwahrscheinlich) und zum anderen wäre nicht zu erwarten, daß eine rezeptorspezifische Signalkaskade konzentrationsabhängig beeinflusst würde.

#### **4.2. Nicht-kompetitive Hemmung der LPA-Signaltransduktion**

Kompetitive Hemmung zweier Liganden gilt als Beweis dafür, dass beide an der gleichen Bindungsstelle andocken. Umgekehrt wird eine nicht-kompetitive Hemmung als Bindung an unterschiedlichen Stellen interpretiert. Um festzustellen, welche Art der Hemmung für Lokalanästhetika (in Bezug auf LPA) vorliegt, wurden Oozyten, die zuvor mit Ropivacain ( $IC_{50}$ ) inkubiert worden waren, steigenden LPA-Konzentrationen ausgesetzt. Dabei beobachteten wir, daß die  $EC_{50}$  für Kontrollzellen und inkubierte Zellen praktisch gleich waren. Die Behandlungsgruppe mit S(-)- Ropivacain-inkubierten Oozyten zeigte in der Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb.11) keine Rechtsverschiebung im Vergleich zur Kontrollkurve. Dies spricht für einen nicht-kompetitiven Antagonismus. Die Reizantworten der inkubierten Zellen waren auf etwa 50% der Kontrollen reduziert. Dies traf auch für die höchsten verwendeten LPA-Konzentrationen zu. Da auch höchste Konzentrationen von LPA die Ropivacainwirkung

nicht aufheben konnten wird ein kompetitiver Antagonismus als unwahrscheinlich angenommen. Lokalanästhetika antagonisieren die LPA- Rezeptorfunktion mit hoher Wahrscheinlichkeit auf allosterische, nicht-kompetitive Weise. Allerdings können wir nicht mit letzter Sicherheit ausschließen, daß es sich nicht doch um eine kompetitive Hemmung handelt: extreme Unterschiede in der Affinität würden zu einem ähnlichen Ergebnis führen, obwohl die Bindung an derselben Stelle am Rezeptor erfolgt. Diese Möglichkeit konnten wir nicht ausschließen, da bei dem – hierzu notwendigen - umgekehrten Versuchsaufbau die Verdrängung von LPA durch Lokalanästhetika in diesem Setup nicht quantifiziert werden kann. Der Kurvenverlauf, die identische EC50 und der anschließende Versuch sprechen dafür, dass beide Substanzen an verschiedenen Stellen des Rezeptors (oder des G-Proteins) binden.

### **4.3 pH-Wert und Hemmung der LPA-Signaltransduktion**

Der Ionisationsgrad der Lokalanästhetika beeinflusst ihre Gewebegängigkeit. Abhängig von der Säuredissoziationskonstante (pKa-Wert) und dem pH-Wert der Umgebung liegen Lokalanästhetika zum Teil in ionisierter und zum Teil in ungeladener Form vor. Nur in der ungeladenen Form sind sie lipidlöslich und können so Lipiddoppelmembranen durchdringen um zum Wirkort zu gelangen. Entspricht der pH-Wert der Umgebung dem pKa-Wert der Verbindung, so liegt sie zu gleichen Teilen in ungeladener und geladener Form vor. Substanzen mit einem pKa-Wert größer als der Gewebe pH-Wert liegen überwiegend in ionisierter Form vor. Gängige Lokalanästhetika haben einen pKa-Wert zwischen 7,8 und 9. Somit liegen sie bei niedrigeren pH-Werten vermehrt ionisiert, bei höheren pH-Werten nicht-ionisiert vor.

Um festzustellen, ob Lokalanästhetika intra- oder extrazellulär binden, machten wir uns die pH-Wert abhängige Membrandurchgängigkeit zu Nutzen. Oozyten wurden mit einer konstanten Konzentration von Lidocain bei unterschiedlichen pH-Werten inkubiert und anschließend mit LPA (EC50) stimuliert. Die Hemmung der LPA-Wirkung war eindeutig vom pH-Wert abhängig. Die stärkste Hemmung auf weniger als 5% der Kontrollantwort fand sich im alkalischen Bereich (pH 9). Hier lagen 95% des Lidocains nicht ionisiert vor.

Dies legt nahe, dass ein Großteil der Wirkung von Lokalanästhetika intrazellulär erfolgt. Da bereits bekannt ist, daß LPA an seinen Rezeptor extrazellulär bindet (intrazelluläre

LPA Injektionen in Oozyten lösten keine Signalkaskade aus) (Durieux 1992) untermauert dies die allosterische, nicht-kompetitive Hemmung der Lokalanästhetika an diesem Rezeptor. Der Anstieg der inhibitorischen Potenz von Lokalanästhetika mit steigendem pH-Wert wurde auch für Natriumkanäle beschrieben (Chernoff 1990). Im sauren pH-Bereich bei pH5 - bei dem nur 1-2% des Lidocains nicht-ionisiert vorliegt – konnten wir bereits eine 50%ige Hemmung der LPA-Reizantworten nachweisen. Dies könnte eine extrazelluläre Bindungsstelle für die ionisierte Form des Lokalanästhetikum vermuten lassen. Kontrollversuche mit dem experimentellen Lidocainanalogon QX314, welches aufgrund seiner quartären Struktur dauerhaft ionisiert vorliegt, zeigten jedoch keinen Effekt nach extrazellulärer Applikation (Sullivan 1999). Eine Hemmung durch QX314 konnte nur nach intrazellulärer Injektion erreicht werden. Somit wird ein extrazellulärer Angriffspunkt der Lokalanästhetika am LPA-Rezeptor immer unwahrscheinlicher. Bei pH 5 liegt nur ca. 1% des Lidocain in der membrangängigen, ungeladenen Form vor. Dennoch konnte hier bereits eine Hemmung von 50% erreicht werden. Aufgrund dieser Beobachtungen gehen wir davon aus, daß die Bindungsstelle der Lokalanästhetika intrazellulär liegt und ihre Bindungsaffinität zum Rezeptor, oder G-Protein hoch ist.

#### **4.4 Methodenkritik**

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um in vitro Experimente, die an einem Rezeptorsubtyp des LPA-Rezeptors einer Zellart (*Xenopus* Oozyten) eines Tieres (Frosch) durchgeführt wurden. Als Read-out diente ein transmembranärer Ionenstrom (Chlorid-Strom). Untersucht wurden die Wirkungen von zwei Lokalanästhetika (Ropivacain, Lidocain).

Verallgemeinerungen der Ergebnisse auf in vivo- Situationen anderer Zellarten anderer Tierarten und mit anderen Lokalanästhetika sind daher nicht ohne weiteres möglich.

In vitro Experimente werden nie der Komplexität eines Organismus gerecht. Unter vielen anderen Problemen ist die Regelung der Körpertemperatur nicht gegeben. Sämtliche Versuche wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt, obwohl Säugetierzellen ihre Funktion bei einer Temperatur von 35-37°C ausüben. Eine erniedrigte Versuchstemperatur soll jedoch keine wesentliche Beeinflussung der Rezeptorfunktion zur Folge haben (Dascal 1987).

Die Versuchsreihen sind anfällig für Störungen verschiedener Art (Temperatur, Geschicklichkeit des Experimentators, Konzentrations- und pH-Schwankungen der Reagenzien, Zustand der Oozyten, etc.). Der hohen Variabilität der Ergebnisse wurde durch Angabe der Messwerte in Prozent der Kontrollantwort begegnet.

Wir wählten den LPA-Rezeptor weil er leicht zugänglich ist (endogene Expression auf Oozyten), die durch LPA-Bindung ausgelöste Signalkaskade gut erforscht ist und mit dem induzierten Chlorid-Strom ein gut messbares Read-out zur Verfügung steht.

Allerdings wurde die Induktion anderer Signalkaskaden durch diese Rezeptoren nicht erfaßt. Es kann deshalb keine Aussage über die Lokalanästhetikawirkung auf die Gesamtheit der LPA-vermittelten Zellinteraktion getroffen werden.

Die Wahl der Oozyten des Frosches hatte verschiedene Gründe: Oozyten exprimieren einen Subtyp eines LPA-Rezeptors mit den entsprechenden intrazellulären Effektorsystemen (Durieux 1992) und haben sich bereits mehrfach in Funktionstests von G-Protein gekoppelten Rezeptoren als geeignet erwiesen (Dascal 1987; Durieux 1999; Liliom 1996; Moolenaar 1997). Zudem erleichtert die Größe der Zellen (1,5mm im Durchmesser) die intrazellulären Injektionen und das Voltage-Clamping. Vergleichsstudien zeigten keinen signifikanten Unterschied der LPA-induzierten  $Ca^{2+}$ -Signalauslösung und der G-Protein Beeinflussung zwischen *Xenopus* Oozyten und Säugetierzellen (Durieux 1993; Durieux 1992; Hollmann 2002; Moolenaar 1995).

Als Testsubstanzen wurden zwei Lokalanästhetika (Ropivacain, Lidocain) eingesetzt. Die Wahl fiel wegen ihrer bestimmten physikochemischen Eigenschaften, die für unsere Versuche hilfreich waren. Eine Übertragung der Ergebnisse auf andere Substanzen ist nicht möglich.

#### **4.5 Ausblick und klinischer Bezug**

In unserem Setup diente der LPA-Rezeptor als Modell für einen klassischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. LPA kommt als Phospholipidmediator nahezu ubiquitär im Organismus vor. Seine mannigfaltigen biologischen Wirkungen scheinen durch Lokalanästhetika beeinflusst werden zu können. Dies eröffnet ein neues großes Feld der Lokalanästhetikawirkungen und bietet einen möglichen Erklärungsansatz für die klinisch beobachteten alternativen Wirkungen bzw. Nebenwirkungen vieler Lokalanästhetika. Inwieweit die Interaktion der Lokalanästhetika mit G-Protein-

gekoppelte Rezeptoren in Zukunft auch therapeutisch gezielt eingesetzt werden kann bleibt zunächst noch ungeklärt.

- Lokalanästhetika könnten **über Beeinflussung der LPA-Signaltransduktion** in den Prozess der **Angiogenese/Vaskulogenese und Organentwicklung einwirken, da bekannt ist, daß** LPA ein Angiogenesefaktor ist (Lee 1998). LPA ist ein potentes Mitogen für Endothelzellen und bewirkt die Bildung tubulärer Strukturen in der Spätphase der Angiogenese (Lee 1999). Welche Edg-Rezeptoren und Signalwege daran beteiligt sind, ist derzeit noch Gegenstand der Forschung.
- Lokalanästhetika könnten über **Beeinflussung** der LPA-Signaltransduktion einen Einfluß auf die Thrombozytenaggregation nehmen, da bekannt ist, daß LPA ein starker thrombozytenaktivierender Agonist ist. LPA induziert eine Aggregationsveränderung von Blutplättchen (Gueguen 1999; Watson 1985) und wird bei der Thrombozytenaktivierung freigesetzt (Eichholtz 1993). Demgemäß konnten in humanem Serum LPA-Konzentrationen von bis zu 10µM gefunden werden. Eine nach dieser Arbeit veröffentlichte Studie bestätigte die Hinweise auf die  $G\alpha_q$ -Untereinheit als selektiver Lokalanästhetikawirkort (Hollmann 2001). Interessanterweise zeigte sich bei  $G\alpha_q$ -defizienten Mäusen, daß ihre Thrombozyten nicht auf Plättchenaktivatoren reagierten (Offermanns 1997). Das  $G\alpha_q$ -Protein wird daher als Zielstruktur zur medikamentösen Blockierung der Thrombozytenaktivierung diskutiert. Die Interaktion von Lokalanästhetika mit dem LPA-Rezeptor, oder seiner  $G\alpha_q$  -Untereinheit könnte einen Mechanismus zur Erklärung der klinisch beobachteten antithrombotischen Lokalanästhetikawirkung darstellen (Hollmann 2001; Modig 1983).
- Lokalanästhetika könnten über **Beeinflussung** der LPA-Signaltransduktion in die Entzündungsreaktion eingreifen, da LPA generell im Plasma bei Entzündungsreaktionen durch sekretorische Phospholipase A2 auf Membranvesikeln gebildet wird (Fourcade 1995). Es steigert die endotheliale Permeabilität und wirkt chemotaktisch auf Entzündungszellen. In diesem Zusammenhang könnte sich ein Erklärungsansatz für die antiinflammatorische Wirkung der Lokalanästhetika bieten (Fischer 2001; Hollmann 2001).

- Lokalanästhetika könnten über **Beeinflussung** der LPA-Signaltransduktion in den Prozess der **Wundheilung eingreifen**. Die hohe Serumkonzentration der Phospholipide spiegelt ihre Bedeutung bei der Wundheilung wieder. Diese läßt sich in zwei Phasen, Zellmigration und Zellproliferation, untergliedern. In diesem Zusammenhang wurde in einem *in vitro* Modell kürzlich gezeigt, daß LPA Monozyten/Makrophagen anlockt und aktiviert. Weiterhin stimuliert es in der zweiten Phase der Wundheilung die Proliferation von Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Lee 2000). *In vivo* finden sich ähnliche Ergebnisse. So konnte die Arbeitsgruppe um Durieux zeigen, daß kleine Hautwunden an Mäuseohren eine schnellere Heilung nach lokaler Behandlung mit LPA- Lösungen zeigten (Demoyer 2000). Andererseits kann sich die durch LPA stimulierte verstärkte Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen auch negativ auswirken, indem sie beispielsweise die Restenosierung nach Koronarangioplastie beschleunigen. Durch die Hemmung des interzellulären Lipidmediators LPA könnten sich somit durchaus positive wie negative Lokalanästhetikaeinflüsse auf die Wundheilung ergeben.

#### 4.6 Schlussfolgerung

Wir konnten in unseren Experimenten die Stereoselektivität von Lokalanästhetika am LPA-Rezeptor nachweisen. Wir gehen deshalb davon aus, daß für bestimmte Lokalanästhetika spezifische Bindungsstellen an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren direkt am Rezeptor oder an seinem G-Protein-Komplex existieren.

Der nicht-kompetitive Antagonismus spricht dafür, dass LPA und Lokalanästhetika nicht dieselbe Bindungsstelle am Rezeptor besetzen.

Unsere Versuche zum Einfluß des Ionisierungsgrades ergaben eine pH-abhängige Hemmwirkung der Lokalanästhetika auf den LPA-Rezeptor. Wir gehen von einer intrazellulären Bindungsstelle von Lokalanästhetika am Rezeptor aus.

Es konnte gezeigt werden, daß neben der bekannten Wirkung von Lokalanästhetika auf Natriumkanäle ein neues und großes Feld für weitere Lokalanästhetikawirkorte besteht.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren scheinen eine große Rolle zu spielen als selektive Wirkorte alternativer Lokalanästhetikawirkungen.

## **5. Zusammenfassung**

Lokalanästhetika haben „alternative“ Wirkungen, die nicht mit der Natriumkanal-Blockade erklärt werden können. Ursache könnte die Blockierung von Signalkaskaden verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sein, wobei die Interaktion wahrscheinlich direkt am Rezeptor oder G-Protein stattfindet. Lysophosphatidsäure (LPA) bindet an einen klassischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Wir wählten daher LPA als Referenzsubstanz.

In unseren Experimenten konnten wir die Stereoselektivität von Ropivacain auf den LPA-Rezeptor zweifelsfrei nachweisen. Die IC<sub>50</sub> des S(-)-Enantiomers betrug 23,8mM und die des R(+)-Enantiomers 4,8mM. Dieser Unterschied war signifikant (p=0,001). Wir interpretieren diese Ergebnisse als starken Hinweis auf eine spezifische Interaktion des Lokalanästhetikums mit dem Rezeptor oder seinem G-Protein.

Wir beobachteten, dass die EC<sub>50</sub> für Kontrollzellen und inkubierte Zellen praktisch gleich war und die Reizantworten der inkubierten Zellen auf etwa 50% der Kontrollen reduziert waren. Dies traf auch für die höchsten verwendeten LPA-Konzentrationen zu. Lokalanästhetika und LPA antagonisieren sich also nicht-kompetitiv.

Die Hemmung der LPA-Wirkung war eindeutig vom pH-Wert abhängig. Die stärkste Hemmung auf weniger als 5% der Kontrollantwort fand sich im alkalischen Bereich (pH 9). Hier lagen 95% des Lidocains nicht-ionisiert vor. Aufgrund dieser Beobachtungen gehen wir davon aus, dass die Bindungsstelle der Lokalanästhetika intrazellulär liegt und ihre Bindungsaffinität zum Rezeptor hoch ist.



## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von LPA .....	12
Abbildung 2: Strukturformel von Lidocain.....	13
Abbildung 3: Strukturformel von Ropivacain.....	13
Abbildung 4: Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, schematische Darstellung des Signalübertragungsweges eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors nach Stimulation durch den entsprechenden Agonisten.....	14
Abbildung 5: Beispiel eines typischen Cl <sup>-</sup> -Membranstroms (digitalisiert mit OoClamp Software) nach LPA-Stimulation in Xenopus Oozyten. Aufgezeichnet ist die Veränderung des Membranstroms in nA (y-Achse) im Verhältnis zur Zeit in sec (x-Achse). .....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Blockschaltbildes zur Registrierung transmembranöser Ionenströme. I-EL - Stromelektrode. U-EL - Spannungselektrode. B - virtuelle Badelektrode. Ref - Referenzelektrode. OP1 - Operationsverstärker zur Einstellung des Haltpotentials (V). OP2- Operationsverstärker zur Messung des Membranpotentials (MP). OP3 - Operationsverstärker zur Strommessung (I).....	16
Abbildung 7: Signalantwort eines durch LPA induzierten Chloridstromes in Oozyten (Bildschirmausgabe von OoClamp). Die Ordinate gibt die Stromstärke in $\mu\text{A}$ , die Abszisse die Zeit in Sekunden wieder. Der maximale Einwärtsstrom beträgt hier ca. $1,5 \mu\text{A}$ . Integriert wurde die Fläche unterhalb der Horizontalen zwischen den Pfeilen. Die in der Zeit zwischen 9,4 und 35,4 sec bewegte Ladung über die Zellmembran betrug $4,3 \mu\text{C}$ (Area).....	21
Abbildung 8: A: Membranstrom nach LPA-Stimulation in Abhängigkeit von der Zeit; B: gehemmte LPA-Reizantwort nach Inkubation mit Lokalanästhetika.....	22
Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungskurve von LPA (Kontrollbedingungen). Oozyten wurden mit steigenden Konzentrationen von LPA (x-Achse) stimuliert und der Ladungstransfer durch den Cl <sup>-</sup> -Strom (y-Achse) gemessen. Die Reizantwortgröße wurde integriert als Veränderung des Stromflusses über der Zeit in $\mu\text{C}$ angegeben. Die halbmaximale Reizkonzentration ( $\text{EC}_{50}$ von $0,6 \mu\text{M}$ ) ist eingezeichnet.....	23
Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Hemmung durch die Stereoisomere S(-) und R(+). Oozyten wurden mit ansteigenden Konzentrationen von S(-)- und R(+)-Isomeren inkubiert und anschließend mit der $\text{EC}_{50}$ von LPA stimuliert. Auf der x-Achse sind die Messdaten in Prozent zur Kontrolle angegeben. Die y-Achse zeigt die Konzentrationen von den Ropivacain-Stereoisomeren. ....	24
Abbildung 11: Nicht-kompetitive Wirkung des S(-)-Ropivacains. S(-)-Ropivacain-inkubierte (quadratische Punkte und gestrichelte Linie) oder nicht inkubierte (schwarze Punkte und durchgehende Linie) Oozyten wurden steigenden Konzentrationen von LPA (x-Achse) ausgesetzt und der Ladungstransfer durch den Cl <sup>-</sup> -Strom (y-Achse) gemessen. Die halbmaximalen Reizkonzentrationen ( $\text{EC}_{50}$ ) sind eingezeichnet. ....	26
Abbildung 12: Reizantworten bei pH 5, pH 7,4 und pH 9. Oozyten wurden bei den angegebenen pH-Werten (x-Achse) mit der $\text{EC}_{50}$ von LPA stimuliert und der Mittelwert des Cl <sup>-</sup> -Stromes aus 12 Oozyten als Balkendiagramm in $\mu\text{A}$ dargestellt (y-Achse) .....	27
Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Hemmung durch Lidocain. Mit ansteigenden Konzentrationen von Lidocain (x-Achse) inkubierte Oozyten wurden mit der $\text{EC}_{50}$	

von LPA stimuliert und der Cl <sup>-</sup> -Strom gemessen. Die Meßgrößen wurden in Prozent zur Kontrolle(y-Achse) normalisiert. Die halbmaximale Hemmkonzentration von Lidocain ist als IC50 eingezeichnet. ....	28
Abbildung 14: pH-abhängige Hemmung durch Lidocain. Cl <sup>-</sup> -Strom bei Blockade durch Lidocain (graue Balken) bei den angegebenen pH-Werten (x-Achse) in Prozent der Kontrolle ohne Lidocain bei pH 7,4 (schwarzer Balken, y-Achse). Die Prozentangaben in Klammern unterhalb der pH-Werte geben den Anteil an ionisiertem Lidocain an. ....	29

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelluläre Wirkungen der Lysophospholipide .....	11
Tabelle 2: IC <sub>50</sub> von S(-)-Ropivacain und R(+)-Ropivacain auf LPA.....	24
Tabelle 3: EC 50 und maximale Reizantwort von LPA mit und ohne Hemmung durch Ropivacain .....	25
Tabelle 4: LPA-Signalantwort in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lidocainlösung in Prozent der Kontrolle. ....	29

## 8. Literaturverzeichnis

1. An, S.,Bleu, T.,Huang, W.,Hallmark, O. G.,Coughlin, S. R.,Goetzl, E. J. Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysosphingolipids. *FEBS Lett.* 417 (1997) 279-282.
2. An, S.,Goetzl, E. J.,Lee, H. Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31 (1998) 147-157.
3. Arlander, E.,Ost, A.,Stahlberg, D.,Lofberg, R. Ropivacaine gel in active distal ulcerative colitis and proctitis -- a pharmacokinetic and exploratory clinical study. *Aliment Pharmacol Ther.* 10 (1996) 73-81.
4. Bjorck, S.,Dahlstrom, A.,Ahlman, H. Treatment of distal colitis with local anaesthetic agents. *Pharmacol Toxicol.* 90 (2002) 173-180.
5. Bjorck, S.,Dahlstrom, A.,Johansson, L.,Ahlman, H. Treatment of the mucosa with local anaesthetics in ulcerative colitis. *Agents Actions. Spec No* (1992) C60-72.
6. Butterworth, J. F. th,Strichartz, G. R. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology.* 72 (1990) 711-734.
7. Caranza, R.,Raphael, J. H.,Nandwani, N.,Langton, J. A. Effect of nebulised lignocaine on the quality of induction of anaesthesia in cigarette smokers. *Anaesthesia.* 52 (1997) 849-852.
8. Carpenter, R. L. Gastrointestinal benefits of regional anesthesia/analgesia. *Reg Anesth.* 21 (1996) 13-17.
9. Chen, J.,Adachi, N.,Liu, K.,Nagaro, T.,Arai, T. Improvement of ischemic damage in gerbil hippocampal neurons by procaine. *Brain Res.* 792 (1998) 16-23.
10. Chernoff, D. M.,Strichartz, G. R. Kinetics of local anesthetic inhibition of neuronal sodium currents. pH and hydrophobicity dependence. *Biophys J.* 58 (1990) 69-81.
11. Chvapil, M.,Hameroff, S. R.,O'Dea, K.,Peacock, E. E., Jr. Local anesthetics and wound healing. *J Surg Res.* 27 (1979) 367-371.
12. Cooke, E. D.,Bowcock, S. A.,Lloyd, M. J.,Pilcher, M. F. Intravenous lignocaine in prevention of deep venous thrombosis after elective hip surgery. *Lancet.* 2 (1977) 797-799.
13. Cuvillier, O.,Pirianov, G.,Kleuser, B.,Vanek, P. G.,Coso, O. A.,Gutkind, S.,Spiegel, S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature.* 381 (1996) 800-803.
14. Cuvillier, O.,Rosenthal, D. S.,Smulson, M. E.,Spiegel, S. Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins

- during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem.* 273 (1998) 2910-2916.
15. Dascal, N. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem.* 22 (1987) 317-387.
16. Demoyer, J. S., Skalak, T. C., Durieux, M. E. Lysophosphatidic acid enhances healing of acute cutaneous wounds in the mouse. *Wound Repair Regen.* 8 (2000) 530-537.
17. Dickinson, R., Franks, N. P., Lieb, W. R. Can the stereoselective effects of the anesthetic isoflurane be accounted for by lipid solubility? *Biophys J.* 66 (1994) 2019-2023.
18. Dluzewski, A. R., Halsey, M. J., Simmonds, A. C. Membrane interactions with general and local anaesthetics: a review of molecular hypotheses of anaesthesia. *Mol Aspects Med.* 6 (1983) 461-573.
19. Drucker, M., Cardenas, E., Arizti, P., Valenzuela, A., Gamboa, A. Experimental studies on the effect of lidocaine on wound healing. *World J Surg.* 22 (1998) 394-397; discussion 397-398.
20. Durieux, M. E. OoClamp: an IBM-compatible software system for electrophysiologic receptor studies in *Xenopus* oocytes. *Comput Methods Programs Biomed.* 41 (1993) 101-105.
21. Durieux, M. E. Muscarinic signaling in the central nervous system. Recent developments and anesthetic implications. *Anesthesiology.* 84 (1996) 173-189.
22. Durieux, M. E., Lynch, K. R. Signalling properties of lysophosphatidic acid. *Trends Pharmacol Sci.* 14 (1993) 249-254.
23. Durieux, M. E., Salafranca, M. N., Lynch, K. R., Moorman, J. R. Lysophosphatidic acid induces a pertussis toxin-sensitive  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  current in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol.* 263 (1992) C896-900.
24. Durieux, M.E. Anesthetic Interactions with Lysophosphatidate Signaling. Printed at the University of Virginia. Charlottesville (1999)
25. Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I., Moolenaar, W. H. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J.* 291 ( Pt 3) (1993) 677-680.
26. Erickson, J. R., Wu, J. J., Goddard, J. G., Tigyi, G., Kawanishi, K., Tomei, L. D., Kiefer, M. C. Edg-2/Vz-1 couples to the yeast pheromone response pathway selectively in response to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem.* 273 (1998) 1506-1510.

27. Fernhout, B. J.,Dijcks, F. A.,Moolenaar, W. H.,Ruigt, G. S. Lysophosphatidic acid induces inward currents in *Xenopus laevis* oocytes; evidence for an extracellular site of action. *Eur J Pharmacol.* 213 (1992) 313-315.
28. Fischer, D. J.,Liliom, K.,Guo, Z.,Nusser, N.,Virag, T.,Murakami-Murofushi, K.,Kobayashi, S.,Erickson, J. R.,Sun, G.,Miller, D. D.,Tigyi, G. Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit different cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes. *Mol Pharmacol.* 54 (1998) 979-988.
29. Fischer, L. G.,Bremer, M.,Coleman, E. J.,Conrad, B.,Krumm, B.,Gross, A.,Hollmann, M. W.,Mandell, G.,Durieux, M. E. Local anesthetics attenuate lysophosphatidic acid-induced priming in human neutrophils. *Anesth Analg.* 92 (2001) 1041-1047.
30. Fischer, L. G.,Honemann, C. W.,Patrie, J. T.,Durieux, M. E.,Rich, G. F. Ropivacaine attenuates pulmonary vasoconstriction induced by thromboxane A2 analogue in the isolated perfused rat lung. *Reg Anesth Pain Med.* 25 (2000) 187-194.
31. Fourcade, O.,Simon, M. F.,Viode, C.,Rugani, N.,Leballe, F.,Ragab, A.,Fournie, B.,Sarda, L.,Chap, H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell.* 80 (1995) 919-927.
32. Gennero, I.,Xuereb, J. M.,Simon, M. F.,Girolami, J. P.,Bascands, J. L.,Chap, H.,Boneu, B.,Sie, P. Effects of lysophosphatidic acid on proliferation and cytosolic Ca<sup>++</sup> of human adult vascular smooth muscle cells in culture. *Thromb Res.* 94 (1999) 317-326.
33. Goetzl, E. J.,An, S. Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Faseb J.* 12 (1998) 1589-1598.
34. Goetzl, E. J.,Dolezalova, H.,Kong, Y.,Hu, Y. L.,Jaffe, R. B.,Kalli, K. R.,Conover, C. A. Distinctive expression and functions of the type 4 endothelial differentiation gene-encoded G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid in ovarian cancer. *Cancer Res.* 59 (1999) 5370-5375.
35. Goetzl, E. J.,Kong, Y.,Mei, B. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of Bax. *J Immunol.* 162 (1999) 2049-2056.
36. Gohla, A.,Harhammer, R.,Schultz, G. The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem.* 273 (1998) 4653-4659.
37. Groeben, H.,Grosswendt, T.,Silvanus, M. T.,Pavlakovic, G.,Peters, J. Airway anesthesia alone does not explain attenuation of histamine-induced bronchospasm by local anesthetics: a comparison of lidocaine, ropivacaine, and dyclonine. *Anesthesiology.* 94 (2001) 423-428; discussion 425A-426A.

38. Groeben, H.,Schwalen, A.,Irsfeld, S.,Stieglitz, S.,Lipfert, P.,Hopf, H. B. Intravenous lidocaine and bupivacaine dose-dependently attenuate bronchial hyperreactivity in awake volunteers. *Anesthesiology*. 84 (1996) 533-539.
39. Groudine, S. B.,Fisher, H. A.,Kaufman, R. P., Jr.,Patel, M. K.,Wilkins, L. J.,Mehta, S. A.,Lumb, P. D. Intravenous lidocaine speeds the return of bowel function, decreases postoperative pain, and shortens hospital stay in patients undergoing radical retropubic prostatectomy. *Anesth Analg*. 86 (1998) 235-239.
40. Groudine, S.,Wilkins, L. Epidural drugs also act systemically. *Anesthesiology*. 81 (1994) 787.
41. Gueguen, G.,Gaige, B.,Grevy, J. M.,Rogalle, P.,Bellan, J.,Wilson, M.,Klaebe, A.,Pont, F.,Simon, M. F.,Chap, H. Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation. *Biochemistry*. 38 (1999) 8440-8450.
42. Guo, C.,Zheng, C.,Martin-Padura, I.,Bian, Z. C.,Guan, J. L. Differential stimulation of proline-rich tyrosine kinase 2 and mitogen-activated protein kinase by sphingosine 1-phosphate. *Eur J Biochem*. 257 (1998) 403-408.
43. Guo, Z.,Liliom, K.,Fischer, D. J.,Bathurst, I. C.,Tomei, L. D.,Kiefer, M. C.,Tigyi, G. Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor-like lipid mediator lysophosphatidic acid from *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (1996) 14367-14372.
44. Hahnenkamp, K.,Durieux, M. E.,van Aken, H.,Berning, S.,Heyse, T. J.,Honemann, C. W.,Linck, B. Modulation of *Xenopus laevis* Ca-activated Cl currents by protein kinase C and protein phosphatases: implications for studies of anesthetic mechanisms. *Anesth Analg*. 99 (2004) 416-422, table of contents.
45. Herroeder, S.,Durieux, M. E.,Hollmann, M. W. Inflammatory responses after surgery. *Hosp Med*. 63 (2002) 99-103.
46. Hill, C. S.,Wynne, J.,Treisman, R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*. 81 (1995) 1159-1170.
47. Himes, R. S., Jr.,DiFazio, C. A.,Burney, R. G. Effects of lidocaine on the anesthetic requirements for nitrous oxide and halothane. *Anesthesiology*. 47 (1977) 437-440.
48. Hisano, N.,Yatomi, Y.,Satoh, K.,Akimoto, S.,Mitsumata, M.,Fujino, M. A.,Ozaki, Y. Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood*. 93 (1999) 4293-4299.
49. Hollmann, M. W.,Difazio, C. A.,Durieux, M. E. Ca-signaling G-protein-coupled receptors: a new site of local anesthetic action? *Reg Anesth Pain Med*. 26 (2001) 565-571.

50. Hollmann, M. W., Durieux, M. E. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology*. 93 (2000) 858-875.
51. Hollmann, M. W., Fischer, L. G., Byford, A. M., Durieux, M. E. Local anesthetic inhibition of m1 muscarinic acetylcholine signaling. *Anesthesiology*. 93 (2000) 497-509.
52. Hollmann, M. W., Gross, A., Jelacin, N., Durieux, M. E. Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils. *Anesthesiology*. 95 (2001) 113-122.
53. Hollmann, M. W., McIntire, W. E., Garrison, J. C., Durieux, M. E. Inhibition of mammalian Gq protein function by local anesthetics. *Anesthesiology*. 97 (2002) 1451-1457.
54. Hollmann, M. W., Ritter, C. H., Henle, P., de Klaver, M., Kamatchi, G. L., Durieux, M. E. Inhibition of m3 muscarinic acetylcholine receptors by local anaesthetics. *Br J Pharmacol*. 133 (2001) 207-216.
55. Hollmann, M. W., Wiczorek, K. S., Berger, A., Durieux, M. E. Local anesthetic inhibition of G protein-coupled receptor signaling by interference with G $\alpha$ (q) protein function. *Mol Pharmacol*. 59 (2001) 294-301.
56. Hollmann, M. W., Wiczorek, K. S., Smart, M., Durieux, M. E. Epidural anesthesia prevents hypercoagulation in patients undergoing major orthopedic surgery. *Reg Anesth Pain Med*. 26 (2001) 215-222.
57. Honemann, C. W., Arledge, J. A., Podranski, T., Aken, H. V., Durieux, M. Volatile and local anesthetics interfere with thromboxane A2 receptors recombinantly expressed in *Xenopus* oocytes. *Adv Exp Med Biol*. 469 (1999) 277-283.
58. Honemann, C. W., Hahnenkamp, K., Podranski, T., Strumper, D., Hollmann, M. W., Durieux, M. E. Local anesthetics inhibit thromboxane A2 signaling in *Xenopus* oocytes and human k562 cells. *Anesth Analg*. 99 (2004) 930-937, table of contents.
59. Hooks, S. B., Ragan, S. P., Hopper, D. W., Honemann, C. W., Durieux, M. E., Macdonald, T. L., Lynch, K. R. Characterization of a receptor subtype-selective lysophosphatidic acid mimetic. *Mol Pharmacol*. 53 (1998) 188-194.
60. Ibarra, M. Ca, Ichihara, Y., Hikita, M., Yoshida, K., Junji, S., Maehara, Y., Kikuchi, H. Effect of bupivacaine enantiomers on Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. *Eur J Pharmacol*. 512 (2005) 77-83.
61. Im, D. S., Heise, C. E., Harding, M. A., George, S. R., O'Dowd, B. F., Theodorescu, D., Lynch, K. R. Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Mol Pharmacol*. 57 (2000) 753-759.
62. Jalink, K., Hordijk, P. L., Moolenaar, W. H. Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator. *Biochim Biophys Acta*. 1198 (1994) 185-196.



63. Jee, D., Park, S. Y. Lidocaine sprayed down the endotracheal tube attenuates the airway-circulatory reflexes by local anesthesia during emergence and extubation. *Anesth Analg.* 96 (2003) 293-297, table of contents.
64. Koh, J. S., Lieberthal, W., Heydrick, S., Levine, J. S. Lysophosphatidic acid is a major serum noncytokine survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J Clin Invest.* 102 (1998) 716-727.
65. Kohrs, R., Hoenemann, C. W., Feirer, N., Durieux, M. E. Bupivacaine inhibits whole blood coagulation in vitro. *Reg Anesth Pain Med.* 24 (1999) 326-330.
66. Kolodney, M. S., Elson, E. L. Correlation of myosin light chain phosphorylation with isometric contraction of fibroblasts. *J Biol Chem.* 268 (1993) 23850-23855.
67. Krause, K. H., Demaurex, N., Jaconi, M., Lew, D. P. Ion channels and receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> influx in neutrophil granulocytes. *Blood Cells.* 19 (1993) 165-173; discussion 173-165.
68. Lee, H., Goetzl, E. J., An, S. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol.* 278 (2000) C612-618.
69. Lee, M. J., Thangada, S., Claffey, K. P., Ancellin, N., Liu, C. H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R. I., Hla, T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell.* 99 (1999) 301-312.
70. Lee, M. J., Thangada, S., Liu, C. H., Thompson, B. D., Hla, T. Lysophosphatidic acid stimulates the G-protein-coupled receptor EDG-1 as a low affinity agonist. *J Biol Chem.* 273 (1998) 22105-22112.
71. Lei, B., Cottrell, J. E., Kass, I. S. Neuroprotective effect of low-dose lidocaine in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Anesthesiology.* 95 (2001) 445-451.
72. Lei, B., Popp, S., Capuano-Waters, C., Cottrell, J. E., Kass, I. S. Effects of delayed administration of low-dose lidocaine on transient focal cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology.* 97 (2002) 1534-1540.
73. Lei, B., Popp, S., Capuano-Waters, C., Cottrell, J. E., Kass, I. S. Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience.* 125 (2004) 691-701.
74. Liliom, K., Guan, Z., Tseng, J. L., Desiderio, D. M., Tigyi, G., Watsky, M. A. Growth factor-like phospholipids generated after corneal injury. *Am J Physiol.* 274 (1998) C1065-1074.
75. Liliom, K., Murakami-Murofushi, K., Kobayashi, S., Murofushi, H., Tigyi, G. *Xenopus* oocytes express multiple receptors for LPA-like lipid mediators. *Am J Physiol.* 270 (1996) C772-777.

76. Martinsson, T. Ropivacaine inhibits serum-induced proliferation of colon adenocarcinoma cells in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 288 (1999) 660-664.
77. Michell, R. H., Wakelam, M. J. Second messengers. Sphingolipid signalling. *Curr Biol.* 4 (1994) 370-373.
78. Mikawa, K., Maekawa, N., Nishina, K., Takao, Y., Yaku, H., Obara, H. Effect of lidocaine pretreatment on endotoxin-induced lung injury in rabbits. *Anesthesiology.* 81 (1994) 689-699.
79. Mitchell, S. J., Pellett, O., Gorman, D. F. Cerebral protection by lidocaine during cardiac operations. *Ann Thorac Surg.* 67 (1999) 1117-1124.
80. Modig, J., Borg, T., Karlstrom, G., Maripuu, E., Sahlstedt, B. Thromboembolism after total hip replacement: role of epidural and general anesthesia. *Anesth Analg.* 62 (1983) 174-180.
81. Moolenaar, W. H. LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends Cell Biol.* 4 (1994) 213-219.
82. Moolenaar, W. H. Lysophosphatidic acid signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 7 (1995) 203-210.
83. Moolenaar, W. H., Jalink, K., van Corven, E. J. Lysophosphatidic acid: a bioactive phospholipid with growth factor-like properties. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 119 (1992) 47-65.
84. Moolenaar, W. H., Kranenburg, O., Postma, F. R., Zondag, G. C. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol.* 9 (1997) 168-173.
85. Morris, T., Appby, R. Retardation of wound healing by procaine. *Br J Surg.* 67 (1980) 391-392.
86. Morris, T., Tracey, J. Lignocaine: its effects on wound healing. *Br J Surg.* 64 (1977) 902-903.
87. Nau, C., Vogel, W., Hempelmann, G., Brau, M. E. Stereoselectivity of bupivacaine in local anesthetic-sensitive ion channels of peripheral nerve. *Anesthesiology.* 91 (1999) 786-795.
88. Nau, C., Wang, S. Y., Strichartz, G. R., Wang, G. K. Point mutations at N434 in D1-S6 of mu1 Na(+) channels modulate binding affinity and stereoselectivity of local anesthetic enantiomers. *Mol Pharmacol.* 56 (1999) 404-413.
89. Nau, C., Wang, S. Y., Wang, G. K. Point mutations at L1280 in Nav1.4 channel D3-S6 modulate binding affinity and stereoselectivity of bupivacaine enantiomers. *Mol Pharmacol.* 63 (2003) 1398-1406.

90. Nietgen, G. W., Chan, C. K., Durieux, M. E. Inhibition of lysophosphatidate signaling by lidocaine and bupivacaine. *Anesthesiology*. 86 (1997) 1112-1119.
91. Nietgen, G. W., Honemann, C. W., Durieux, M. E. Influence of anesthetics on endogenous and recombinantly expressed G protein-coupled receptors in the *Xenopus* oocyte. *Toxicol Lett*. 100-101 (1998) 319-327.
92. Nishina, K., Mikawa, K., Takao, Y., Shiga, M., Maekawa, N., Obara, H. Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology*. 88 (1998) 1300-1309.
93. Offermanns, S., Toombs, C. F., Hu, Y. H., Simon, M. I. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature*. 389 (1997) 183-186.
94. Pettersson, N., Emanuelsson, B. M., Reventlid, H., Hahn, R. G. High-dose ropivacaine wound infiltration for pain relief after inguinal hernia repair: a clinical and pharmacokinetic evaluation. *Reg Anesth Pain Med*. 23 (1998) 189-196.
95. Phillips, O. C., Lyons, W. B., Harris, L. C., Nelson, A. T., Graff, T. D., Frazier, T. M. Intravenous lidocaine as an adjunct to general anesthesia: a clinical evaluation. *Anesth Analg*. 39 (1960) 317-322.
96. Piazza, G. A., Ritter, J. L., Baracka, C. A. Lysophosphatidic acid induction of transforming growth factors alpha and beta: modulation of proliferation and differentiation in cultured human keratinocytes and mouse skin. *Exp Cell Res*. 216 (1995) 51-64.
97. Ridley, A. J., Hall, A. Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *Embo J*. 13 (1994) 2600-2610.
98. Rosenfeld, B. A. Benefits of regional anesthesia on thromboembolic complications following surgery. *Reg Anesth*. 21 (1996) 9-12.
99. Schmidt, W., Schmidt, H., Bauer, H., Gebhard, M. M., Martin, E. Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Anesthesiology*. 87 (1997) 617-624.
100. Seewald, S., Sachinidis, A., Dusing, R., Ko, Y., Seul, C., Epping, P., Vetter, H. Lysophosphatidic acid and intracellular signalling in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 130 (1997) 121-131.
101. Shapira, H., Amit, I., Revach, M., Oron, Y., Battey, J. F. Galpha14 and Galphaq mediate the response to trypsin in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 273 (1998) 19431-19436.
102. Shiono, S., Kawamoto, K., Yoshida, N., Kondo, T., Inagami, T. Neurotransmitter release from lysophosphatidic acid stimulated PC12 cells: involvement of lysophosphatidic acid receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 193 (1993) 667-673.

103. Simon, M. F., Chap, H., Douste-Blazy, L. Human platelet aggregation induced by 1-alkyl-lysophosphatidic acid and its analogs: a new group of phospholipid mediators? *Biochem Biophys Res Commun.* 108 (1982) 1743-1750.
104. Strichartz, G., Rando, T., Wang, G. K. An integrated view of the molecular toxinology of sodium channel gating in excitable cells. *Annu Rev Neurosci.* 10 (1987) 237-267.
105. Sullivan, L. M., Honemann, C. W., Arledge, J. A., Durieux, M. E. Synergistic inhibition of lysophosphatidic acid signaling by charged and uncharged local anesthetics. *Anesth Analg.* 88 (1999) 1117-1124.
106. Takao, Y., Mikawa, K., Nishina, K., Maekawa, N., Obara, H. Lidocaine attenuates hyperoxic lung injury in rabbits. *Acta Anaesthesiol Scand.* 40 (1996) 318-325.
107. Tigyi, G., Dyer, D. L., Miledi, R. Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91 (1994) 1908-1912.
108. Tigyi, G., Miledi, R. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem.* 267 (1992) 21360-21367.
109. Tinker, A., Williams, A. J. Charged local anesthetics block ionic conduction in the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Biophys J.* 65 (1993) 852-864.
110. Tokumura, A., Fukuzawa, K., Yamada, S., Tsukatani, H. Stimulatory effect of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregnant rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 245 (1980) 74-83.
111. Tokumura, A., Iimori, M., Nishioka, Y., Kitahara, M., Sakashita, M., Tanaka, S. Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am J Physiol.* 267 (1994) C204-210.
112. Tuman, K. J., McCarthy, R. J., March, R. J., DeLaria, G. A., Patel, R. V., Ivankovich, A. D. Effects of epidural anesthesia and analgesia on coagulation and outcome after major vascular surgery. *Anesth Analg.* 73 (1991) 696-704.
113. Udassin, R., Eimerl, D., Schiffman, J., Haskel, Y. Epidural anesthesia accelerates the recovery of postischemic bowel motility in the rat. *Anesthesiology.* 80 (1994) 832-836.
114. van Corven, E. J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T., Moolenaar, W. H. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell.* 59 (1989) 45-54.
115. van Corven, E. J., van Rijswijk, A., Jalink, K., van der Bend, R. L., van Blitterswijk, W. J., Moolenaar, W. H. Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic

- acid on fibroblasts. Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem J.* 281 ( Pt 1) (1992) 163-169.
116. Wang, G. K. Binding affinity and stereoselectivity of local anesthetics in single batrachotoxin-activated Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol.* 96 (1990) 1105-1127.
117. Wang, G. K., Wang, S. Y. Altered stereoselectivity of cocaine and bupivacaine isomers in normal and batrachotoxin-modified Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol.* 100 (1992) 1003-1020.
118. Watson, S. P., McConnell, R. T., Lapetina, E. G. Decanoyl lysophosphatidic acid induces platelet aggregation through an extracellular action. Evidence against a second messenger role for lysophosphatidic acid. *Biochem J.* 232 (1985) 61-66.
119. Wattwil, M., Thoren, T., Hennerdal, S., Garvill, J. E. Epidural analgesia with bupivacaine reduces postoperative paralytic ileus after hysterectomy. *Anesth Analg.* 68 (1989) 353-358.
120. Weiss, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. *Faseb J.* 11 (1997) 835-841.
121. Yost, C. S. G proteins: basic characteristics and clinical potential for the practice of anesthesia. *Anesth Analg.* 77 (1993) 822-834.
122. Zamponi, G. W., Soong, T. W., Bourinet, E., Snutch, T. P. Beta subunit coexpression and the alpha1 subunit domain I-II linker affect piperidine block of neuronal calcium channels. *J Neurosci.* 16 (1996) 2430-2443.
123. Zhang, Q., Checovich, W. J., Peters, D. M., Albrecht, R. M., Mosher, D. F. Modulation of cell surface fibronectin assembly sites by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol.* 127 (1994) 1447-1459.
124. Zheng, Y., Kong, Y., Goetzl, E. J. Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane. *J Immunol.* 166 (2001) 2317-2322.
125. Zink, W., Missler, G., Sinner, B., Martin, E., Fink, R. H., Graf, B. M. Differential effects of bupivacaine and ropivacaine enantiomers on intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation in murine skeletal muscle fibers. *Anesthesiology.* 102 (2005) 793-798.
126. Zondag, G. C., Postma, F. R., Etten, I. V., Verlaan, I., Moolenaar, W. H. Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem J.* 330 ( Pt 2) (1998) 605-609.

## **Lebenslauf**

Andreas Berger

Geburtsdatum: 17.08.1974

Geburtsort: Kassel

### **Schulische Ausbildung:**

1981-1985 Grundschule Großalmerode

1985-1991 Gesamtschule Großalmerode

1991-1994 Jacob Grimm Schule Kassel, Abitur

1994-1995 Zivildienst in Kassel Deutsches Rotes Kreuz

### **Universitäre Ausbildung:**

1995-2002 Medizinstudium Universität Heidelberg

2001-2002 Praktisches Jahr in Heidelberg und in Zürich (Schweiz)

2002 3. Staatsexamen 6.11.2002

### **Berufliche Ausbildung:**

01.01.2003 bis heute Assistenzarzt an der BG Unfallklinik Murnau Chirurgie

## **Danksagung**

Ich möchte meinem Betreuer Herrn Professor Hollmann und Herrn Professor Durieux für die Überlassung der Arbeit danken.

Herrn Dr. Jörg Kurz und Herrn Professor Rust danke ich herzlich für die Betreuung und Hilfestellung.

Dank gebührt auch Herrn Dipl.Ing. (FH) Raphael Schneider für seine tatkräftige Unterstützung.

Mein größter und unermesslicher Dank gilt meiner lieben Frau Luise. Ohne ihre unbeschreibliche Liebe und den nötigen Druck hätte ich nie den Mut aufgebracht diese Arbeit zu vollenden.