

Susanne Herröder

Dr. med.

Zeitabhängige Inhibition der Signalübertragung G Protein-gekoppelter Rezeptoren durch Lokalanästhetika

Geboren am 26.11.1976 in Karlsruhe

Reifeprüfung am 12.06.1996 in Nidda

Studiengang der Fachrichtung Medizin von WS 1996/97 bis WS 2003/04

Physikum am 08.09.1998 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg/Mannheim

Praktisches Jahr in Mannheim, Charlottesville, VA, USA und San Diego, CA, USA

Staatsexamen am 27.11.2003 an der Universität Heidelberg/Mannheim

Promotionsfach: Anaesthesiologie

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

Effekte von Lokalanästhetika, wie z.B. ihre antiinflammatorischen Wirkungen, sind nicht vollständig über eine Blockade von Natriumkanälen zu erklären. Interaktionen von Lokalanästhetika mit der Signalübertragung G Protein-gekoppelter Rezeptoren scheinen in diesem Kontext eine bedeutende Rolle zu spielen. *In vitro*-Studien induzieren diese protektiven Effekte allerdings erst in deutlich höheren Lokalanästhetika-Konzentrationen als solche, die routinemäßig im Plasma nach intravenöser oder epiduraler Applikation erreicht werden. Im Gegensatz dazu, zeigen viele *in vivo*-Untersuchungen positive Effekte bereits in klinisch relevanten Konzentrationen der Lokalanästhetika (1-10 μM). Da sich die meisten Studien vor allem in der Länge der Exposition zu den Lokalanästhetika unterscheiden, wurde in vorliegender Studie untersucht, inwiefern die Inhibition der Signalübertragung G Protein-gekoppelter Rezeptoren einen zeitabhängigen Charakter aufweist, sowie mögliche Wirkorte und –mechanismen dieser Zeitabhängigkeit näher charakterisiert.

Mechanistische Fragestellungen wurden primär in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht und mittels Studien an humanen Neutrophilen für menschliche Zellen verifiziert. Zur Bestimmung der Aktivität von G Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden Agonist-induzierte Ca^{2+} -abhängige Chlorid-Einwärtsströme ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) zu verschiedenen Zeitpunkten (10 min - 48 h) nach Applikation der Lokalanästhetika mittels Voltage-Clamp-Technik gemessen. Anhand der Cytochrom C Reduktionsmethode wurden die Effekte der Lokalanästhetika auf die Signalübertragung G Protein-gekoppelter Rezeptoren von geprimten und aktivierten

Neutrophilen mittels ihrer Sauerstoffradikal Produktion bestimmt. Antisense Knock down des $G\alpha_q$ Proteins, die Inhibition diverser Proteine aus dem Signalübertragungsweg der jeweiligen Rezeptoren sowie direkte Stimulation der G Proteine, diente der näheren Charakterisierung von potentiellen Wirkorten und –mechanismen des zeitabhängigen Lokalanästhetika-Effektes. Sowohl in *Xenopus* Oozyten als auch in humanen Neutrophilen wurde die Signalübertragung G Protein-gekoppelter Rezeptoren (Lysophosphatidat (LPA)-, Thromboxan A_2 (TXA $_2$)- und Plättchen-Aktivierungs-Faktor (PAF)-Rezeptor) zeitabhängig und reversibel durch Lidocain und Bupivacain inhibiert. Nach 48-stündiger Inkubation in dem jeweiligen Lokalanästhetikum, wurde die LPA-Signalübertragung durch Bupivacain (450 μ M) vollständig und durch Lidocain (590 μ M) auf 19 ± 3 % der Kontrolle reduziert. In Neutrophilen wurde LPA- oder PAF-induziertes Priming durch sechsstündige Inkubation in Bupivacain (100 nM) auf 40 ± 1 % bzw. 47 ± 1 % der Kontrolle inhibiert. Eine Reversibilität des Effektes konnte nach prolongiertem Washout (40 h) der zuvor für sechs Stunden im Lokalanästhetikum inkubierten *Xenopus* Oozyten nachgewiesen werden. Zur näheren Charakterisierung des Wirkortes wurde QX314, ein permanent geladenes Lidocain-Analog, in Oozyten injiziert und zeigte eine ähnlich zeitabhängige Inhibition LPA-induzierter $I_{Cl(Ca)}$, wie zuvor für die anderen Lokalanästhetika beschrieben. Extrazelluläre Applikation dieser Substanz oder intrazelluläre Injektion nach Depletion des $G\alpha_q$ Proteins zeigte dagegen zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Inhibition, wodurch das $G\alpha_q$ Protein als Wirkort sehr wahrscheinlich wird. Untermuert wurden diese Daten durch extrazellulär appliziertes Lidocain, das zwar aufgrund einer extrazellulär lokalisierten Bindungsstelle für ungeladene Lokalanästhetika signifikant, jedoch nicht zeitabhängig, die LPA-Signalübertragung in $G\alpha_q$ -degradierten Oozyten inhibierte. Die Inhibition von PKC und verschiedenen Phosphatasen bewirkte zwar eine Verstärkung bzw. Verminderung der basalen Signaltransduktion, blieb jedoch ohne Einfluss auf die zeitabhängige Inhibition G Protein-gekoppelter Rezeptoren durch die Lokalanästhetika. Auch direkte Stimulation des G Proteins mittels Guanosin 5'-O-3-thiotriphosphat (GTP γ S) oder Aluminiumfluorid (AlF) zeigte eine zeitabhängige Inhibition induzierter $I_{Cl(Ca)}$ durch Bupivacain in *Xenopus* Oozyten. Da zur Induktion der Signaltransduktion durch GTP γ S, im Gegensatz zu AlF, die Freisetzung eines GDP-Moleküls vom G Protein erforderlich ist, scheint eine Interaktion mit dem GDP-GTP Austausch oder der GTPase Aktivität als Erklärung für den zeitabhängigen Effekt der Lokalanästhetika unwahrscheinlich.

Zusammenfassend konnte in vorliegender Studie gezeigt werden, dass Lokalanästhetika die Signalübertragung G Protein-gekoppelter Rezeptoren sowohl in *Xenopus* Oozyten als auch in humanen Neutrophilen zeitabhängig und reversibel inhibieren. Kritisch abhängig von der Anwesenheit des $G\alpha_q$ Proteins, scheinen Wirkort bzw. -mechanismus unterhalb der G Protein

Aktivierung lokalisiert und unabhängig von GDP-GTP Austausch oder GTPase Aktivität sowie der Wirkungen von PKC und Phosphatasen zu sein. Der zeitabhängige Charakter dieser inhibitorischen Wirkung von Lokalanästhetika stellt eine Erklärungsmöglichkeit für die beschriebene Diskrepanz der Lokalanästhetika-Konzentrationen, benötigt für die Auslösung protektiver Effekte *in vivo* und *in vitro*, dar. Klinische Effekte, die auf einer $G\alpha_q$ Protein-vermittelten Signaltransduktion basieren (z.B. Thrombozytenaggregation), könnten somit möglicherweise effektiver durch eine kontinuierliche Applikation von Lokalanästhetika gehemmt werden.