

Carsten Hartwig Ritter  
Dr. med.

## **Inhibition der muskarinen m3 Signalübertragung durch Lokalanästhetika**

Geboren am 20.07.1976 in Heidelberg  
Reifeprüfung am 23.06.1995 in Neckargemünd  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1996/97 bis SS 2002  
Physikum am 08.09.1998 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Houston, Texas, USA; New York, NY, USA; Heidelberg  
Staatsexamen am 04.11.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anaesthesiologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Bernhard M.. Graf

Lokalanästhetika inhibieren die Signalübertragung von bestimmten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Neben der Lysophosphatidat-(LPA)- und Thromboxan-A<sub>2</sub>-(TXA<sub>2</sub>)-Signalübertragung blockieren Lokalanästhetika auch die muskarine Signalübertragung am muskarinen m1-Rezeptor in Konzentrationen, die geringer als zur Blockade neuronaler oder kardialer Na<sup>+</sup>-Kanäle notwendig sind. Ob und in welchem Maße unterschiedlich zum m1-Rezeptor auch der muskarine m3-Rezeptor durch Lokalanästhetika inhibiert werden kann, wurde in dieser Studie in einem *Xenopus laevis* Oozyten Modell an rekombinant exprimierten muskarinen m3-Rezeptoren untersucht. Die Wirkorte von Lokalanästhetika an muskarinen Rezeptoren sollten näher charakterisiert werden.

*Xenopus laevis* Oozyten wurden mit 5 ng cRNA zur Expression des muskarinen m3-Rezeptors injiziert und 48 bis 72 h inkubiert. Mittels 2-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik wurden die durch verschiedene Methylcholin-(MCh)-Konzentrationen induzierten, Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Cl<sup>-</sup>-Einwärtsströme (I<sub>Cl(Ca)</sub>) in Oozyten gemessen und die halbmaximale Effektkonzentration (EC<sub>50</sub>) für MCh am Rezeptor bestimmt. Die Wirkungen von Lidocain und QX314, einem permanent geladenen, daher nicht membrangängigen Lokalanästhetikum, jeweils extrazellulär wie intrazellulär appliziert, als auch von Benzocain (permanent ungeladen) auf den durch MCh bei EC<sub>50</sub> ausgelösten I<sub>Cl(Ca)</sub> wurden bestimmt. Desweiteren wurde der Effekt von Lidocain (IC<sub>50</sub>) auf das Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis von MCh am m3-Rezeptor untersucht. EC<sub>50</sub> und IC<sub>50</sub> wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung berechnet. Die m3-Rezeptordichte und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante in Chinese-Hamster-Ovary-Zellmembranen wurden mittels des muskarinen m3-Rezeptorantagonisten [<sup>3</sup>H]Quinuclidinylbenzilat ([<sup>3</sup>H]QNB) festgestellt. Ebenso wurde untersucht inwieweit Lidocain in der Lage ist, an der Ligandenbindungsstelle gebundenes [<sup>3</sup>H]QNB zu verdrängen. Bindung von MCh an den muskarinen m3-Rezeptor induzierte konzentrationsabhängig einen I<sub>Cl(Ca)</sub> mit einer EC<sub>50</sub> von 4,2±0,4 x 10<sup>-7</sup> M. Eine 10-minütige Inkubation in Lidocain inhibierte die Signalübertragung am m3-Rezeptor konzentrationsabhängig und reversibel mit einer IC<sub>50</sub> von 3,70±0,76 x 10<sup>-7</sup> M. Die Applikation der IC<sub>50</sub> von Lidocain bewirkte keine signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für MCh (EC<sub>50(Kontrolle)</sub> 1,67±0,57 x 10<sup>-7</sup> M, EC<sub>50(Lidocain)</sub> 8,23± 2,58 x 10<sup>-8</sup> M), wohingegen das Wirkungsmaximum von MCh durch Lidocain um 26,7% signifikant vermindert wurde (E<sub>max(Kontr.)</sub> 5,5±0,42 μA, E<sub>max(Lidocain)</sub> 4,03±0,17 μA). Im Bindungsexperiment war Lidocain in Konzentrationen, die die m3-Signalübertragung hemmen, nicht in der Lage den spezifischen m3-Rezeptorantagonisten [<sup>3</sup>H]QNB vom m3-Rezeptor zu verdrängen. Nur in hohen Konzentrationen (10<sup>-3</sup> bzw. 10<sup>-2</sup> M) vermindert Lidocain das Binden von [<sup>3</sup>H]QNB. Die berechnete IC<sub>50</sub> war 78±9 mM. Bei

Vergleich des Bindens von [<sup>3</sup>H]QNB allein und in Anwesenheit von Lidocain bei IC<sub>20</sub> zeigte sich, daß die Hemmung von Lidocain auf das Binden von [<sup>3</sup>H]QNB nicht durch höhere Konzentrationen von [<sup>3</sup>H]QNB aufgehoben werden kann. Die Inhibition der m3-Signalübertragung durch Lidocain ist somit auf einen nicht-kompetitiven Antagonismus zurückzuführen. Extrazellulär appliziertes, permanent ungeladenes Benzocain hemmt die m3-Signaltransduktion mit einer IC<sub>50</sub> von 2,59±1,8 x 10<sup>-4</sup> M. Intrazellulär injiziertes QX314 (IC<sub>50</sub> 4,45±2,3 x 10<sup>-4</sup> M) und intrazellulär injiziertes Lidocain (IC<sub>50</sub> 3,41±0,33 x 10<sup>-4</sup> M) hemmen die m3-Signalübertragung in ähnlichen halbmaximalen Hemmkonzentrationen, was einen polaren intrazellulären Wirkort für Lidocain wahrscheinlich macht. Die starke Inhibition der m3-Signalübertragung durch extrazellulär appliziertes, membrangängiges Lidocain läßt sich am besten erklären durch den synergistischen, additiven oder evtl. auch supraadditiven Effekt zweier Bindungsstellen: einer unpolaren extrazellulären und einer polaren intrazellulären. Der Vergleich mit vorhergehenden Studien an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren macht als Lokalisation der polaren Bindungsstelle das Gα<sub>q</sub>-Protein wahrscheinlich.