

# **Alternative membranvermittelte Wirkung von Lokalanästhetika und Psychopharmaka**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Marcel Huhn

1. Referentin: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

2. Referentin: Priv.-Doz. Dr. Claudia Muhle-Goll

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2025

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Anne S. Ulrich am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie (Lehrstuhl für Biochemie) im Zeitraum vom März 2022 bis November 2025 angefertigt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere wahrheitsgemäß, die Arbeit selbstständig verfasst, alle benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde sowie die Satzung des KIT zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet zu haben.

Karlsruhe, den 04.11.2025

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit in jedweder Weise unterstützt haben.

Mein Dank gilt zuallererst Prof. Dr. Anne S. Ulrich, die es mir erneut ermöglicht hat in ihrem Arbeitskreis an einem interessanten Thema zu arbeiten. Vielen Dank auch für die zur Verfügung gestellten Ressourcen und den Grad der Freiheit, mit dem ich an diesem Thema forschen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Sergii Afonin (*Дуже дякую*) und Dr. Stephan L. Grage. Vielen Dank für die exquisite Betreuung, das entgegengebrachte Verständnis, die Diskussionsbereitschaft, die investierte Zeit und Geduld und noch mehr Zeit und noch mehr Geduld mit mir. Besser hätte es nicht sein können.

Stefanie Vollmer möchte ich für die Planung, Expression und Reinigung der verwendeten Proteine danken. Ebenso Annika Stumpf, die daran während ihrer Abschlussarbeit mitgewirkt hat. Zudem danke ich Simon Schwarz und Mert Hamballar, die mich ebenfalls im Zuge ihrer Abschlussarbeiten unterstützt haben und mir ihre NMR-Ergebnisse teilweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Kieron Laqua-Acosta und Nataliia Petlovana danke ich für die mehr als kollegiale Atmosphäre, die ihre Anwesenheit im Labor und Büro als auch während der Praktikumsbetreuung oder auch bei Gruppenausflügen hervorbrachte. Gleichmaßen danke ich für die stete Ablenkung, aber auch für fundierte, fachliche Diskussionen, wann immer sie nötig waren.

Danke auch Eileen List für die kompetente Einweisung am Fluoreszenzmikroskop.

Vielen Dank Prof. Dr. Ferdinand le Noble bzw. seinen Mitarbeitern – Dr. Laetitia Préau, Karolin, Esther und Hiwis – für die freundliche Bereitstellung der verwendeten Zellen zur Mikroskopie, die Möglichkeit an den Mikroskopen des Arbeitskreises zu arbeiten und die gute Betreuung durch Dr. Laetitia Préau.

Danke Tamta, Frau Buth und Frau Willms für die administrative Arbeit, die hinter jedem Promovierenden steckt und auch für die Hilfe bei allen anderen organisatorischen Fragen.

Vielen Dank dem restlichen AK Ulrich, für das angenehme Arbeitsklima.



Danke schön Annika für das sorgfältige Korrekturlesen und motivierende Nachrichten. Beides hat nicht unerheblich zur Fertigstellung beigetragen.

Mein Dank gilt außerdem meiner Frau Céline und meinen Kindern Constantine und Casimir für die Geduld und das Verständnis, die sie während dieser fordernden Zeit aufgebracht haben. Die vorliegende Arbeit ist ihnen gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Lokalanästhetika .....	2
1.1.1	Pharmakologische und chemische Eigenschaften .....	3
1.1.2	Wirkmechanismus: Reversible Blockade von Natriumkanälen.....	5
1.1.3	Alternativer Wirkmechanismus: Membranvermittelte Modulation.....	6
1.1.4	Mukolytikum Ambroxol: Ein atypisches Lokalanästhetikum .....	7
1.2	Antidepressiva.....	8
1.2.1	Pharmakologische und chemische Eigenschaften .....	10
1.3	Ionenkanäle.....	11
1.3.1	Spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle .....	12
1.3.2	Säureempfindliche Ionenkanäle .....	15
1.3.3	Mechanosensitive Ionenkanäle .....	18
1.4	Membranen und Lipide.....	21
1.4.1	Lipide und Lipidvesikel .....	21
1.4.2	Phasenübergänge, Membranfluidität und lateraler Druck .....	24
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1	Veränderungen biophysikalischer Eigenschaften.....	29
3.1.1	Membran-Wasser-Verteilung via $^1\text{H}$ NMR.....	29
3.1.2	Kritische Mizellbildungskonzentration via Fluoreszenzsonde.....	33
3.1.3	Membranfluidität und Phasenübergang via Fluoreszenzpolarisation ..	38
3.1.4	Spontane Krümmung via $^{31}\text{P}$ -NMR .....	41
3.1.5	Voltmeter: Einfluss auf Lipidkopfguppen via $^2\text{H}$ NMR .....	44
3.1.6	Ordnungsparameter: Mobilität der Lipidketten via $^2\text{H}$ NMR.....	45
3.2	Modulation säureempfindlicher Kanäle .....	50
3.3	Modulation mechanosensitiver Kanäle.....	52

3.3.1	Expression von MscS und MscL .....	52
3.3.2	Einfluss von Lokalanästhetika auf MscS und MscL.....	54
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>60</b>
4.1	Einfluss von Lokalanästhetika und Psychopharmaka auf biophysikalische Parameter .....	61
4.1.1	Membran-Wasser-Verteilung .....	61
4.1.2	Kritische Mizellbildungskonzentration .....	64
4.1.3	Membranfluidität und Phasenübergang .....	66
4.1.4	Spontane Krümmung .....	67
4.1.5	Orientierung der Lipidkopfgruppen.....	69
4.1.6	Ordnungsparameter .....	70
4.2	Beeinflussung säureempfindlicher Ionenkanäle durch Lokalanästhetika ...	71
4.3	Beeinflussung mechanosensitiver Ionenkanäle durch Lokalanästhetika ....	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Material.....</b>	<b>79</b>
6.1	Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	79
6.1.1	Geräte .....	79
6.1.2	Chemikalien .....	80
6.1.3	Verbrauchsmaterial .....	82
6.2	Puffer und Lösungen .....	82
6.2.1	Proteinexpression und Reinigung .....	82
6.2.2	Fluoreszenzmikroskopie .....	87
6.2.3	Fluoreszenzmessungen am Plate Reader .....	88
6.2.4	Fluoreszenzpolarisationsmessungen am Plate Reader .....	88
6.2.5	NMR-Messungen .....	89
6.3	Software .....	89
<b>7</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>90</b>
7.1	Proteinbiochemische Methode .....	90

7.1.1	Expressionssystem und Optimierung für MscS und MscL .....	90
7.1.2	Zellaufschluss und Fraktionierung.....	91
7.1.3	Aufreinigung .....	91
7.1.4	Entsalzung .....	91
7.1.5	Konzentrationsbestimmung.....	92
7.2	Fluoreszenzbasierte Methoden .....	93
7.2.1	Elektroformation der GUVs sowie Rekonstitution von MscS/MscL .....	93
7.2.2	Calcium Influx via ASICs in humanen HEK293-Zellen .....	95
7.2.3	Thallium-Influx via MscS/MscL in artifiziellen Lipidvesikeln.....	97
7.2.4	Fluidität und Phasenübergang über Fluoreszenzpolarisation.....	99
7.2.5	Kritische Mizellbildungskonzentration via Coumarin-6 .....	100
7.3	Kernspinresonanzbasierte Methoden.....	101
7.3.1	<sup>1</sup> H-NMR Membran-Wasser-Verteilungskoeffizient .....	101
7.3.2	<sup>31</sup> P-NMR Phasenübergang und spontane Krümmung .....	103
7.3.3	<sup>2</sup> H-NMR Einfluss auf Kopfgruppen via Voltmeter-Experiment.....	106
7.3.4	<sup>2</sup> H-NMR Mobilität der Lipidketten .....	107
7.4	Andere analytische Methoden .....	109
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>127</b>
9.1	Struktur der eingesetzten Lipide.....	127
9.2	Struktur der untersuchten Lokalanästhetika .....	128
9.3	Struktur der untersuchten Antidepressiva .....	129
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>12</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>132</b>
12.1	Publikationen in Fachjournalen und in Vorbereitung .....	132
12.2	Tagungsbeiträge .....	133

# Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetoxymethylester (engl. <i>acetoxymethylester</i> )
ANTS	8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure
ASIC	Säureempfindliche Ionenkanäle (engl. <i>acid-sensing-ion-channel</i> )
ATP	Adenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
C <sub>n</sub>	Kohlenstoffatome
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration (engl. <i>critical micelle concentration</i> )
2D <sub>c</sub>	effektive Membrandicke des Acylkettenbereichs
DCM	Dichlormethan
DEG/ENaC	Degenerin-/epithelialer Natriumkanal-Superfamilie (engl. <i>degenerin/epithelial sodium channel</i> )
DIL	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'- Tetramethylindocarbocyanin-perchlorat
DMF	Dimethylformamid
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPCd <sub>54</sub>	1,2-Dimyristoyl-d <sub>54</sub> -sn-glycero-3-phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin

DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]
DPH	Diphenylhexatrien
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPX	p-Xylen-bis(N-Pyridiniumbromid)
ECB <sub>F</sub>	Extrazellulärer Puffer für die Fluoreszenzmikroskopie
GABA	Gamma-Aminobuttersäure (engl. gamma aminobutyric acid)
GUV	Riesige unilamellare Vesikel (engl. <i>giant unilamellar vesicle</i> )
HCl	Salzsäure (engl. hydrochloric acid)
HEK293	Humane embryonale Nieren 293-Zellen (engl. <i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i> )
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HII	invertierte hexagonale Phase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITO	Indium-Zinn-Oxid (engl. <i>indium tin oxide</i> )
LB	Lysogenie-Brühe (engl. <i>lysogeny broth</i> )
LUV	Große unilamellare Vesikel (engl. <i>large unilamellar vesicle</i> )
MLV	Multilamellare Vesikel (engl. <i>multilamellar vesicle</i> )
MscK	kaliumabhängiger, mechanosensitiver Kanal geringer Leitfähigkeit
MscL	mechanosensitiver Kanal großer Leitfähigkeit

MscM	mechanosensitiver Kanal minimaler Leitfähigkeit
MscS	mechanosensitiver Kanal geringer Leitfähigkeit
MVV	Multivesikuläre Vesikel (engl. <i>multivesicular vesicle</i> )
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Nls	N-Lauroylsarkosin Natriumsalz
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	Kernspinresonanz [-Spektroskopie] (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
PDB	Proteindatenbank (engl. <i>protein data bank</i> )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
S <sub>CD</sub>	Ordnungsparameter
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SUV	Kleine unilamellare Vesikel (engl. <i>small unilamellar vesicle</i> )
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

\*Für kanonische Aminosäuren wurde der standardisierte Drei- bzw. Einbuchstabencode verwendet.

# 1 Einleitung

Schmerz stellt global betrachtet eines der am häufigsten zu behandelnden Symptome dar und ist sowohl sensorisch als auch emotional unangenehm. Dabei kann zwischen akuten Schmerzen, die häufig mit einer Verletzung einhergehen, als auch chronischen Schmerzen, die über den Zeitrahmen der Verletzung und Heilung hinaus reichen, unterschieden werden. In den letzten Jahren hat die Prävalenz für chronische Schmerzen zugenommen und wird derzeit auf ca. 20% der Weltbevölkerung geschätzt.<sup>1-3</sup> Nebst der Behandlung der zugrunde liegenden Krankheit oder Verletzung steht dabei die Schmerzlinderung im Fokus. Um diese zu gewährleisten, werden globale, aber auch lokale Anästhetika eingesetzt. Diese sind auch aus palliativmedizinischer Sicht von großer Bedeutung in einer im Schnitt stetig alternden Gesellschaft. Hierbei ist es enorm wichtig die zugrundeliegenden Wirkmechanismen umfassend zu verstehen, sodass mögliche Nebenwirkungen vermieden werden können und eine möglichst effiziente Behandlung durchgeführt werden kann. Lokalanästhetika sind eine Wirkstoffgruppe, die seit ihrer Entdeckung 1860 durch Albert Niemann, und der Extraktion des Wirkstoffs Kokain aus den Blättern von *Erythroxylum coca*, rasant an Bedeutung gewann.<sup>4</sup> Schnell kristallisierte sich heraus, dass die Gefahr der Abhängigkeit als auch eine potentielle systemische Toxizität für medizinisches Personal und Patienten den medikamentösen Gebrauch von Kokain ausschloss. Trotz des hohen Bedarfs an Lokalanästhetika wurde es daher nicht mehr eingesetzt.<sup>5</sup> In den nächsten 80 Jahren brachte die organische Chemie viele Medikamente hervor, die den Bedarf nach sicheren, nebenwirkungsfreien und effektiven Lokalanästhetika zufrieden stellen sollte. Heutzutage gehören Lokalanästhetika laut der Weltgesundheitsorganisation zu den wichtigsten Medikamenten.<sup>6</sup> Aufgrund dessen ist es von essentieller Bedeutung Wissen über diese Arzneistoffe zu akkumulieren, wobei ein besonderes Augenmerk auf dem zugrundeliegenden Wirkmechanismus ruhen sollte. Dabei wurde bisher angenommen, dass der anästhetische Effekt durch eine Blockade spannungsgesteuerter Natriumkanäle ausgelöst wird. In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass es spezifische Bindungsstellen der Ionenkanäle innerhalb des Lumens der Zellmembran gibt, an die Lokalanästhetika nach ihrem Durchtritt durch die Membran aus dem Zytosol heraus binden.<sup>7-9</sup> Seit der Jahrtausendwende wurden jedoch weitere Zielproteine identifiziert, die durch Lokalanästhetika beeinflusst werden. Die meisten davon befinden sich in oder an der Membran. Darüber hinaus bleibt festzustellen, dass



trotz ihrer strukturellen Unterschiede Lokalanästhetika auf das gleiche Zielmolekül wirken können.<sup>10,11</sup> Außerdem wurden neben den klassischen analgetischen Effekten der Lokalanästhetika weitere Wirkungen festgestellt, zu denen antithrombotische, antiinflammatorische und immunmodulierende Eigenschaften zählen.<sup>12–14</sup> All diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass der bisher akzeptierte Mechanismus die tatsächlichen Vorgänge während des Einsatzes von Lokalanästhetika nicht vollständig widerspiegelt. Dabei rückt zunehmend die Membran selbst als aktiver Bestandteil des Wirkmechanismus in den Fokus, da sie durch ihre Struktur und Dynamik entscheidend zur Regulation membranständiger Proteine beiträgt. Diese Arbeit konzentriert sich daher darauf wissenschaftlich fundierte Hinweise zu finden, die die Theorie eines membranvermittelten Wirkmechanismus untermauern. Dazu werden verschiedene Eigenschaften von Modellmembranen und Proteinen unter Einfluss von Lokalanästhetika und anderen Amphiphilen untersucht.

### 1.1 Lokalanästhetika

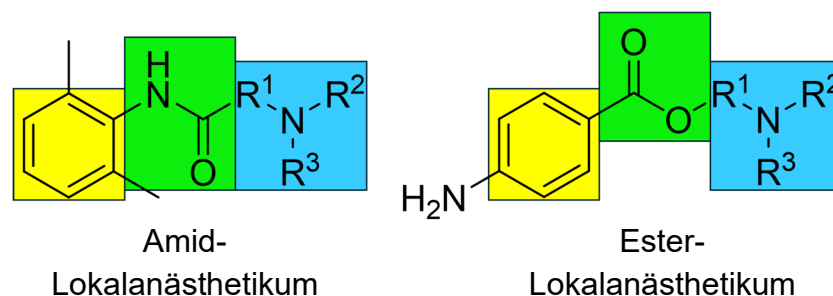
Lokalanästhetika rufen eine reversible Hemmung der Erregungsleitung in peripheren Nerven hervor. Wirkungsziel ist dabei die Schmerzausschaltung bei erhaltenem Bewusstsein.<sup>15</sup> Eingesetzt werden sie hauptsächlich in der Zahnmedizin, der Regionalanästhesie und bei kleineren chirurgischen Eingriffen, aber auch in der Schmerztherapie zur Behandlung von akuten und chronischen Schmerzen.<sup>16</sup> Differenziert werden können Lokalanästhetika von anderen Schmerzmitteln, die in zwei Klassen aufgeteilt sind: Opioide und nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente.<sup>17,18</sup> Bei diesen treten jedoch verschiedene Nebenwirkungen auf, wodurch sie zum Einsatz bei chronischen Schmerzen weniger geeignet sind. Opioide verursachen beispielsweise Atemdepressionen, Abhängigkeit, Verstopfung, Übelkeit und Erbrechen, wohingegen nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente Geschwüre im Verdauungstrakt, Gerinnungsstörungen, sowie Leber- und Nierenfunktionsstörungen hervorrufen können.<sup>19,20</sup> Im Gegensatz dazu sind Lokalanästhetika durch ihre lokale Verabreichung vorteilhafter, da so die gewünschte Wirkung wesentlich gezielter eintreten kann. Sofern diese nicht unbeabsichtigt in die Blutbahn injiziert werden ist deren Konzentration in derselben gering, was sich in weniger systemischen Nebenwirkungen widerspiegelt.<sup>21</sup> Betrachtet man die Anästhesie aus einem größeren, molekularen Blickwinkel, so können Lokalanästhetika auch in einen Kontext zu Narkotika und Toxinen gestellt werden. Allgemeine Anästhetika, wie Xenon, Chloroform oder Halothan, besitzen eine kompakte

## Einleitung

hydrophobe Struktur. Ihr Mangel an struktureller Komplexität deutet darauf hin, dass sie keine spezifische Proteinbindung eingehen. Daher wird ihnen ein indirekter, über die Membran vermittelter Effekt zugeschrieben.<sup>22,23</sup> Toxine stellen hingegen mit ihrer höheren strukturellen Komplexität und hohen Hydrophilie das entgegengesetzte Extrem dar. Sie weisen zahlreiche polare, geladene und hydrophobe Bereiche auf, die spezifische Interaktionen vermuten lassen, welche meist schon bei nanomolaren Konzentrationen stattfinden können. Effekte, die durch eine Modulation der Membraneigenschaften stattfinden sind durch die hohe Wasserlöslichkeit eher unwahrscheinlich. Lokalanästhetika nehmen mit ihrer amphiphilen Molekülstruktur eine Position zwischen diesen beiden Extremen ein. Ihre Struktur erlaubt einerseits eine effektive Partitionierung in die Lipidmembran und damit die Möglichkeit unspezifische membranvermittelte Effekten (ähnlich wie Narkotika) auszuüben, andererseits bleibt durch ihre polaren und ionisierbaren Gruppen die Fähigkeit zu spezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen, beispielsweise mit Ionenkanälen (ähnlich wie Toxine), erhalten.<sup>24</sup>

### 1.1.1 Pharmakologische und chemische Eigenschaften

Alle Lokalanästhetika weisen eine sehr ähnliche Struktur auf: Der hydrophobe Teil des Moleküls, der aus einem aromatischen Ring mit verschiedenen Substituenten besteht, ist über einen intermediären Ester oder ein Amid mit einem polaren tertiären Amin verbunden (Abbildung 1).<sup>25</sup> Entsprechend werden diese Lokalanästhetika dann als Amid- oder Ester-Typ bezeichnet.



**Abbildung 1: Struktur von Amid- und Ester-Lokalanästhetika**

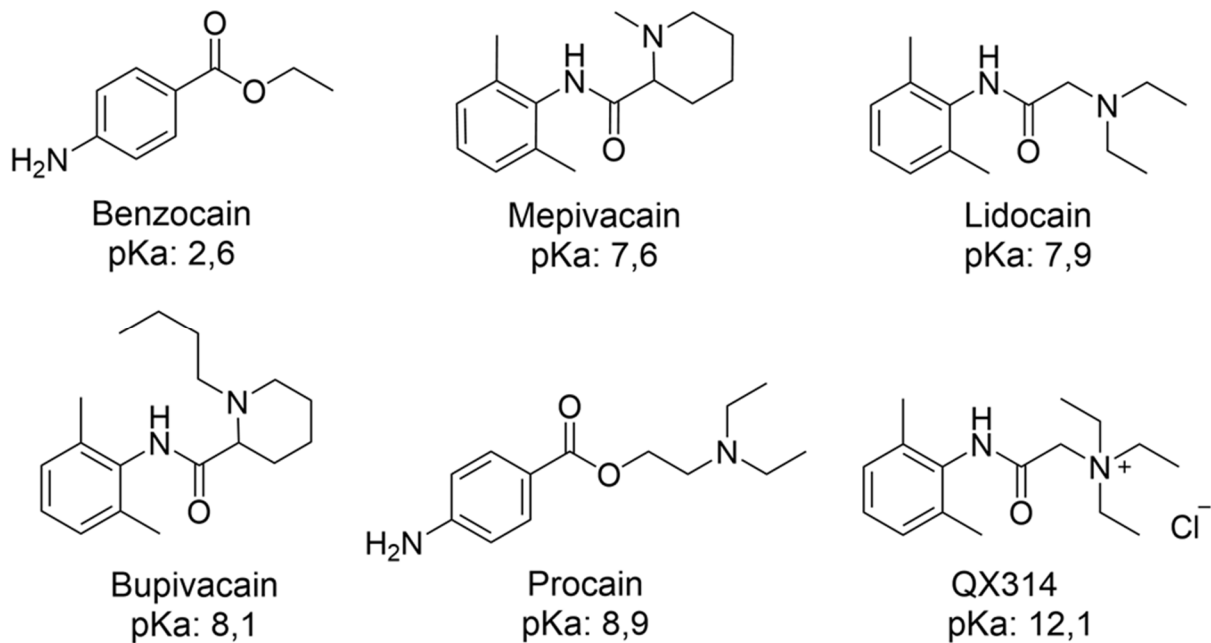
In Gelb ist der lipophile aromatische Ring dargestellt; grün hinterlegt ist der intermediäre Linker, welcher entweder ein Amid oder Ester ist; hellblau gefärbt ist das tertiäre Amin.

Diese Klassifizierung erlaubt es auch, den Abbauweg des jeweiligen Lokalanästhetikums zu bestimmen. Amide werden zur Leber transportiert und dort von verschiedenen Cytochrom-P450-Enzymen abgebaut, wohingegen Ester im Blutplasma durch Pseudocholinesterasen degradiert werden.<sup>25,26</sup> Zu den Amid-Lokalanästhetika zählen unter anderem: Mepivacain, Lidocain, Etidocain, Bupivacain,

## Einleitung

Levobupivacain, Articain, Ropivacain und QX314, wobei Articain in der Seitenkette seines aromatischen Rings einen Ester aufweist und durch Hydrolyse desselben inaktiv wird. QX314 ist ein rein experimentelles Lidocainderivat und wird klinisch nicht eingesetzt. Reine Amid-Lokalanästhetika sind strukturbedingt chemisch stabiler in Lösung. Zu den Ester-Lokalanästhetika zählen Procain, Chloroprocain, Tetracain und Benzocain.<sup>16</sup> Diese werden schneller metabolisiert als Amid-Lokalanästhetika und weisen ein erhöhtes Risiko bezüglich allergischer Reaktionen auf, da Metabolite der para-Aminobenzoesäure freigesetzt werden.<sup>27</sup> Je nach Aufbau unterscheiden sich die Lokalanästhetika in ihren Eigenschaften. Dazu zählen unter anderem die Anschlagszeit, die zwischen 1 – 30 Minuten liegt, die Wirkdauer, die 15 Minuten bis zu 12 Stunden beträgt und darüber hinaus durch erneute Gabe des Lokalanästhetikums verlängert werden kann sowie die einzusetzende Konzentration der Lokalanästhetika-Lösung, die typischerweise zwischen 0,1 und 5 w/v % liegt.<sup>11,27</sup> Wie alle Substanzen weisen auch Lokalanästhetika bei entsprechend hoher Dosierung eine systemische Toxizität auf. Diese wirkt sich einerseits auf das zentrale Nervensystem, andererseits auf das Herz-Kreislaufsystem aus. Symptome bei Lokalanästhetika-Intoxikation umfassen einen metallischen Geschmack, Hörveränderungen, Schläfrigkeit, Taubheitsgefühle im Bereich der Mundhöhle, verschwommenes Sehen, Unruhe und Krampfanfälle, gefolgt von Hypotonie, verminderter Herzkontraktilität, Herzrhythmusstörungen, vollständiger Herzblockade und schließlich Herz-Kreislauf-Kollaps.<sup>16,28</sup> Bei Überdosierung von Lokalanästhetika wird als erste Maßnahme intravenös eine Lipidemulsion verabreicht. Durch den teilweise lipophilen Charakter der Lokalanästhetika werden diese dann im Blutplasma gebunden. Die Lipophilie steht außerdem in direktem Zusammenhang mit einer stärkeren bzw. längeren Wirkung, wohingegen eine gewisse Hydrophilie notwendig ist, um eine Löslichkeit im Blut zu gewährleisten. Benzocain ist beispielsweise so hydrophob, dass es nur topisch angewendet wird.<sup>29,30</sup> In dieser Arbeit wird eine Auswahl an Amid- und Ester-Lokalanästhetika untersucht, die ein möglichst großes Spektrum an Protonierungsgraden abdeckt. QX314 ist dabei unter physiologischen Bedingungen vollständig protoniert und weist einen  $pK_a$ -Wert der Amid-Gruppe von 12,1 auf (Abbildung 2).<sup>31</sup> Auf der anderen Seite des Protonierungsspektrums steht Benzocain, das mit einem  $pK_a$ -Wert von 2,6 beinahe vollständig unprotoniert vorliegt.<sup>32</sup> Die  $pK_a$ -Werte der Lokalanästhetika Lidocain mit 7,9, Procain mit 8,9, Mepivacain mit 7,6 und Bupivacain mit 8,1 liegen hierbei zwischen den beiden untersuchten Extrema.<sup>11</sup>

## Einleitung



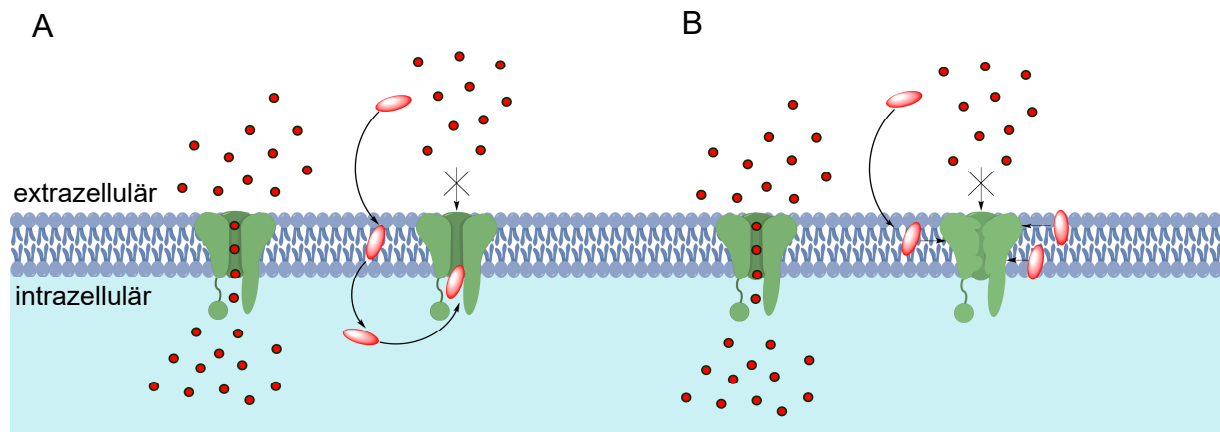
**Abbildung 2: Untersuchte Lokalanästhetika in dieser Arbeit**

Zusätzlich zur jeweiligen Struktur der Lokalanästhetika sind auch deren pK<sub>a</sub>-Werte aufgeführt, die für deren Protonierungsgrad bei physiologischen Bedingungen interessant sind. Die Amid-Lokalanästhetika sind vertreten mit Lidocain, Mepivacain, Bupivacain und QX314. Zu den Ester-Lokalanästhetika zählen Procain und Benzocain.

### 1.1.2 Wirkmechanismus: Reversible Blockade von Natriumkanälen

Im klassischen Modell blockieren Lokalanästhetika reversibel spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle, wodurch ein Einstrom von Natriumionen in die Zelle verhindert wird. Dadurch wird die Depolarisation unterbunden, die für die Weiterleitung von Aktionspotenzialen und schlussendlich Schmerz notwendig wäre. Die Bindungsstelle hierfür liegt intrazellulär in der  $\alpha$ -Untereinheit, jeweils Transmembransegment 6 der Domänen I, III und IV. Um diese zu erreichen, müssen Lokalanästhetika die Membran durch Diffusion überwinden, was ihnen nur im ungeladenen Zustand möglich ist, intrazellulär protoniert werden, um aktiv zu sein, und dann an die spannungsgesteuerten Natriumionenkanäle binden (Abbildung 3A). Da lediglich die nicht-ionisierte Form von Lokalanästhetika die Zellmembran überwinden kann ist es von großer Bedeutung, den pH-Wert an der Anwendungsstelle zu kontrollieren. Entzündungen erzeugen eine saure Umgebung, wodurch Moleküle eher ionisiert werden. Dadurch können weniger Moleküle die Membran passieren. Die Effizienz einer Lokalanästhetikum-Lösung kann somit durch Zugabe von Natriumbicarbonat durch Alkalisierung gesteigert werden, da der Anteil an nicht-ionisierten Molekülen durch den basischeren pH-Wert erhöht wird.<sup>33</sup>

## Einleitung



**Abbildung 3: Wirkmechanismen von Lokalanästhetika**

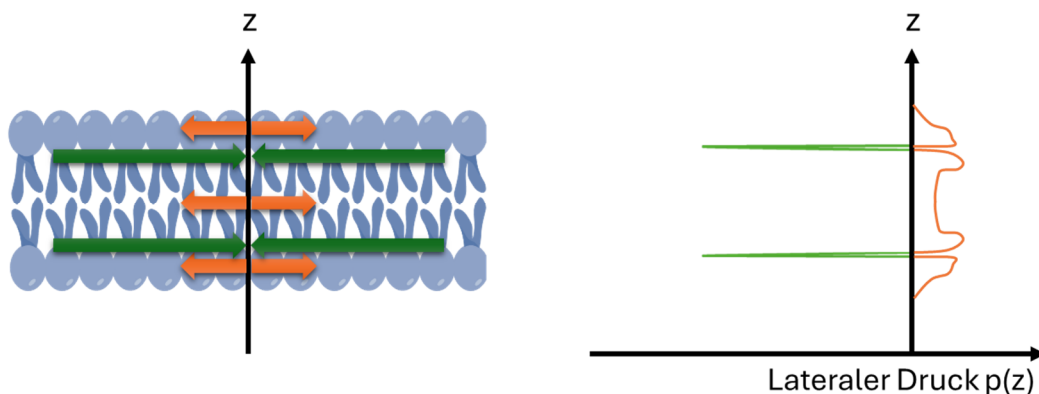
**A** klassischer Wirkmechanismus von Lokalanästhetika (oval hellrot). Ungeladene Moleküle diffundieren durch die Zellmembran, werden intrazellulär protoniert und binden aus dem Zytosol heraus an die Bindungsstelle der Natriumionenkanäle (grün). **B** Alternativer membranvermittelter Mechanismus: Lokalanästhetika diffundieren zum Teil in die Membran, verbleiben dort und erhöhen so den lateralen Druck, was zu einer Konformationsänderung membranständiger Proteine führt.

### 1.1.3 Alternativer Wirkmechanismus: Membranvermittelte Modulation

Neben spannungsgesteuerten Natriumionenkanälen modulieren Lokalanästhetika weitere Ziele, zu denen einerseits membranständige, aber auch oberflächlich an die Membran assoziierte Proteine zählen. Darüber hinaus werden ebenfalls intrazelluläre, lösliche Proteine beeinflusst.<sup>10,11,24</sup> Die Modulation so vieler verschiedener molekularer Ziele kann nicht über eine spezifische Bindung, sondern nur über einen membranvermittelten Wirkmechanismus erklärt werden. Für die Membranvermittlung wurden bislang unterschiedliche Modelle vorgeschlagen. Einerseits beschreibt Tsuchiya *et al.*<sup>34</sup>, dass Lokalanästhetika mit Lipid-Rafts innerhalb der Membran interagieren können. Diese Lipid-Mikrodomänen sind dicht gepackt und bestehen hauptsächlich aus Sphingolipiden und Cholesterin. Sie bilden funktionell wichtige, proteinreiche Cluster. Dadurch, dass Lokalanästhetika die Lipidordnung senken und die Fluidität der Membran erhöhen, können diese Lipid-Rafts aufgelöst werden. Dies würde die Beeinflussung von GABA-, NMDA- oder auch G-Protein-gekoppelten Rezeptoren erklären.<sup>24,34–36</sup> Desweiteren existiert ein 2005 vorgestelltes Modell, nach dem die Ausbreitung von Nervenimpulsen in Form von Solitonen abläuft. Diese verlustfrei laufenden Druckwellen breiten sich in nichtlinearen dispersiven Medien, wie Lipidmembranen nahe ihrem Phasenübergang, aus. Durch die Absenkung der Phasenübergangstemperatur durch Lokalanästhetika kann keine Ausbreitung über Solitonen mehr erfolgen.<sup>24,37</sup> Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Lokalanästhetika durch ihre Insertion im amphiphilen Bereich das laterale Druckprofil innerhalb der Membran verändern. Dies ist ein entscheidender physikalischer Parameter in

## Einleitung

biologischen Membranen, der Struktur und damit Funktion von Membranproteinen beeinflussen kann. Durch ihre unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften erzeugen Lipide in einer Membran über diese hinweg ein charakteristisches Druckprofil. In verschiedenen Regionen der Lipiddoppelschicht weist dieses unterschiedliche laterale Druckbeiträge auf. Ein positives Druckmaximum herrscht hierbei in der Kopfgruppen- und hydrophoben Alkylkettenregion, wohingegen im Bereich der Glycerol-Esterbindungen eine, durch hydrophobe Wechselwirkungen bedingte, Anziehungskraft vorliegt (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Laterales Druckprofil einer Lipidmembran**

Die Anziehungskraft der Oberflächenspannung an der Wasser-Membran-Oberfläche, in grün, wird durch den abstoßenden, lateralen Druck in der Kopfgruppen- und Membrankernregion, in orange, ausgeglichen. Somit variiert der laterale Druck  $p(z)$  in Bezug auf die Membrantiefe  $z$  (Abbildung erstellt in Anlehnung an Grage *et al.*<sup>24</sup>).

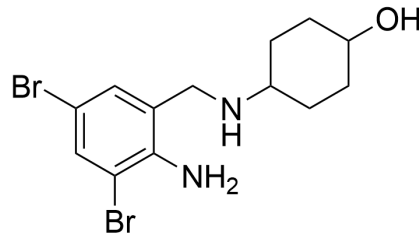
Eine Modulation des lateralen Druckprofils findet bei Einlagerung von Lokalanästhetika statt. Dabei beeinflussen diese den lateralen Druck je nach Eindringtiefe in die Membran unterschiedlich. Tief eindringende Lokalanästhetika stören das negative Druckminimum im Esterbereich, was starke Auswirkungen auf integrale Membranproteine haben kann. Eine Spannungsänderung in der Membran kann demnach eine Konformationsänderung von Rezeptoren und Kanälen begünstigen oder behindern (Abbildung 3B). Dieser Mechanismus hängt nicht von spezifischen Bindungsstellen an Proteinen ab, sondern erklärt das breite Wirkungsspektrum von Lokalanästhetika mittels physikalischer Membraneigenschaften.<sup>24,38,39</sup>

### 1.1.4 Mukolytikum Ambroxol: Ein atypisches Lokalanästhetikum

Ambroxol wird primär als mukolytisches Medikament bei Atemwegserkrankungen eingesetzt. Es handelt sich dabei um die hydrolysierte Form des Bromhexins. Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, Bronchitis und andere Krankheiten mit produktiven Hustenformen lassen sich mittels Ambroxol behandeln, da es durch Reduktion der Schleimviskosität dessen Abtransport fördert. Neben seiner schleimlösenden Wirkung besitzt Ambroxol allerdings auch interessante

## Einleitung

pharmakologische Nebenwirkungen, insbesondere ausgeprägte lokalanästhetische Eigenschaften.<sup>40</sup> Strukturell betrachtet ist Ambroxol ein Arylalkylamin, mit einem bromierten aromatischen Ring, einer aliphatischen Aminogruppe und einer Hydroxygruppe am Cyclohexan (Abbildung 5).



Ambroxol  
pKa: 9,2

### Abbildung 5: Struktur des Mukolytikums Ambroxol

Ein aromatischer, zweifach bromierter Ring, der über eine Aminogruppe mit einer Cyclohexanolgruppe verbunden ist und dadurch einen amphiphilen Charakter aufweist. Ambroxol zeigt somit strukturelle Ähnlichkeiten zu Lokalanästhetika auf.

Trotz fehlender Amid- oder Esterbindung weist Ambroxol eine den genannten Lokalanästhetika ähnliche Struktur auf. Die lipophile aromatische Gruppe und die basische Aminogruppe versetzen es in die Lage, sowohl ausreichend wasserlöslich als auch lipophil genug zu sein, um Zellmembranen durchdringen zu können. Mit einem pK<sub>a</sub>-Wert von 9,2 gliedert es sich in einem ähnlichen Bereich wie die übrigen Lokalanästhetika ein.<sup>41</sup> Es sind daher ähnliche amphiphile Eigenschaften wie bei Lokalanästhetika gegeben. Neben spannungsgesteuerten Natriumionenkanälen blockiert Ambroxol auch Calciumkanäle. Erwähnenswert ist darüber hinaus, dass Ambroxol bevorzugt den Natriumkanalsubtyp Nav1.8 blockiert. Ob dieser Subtyp nun selektiver durch Ambroxol gebunden wird oder anfälliger für Veränderungen in der Membran bzw. dem lateralen Druck ist, bleibt bislang offen.<sup>40,42–44</sup>

## 1.2 Antidepressiva

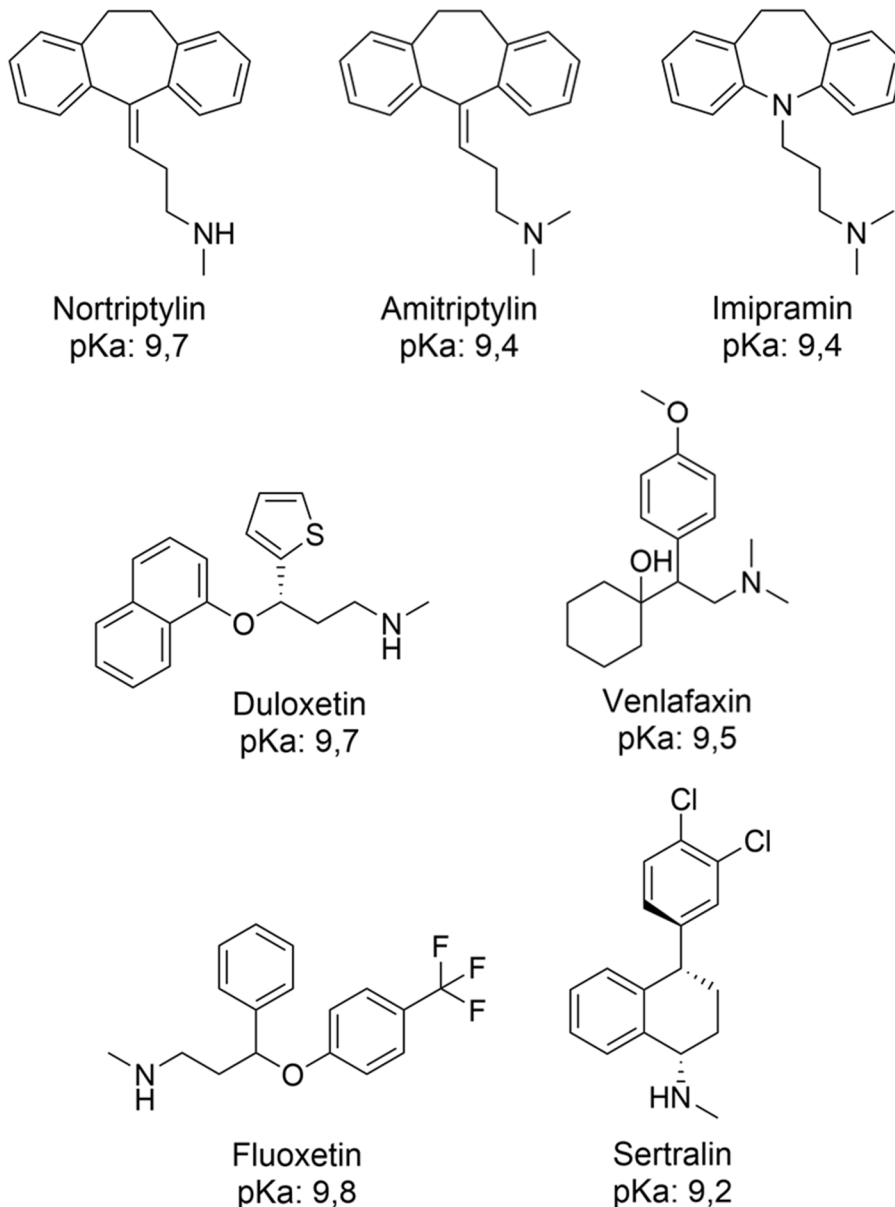
Nach den zuvor beschriebenen Lokalanästhetika, deren Wirkung maßgeblich durch membranvermittelte Mechanismen beeinflusst wird, rücken zunehmend auch psychotrope Substanzen wie Antidepressiva in den Fokus ähnlicher Überlegungen.<sup>45</sup> Diese Wirkstoffe stellen eine weitere interessante, heterogene Gruppe amphiphiler Moleküle dar, die primär zur Behandlung depressiver Störungen eingesetzt werden. Darüber hinaus existieren mittlerweile weitere Anwendungsmöglichkeiten, die auf der Eigenschaft von Antidepressiva beruhen, zentrale Prozesse zu beeinflussen, wie zum

## Einleitung

Beispiel Motivation und Stimmung, sowie vegetative Funktionen und Schmerzverarbeitung. Insbesondere Letzteres stellt sich dabei als Bindeglied zu den bereits vorgestellten Lokalanästhetika dar, da Antidepressiva teilweise Membraninteraktionen aufweisen und ebenfalls Ionenkanäle modulieren. Schlussendlich nehmen sie Einfluss auf die Konzentration bestimmter Neurotransmitter im Gehirn, wie Dopamin, Noradrenalin und Serotonin, um stimmungsstabilisierend bzw. symptomlindernd zu wirken.<sup>46,47</sup> Zu den Hauptklassen von Antidepressiva zählen unter anderem trizyklische Antidepressiva, die die Wiederaufnahmen von Serotonin und/oder Noradrenalin in präsynaptischen Neuronen hemmen. Beispiele hierfür sind Amitriptylin, Imipramin und Nortriptylin (Abbildung 6). Chronische und neuropathische Schmerzen sowie Fibromyalgie werden ebenfalls mit trizyklischen Antidepressiva behandelt, auch wenn sie im Allgemeinen heutzutage nicht mehr als Erstlinientherapie eingesetzt werden, aufgrund ihrer Nebenwirkungen wie Sedierung und anticholinergischer Effekte.<sup>48,49</sup> Die zweite Klasse, deren Vertreter Fluoxetin und Sertralin umfassen (Abbildung 6), ist die der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer. Im Vergleich zu trizyklischen Antidepressiva sind sie besser verträglich. Anwendung finden sie bei Angststörungen und Depressionen, wohingegen ein Einsatz zur Schmerzbehandlung eher begrenzt und inkonsistent ist.<sup>50</sup> Ein geringeres Nebenwirkungsprofil weist auch die letzte hier vertretene Gruppe der Antidepressiva auf, die Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer, wobei bei diesen Übelkeit und Schlaflosigkeit auftreten können. Zu den hier untersuchten Vertretern dieser Klasse zählen Duloxetin und Venlafaxin (Abbildung 6). Sie werden ebenfalls zur Behandlung von Depressionen und Angststörungen eingesetzt, finden aber wie trizyklische Antidepressiva auch Einsatz bei neuropathischen Schmerzen und Fibromyalgie.<sup>51</sup> Darüber hinaus gibt es noch Monoaminoxidase-Hemmer, die das namensgebende Enzym hemmen, welches für den Abbau von Neurotransmittern zuständig ist. Da sich einige Antidepressiva aufgrund ihrer Struktur in Lipidmembranen einlagern, ist es auch in diesem Fall interessant zu sehen, ob sie, ähnlich wie für Lokalanästhetika vorgeschlagen, Einfluss auf Fluidität und Spannung der Membran nehmen und dadurch indirekt, membranvermittelt Proteine beeinflussen. Amitriptylin und Imipramin blockieren ebenfalls Natriumionenkanäle und verhindern dadurch eine Schmerzweiterleitung. Im Unterschied zu Lokalanästhetika wirken Antidepressiva aber nicht lokal, sondern haben eine systemische Wirkung bedingt durch ihre Verabreichungsform und resultierenden Verteilung im Organismus.<sup>46,47</sup>



## Einleitung



**Abbildung 6: Untersuchte Antidepressiva in dieser Arbeit**

Zusätzlich zur jeweiligen Struktur der Antidepressiva sind auch deren pK<sub>a</sub>-Werte aufgeführt, die für deren Protonierungsgrad bei physiologischen Bedingungen interessant sind. Untersuchte trizyklische Antidepressiva umfassen Amitriptylin, Nortriptylin und Imipramin. Fluoxetin und Sertralin zählen zu den selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer und Duloxetin sowie Venlafaxin gehören zu den Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer.

### 1.2.1 Pharmakologische und chemische Eigenschaften

Trotz struktureller Unterschiede der einzelnen Antidepressiva weisen diese einige gemeinsame Merkmale auf. Typisch ist auch hier, wie bei den Lokalanästhetika, ein amphiphiler Charakter. Ein großes aromatisches oder heterozyklisches Grundgerüst als lipophiler Part ist dabei über eine Alkylkette mit einer basischen Aminogruppe verbunden. Diese Struktur ermöglicht es, sowohl mit Zellmembranen zu interagieren, als auch durch ihre erhöhte Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.<sup>47,48,52</sup> Als weitere Gemeinsamkeit zählt die überwiegend hepatische Metabolisierung.

## Einleitung

Dabei werden Antidepressiva von verschiedenen Cytochrom-P450-Enzymen umgesetzt, wobei viele Metabolite ebenfalls pharmakologisch aktiv sind und außerdem meist eine längere Halbwertszeit als die Ursprungssubstanz besitzen. So wird beispielsweise Amitriptylin zu Nortriptylin und Imipramin zu Desipramin umgesetzt.<sup>53,54</sup> Neben ihrer eigentlichen Wirkweise als Neurotransmitter-Wiederaufnahmehemmer zeigen viele Antidepressiva noch andere Eigenschaften.<sup>52</sup> Venlafaxin blockiert Natriumionenkanäle und aktiviert  $\mu$ - und  $\delta$ -Opioidrezeptoren.<sup>55–59</sup> Calciumionenkanäle werden durch Duloxetin und Fluoxetin blockiert.<sup>60</sup> Letzteres verstärkt auch die Funktion des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors. Diese Eigenschaft zeigen auch trizyklische Antidepressiva wie Amitriptylin und ein Metabolit des hier untersuchten Imipramins, das Desipramin.<sup>61</sup> Darüber hinaus aktiviert Amitriptylin den A1-Adenosinrezeptor.<sup>62</sup> Interessanterweise wurde bereits im Vergleich mit Bupivacain gezeigt, dass trizyklische Antidepressiva teilweise als Lokalanästhetika wirken.<sup>57</sup> Viele Nebenwirkungen beruhen auf diesen Rezeptoraktivitäten außerhalb des gewünschten Wirkungsbereiches. Symptome einer Überdosierung reichen durch die dann anticholinergen, sedierenden und kardiovaskulären Effekte von Unruhe, Krampfanfällen, Tremor über Herzrhythmusstörungen bis hin zu Koma und Tod. Verschiedene Antidepressiva besitzen noch weitere Nebenwirkungen, auf die hier aber nicht weiter eingegangen wird.<sup>52</sup> Die untersuchten Antidepressiva weisen alle einen höheren  $pK_a$ -Wert (Abbildung 6) als die meisten Lokalanästhetika auf und liegen daher unter physiologischen Bedingungen eher protoniert vor.<sup>63</sup> Dadurch können weniger unprotonierte Moleküle durch die Zellmembran diffundieren.

### 1.3 Ionenkanäle

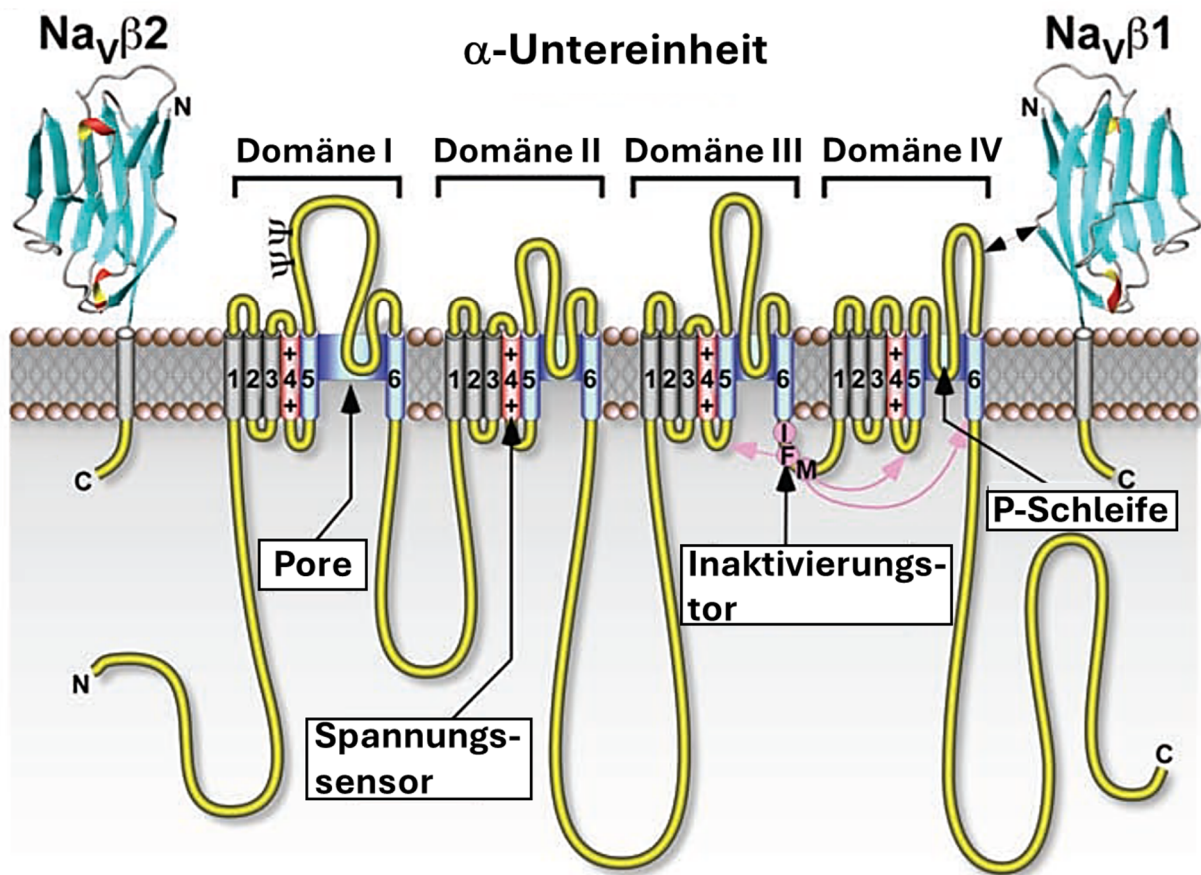
Im klassischen Wirkungsbild der Lokalanästhetika sind Natriumkanäle die Hauptzielstruktur, über deren Inhibition durch spezifische Bindung die Schmerzweiterleitung unterbrochen wird. Demgegenüber stehen die in dieser Arbeit verwendeten mechanosensitiven und säureempfindlichen Ionenkanäle, die keine bekannten spezifischen Bindungsstellen aufweisen und daher als Modellsysteme dienen können, um indirekte membranvermittelte Wirkungen amphiphiler Moleküle zu untersuchen. Proteine erfüllen verschiedenste Aufgaben in Organismen. Ionenkanäle zählen dabei zu sehr spezialisierten Membranproteinen, die die Passage von Ionen über biologischen Membranen kontrollieren. Entlang elektrochemischer Gradienten ermöglichen Ionenkanäle durch ihre porenbildende Struktur einen selektiven, passiven Transport von Ionen wie Calcium, Chlorid, Kalium oder Natrium. Zellphysiologisch

betrachtet spielen sie eine wichtige Rolle bei diversen Prozessen, wie etwa bei der Erzeugung und Weiterleitung elektrischer Signale, der Regulation des Zellvolumens, der Signaltransduktion oder auch der Osmoregulation.<sup>64,65</sup> Das Gating, also Öffnen und Schließen der Ionenkanäle, kann dabei auf unterschiedlichste Weise erfolgen. So können spannungsgesteuerte, ligandengesteuerte, temperaturabhängige, säureempfindliche und mechanosensitive Ionenkanäle unterschieden werden. Diese Bandbreite an Regulationsmechanismen ermöglicht eine präzise räumliche und zeitliche Beeinflussung der Ionenkonzentration, wodurch Prozesse in verschiedensten Geweben bzw. Organismen stattfinden können. Typischerweise besitzen Ionenkanäle einen Selektivitätsfilter, um nur bestimmten Ionenarten die Passage über die Membran und durch die aus mehreren Transmembranhelices zentral gebildete Pore zu ermöglichen. Neben ihrer physiologischen Bedeutung zeigen sich Ionenkanäle durch ihre vielfältigen Regulationen auch pharmakologisch relevant. Erkrankungen, die im Zusammenhang mit Fehlfunktionen durch Mutationen in Genen, die für Ionenkanäle kodieren, stehen, werden als Kanalopathien bezeichnet. Daraus folgt, dass Ionenkanäle bei Erkrankungen wie Epilepsie, Herzrhythmusstörungen, Schmerzen und auch psychiatrischen Erkrankungen als therapeutische Zielstrukturen in Frage kommen.<sup>64–66</sup> In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Ionenkanäle vorgestellt, die entweder Bindestellen für Lokalanästhetika aufweisen oder in keinem Zusammenhang mit diesen amphiphilen Molekülen stehen. Die in dieser Arbeit genutzten Kanäle besitzen keine spezifischen Bindestellen für die untersuchten Lokalanästhetika oder Psychopharmaka.

### 1.3.1 Spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle

Spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle in Eukaryoten bestehen aus einer 250 kDa  $\alpha$ -Untereinheit und zwei 30-40 kDa  $\beta$ -Untereinheiten, wobei von Letzteren vier verschiedene Varianten existieren,  $\beta 1$ -  $\beta 4$ .<sup>67,68</sup> Von diesen Hilfsuntereinheiten ist jeweils eine kovalent und eine nicht-kovalent an die  $\alpha$ -Untereinheit gebunden. Sie fungieren, neben ihrer Funktion als Natriumstrommodulatoren, auch als Zelladhäsionsmoleküle und sind wichtig für Zellaggregation, Migration, Invasion, Neuritenwachstum und Axonfaszikulation.<sup>67</sup> Die wesentlich größere  $\alpha$ -Untereinheit besteht strukturell betrachtet aus 24 Transmembranhelices, von denen jeweils sechs Segmente in eine der vier Domänen organisiert sind. Die Helices 1-4 sind spannungsempfindlich und über den zytoplasmatischen Linker in Segment 4-5 mit der

porenbildenden Einheit in Segment 5-6 verbunden (Abbildung 7).<sup>68,69</sup> Segment 4 fungiert als Spannungssensor, der Änderungen des Membranpotenzials detektiert und bei einer Membrandepolarisation nach außen gezogen wird, wodurch über den Linker zwischen Segment 4 und 5 die Pore geöffnet wird. Das Aktivierungstor ist somit geöffnet und es können Natriumionen entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle strömen.<sup>70,71</sup> Die P-Schleife in jeder Domäne beinhaltet ein DEKA-Strukturmotiv, das als Selektivitätsfilter agiert. Der Durchstrom von Natriumionen wird begünstigt, wohingegen größere Ionen wie Kalium und zweifach geladene Ionen zurückgehalten werden.<sup>72</sup>



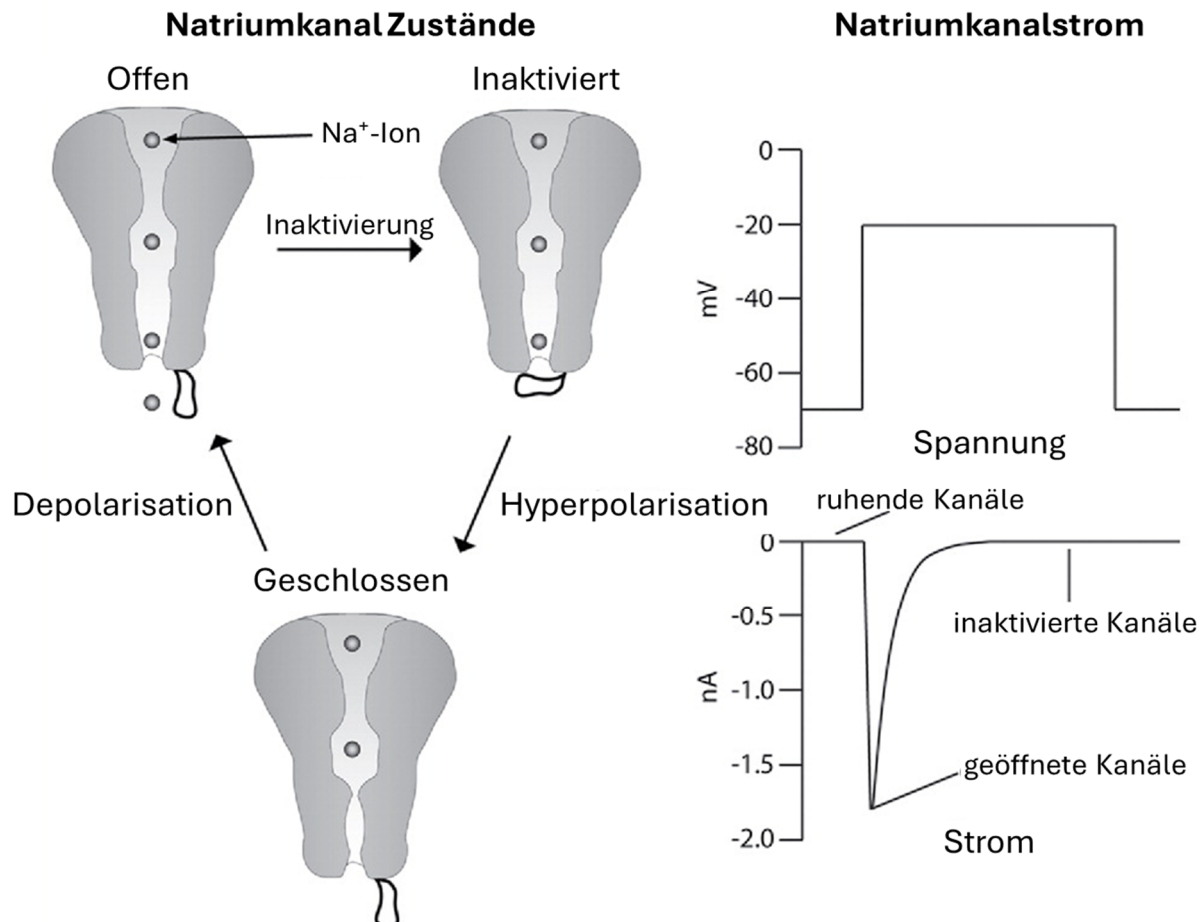
**Abbildung 7: Aufbau eukaryotischer spannungsgesteuerter Natriumkanäle**

Abgebildet sind zwei  $\beta$ -Untereinheiten mit 30-40 kDa und eine  $\alpha$ -Untereinheit mit 250 kDa, die zusammen einen spannungsgesteuerten Natriumkanal bilden. Jeweils sechs Transmembranhelices bilden eine Domäne, die eine Pore, einen Spannungssensor, eine Porenschleife (P-Schleife) und ein Inaktivierungstor beinhalten (Abbildung verändert entnommen aus G. King *et al.*<sup>69</sup> © copyright # [2008], reprinted by permission of Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, <https://www.tandfonline.com>).

Die Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle erfolgt innerhalb von 1-2 ms. Das Inaktivierungstor wird aus dem intrazellulären Linker zwischen Domäne III und IV gebildet, besteht aus den drei Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin sowie Methionin, und interagiert dann mit einer Bindestelle auf der Pore, wodurch eine allosterische Modulation ausgelöst wird, die die Pore impermeabel für Ionen

## Einleitung

zurücklässt. Durch Repolarisation der Membran kann der Ionenkanal durch Ablösen des Inaktivierungsmotivs aus dem vorübergehend refraktären Zustand in den Ruhezustand übergehen, der eine erneute Aktivierung ermöglicht.<sup>68,73</sup> Spannungsgesteuerte Ionenkanäle liegen demnach in drei unterschiedlichen Zuständen vor (Abbildung 8).<sup>74</sup>



**Abbildung 8: Zustände von spannungsgesteuerten Natriumionenkanälen**

Geschlossene/ruhende Kanäle werden durch Depolarisation geöffnet, woraufhin Natriumionen einströmen können, und bereits nach 1-2ms inaktiviert. Abgebildet sind die drei Zustände der Ionenkanäle und die Spannung in mV bzw. der Strom in nA, die/der während der einzelnen Phasen vorliegt (Abbildung verändert entnommen aus S. Bagal *et al.*<sup>74</sup>).

Es existieren mindestens zehn unterschiedliche Subtypen des spannungsgesteuerten Natriumionenkanals, die sich strukturell leicht unterscheiden und von unterschiedlichen Genen codiert werden. Diese Na<sub>v</sub>1.1 – Na<sub>v</sub>1.9 genannten Ionenkanäle werden in unterschiedlichen Zellen exprimiert, wodurch sie mit verschiedenen Kanalopathien in Zusammenhang gebracht werden können. Na<sub>x</sub> ist strukturell ähnlich aufgebaut, zeigt aber keine spannungsgesteuerte Abhängigkeit.<sup>11,75</sup> Lokalanästhetika sind nutzungsabhängig, blockieren also bevorzugt aktive oder inaktivierte Kanäle, da in diesen Zuständen das Aktivierungstor geöffnet ist.<sup>9</sup> Diese Natriumionenblockade ist unter experimentellen Bedingungen reversibel und führt zu

## Einleitung

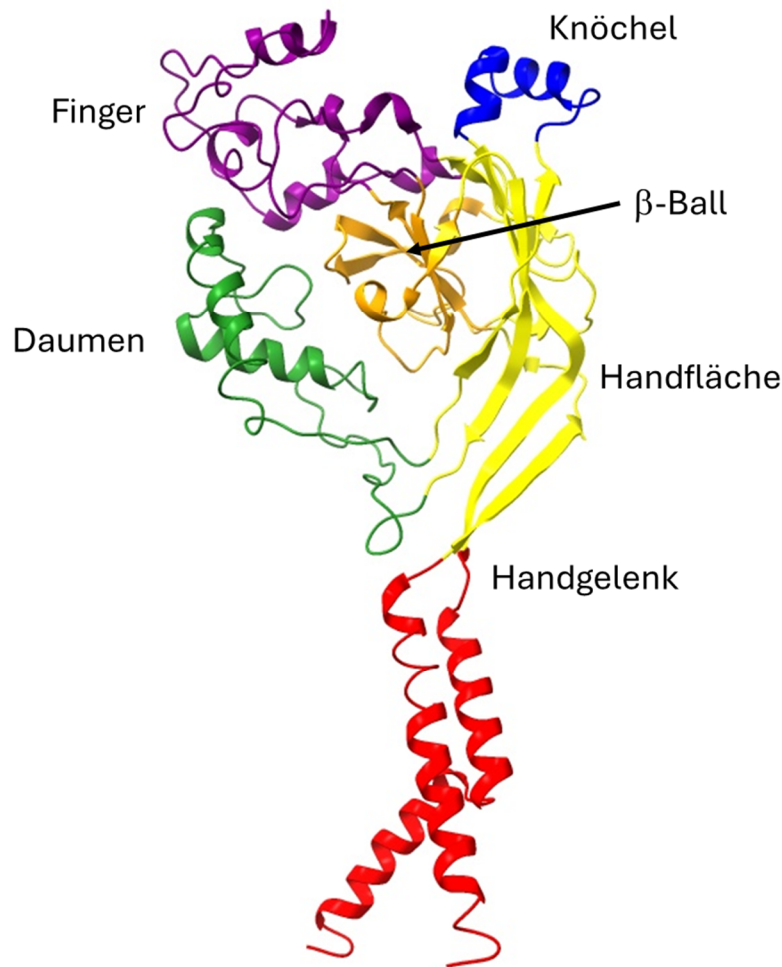
einer konzentrationsabhängigen Verminderung des maximalen Natriumstroms.<sup>76</sup> Einerseits wird dies durch eine Konformationsänderung der spannungssensorischen S4-Segmente ausgelöst, andererseits über eine direkte Blockade des Natriumionenflusses durch die eingebrachte positive Ladung des Lokalanästhetikums in die Kanalpore hervorgerufen.<sup>77,78</sup> Neben dem hydrophilen in Kapitel 1.1.2 dargelegten Mechanismus können Lokalanästhetika auch via Fenestration an ihre Bindestelle innerhalb des Natriumionenkanals gelangen. Bei diesem hydrophoben Mechanismus dringt das ungeladene Lokalanästhetikum in die Membran ein und anschließend direkt über eine seitliche Öffnung in die Kanalpore.<sup>79</sup> Lokalanästhetika dringen also spontan in die Membran ein und gelangen entweder direkt in die Pore oder lösen über einen intrazellulären Weg eine Natriumionenblockade aus. Dabei ist anzunehmen, dass insbesondere ungeladene Moleküle auch in der Membran verbleiben, anstatt in die, für sie ungünstigere, hydrophile, intrazelluläre Umgebung zu diffundieren. Diese Membran-Theorie beinhaltet die hydrophobe und elektrostatische Interaktion der amphiphilen Lokalanästhetikamoleküle mit der Membran, wodurch ihre biophysikalischen Eigenschaften verändert werden, was wiederum Einfluss auf Transmembranproteine haben könnte.<sup>10</sup>

### 1.3.2 Säureempfindliche Ionenkanäle

Säureempfindliche Ionenkanäle (engl. *acid-sensing ion channels* – ASICs) sind protonenempfindliche, spannungsunabhängige Natriumionenkanäle, die zur Familie der Degenerin-/epithelialer Natriumkanäle (engl. *degenerin/epithelial sodium channel* – DEG/ENaC) gehören.<sup>80</sup> Lokalisiert sind diese Kanäle hauptsächlich im peripheren und zentralen Nervensystem, wo sie an physiologischen Prozessen aller Art beteiligt sind.<sup>80–82</sup> Funktionell sind ASICs als Homo- oder Heterotrimer. Die monomeren Untereinheiten besitzen zwei Transmembrandomänen mit beiden Termini auf der intrazellulären Seite und einen umfangreicheren, cysteinhaltigen extrazellulären Bereich, der wie eine Hand aufgebaut ist (Abbildung 9).<sup>83,84</sup> Aktiviert werden ASICs durch einen raschen extrazellulären pH-Abfall, wobei Protonen an die azide Tasche (Abbildung 10B) binden, wodurch ein transienter Natriumionenstrom induziert wird. Die Pore wird hierbei durch die sechs Transmembranhelices, zwei aus jeder der drei Untereinheiten, gebildet. Jeweils eine der beiden Helices ist strukturell durch ein Gly-Ala-Ser-Motiv unterbrochen. Werden diese Helices durch Protonierung in der extrazellulären, aziden Tasche und daraus resultierender Konformationsänderung begradigt, bildet sich der Ionenselektivitätsfilter (Abbildung 10A) aus, dessen Radius

## Einleitung

von ~3,6 Å hydratisierten Natriumionen die Passage ermöglicht. ASICs sind darüber hinaus permeabel für Lithium-, Kalium- und Calciumionen sowie Protonen.<sup>80,84–86</sup>



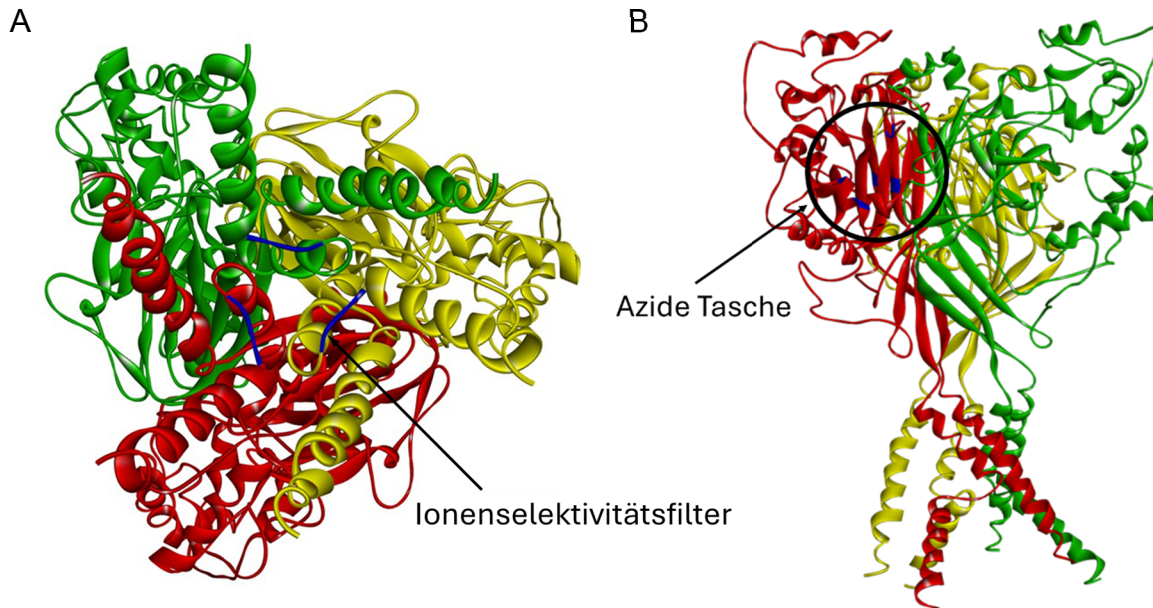
### Abbildung 9: ASIC-Monomer Struktur

Strukturell betrachtet gleicht ein ASIC-Monomer einer Hand. Extrazellulärer Bereich: Handfläche (gelb), Daumen (grün), Finger (violett) und Knöchel (blau) umschließen die  $\beta$ -Ball-Domäne (orange). Die beiden Transmembranhelices sind rot dargestellt. Die Verbindung zwischen extrazellulärem Bereich und Transmembrandomänen wird als Handgelenk beschrieben. PDB-ID: 7CFS<sup>84</sup>

Insgesamt fünf Gene kodieren humane ASICs, die, Spleißvarianten inkludiert, zu mindestens acht unterschiedlichen Isoformen (ASIC1a, ASIC1b, ASIC1b<sub>2</sub>, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, ASIC4 und ASIC5) exprimiert werden. Einzelne Isoformen sind nicht sensitiv gegenüber Protonen (ASIC1b<sub>2</sub>, ASIC2b und ASIC4), sondern haben Einfluss auf die Eigenschaften der Heterotrimere, sofern sie Bestandteil davon sind.<sup>87–89</sup> Öffnen sich ASICs durch extrazelluläre pH-Absenkung und anschließende Konformationsänderung, werden diese hauptsächlich permeabel für Natriumionen. Es entsteht ein nach innen gerichteter, schnell ansteigender, transientser Strom, der nach wenigen Sekunden abflacht, auch wenn der extrazelluläre pH-Wert niedrig bleibt. Nach der Aktivierung werden diese Kanäle desensibilisiert.



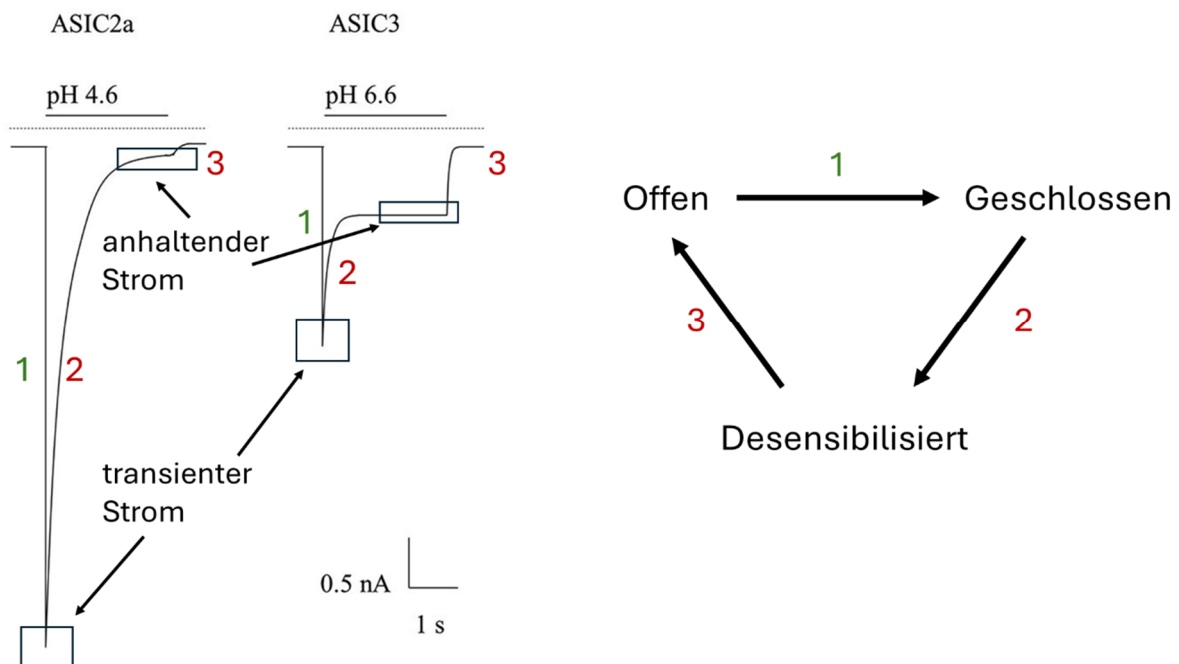
## Einleitung



**Abbildung 11: Struktur des humanen homotrimeren ASIC1a**

**A** Rot, gelb und grün sind jeweils die einzelnen ASIC1a-Untereinheiten. Blau hervorgehoben ist der ausgebildete Ionenselektivitätsfilter. **B** Blau hervorgehoben und schwarz eingekreist ist die azide Tasche eines Monomers (im großen, extrazellulären Bereich), deren Protonierung zur Aktivierung der ASICs notwendig ist. PDB-ID: 7CFS<sup>84</sup>

In diesem Zustand verbleibt ein anhaltender Strom, dessen Niveau höher liegt als der Strom vor der Aktivierung. Erst nach Rückkehr auf den ursprünglichen extrazellulären pH-Wert, kehrt auch der Strom auf das Ausgangsniveau zurück. Auch ASICs können also in drei unterschiedlichen Zuständen – offen, geschlossen und desensibilisiert – vorliegen (Abbildung 11).



**Abbildung 10: ASIC-Kinetik – Zustände der Kanäle**

Abhängig von der Zusammensetzung der Hetero- oder Homotrimere unterscheiden sich sowohl die transienten als auch anhaltenden Ströme. ASICs liegen in offenen, geschlossenen oder desensibilisierten Zuständen vor (Abbildung verändert entnommen aus Vullo *et al.*<sup>86</sup> und Dulai *et al.*<sup>90</sup>).



## Einleitung

Der anhaltende Strom sowie der transiente Strom sind außerdem stark abhängig von der Zusammensetzung der Trimere. Wird der pH-Wert langsam abgesenkt erfolgt ebenfalls eine Desensibilisierung, jedoch ohne vorherige Aktivierung.<sup>86,90</sup> Da ASICs Kanäle sind, die durch Protonen aktiviert werden, eignen sie sich hervorragend, um nachzuweisen ob Lokalanästhetika trotz fehlender Bindungsstellen über einen membranvermittelten Mechanismus wirken können.

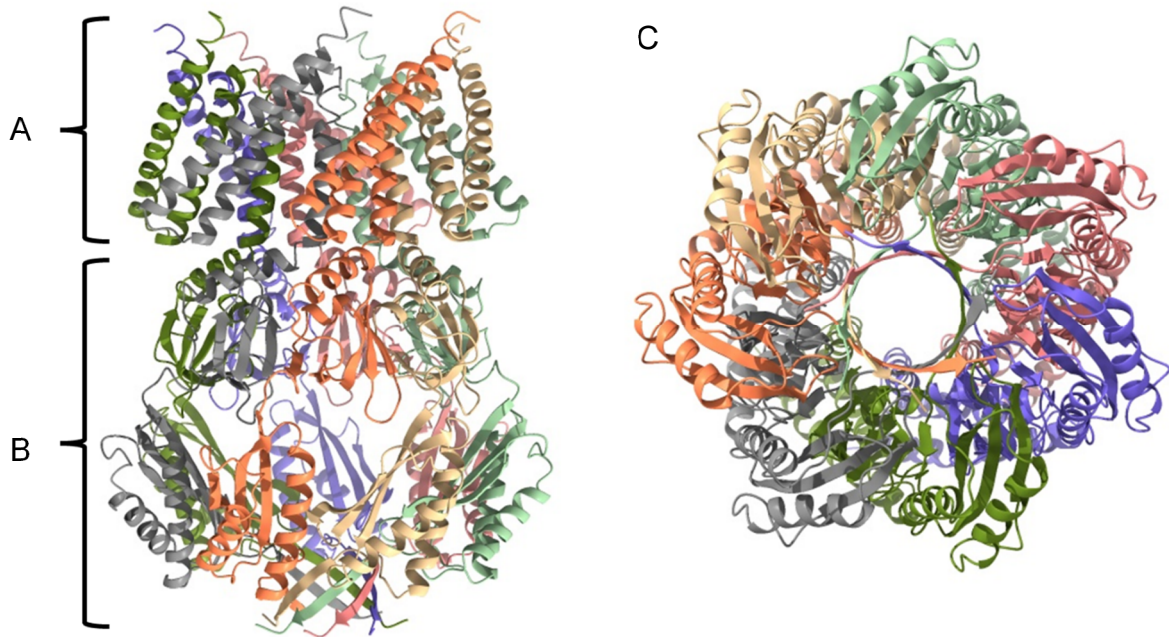
### 1.3.3 Mechanosensitive Ionenkanäle

Bakterielle mechanosensitive Kanäle nehmen eine Veränderung der Membranspannung wahr und fungieren als Druckventile. Bei plötzlichem Anstieg des osmotischen Drucks in der Zelle öffnen sich diese Ionenkanäle und ermöglichen so den Austritt von osmotisch wirksamen Bestandteilen der Zelle bzw. Ionen. Dadurch wird ein Platzen durch das Einstromen von Wasser verhindert.<sup>91,92</sup> Die beiden Hauptvertreter von mechanosensitiven Ionenkanälen in *E. coli* sind mechanosensitive Kanäle geringer Leitfähigkeit (MscS) und großer Leitfähigkeit (MscL). Darüber hinaus gibt es weitere mechanosensitive Kanäle wie MscM (minimale Leitfähigkeit) und MscK (kaliumabhängig, geringe Leitfähigkeit) und MscS-artige Ionenkanäle wie YbdG, Ynal, YbiO und Yjep. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur, Leitfähigkeit und Aktivierungsschwelle.<sup>93</sup> Im weiteren Verlauf wird auf die beiden verwendeten, gut untersuchten Kanäle MscS und MscL eingegangen.

MscS bildet funktionelle Homoheptamere<sup>94</sup> (Abbildung 12), wobei jedes Monomer aus drei Transmembranhelices, einem periplasmatischen N- und einem großen zytoplasmatischen C-Terminus besteht. Letzterer fungiert als eine Art vorgeschalteter Filter. Außerdem beeinflusst er die Leitfähigkeit, Selektivität und Regulation der Kanalöffnung durch Stabilisierung des geschlossenen Zustands. Je eine Transmembranhelix (TM3) pro Untereinheit nimmt an der Bildung der ca. 13 Å großen Pore teil, wohingegen die anderen beiden Helices Druckänderungen in der Membran detektieren.<sup>94</sup> Bei dieser Porengröße ist MscS permeabel für anorganische Ionen wie Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> und Ca<sup>2+</sup> und kleine organische Moleküle. Selbst bei hohen Salzkonzentrationen ist MscS nicht gesättigt. Dieser mechanosensitive Kanal öffnet bei moderaten Membranspannungen von ungefähr 5,5-8 mN/m, wodurch er bei plötzlichem, osmotischem Druckabfall eine für die Bakterienzelle letale Zellyse verhindert, indem er den schnellen Efflux von Ionen und kleinen Molekülen ermöglicht. MscS ist für eine Feinregulierung des osmotischen Drucks zuständig. Von seinem

## Einleitung

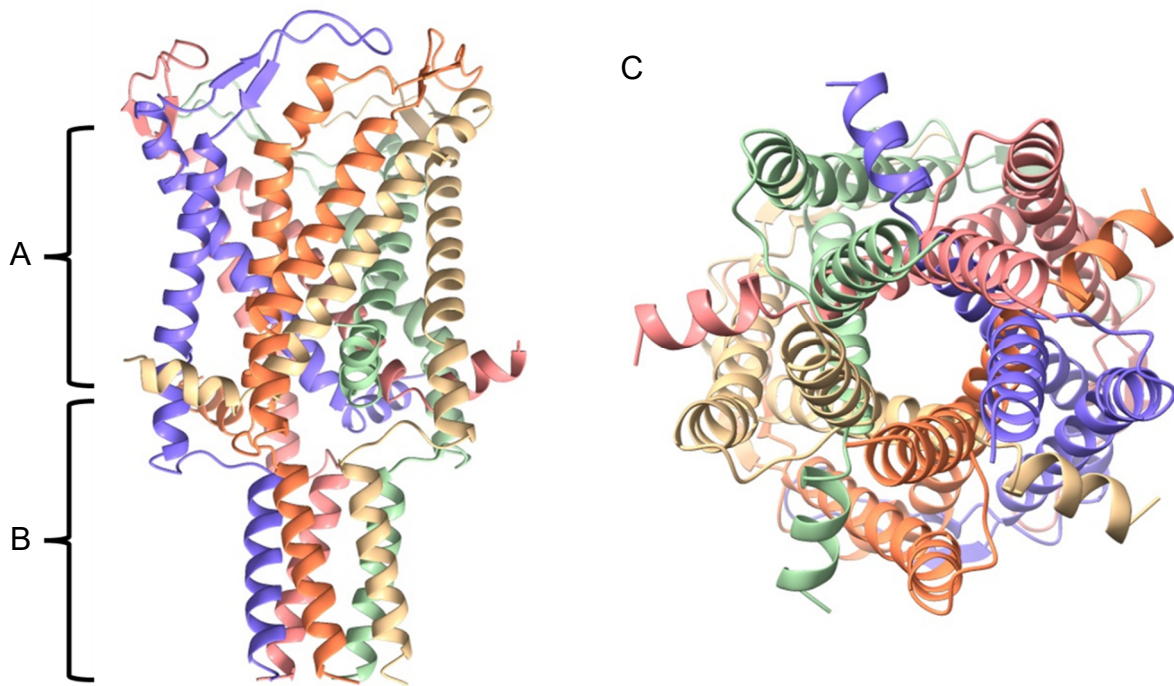
inaktiven Zustand geht MscS nach transienter Öffnung in einen spannungsunempfindlichen, inaktivierten Zustand über, wobei die Leitfähigkeit eines einzelnen offenen Kanals ca. 1 nS beträgt.<sup>91,95–97</sup>



**Abbildung 12: MscS-Homoheptamer**

**A** Die Untereinheiten bestehen je aus drei Transmembranhelices von denen zwei Druckänderungen in der Membran wahrnehmen, während die dritte an der eigentlichen Porenbildung beteiligt ist. **B** Zytoplasmatischer C-Terminus **C** Sicht entlang der Porenachse von der zytoplasmatischen Seite aus. PDB-ID: 2VV5<sup>94</sup>

MscL bildet Pentamere<sup>98</sup> aus fünf identischen Untereinheiten aus, von der jede zwei Transmembranhelices besitzt (Abbildung 13). Dieser mechanosensitive Kanal dient als Notfallventil, das bei hohen Membranspannungen von ca. 10-12 mN/m öffnet. Mit einer ungefähr 28 Å großen Pore ermöglicht MscL den schnellen, unspezifischen Ausstrom von osmotisch aktiven Ionen und Molekülen. Dabei liegt die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals bei ca. 3 nS. Im Gegensatz zu MscS zeigt MscL keine Desensibilisierung oder Inaktivierung, sondern verweilt im geöffneten Zustand, solange die Membranspannung hoch genug ist. Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite. Eine der beiden Transmembranhelices nimmt, ähnlich wie bei MscS, eine Veränderung der Membranspannung wahr und überträgt diese mechanischen Kräfte auf die Porendomäne. Die andere Transmembranhelix ist direkt an der Bildung der zentralen Pore beteiligt.<sup>91,92</sup>



**Abbildung 13: MscL-Homopentamer**

**A** Je Untereinheit existieren zwei Transmembranhelices, wovon eine Membranspannungen detektiert, während die andere direkt an der Bildung der zentralen Pore beteiligt ist. **B** Der zyttoplasmatische Teil von MscL beherbergt sowohl C- als auch N-Terminus. **C** Sicht entlang der Porenachse von der zyttoplasmatischen Seite aus. PDB-ID: 2OAR<sup>98</sup>

Es wurde bereits der Einfluss anderer amphipathischer Moleküle in einem liposomalen Rekonstitutionssystem untersucht. Parabene beeinflussten sowohl MscS als auch MscL; wahrscheinlich durch ihre Einlagerung in die Lipiddoppelschicht und daraus resultierender Veränderung des herrschenden lateralen Drucks in der Membran.<sup>99</sup> Für MscS konnten Kamaraju & Sukharev<sup>100</sup> zeigen, dass sich die von Paraben ausgeübten Effekte unterscheiden, je nachdem auf welcher Seite der Membran sie zugegeben wurden und sich dementsprechend einlagerten. MscS wurde demnach durch Zugabe von Butylparaben zur periplasmatischen Membranseite sensibler gegenüber mechanischen Einflüssen, wohingegen eine zyttoplasmatische Addition zu einem weniger sensiblen Kanal führte. Diese Effekte wurden ebenfalls der Modulation des lateralen Drucks zugeschrieben.<sup>100</sup> Um die Effekte weiterer amphiphiler Moleküle wie beispielsweise Lokalanästhetika auf Lipidmembranen zu untersuchen, eignen sich mechanosensitive Kanäle daher hervorragend.

## 1.4 Membranen und Lipide

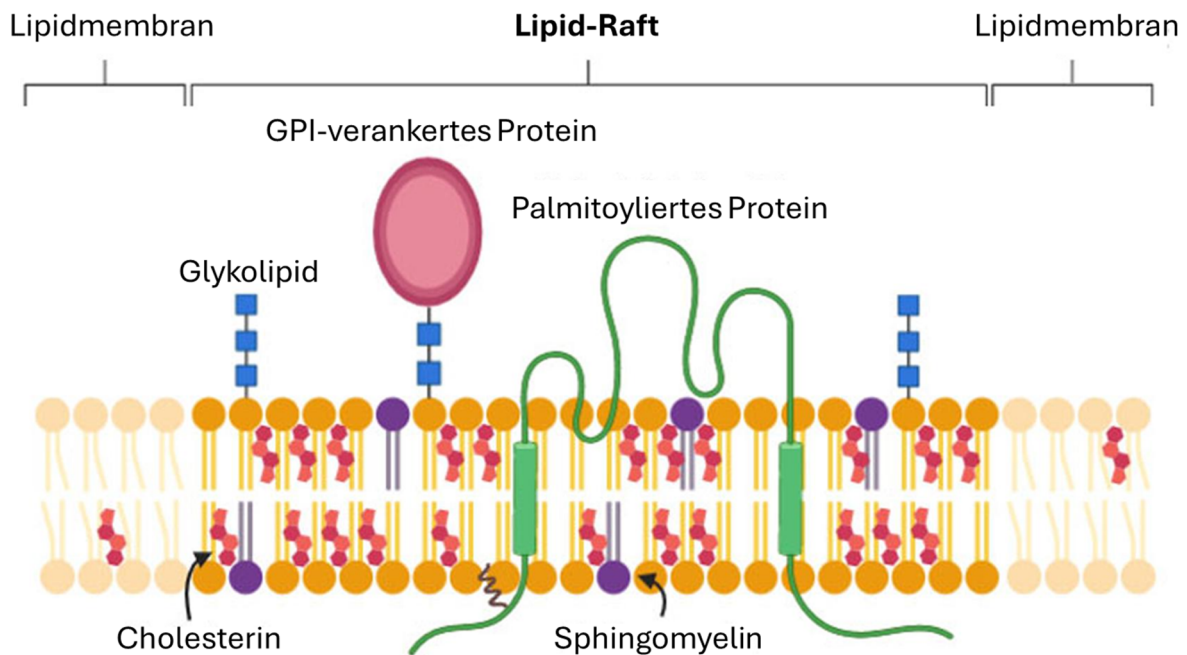
Biologische Membranen beherbergen eine Vielzahl an Proteinen, zu denen sowohl Natriumkanäle als auch die untersuchten mechanosensitiven sowie säureempfindlichen Ionenkanäle zählen. Durch ihre Zusammensetzung und Eigenschaften beeinflussen sie diese membranständigen Proteine. Membranen stellen außerdem innerhalb von Organismen eine strukturelle Abgrenzung zwischen unterschiedlichen Systemen dar und sind Teil einer Vielzahl physiologischer Prozesse. Grundbaustein von biologischen Membranen sind Lipide, von denen es bezüglich Kopfgruppe, Kettenlänge und physikalischer Eigenschaften eine große Varianz gibt, um verschiedene Aufgaben erfüllen zu können. Lipide fungieren einerseits, bedingt durch ihren reduzierten Zustand, als Energiespeicher; meist als Triacylglycerole oder Sterylester in Lipidtröpfchen. Diese wasserfreien Speicher dienen ebenfalls als Reservoir für Fettsäuren und Sterole zur Membranbiogenese. Darüber hinaus können Lipide als primäre und sekundäre Botenstoffe in einer Signaltransduktion agieren. Amphiphile Lipide werden degradiert, wobei der lipophile Teil innerhalb der Membran Signale übertragen kann, der hydrophile Teil hingegen zytosolisch weiterverarbeitet wird. Daneben bilden spezielle Lipide definierte Membrandomänen, die Proteine aus dem Zytosol gezielt rekrutieren können und dadurch sekundäre Signalkomplexe organisieren. Außerdem ermöglicht die Polarität von Lipiden die Ausbildung von biologischen Membranen. Die hydrophoben Teile neigen in wässriger Umgebung zur Selbstassoziation, wobei die hydrophilen Kopfgruppen mit dem Zytosol und der extrazellulären Matrix interagieren. Diese physikalischen Wechselwirkungen resultieren in der spontanen Bildung von Lipiddoppelschichten, die die Basis für die Kompartimentierung biologischer Systeme sind. Dadurch werden kontrollierte Reaktionsräume wie zum Beispiel Zellen gebildet, aber auch weitere Differenzierungen innerhalb dieser vorgenommen. So werden auch Zellorganellen räumlich getrennt und schließlich biochemische Effizienz geschaffen. Lipide befähigen die Membran, zusätzlich zu ihrer funktionellen Aufgabe als Barriere, außerdem zur Bildung von Vesikeln und Tubuli, Fission sowie Fusion, um die Zellteilung, Reproduktion und intrazellulären Membrantransport zu gewährleisten.<sup>101–104</sup>

### 1.4.1 Lipide und Lipidvesikel

Die Hauptbestandteile von biologischen Membranen sind Phospholipide, Sphingolipide, Cholesterin und in Prokaryoten außerdem Cardiolipin, das auch in der

## Einleitung

inneren Membran von Mitochondrien vorkommt. Glycerophospholipide stellen dabei den größten Teil der Membranlipide mit 50-60% in Eukaryoten und lassen sich einerseits anhand ihrer Kopfgruppe unterscheiden in Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidsäure.<sup>101</sup> Ihr hydrophober Teil besteht aus einem Diacylglycerol, welches andererseits das zweite Unterscheidungsmerkmal ist. Sowohl die Kettenlänge als auch der Anteil an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren ist entscheidend für die biophysikalischen Eigenschaften der Lipide.<sup>104</sup> Die Lipidzusammensetzung der Membran variiert je nach Zelltyp signifikant, ist aber auch bei einzelnen Membranen nicht homogen, sondern zeigt eine laterale und transversale Varianz, wodurch sich Mikrodomänen bilden – sogenannte Lipid-Rafts (Abbildung 14).<sup>103,105</sup> In diesen können sich, bedingt durch die Anreicherung von Sphingolipiden und Cholesterin und einem daraus resultierenden, weniger flüssigen Membranbereich, spezifische Membranproteine assemblieren.<sup>103</sup>



**Abbildung 14: Lipidmembran mit Lipid-Raft**

Innerhalb der Lipid-Rafts ist die Konzentration an Cholesterin und (Glyko-)Sphingolipiden erhöht. Dadurch lagern sich vermehrt Proteine in den weniger flüssigen Membranteil ein, hier dargestellt als palmitoyliertes und GPI-verankertes Protein (Abbildung verändert entnommen aus Ripa *et al.*<sup>105</sup>).

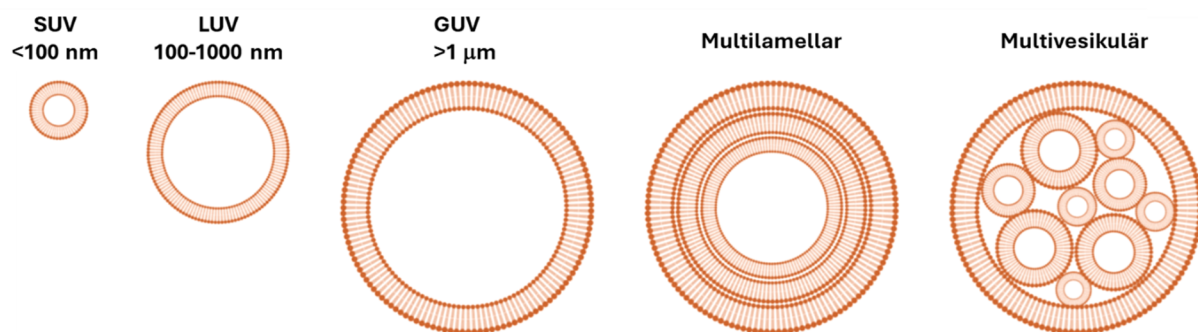
Neben Lipid-Rafts können Lipide außerdem Vesikel, auch Liposomen genannt, ausbilden. Diese Exosomen, Endosomen, Lysosomen und Transportvesikel erfüllen zentrale Aufgaben in Membran- und Proteintransport. So sortieren und transportieren sie Proteine und Lipide zwischen Zellorganellen beispielsweise bei der Exo- und Endozytose. Daneben werden synaptische Vesikel in Nervenzellen zur Signalübertragung genutzt, indem sie Botenstoffe in den extrazellulären Raum freisetzen. Eine weitere Funktion ist die Kommunikation zwischen Zellen über



## Einleitung

extrazelluläre Vesikel, die Proteine, Lipide und RNA enthalten können. Außerdem werden auch Makromoleküle nach dem Transport in Lysosomen abgebaut.<sup>106,107</sup>

Lipidvesikel lassen sich artifiziell gut in definierter Größe und Zusammensetzung herstellen und eignen sich daher hervorragend als Modellsystem für verschiedene Forschungsbereiche. Dabei ist es möglich Ionenkanäle in Liposomen zu rekonstituieren und anschließend ihre Funktion und beispielsweise den Einfluss verschiedener Substanzen darauf zu untersuchen. Durch eine überlegte Wahl der Lipidzusammensetzung, der Umgebungstemperatur und des Vesikeltyps lassen sich Fluidität, mechanische Eigenschaften und Phasenübergänge systematisch anpassen.<sup>108</sup> Künstlich hergestellte Lipidvesikel werden anhand ihrer Größe und Lamellarität unterschieden. Es existieren kleine unilamellare Vesikel (engl. *small unilamellar vesicles* – SUV), die kleiner als 100 nm sind, große unilamellare Vesikel (engl. *large unilamellar vesicles* – LUV), deren Größe zwischen 100 und 1000 nm liegt und riesige unilamellare Vesikel (engl. *giant unilamellar vesicles* – GUV), die mit einem Durchmesser von mehr als 1  $\mu\text{M}$  die größten unilamellaren Vesikel darstellen. Daneben gibt es multilamellare Vesikel (engl. *multilamellar vesicles* – MLV), bei denen mehrere Lipiddoppelschichten nacheinander vorhanden sind, und multivesikuläre Vesikel (engl. *multivesicular vesicles* – MVV), bei denen sich innerhalb eines Vesikels mehrere weitere Vesikel unterschiedlicher Größe ausgebildet haben (Abbildung 15).<sup>109</sup> Durch die Möglichkeit, Liposomen bezüglich ihrer biophysikalischen Eigenschaften anpassen zu können, sind sie ideale Systeme, um membranvermittelte Mechanismen zu erforschen. Limitiert wird dies lediglich durch die Vereinfachung im Vergleich zu Membranen *in vivo*, welche deutlich komplexer sind und zusätzlich Elemente des Zytoskeletts, Membranproteine in physiologische Konzentration und komplexe Lipid-Rafts beinhalten.<sup>106</sup>

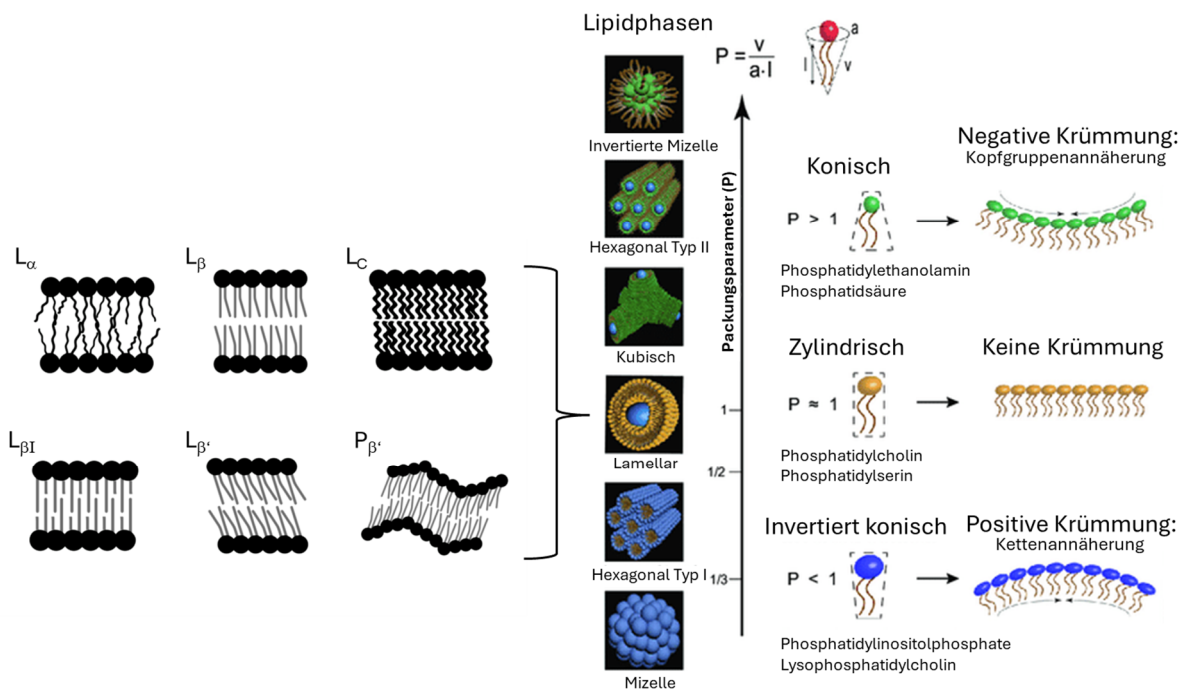


**Abbildung 15: Aufbau verschiedener Lipidvesikel**

Je nach Größe werden unilamellare Liposomen unterschieden. SUVs sind kleiner als 100 nm, LUVs zwischen 100 und 1000 nm groß und GUVs größer als 1  $\mu\text{M}$ . Daneben existieren multilamellare Vesikel, die aus mehreren Lipiddoppelschichten bestehen und multivesikuläre Vesikel, in deren Inneren weitere Vesikel unterschiedlicher Größe sind. (Abbildung verändert entnommen aus Swaay *et al.*<sup>109</sup>).

## 1.4.2 Phasenübergänge, Membranfluidität und lateraler Druck

Die physikalischen Eigenschaften einer Membran und damit für alle membranständigen oder assoziierten Proteine und Moleküle sind maßgeblich davon abhängig, in welcher Phase sich die Lipide befinden. Bedingt durch die Zusammensetzung aus verschiedenen Lipiden, den Gehalt an Cholesterin und anderen Membrankomponenten und schlussendlich abhängig von der Temperatur nimmt die Lipidmatrix der Membran unterschiedliche physikalische Zustände ein. Diese Lipidphasen lassen sich nach ihrer Krümmung unterteilen in Mizellen und invertierte Mizellen für extreme positive bzw. negative Membrankrümmungen, sowie in eine hexagonale Typ I, lamellare, kubische und hexagonale Typ II Phase für geringere Krümmungen (Abbildung 16).<sup>110</sup>



**Abbildung 16: Lipidphasen und Membrankrümmung**

Lipiddoppelschichten existieren in verschiedenen Lipidphasen als Mizelle, hexagonale Typ I Phase, lamellare, kubische, hexagonale Typ II Phase oder invertierte Mizelle. Dies ist abhängig von der Krümmung der Membran, die auf der Membranzusammensetzung beruht. Typische Lipide, die eine positive, negative oder keine Krümmung hervorrufen sind unter den jeweiligen Packungsparametern notiert. Die lamellare Phase von Lipiden lässt sich unterteilen in die flüssig-lamellare Phase ( $L_\alpha$ ), die Gelpase ( $L_\beta$ ), die kristallin-lamellare Phase ( $L_c$ ), die *interdigitierte* Gelpase ( $L_{\beta I}$ ), die *gekippte* Gelpase ( $L_{\beta'}$ ) und die *gerippte* Gelpase ( $P_{\beta'}$ ). (Abbildung verändert entnommen aus Salvador-Castell *et al.*<sup>110</sup> und Ilias *et al.*<sup>111</sup>).

Artifizielle Membranen aus reinen Lipiden zeigen dabei entsprechend ihrer Form Präferenzen, bestimmte Krümmungen auszubilden. Konische Lipide, wie Phosphatidylethanolamin und Phosphatidsäure bilden negative Krümmungen. Phosphatidylinositolphosphate und Lysophosphatidylcholin haben eine invertiert

## Einleitung

konische Form und neigen zur Bildung einer positiven Krümmung. Zylindrisch geformt sind beispielsweise Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin, wodurch sie keine der beiden vorher genannten Varianten ausbilden. Die lamellare Phase, in der sich Lipiddoppelschichten *in vitro* befinden, existiert in sechs unterschiedlichen Zuständen. Der Phasenübergang ( $T_m$ ) beschreibt hierbei die Temperatur, bei der die Lipide von der gelartigen  $L\beta$ -Phase in die flüssig-kristalline bzw. flüssig-lamellare  $L\alpha$ -Phase übergehen (Abbildung 16).<sup>111</sup> Die Acylketten der Lipide sind dabei in der gelartigen Phase eng gepackt und gestreckt, während die flüssig-kristalline Phase eine höhere Unordnung und Beweglichkeit aufweist.

Entscheidender Parameter für die Membranpermeabilität, die Diffusionsfähigkeit von Lipiden und Proteinen in der Membran und die Aktivität von Proteinen wie beispielsweise Ionenkanälen ist die Fluidität. Diese ist in der flüssig-kristallinen Phase erhöht. Der Phasenübergang zu dieser Phase höherer Fluidität wird durch die Art der Lipide beeinflusst, wobei längere und gesättigte Acylketten die  $T_m$  erhöhen. Cholesterin, welches die Fluidität ebenfalls modifiziert, stabilisiert einerseits flüssige Membranen bei höheren Temperaturen, andererseits verhindert es eine zu starke Komprimierung bei niedrigen Temperaturen. Die Ein- oder Anlagerung anderer Moleküle in bzw. an die Membran hat daher auch direkten Einfluss auf die Fluidität und den Phasenübergang. Durch die Veränderungen der physikalischen Eigenschaften der Membran können membranständige Proteine wie die zuvor vorgestellten mechanosensitiven Kanäle MscS und MscL beeinflusst werden. Auch andere Kanäle wie ASICs lassen sich indirekt modulieren. Bedingt durch die Fluiditätsänderungen werden die Membrandicke, die laterale Diffusion und die lokale Lipidumgebung verändert. Lokalanästhetika oder andere amphiphile Moleküle können Einfluss auf diese Membraneigenschaften nehmen und neben der Erhöhung der Fluidität auch die Krümmung der Membran manipulieren. Da die energetischen Voraussetzungen für Konformationsänderungen und Stabilität verschiedener Ionenkanalzustände maßgeblich von der lokalen Membranspannung, also dem lateralen Druck abhängen, können auch nicht mechanosensitive Ionenkanäle durch Einlagerung amphiphiler Moleküle beeinflusst werden.<sup>112–114</sup>



## 2 Aufgabenstellung

Traditionell wird für Lokalanästhetika mechanistisch davon ausgegangen, dass diese die Zellmembran durchdringen können und über die zytosolische Seite spezifisch an spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle binden. Die somit ausgelöste Depolarisation der Zellmembran verhindert die Impulsausbreitung in erregbaren Nerven- und Muskelzellen, wodurch eine Schmerzweiterleitung blockiert wird.<sup>7–9</sup>

Um jedoch auftretende Nebenwirkungen, zusätzliche Ziele in der Membran und antithrombotische, antiinflammatorische sowie immunmodulierende Eigenschaften der Lokalanästhetika erklären zu können, wurde postuliert, dass die Wirkung nicht alleinig über eine spezifische Bindung zu erklären sein könnte.<sup>24</sup>

Ein alternativer, membranvermittelter Wirkmechanismus für Lokalanästhetika oder viele Psychopharmaka basiert auf der Annahme, dass diese amphiphilen Moleküle sich bevorzugt in die Lipiddoppelschicht einlagern können und dort die Membraneigenschaften verändern. Dadurch würden wiederum die Konformation und Funktion membranständiger Proteine beeinflusst, ohne dass dafür eine spezifische Bindung notwendig ist.

Im Zuge dieser Arbeit sollen die biophysikalischen Eigenschaften verschiedener Lokalanästhetika untersucht werden, um deren Wirkweise über ein laterales Membrandruckmodell zu verifizieren. Darüber hinaus wurden weitere amphiphile, pharmakologisch interessante Moleküle, Antidepressiva, in die Arbeit mit einbezogen, für die ebenfalls ein membranvermittelter Mechanismus postuliert wurde.<sup>45</sup>

In diesem Zusammenhang stellen sich folgende Fragen:

1. In welchem Maß beeinflussen amphiphile Moleküle wie Lokalanästhetika und Antidepressiva die biophysikalischen Eigenschaften biologischer Membranen?
2. Modulieren die untersuchten Pharmaka über diese Veränderungen der Membraneigenschaften Ionenkanäle, die keine spezifischen Bindungsstellen für sie besitzen?
3. Welche bestimmten Parameter sind für die Art und Ausprägung der membranvermittelten Wechselwirkungen amphiphiler Moleküle entscheidend?

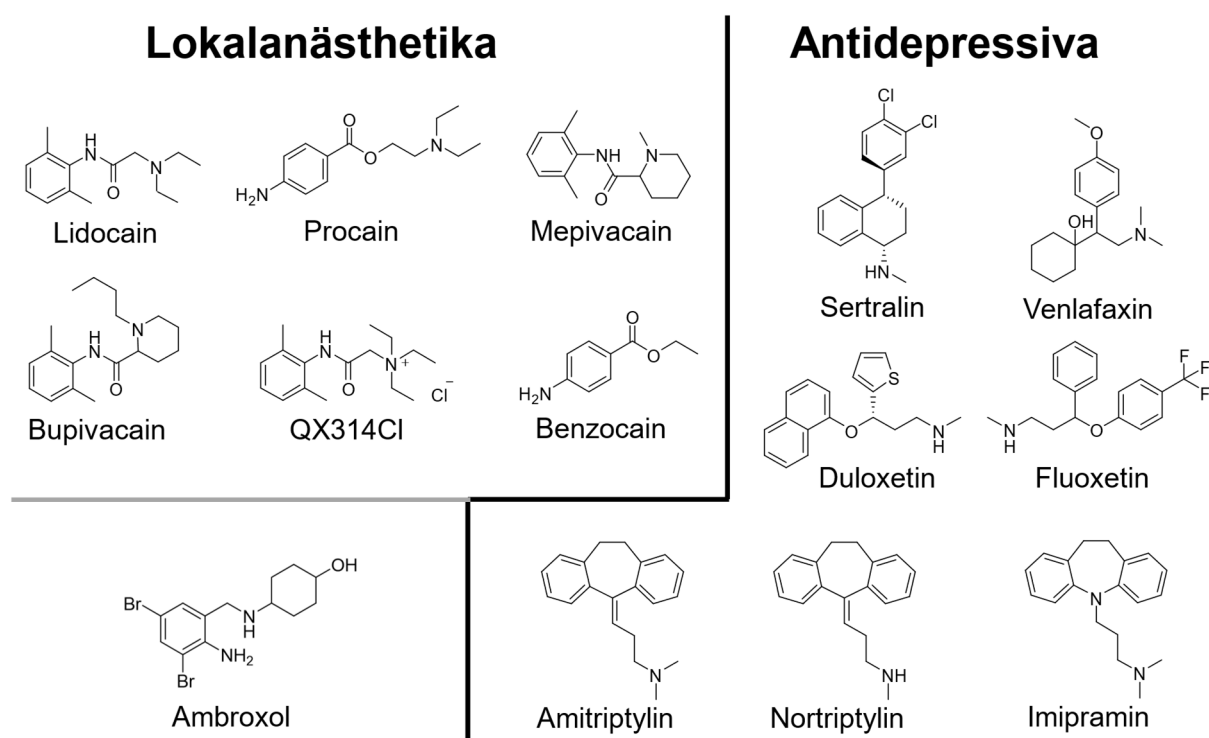
## Aufgabenstellung

Um diese Fragen zu beantworten, sollen die folgenden Teilziele mittels  $^1\text{H}$ -NMR-,  $^2\text{H}$ -NMR- und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie sowie fluoreszenzbasierter Methoden realisiert werden:

- Untersuchung des **Einflusses amphiphiler Moleküle auf die biophysikalischen Eigenschaften und die Architektur biologischer Membranen**, um deren Interaktion mit der Lipiddoppelschicht umfassend zu bewerten. Unter anderem wird der **Membran-Wasser-Verteilungskoeffizient**, welcher die Verteilung in der Lipiddoppelschicht charakterisiert, und die **Membranfluidität** sowie die **Phasenübergangstemperatur**, die es ermöglichen die Dynamik der Lipide zu erfassen, ermittelt. Außerdem soll die **kritische Mizellbildungskonzentration** bestimmt werden, die Rückschlüsse auf Bioverfügbarkeit und Membrandestabilisierung ermöglicht. Strukturelle Veränderungen auf molekularer Ebene sollen durch Analyse des **Deuterium-Ordnungsparameters** erfasst werden. Darüber hinaus soll eine Begutachtung der **Kopfgruppeninteraktion** erfolgen, um das elektrostatische und sterische Umfeld an der Membranoberfläche zu charakterisieren. Des Weiteren soll die bevorzugte Einlagerung amphiphiler Moleküle durch Untersuchung des **Krümmungsverhaltens** bestimmt werden.
- Überprüfung des **Einflusses amphiphiler Moleküle auf eukaryotische Ionenkanäle – ASICs** –, die endogen in HEK293-Zellen exprimiert werden. Dies ermöglicht es Aussagen darüber treffen zu können, ob die Veränderungen biophysikalischer Parameter der Lipidmembran in einem biologisch komplexeren System detektierbar sind und die Aktivierungskinetik humaner Ionenkanäle moduliert.
- Bestimmung des **Einflusses amphiphiler Moleküle auf prokaryotische Ionenkanäle – MscS/MscL** –, um membranvermittelte Effekte direkt funktionell an einem einfachen, rekonstituierten System ohne mögliche Störfaktoren belegen zu können. Über diese bakteriellen Ionenkanäle können Membranmodulationen präzise erfasst werden, da sie ausschließlich auf Veränderungen der Membranspannung und des lateralen Druckprofils reagieren.

### 3 Ergebnisse

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Veränderungen biophysikalischer Eigenschaften von Modellmembranen unter Einfluss von Lokalanästhetika und Psychopharmaka (Abbildung 17) untersucht, um weitere Hinweise auf einen bereits vermuteten membranvermittelten Wirkmechanismus der ersten Stoffgruppe zu finden und gleichzeitig zu eruieren, ob auch andere amphiphile Moleküle indirekt über die Lipidmembran wirken können. Um diesen Verdacht darüber hinaus festigen zu können, wurden pro- und eukaryotische Ionenkanäle verschiedenen Lokalanästhetikakonzentrationen ausgesetzt, sodass die Modulation der Membraneigenschaften indirekten Einfluss auf die Proteine ausüben konnte.



**Abbildung 17: Untersuchte Lokalanästhetika und Antidepressiva**

Strukturformeln aller untersuchten Lokalanästhetika und Antidepressiva in dieser Arbeit. Der amphiphile Charakter der Moleküle ermöglicht es ihnen, sich in Lipidmembranen einzulagern und durch Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften dieser, Einfluss auf membrangebundene Proteine zu nehmen.

Die Ergebnisse bezüglich Membran-Wasser-Verteilung, spontaner Krümmung und Ordnungsparametern entstanden in Zusammenarbeit mit Simon Schwarz. Ebenso ist Kapitel 3.3.1 das Ergebnis gemeinsamer Untersuchungen mit Annika Stumpf. Sofern nicht anders angegeben wurden Einzelmessungen durchgeführt und der Fehler basierend auf experimenteller Reproduzierbarkeit und Gerätespezifikation abgeschätzt. Triplikate und Standardabweichung sind gesondert gekennzeichnet.

### 3.1 Veränderungen biophysikalischer Eigenschaften

#### 3.1.1 Membran-Wasser-Verteilung via $^1\text{H}$ NMR

Inwieweit amphiphile Moleküle membrangebundene Proteine beeinflussen können, hängt essenziell von ihrer Membrangängigkeit bzw. dem membrangebundenen Anteil der einzelnen Substanz ab. Um diese Eigenschaft näher zu beleuchten, wurden  $^1\text{H}$ -NMR-Experimente durchgeführt, um die Membran-Wasser-Verteilung der untersuchten Moleküle zu bestimmen. Hierfür kamen zwei unterschiedliche Messansätze zum Einsatz: Einerseits wurde die gesamte Probe inklusive Lipidvesikeln gemessen, andererseits erfolgte die Analyse der wässrigen Phase nach Abtrennung der Vesikel. Bei den Messungen in Gegenwart von Liposomen zeigte sich die Einlagerung der amphiphilen Moleküle in die Membran dadurch, dass deren Signale in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren stark abgeschwächt bzw. verbreitert auftraten. Grund hierfür ist die eingeschränkte Bewegungsfreiheit der Moleküle, sobald diese in die Lipiddoppelschicht inkorporiert vorliegen. Im Gegensatz dazu konnten in den Messungen ohne Vesikel – also nach Zentrifugation und Entfernung der Lipidphase – nur die gelösten, nicht membrangebundenen Moleküle quantifiziert werden (Abbildung 18A). Diese quantitative Bestimmung wurde für physiologische Bedingungen bei pH 7,4, aber auch bei pH 5 und 10 durchgeführt, um die unterschiedlichen Protonierungsgrade der Moleküle zu berücksichtigen. Als Modellmembran diente DMPC; zusätzlich wurden, um den Einfluss einer negativ geladenen Membran zu untersuchen, Messungen mit DMPC/DMPG-Vesikeln bei pH 5 durchgeführt (Abbildung 18B).

Die Fähigkeit sich in Lipidmembranen zu integrieren, hängt maßgeblich von der Lipophilie und der Ladung des einzelnen Moleküls ab. Inwieweit eine Substanz protoniert ist und damit Ladung aufweist oder neutral geladen ist, lässt sich anhand ihres  $\text{pK}_a$ -Wertes abschätzen. Liegt der pH-Wert unterhalb des  $\text{pK}_a$ -Wertes überwiegt die protonierte (geladene) Form. Ist hingegen der pH- größer als der  $\text{pK}_a$ -Wert dominiert die unprotonierte (neutrale) Variante. Die Lipophilie einer Substanz lässt sich über das Verteilungsverhältnis zwischen Octanol und Wasser und den daraus ermittelten Koeffizienten  $\log P$  beschreiben. Je größer  $\log P$ , desto lipophiler ist das Molekül, wobei dieser Wert nur für die ungeladene, neutrale Form einer Substanz definiert ist. Präziser lässt sich die Lipophilie daher mittels  $\log D$ , dem Verteilungskoeffizienten bei einem definierten pH-Wert beschreiben (Tabelle 1).

## Ergebnisse

Aber auch dies ist nur eine Näherung an physiologische Bedingungen, da noch immer eine Verteilung zwischen zwei harschen Zuständen – Octanol als organischem Lösungsmittel und Wasser – bestimmt wird. Für akkuratere Aussagen zur Verteilung *in vivo* bietet es sich an, die Partitionen zu ermitteln, die sich zwischen einer Lipidmembran und Wasser verteilen (siehe Kapitel 7.1.1).

**Tabelle 1: Physikochemische Eigenschaften der Lokalanästhetika und Psychopharmaka**

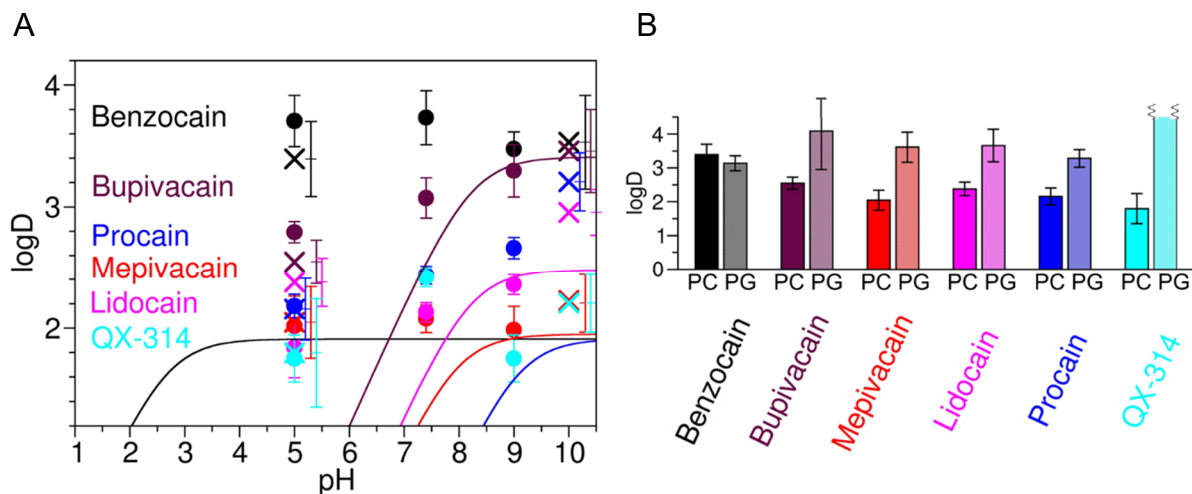
Werte für  $pK_a$  und  $\log P$  der Antidepressiva und Benzocain wurden aus der *DrugBank*<sup>115</sup> (<https://go.drugbank.com>) entnommen (Knox *et al* 2024). Die  $pK_a$ -,  $\log P$ - und  $\log D$ -Werte der Lokalanästhetika stammen aus Messungen von Strichartz *et al* (1990)<sup>116</sup>, wobei  $\log P$ - und  $pK_a$ -Wert für Ambroxol aus Pobudkowska *et al* (2021)<sup>41</sup> sowie  $\log D$  aus Benet *et al* (2011)<sup>117</sup> entnommen wurden und QX314 aus Butterworth & Strichartz (1990) stammt.<sup>8</sup> Die  $\log D$ -Werte der Psychopharmaka wurden mithilfe von ChemAxon Marvin<sup>118</sup> berechnet. \* $pK_a$  für QX314 für dessen Linker

Amphiphil	$pK_a$ -Wert	$\log P$	Log D (pH 7,4)	Wirkstoffklasse
Lidocain	8,19	2,48	1,63	Lokalanästhetikum (Amid)
Procain	9,06	1,91	0,23	Lokalanästhetikum (Ester)
Mepivacain	7,92	1,95	1,32	Lokalanästhetikum (Amid)
Bupivacain	8,21	3,41	2,54	Lokalanästhetikum (Amid)
QX314	12,14*	-	-1,47	Lokalanästhetikum (Amid)
Benzocain	2,51	1,86	1,91	Lokalanästhetikum (Ester)
Ambroxol	6,87	3,19	2,66	Mukolytikum (Amid-Amin)
Sertralin	9,2	4,30	2,39	Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
Venlafaxin	9,6	2,74	0,90	Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
Duloxetin	9,8	4,20	1,54	Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
Fluoxetin	9,9	4,17	1,99	Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
Amitriptylin	9,4	4,81	2,28	Trizyklische Antidepressiva
Nortriptylin	9,7	4,43	3,10	Trizyklische Antidepressiva
Imipramin	9,4	4,30	2,40	Trizyklische Antidepressiva

Diese via  $^1H$ -NMR ermittelten Membranverteilungen können ebenfalls in  $\log D$ -Werte umgerechnet werden und spiegeln die tatsächliche physiologische Verteilung der untersuchten Lokalanästhetika bzw. Antidepressiva genauer wider. Es fällt hierbei auf, dass alle untersuchten Lokalanästhetika deutlich höhere  $\log D$ -Werte für DMPG-

## Ergebnisse

Membranen im Vergleich zu Octanol/Wasser aufweisen (Abbildung 18A). Diese stärkere Membranbindung gilt auch für das ungeladen vorliegende Benzocain. Ebenfalls bemerkenswert ist, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen gebunden in Membranen deutlich geringer ausfallen als im härteren Octanol-Wasser-System. Zusätzlich zeigen Procain und QX314 mit den übrigen Lokalanästhetika vergleichbare Werte bei der Membranbindung, wohingegen ihre logD-Werte für Octanol/Wasser sehr niedrig liegen. Polarisierung und  $pK_a$ -Werte scheinen daher nicht allein ausschlaggebend für die Wechselwirkung mit Lipiden zu sein, sondern auch der amphiphile Charakter der Moleküle an sich. Diese Vermutung bestätigt sich im Vergleich mit den berechneten logD-Werten, die bei niedrigem pH drastisch abfallen. Bei pH 5 bestimmte logD-Werte der Membranverteilung zeigen stabile, höhere Werte, woraus sich schlussfolgern lässt, dass auch protonierte Lokalanästhetika in die Membran partitionieren und dort insbesondere mit den polaren Kopfgruppen interagieren. Oberhalb von pH 9 nähern sich die Werte für das Octanol-Wasser- und Membran-Wasser-System einander an. Benzocain und Procain bilden hier eine Ausnahme, da sie beide auch in diesem pH-Bereich eine höhere Membranaffinität aufweisen.



**Abbildung 18: Membranverteilung der untersuchten Lokalanästhetika**

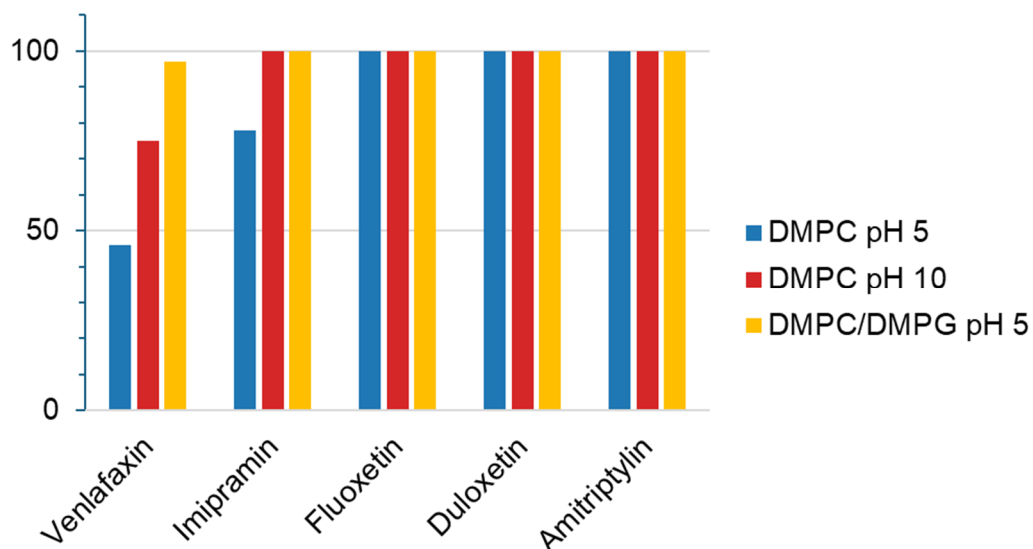
**A** Die Membranverteilung wurde für die Lokalanästhetika in Abhängigkeit des pH-Wertes gemessen und in logD-Werte umgewandelt. Kreise stellen Ergebnisse dar, die durch  $^1H$ -NMR-Messungen von Lipidvesikeln mit Lokalanästhetika erhalten wurden, wohingegen Kreuze aus Experimenten mit Ultrafiltrationsschritt, also unter Trennung gebundener und ungebundener Fraktion, stammen. Um die Sichtbarkeit zu verbessern, sind die Fehlerbalken nach rechts verschoben. Zum Vergleich sind Linien mit berechneten Octanol/Wasser logD-Werten illustriert. **B** Vergleich der Membranverteilung in DMPC und 1:1 DMPC/DMPG-Membranen bei pH 5.

Für alle Lokalanästhetika, mit Ausnahme von Benzocain, dessen Werte unter Berücksichtigung der Fehlerbalken als gleich anzunehmen sind, zeigte sich eine erhöhte Bindung an DMPC/DMPG- im Vergleich zu reinen DMPC-Membranen

## Ergebnisse

(Abbildung 18B). Da diese Ergebnisse bei pH 5 erhalten wurden, bei dem alle Lokalanästhetika in überwiegend protonierter Form vorliegen, stellt sich die positive Ladung hier als maßgeblicher Faktor für die Bindung heraus. QX314, dessen positive Ladung permanent ist, zeigte die stärkste Wechselwirkung und partitionierte vollständig in die DMPC/DMPG-Membran.

Die Membranverteilung der untersuchten Antidepressiva bestätigt die bisher gemachten Schlussfolgerungen einer erhöhten Bindung an geladene Membranen sowie pH-abhängigen Partitionierung. Für diese Substanzen wurden die gebundenen und ungebundenen Anteile durch Ultrazentrifugation separiert und anschließend mittels  $^1\text{H}$ -NMR untersucht. Fluoxetin, Duloxetin und Amitriptylin zeigen für alle variierten Parameter eine vollständige Membranbindung. Imipramin unterscheidet sich dahingehend und weist bei pH 5 eine Membranbindung von 78% (protonierte Form) in DMPC-Membranen auf. Venlafaxin, das in dieser Versuchsreihe den niedrigsten Octanol-logD-Wert mit 0,9 hat, zeigt in seiner protonierten Form eine Membranbindung von 46%, wohingegen die unprotonierte Form eine erhöhte Membranpartitionierung mit 75% aufweist. Der gebundene Membrananteil für die DMPC/DMPG-Membran bei pH 5 liegt mit 97% sehr nah an denen der übrigen Antidepressiva und kann als vollständig angenommen werden. Die beobachteten Membranpartitionierungen (Abbildung 19) korrelieren gut mit den höheren Werten für logP bzw. logD (Octanol/Wasser) der Antidepressiva im Vergleich zu den Lokalanästhetika bzw. Venlafaxin.



**Abbildung 19: Membranverteilung der untersuchten Antidepressiva**

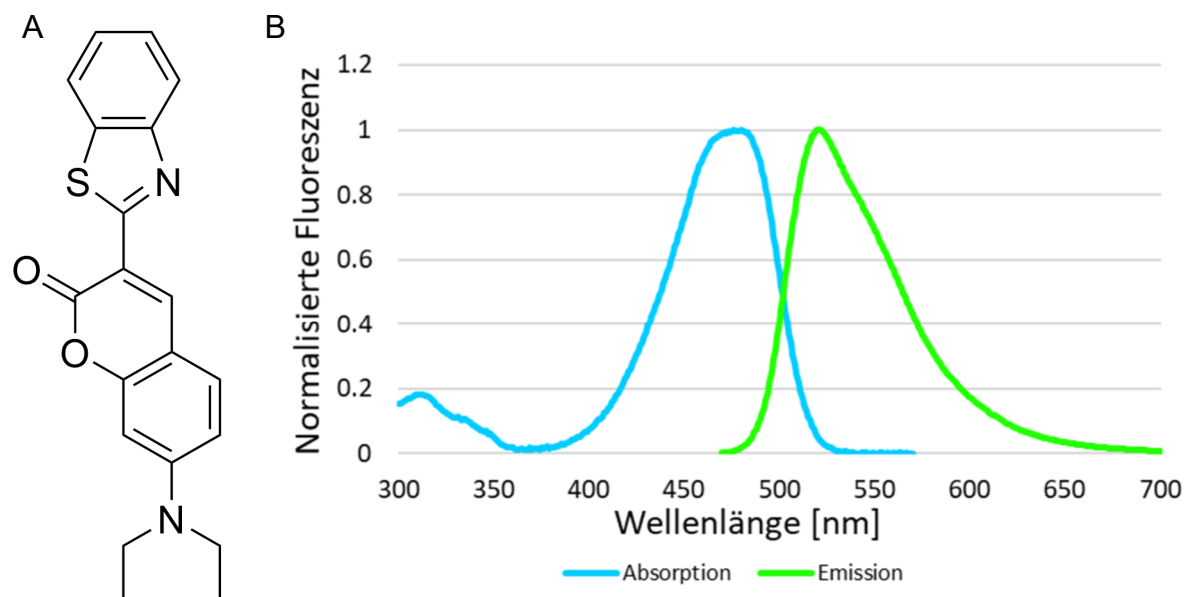
Prozentuale Verteilung innerhalb der Membran bei verschiedenen pH-Werten. Fluoxetin, Duloxetin und Amitriptylin zeigen keine Veränderung und binden vollständig für pH 5 und pH 10 sowie pH 5 und einer DMPC/DMPG-Membran. Imipramin zeigt für pH 5 (protonierte Form) eine geringere Konzentration innerhalb der Membran. Venlafaxin zeigt dieses Verhalten ebenfalls und zusätzlich eine geringere Membranbindung als die übrigen Antidepressiva bei pH 10.

### 3.1.2 Kritische Mizellbildungskonzentration via Fluoreszenzsonde

Die kritische Mizellbildungskonzentration (engl. *critical micelle concentration* – CMC) beschreibt die Konzentration oberhalb der amphiphile Moleküle in wässriger Lösung spontan Mizellen ausbilden. Bilden sich diese supramolekularen Strukturen verschieben sich durch das veränderte Aggregationsverhalten wichtige Eigenschaften der Lösung. Zu diesen zählen Oberflächenspannung, Viskosität, Leitfähigkeit und Trübung. Darüber hinaus ist für Medikamente wie Lokalanästhetika und Psychopharmaka die Bioverfügbarkeit relevant. Auch diese wird durch die Bildung von Mizellen eingeschränkt bzw. verändert. Da die meisten dieser Substanzen eine amphiphile Struktur aufweisen, bilden sie unter physiologischen Bedingungen ab einer bestimmten Konzentration Mizellen aus. Neben der Bioverfügbarkeit wird so die Löslichkeit sowie die Möglichkeit, Wechselwirkungen mit Membranen einzugehen beeinflusst. Durch Ermittlung der CMC können ebenfalls Rückschlüsse auf die Eindringtiefe amphiphiler Moleküle in Membranen gezogen werden. Eine hohe CMC weist dabei auf eine niedrige Hydrophobizität und eine Einlagerung in der Kopfgruppenregion der Membranlipide hin, wohingegen eine niedrige CMC auf eine erhöhte Hydrophobizität sowie den Verbleib der Moleküle in tieferen Schichten der Lipidmembran hindeutet. Klassische Verfahren zur Bestimmung der CMC wie Oberflächenspannungs- oder Leitfähigkeitsmessungen sind zwar etabliert, aber weisen entweder einen hohen Material- bzw. Zeitaufwand auf oder sind methodisch oder sensitivitätsbedingt limitiert. Daher wurde die CMC mittels der Fluoreszenzsonde Coumarin-6 (Abbildung 20A) bestimmt (siehe dazu Kapitel 7.2.5). Bedingt durch die schlechte Wasserlöslichkeit des Farbstoffs kann eine signifikante Fluoreszenz (Abbildung 20B) erst gemessen werden, wenn dieser in einer hydrophoben Umgebung, beispielsweise Mizellen amphiphiler Substanzen oder Lipide, gelöst ist. Zur Auswertung wurden je zwei lineare Regressionen, einmal unterhalb und oberhalb der CMC, gekennzeichnet durch einen sprunghaften Anstieg der Fluoreszenz, angewandt und durch Berechnung des Schnittpunkts dieser beiden Geraden die CMC bestimmt (Abbildung 21). Für Lidocain wurden die folgenden Konzentrationen untersucht: 0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180 und 200 mM. Die CMC für Lidocain liegt bei ca. 131 mM. Procain zeigt einen niedrigeren Wert von 92 mM, wobei bedingt durch die Löslichkeit Konzentrationen im Bereich von 0 bis 160 mM, jeweils in 20 mM Schritten, untersucht wurden. Bupivacain zeigt ebenfalls eine deutlich niedrigere CMC von 51 mM. Die Proben zur Bestimmung enthielten je 0; 20; 40; 60;



## Ergebnisse



**Abbildung 20: Coumarin-6 Struktur sowie Absorptions- und Emissionsspektrum**

**A** Struktur von Coumarin-6, das als Fluoreszenzsonde dient, die erst nach Einlagerung in eine hydrophobe Umgebung fluoresziert. **B** Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluorophors mit Maxima bei ca.  $\lambda_{\text{Ex}}$  480 nm und  $\lambda_{\text{Em}}$  520 nm.

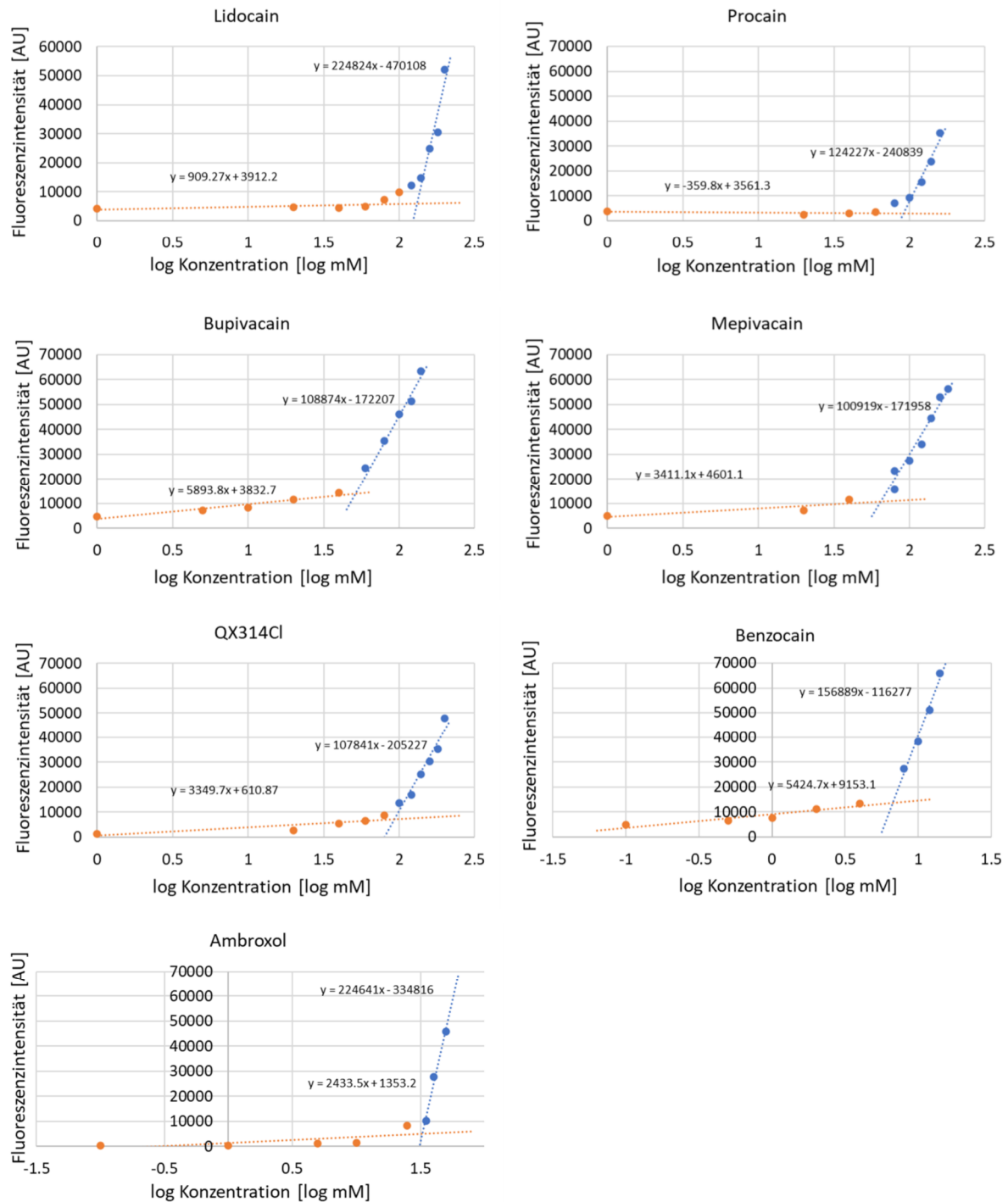
80; 100; 120; 140; 160 und 180 mM Bupivacain. Dieselben Konzentrationen wurden für Mepivacain verwendet, dessen CMC bei 64 mM liegt. QX314 als gut lösliches Lidocainderivat wurde ebenfalls in 20 mM Schritten von 0 bis 200 mM eingesetzt, wobei eine CMC von 89 mM berechnet wurde. Bedingt durch seine ausgeprägte Hydrophobizität musste die Konzentrationsreihe für Benzocain angepasst werden, um der dadurch reduzierten Löslichkeit Rechnung zu tragen. Eingesetzt wurden 0,1; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 12 und 14 mM Benzocain. Mit 7 mM weist Benzocain die niedrigste CMC der untersuchten Lokalanästhetika auf. Die Reihe der eingesetzten Konzentrationen musste für Ambroxol ebenfalls modifiziert werden und umfasste 0,1; 1; 5; 10; 25; 35; 40 sowie 50 mM. Die CMC konnte somit bei 33 mM bestimmt werden. Die Konzentrationen, bei denen sich Mizellen ausbilden, liegen demnach zwischen 7 mM für Benzocain und 131 mM für Lidocain (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Zusammenfassung CMC der Lokalanästhetika bei pH 7,4**

Die mittels Fluoreszenzsonde Coumarin-6 ermittelten CMC der Lokalanästhetika Lidocain, Procain, Bupivacain, Mepivacain, QX314, Benzocain und Ambroxol.

Wirkstoff	Lidocain	Procain	Bupivacain	Mepivacain	QX314	Benzocain	Ambroxol
CMC [mM]	131	92	51	64	89	7	33

## Ergebnisse



**Abbildung 21: CMC der untersuchten Lokalanästhetika**

Mittels Fluoreszenzsonde Coumarin-6 wurden unterschiedliche Konzentrationen von Lokalanästhetika in 100 mM Phosphatpuffer bei pH 7,4 untersucht. Die CMC wurde dann durch den Schnittpunkt zweier linearer Regressionen bestimmt, einer unterhalb der CMC, bei dem noch keine nennenswerte Fluoreszenz auftrat, sowie eine Gerade oberhalb der CMC, deren Messpunkte bereits eine markante Fluoreszenz aufwiesen.

## Ergebnisse

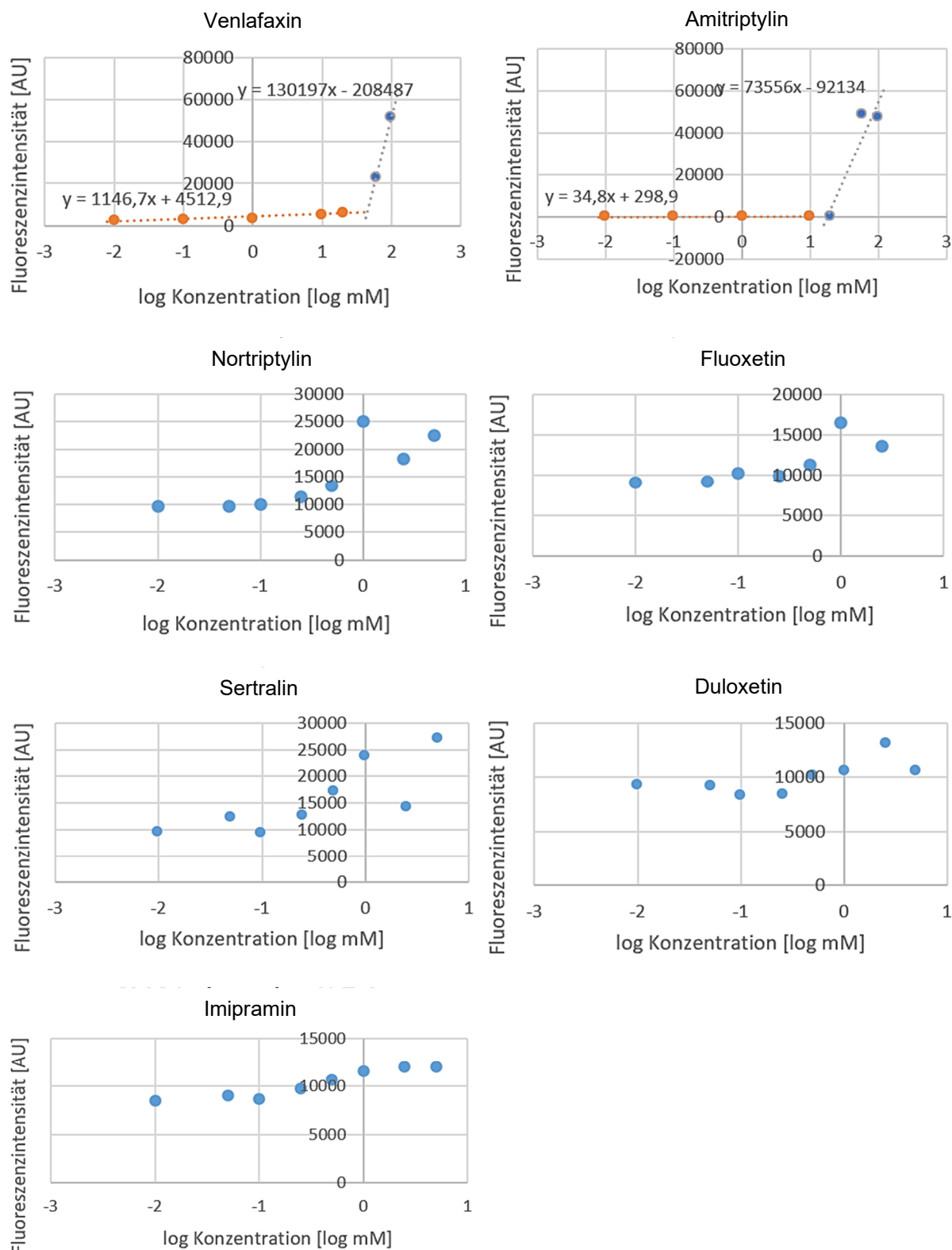
In derselben Weise wurden die CMC für die untersuchten Antidepressiva bei pH 7,4 bestimmt (Abbildung 22). Für die beiden Wirkstoffe Venlafaxin und Amitriptylin wurden Konzentrationsreihen von 0,01 mM über 0,1; 1; 10; 20; 60 bis zu 100 mM gemessen und jeweils Werte von 45 mM bzw. 18 mM erhalten (Tabelle 3). Die übrigen Antidepressiva (Nortriptylin, Fluoxetin, Sertralin, Duloxetin und Imipramin) waren schlecht wasserlöslich, weswegen niedrigere Konzentrationen eingesetzt wurden. Obwohl Antidepressiva bei physiologischen pH überwiegend protoniert vorliegen, verhindert ihre ungünstige Molekülgeometrie teilweise eine effektive Mizellbildung. Mit Ausnahme von Fluoxetin, dessen maximale Konzentration 2,5 mM war, wurde als Maximum 5 mM verwendet und die einzelnen Reihen über 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 bis zu 0,01 mM fortgesetzt. Jedoch konnte für keinen dieser niedrig dosierten Wirkstoffe zuverlässig eine CMC bestimmt werden, da ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz ausblieb, jedoch bei höheren Konzentrationen Löslichkeitsprobleme bestanden. Besonders deutlich zeigen dies Imipramin und Duloxetin, deren Fluoreszenzwerte unter 15.000 AU bleiben, bei einer Basislinie von ca. 10.000 AU (Abbildung 22). Unter Vernachlässigung höherer Konzentrationen kann für die Antidepressiva Nortriptylin, Fluoxetin und Sertralin eine CMC von < 1 mM abgeschätzt werden (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Zusammenfassung CMC der Antidepressiva bei pH 7,4**

Die mittels Fluoreszenzsonde Coumarin-6 ermittelten CMC der Antidepressiva Venlafaxin, Amitriptylin, Nortriptylin, Fluoxetin, Sertralin, Duloxetin und Imipramin, wobei die Werte für Nortriptylin, Fluoxetin und Sertralin abgeschätzt\* und nicht berechnet wurden. Die CMC von Imipramin und Duloxetin liegt über deren praktisch umsetzbaren Konzentrationen.

Wirkstoff	Venlafaxin	Amitriptylin	Nortriptylin	Fluoxetin	Sertralin	Duloxetin	Imipramin
CMC [mM]	45	18	< 1*	< 1*	< 1*	-	-

## Ergebnisse



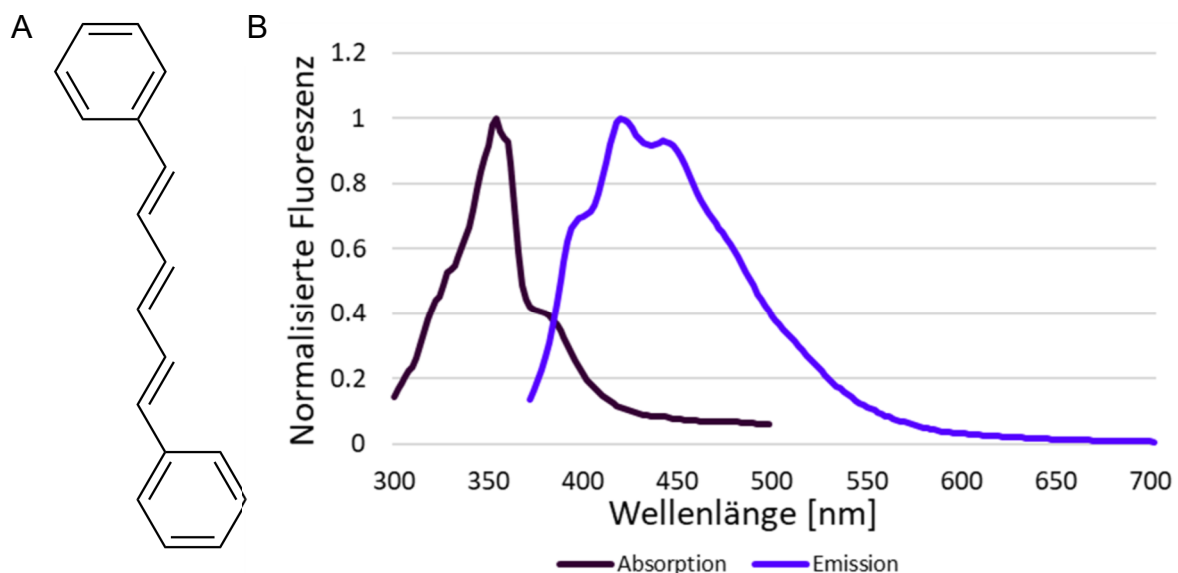
**Abbildung 22: CMC der untersuchten Antidepressiva**

Mittels Fluoreszenzsonde Coumarin-6 wurden unterschiedliche Konzentrationen von Lokalanästhetika in 100 mM Phosphatpuffer bei pH 7,4 untersucht. Die CMC wurde durch den Schnittpunkt zweier linearer Regressionen bestimmt, einer unterhalb der CMC, bei dem noch keine nennenswerte Fluoreszenz auftrat, sowie eine Gerade oberhalb der CMC, deren Messpunkte bereits eine signifikante Fluoreszenz aufwiesen. Werte konnten verlässlich lediglich für Venlafaxin und Amitriptylin bestimmt werden.

## Ergebnisse

### 3.1.3 Membranfluidität und Phasenübergang via Fluoreszenzpolarisation

Amphiphile Stoffe wie Lokalanästhetika lagern sich in Lipidmembranen ein und beeinflussen so die laterale Packung der Lipide, die Wechselwirkungen innerhalb der Membran und damit das kollektive Schmelzverhalten. Um diese membranmodulierende Wirkung messbar zu machen, wurden die Membranfluidität und der thermotrope Phasenübergang von DMPC-Liposomen über die Fluoreszenzpolarisation der Sonde Diphenylhexatrien (DPH) (Abbildung 23A) bestimmt, die bei ca. 354 nm angeregt wurde und deren Fluoreszenzmaximum bei ca. 420 nm liegt (Abbildung 23B). Dabei wird über die Rotationsdynamik der in die Membran integrierten Fluoreszenzsonde indirekt die Beweglichkeit der Lipidketten detektiert. Mit steigender Temperatur lässt sich so  $T_m$  der DMPC-Liposomen bei 23°C visualisieren, da sich in diesem Bereich ein charakteristischer Abfall der Polarisationswerte zeigt, der den Übergang von der  $L\beta$ - in die  $L\alpha$ -Phase darstellt.

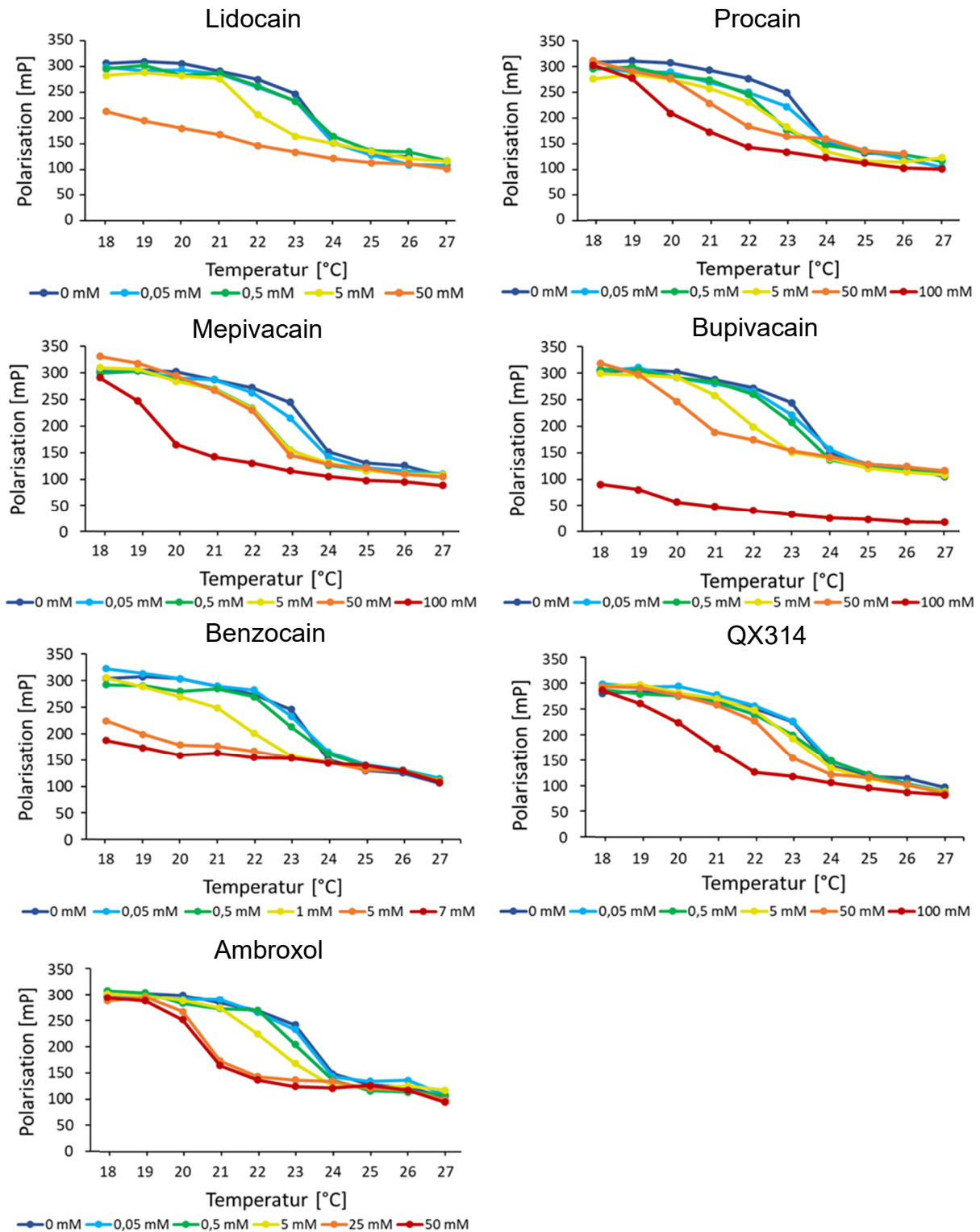


**Abbildung 23: DPH-Struktur sowie Absorptions- und Emissionsspektrum**

**A** Struktur von DPH, das als Fluoreszenzsonde dient. Die Beweglichkeit der Lipidketten beeinflusst die Fluoreszenzpolarisation. **B** Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluorophors mit Maxima bei ca.  $\lambda_{Ex}$  354 nm und  $\lambda_{Em}$  420 nm.

Der Einfluss der untersuchten Lokalanästhetika auf die Membranfluidität wurde im Temperaturbereich von 18 bis 27°C bei verschiedenen Konzentrationen beobachtet (Abbildung 24). Die gemessene Polarisation wurde hierfür gegen die Temperatur aufgetragen, um Unterschiede für die absoluten Werte als auch eine Verschiebung des Phasenübergangs zu visualisieren. Dabei zeigten bei niedrigen Konzentrationen alle Lokalanästhetika kaum einen Einfluss, sowohl auf den Phasenübergang als auch die absoluten Polarisationswerte.

## Ergebnisse



**Abbildung 24: DPH-Fluoreszenzpolarisation in DMPC-Liposomen mit Lokalanästhetika**

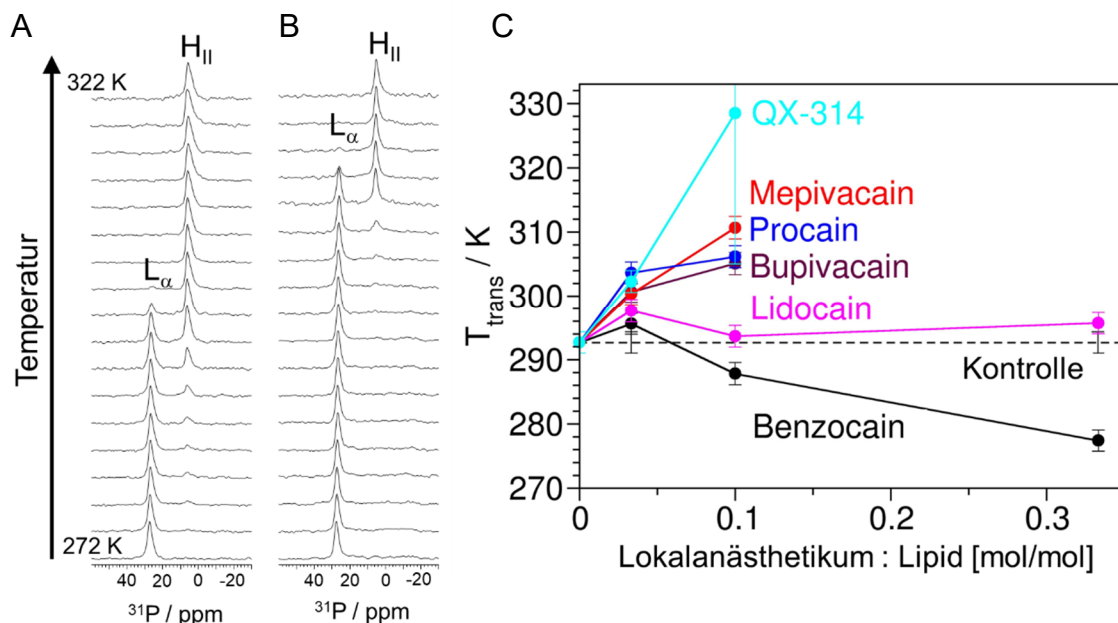
Die Polarisation in mP ist gegen die Temperatur in °C aufgetragen. Die Phasenübergangstemperatur der DMPC-Vesikel ist gekennzeichnet durch einen abrupten Abfall der Polarisationswerte. Für alle Lokalanästhetika wurden Konzentrationen zwischen 0,05 und 50 bzw. 100 mM gemessen, außer für Benzocain, dessen Löslichkeit dies nicht gestattete. Zur schnellen Differenzierung sind die Konzentrationen in einem Farbverlaufsschema von blau für niedrige bis rot für hohe Konzentration illustriert. Alle untersuchten Lokalanästhetika zeigen ab unterschiedlichen Konzentrationen eine Absenkung der Phasenübergangstemperatur. Mit Ausnahme von Mepivacain und Ambroxol zeigten die übrigen Lokalanästhetika außerdem eine Verbreiterung des Phasenübergangs für die Konzentrationen, die den Phasenübergang selbst reduzierten. Experimente wurden im Triplikat durchgeführt.

## Ergebnisse

Lidocain zeigt ab einer Konzentration von 5 mM einen deutlichen Effekt. Die Phasenübergangstemperatur wird erniedrigt und der Phasenübergang an sich breiter. Die absoluten Polarisationswerte scheinen insgesamt leicht zu sinken, sowohl vor als auch nach dem Phasenübergang, wobei dieser Effekt in der  $L\alpha$ -Phase markanter ausgeprägt ist. Dies zeigt sich besonders deutlich bei 50 mM Lidocain. Bei dieser Konzentration ist die reine  $L\beta$ -Phase nicht sichtbar, da die Polarisationswerte bereits zu sinken begonnen haben und bei 18°C bei -88 mP liegen. Auch Procain zeigt eine leichte Erniedrigung der absoluten Polarisationswerte. Die Phasenübergangstemperatur wird ebenfalls gesenkt, allerdings schon ab einer Konzentration von 0,5 mM. Höhere Konzentrationen, 50 und 100 mM, zeigen einen stärkeren Effekt und eine intensive Verbreiterung des Phasenübergangs. Mepivacain zeigt ebenfalls ab 0,5 mM eine Verringerung der Phasenübergangstemperatur. Der Verlauf ist aber zwischen 0,5 und 50 mM nicht nennenswert verbreitert. Die höchste Konzentration mit 100 mM Mepivacain zeigt überdies keine Veränderung des Kurvenverlaufs, dafür aber eine starke Absenkung der Phasenübergangstemperatur auf ca. 19°C. Ein signifikantes Absinken der Temperatur des Phasenübergangs ist für Bupivacain für 5 und 50 mM auf ca. 20 bzw. 21°C sichtbar. Im Vergleich zum abrupten Absinken der Polarisationswerte für die Kontrollprobe zeigen diese hohen Konzentrationen Bupivacain einen flacheren Abfall der Polarisation. Mit einer Fluoreszenzpolarisation zwischen -200 und -300 mP liegt die höchste Konzentration mit 100 mM Bupivacain deutlich unter den typischen, gemessenen Polarisationswerten. Ein Phasenübergang lässt sich für diese Konzentration nicht bestimmen. Benzocain als stark hydrophobes Lokalanästhetikum wurde in wesentlich geringeren Konzentrationen untersucht. Trotzdem zeigte es bereits ab 1 mM eine Reduktion der Phasenübergangstemperatur auf ca. 21°C und eine Verbreiterung des Übergangs. Für 5 bzw. 7 mM setzte sich dieser Trend fort, wobei die Temperatur des Phasenübergangs hier niedriger als 18°C liegt und die absoluten Polarisationswerte, zumindest für die  $L\alpha$ -Phase, vergleichbar sind. QX314 beeinflusst die Membranfluidität ab 50 mM. Dies schlägt sich in der Absenkung der Phasenübergangstemperatur auf 22°C nieder. Eine Verbreiterung des Phasenübergangs findet für 100 mM QX314 statt, wobei die entsprechende Temperatur auf ungefähr 20°C abgesenkt wird. Schlussendlich erniedrigt Ambroxol ab ca. 5 mM die Phasenübergangstemperatur. Ebenso für 25 bzw. 50 mM, allerdings stärker auf 20°C. Eine nennenswerte Verbreiterung des Phasenübergangs findet kaum statt.

### 3.1.4 Spontane Krümmung via $^{31}\text{P}$ -NMR

Wichtiger Parameter für die Konformation von Membranproteinen ist nicht nur das laterale Druckprofil, sondern auch die spontane Membrankrümmung, welche durch das Eindringen von Molekülen in die Lipidmembran modifiziert werden kann. Amphiphile Moleküle, wie Lokalanästhetika oder Antidepressiva, haben somit das Potential über die Veränderung der Membrankrümmung die Funktion membranständiger Proteine zu beeinflussen. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurde der Phasenübergang von lamellarer zu hexagonaler Phase anhand orientierter DOPE-Lipid-Proben in Gegenwart der amphiphilen Moleküle mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR bestimmt – siehe dazu Kapitel 7.3.2. Die unterhalb von ca. 290 K vorherrschende lamellare  $L_\alpha$ -Phase geht bei höheren Temperaturen zur invertierten hexagonalen  $H_{II}$ -Phase über. Die Phasenübergangstemperatur wird durch Moleküle, die eine negative Krümmung favorisieren gesenkt, wodurch die  $H_{II}$ -Phase, detektiert bei 5 ppm (Abbildung 25A), stabilisiert wird. Eine positive oder neutrale Krümmung erhöht die Übergangstemperatur und stabilisiert die  $L_\alpha$ -Phase, welche ein Signal bei 27 ppm zeigt (Abbildung 25B). In Abwesenheit von Wirkstoffen lag die Phasenübergangstemperatur in diesem Versuchsaufbau bei ungefähr 292 K. Die untersuchten Lokalanästhetika wurden in unterschiedlichen Verhältnissen zu DOPE eingesetzt.



**Abbildung 25: DOPE-Phasenübergang und Modifikation durch Lokalanästhetika**

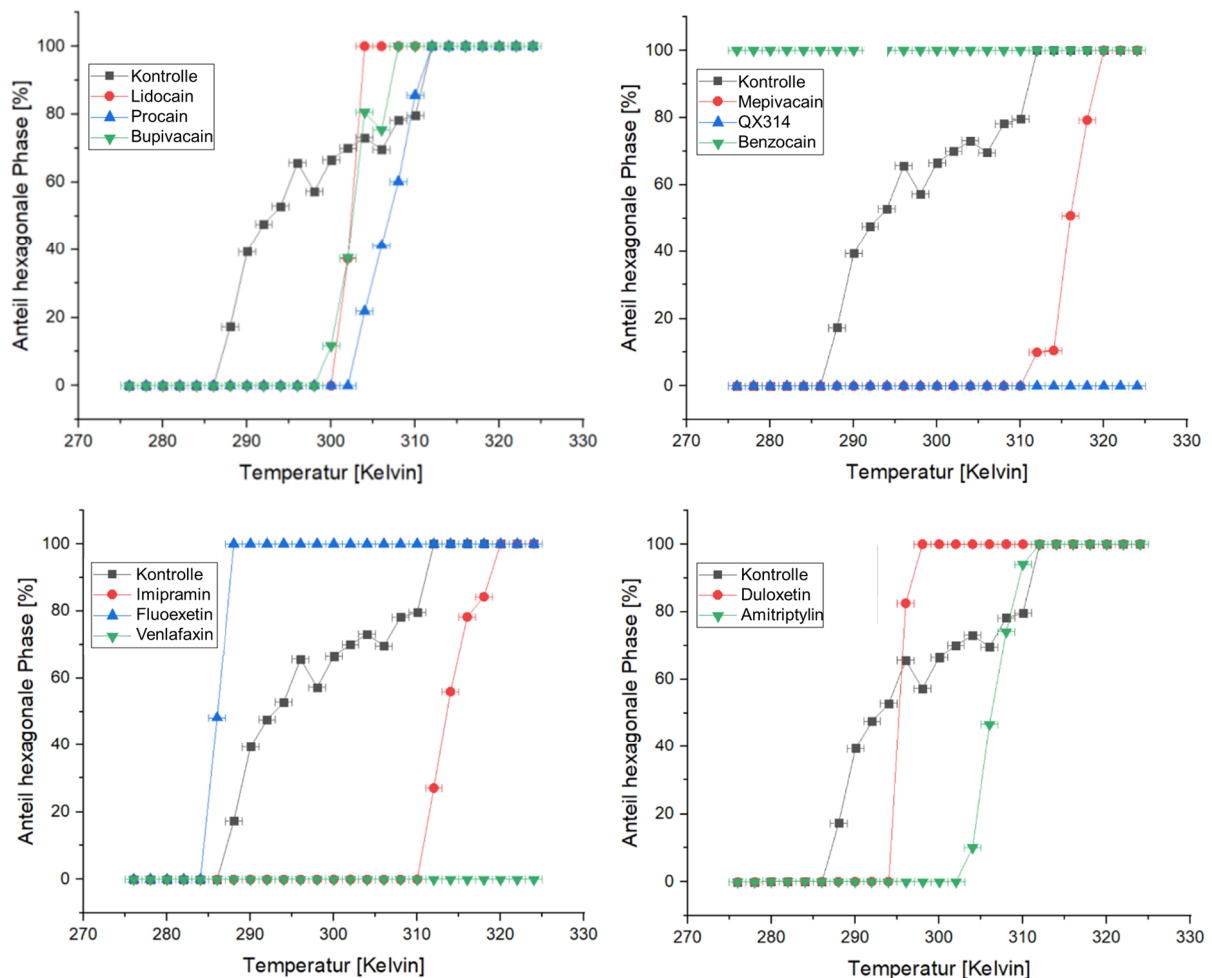
$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von **A** DOPE und **B** Procain, das in DOPE im Verhältnis 1:10 rekonstituiert wurde. Der Phasenübergang zwischen lamellarer ( $L_\alpha$ ) und hexagonaler ( $H_{II}$ ) Phase wurde im Bereich zwischen 272 bis 322 K in Schritten von 3 K observiert. **C** Es wurden verschiedene Verhältnisse zwischen Lokalanästhetikum und Lipid untersucht, wobei die gestrichelte Linie reines DOPE in Abwesenheit von Lokalanästhetika zeigt.



## Ergebnisse

Dabei zeigten Bupivacain, Mepivacain, Procain und QX314 eine deutliche Erhöhung der Phasenübergangstemperatur, während Lidocain kaum einen messbaren Einfluss ausübte, wohingegen Benzocain durch Induktion negativer Krümmung die Übergangstemperatur absenkte (Abbildung 25C).

Um die Bindung der protonierten Lokalanästhetika und Antidepressiva in den wasserreicheren Vesikelpollen zu gewährleisten, wurde die DOPE-Modellmembran mit 10% negativ geladener Myristinsäure versetzt (siehe Kapitel 7.3.2). Der Phasenübergang war für diese Mischung breiter als für reines DOPE und fand von ca. 286 bis 312 K statt (Abbildung 26). Die untersuchten Moleküle wurden im Verhältnis 1:5, bezogen auf DOPE und Myristinsäure, zugegeben. In Gegenwart der Lokalanästhetika Lidocain, Procain und Bupivacain verringerte sich die Breite des Phasenübergangs deutlich auf maximal 10 K. Die Phasenübergangstemperatur für Lidocain und Bupivacain beträgt ca. 303 K sowie für Procain ca. 307 K, womit sie im Vergleich zur Kontrollprobe erhöht wurde. Mepivacain erhöht die Phasenübergangstemperatur noch



**Abbildung 26: DOPE-Phasenübergang unter Einfluss von Lokalanästhetika und Antidepressiva**  
Abgebildet sind die temperaturinduzierten Phasenübergänge einer DOPE-Membran, der Myristinsäure zur Bindung protonierter Moleküle beigemischt wurde. Aufgetragen ist der Anteil der hexagonalen Phase in Prozent gegen die Temperatur in Kelvin, wobei die Kontrollprobe in schwarz dargestellt ist.

## Ergebnisse

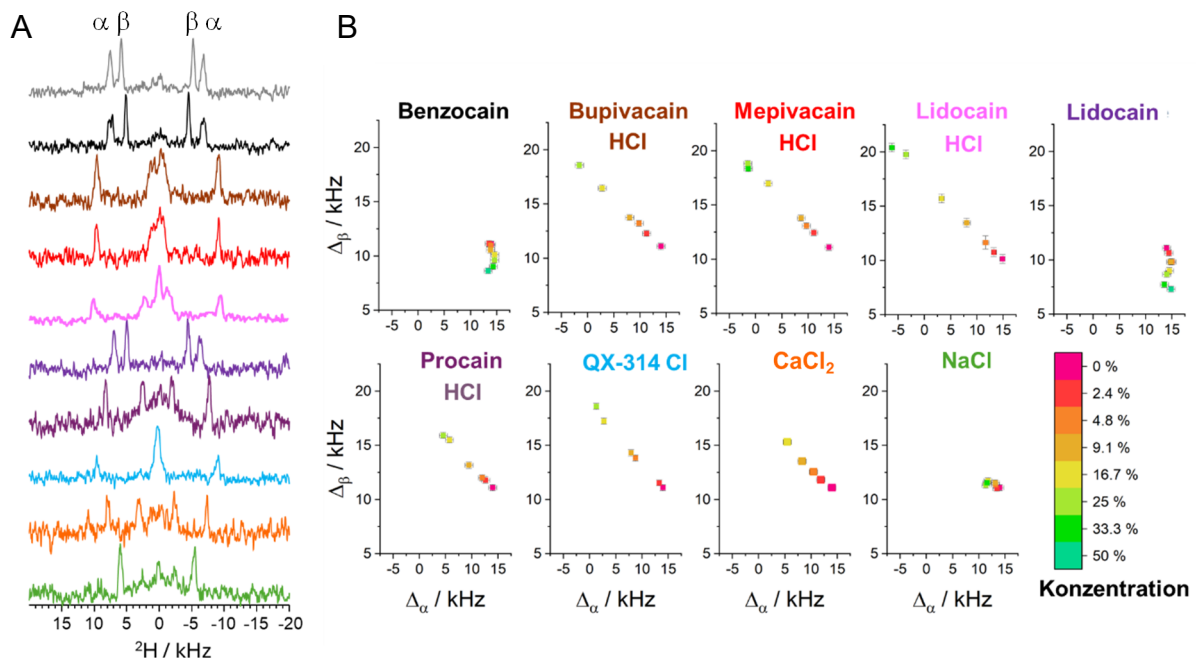
stärker auf 316 K und verringert die Breite ebenfalls. Im beobachteten Bereich von 276 bis 324 K findet für QX314 und Benzocain kein Phasenübergang statt. Für QX314 verbleibt die Modellmembran selbst bei 324 K in der lamellaren Phase, wohingegen sie unter Zugabe von Benzocain auch bei 276 K noch in der hexagonalen Phase vorlag (Abbildung 26). Bei den untersuchten Antidepressiva in DOPE-Myristinsäure-Systemen zeigt Venlafaxin das gleiche Verhalten wie QX314 indem kein Phasenübergang in die hexagonale Phase, selbst bei 324 K, stattfindet. Für Fluoxetin ist eine niedrigere Phasenübergangstemperatur von ca. 286 K mit einer Breite von 4 K zu beobachten und für Imipramin liegt sie mit 314 K und einer Breite von 10 K über der Kontrollprobe. Schließlich wurde für Duloxetin der Phasenübergang bei 295 K, Übergangsbreite 4 K, und für Amitriptylin bei 306 K, Übergangsbreite 10 K, bestimmt. Somit zeigen alle zugegebenen Lokalanästhetika und Antidepressiva einen markanten Einfluss, sowohl auf die Phasenübergangstemperatur als auch die Breite des Phasenübergangs von der lamellaren zur hexagonalen Phase (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Phasenübergangstemperaturen und Phasenübergangsbreiten**  
Mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR bestimmte Phasenübergangstemperaturen und -Breiten in Kelvin für DOPE-Membranen mit Myristinsäure. Alle eingesetzten Lokalanästhetika und Antidepressiva zeigen einen deutlichen Einfluss auf die untersuchten Parameter.

Molekül	Phasenübergangstemperatur [K]	Phasenübergangsbreite [K]
Kontrolle	293	26 (286 – 312)
Lidocain	303	4 (300 – 304)
Procain	307	10 (302 – 312)
Bupivacain	303	10 (298 – 308)
Mepivacain	316	10 (310 – 320)
QX314	> 324	Keine hexagonale Phase
Benzocain	< 276	Keine lamellare Phase
Imipramin	314	10 (310 – 320)
Fluoxetin	286	4 (284 – 288)
Venlafaxin	> 324	Keine hexagonale Phase
Duloxetin	295	4 (294 – 298)
Amitriptylin	306	10 (302 – 312)
Nortriptylin	n.b.	n.b.
Sertralin	n.b.	n.b.

### 3.1.5 Voltmeter: Einfluss auf Lipidkopfggruppen via $^2\text{H}$ NMR

Typischerweise bildet sich ein elektrischer Dipol in zwitterionischen Kopfgruppen wie Phosphatidylcholin. Dafür sorgen die positive Ladung des quartären Stickstoffs im Cholin und die negative Ladung des Phosphats. Werden die beiden Methylengruppen zwischen diesen geladenen Gruppen deuteriert, so lässt sich die Orientierung und Beweglichkeit des P-N-Dipols via Festkörper- $^2\text{H}$  NMR bestimmen – siehe dazu auch Kapitel 7.3.3. Für die Messungen wurden orientierte Proben verwendet, bei denen das Cholin in DMPC zu 5 % deuteriert war und diese mit unterschiedlichen Konzentrationen an Lokalanästhetika versetzt. Die Spektren zeigen dann zwei Dubletts, die den beiden deuterierten Methylengruppen zugeordnet werden können und aus der Quadrupolkopplung resultieren (Abbildung 27A). Die beiden Dubletts können den Deuteriumatomen des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms (äußeres Dublett mit größerer Aufspaltung) und  $\beta$ -Kohlenstoffatoms (inneres Dublett) zugeordnet werden. Die Aufspaltungen  $\Delta\alpha$  und  $\Delta\beta$  zwischen den beiden Dubletts ändern sich in Relation zur zugegebenen Menge an Lokalanästhetikum und können gegeneinander in einem  $\alpha$ - $\beta$ -Plot dargestellt werden, um die jeweilige Tendenz zu visualisieren (Abbildung 27B).



**Abbildung 27: Einfluss von Lokalanästhetika auf Lipid-Kopfgruppen via  $^2\text{H}$  NMR**

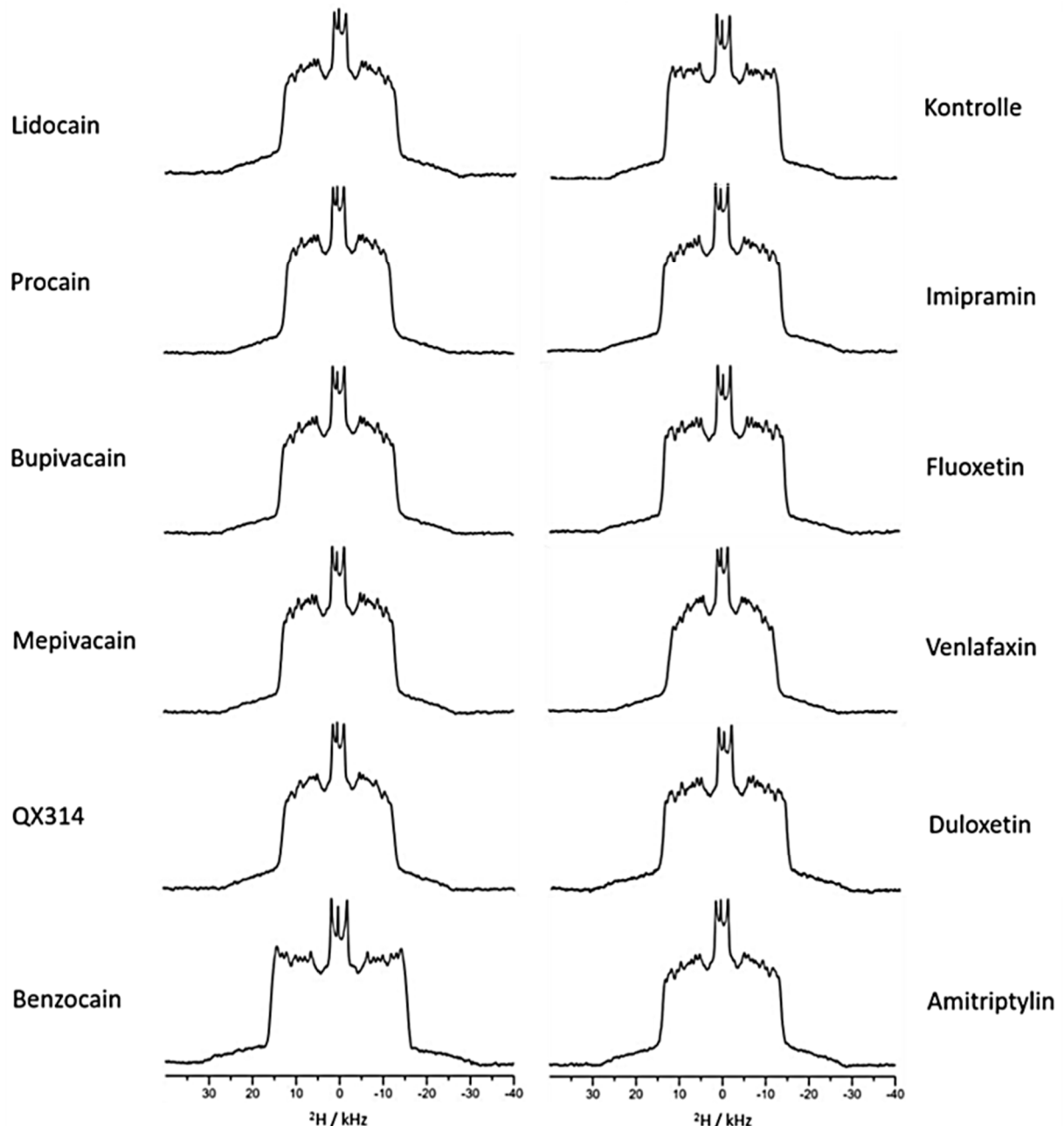
**A**  $^2\text{H}$  NMR-Spektren der DMPC-Lokalanästhetikum-Proben im Verhältnis 3:1. Das eingesetzte Lipid ist in der Cholingruppe deuteriert. Beobachtet werden kann somit die Konformationsänderung des P-N-Dipols. **B** Verschiedene Lokalanästhetikum-Lipid-Verhältnisse wurden gemessen und die Aufspaltung der beiden Dubletts  $\Delta\alpha$  und  $\Delta\beta$  gegeneinander aufgetragen.

$\Delta\beta$  nimmt mit steigender Lokalanästhetikakonzentration zu, wohingegen  $\Delta\alpha$  in fast allen Fällen abnimmt. Benzocain und Lidocain, die ebenfalls in neutraler Form, also nicht als Hydrochlorid für diese Experimente eingesetzt wurden, bilden hier die Ausnahme, wobei bei diesen beiden Lokalanästhetika  $\Delta\alpha$  nahezu unverändert bleibt. Somit können bei den  $\alpha$ - $\beta$ -Plots zwei Muster identifiziert werden, die sich deutlich voneinander unterscheiden: auf der einen Seite die in neutraler Form vorliegenden Lokalanästhetika Benzocain und Lidocain und auf der anderen Seite die übrigen, protonierten Moleküle. Da die Unterschiede innerhalb dieser Gruppen nur geringfügig sind, kann geschlussfolgert werden, dass die Ladung den dominanten Einfluss auf die Kopfgruppe ausübt. Um dies zu verifizieren, wurden darüber hinaus Messungen mit Calcium- und Natriumchlorid durchgeführt, wobei NaCl kaum einen Effekt, ähnlich dem der neutralen Lokalanästhetika, hat.  $\text{CaCl}_2$  bzw. Calciumionen, die stark mit der Phosphatgruppe interagieren, zeigen hingegen einen vergleichbaren Effekt wie die protonierten Lokalanästhetika. Der beobachtete Effekt ist also einer positiven Ladung in unmittelbarer Nähe zur Kopfgruppe zuzuordnen.

### 3.1.6 Ordnungsparameter: Mobilität der Lipidketten via $^2\text{H}$ NMR

Die Anwesenheit von amphiphilen Molekülen in der Lipiddoppelschicht führt zu einem veränderten Ordnungsparameter der Acylketten als auch einer Modulation der hydrophoben Dicke und der Fläche pro Lipid. Diese Parameter können via Festkörper- $^2\text{H}$ -NMR observiert werden, indem deuteriertes Lipid, beispielsweise DMPCd<sub>54</sub>, eingesetzt wird (siehe Anhang 9.1). Die aufgezeichneten Pake-Dubletts (Abbildung 28) wurden numerisch entfaltet und dadurch aus zwei sich überlappenden Pulverspektren die orientierten Spektren rekonstruiert (siehe Kapitel 7.3.4). Als Kontrollprobe wurde DMPC/DMPG im Verhältnis 1:1, wobei dem DMPC 20% DMPCd<sub>54</sub> beigemischt war, eingesetzt. Aus dessen Spektrum wurde, wie auch für alle darauffolgenden Proben, ein Ordnungsparameterprofil (Ordnungsparameter aufgetragen gegen Kohlenstoffnummer) erstellt. Dieses Profil zeigt bei steigender Kohlenstoffanzahl einen Abfall des Ordnungsparameters, was den erwarteten Messwerten entspricht, da mit Annäherung an das Ende der Acylkette die Bewegungsfreiheit zunimmt. Umgekehrt weisen die Kohlenstoffatome in der Nähe der Kopfgruppen einen höheren Ordnungsparameter auf, da deren Bewegungsfreiheit durch die Fixierung der Kopfgruppe eingeschränkt ist. Der Verlauf der Ordnungsparameterprofile ist daher charakteristisch abfallend wie eben beschrieben (Abbildung 29 & 30).

## Ergebnisse

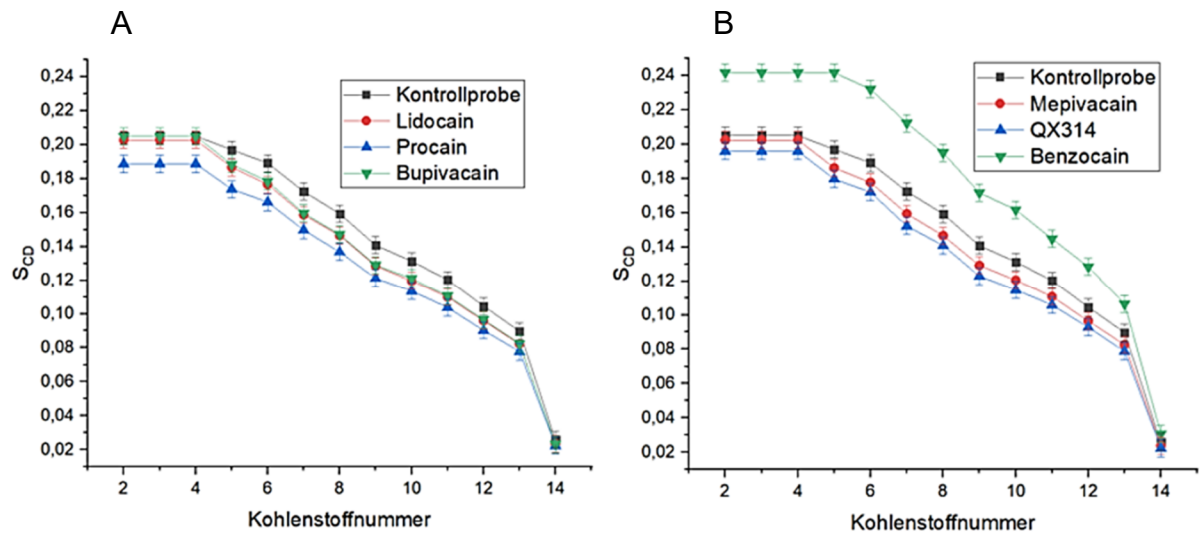


**Abbildung 28: Ordnungsparameter via  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der  $\text{DMPC}_{54}/\text{DMPG}$ -Vesikel**

Bei 308 K aufgezeichnete  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der Lipidmodellmembranen unter Einfluss der angegebenen Lokalanästhetika und Antidepressiva. Das Verhältnis Amphiphil zu Lipid betrug 1:5. Die Spektren erlauben die Bestimmung des Ordnungsparameters, der Rückschlüsse auf die Bewegungsfreiheit der Lipidkohlenstoffatome und damit die Lokalisation der zugegebenen Moleküle zulässt (Abbildung verändert entnommen aus Schwarz<sup>124</sup>).

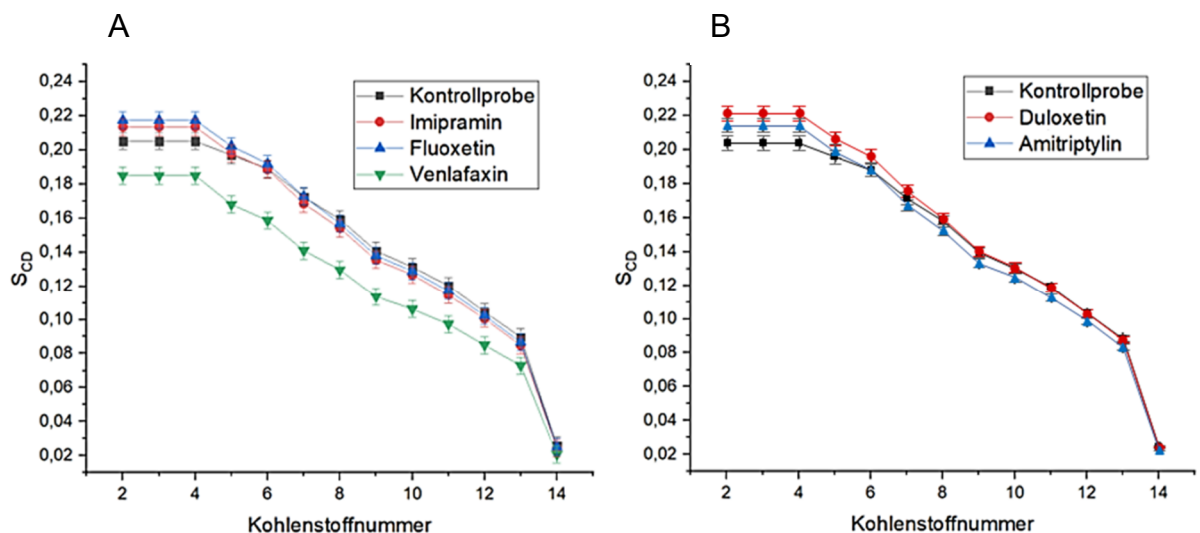
Alle untersuchten Modellmembranen, die mit Lokalanästhetika versetzt wurden, weisen eine mehr oder weniger starke Abweichung von dem Ordnungsparameterprofil der Kontrollprobe auf. Daher unterscheiden sich auch die berechneten Werte für die hydrophobe Dicke, die die Ausdehnung der Acylketten der Membran beschreibt, und die Fläche pro Lipid, welche den Platz wiedergibt, den ein einzelnes Lipidmolekül in der Doppelschicht einnimmt.

## Ergebnisse



**Abbildung 29: Ordnungsparameterprofile der Lokalanästhetika**

Dargestellt sind Ordnungsparameterprofile von DMPCd<sub>54</sub>/DMPG-Proben im Molverhältnis 1:1 nach Zugabe verschiedener Lokalanästhetika. Die Substanzen wurden jeweils in einem molaren Verhältnis von 1:5 (Lokalanästhetikum:Lipid) zugesetzt. Aufgetragen ist der Ordnungsparameter  $S_{CD}$  in Abhängigkeit von der Kohlenstoffposition der DMPC-Acylketten. In **A** sind die Effekte von Lidocain (rot), Procain (blau) und Bupivacain (grün) dargestellt, in **B** die von Mepivacain (rot), QX314 (blau) und Benzocain (grün). Zum Vergleich ist in beiden Fällen das Profil der unbehandelten Kontrollprobe (schwarz) gezeigt (Abbildung verändert entnommen aus Schwarz<sup>124</sup>).



**Abbildung 30: Ordnungsparameterprofile der Antidepressiva**

Dargestellt sind Ordnungsparameterprofile von DMPCd<sub>54</sub>/DMPG-Proben im Molverhältnis 1:1 nach Zugabe verschiedener Antidepressiva. Die Substanzen wurden jeweils in einem molaren Verhältnis von 1:5 (Lokalanästhetikum:Lipid) zugesetzt. Aufgetragen ist der Ordnungsparameter  $S_{CD}$  in Abhängigkeit von der Kohlenstoffposition der DMPC-Acylketten. In **A** sind die Effekte von Imipramin (rot), Fluoxetin (blau) und Venlafaxin (grün) dargestellt, in **B** die von Duloxetin (rot) und Amitriptylin (blau). Zum Vergleich ist in beiden Fällen das Profil der unbehandelten Kontrollprobe (schwarz) gezeigt (Abbildung verändert entnommen aus Schwarz<sup>124</sup>).

## Ergebnisse

Im Vergleich zur Kontrollprobe verursacht die Zugabe von Procain zur Modellmembran eine Verringerung der Ordnungsparameterwerte (Abbildung 27A). Für die Kontrolle weist Kohlenstoffatom Nummer 2 einen Wert von 0,205, für die Procainprobe jedoch 0,189 auf. Diese Differenz lässt sich für Procain im gesamten Profil beobachten, mit Ausnahme des letzten Kohlenstoffatoms, dessen Wert für den Ordnungsparameter mit ca. 0,023 für alle untersuchten Lokalanästhetika in etwa identisch ist (Abbildung 29A & B). Lidocain und Procain führen ebenfalls eine Absenkung der Ordnungsparameter herbei (Abbildung 29A), der für die Kohlenstoffatome 2-4 noch markant war, danach jedoch auf niedrige Werte um 0,010 absank. Beide Lokalanästhetika zeigen nahezu gleiche Werte, unterscheiden sich in ihrer Wirkung also kaum. Mepivacain und QX314 erniedrigen die Werte für den Ordnungsparameter über das gesamte Profil hinweg (Abbildung 29B), wobei für die ersten drei Kohlenstoffatome die Abweichung zur Kontrollprobe mit 0,003 und 0,009 für Mepivacain bzw. QX314 gering ausfällt. Die weiter von der Kopfgruppe entfernten Kohlenstoffe zeigen eine durchschnittliche höhere Differenz mit 0,011 für Mepivacain und 0,050 für QX314. Benzocain zeigt eine gegensätzliche Tendenz mit der Abweichung der Ordnungsparameterwerte (Abbildung 29B). Diese liegen allesamt oberhalb der Kontrolle. Die Differenz fällt von anfänglich durchschnittlich 0,037 für C2 – C4 stetig ab, liegt aber selbst bei C13 noch bei 0,017. Der Unterschied für das letzte Kohlenstoffatom ist auch für Benzocain nur noch minimal.

Venlafaxin erniedrigt das Ordnungsparameterprofil im Vergleich zur Kontrollprobe deutlich, wobei C14 auch für alle untersuchten Antidepressiva kaum Abweichungen zeigt (Abbildung 30A). Die übrigen untersuchten amphiphilen Moleküle (Imipramin, Fluoxetin, Duloxetin und Amitriptylin) zeigen allesamt einen ähnlichen Profilverlauf. So liegen für Imipramin C2 – C5 und für Fluoxetin C2 – C7 oberhalb des Kontrollprofils, sinken aber für die übrigen Kohlenstoffatomen unter die Werte der Kontrolle (Abbildung 30A). Duloxetin und Amitriptylin weisen denselben Trend auf (Abbildung 30B). Bei diesen Antidepressiva liegen die Ordnungsparameter für C2 – C11 bzw. C2 – C7 oberhalb der Kontrolle und fallen danach ebenfalls unter die der Kontrollwerte ab. Aus dem durchschnittlichen gesamten Ordnungsparameter der jeweiligen Substanz und der Plateauregion, C2 – C6, wurden die hydrophobe Dicke und die Fläche pro Lipid berechnet (Tabelle 5), siehe dazu Kapitel 7.3.4. Diese erlauben es, die Elastizität und Packungsdichte der Membran zu interpretieren.

## Ergebnisse

**Tabelle 5: Zusammenfassung der relevanten Werte bezüglich der Lipiddynamik**

Durchschnittlicher Ordnungsparameter der gesamten Acylkette  $\langle S_{CD} \rangle$  sowie Mittelwerte der Ordnungsparameter der Plateauregion C2 – C6  $S_p$ . Aus diesen Werten wurden die effektive Membrandicke des Acylkettenbereichs  $2D_c$  und die Moleküloberfläche pro Lipid  $A$  berechnet. Zusätzlich sind die Abweichungen  $\Delta 2D_c$  und  $\Delta A$  gegenüber der Kontrollprobe angegeben.

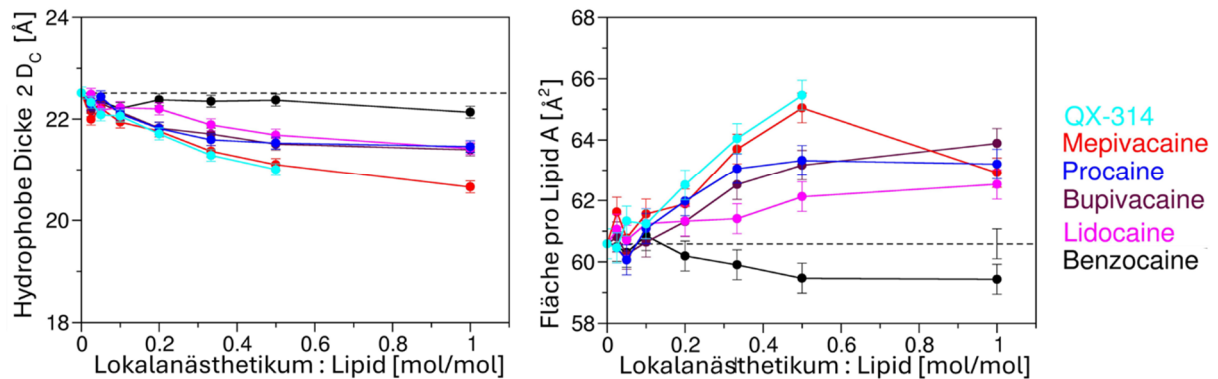
<b>Amphiphil</b>	<b><math>\langle S_{CD} \rangle</math></b>	<b><math>S_p</math></b>	<b><math>2D_c</math> [Å]</b>	<b><math>A</math> [Å<sup>2</sup>]</b>	<b><math>\Delta 2D_c</math> [Å]</b>	<b><math>\Delta A</math> [Å<sup>2</sup>]</b>
Kontrolle	0,150	0,38	21,90	61,08	0,00	0,00
Benzocain	0,174	0,44	22,77	57,76	+0,87	-3,32
Duloxetin	0,158	0,40	22,07	59,84	+0,17	-1,24
Fluoxetin	0,154	0,39	21,96	60,29	+0,06	-0,79
Amitriptylin	0,153	0,38	21,89	60,46	-0,01	-0,62
Imipramin	0,153	0,38	21,88	60,63	-0,03	-0,45
Bupivacain	0,145	0,36	21,70	61,43	-0,20	+0,35
Mepivacain	0,144	0,36	21,67	61,62	-0,23	+0,54
Lidocain	0,144	0,36	21,66	61,61	-0,24	+0,53
QX314	0,138	0,34	21,52	62,20	-0,38	+1,12
Procain	0,134	0,34	21,42	62,82	-0,48	+1,74
Venlafaxin	0,128	0,32	21,26	63,28	-0,64	+2,20

Benzocain zeigt die stärkste Zunahme der Membrandicke mit +0,87 Å bei gleichzeitiger Verringerung der Fläche pro Lipid um -3,32 Å<sup>2</sup>, was auf eine Verdichtung und stärkere Ordnung der Membran schließen lässt. Eine leichte Erhöhung bzw. für Amitriptylin und Imipramin eine vernachlässigbare Abnahme zeigen Duloxetin, Fluoxetin, Amitriptylin und Imipramin, bei gleichzeitiger Reduktion der Lipidfläche von -0,45 bis -1,24 Å<sup>2</sup>. Damit verdichten diese vier Antidepressiva die Membran bzw. erhöhen deren Ordnung moderat. Bupivacain, Mepivacain und Lidocain zeigen eine leichte Abnahme der hydrophoben Dicke von ca. -0,2 Å und eine leichte Zunahme der Fläche pro Lipid zwischen +0,35 und +0,54 Å<sup>2</sup>. Diese Tendenz verstärkt sich für die Lokalanästhetika QX314 und Procain mit einer deutlicheren Abnahme der Dicke von -0,38 und -0,48 Å sowie einer Erhöhung der Fläche um +1,12 Å<sup>2</sup> und +1,74 Å<sup>2</sup>. Mit Ausnahme von Benzocain zeigen die Lokalanästhetika also eine Aufweitung und Flexibilisierung der Membran. Dieser Effekt ist am markantesten für das Antidepressivum Venlafaxin mit einer Verringerung der hydrophoben Dicke um -0,64 Å und einer Zunahme der Fläche pro Lipid von +2,20 Å<sup>2</sup>.



## Ergebnisse

Für die untersuchten Lokalanästhetika wurden darüber hinaus verschiedene molare Verhältnisse zwischen Lipid und Lokalanästhetikum mit orientierten Proben ohne DMPG eingesetzt (Abbildung 31). Diese bestätigen die bereits beobachteten Effekte bei Erhöhung der Konzentration für die Veränderungen der Membrandicke und Fläche pro Lipid, wobei es für hohe Mepivacain-Konzentrationen Abweichungen bei der Fläche pro Lipid zu niedrigeren Werten gibt.



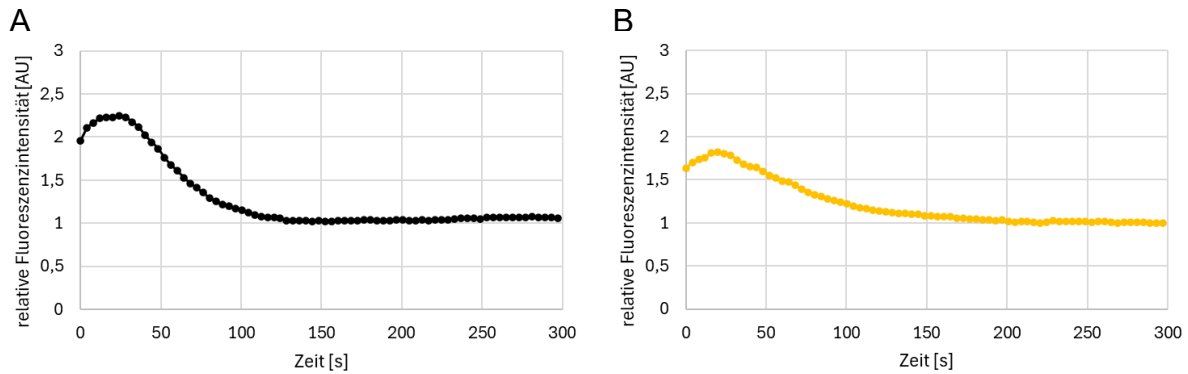
**Abbildung 31: Membranparameter für verschiedene Lokalanästhetikum-Lipid-Verhältnisse**

Hydrophobe Dicke und Fläche pro Lipid bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen zwischen Lipid und Lokalanästhetikum. Die Ausprägung der beobachteten Veränderung dieser beiden Parameter nimmt mit steigender Konzentration der Lokalanästhetika zu.

## 3.2 Modulation säureempfindlicher Kanäle

Die Untersuchung des ASIC-abhängigen Calciumeinstroms in HEK293-Zellen, die diese Kanäle endogen exprimieren, ermöglicht es den Einfluss von Lokalanästhetika auf protonenaktivierte Ionenkanäle zu erfassen. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, ob eine Modulation der Funktion dieser Ionenkanäle, die klassischerweise keine spezifischen Bindungsstellen für Lokalanästhetika aufweisen, über einen indirekten, membranvermittelten Mechanismus möglich ist. Das verwendete, auf Fluo-4 basierende, Calcium-Influx-Assay (siehe Kapitel 7.2.2) gestattet es, den durch einen raschen extrazellulären pH-Abfall ausgelösten Calciumeinstrom sowohl reproduzierbar zu detektieren als auch zu quantifizieren. Die Signalintensität des Calciuminflux wurde mittels der Differenz zwischen maximaler und minimaler Fluoreszenz ausgewertet. Die Erfassung der vollständigen Fluoreszenzkurve ist technisch aufgrund der schnellen Aktivierung der Ionenkanäle nicht möglich. Die Werte wurden normiert und die relative Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen. Ein Vergleich zwischen Calciuminflux ohne (Abbildung 32A) und mit Lokalanästhetikum (Abbildung 32B), ermöglichte es Aussagen über die Modulation der ASICs zu treffen.

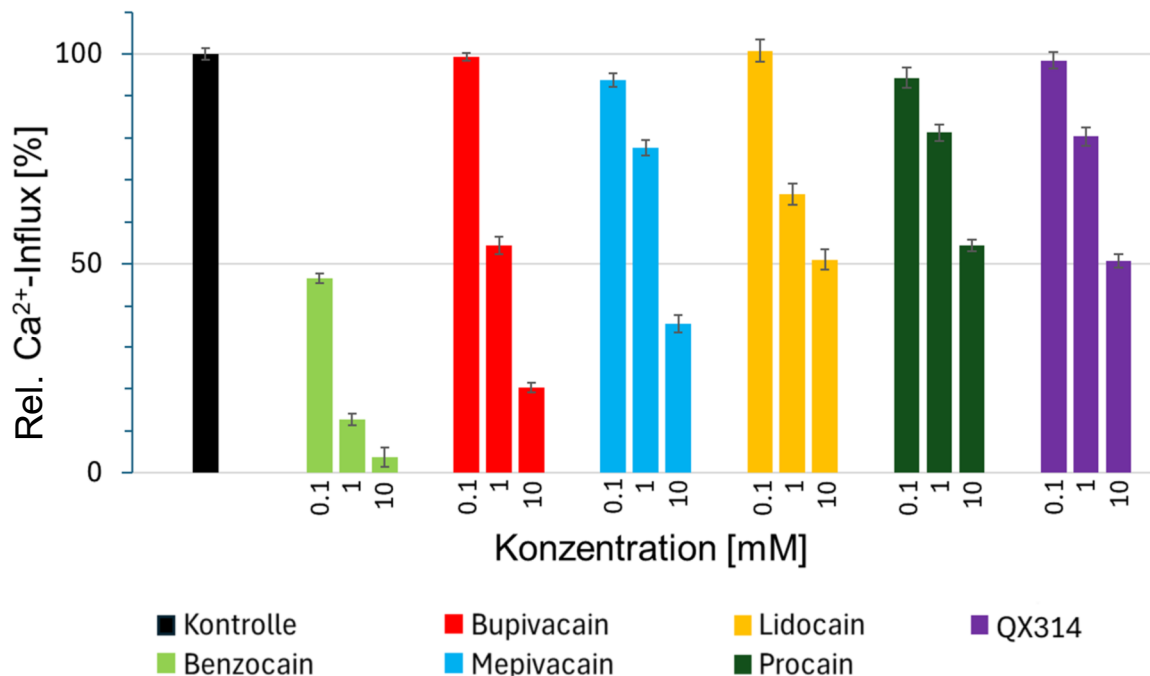
## Ergebnisse



**Abbildung 32: Fluoreszenzsignal des ASIC-Calcium-Influx in HEK293-Zellen**

Normierte Signale der relativen Fluoreszenzintensität der intrazellulären Fluoreszenzsonde Fluo-4 in Abhängigkeit der Zeit für **A** HEK293-Zellen ohne Lokalanästhetikum als Kontrolle sowie **B** HEK293-Zellen, die hier exemplarisch mit 1 mM Lidocain inkubiert wurden und daher eine geringere Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollprobe aufwiesen. Der extrazelluläre pH-Wert wurde von 7,4 auf 5,3 gesenkt, um den Calciumeinstrom auszulösen.

Nachdem die HEK293-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 mM inkubiert wurden, wurde der extrazelluläre pH-Wert von 7,4 auf 5,3 abgesenkt und die Fluoreszenz von Fluo-4 für 300 s observiert. Die Differenz zwischen Fluoreszenzmaximum und -minimum in dieser Zeit wurde für die Kontrolle als 100 % gesetzt. Die auf dieselbe Weise ermittelte Differenz der Fluoreszenzwerte der übrigen Ansätze wurde jeweils mit dieser Kontrolldifferenz verglichen (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Einfluss der Lokalanästhetika auf den Calcium-Influx via ASICs**

Einfluss der verschiedenen Lokalanästhetikakonzentrationen von 10, 1 und 0,1 mM auf den ASIC-vermittelten Calcium-Einstrom in HEK293-Zellen. Kontrolle ohne Zugabe von Lokalanästhetika in schwarz mit maximaler Fluoreszenz von 100%. Die übrigen Wirkstoffe sind nach Stärke der Fluoreszenzreduktion sortiert, beginnend bei Benzocain über Bupivacain, Mepivacain, Lidocain und Procain bis zu QX314. Experimente wurden im Triplikat durchgeführt; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

## Ergebnisse

Eine deutliche Hemmung des Calciumeinstroms ist für Benzocain bereits bei einer Konzentration von 0,1 mM sichtbar, wobei die Fluoreszenz auf 46,6% im Vergleich zur Kontrollprobe absinkt. Werden höhere Konzentrationen eingesetzt, so verstärkt sich dieser Effekt und erreicht bei 1 mM und 10 mM Werte von 12,8 bzw. 3,7%. Im Gegensatz dazu ist bei den übrigen Lokalanästhetika für die niedrigste Konzentration von 0,1 mM kaum ein Einfluss erkennbar. Die Fluoreszenz bleibt in diesen Fällen näherungsweise bei 100%. Eine Reduktion der Fluoreszenz findet erst bei 1 mM statt, wobei Mepivacain, Lidocain, Procain und QX314 diese auf ca. 75 % erniedrigen, während Bupivacain bereits bei dieser Konzentration eine deutlich stärkere Absenkung der Fluoreszenz auf einen Wert von ungefähr 50% bewirkt. Diese bereits ersichtliche Konzentrationsabhängigkeit bestätigt sich bei Begutachtung der höchsten untersuchten Konzentration von 10 mM. Für Lidocain, Procain und QX314 sinkt die Fluoreszenz hierfür auf etwa 50%, während Bupivacain mit einem Wert von 20% eine wesentlich stärkere Reduktion hervorruft. Mepivacain liegt mit einer Restfluoreszenz von rund 35% zwischen diesen beiden Ausprägungen.

### 3.3 Modulation mechanosensitiver Kanäle

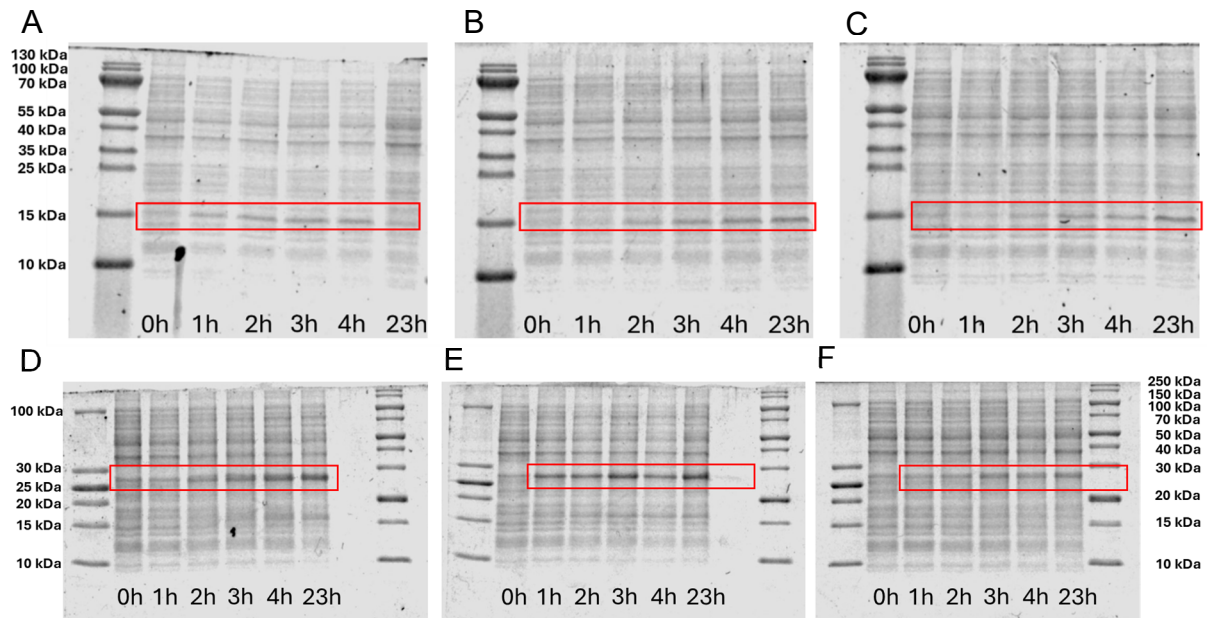
MscS und MscL wurden eingesetzt, da die Aktivität dieser mechanosensitiven Kanäle direkt durch Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften der Lipidmembran beeinflusst wird. Sie ermöglichen es so in einem einfachen rekonstituierten System Rückschlüsse auf die funktionelle Modulation der Kanäle, die keine spezifischen Bindungsstellen für Lokalanästhetika besitzen, über einen indirekten, membranvermittelten Mechanismus zu ziehen.

#### 3.3.1 Expression von MscS und MscL

Die mechanosensitiven Ionenkanäle MscS und MscL sollten in *E. coli* Lemo21-DE3-Zellen in größeren Mengen exprimiert werden (siehe Kapitel 7.1.1 – 7.1.4). Dazu wurde zunächst die optimale Rhamnosekonzentration für jedes Protein bestimmt (Abbildung 34). Für MscS beträgt diese 0,1 mM und für MscL 0,25 mM. Im Anschluss erfolgte eine Großexpression. Nach Zellaufschluss und differentieller Zentrifugation ließ sich der Hauptanteil der Proteine in der Membranfraktion nachweisen, während die lösliche Cytoplasmafraktion nur geringe Mengen enthielt, was dem erwarteten Verhalten für membranständige Protein entspricht. Triton X-100 erwies sich als geeignetes Detergens zur Solubilisierung der Kanalproteine. Sowohl MscS als auch MscL konnten auf diese Weise effizient aus der Membranfraktion

## Ergebnisse

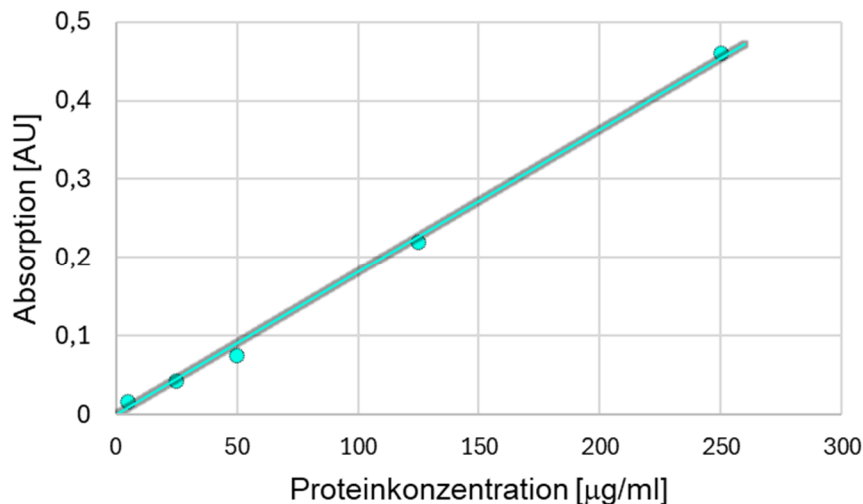
herausgelöst und anschließend über eine Nickel-Affinitätschromatografie aufgereinigt werden. Die Gesamtausbeute lag für MscS deutlich höher (Abbildung 35), was vermutlich auf Unterschiede in der zellulären Regulation und Expressionseffizienz zurückzuführen ist. Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine erfolgte mittels ROTI®Quant universal Kit (siehe Kapitel 7.1.5).



**Abbildung 34: SDS-PAGE-Gele für MscS und MscL mit variierender Rhamnosekonzentration**  
Rhamnosekonzentration der Expressionsansätze für MscL **A** 0,00 mM **B** 0,10 mM **C** 0,25 mM und MscS **D** 0,00 mM **E** 0,10 mM **F** 0,25 mM. Für MscL wurde demnach 0,25 mM und für MscS 0,10 mM Rhamnose als optimal angenommen und in der Großexpression eingesetzt (Abbildung verändert entnommen aus Stumpf<sup>153</sup>).

Dieses Verfahren beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Polypeptidbindungen im Alkalischen mit Kupferionen einen purpurfarbenen Chelatkomplex ausbilden. Da die Farbintensität direkt proportional zur Proteinkonzentration ist und sich diese spektroskopisch über die Absorption bei 492 nm bestimmen lässt, konnte mit Rinderserumalbumin als Standardprotein eine Eichgerade erstellt werden (Abbildung 35), die eine zuverlässige Berechnung der Proteinkonzentration erlaubte. Diese beträgt für MscS 101 µg/ml und für MscL 69 µg/ml.

## Ergebnisse



### Abbildung 35: Konzentrationsbestimmung von MscS und MscL via Biuret-Assay

Abgebildet ist die gemessene Absorption bei 492 nm verschiedener Konzentrationen (5, 25, 50, 125 und 250 µg/ml) an Rinderserumalbumin als Referenz. Es wurde eine lineare Regression angewendet. Die Proteinkonzentration an MscS und MscL kann anhand dieser Eichgerade über das verwendete kolorimetrische Biuret-Assay ermittelt werden und beträgt für MscS 101 µg/ml und für MscL 69 µg/ml.

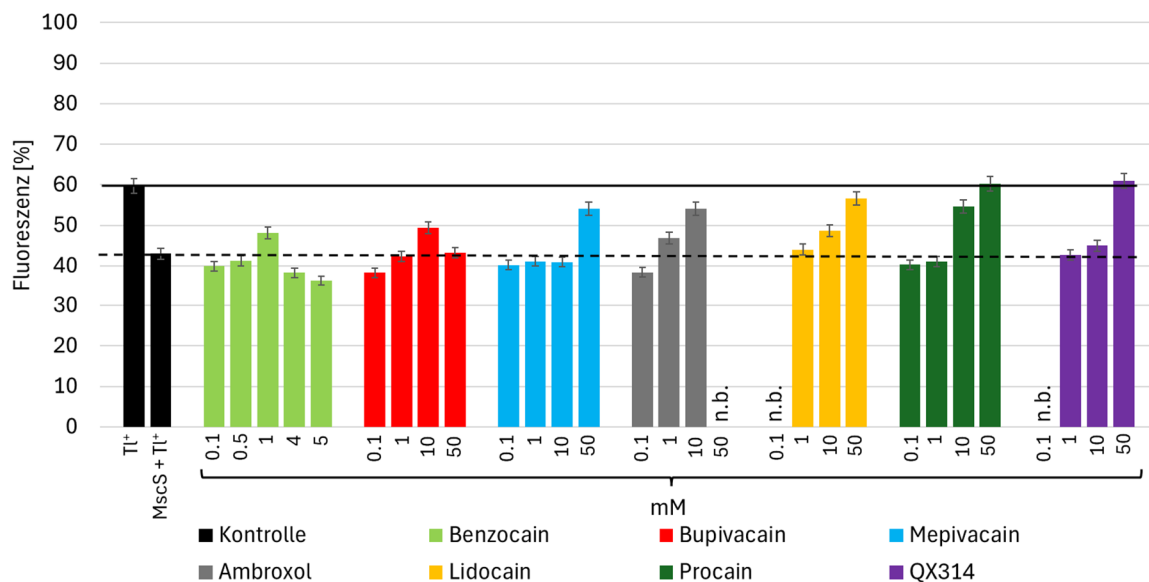
### 3.3.2 Einfluss von Lokalanästhetika auf MscS und MscL

Um den Effekt von Lokalanästhetika auf mechanosensitive Ionenkanäle zu evaluieren, wurden die in Lipidvesikeln rekonstituierten Proteine MscS und MscL in einem Fluoreszenz-Quenching-Assay untersucht (siehe Kapitel 7.2.1 und 7.2.3). Dabei diente der Fluoreszenzfarbstoff 8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS) als Reporter, der sowohl intra- als auch extravesikulär vorliegt und durch Zugabe von Thalliumionen gequenchet wird. In Kontrollproben ohne Proteinrekonstitution tritt nur basales Quenching durch die extravesikulären Thalliumionen auf. Die Öffnung der Kanäle, die durch den osmotischen Druck bedingt durch die Thalliumzugabe erfolgt, führt so zu einem zusätzlichen Thalliuminflux in die Vesikel, wodurch die Fluoreszenz stärker abnehmen kann. Auf diese Weise kann zwischen offenen und geschlossenen Zuständen der Ionenkanäle unterschieden werden. Durch die Zugabe verschiedener Konzentrationen unterschiedlicher Lokalanästhetika lässt sich überprüfen, in welchem Ausmaß diese Substanzen die Aktivierung oder Hemmung von MscS und MscL beeinflussen. Die verwendeten Konzentrationen der Lokalanästhetika wurden entsprechend ihrer Löslichkeit und den zu erwartenden effektiven Konzentrationen bestimmt. Zum Vergleich wurden Messungen unternommen, bei denen keine Ionenkanäle rekonstituiert, aber trotzdem Lokalanästhetika zugegeben wurden. Außerdem wurde überprüft, ob das zur Rekonstitution verwendete Triton X-100 Einfluss auf das Modellsystem der artifiziellen DOPE/DOPG GUVs hat. Unterschiede in der GUV-Menge wurden durch Normalisierung über die zusätzlich gemessenen

## Ergebnisse

1,1'-Diocetyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin-perchlorat-Fluoreszenz (DIL) korrigiert. So wurden sowohl eine Konzentrationsabhängigkeit der Effekte als auch Unterschiede zwischen den beiden Kanaltypen erfasst und auf dieser Grundlage die möglichen Wechselwirkungen der untersuchten Lokalanästhetika mit mechano-sensitiven Ionenkanälen über Membranlipide bzw. die veränderten Eigenschaften der Membran charakterisiert. Die maximale Fluoreszenz der GUVs ohne inkorporiertes Protein wird in der Auswertung mit 60% durch schwarze, durchgezogene Linien abgebildet, wohingegen die schwarzen, gestrichelten Linien jeweils das Fluoreszenzminimum mit rekonstituiertem MscS mit ca. 42% bzw. MscL mit ca. 35% darstellen – beide Referenzen jeweils nach dem Quenching mit Thallium, wobei die Fluoreszenz vor dem Quenching als 100% gesetzt wurde (Abbildungen 36 – 38).

Die folgenden Fluoreszenzwerte beziehen sich auf rekonstituiertes MscS in Lipidvesikeln. Lidocain, Procain und QX314 weisen dieselbe konzentrationsabhängige Wirkung auf MscS auf (Abbildung 36). Diese Lokalanästhetika zeigen bei einer Konzentration von 1 mM, bzw. für Procain von 0,1 und 1 mM eine Fluoreszenz ähnlich der Kontrolle MscS +  $Tl^+$ , üben also in niedriger Dosierung keinen Effekt aus, wodurch MscS geöffnet bleibt. Für die höhere Konzentration von 10 mM nimmt die gemessene Fluoreszenz je nach Substanz unterschiedlich stark zu: QX314 zeigt die geringste



**Abbildung 36: GUVs mit rekonstituiertem MscS und Zusatz von Lokalanästhetika**

ANTS-Fluoreszenz von DOPE/DOPG GUVs mit rekonstituiertem MscS unter Einfluss der Lokalanästhetika. Die schwarze durchgezogene Linie stellt GUVs ohne MscS dar, während die schwarze gestrichelte Linie GUVs mit membranständigem Protein zeigt. Alle Proben mit rekonstituiertem Protein wurden inner- und außerhalb der GUVs mit Thallium gequencht, bei GUVs ohne Ionenkanäle erfolgte das Quenching nur außerhalb. 100% entsprechen der Fluoreszenz der GUVs ohne MscS und ohne Quenching. Experimente wurden im Triplikat durchgeführt; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

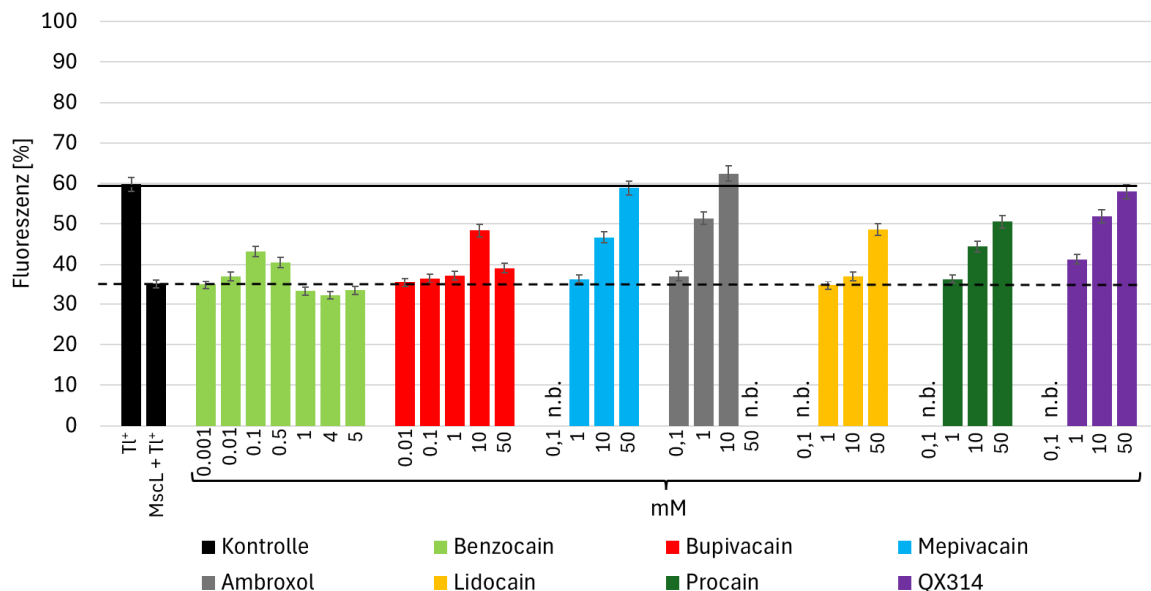
## Ergebnisse

Zunahme, über Lidocain bis hin zu Procain mit einem deutlichen Anstieg auf 54%. Die höchste eingesetzte Konzentration für diese drei Lokalanästhetika von 50 mM resultiert in Fluoreszenzwerten zwischen 57 und 61%. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass wenige bis keine Thalliumionen in die Vesikel eindringen können, um dort ANTS zu quenchen. Daher liegt MscS bedingt durch die hohe Lokalanästhetikumkonzentration im geschlossenen Zustand vor. Dieses beschriebene Muster lässt sich auch für Ambroxol beobachten, wenngleich es hier bei niedrigeren Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 mM sichtbar ist. Dies spricht für eine stärkere Beeinflussung der Membraneigenschaften bzw. Hemmung der Öffnung des mechanosensitiven Kanals. Im Gegensatz dazu steigen die Werte für Bupivacain zwar bei Erhöhung der Konzentration, fallen bei 50 mM aber auf das Niveau ohne Lokalanästhetikum zurück. Mepivacain zeigt ebenfalls ein spezielles Verhalten: Für niedrige Konzentrationen ist keine markante Veränderung der Fluoreszenzwerte sichtbar, die um die 40% verbleiben. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 50 mM zeigt sich jedoch auch für Mepivacain eine Erhöhung der Fluoreszenz, was darauf schließen lässt, dass MscS nun vermehrt im geschlossenen Zustand vorliegt. Der Einsatz höherer Konzentrationen war aus Gründen der Löslichkeit nicht möglich. Schlussendlich kann für Benzocain, das hydrophobste Lokalanästhetikum, beobachtet werden, dass ein Anstieg der Fluoreszenz bei 1 mM erfolgt, höhere Konzentrationen von 4 und 5 mM allerdings unterhalb der Referenz MscS +  $\text{TI}^+$  liegen. Limitationen bezüglich der Löslichkeit verhinderten auch für dieses Lokalanästhetikum die Untersuchung höherer Konzentrationen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für in Liposomen rekonstituiertes MscL beschrieben. Die Fluoreszenzwerte für Mepivacain und QX314 für MscL liegen bei niedrigen Konzentrationen von 1 mM leicht über der minimalen Fluoreszenz, was auf einen verringerten Einstrom von Thalliumionen hinweist (Abbildung 37). Dies setzt sich sowohl für 10 als auch für 50 mM in einer konzentrationsabhängigen Weise fort. Beide Lokalanästhetika zeigen für die höchste Konzentration eine Fluoreszenz von ungefähr 60%, was darauf schließen lässt, dass MscL weitgehend im geschlossenen Zustand vorliegt. Ambroxol zeigt für MscL dasselbe Muster wie Mepivacain und QX314, jedoch bereits bei niedrigeren Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 mM. Procain verhält sich ebenfalls ähnlich, wobei die Fluoreszenzwerte nicht so stark zunehmen, wie bei den vorher genannten Substanzen. Das Maximum liegt hier bei ca. 50% für die höchste

## Ergebnisse

untersuchte Konzentration von 50 mM. Lidocain, dessen Fluoreszenzwerte für 10 mM noch nicht markant steigen, endet ebenfalls bei ca. 50% für die gleiche, hohe Konzentration. Dies lässt auf eine teilweise Schließung der MscL-Population schließen. Bupivacain und Benzocain unterscheiden sich bezüglich ihres Effekts auf MscL im Vergleich zu den anderen Lokalanästhetika. Die Fluoreszenz von Bupivacain steigt ähnlich der von Lidocain für 10 mM auf knapp unter 50% an, sinkt aber für die 50 mM Konzentration auf einen Wert knapp oberhalb der minimalen Referenz ab. Der Fluoreszenzanstieg von Benzocain ist noch flacher mit einem Maximum von ca. 42% bei 0,1 mM und sinkenden Fluoreszenzwerten für die höheren Konzentrationen, wobei 1, 4 und 5 mM bereits knapp unterhalb der Fluoreszenz von MscL +  $Tl^+$  liegen. Niedrige Konzentrationen von Bupivacain und Benzocain schließen demnach MscL, wohingegen höhere Dosierungen zu einer scheinbaren Öffnung führen.



**Abbildung 37: GUVs mit rekonstituiertem MscL und Zusatz von Lokalanästhetika**

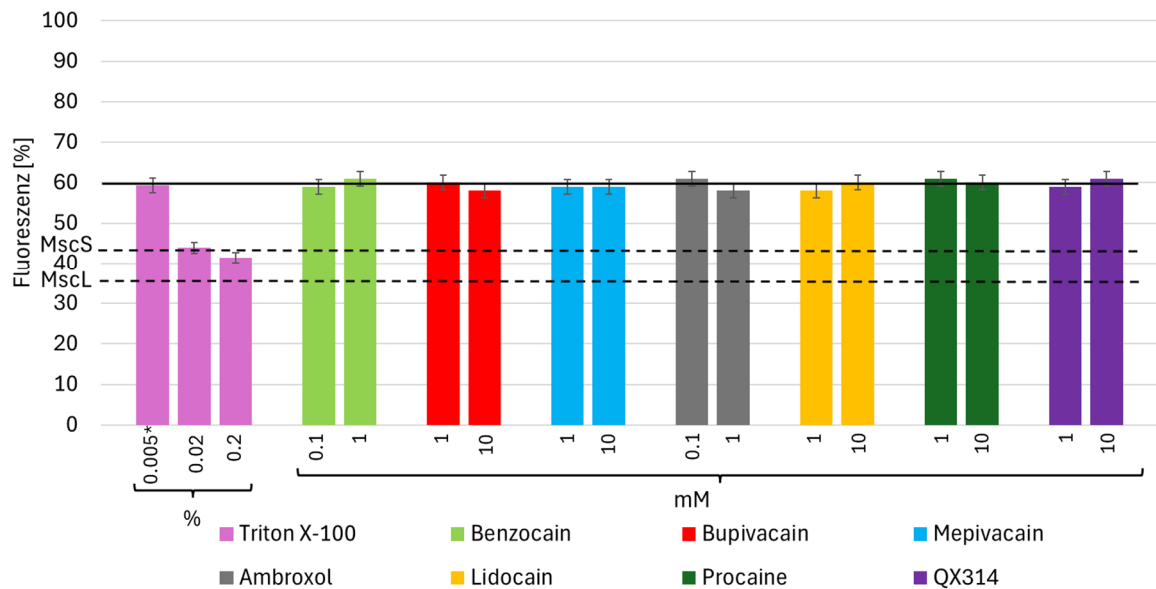
ANTS-Fluoreszenz von DOPE/DOPG GUVs mit rekonstituiertem MscL unter Einfluss der Lokalanästhetika. Die schwarze durchgezogene Linie stellt GUVs ohne MscS dar, während die schwarze gestrichelte Linie GUVs mit membranständigem Protein zeigt. Alle Proben mit rekonstituiertem Protein wurden inner- und außerhalb der GUVs mit Thallium gequench, bei GUVs ohne Ionenkanäle erfolgte das Quenching nur außerhalb. 100% entsprechen der Fluoreszenz der GUVs ohne MscL und ohne Quenching. Experimente wurden im Triplikat durchgeführt; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Um zu überprüfen, ob Lokalanästhetika selbst die GUVs bzw. das Fluoreszenzsignal beeinflussen, wurden diese amphiphilen Moleküle zu Lipidvesikeln ohne rekonstituierte mechanosensitive Kanäle gegeben. Die emittierte Fluoreszenz für diese Experimente ist vergleichbar mit der Kontrollprobe ohne integriertes Protein bei gleichzeitigem Quenching (Abbildung 38). Die Vesikelintegrität wird durch deren Gegenwart also nicht beeinflusst.



## Ergebnisse

Um ausschließen zu können, dass Triton X-100-Residuen aus der Proteinrekonstitution Einfluss auf die Fluoreszenzwerte nehmen können, wurden verschiedene Konzentrationen zu den GUVs hinzugegeben. Die zur Rekonstitution eingesetzte Triton X-100 Konzentration betrug maximal 0,005% und zeigt im Fluoreszenz-Quenching-Assay keine Erniedrigung der Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollprobe ohne rekonstituierten mechanosensitiven Kanal bei gleichzeitiger Thalliumzugabe (Abbildung 38). Bei höheren Konzentrationen von 0,02% und 0,2% Triton X-100 in der Gesamtlösung sinkt die Fluoreszenz auf Werte zwischen MscS und MscL. Da dies in Abwesenheit mechanosensitiver Ionenkanäle passiert, müssen die Thalliumionen zum Quenchen der Fluoreszenz anderweitig in Kontakt mit ANTS kommen. Eine Destabilisierung der Lipidvesikel scheint wahrscheinlich.



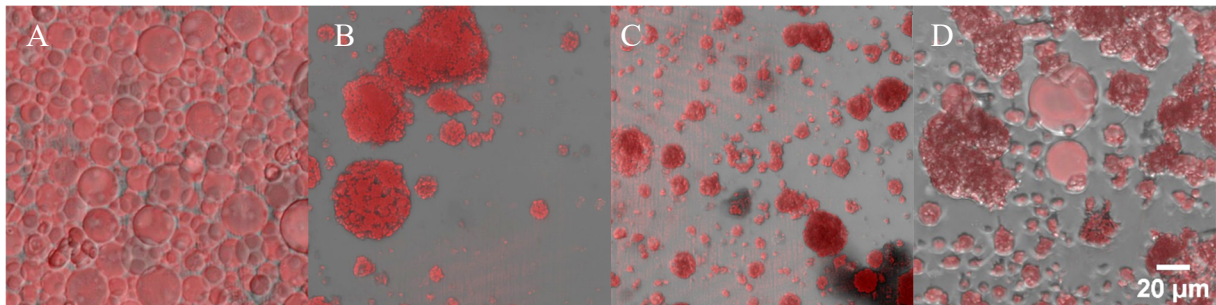
**Abbildung 38: GUVs ohne rekonstituierte mechanosensitive Kanäle**

ANTS-Fluoreszenz von DOPE/DOPG GUVs ohne rekonstituierte mechanosensitive Kanäle unter Einfluss der Lokalanästhetika sowie Triton X-100. Die schwarze durchgezogene Linie stellt GUVs ohne Ionenkanäle dar, während die schwarzen gestrichelten Linien jeweils GUVs mit membranständigen MscS bzw. MscL zeigen. Da alle Proben keine Ionenkanäle beinhalten, wurden diese lediglich außerhalb der GUVs mit Thallium gequenchet. 100% entsprechen der Fluoreszenz der GUVs ohne Ionenkanal und ohne Quenching. Experimente wurden im Triplikate durchgeführt; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. \*In den übrigen Experimenten zur Rekonstitution von MscS/MscL eingesetzte Triton X-100 Konzentration: 0,02%. Diese wurde bei der Rekonstitution noch weiter verdünnt auf maximal 0,005%.

Um die von den übrigen Lokalanästhetika abweichenden Ergebnisse, insbesondere bei Benzocain und Bupivacain, zu untersuchen, wurden zusätzliche Kontrollen mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs DIL durchgeführt (siehe Kapitel 7.2.1). Das Ziel war zu prüfen, ob die beobachteten Effekte einer scheinbaren Ionenkanalinhibition – also der sinkenden Fluoreszenz – durch eine

## Ergebnisse

direkte Destabilisierung der GUVs und nicht durch membranvermittelte Interaktion mit den mechanosensitiven Kanälen verursacht wurden. Die GUVs ohne Zugabe von Lokalanästhetika blieben intakt. Im Gegensatz dazu führten hohe Konzentrationen von Benzocain (5 mM), Bupivacain (100 mM) sowie 0,2% Triton X-100 selbst in Abwesenheit von mechanosensitiven Kanälen zur Zerstörung der Vesikel (Abbildung 39 A – D). Niedrigere Konzentrationen von Benzocain und Bupivacain sowie alle Konzentrationen der übrigen Lokalanästhetika zeigten keine destabilisierenden Effekte. Daraus lässt sich schließen, dass die bei hohen Konzentrationen von Benzocain und Bupivacain sowie Triton X-100 beobachteten Fluoreszenzveränderungen auf eine direkte Vesikeldestabilisierung zurückzuführen sind.



**Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopie von GUVs mit hohen Lokalanästhetikakonzentrationen**  
**A** Intakte GUVs ohne Zusatz von Lokalanästhetika **B – D** Zerstörte GUVs: **B** 5 mM Benzocain **C** 100 mM Bupivacain **D** 0,2% Triton X-100

## 4 Diskussion

Biologische Membranen sind hochdynamische, heterogene Systeme, deren biophysikalischen Eigenschaften, wie Lipidzusammensetzung, laterales Druckprofil oder Phasenverhalten, entscheidend die Struktur und Funktion eingebetteter Proteine bestimmen.<sup>101,102,104</sup> Amphiphile Wirkstoffe, zu denen klassische Lokalanästhetika ebenso wie verschiedene Antidepressiva zählen, scheinen, zumindest neben ihrer Bindung an spezifische Rezeptoren, häufig ebenfalls über eine Modulation der Lipidmatrix selbst und daraus resultierender Veränderung der Membranfluidität, Phasenübergangstemperaturen und lateralen Spannung zu wirken.<sup>8,24,119</sup> Die Veränderung dieser Eigenschaften könnte dann wiederum Einfluss auf membranständige Proteine haben. In dieser Arbeit sollten daher biophysikalische Änderungen der Membran umfassend und systematisch erfasst werden. Die Methodik reichte dafür von Fluoreszenzmessungen und Fluoreszenzpolarisationsexperimenten über spektroskopische Methoden wie  $^1\text{H}$ -,  $^2\text{H}$ -, und  $^{31}\text{P}$ -NMR, hin zu Fluoreszenzassays, die auf der Detektion von Ioneninflux basierten. Erfasst werden sollten damit die Membran-Wasser-Verteilung der Amphiphile, deren kritische Mizellbildungskonzentration und deren Einfluss auf Membranfluidität und Phasenübergänge, Veränderungen der Orientierung der Lipidkopfgruppen sowie Ordnungsparameter, spontane Krümmung und Phasenveränderungen der Lipidmembran.<sup>120–127</sup> Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob eventuell auftretende Änderungen indirekt Einfluss auf membranständige Ionenkanäle ausüben könnten. Als Zielproteine wurden hierfür Kanäle verwendet, die keine direkten spezifischen Bindungsstellen für die eingesetzten amphiphilen Wirkstoffe aufweisen. Prokaryotische MscS und MscL wurden hierfür in artifizielle Lipidvesikel rekonstituiert, um ein möglichst simples System ohne weitere zu berücksichtigende Parameter zu erhalten. Um ebenfalls in einem biologisch komplexeren Kontext Resultate zu erheben, wurden darüber hinaus endogen vorkommende Ionenkanäle in HEK293-Zellen, ASICs, als Zielproteine ausgewählt und in dieser Zelllinie untersucht. Ob eine indirekte, membranvermittelte Wirkung der untersuchten Substanzen eintrat, wurde hierbei mittels Calcium- bzw. Thallium-Influx-Assay bestimmt.<sup>128–130</sup> Ziel war es, die Resultate aus membranbiophysikalischen und funktionellen Messungen an beiden Ionenkanalarten zu verknüpfen, um Mechanismen zu identifizieren, durch die Lokalanästhetika und Antidepressiva Kanäle ohne klassische Bindungsstellen modulieren können.

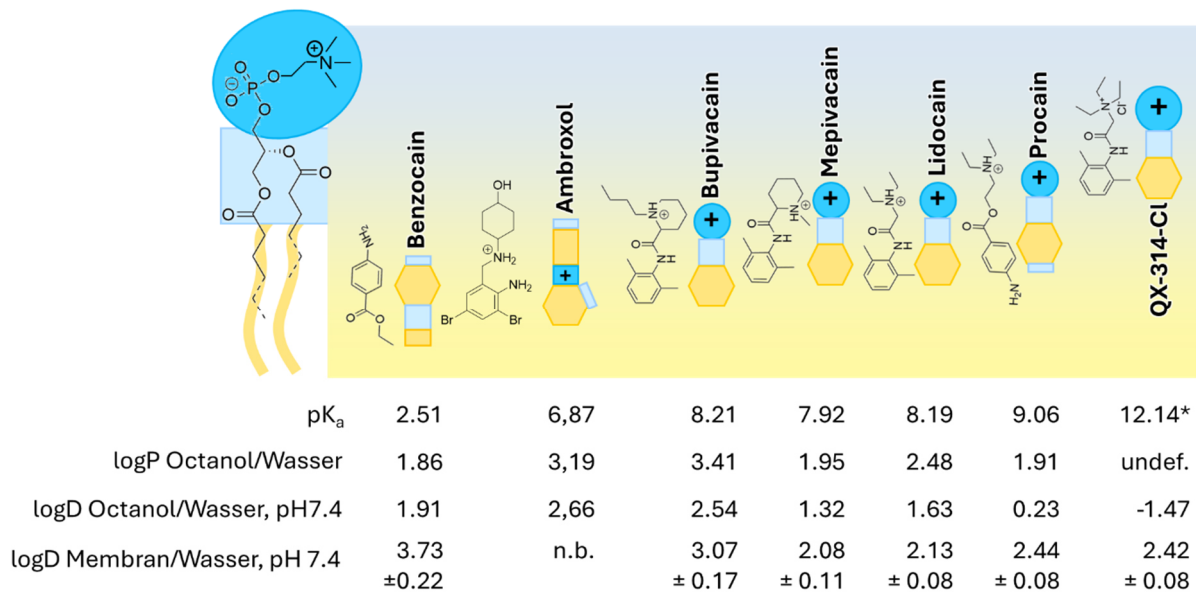
## 4.1 Einfluss von Lokalanästhetika und Psychopharmaka auf biophysikalische Parameter

### 4.1.1 Membran-Wasser-Verteilung

Charakteristische Eigenschaften vieler Lokalanästhetika sind deren amphiphile Struktur und positive Ladung unter physiologischen Bedingungen, die ihre Interaktion mit Lipidmembranen ermöglichen. Gleiches gilt für die hier untersuchten Antidepressiva. Klassische pharmakologische Kenngrößen wie die Octanol/Wasser-Verteilung und die Protonierungseigenschaften ermöglichen eine Abschätzung, inwiefern es Substanzen möglich ist, in und durch die Lipiddoppelschicht der Membran zu gelangen (Abbildung 40). Dabei werden die Protonierungseigenschaften als  $\log P$  bzw. pH-abhängig als  $\log D$ , wodurch geladene und ungeladene Fraktionen berücksichtigt werden, sowie als  $pK_a$  ausgedrückt. Aussagekräftiger für die tatsächlich stattfindende Membraninteraktion ist jedoch die Partitionierung in Lipidmembranen, da Octanol als harsches Lösungsmittel lediglich das hydrophobe Kettensegment der Lipide rudimentär darstellt. Wechselwirkungen, die zwischen Wirkstoff und Lipidkopfgruppe sowie Lipidkettenregion gleichzeitig stattfinden, werden durch die Octanol/Wasser-Verteilung nicht erfasst. Vergleicht man die in dieser Arbeit mittels  $^1\text{H-NMR}$  gemessene und in  $\log D$ -Werte umgerechnete Verteilung der Lokalanästhetika mit den Octanol/Wasser- $\log D$ -Werten – beide bei pH 7,4 – so lässt sich feststellen, dass die Membran/Wasser- $\log D$ -Werte durchgehend höher sind, was auf eine stärkere Affinität zur Membran als zu Octanol hindeutet. Benzocain, als einziges ungeladenes Lokalanästhetikum, bindet ebenfalls stärker an Membranen als an Octanol, woraus sich schlussfolgern lässt, dass an der entsprechenden Wechselwirkung nicht nur die Octanol ähnelnde hydrophobe Kernregion beteiligt ist. Die Spannweite der Membran/Wasser-Verteilung ist im Vergleich zu den Octanol/Wasser- $\log D$ -Werten schmaler. Explizit lässt sich dies für Procain und QX314 beobachten, deren  $\log D$  für Octanol/Wasser nahe 0 bzw. im negativen Bereich liegt, für die Verteilung zwischen Membran und Wasser aber Werte annimmt, die denen der übrigen Lokalanästhetika stark ähneln. Somit determinieren also weder die Polarität noch der höhere  $pK_a$ -Wert die Eigenschaft, an Membranen zu binden, sondern vielmehr das amphipathische Gesamtprofil der Moleküle, welches die Wechselwirkungen mit der hydrophoben Kernregion und den hydrophilen Kopfgruppen inkludiert.

## Diskussion

Die pH-abhängigen logD-Verläufe bestätigen diese Vermutung. Im Gegensatz zu den aus Octanol-logP- und pK<sub>a</sub>-Werten berechneten logD-Kurven (Abbildung 18), die unterhalb des pK<sub>a</sub> stark abfallen, zeigen die Membran/Wasser-logD-Werte nur moderate pH-abhängige Schwankungen. Dies weist darauf hin, dass auch die protonierte Form der Lokalanästhetika bei der Membranpartitionierung von Bedeutung ist, da eine polare Kopfgruppenregion bei der Verteilung zwischen Octanol und Wasser fehlt. Bei pH-Werten über 9 stimmen die logD-Werte von Membran- und Octanolverteilung weitgehend überein, wobei Benzocain und Procain hier eine Ausnahme bilden, bei denen die Werte für die Membran höher die der Octanolpartitionierung sind. Da die logD-Werte bei diesen pH-Bedingungen der Verteilung der ungeladenen Form, den logP-Werten, entsprechen, scheint es, dass beide Lokalanästhetika in ihrer nicht-protonierten Form eine vergleichsweise polare Molekülstruktur aufweisen, was sich auch in ihren relativ niedrigen Octanol/Wasser-logP-Werten widerspiegelt. Aufgrund der Literaturwerte und der gemessenen bzw. berechneten Parameter wurde ein Versuch unternommen die Lokalanästhetika grafisch nach ihrer Eindringtiefe in die Membran einzuordnen (Abbildung 40).

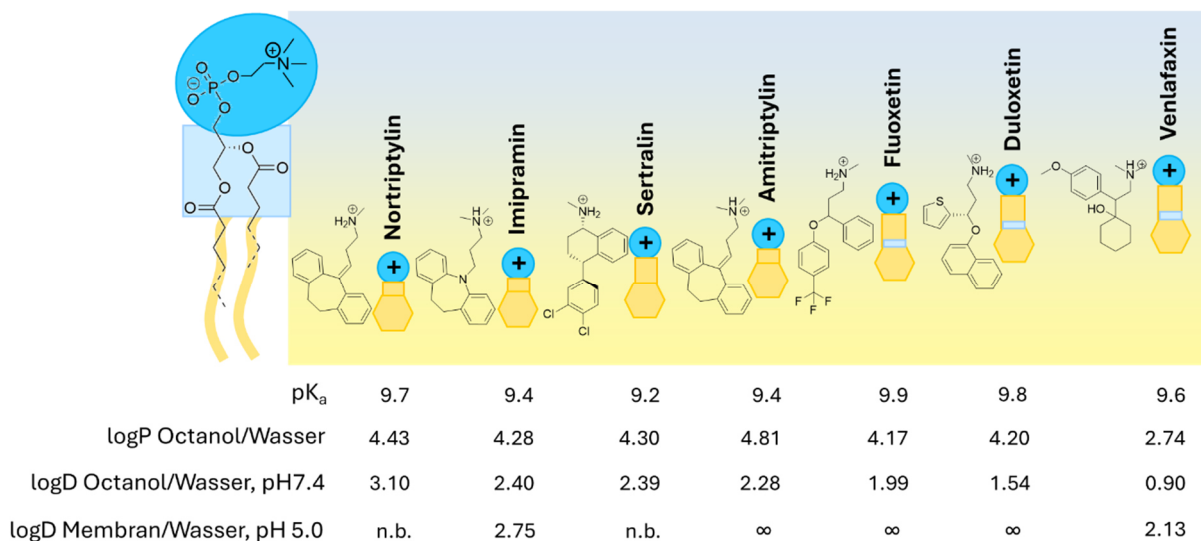


**Abbildung 40: Postulierte Eindringtiefe der Lokalanästhetika in Membranen**

Basierend auf Struktur, Protonierung, Ladung, logP und logD in Octanol/Wasser und logD in Membran/Wasser, die beiden letzteren Parameter bestimmt bei pH 7,4, wurde zusammenfassend eine relative Eindringtiefe postuliert. Quellen der Literaturwerte siehe Tabelle 1. \*pK<sub>a</sub> für QX314 für dessen Linker. (Abbildung erstellt in Anlehnung an Grage *et al.*<sup>24</sup>).

## Diskussion

Um den Einfluss der Lipidladung im Kontext der Membranverteilung zu prüfen, wurde die Partitionierung neben reinen, neutralen DMPC-Membranen auch in anionischen DMPC/DMPG-Lipiddoppelschichten untersucht. Da diese Experimente bei pH 5 durchgeführt wurden, lagen alle Lokalanästhetika außer Benzocain protoniert vor. Entsprechend zeigte sich eine erhöhte Affinität aller Wirkstoffe, mit Ausnahme von Benzocain, die negativ geladene Membran zu binden. Dies unterstreicht die Bedeutung der positiven Ladung für die Wechselwirkung mit anionischen Kopfgruppen. Diese Beobachtung erhält weitere Relevanz, wenn sie an eukaryotischen Zellen in Kapitel 4.2 diskutiert wird. Wie bereits bei den Lokalanästhetika beschrieben, sind auch für Antidepressiva deren Amphiphilie und pH-abhängige Protonierung von entscheidender Bedeutung für die Wechselwirkung mit biologischen Membranen. Die untersuchten Moleküle zeichnen sich ebenfalls durch einen hohen  $pK_a$ -Wert im Bereich von 9,2 – 9,9 aus, wodurch sie unter physiologischen Bedingungen überwiegend protoniert vorliegen. Die  $\log P$ -Werte für die Verteilung zwischen Octanol und Wasser liegen mit Ausnahme von Venlafaxin sehr nah beieinander und weisen alle Antidepressiva als lipophile Verbindungen aus. Die pH-abhängigen  $\log D$ -Werte bei pH 7,4 liegen jedoch deutlich niedriger, was den Einfluss der Protonierung auf die Verteilung verdeutlicht. Vergleicht man die Octanol/Wasser- $\log D$ -Werte mit den in dieser Arbeit experimentell bestimmten Membran/Wasser-Verteilungen, wird eine ähnliche Tendenz sichtbar: Die tatsächliche Affinität, Lipidmembranen zu binden scheint mit Ausnahme von Imipramin, höher zu sein, als durch die Octanol/Wasser- $\log D$ -Werte antizipiert (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Postulierte Eindringtiefe der Antidepressiva in Membranen**

Basierend auf Struktur, Protonierung, Ladung,  $\log P$  und  $\log D$  in Octanol/Wasser und  $\log D$  in Membran/Wasser, die beiden letzteren Parameter bestimmt bei pH 7,4 bzw. pH 5,0, wurde zusammenfassend eine relative Eindringtiefe postuliert. (Abbildung erstellt in Anlehnung an Grage *et al.*<sup>24</sup>).

Auffällig ist, dass Amitriptylin, Fluoxetin und Duloxetin bei der Membran-Wasser-Verteilung vollständig in die Membran partitionierten und keine messbare wässrige Fraktion zurückblieb. Dies weist auf eine sehr hohe Membranaffinität hin, die über den rein hydrophoben Effekt hinausgeht und eine gleichzeitige Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und hydrophobem Kern sowie polarer Kopfgruppe vermuten lässt. Die Protonierung zeigt sich lediglich für Imipramin und Venlafaxin als limitierender Faktor bezüglich der Membranpartizipation (Abbildung 19), da deren membrangebundener Anteil bei niedrigerem pH-Wert reduziert ist. Fluoxetin, Duloxetin und Amitriptylin weisen bei pH 5 und 10 sowie Betrachtung von DMPC/DMPG-Membranen durchgehend eine vollständige Bindung auf. Anionische Lipide erhöhen also bei den Antidepressiva nur für Venlafaxin und Imipramin die Bindungsmenge, dort aber deutlich ausgeprägt (Abbildung 19). Für Fluoxetin, Duloxetin und Amitriptylin bestätigt sich somit, dass die Protonierung der Moleküle die Bindung an die Lipidmembran nicht behindert, sondern eher die amphiphile Gesamtstruktur für die Partitionierung bestimmend ist – ähnlich wie bei den Lokalanästhetika. Ausnahmen hiervon bilden Imipramin und Venlafaxin, die bei niedrigerem pH-Wert, also in protonierter Form, eine geringere Membranbindungsaffinität aufweisen, was vermutlich in deren Molekülarchitektur begründet liegt. Obwohl Amitriptylin und Imipramin formal nahezu identisch scheinen, verschiebt vermutlich die Doppelbindung in Amitriptylin die elektronischen Eigenschaften hin zu mehr Hydrophobie und Planarität, wodurch eine vollständige Membranbindung ermöglicht wird. Imipramin trägt durch das Stickstoffatom im Ringsystem zusätzliche Polarität, was seine Membranbindung bei pH 5 einschränken kann. Venlafaxin ist mit einem logD-Octanol/Wasser-Wert bei pH 7,4 von 0,90 und dem niedrigsten logP-Wert von 2,74 weniger hydrophob und scheint bei zusätzlicher Protonierung von der idealen Struktur zur Membraninteraktion abzuweichen.

### 4.1.2 Kritische Mizellbildungskonzentration

Die CMC ist eine zentrale Kenngröße, um das Aggregationsverhalten amphiphiler Moleküle in wässriger Lösung zu beschreiben. Oberhalb einer bestimmten Konzentration kommt es zur Selbstassemblierung in Mizellen, bei denen entropiegetrieben hydrophobe Molekülbereiche im Inneren zusammengelagert werden und polare Kopfgruppen nach außen hin orientiert vorliegen. Dadurch werden physikochemische Eigenschaften wie Oberflächenspannung, Leitfähigkeit, Viskosität und Trübung verändert. Für Pharmaka besitzt die CMC darüber hinaus weitere

## Diskussion

Relevanz für biophysikalische Effekte: Einerseits kann die Ausbildung von Mizellen die freie Konzentration eines Wirkstoffs im Gewebe reduzieren und damit dessen Bioverfügbarkeit verringern, andererseits können die vorher von Monomeren ausgehenden Wechselwirkungen mit biologischen Membranen moduliert werden. Für Wirkstoffe, die lokal appliziert werden, ist es daher wahrscheinlich, dass hohe Konzentrationen in kleinen Gewebebereichen auftreten können, was die CMC zu einem kritischen Parameter macht, der sowohl Pharmakodynamik als auch -kinetik beeinflussen kann. Dieser Effekt kann also insbesondere bei Lokalanästhetika auftreten, wohingegen er bei den systemisch angewendeten und typischerweise niedrig dosierten Antidepressiva eher unwahrscheinlich scheint. Die verwendete Methode zur CMC-Bestimmung<sup>121</sup> lieferte reproduzierbare Ergebnisse, die sich mit denen anderer Methoden aus der Literatur decken. Beispiel hierfür ist Lidocain mit einer CMC zwischen 0,12 – 0,13 M<sup>131</sup>, dessen CMC in dieser Arbeit als 131 mM ermittelt wurde. Auffällig ist, dass die CMC-Werte der Lokalanästhetika (Tabelle 6) nicht direkt mit logP- oder pK<sub>a</sub>-Werten korrelieren. Das ist ein möglicher Hinweis darauf, dass neben der Hydrophobizität auch sterische Faktoren und molekulare Packung entscheidend dafür sind, wie eng Moleküle in einer Mizelle angeordnet werden und damit bestimmen können, ab welcher Konzentration eine Mizellbildung stattfindet. Die Modulation biologischer Membranen durch Lokalanästhetika-Mizellen wird im weiteren Diskussionsverlauf (siehe Kapitel 4.3) noch an Bedeutung gewinnen. Vorweg sei erwähnt, dass beispielsweise Tetracain, ein Lokalanästhetikum des Ester-Typs, oberhalb seiner CMC von ca. 68 mM<sup>132</sup>, Membranen auflöst bzw. Lipide in seine eigenen Mizellen integriert. Für die untersuchten Antidepressiva ließen sich lediglich zwei CMC-Werte – für Venlafaxin (45 mM) und Amitriptylin (18mM) – sicher bestimmen. Beide liegen deutlich unter den meisten Lokalanästhetika, deren CMC-Werte überwiegend zwischen ca. 50 und 130 mM liegen (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Zusammenfassung CMC der Lokalanästhetika und Antidepressiva**

Mittels Fluoreszenz-Assay bestimmte CMC in mM für die untersuchten, amphiphilen Moleküle. Eine CMC konnte für Duloxetin und Imipramin innerhalb der löslichen Konzentrationen nicht bestimmt werden. \*Werte für Nortriptylin, Fluoxetin und Sertralin sind abgeschätzt (Abbildung 22).

Wirkstoff	Lidocain	Procain	Bupivacain	Mepivacain	QX314	Benzocain	Ambroxol
CMC [mM]	131	92	51	64	89	7	33

Wirkstoff	Venlafaxin	Amitriptylin	Nortriptylin	Fluoxetin	Sertralin	Duloxetin	Imipramin
CMC [mM]	45	18	< 1*	< 1*	< 1*	-	-



Eine Korrelation lässt sich hierbei für den  $pK_a$ -Wert erkennen. Venlafaxin zeichnet sich durch die höchste CMC bei niedrigstem  $pK_a$  aus. Die bereits praktisch beobachteten Löslichkeitsprobleme in Kombination mit den hohen theoretischen  $\log P$ -Werten und der Molekülstruktur ließen erwarten, dass für die durchgängig hydrophoben Antidepressiva die CMC eher niedrig ausfallen. Dies wurde insbesondere für Nortriptylin, Fluoxetin und Sertralin beobachtet, deren CMC anhand des Kurvenverlaufs (Abbildung 22) auf unter 1 mM abgeschätzt wurde. Die CMC von Duloxetin und Imipramin liegen wahrscheinlich ebenfalls im niedrigen einstelligen molaren Bereich, konnten aber durch die begrenzte Löslichkeit bei höheren Konzentrationen nicht bestimmt werden.

### 4.1.3 Membranfluidität und Phasenübergang

Die Fluoreszenzpolarisation mit DPH als Sonde gestattet eine sensitive Detektion der lateralen Beweglichkeit der Lipidketten in DMPC-Membranen und damit die Betrachtung der Membranfluidität sowie eine quantitative Bestimmung des Phasenübergangs. Die erhaltenen sigmoidalen Kurven (Abbildung 24) flachen konzentrationsabhängig ab und verschieben sich hin zu niedrigeren Temperaturen. Die Phasenübergangstemperatur wird durch die Anwesenheit von Lokalanästhetika demnach erniedrigt und der Übergang allgemein verbreitert. Die Temperaturabsenkung des Phasenübergangs lässt auf eine Destabilisierung der  $L\beta$ -Phase schließen. Die amphiphilen Moleküle, die sich zwischen die Acylketten der Lipide einlagern, stören dort die rein hydrophoben Wechselwirkungen und erhöhen dadurch die laterale Beweglichkeit. Die Verbreiterung des Phasenübergangs lässt sich möglicherweise dadurch begründen, dass die Membran heterogen modifiziert wird. Lokal unterschiedliche Störungen durch die räumlich höheren Konzentrationen an Lokalanästhetika könnten dazu führen, dass verschiedene Bereiche der Membran bei unterschiedlichen Temperaturen in die  $L\alpha$ -Phase übergehen. Dies resultiert in einer verringerten Kooperativität der Lipidmoleküle, wodurch diese nicht mehr synchron, sondern über einen breiteren Temperaturbereich hinweg in die  $L\alpha$ -Phase wechseln. Zu beobachten ist ebenfalls eine leichte Absenkung der absoluten Polarisationswerte vor und nach dem Phasenübergang bei Erhöhung der Konzentration der eingesetzten Lokalanästhetika. Diese Fluidisierung ist ebenfalls auf die Anwesenheit der amphiphilen Moleküle zurückzuführen, die die Wechselwirkungen der Lipidketten auch bereits vor dem Phasenübergang stören und somit die Rotation der DPH-Sonde erhöhen können. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Lokalanästhetika lassen

sich anhand ihrer Lipophilie und Struktur erklären. Hydrophobe Substanzen wie Benzocain und Ambroxol können tiefer in die Membran eindringen und stören dort die Wechselwirkungen zwischen den Acylketten der Lipide stärker als beispielsweise das hydrophile QX314, welches erst bei höheren Konzentrationen markante Effekte aufweist. Erwähnenswert ist außerdem die für Bupivacain höchste untersuchte Konzentration von 100 mM, bei der der Phasenübergang weit unter 18°C liegt und deren absolute Polarisationswerte stark erniedrigt sind. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die eingesetzte Konzentration weit über der CMC von Bupivacain liegt und, wie bereits dort diskutiert, Lokalanästhetika oberhalb ihrer CMC dazu neigen, Lipidmoleküle in ihre eigenen Mizellen zu integrieren. So könnte neben den Lipidmolekülen auch die Fluoreszenzsonde DPH zu einem Großteil in Bupivacain-Mizellen vorliegen, deren Fluidität ihrerseits niedriger ist als die von DMPC-Liposomen. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die beobachtete weitere Erniedrigung der Polarisationswerte ab 19°C auf eine weitere Destabilisierung der lamellaren Phase hinweist und bereits partiell Phasen entstehen, die eher hexagonalen Charakter aufweisen.

### 4.1.4 Spontane Krümmung

Um den Einfluss von Lokalanästhetika und Antidepressiva auf die präferierte, spontane Krümmung einer DOPE-Modellmembran zu untersuchen, wurde die Phasenübergangstemperatur via  $^{31}\text{P}$ -NMR bestimmt. Eine Stabilisation der HII-Phase wird bedingt durch eine negative Krümmung, die die Phasenübergangstemperatur herabsetzt. Eine positive oder neutrale Krümmung führt zur Stabilisation der  $\text{L}\alpha$ -Phase und erhöht die entsprechende Phasenübergangstemperatur. Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, inwieweit die Struktur der amphiphilen Moleküle sowie deren Lokalisierung in der Membran die spontane Krümmung modulieren. Um den Einfluss elektrostatischer Effekte zu berücksichtigen, wurden zwei Arten von Proben untersucht: reine DOPE- sowie DOPE-Membranen, die zusätzlich Myristinsäure enthielten. Für alle eingesetzten Substanzen konnte bei den Experimenten mit DOPE und Myristinsäure eine Reduzierung der Phasenübergangsbreite von 26 auf 4 – 10 K beobachtet werden. Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass durch die negativ geladene Myristinsäure Heterogenität eingebracht wird, die in einem breiten Phasenübergang resultiert, aber durch die Anwesenheit protonierter, also positiv geladener Lokalanästhetika und Antidepressiva teilweise ausgeglichen werden kann.

Anhand der Lokalanästhetika, für die ebenfalls Ergebnisse zur Beeinflussung der Kopfgruppenregion der Lipide vorliegen – siehe Kapitel 3.1.5 – lässt sich beobachten, dass amphiphile Moleküle, die eine positive Krümmung induzieren ebenfalls einen starken Einfluss auf den P-N-Dipol nehmen. Dies gilt für Procain, Bupivacain, Mepivacain und besonders QX314. Diese Lokalanästhetika lagern sich demnach bevorzugt über der Acylkettenregion im Übergangsbereich zwischen polarem und apolarem Bereich ein. Dies steht in Einklang mit der beobachteten Präferenz für eine positive spontane Krümmung, da in diesem Fall in der Kopfgruppenregion mehr Raum zur Verfügung steht als bei einer negativen Krümmung. Im Gegensatz dazu lagert sich Benzocain wesentlich tiefer in die Membran ein, wo es keinen nennenswerten Einfluss mehr auf die Kopfgruppenregion hat. Die Bevorzugung der negativen Krümmung scheint daher plausibel für dieses Lokalanästhetikum. Lidocain zeigt zwar eine Modulation des P-N-Dipols, aber keine markante Verschiebung des Phasenübergangs. Da es demnach keine Krümmung präferiert, ist es vermutlich zwischen Benzocain und den übrigen Lokalanästhetika lokalisiert und damit nah genug an den Lipidkopfgruppen, um diese zu beeinflussen. Betrachtet man auf diese Weise den Extremfall des QX314, so lässt sich schlussfolgern, dass dieses eher in der Nähe der Membranoberfläche verweilt. Überträgt man die Erkenntnisse auf die untersuchten Antidepressiva, so können auch diesen Lokalisationen in der Membran zugeordnet werden. Venlafaxin zeigte das gleiche extreme Verhalten wie QX314, indem es selbst bei hohen Temperaturen nicht in die hexagonale Phase überging, also eine positive spontane Krümmung präferiert. Neben Benzocain zeigte nur ein weiteres Amphiphil eine Präferenz für eine negative Krümmung: das Antidepressivum Fluoxetin, welches demnach ebenfalls eher in den hydrophoben Bereich der Membran eindringt. Duloxetine wies, ähnlich wie Lidocain, kaum eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur auf, verweilt also in ähnlicher Tiefe in der Membran. Die Präferenz von Imipramin und Amitriptylin lässt sich mit denen der übrigen Lokalanästhetika für die positive Krümmung vergleichen. Auch diese beiden Antidepressiva sind demnach eher in der polar-apolaren-Grenzregion lokalisiert. Für Nortriptylin, dessen Einfluss auf das Krümmungsverhalten in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, zeigten Weaver *et al.*<sup>133</sup> eine Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur, allerdings für DPPC, bei dem der Übergang von der L $\beta$ - in die L $\alpha$ -Phase observiert wurde. Eine Bevorzugung der positiven oder neutralen spontanen Krümmung kommt daher in Frage. Darüber hinaus wurde für Nortriptylin

unter diesen Bedingungen ebenfalls eine Verbreiterung des Phasenübergangs festgestellt, was sich durch die Bildung heterogener Bereiche erklären lässt, ähnlich der Zugabe von Myristinsäure zu DOPE.<sup>133</sup> Sertralin bindet wahrscheinlich an die Carbonylgruppe der Lipide<sup>134</sup>, ist also ähnlich wie Duloxetine und Lidocain lokalisiert und bevorzugt weder positive noch negative Krümmung.

### 4.1.5 Orientierung der Lipidkopfgruppen

In der Phosphocholin-Kopfgruppe von DMPC existiert ein elektrischer Dipol, der durch die negativ geladene Phosphat- und die positiv geladene Aminogruppe gebildet wird. Via <sup>2</sup>H-NMR und mittels deuteriertem Cholin konnte die Orientierung dieses Dipols beobachtet sowie der Einfluss, den Lokalanästhetika auf diesen haben, erfasst werden. Der Vergleich der beiden Aufspaltungen  $\Delta\alpha$  und  $\Delta\beta$  miteinander (Abbildung 27) ließ so Rückschlüsse auf die Einlagerungstiefe der Lokalanästhetika und die Art der Modulation des Dipols zu. Die identifizierten Verläufe für verschiedene Lokalanästhetika-Lipid-Verhältnisse zeigten zwei klar unterscheidbare Szenarien. Auf der einen Seite verhielten sich Benzocain und Lidocain in nicht protonierter Form wie NaCl und verursachten nur geringe Veränderungen der Aufspaltungen. Auf der anderen Seite verhielten sich Bupivacain, Mepivacain, Lidocain (als HCl), Procain und QX314 wie CaCl<sub>2</sub>. Ca<sup>2+</sup>-Ionen sind dafür bekannt mit der Phosphatgruppe von Lipiden zu interagieren, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Nähe einer positiven Ladung zur Kopfgruppe für den beobachteten Effekt notwendig ist. Benzocain und Lidocain lagern sich demnach weiter entfernt von den Kopfgruppen in die Membran ein, wohingegen die übrigen Lokalanästhetika näher an dem P-N-Dipol lokalisiert sein müssen, um dessen Ausrichtung modulieren zu können. Diese Ergebnisse stimmen mit denen früheren Studien überein, nach denen geladene Substanzen wie beispielsweise protonierte Amphiphile oder Metallionen im beschriebenen  $\alpha$ - $\beta$ -Plot zu einer linearen Funktion mit negativer Steigung führen, wie für die hier untersuchten, protonierten Lokalanästhetika. Demgegenüber zeigen neutrale Moleküle wie Chloroform oder Cholesterin einen konstanten Wert für  $\Delta\alpha$ , was zu dem erfassten, kompakten Muster im  $\alpha$ - $\beta$ -Plot führt, wie es Benzocain und Lidocain in ihrer unprotonierten Form aufwiesen (Abbildung 27B).<sup>125,135–137</sup> Befindet sich eine positive Ladung, eingebracht durch ein protoniertes Molekül oder Ion an der polar-apolaren-Grenzfläche nahe der Phosphocholingrouppe, so wird der P-N-Dipol aufrechter ausgerichtet (Abbildung 52B), da die positive Ladung das quartäre Ammonium der Cholingrouppe in Richtung wässriges Medium schiebt.<sup>125,138</sup> Dies resultiert in

charakteristischen Verschiebungen der  $^2\text{H}$ -NMR-Aufspaltungen, woraus sich für die untersuchten protonierten Lokalanästhetika schlussfolgern lässt, dass diese so in die Membran partitionieren, dass deren positive Ladung genau diesen Effekt verursacht.

### 4.1.6 Ordnungsparameter

Die Ordnung der Lipidketten und die Membrandicke werden durch die Anwesenheit amphiphiler Moleküle beeinflusst. Erstere wurde in dieser Arbeit mittels  $^2\text{H}$ -NMR durch den Einsatz von DMPCd<sub>54</sub> bestimmt und die Veränderung der Membrandicke sowie Lipidfläche berechnet (siehe Kapitel 3.1.6 und 7.3.4). Ein membrandicken-reduzierender Effekt tritt dabei auf, wenn sich Amphiphile in der Nähe des Kopfgruppenbereichs der Lipide positionieren. Dies wurde in der Literatur beispielsweise für antimikrobielle Peptide von Kim *et al.*<sup>139</sup> und Grage *et al.*<sup>140</sup> gezeigt. Dabei erhöht sich die Bewegungsfreiheit im Kettenbereich dadurch, dass die polaren Kopfgruppen auseinandergedrückt werden. Somit entsteht mehr Raum für die Acylketten, die diesen ausfüllen. Bei gleichem Membranzvolumen führt eine laterale Ausdehnung zu einer insgesamt dünneren Membran. Cholesterin hingegen, als klassisches transmembran-lokalisiertes Molekül, erhöht die Membrandicke durch Erhöhung der Ordnung der Lipidketten.<sup>141</sup> Dies ist folglich auch für andere Moleküle möglich, die im Bereich der Acylketten innerhalb einer Lipidmembran lokalisiert sind.

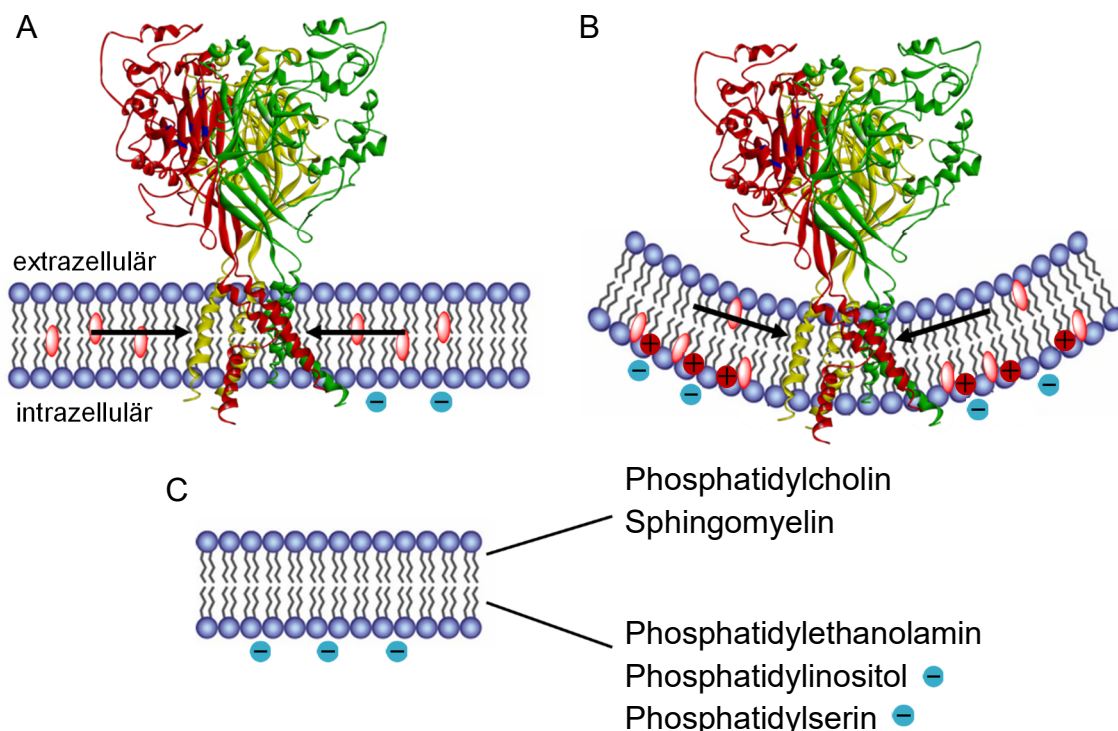
Betrachtet man die Differenz der effektiven Membrandicke des Acylkettenbereichs  $\Delta 2D_c$  im Vergleich zu den lamellar-hexagonalen Phasenübergängen, so zeigt sich, dass Moleküle, die die hexagonale Phase stabilisieren (Benzocain, Duloxetin, Fluoxetin) durch Einlagerung in den Kettenbereich der Lipide die Ordnung erhöhen, was zu einer dickeren Membran und reduzierten Fläche pro Lipid führt. Diese tiefere Einlagerung in die Lipidmembran, verglichen mit protonierbaren Lokalanästhetika, konnte für Benzocain bereits demonstriert werden.<sup>142</sup> Amitriptylin und Imipramin zeigen zwar ebenfalls eine erniedrigte Lipidfläche, jedoch eine geringfügige Reduktion der Membrandicke, wodurch eine Lokalisierung im Bereich zwischen Acylketten und Kopfgruppenregion wahrscheinlicher ist. Für die übrigen Lokalanästhetika (Bupivacain, Mepivacain, Lidocain, QX314 und Procain) als auch das Antidepressivum Venlafaxin lässt sich beobachten, dass die Fläche pro Lipid vergrößert sowie die hydrophobe Dicke verringert wird. Für die Messungen bei einem molaren Verhältnis zwischen Amphiphil und Lipid von 1:5 zeigt Venlafaxin den stärksten Effekt. Dies lässt darauf schließen, dass sich die zuvor genannten Lokalanästhetika und Venlafaxin

bevorzugt im Bereich der Lipidkopfgruppen aufhalten. Bei Erhöhung der Konzentration, die für die Antidepressiva nicht ermittelt wurde, konnte beobachtet werden, dass QX314 und Mepivacain die hydrophobe Dicke und Fläche pro Lipid stärker modulierten. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine besondere Orientierung dieser beiden Lokalanästhetika innerhalb der Membran sein, bei der diese mehr Raum beanspruchen als die übrigen untersuchten Moleküle.

## **4.2 Beeinflussung säureempfindlicher Ionenkanäle durch Lokalanästhetika**

ASICs sind eukaryotische, protonensensitive Ionenkanäle, deren Aktivität im physiologischen Kontext durch einen Abfall des extrazellulären pH-Werts gesteuert wird. Klassische Bindungsstellen, wie sie in spannungsgesteuerten Natriumionenkanälen vorkommen, besitzen ASICs nicht, wodurch sich eine Modulation über einen indirekten, membranvermittelten Mechanismus evaluieren lässt. Eine entsprechende konzentrationsabhängige Wirkung auf ASICs konnte früher bereits für Lidocain gezeigt werden.<sup>143</sup> Diese Ergebnisse decken sich gut mit den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten. Lidocain zeigte in der erwähnten Studie eine Inhibition von ASIC1a-Homotrimern – dieser Subtyp wird ebenfalls hauptsächlich in HEK293-Zellen endogen exprimiert – mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von ca. 12 mM. Die Inhibition des Calciumeinstroms für Lidocain betrug in der vorliegenden Arbeit knapp über 50% für eine 10 mM Konzentration. Darüber hinaus wurde ebenfalls eine Inhibition eines nicht-selektiven Kationenkanals, TRPM7, demonstriert<sup>144</sup>, mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration in der gleichen Größenordnung von ungefähr 11 mM für Lidocain und einem ähnlichen, hemmenden Effekt für QX314. Diese konzentrationsabhängige Hemmung wurde hier für sechs Lokalanästhetika gezeigt (Abbildung 33), wobei Benzocain als stark hydrophobes, nicht protoniertes Lokalanästhetikum die stärkste Inhibition der endogenen ASICs in HEK293-Zellen aufwies. Die übrigen, untersuchten, amphiphilen Moleküle Bupivacain, Mepivacain, Lidocain, Procain und QX314 zeigen konzentrationsabhängige, inhibierende Effekte, die bezüglich ihrer Stärke auf deren Eindringtiefe basieren. Beispielsweise lässt sich für Mepivacain, welches so in die Membran partitioniert, dass es die Lipidkopfgruppen noch beeinflusst, aber gleichzeitig, verglichen mit den protonierten Lokalanästhetika, am weitesten in den hydrophoben Bereich hineinragt, eine ausgeprägtere Inhibition beobachten.

HEK293 stammen aus humanen, embryonalen Nierenzellen, ihre Membran weist strukturell demnach, wie viele Plasmamembranen eukaryotischer Zellen, eine ausgeprägte transversale Asymmetrie der Lipide auf. In der äußeren Membranhälfte dominieren Phosphatidylcholin und Sphingomyelin während die innere Lipidschicht von Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin geprägt ist, wobei die beiden Letzteren zur negativen Nettoladung der inneren Membranhälfte beitragen (Abbildung 42C).<sup>101,145</sup> Betrachtet man die Modulation der ASICs im physiologischen Zusammenhang, nimmt also Rücksicht auf die tatsächliche Membranzusammensetzung der verwendeten Zelllinie, könnte die Bindung positiv geladener Lokalanästhetika vorzugsweise in der inneren Lipidschicht erfolgen. Neben der Veränderung des lateralen Druckprofils, die für stark hydrophobe Substanzen wie Benzocain bezüglich der Beeinflussung membranständiger Proteine mechanistisch am logischsten erscheint, könnten so die Lokalanästhetika, die näher an den Kopfgruppen orientiert sind und eine positive Krümmung verursachen, die gesamte Lipiddoppelschicht nach innen hin krümmen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die



**Abbildung 42: Membranmodulation durch amphiphile Moleküle und Auswirkungen auf ASICs**

**A** ASIC-Trimer in Lipidmembran, die durch die Einlagerung amphiphiler Moleküle (rot-weiße Ovale) in die hydrophobe Acylkettenschicht eine Veränderung des lateralen Drucks erfährt und so Einfluss auf die Transmembrandomänen der Ionenkanäle nimmt. **B** ASIC-Trimer in Lipidmembran, welche durch die Einlagerung amphiphiler Substanzen auf der inneren Membranseite in der Nähe der negativ geladenen Kopfgruppen gekrümmt ist und dadurch die Konfirmation der Kanäle moduliert **C** Charakteristischer Aufbau eukaryotischer Membran mit negativer Ladung auf der intrazellulären Seite. (Abbildung teilweise verändert entnommen aus Tarasenko *et al.*<sup>146</sup>) PDB-ID: 7CFS<sup>84</sup>

untersuchten Lokalanästhetika auf zwei unterschiedliche membranvermittelte Mechanismen Einfluss auf die protonensensitive Region der ASICs über die Transmembrandomänen nehmen: einerseits durch Veränderung des lateralen Drucks, für hydrophobe, tiefer in den Acylkettenbereich eindringende Substanzen (Abbildung 42A), andererseits durch Modulation der Membrankrümmung für protonierte, näher an der Kopfgruppenregion der inneren Membranschicht orientierte Moleküle (Abbildung 42B).<sup>146,147</sup> Insbesondere für spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle kann nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* sowohl verschiedene membranabhängige Mechanismen, als auch über spezifische Bindungen ausgelöste Wirkungen konzentriert stattfinden. Andere membranständige Zielproteine ohne spezifische Bindungsstellen können hingegen lediglich durch unterschiedliche indirekte Wirkweisen über die Membran moduliert werden.

### **4.3 Beeinflussung mechanosensitiver Ionenkanäle durch Lokalanästhetika**

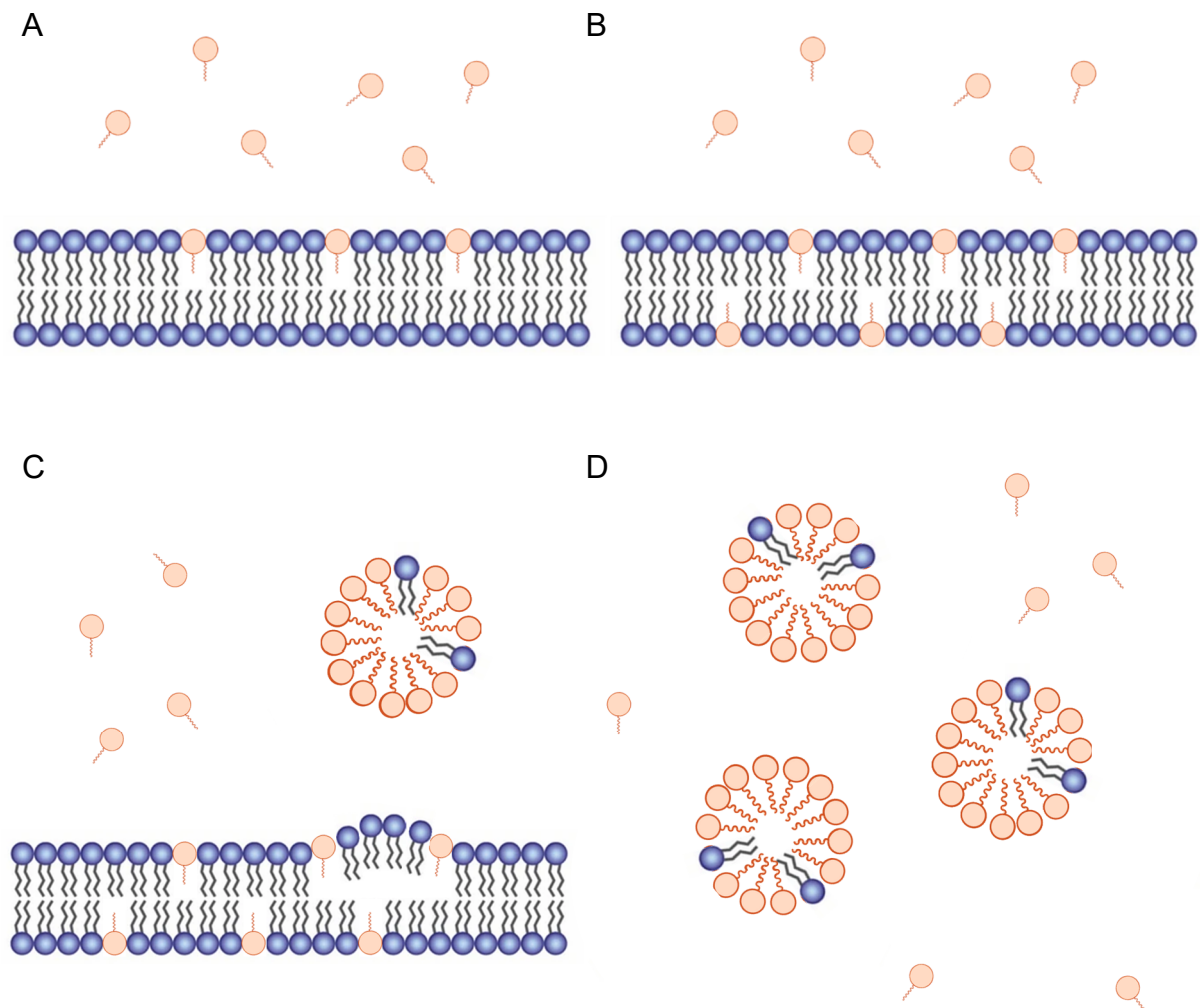
MscS und MscL sind bakterielle, mechanosensitive Kanäle, deren Regulation durch Veränderungen der mechanischen Membranspannung stattfindet. In prokaryotischen Zellen dienen sie als osmotische Schutzventile, verhindern demnach bei starken osmotischen Schocks durch ihr Öffnen die Lyse der Zelle, wobei lösliche Substanzen ein- bzw. ausströmen können. MscS zeichnet sich hierbei dadurch aus, dass es hauptsächlich für Anionen und kleine Kationen permeabel ist, wohingegen MscL eine größere Leitfähigkeit und praktisch unspezifische Permeabilität aufweist. Da diese Ionenkanäle, ebenso wie ASICs, keine klassischen Bindungsstellen für Lokalanästhetika oder andere pharmakologische Modulatoren aufweisen, wurden sie als Modellsystem ausgewählt. Die Aktivität mechanosensitiver Kanäle wird maßgeblich durch die physikochemischen Eigenschaften der sie umgebenden Lipidmembran bestimmt, insbesondere durch lateralen Druck, Membrandicke, spontane Krümmung und reale Membrankrümmung. Dieser Umstand bedingt, dass eine aktive Modulation dieser Kanäle durch Pharmaka ebenfalls über indirekte, membranvermittelte Mechanismen vorgenommen werden könnte.<sup>147–149</sup> Beispielsweise zeigten Moschetta *et al.* die Änderung von Membraneigenschaften durch Einlagerung eines photosensitiven Moleküls, dass bei Bestrahlung eine trans-cis-Konfigurationsverschiebung aufweist und dadurch Einfluss auf einen mechanosensitiven Kanal ausübt.<sup>150</sup>



In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl MscS als auch MscL in ein GUV-System, bestehend aus DOPE:DOPG im Verhältnis 3:1, rekonstituiert und deren Aktivität unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an Lokalanästhetika fluoreszenzspektroskopisch observiert. Der eingesetzte Farbstoff ANTS konnte dabei durch Thalliumionen gequencht werden. Die Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente wurde durch Bestimmung der GUV-Konzentration über den lipophilen Fluoreszenzfarbstoff DIL kontrolliert und normiert. Da die mechanosensitiven Ionenkanäle keine spezifischen Bindungsstellen für Lokalanästhetika besitzen, deutet ihre Hemmung darauf hin, dass die Blockade durch Veränderungen der Membraneigenschaften infolge der Zugabe amphiphiler Substanzen verursacht wird.

Die erhaltenen Daten zeigen eine Gemeinsamkeit bezüglich des ausgeübten Effekts, sowohl auf MscS als auch auf MscL (Abbildung 36 – 38). Alle untersuchten Lokalanästhetika wiesen eine dosisabhängige Inhibition der mechanosensitiven Kanäle auf. Dabei inhibierten Ambroxol und Bupivacain bereits bei 10 mM deutlich. Hydrophilere Moleküle, die eine schwächere Membranaffinität aufwiesen, benötigen eine höhere Konzentration, um vergleichbare Effekte zu induzieren. Benzocain als hydrophobe, tiefer in die Membran eindringende Substanz zeigt bereits bei niedrigeren Konzentrationen, 1 mM für MscS und 0,1 mM bei MscL, einen markanten Effekt, der jedoch bei höherer Dosierung wieder auf das Ausgangsniveau einbrach. Um die Ursache für diese, sowohl für Benzocain als auch Bupivacain beobachtete, Inkonsistenz aufzuzeigen, wurden GUVs mit rekonstituierten Ionenkanälen und allen eingesetzten Konzentrationen an Lokalanästhetika fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Diese visuelle Überprüfung zeigte für höhere Konzentrationen an Benzocain und Bupivacain defekte GUVs (Abbildung 39). Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollmessungen des Thallium-Influx-Assays stabile GUVs bei niedrigen Konzentrationen (Abbildung 38). Für die maximal eingesetzten Konzentrationen der übrigen Lokalanästhetika wurden ausschließlich intakte GUVs gefunden. Zu hohe Zusätze an Triton X-100, 0,02 und 0,2% bezogen auf die Gesamtlösung, zeigten ebenfalls einen destruktiven Effekt auf die Lipidvesikel. Diese Konzentrationen wurden während des Assays jedoch zu keiner Zeit erreicht und dienen hier lediglich als Kontrollprobe. Erwähnenswert ist, dass die Konzentrationen an Lokalanästhetika, die zur Auflösung von GUVs führen, ebenfalls über deren CMC liegen. Es scheint somit wahrscheinlich, dass die Ausbildung von Mizellen für den destruktiven Effekt von Benzocain und Bupivacain verantwortlich ist.

Diesen detergenzien-ähnlichen Mechanismus beschreiben Lichtenberg *et al.* in vier Schritten (Abbildung 43).<sup>151</sup> Zuerst lagern sich die amphiphilen Monomere in die äußere Schicht der Membran ein (Abbildung 43 A), worauf eine transmembrane Angleichung der Molekülkonzentration zwischen innerer und äußerer Schicht erfolgt (Abbildung 43 B). Im dritten Schritt ist die innere Membranschicht gesättigt und die weitere Einlagerung zwischen die äußeren Lipide führt zur Destabilisierung durch ein Ungleichgewicht zwischen den beiden Lipidschichten und der eventuell vorhandenen Tendenz der eingelagerten Moleküle eine spontane Krümmung auszubilden (Abbildung 43C). Durch das Herauslösen von Lipidmolekülen aus dem Vesikel können amphiphile Moleküle in das Liposom eindringen, was anschließend die transmembrane Verteilung beschleunigt und durch Übersättigung der beiden Lipidschichten zur Ausbildung gemischter Mizellen führt (Abbildung 43D).



**Abbildung 43: Mechanismus der Membranauflösung durch Detergenzien**

**A** Einlagerung der amphiphilen Monomere (orange) in die äußere Schicht der Membran. **B** Transmembraner Ausgleich der Konzentration der monomeren Moleküle **C** Übersättigung der äußeren Lipidschicht (blau) und beginnende Permeabilisierung der Membran **D** Ausbildung gemischter Mizellen (Abbildung teilweise verändert entnommen aus Tarasenko *et al.*<sup>146</sup>)

Das Lipidmodellsystem DOPE/DOPG weist prinzipiell eine negative Krümmung auf.<sup>152</sup> Lokalanästhetika lagern sich nun in die Membran ein, ohne Präferenz für innere oder äußere Membranschicht, da die beiden Schichten der Membran symmetrisch aufgebaut sind. Sind die untersuchten Substanzen zu hydrophob, so zeigen sich schon früh destruktive Effekte auf die GUVs. Hydrophilere Lokalanästhetika zeigen erst bei höheren Konzentrationen eine starke Inhibition der mechanosensitiven Kanäle. Dies lässt sich eventuell dadurch begründen, dass diese Moleküle eine positive spontane Krümmung bevorzugen, die negative Krümmungstendenz der Lipiddoppelschicht allerdings erst ausgleichen müssen, bevor sie einen Effekt zeigen. Hier liegt beispielsweise Ambroxol mit einer CMC von 33 mM zwischen stark hydrophilen und hydrophoben Substanzen, inhibiert mechanosensitive Kanäle aber bei 10 mM vergleichsweise stark. Wahrscheinlich modulieren die Lokalanästhetika in diesem Modellsystem – anders als bei den ASICs – die Kanäle vor allem über eine Veränderung des integralen lateralen Drucks, also der Gesamtstärke über das Membranprofil hinweg und nicht über die reale Krümmung. Dadurch könnten sie auch im Fall von MscS und MscL den Druck auf die Transmembrandomänen der mechanosensitiven Kanäle erhöhen. Da dies in beiden Lipidschichten gleichermaßen passiert, wird der durch osmotischen Druck ausgelöste Mechanismus, der eigentlich zur Öffnung der Ionenkanäle führt, blockiert und höhere Konzentrationen an Lokalanästhetika resultieren in einer Inhibition von MscS und MscL. Die Stärke dieses Effekts scheint dabei abhängig von der Einlagerungstiefe und damit der Region der Transmembrandomänen der Proteine zu sein, auf die Druck ausgeübt wird.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein membranvermittelter Mechanismus amphiphiler Moleküle – Lokalanästhetika und Antidepressiva – nachgewiesen werden. Dazu wurden biophysikalische Parameter bestimmt, die erste Hinweise auf eine Modulation biologischer Lipidmembranen lieferten. Diese Erkenntnisse sollten darüber hinaus in zwei verschiedenen Modellen an membranständigen Proteinen untersucht werden. Dazu wurden prokaryotische, mechanosensitive Kanäle, MscS und MscL, rekombinant exprimiert und anschließend in Lipidvesikeln rekonstituiert. Außerdem wurde der Einfluss auf eukaryotische Ionenkanäle anhand endogen vorkommender ASICs in HEK293-Zellen eruiert. Diese Herangehensweise erlaubt es membranbiophysikalische Effekte mit ionenkanalphysiologischen Konsequenzen in Relation zu setzen und zu verknüpfen. Die Ergebnisse zeigen durchgehend, dass die untersuchten amphiphilen Substanzen verschiedene Membraneigenschaften deutlich modifizieren und dass diese festgestellten Modifikationen in funktionellen Veränderungen der eingesetzten Ionenkanäle münden:

Die untersuchten Lokalanästhetika und Antidepressiva zeigen eine ausgeprägte Neigung zur Partitionierung in Lipidmembranen. Sowohl protonierte als auch ungeladene Amphiphile können in relevanter Weise in die Lipiddoppelschicht partitionieren, wobei Gesamtamphiphilie sowie Wechselwirkungen mit Kopfgruppen- und Kettenregion das Partitionierungsverhalten stärker bestimmen als einfache Octanol-Wasser-logP-Werte. Protonierte Substanzen wiesen eine erhöhte Affinität gegenüber anionischen Membranen auf, was die Bedeutung elektrostatischer Wechselwirkungen mit den Lipidkopfgruppen unterstreicht. Neben der Eindringtiefe wurden ebenfalls Daten zum Einfluss auf die spontane Krümmung der Lipidmembranen in Gegenwart von Lokalanästhetika und Antidepressiva erhoben. Hydrophobe Substanzen wie Benzocain, Fluoxetin und Duloxetin, die sich tiefer in die Membran im Bereich der Acylketten aufhalten, fördern eine negative spontane Krümmung und erhöhen sowohl die Membrandicke als auch Ordnung der Lipide. Demgegenüber stehen hydrophilere Moleküle, wie beispielsweise Venlafaxin, Mepivacain und QX314, die bei physiologischen Bedingungen eher protoniert vorliegen, und einen gegensätzlichen Effekt ausüben. Diese lagern sich bevorzugt an der polar-apolaren Grenzfläche zwischen Ketten- und Kopfregion ein und beeinflussen dort den P-N-Dipol der Kopfgruppen.

## Zusammenfassung

Für alle Lokalanästhetika konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung sowohl von pro- als auch eukaryotischen Ionenkanälen – MscS/MscL und ASICs – in fluoreszenzbasierten Assays festgestellt werden.

Die Ergebnisse für ASICs deuten auf eine indirekte, membranvermittelte Modulation hin. So stimmen Inhibitionswerte für Lidocain mit Literaturdaten überein, während Benzocain die stärkste Hemmung endogener ASICs in HEK-Zellen zeigt. Unterschiede in der Eindringtiefe korrelieren mit der Wirksamkeit einzelner Substanzen, wobei die Asymmetrie biologischer Membranen, negative Ladung auf der Innenseite, die Anreicherung protonierter Lokalanästhetika begünstigt. Dies beeinflusst die protonensensitiven Regionen durch Veränderung des lateralen Druckprofils und der lokalen Krümmung.

Ebenso weisen die Daten für die bakteriellen mechanosensitiven Kanäle MscS und MscL auf eine indirekte, membranabhängige Hemmung hin. Beide Ionenkanäle, deren Öffnungskinetik stark vom lateralen Druck und der Membrandicke abhängt, reagieren empfindlich auf die Gegenwart amphiphiler Substanzen in der Membran. Dabei zeigt sich ein dosisabhängiger Effekt, der eine klare Abhängigkeit bezüglich der Einlagerungstiefe und damit Hydrophobizität aufweist. Die Wirkung korreliert somit mit der Erhöhung des lateralen Drucks in der Acylkettenregion der Lipidmembran, wodurch die mechanische Expansion der Transmembrandomänen und dadurch die Kanalöffnung behindert wird. Artefakte, die bei höheren Konzentrationen hydrophober Lokalanästhetika beobachtet wurden, und ebenfalls bei der Modulation membranphysiologischer Eigenschaften auftraten, konnten eindeutig der Destabilisierung der Liposomen zugeordnet werden.

Die hier erhaltenen Ergebnisse schließen nicht aus, dass es mehrere Mechanismen für amphiphile Wirkstoffe gibt, die konzertiert stattfinden, insbesondere da spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle Bindungsstellen für Lokalanästhetika aufweisen. Die membranmodulierenden Effekte, die in dieser Arbeit gefunden wurden, weisen allerdings stark auf eine membranvermittelte Wirkung amphiphiler Moleküle hin, die neben einer spezifisch auftretenden Blockade parallel dazu stattfinden kann. Diese Hypothese wird durch die konzentrationsabhängige Inhibition pro- und eukaryotischer Ionenkanälen nochmals gestärkt.

## 6 Material

### 6.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

#### 6.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Modell, Hersteller</b>
Extruder	Avanti® Mini-Extruder, Avanti® Polar Lipids
Fluoreszenz-Mikroskop	Axio Observer z1, Zeiss Axioskop 40, Zeiss TCS SP8, Leica
Geldokumentationssystem mit UV-Detektor	Odyssey Fc, Li-COR Biosciences
Gelelektrophoresegerät	Mini-Protean Tetra Cell, BioRad Netzgerät PowerPac Basic, BioRad
Heizschränke	Typ B42, Hereaus Modell 600, Memmert
Inkubator	Incucell, MMM Medcenter Einrichtungen
Kontaktthermometer	ETS-D4 fuzzy, IKA® Labortechnik
Kühlschränke: 4 °C -20 °C -80 °C	Müller; Siemens Liebherr; Bauknecht Forma 900 Series. Thermo Scientific
Lyophilisator	Alpha 1-4 LSC, Martin Christ GmbH Alpha 2-4 LD, Martin Christ GmbH
Magnetrührer	IKAMAG RCT, IKA® Labortechnik
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Spark®, Tecan
Multipipette	Rainin E4-300XLS, Mettler Toledo
NMR-Probenkopf	HFX Flachspule, statisch, Eigenbau KIT HF Goniometer, drehbare Spule, Eigenbau KIT HC-BB-D-Probenkopf, Flüssig-NMR, Bruker
NMR-Spektrometer	Avance III HD widebore, 500 MHz (Ultrashield™), Bruker Biospin Avance II HD, 300 MHz, Bruker
pH-Messgerät	pH 3310, WTW
Pipetten: 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl, 5ml	Research, Eppendorf Research plus, Eppendorf Reference, Eppendorf
Reinraumbank	Herasafe 12, Heraeus Instrument
Reinstwasseranlage	Milli-Q, Merck Millipore
Schüttler	Vibramax 100, Heidolph Instruments
Spritze Extruder	Hamilton 1000µl, Avanti® Polar Lipids
Vakuumpumpe	MZ 2C, VacuuBrand
Vortexer	Genie 2, Bender & Hobein GmbH
Waagen	XPR2, Mettler Toledo CP64, Sartorius PB3001, Mettler Toledo M2P, Sartorius
Wasserbad	Aqualine AL5, Lauda
Zentrifuge	PerfectSpin 24R, Peqlab

## 6.1.2 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
1,2-Dimyristoyl-d <sub>54</sub> -sn-glycero-3-phosphocholin (DMPCd <sub>54</sub> )	Avanti® Polar Lipids
1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DMPC)	NOF Corporation
1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG)	Avanti® Polar Lipids
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE)	Avanti® Polar Lipids
3-(2-Benzothiazolyl)-7-(diethylamino)-cumarin (Coumarin 6)	Sigma
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Thermo Fisher
8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS)	Biotium
Acrylamid:Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel30 37,5:1)	Roth
Adenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz (ATP)	Roth
Agar	Roth
Aluminiumsulfat Hexadecahydrat	Honeywell
Amicon® Ultra Zentrifugenfilter, 10 kDa MWCO	Sigma Aldrich
Amitriptylinhydrochlorid	Cayman Chemical
Ampicillin	Roth
Anti-His-Tag Antikörper, monoklonal (Maus)	Novagen
Anti-Maus Antikörper, polyklonal (Ziege)	Novagen
Benzocain HCl	Sigma
Borax	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Merck KGaA
Bupivacain HCl * H <sub>2</sub> O	Sigma
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Fluka®
Capsaicin	Cayman Chemical
Carbachol	Acros organics
Chloramphenicol	Roth
Chloroform	Merck
Cholesterin	Avanti® Polar Lipids
Coomassie Brilliant Blau R250	SERVA Electrophoresis
Coomassie Brilliant Blue G250	SERVA
D-Glucose	Roth
Dichlormethan (DCM)	VWR Chemicals
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fisher Scientific
Diphenylhexatrien (DPH)	Cayman Chemical Company
Duloxetinhydrochlorid	Cayman Chemical
Ethanol	Fisher Scientific
Fluo-4 AM	Ion Biosciences
Fluoxetinhydrochlorid	LKT Laboratories
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	Roth

## Material

HEPES	Sigma
Imipraminhydrochlorid	Cayman Chemical
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumphosphat	Roth
<i>LEMO21 DE3 e.coli</i>	New England Biolabs
Lidocain HCl * H <sub>2</sub> O	Sigma
LPC	Avanti® Polar Lipids
L-Rhamnose	New England BioLabs
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA
Mepivacain HCl	Sigma
Methanol	Merck, VWR Chemicals
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Fisher Scientific
Natriumphosphat	Roth
Natriumphosphat dibasisch Heptahydrat	Riedel-de-Haën
Natriumphosphat monobasisch Monohydrat	Roth
NEB 5 α competent e.coli	New England Biolabs
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Thermo Fisher
N-Lauroylsarkosin Natriumsalz (NIs)	Merck KGaA
Nortriptylinhydrochlorid	Cayman Chemical
o-Phosphorsäure	Roth
PageRuler™ Broad Range, Protein Ladder, prestained	Thermo Fisher
PageRuler™ Broad Range, Protein Ladder, unstained	Thermo Fisher
PageRuler™ Low Range, Protein Ladder, unstained	Thermo Fisher
<i>pET-22b Vektor</i>	Novagen
Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat (Tween®20)	Roth
Probenecid	Cayman Chemical Company
Procain HCl	Sigma
QX314 Cl	Biozol
ROTI®Quant universal	Roth
Salzsäure (HCl)	Fisher Scientific
Sertralinhydrochlorid	Cayman Chemical
SOC-Medium	New England Biolabs
Thallium(I)-nitrat	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trypton	Roth
Venlafaxinhydrochlorid	LKT Laboratories



### 6.1.3 Verbrauchsmaterial

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Aluminiumfolie	Roth
Autoklavierband	3M
Bio-Beads	BioRad
Einmalhandschuhe Nitril	Meditrade®
Einmalspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun Melsungen
Falcon-Tubes (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Frischhaltefolie (Polyethylen)	Sarogold
ITO-Slides	Sigma Aldrich
Kammerobjektträger (4-Well, 8-Well)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Mikrotiterplatte, 96-Well, steril	PerkinElmer Inc.
Ni <sup>2+</sup> -NTA-Chromatographiesäule	HisTrap HP 5 ml, GE Healthcare Life Sciences
Parafilm®	Bemis Company Inc.
Pasteurpipetten	VWR GmbH
Pipettenspitzen (10 µl, 200µl, 1000 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (5 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Präzisionswischtücher Kimtech Science	Kimberly-Clark
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße LoBind (1,5 ml, 2ml)	Eppendorf
ROTI®Quant universal Kit	Roth
Spritzenvorsatzfilter 0,20 µm (Ø 0,25 mm)	LLG® Labware
Universalindikator-Papier (pH 1-14)	Roth
Wägepapier MN226	Macherey-Nagel
Wägeschalen	Roth

## 6.2 Puffer und Lösungen

### 6.2.1 Proteinexpression und Reinigung

#### Chloramphenicol-Stammlösung

---

Chloramphenicol (30 mg/ml)	30 mg
	mit Ethanol auf 1 ml auffüllen, vortexen und zentrifugieren

#### IPTG-Stammlösung

---

IPTG (1 M)	238,3 mg
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 ml auffüllen

## Material

### LB-Medium

---

Trypton	20,0 g
NaCl	20,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
mit ddH <sub>2</sub> O auf 2 L auffüllen, pH 7,5 einstellen, autoklavieren	

### LB-Agar

---

LB-Medium	350 ml
Agar	7,0 g

### Ampicillin-Stammlösung

---

Ampicillin (100 mg/ml)	500 mg
mit ddH <sub>2</sub> O auf 5 ml auffüllen	

### Cracking-Puffer

---

TRIS (1 M, pH 6,8)	1,0 ml
Natriumlaurylsulfat (SDS) (10%)	2,0 ml
Glycerol (100%)	5,0 ml
β-Mercaptoethanol (100%)	0,2 ml
Bromphenolblau	10 mg
11,8ml ddH <sub>2</sub> O zugeben	

### 4x TRIS-Lösung

---

TRIS	6,05 g
mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen, pH 6,8 einstellen	
SDS	0,4 g

## Material

### 8x TRIS-Lösung

---

TRIS	36,4 g
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen, pH 8,45 einstellen

SDS	0,3 g
-----	-------

### SDS-Probenpuffer

---

TRIS (1M) pH 6,8	875 µl
Glycerol (50%)	1,5 ml
SDS (10%)	2,5 ml
Dithiothreitol	120 mg
ddH <sub>2</sub> O	125 µl
Bromphenolblau	1 Ssp.

### Anodenpuffer

---

TRIS	121,1 g
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 5 L auffüllen, pH 8,9 einstellen

### Kathodenpuffer

---

TRIS	12,11 g
Tricin	17,92 g
SDS	1 g
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen

### Anodenpuffer I

---

TRIS	36,3 g
Methanol	200 ml
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, pH 10,4 einstellen

## Material

### Anodenpuffer II

---

TRIS	3 g
Methanol	200 ml
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, pH 10,4 einstellen

### Kathodenpuffer I

---

6-Aminocaprinsäure	5,2 g
SDS	0,1 g
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, pH 7,4 einstellen

### 10x Puffer A

---

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	3,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	13,7 g
NaCl	9,3 g
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, pH 7,2 einstellen

### Puffer B

---

Puffer A	100 ml
Tween® 20	500 µl
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen

### Puffer C

---

TRIS	1,2 g
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,0 g
NaCl	0,6 g
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen, pH 9,5 einstellen

### Milchpulverlösung

---

Milchpulver (5%)	2,5 g
	mit Puffer B auf 50 ml auffüllen

## Material

### Detektionslösung

---

Puffer C	10 ml
NBT (50 mg/ml in 70% DMF)	66 µl
BCIP (50mg/ml in 100% DMF)	33 µl

### Entsalzungspuffer

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (20mM)	3,56 g
NaCl (140 mM)	8,18 g
NaN <sub>3</sub> (0,01 %)	100 mg
Triton X-100 (0,2%)	2 g
mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, pH 8 einstellen	

### Aufschlusspuffer

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mM)	8,9 g
Imidazol (30 mM)	2,04 g
NaCl (300 mM)	17,53 g
mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, pH 8 einstellen, sterilfiltriert und entgast	
Triton X-100 (2%)	20 g

### Bindepuffer

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mM)	17,8 g
Imidazol (30 mM)	4,08 g
NaCl (300 mM)	35,06 g
mit ddH <sub>2</sub> O auf 2 L auffüllen, pH 8 einstellen, sterilfiltriert und entgast	
Triton X-100 (2%)	40 g

## Material

### Elutionspuffer

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mM)	4,45 g
Imidazol (500 mM)	17,02 g
NaCl (300 mM)	8,77 g
mit ddH <sub>2</sub> O auf 0,5 L auffüllen, pH 8 einstellen, sterilfiltriert und entgast	
Triton X-100 (2%)	10 g

## 6.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

### Extrazellulärer Puffer (ECB<sub>F</sub>)

---

NaCl (150 mM)	2,192 g
KCl (5 mM)	0,093 g
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (1 mM)	0,051 g
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (2 mM)	0,074 g
HEPES (10 mM)	0,596 g
D-Glucose (10 mM)	0,450 g
Probenecid (1 mM)	2,5 ml 250 mM Probenecid-Lösung
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 250 ml auffüllen
	pH 7,4 mit NaOH einstellen
	sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

### Pluronic® F-127-Lösung

---

Pluronic® F-127 (20 % (m/v))	2 g
	mit DMSO auf 10 ml auffüllen
	Lagerung bei Raumtemperatur

### Probenecid-Lösung

---

Probenecid (250 mM)	178,35 mg
	mit 1 M NaOH auf 2,5 ml auffüllen

## 6.2.3 Fluoreszenzmessungen am Plate Reader

### Phosphatpuffer 100mM

---

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,848 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5,052 g
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 250 ml auffüllen, pH 7,4 einstellen, sterilfiltriert

### HEPES-Puffer 100mM

---

HEPES	2,38 g
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen, pH 7,4 einstellen, sterilfiltriert

### Coumarin-6-Stammlösung

---

Coumarin-6 (6 mM)	2,1 mg
	mit DMSO auf 1 ml auffüllen, Verdünnungsreihe 1:10 bis auf 6 µM mit DMSO

## 6.2.4 Fluoreszenzpolarisationsmessungen am Plate Reader

### DPH-Stammlösung

---

DPH (10mM)	1,16 mg
	mit DMSO auf 0,5 ml auffüllen

## 6.2.5 NMR-Messungen

**Phosphatpuffer 10mM**


---

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2,67 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	4,35 g
mit ddH <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen, splitten auf je 250 ml, je ein Aliquot auf pH 5 bzw. pH 7,4 einstellen, sterilfiltriert	

**Boratpuffer 10mM, pH 10**


---

Borax	0,119 g
NaOH (0,1 mol/l)	45,75 ml
mit ddH <sub>2</sub> O auf 250 ml auffüllen, pH 10 einstellen	

**6.3 Software**

ChemDraw Professional 16.0	PerkinElmer
TopSpin 4.0.6 und 4.3.0	Bruker Biospin
ZEN 3.4 (blue edition)	Zeiss
ChimeraX	UCSF
SparkControl	Tecan
LAS X Office	Leica Microsystems
Office365	Microsoft



## 7 Methoden

### 7.1 Proteinbiochemische Methode

#### 7.1.1 Expressionssystem und Optimierung für MscS und MscL

Die Expression und Aufreinigung der mechanosensitiven Kanäle MscS und MscL wurden von Stefanie Vollmer und Annika Stumpf<sup>153</sup> (KIT, IOC) durchgeführt. DPG

Die Gene für MscS und MscL, die jeweils mit einem His-Tag versehen sind, befanden sich in einem pQE-Vektor und wurden in einen pET-22b-Vektor kloniert, der anschließend in *E. coli*-Lemo21-DE3-Zellen transformiert wurde. Diese Zellen enthalten zusätzlich ein pLemo-Plasmid, das einen rhamnoseabhängigen Promotor für die T7-Lysozymexpression trägt. Letztere hemmt die T7-RNA-Polymerase. Dadurch kann die Aktivität der T7-RNA-Polymerase durch Anpassung der Rhamnosekonzentration während der Expression reguliert werden<sup>154–156</sup>.

Daher wurde zunächst eine Testexpression durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für eine großmaßstäbliche Expression zu ermitteln. Jede Kultur enthielt die gleiche Menge an Antibiotika: 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol. Für jedes Protein wurde eine einzelne Kolonie von einer über Nacht gewachsenen LB-Agarplatte entnommen und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler bei 220 rpm in 20 ml LB-Medium inkubiert. Es wurden 0 µM, 100 µM und 250 µM Rhamnose getestet. 100 ml LB-Kulturen, die entweder 900 µl oder 2,5 ml der MscL- bzw. MscS-Vorbereitung enthielten, wurden bei 37 °C inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> 0,4 erreichte. Die Proteinexpression wurde anschließend durch Zugabe von 40 µl 1 M IPTG induziert.<sup>153</sup>

Für die Großexpression wurden die Volumina entsprechend angepasst. Es wurden 4 L (8 × 500 ml in 2-Liter-Erlenmeyerkolben) analog vorbereitet. Die optimale Rhamnosekonzentration für die Kulturen betrug 100 µM für MscS und 250 µM für MscL. Die Übernachtskulturen wurden auf 150 ml erweitert, und es wurden 4,95 ml (für MscS) bzw. 5,87 ml (für MscL) pro Kolben inokuliert. Das Verfahren folgt den Schritten der Testexpression, jedoch mit einem auf 200 µl pro 500 ml Kultur angepassten IPTG-Volumen.<sup>153</sup>

### 7.1.2 Zellaufschluss und Fraktionierung

Nach der Expression wurden die Kulturen bei 6.000 rpm bei 4 °C für 25 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellpellets wurden in 25 ml Lysepuffer ohne Triton X-100 (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM Imidazol, 300 mM NaCl) bei 25 °C resuspendiert. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Pefabloc, Benzamidin und Benzonase wurden der Suspension zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch vier Zyklen von je 4 Minuten Sonifikation unter Kühlung. Nach anschließender Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4 °C für 30 Minuten wurde der Überstand durch Ultrazentrifugation bei 40.000 rpm und 4 °C für 1 Stunde weiter aufgetrennt. Das Pellet der ersten Zentrifugation ergibt die Zelltrümmerfraktion, das Pellet der Ultrazentrifugation bildet die Membranfraktion, und der Überstand aus dem letzten Schritt stellt die Zytoplasmafraktion dar. Die Membranfraktionspellets von MscS und MscL wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler in Lysepuffer mit 2 % Triton X-100 inkubiert.<sup>153</sup>

### 7.1.3 Aufreinigung

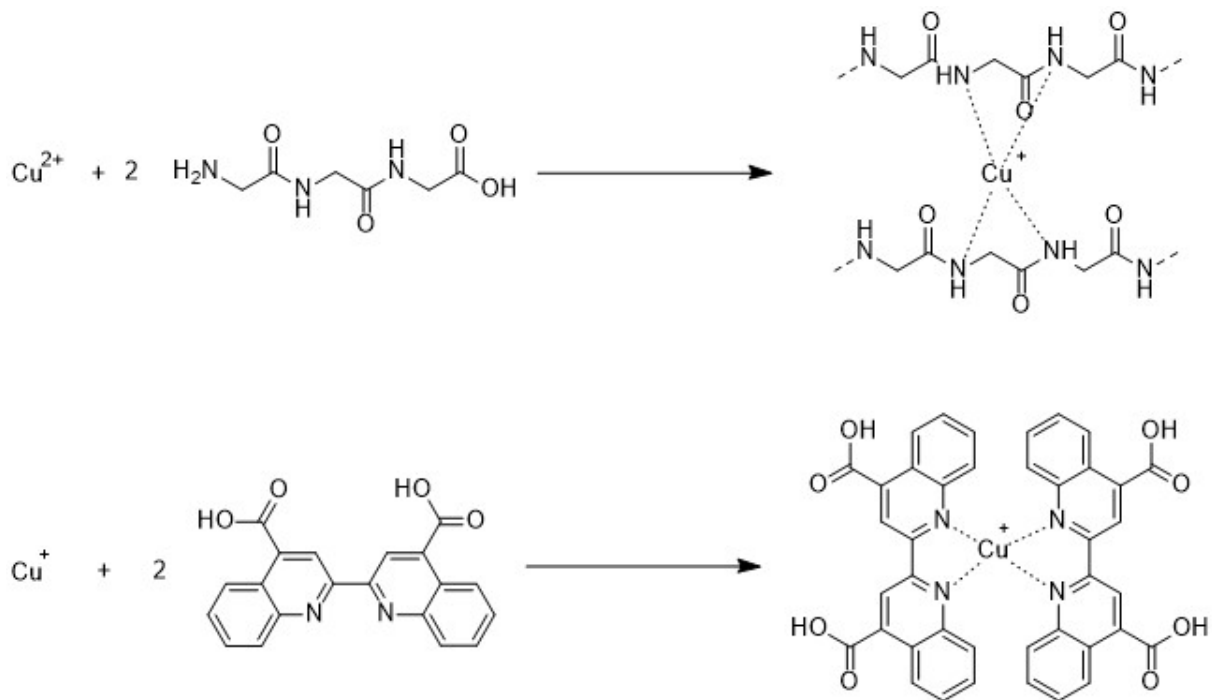
Die Membrankanäle wurden über ihren His-Tag mittels Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt. Dieser automatisierte Prozess wurde unter Verwendung des ÄKTApurifier™-Systems mit der UNICORN™-Software durchgeführt. Der Bindepuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 2 % Triton X-100, pH 8, entgast und steril filtriert) wurde zur Äquilibrierung der Säule und zur Applikation des Proteins verwendet. Nachdem keine Absorption mehr messbar war, wurden die Proteine durch Elutionspuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 2 % Triton X-100, pH 8, entgast und steril filtriert) eluiert. MscS und MscL wurden anschließend durch eine Zentrifugation mit Amicon Ultra-15 weiter konzentriert. Der Durchfluss wurde verworfen, und die konzentrierten Proben wurden bei 5.000 g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert.<sup>153</sup>

### 7.1.4 Entsalzung

Zur Entsalzung wurden PD10-Säulen mit einem Entsalzungspuffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 0,01 % NaN<sub>3</sub>, 0,2 % Triton X-100, pH 8) verwendet, der eine geringere Konzentration an Triton X-100 enthält. Die Säule wurde mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Entsalzungspuffer äquilibriert, und die Proteinlösung wurde fraktioniert aufgefangen, indem nach der Applikation der Probe jeweils 1 ml Entsalzungspuffer nachgegeben wurde. Dies führte zu insgesamt 20 Fraktionen für MscS und MscL.<sup>153</sup>

### 7.1.5 Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration des aufgereinigten MscS und MscL wurde mittels des kolorimetrischen Biuret-Assay mit dem ROTI®Quant universal Kit quantitativ bestimmt. Diese Methode basiert auf der reduktiven Umwandlung von Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen durch Peptidbindungen im alkalischen Milieu – der Biuret-Reaktion. Das entstehende  $\text{Cu}^+$  bildet in einem zweiten Schritt einen intensiven purpurfarbenen bis bräunlichen Komplex mit PCA, einem chromogenen Chelator, der strukturell mit Bicinchoninsäure verwandt ist (Abbildung 44).



**Abbildung 44: Funktionsweise des Biuret-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung**

Im ersten Schritt binden Proteine im alkalischen Kupfer, wodurch ein violetter Komplex gebildet wird. Durch das anschließende Verschieben der Elektronendichte im Komplex entstehen Kupfer(I)-Ionen, die im zweiten Schritt durch Bicinchoninsäure oder verwandte Moleküle, wie PCA, komplexiert werden können und einen farblich intensiveren Komplex ausbilden.

Für die Messungen wurden von den jeweiligen Elutionsfraktionen Verdünnungen im Verhältnis 1:10 und 1:100 mit Entsalzungspuffer hergestellt. Die Arbeitslösung wurde nach Anweisung des Kits gemäß Herstellerangaben vorbereitet, indem 7,5 ml Reagenz 1 mit 0,5 ml Reagenz 2 gemischt wurden. Zur Kalibrierung wurde eine Standardreihe mit Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin* – BSA) erstellt. Dafür wurde eine Stammlösung mit 2 mg/ml in Entsalzungspuffer angesetzt und anschließend eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt (Tabelle 7). In einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  der Referenzlösungen A-K sowie ein Leerwert, der ausschließlich Entsalzungspuffer enthielt, und je 50  $\mu\text{l}$  der Proben in Triplikaten pipettiert. Anschließend wurden je 100  $\mu\text{l}$  der zuvor hergestellten Arbeitslösung

hinzugegeben. Alle Proben wurden anschließend für zwei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Absorption bei 492 nm an einem Tecan Spark® Plate Reader gemessen. Der präparierte Leerwert wurde zur Hintergrundkorrektur von allen Messwerten subtrahiert.

**Tabelle 7: BSA-Verdünnungsreihe zur Konzentrationsbestimmung via Biuret-Assay**

Endkonzentration der BSA-Lösungen sowie nötiges Volumen des Puffers und der entsprechenden BSA-Lösungen zur Herstellung.

Lösung	Konzentration BSA (µg/ml)	Verdünnungspuffer (µl)	Volumen [ml] und BSA-Lösung
A	2000	0	400 µl Stammlösung
B	1500	125	375 µl Stammlösung
C	1000	325	325 µl Stammlösung
D	750	325	325 µl Lösung B
E	500	325	325 µl Lösung C
F	250	325	325 µl Lösung E
G	125	325	325 µl Lösung F
H	50	450	300 µl Lösung G
I	25	400	100 µl Lösung G
K	5	400	100 µl Lösung I
Leerwert	0	400	0 µl

## 7.2 Fluoreszenzbasierte Methoden

### 7.2.1 Elektroformation der GUVs sowie Rekonstitution von MscS/MscL

Die Herstellung der verwendeten GUVs erfolgte via Elektroformation, basierend auf einem modifizierten Protokoll.<sup>157,158</sup> Die erfolgreiche Synthese wurde durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes DIL mikroskopisch überprüft. Um die natürliche Umgebung von MscS und MscL, die Membran von *E. coli*, nachzuahmen, wurden 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) und 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (DOPG) im Verhältnis 3:1 als Lipide gewählt.<sup>159</sup> Beide Lipide wurden gemeinsam mit einer Konzentration von jeweils 1 mg/ml in Chloroform gelöst und so viel DIL zugegeben, dass die Endkonzentration des Fluoreszenzfarbstoffes 1 µM betrug. Mit Indium-Zinn-Oxid (ITO) beschichtete Objektträger wurden mit Chloroform gereinigt und die beschichtete, leitfähige Seite mithilfe eines Voltmeters bestimmt.

## Methoden

75 µl der zuvor hergestellten Lipidlösung wurden vorsichtig auf die leitfähige Seite der ITO-Objektträger aufgetragen und das Lösungsmittel unter dem Abzug evaporiert. Um einen möglichst homogenen Lipidfilm zu erhalten, wurden weitere 50 µl der Lipidlösung aufgetragen, das Lösungsmittel erneut unter dem Abzug verdampfen gelassen und die ITO-Objektträger anschließend über Nacht in einem Exsikkator unter Vakuum gelagert, um verbleibende Chloroformreste zu entfernen. Anschließend wurden die Lipide bei 40°C für 10 min in 0,1x PBS mit 1 mM ANTS hydriert, bevor ein wechselndes elektrisches Feld zur Elektroformation der gewünschten GUVs angelegt wurde. Die Spannung wurde dazu schrittweise, bei konstanter Frequenz von 500 Hz, erhöht (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Protokoll zur Elektroformation von GUVs**

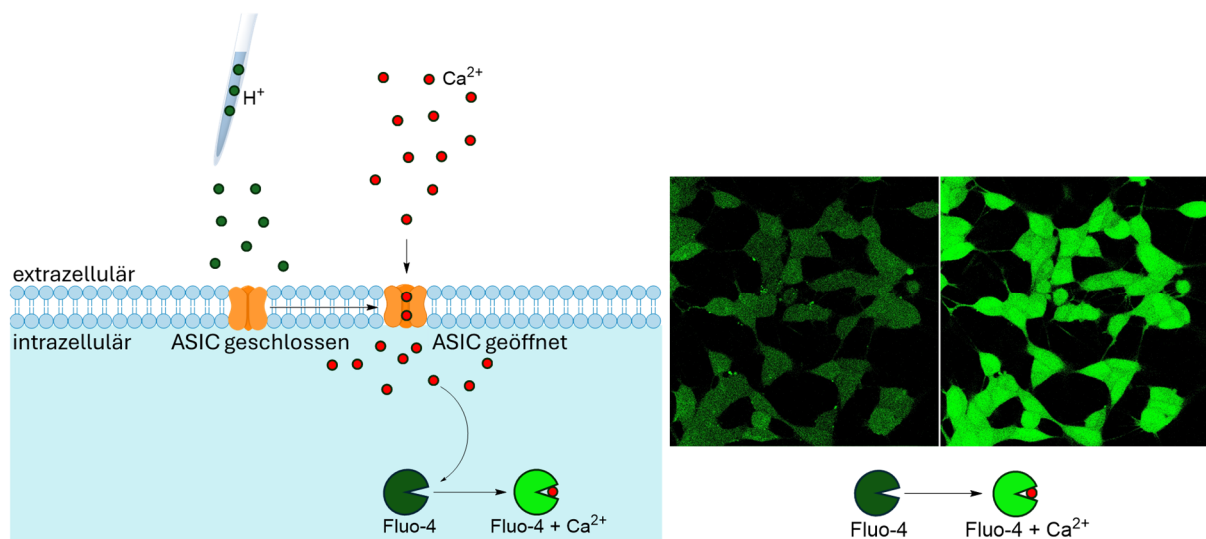
Zeit und jeweils angelegte Spannung bei einer Frequenz von 500 Hz zur Herstellung von GUVs.

Zeit [min]	5	5	15	30	Über Nacht
Spannung [Vpp]	0,44	0,88	1,32	1,76	2,20

Die Rekonstitution der mechanosensitiven Kanäle MscS und MscL erfolgte über eine detergensvermittelte Methode.<sup>160</sup> 0,2 % Triton X-100 wurden verwendet, um die Proteine in die zuvor hergestellten GUVs im Verhältnis 1:1000 (Protein zu Lipid) zu integrieren. Dazu wurden für MscS 47,5 µl und für MscL 35 µl der jeweiligen Stammlösungen (MscS 101 µg/ml, MscL 69 µg/ml), die in Entsalzungspuffer vorlagen zu 1,7 ml GUV-Lösung gegeben. Anschließend wurde das Detergens mithilfe von jeweils 0,5 g (Nassgewicht) SM-2 BioBeads entfernt, sodass eine GUV-Lösung mit funktionsfähigem MscS oder MscL erhalten wurde. Zuvor wurden die BioBeads einmal mit Methanol, viermal mit ddH<sub>2</sub>O und einmal mit 0,1xPBS gewaschen. Die Inkubationszeit betrug nach Zugabe der Proteine bzw. BioBeads jeweils 1h. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und weiterverwendet. Die Stabilität gegenüber Triton X-100 sowie die allgemeine Integrität der GUVs wurde an einem Axioskop 40 visuell überprüft. Hierzu wurden verschiedene Triton X-100 Konzentrationen in GUV-Lösungen untersucht, um eventuell auftretende Solubilisierungseffekte erfassen zu können. Hohe Konzentrationen der einzelnen Lokalanästhetika in Gegenwart von GUVs wurden fluoreszenzmikroskopisch an einem Leica TCS SP8 beobachtet.

### 7.2.2 Calcium Influx via ASICs in humanen HEK293-Zellen

Das in dieser Arbeit verwendete und modifizierte Calcium-Influx-Assay<sup>128</sup> nutzt die endogene Expression von ASICs in HEK293-Zellen aus. Diese humane Zelllinie exprimiert ASIC 1a und 1b.<sup>161,162</sup> Diese Ionenkanäle werden durch einen Abfall des extrazellulären pH-Werts aktiviert. Permeabel sind ASICs nach der Öffnung hauptsächlich für Natriumionen. Bestimmte Subtypkombinationen der trimeren Kanäle zeigen jedoch auch eine Permeabilität für andere Ionen, darunter auch  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>82</sup> Dies trifft auch auf die in HEK293-Zellen exprimierten Kanäle zu. Um den Calciumeinstrom zu detektieren, wurde Fluo-4 AM (engl. *acetoxymethylester*) als Indikator ausgewählt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist ein Acetoxymethylester, der leicht durch die Zellmembran diffundieren kann und anschließend intrazellulär durch unspezifische Esterasen gespalten wird (Abbildung 46). Durch die Deesterifizierung verbleibt Fluo-4 in der Zelle und kann nicht mehr via Diffusion aus dieser gelangen. Bindet Calcium an Fluo-4 nimmt dessen Fluoreszenz stark zu (Abbildung 45).<sup>163</sup>

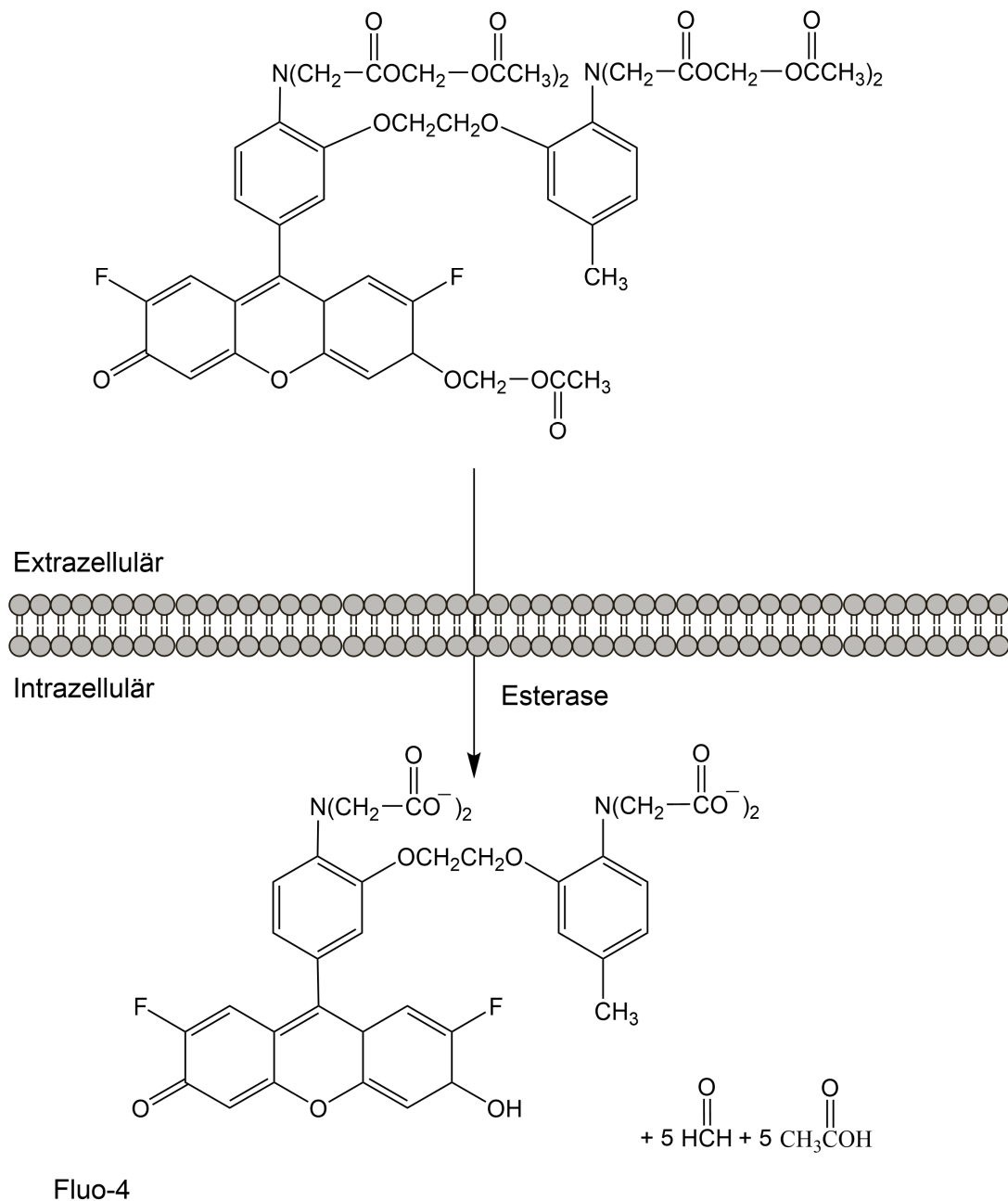


**Abbildung 45: Protonengetriggerte ASIC-Aktivierung & Fluo-4 Fluoreszenz nach Calciuminflux**  
Links: Aktivierung eines ASIC durch extrazelluläre Protonen. Gezeigt ist anschließend der Einstrom von Calciumionen. Rechts: Mikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen vor und nach Calciuminflux. Es ist ein deutlicher Anstieg der durch Fluo-4 ausgelösten Fluoreszenz sichtbar.

11  $\mu\text{l}$  einer 5 mM Stammlösung von Fluo-4 AM in DMSO wurden mit 11  $\mu\text{l}$  einer 20 % (m/V) Pluronic F-127-Lösung in DMSO gemischt, welches die Beladung der Zellen dadurch erleichtert, dass es die Aggregation der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle unterdrückt, und mit extrazellulärem Puffer ( $\text{ECB}_F$ ) auf 11 ml aufgefüllt. Die Fluo-4-Endkonzentration betrug somit 5  $\mu\text{M}$ . Probenecid dient als Inhibitor organischer Anionentransporter und verhindert so den unspezifischen Efflux des deesterifizierten Farbstoffs, wodurch dessen intrazelluläre Retention erhöht wird. HEK293-Zellen

## Methoden

wurden vor und nach der Inkubation mit Fluo-4 AM sowie nach der Deesterifizierung mit  $\text{ECB}_F$  gewaschen. Die Inkubation und Deesterifizierung erfolgten für jeweils 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  und 4 %  $\text{CO}_2$ . Wurden Lokalanästhetika zugegeben, so erfolgte dies während der Deesterifizierungsphase. Die Messungen fanden an einem Tecan Spark® Plate Reader statt. Hierbei wurden 25  $\mu\text{l}$   $\text{ECB}_F$  mit pH 1,2 zu 175  $\mu\text{l}$   $\text{ECB}_F$  mit pH 7,4 gegeben, wodurch der pH-Wert auf ca. 5,3 abgesenkt wurde, was den ASIC-getriggerten Einstrom von Calciumionen zur Folge hatte. Durch den schnellen Anstieg des Fluoreszenzsignals nach der Injektion des Puffers mit pH 1,2 konnte der Fluo-4 AM



**Abbildung 46: Beladung und Deesterifizierung von Fluo-4 AM**

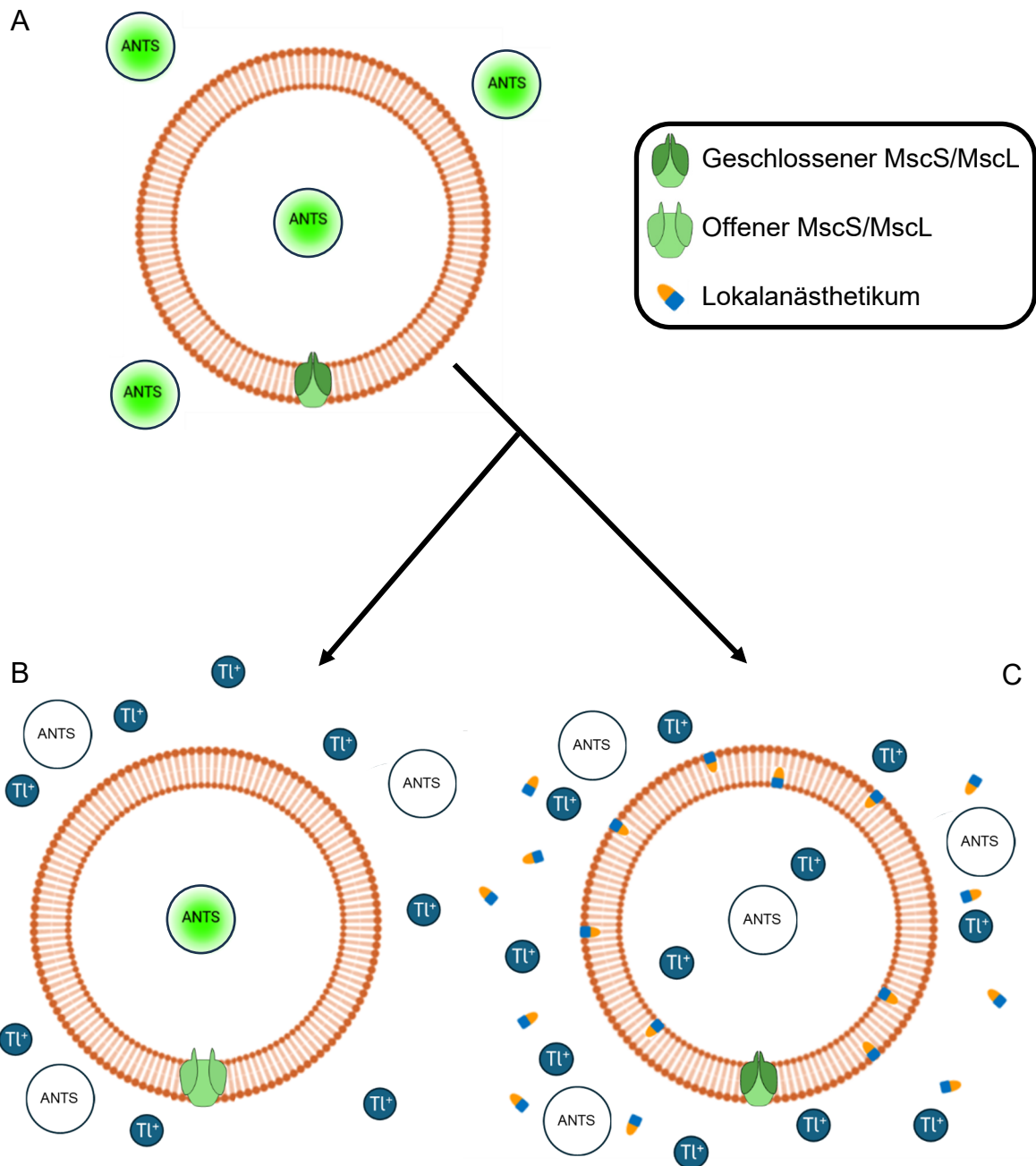
Fluo-4 AM diffundiert durch die Zellmembran und wird durch intrazelluläre Esterasen zu Fluo-4 gespalten. Als Nebenprodukte entstehen Formaldehyd und Essigsäure.

Fluoreszenzpeak nicht vollständig aufgezeichnet werden, weshalb die Fluoreszenzintensitätskurven der 5-minütigen Messungen normalisiert und die Differenz zwischen maximaler und minimaler Intensität zur Auswertung der verschiedenen Experimente herangezogen wurden. Als Referenz dienten HEK293-Zellen mit Fluo-4 und ohne Zugabe von Lokalanästhetika. Die Fluoreszenz von Fluo-4 wurde bei  $\lambda_{\text{Ex}}$  492 nm angeregt und bei  $\lambda_{\text{Em}}$  518 nm detektiert.

### 7.2.3 Thallium-Influx via MscS/MscL in artifiziellen Lipidvesikeln

Die in Kapitel 7.2.1 beschriebenen GUVs wurden anschließend für ein Thallium-Influx-Assay verwendet, welches für einen Tecan Spark® Plate Reader angepasst wurde.<sup>129,130</sup> Thalliumionen sind wie das üblicherweise verwendete DPX kationische Quencher, die durch Kollision mit dem Fluoreszenzfarbstoff wirken. Im Gegensatz zur Methode in 7.2.2 liegt ANTS hier sowohl inner- als auch außerhalb der Vesikel vor (Abbildung 47A), da es bereits während der Elektroformation der GUVs in der Lösung enthalten ist. Das Quenching erfolgt dann durch extravesikuläre Zugabe von Thalliumionen. Sind keine mechanosensitiven Ionenkanäle in die Lipidmembran eingebaut oder verbleiben diese im geschlossenen Zustand, so wird die Fluoreszenz in einem gewissen Maß durch die äußeren Thalliumionen gequencht (Abbildung 47B). Wenn jedoch MscS oder MscL rekonstituiert und geöffnet wurden, können Ionen schnell durch die aktivierten Kanäle in die GUVs eindringen. Daraus resultiert ein zusätzliches Quenching des ANTS-Farbstoffs im Inneren der Vesikel (Abbildung 47C), was zu einer insgesamt deutlich verringerten Fluoreszenz führt. Begünstigt die Anwesenheit von Lokalanästhetika oder ähnlichen Substanzen die Öffnung der mechanosensitiven Ionenkanäle, so äußert sich dies in einer herabgesetzten Fluoreszenz durch zusätzliches Quenching des intravesikulären ANTS. Die Stammlösung enthielt 300 mM Thallium(I)-nitrat, wovon 15  $\mu\text{l}$  zu 210  $\mu\text{l}$  GUV-Lösung gegeben wurden, was zu einer Endkonzentration von 20 mM Thallium(I)-nitrat führte. Unterschiede in der GUV-Menge je Well wurden durch Normalisierung mittels der DIL-Fluoreszenz ausgeglichen, da dieser Fluoreszenzfarbstoff nur nach Integration in die Lipidmembran eine relevante Fluoreszenz aufweist. DIL kann bei  $\lambda_{\text{Ex}}$  549 nm angeregt und die Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{Em}}$  565 nm ausgelesen werden. ANTS weist eine  $\lambda_{\text{Ex}}$  von 353 nm auf und eine  $\lambda_{\text{Em}}$  von 520 nm. Kontrollansätze umfassten Proben ohne rekonstituiertes Protein, ohne Zugabe von Lokalanästhetikum oder ohne Thalliumionen.





**Abbildung 47: Thallium-Influx-Assay mit ANTS als Fluoreszenzfarbstoff**

**A** GUV mit geschlossenem mechanosensitiven Kanal. Fluoreszenz von ANTS inner- und außerhalb des Vesikels. **B** Zugabe von Thallium(I)-nitrat. Der mechanosensitive Kanal bleibt geschlossen und die Fluoreszenz von ANTS wird lediglich außerhalb des GUV gequenchet. **C** Zugabe von Thalliumionen in Anwesenheit von Lokalanästhetikum. Durch Eindringen von  $Tl^+$ -Ionen über geöffnete MscS oder MscL wird auch die Fluoreszenz innerhalb des Vesikels gequenchet. (Abbildung teilweise verändert entnommen aus Swaay *et al.*<sup>109</sup>).

### 7.2.4 Fluidität und Phasenübergang über Fluoreszenzpolarisation

DPH kann als Fluoreszenzsonde verwendet werden, um die Beweglichkeit als membrangebundener Fluoreszenzfarbstoff zu untersuchen. Diese rotatorische Relaxation wird mittels Fluoreszenzpolarisation detektiert. Dabei wird DPH mit polarisiertem Licht angeregt,  $\lambda_{\text{Ex}}$  354 nm, und das emittierte Licht,  $\lambda_{\text{Em}}$  420 nm, sowohl parallel als auch senkrecht zur Polarisationsrichtung gemessen. Wird die Membran fluider, erhöht sich die Beweglichkeit der Fluoreszenzsonde, wodurch die Intensität des parallel emittierten Lichts reduziert wird. Membranfluidität und Fluoreszenzpolarisation verhalten sich demnach invers zueinander. In wässriger Umgebung ist die Fluoreszenz von DPH vernachlässigbar, wohingegen die Integration in den lipophilen Teil der Membran zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz führt. Die Berechnung der Polarisation erfolgt nach Formel (1) und wird meist in Millipolarisation (mP) angegeben.<sup>120</sup>

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (1)$$

P = Polarisation

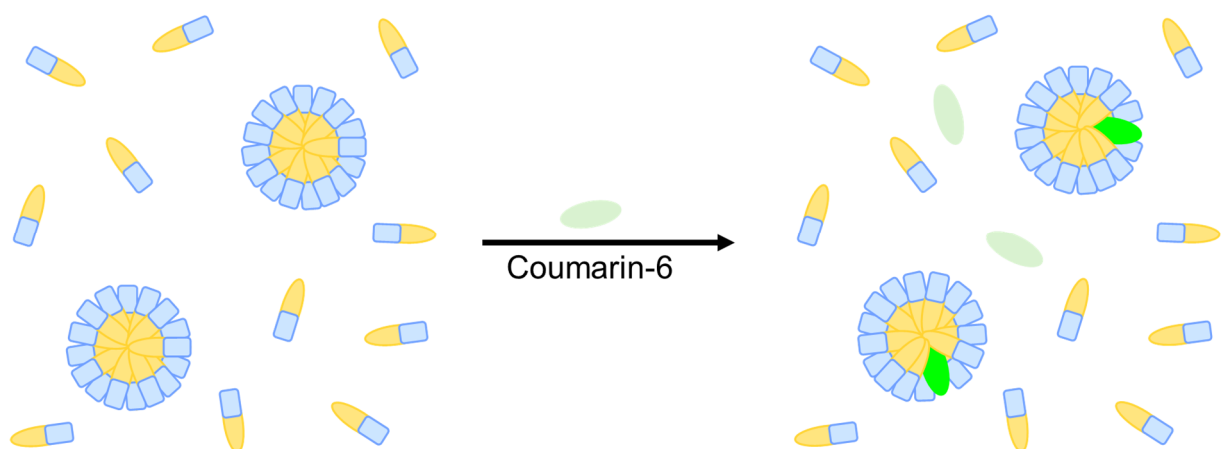
$I_{\parallel}$  = parallele Fluoreszenzintensität

$I_{\perp}$  = senkrechte Fluoreszenzintensität

Mittels Fluoreszenzpolarisation lässt sich so die  $T_m$  von der gelartigen  $L\beta$ -Phase in die flüssig-kristalline  $L\alpha$ -Phase bestimmen. Charakteristisch ist ein sigmoidaler Kurvenverlauf an dessen Wendepunkt  $T_m$  lokalisiert ist. Um den Einfluss von amphiphilen Molekülen auf Lipidmembranen zu bestimmen, wurde DMPC mit einer  $T_m$  von 23°C verwendet. Bei niedrigen Temperaturen unterhalb der  $T_m$ , ist die Lipidmembran starr, wodurch die DPH-Rotation eingeschränkt ist. Erst bei Überschreiten der  $T_m$  sinken die Polarisationswerte ab, da der Anteil an paralleler Fluoreszenzintensität abnimmt. Für die Messung wurde eine 10 mM DPH-Stammlösung in DMSO hergestellt, diese 1:10 mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt, was eine trübe Suspension ergab. Diese wurde anschließend nochmals 1:100 mit Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt und schlussendlich 1:1 mit LUVs mit oder ohne Lokalanästhetikum vereint (Herstellung siehe Kapitel 7.3.1), was in einer finalen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  DPH bei 0,05% DMSO endete.

### 7.2.5 Kritische Mizellbildungskonzentration via Coumarin-6

Die CMC ist definiert als die Konzentration bei der amphiphile Moleküle in Lösung beginnen nicht mehr als monomere Moleküle vorzuliegen, sondern die Kontaktfläche zwischen hydrophoben und hydrophilen Bereichen durch Selbstassemblierung zu Mizellen zu reduzieren. Die hydrophilen Anteile sind nach außen hin, zum umgebenden Medium, meist Wasser, da dieser Parameter physiologisch interessant ist, orientiert.<sup>121</sup> Da Lokalanästhetika und auch Psychopharmaka amphiphile Moleküle sind, besitzen auch sie bei entsprechend hoher Konzentration eine CMC. Dieser Wert ist daher nicht nur ein Maß für das Aggregationsverhalten amphiphiler Moleküle, sondern auch pharmakologisch relevant, da die Ausbildung von Mizellen dazu führen kann, dass die Interaktion mit biologischen Membranen beeinflusst, die Wirkung auf Membranproteine verändert und die Verfügbarkeit und Diffusion der Wirkstoffe im Gewebe moduliert wird. Gerade bei lokaler Anwendung ist, bedingt durch die höhere Konzentration, die CMC ein wichtiger Faktor, der membranvermittelte Wirkmechanismen beeinflussen kann. Zur Bestimmung der CMC<sup>121</sup> wurde Coumarin-6 als Fluoreszenzsonde eingesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist schlecht wasserlöslich, wodurch seine Fluoreszenz erst ausgeprägt ist, sobald Mizellen vorliegen und er in deren hydrophoben Bereich integriert wird (Abbildung 48). Die Fluoreszenz in Lipidlösungen, in denen keine Mizellen vorliegen, ist ebenfalls vernachlässigbar, da die hydrophoben Bereiche nur unvollständig vor Wasser geschützt sind und der Farbstoff unter diesen Bedingungen zur Selbstaggregation neigt. Coumarin-6 wurde in einer Konzentration von 6  $\mu\text{M}$  in DCM gelöst und 50  $\mu\text{l}$  dieser Lösung in ein leeres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, um das Lösungsmittel



**Abbildung 48: Bestimmung der CMC mittels Coumarin-6**

Amphiphile Moleküle, wie Lokalanästhetika, abgebildet in blau (hydrophil) und gelb (lipophil), lagern sich bei hohen Konzentrationen zu Mizellen zusammen. Coumarin-6 (grün) kann als Fluoreszenzsonde eingesetzt werden, da dieses schlecht wasserlöslich und seine Fluoreszenz nur ausgeprägt ist, sobald es in lipophiler Umgebung gelöst ist, beispielsweise in Mizellen.

verdampfen zu lassen. Verschiedene Konzentrationen an Lokalanästhetika oder Psychopharmaka in 100 mM Phosphatpuffer bzw. für Bupivacain in 100 mM HEPES-Puffer wurden anschließend zugegeben und die Lösungen über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Emission der fluoreszierenden Sonde wurde anschließend mit einem Tecan Spark® Plate Reader ausgelesen. Dazu wurden je 150 µl der, über Nacht inkubierten, Lösungen in 96-Well-Platten überführt. Coumarin-6 kann bei  $\lambda_{\text{Ex}}$  480 nm angeregt und die Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{Em}}$  520 nm aufgezeichnet werden. Es wurden verschiedene Konzentrationen an amphiphilen Molekülen untersucht. Bilden sich Mizellen aus, so ist die Fluoreszenz der entsprechenden Probe deutlich erhöht. Die Fluoreszenzwerte wurden dann gegen die Konzentration aufgetragen, je eine lineare Regression für Werte unter- und oberhalb der CMC angewandt und über den Schnittpunkt dieser beiden Geraden die CMC bestimmt.

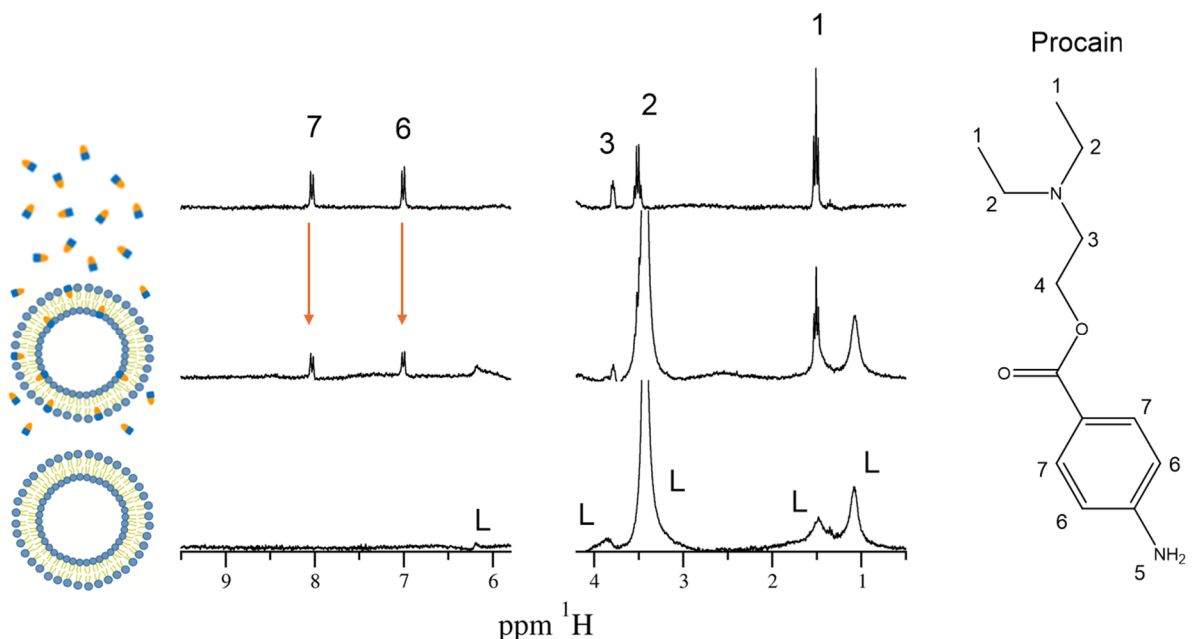
### 7.3 Kernspinresonanzbasierte Methoden

#### 7.3.1 $^1\text{H}$ -NMR Membran-Wasser-Verteilungskoeffizient

Mittels  $^1\text{H}$ -NMR wurde der Verteilungskoeffizient von verschiedenen amphiphilen Molekülen zwischen Membran und umgebenden Medium Wasser bestimmt. Der Verteilungskoeffizient ist definiert als das Verhältnis der Konzentrationen einer Substanz in einer Mischung aus zwei nicht mischbaren Lösungsmitteln.<sup>164</sup> Dies ist für Lipidvesikel der Fall, die in Wasser suspendiert vorliegen. Für die  $^1\text{H}$ -NMR-Experimente wurde LUVs durch Extrusion mittels eines Avanti® Polar Lipids Mini-Extruder unter Einsatz von 100 nm Membranen hergestellt. Zur Herstellung wurden Lipidstammlösungen mit 2 mg/ml angesetzt. Das Verhältnis zwischen den untersuchten amphiphilen Molekülen und dem eingesetzten Lipid DMPC betrug 1:20. Es wurden verschiedene pH-Werte untersucht und daher unterschiedliche Puffer eingesetzt: Phosphatpuffer mit 10 mM und pH 7,4, Phosphatpuffer mit 10 mM und pH 5 sowie Boratpuffer mit 10 mM bei pH 10 (siehe Kapitel 6.2.5). Die Konzentration der Stammlösungen für die Lokalanästhetika betrug je nach Löslichkeit 50 bzw. 5 mg/ml. Um eventuelle systematische Fehler auszuschließen, wurden im Zuge einer Bachelorarbeit LUVs auch mittels Sonifikation hergestellt und der Einfluss von Lokalanästhetika und Psychopharmaka auf diese ebenfalls via  $^1\text{H}$ -NMR untersucht.<sup>124</sup> Dazu wurden die amphiphilen Moleküle zusammen mit Lipid in Methanol/Chloroform gelöst, das Lösungsmittel mittels Argon verdampft, die Probe über Nacht im Exsikkator unter Vakuum gelagert, um Lösungsmittelreste zu entfernen, und anschließend in 1 ml

des jeweiligen Puffers gelöst. Sowohl für die Herstellung der LUVs via Sonifikation als auch Extrusion wurden die Proben ab diesem Zeitpunkt gleichbehandelt, indem sie fünf Zyklen lang eingefroren und aufgetaut wurden. Anschließend wurden die Proben entweder extrudiert und mit Lokalanästhetika versetzt oder die bereits zusammen gelösten Substanzen so lange Ultraschall ausgesetzt, bis die milchig trübe Lösung transparent wurde, was auf die Bildung von LUVs schließen ließ. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit Amicon® Ultra-0,5 Zentrifugalfiltereinheiten für 30 min bei 14000 g. Der Durchfluss wurde mit Natriumtrimethylsilylpropionat versetzt und 0,5 ml zur Messung in ein NMR-Probenröhrchen überführt. Diese von Schwarz<sup>124</sup> untersuchten Proben enthielten kein Lipid mehr; es wurde lediglich untersucht, wie viel der amphiphilen Moleküle ungebunden im Durchfluss vorlagen.

Von den extrudierten Ansätzen wurden ebenfalls je 0,5 ml zur Messung in NMR-Probenröhrchen überführt und nach ca. 30 min gemessen. Da in der <sup>1</sup>H-NMR nur Protonen der Moleküle detektierbar sind, die sich in einer Umgebung mit genügend molekularer Bewegungsfreiheit befinden, verschwinden die Signale der amphiphilen Substanzen, die sich in die Lipidmembran einlagern, da sie dort einer stark eingeschränkten Rotations- und Translationsfähigkeit unterliegen. Dies führt zu einer verkürzten transversalen Relaxationszeit, wodurch Signale stark verbreitert werden, und im Spektrum nicht mehr vom Grundrauschen zu unterscheiden sind. Nicht integrierte Moleküle, die in Lösung verbleiben, liefern hingegen durch ihre



**Abbildung 49: Quantifizierung des membranassoziierten Amphiphils via <sup>1</sup>H-NMR**

Am Beispiel des Procain sind die gemessenen Spektren abgebildet. **Oben:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Procain mit zugeordneten Signalen zum Molekül rechts. **Mitte:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der LUVs mit Procain, bei dem eine Signalreduktion der eindeutig zuordenbaren Signale 6 und 7 des Procain. **Unten:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der reinen LUVs, um die Lipidsignale zuordnen zu können (beschriftet mit L).

schnelle isotrope Rotation schmale, gut aufgelöste Peaks. Um das vorherrschende Lösungsmittelsignal des Wassers zu unterdrücken, wurde ein WATERGATE-Pulsprogramm verwendet. Dabei werden phasensensitive Gradientenpulse genutzt, um dies zu erreichen, während gleichzeitig Signale kleiner gelöster Moleküle erhalten bleiben.<sup>165</sup> Je untersuchtem Amphiphil wurden drei unterschiedliche Spektren aufgenommen. Zuerst ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Lipide sowie ein Spektrum mit der gleichen Konzentration an zu untersuchendem Molekül wie es auch in der eigentlichen Probe verwendet wurde. Dadurch können die Signale jeweils eindeutig dem Lipid oder der untersuchten Substanz zugeordnet werden. Das dritte Spektrum enthielt sowohl Lipidvesikel als auch Lokalanästhetikum/Psychopharmaka. Der membranassoziierte Anteil lässt sich dann durch Subtraktion der Spektren bzw. der Integrale der entsprechenden Peaks berechnen, da nur das Signal der Substanz sichtbar bleibt, die nicht membrangebunden ist (Abbildung 49). Über die Integrale konnte das Verhältnis  $x$  bestimmt werden, das den Anteil ungebundener Moleküle im Verhältnis zur Gesamtzahl beschreibt. Der Verteilungskoeffizient konnte dann nach Formel (2) berechnet werden. Das Molekülvolumen wurde als  $18 \text{ \AA} * 60 \text{ \AA}^2 = 1080 \text{ \AA}^3$  angenommen.

$$\log D = \log \left( \frac{x}{(1-x)} * \frac{m_W}{m_L} * \frac{\rho_W}{\rho_L} \right) \quad (2)$$

$m_W/m_L$  = Massenverhältnis Wasser zu Lipid

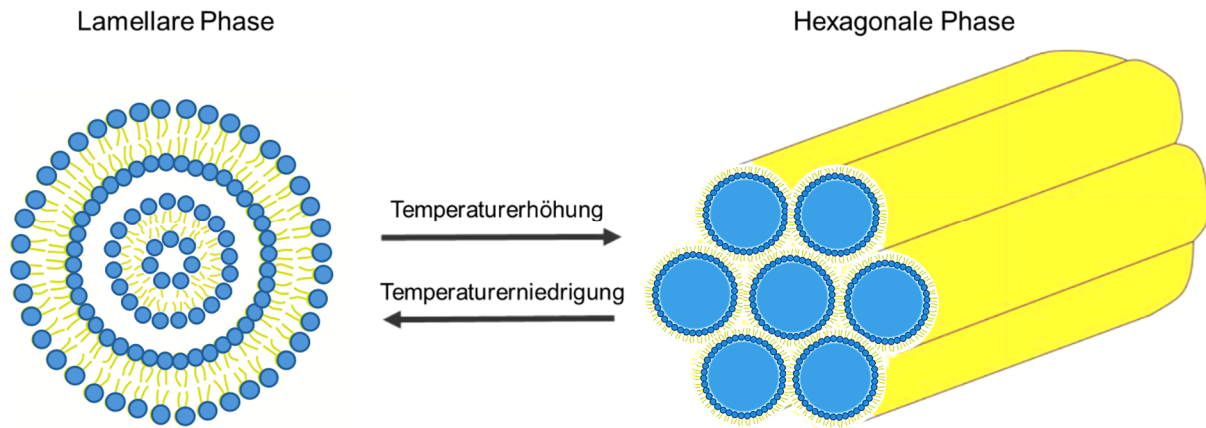
$\rho_W$  bzw.  $\rho_L$  = Massendichte Wasser bzw. Lipid

$\rho_L = 1,043 \text{ g/ml}$

### 7.3.2 <sup>31</sup>P-NMR Phasenübergang und spontane Krümmung

Ähnlich wie bei Kapitel 7.2.4 können verschiedenen Phasenübergänge auch via Kernspinresonanzspektroskopie beobachtet werden. Für DOPE wurde mittels <sup>31</sup>P-NMR der Übergang aus der lamellaren  $L\alpha$ -Phase zur invertierten hexagonalen HII-Phase observiert (Abbildung 50). Dieser Phasenübergang lässt Rückschlüsse darauf zu, ob zugegebene Moleküle wie Lokalanästhetika oder Psychopharmaka, die hexagonale Hochtemperaturphase und damit negative Krümmung oder die lamellare Niedrigtemperaturphase und somit positive Krümmung stabilisieren. So zeigt ein Absinken der Phasenübergangstemperatur die Stabilisation negativer Krümmung an.<sup>122,123,166,167</sup>

## Methoden



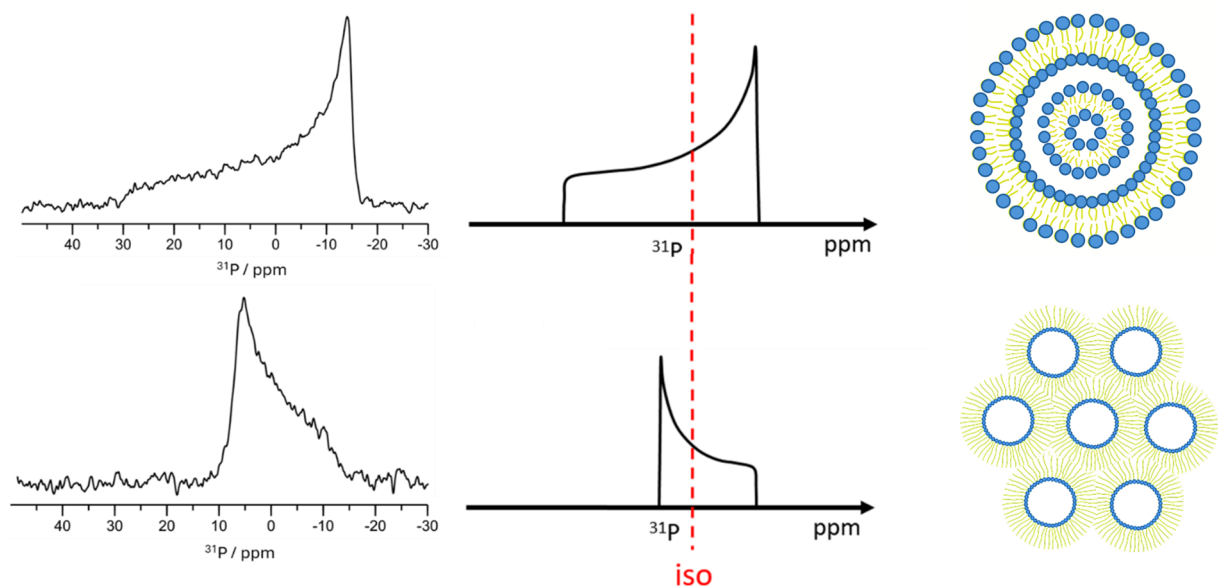
### Abbildung 50: Phasenübergang lamellar zu hexagonal

Verschiedene Lipide weisen bei unterschiedlichen Temperaturen Phasenübergänge auf. DOPE beispielsweise bei circa 65°C den Übergang von der lamellaren  $L_{\alpha}$ -Phase zur invertierten hexagonalen  $H_{II}$ -Phase (Abbildung erstellt in Anlehnung an Schwarz<sup>124</sup>).

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern, wurden Proben für die  $^{31}\text{P}$ -NMR auf zwei unterschiedliche Weisen hergestellt: Einerseits kamen orientierte Proben ohne Myristinsäure zum Einsatz, bei denen das Verhältnis zwischen Lipid und Lokalanästhetikum 10:1 betrug, wobei ca. 5 mg DOPE in 140 ml Methanol auf 5 Glasplättchen verteilt wurde. Die Trocknung erfolgte unter dem Abzug und die Proben wurden über Nacht in einem Exsikkator unter Vakuum gelagert, um verbleibenden Lösungsmittelreste zu entfernen. Zur Hydratisierung wurden die Glasplättchen aufeinandergestapelt, wobei ein 6. Plättchen zum Abdecken hinzugefügt wurde, und anschließend bei 48°C und circa 100% Luftfeuchtigkeit über Nacht gelagert. Im Anschluss wurden die Plättchen mit Parafilm versiegelt und die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen wie bei den Vesikelpuben durchgeführt.

Andererseits wurden zur Vorbereitung von Vesikelpuben für  $^{31}\text{P}$ -NMR-Experimente jeweils 10 mg DOPE mit Myristinsäure im molaren Verhältnis 10:1 vermischt. Das Verhältnis zwischen Lipid und Myristinsäure zu den zu untersuchenden amphiphilen Molekülen betrug 5:1. Im Gegensatz zu orientierten Proben, die leicht austrocknen können, kommt in Vesikelpuben mehr Wasser vor, wodurch die Bewegungsfreiheit der zugesetzten amphiphilen Substanzen erhöht ist. Myristinsäure wurde zugegeben, um die Bindung der untersuchten Moleküle sicherzustellen, da diese Fettsäure sich in Lipiddoppelschichten einlagern kann und dort als Lipidanker agiert. Die Substanzen wurden gemeinsam in Methanol/Chloroform gelöst, das Lösungsmittel unter Einsatz von Argon entfernt und die Proben über Nacht in einem Exsikkator unter Vakuum gelagert, um verbleibenden Lösungsmittelreste zu entfernen. Anschließend wurde ddH<sub>2</sub>O im Gewichtsverhältnis 1:1 zugegeben und die Proben jeweils fünfmal

eingefroren bzw. aufgetaut. Nach Überführung in NMR-Probengefäße für die Festkörper-NMR wurden diese auf Eis temperiert in ein Bruker Avance III HD 500 MHz Widebore-Spektrometer eingebracht. Die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen erfolgten mittels Hahn-Echo-Sequenz mit 90- und 180°-Pulsen. Die Pulslänge betrug 5  $\mu\text{s}$ , die Aufnahmezeit 32,8 ms bei einer Wiederholungszeit von 3 s und 64 Scans pro Messpunkt. Für jede Probe wurde eine Temperaturserie im Bereich von 276 bis 324 K durchgeführt. Die Äquilibrationszeit zwischen den einzelnen Temperaturstufen betrug 600 s. Ausgewertet wurde mittels TopSpin (Version 4.3.0, Bruker BioSpin). Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde ein Line Broadening im Bereich von 50 bis 200 Hz angewendet. Die Quantifizierung der Phasenanteile in den Spektren erfolgte mithilfe des integrierten Moduls Fit Solids NMR Model (SOLA) von TopSpin.<sup>124</sup> In der  $^{31}\text{P}$ -NMR weisen unterschiedliche Phospholipide je nach Phase charakteristische Linienformen auf. Sphärische Vesikel, in denen die Anzahl an Lipiden, die in einem Winkel von 90° zum Magnetfeld liegen, im Vergleich zu denen mit einem Winkel von 0°, überwiegt, zeigen ein typisches Pulverspektrum (Abbildung 51). Im Vergleich zu dieser lamellaren Phase, ist das Spektrum der invertierten hexagonalen Phase lediglich halb so breit und am isotropen Peak gespiegelt (Abbildung 51).<sup>123,168</sup>

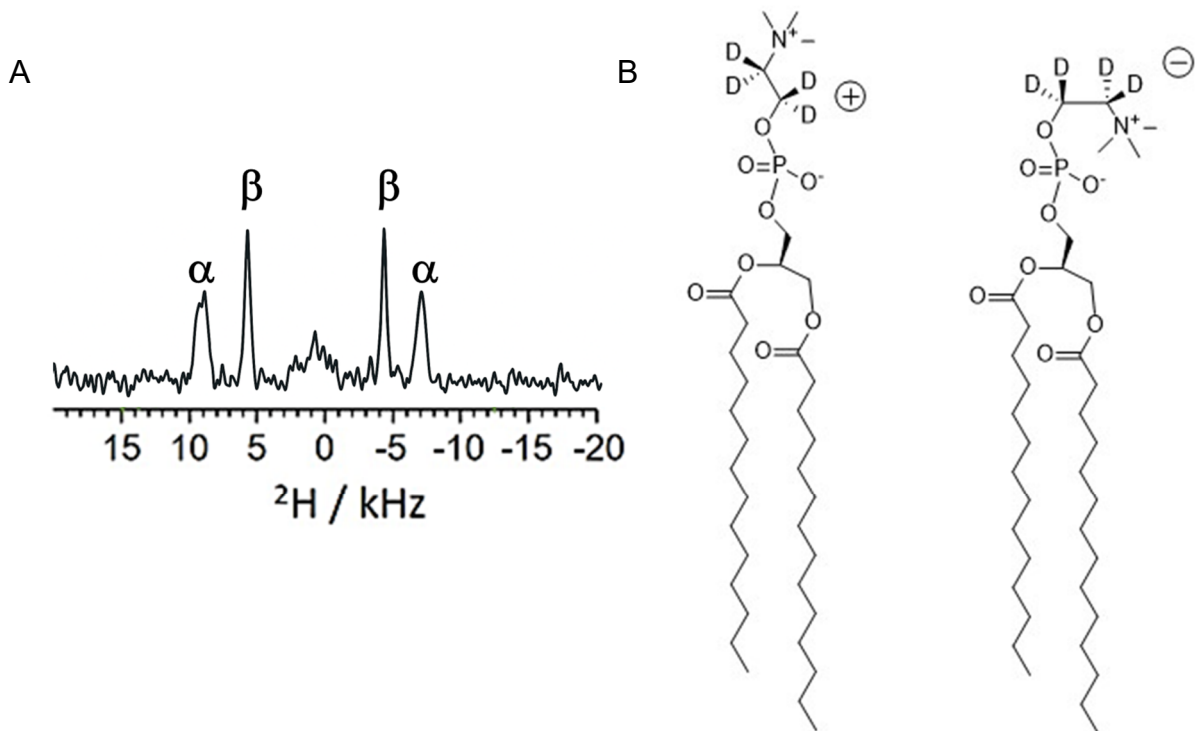


**Abbildung 51:  $^{31}\text{P}$ -Spektren von Vesikelproben in lamellarer und invertiert hexagonaler Phase**  
**Oben:** Lamellare Phase einer DOPE-Vesikelprobe, die ein charakteristisches Pulverspektrum aufweist.  
**Unten:** Invertiert hexagonale Phase einer DOPE-Vesikelprobe, deren Spektrum am isotropen Peak gespiegelt und nur halb so breit wie das Pulverspektrum der lamellaren Phase ist. Die beiden Spektren links zeigen DOPE-Myristinsäure-Vesikel im Verhältnis 10:1 mit Lidocain, die diese typischen Linienformen aufweisen. (Abbildung teilweise verändert entnommen aus S. Schwarz<sup>124</sup>).



### 7.3.3 $^2\text{H}$ -NMR Einfluss auf Kopfgruppen via Voltmeter-Experiment

Um den Einfluss von Lokalanästhetika auf die Membranoberfläche zu untersuchen, wurde die Deuterium-NMR-Spektroskopie unter Einsatz von DMPCd<sub>4</sub> verwendet. Bei diesem Lipid sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kohlenstoffatome der Cholingruppe gezielt deuteriert, was eine ortsselektive Beobachtung von Konformations- und Orientierungsänderungen in der Kopfgruppenregion der Lipide ermöglicht. Die gemessene Aufspaltung resultiert aus der quadrupolaren Kopplung der Deuteronen und ist sensitiv gegenüber Veränderungen im elektrischen Umfeld und der Molekülorientierung, relativ zum äußeren Magnetfeld. Verändert sich die Ladungsverteilung an der Membranoberfläche, so führt dies zu charakteristischen Verschiebungen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Deuteriumsignale (Abbildung 52).<sup>125,126</sup>



**Abbildung 52:  $\alpha$ - und  $\beta$ -Aufspaltung in  $^2\text{H}$ -NMR-Experimenten**

**A** Deuterium-NMR-Spektrum einer orientierten Probe. Zu sehen sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Signale der entsprechenden Deuteronen. Je nachdem wie diese beeinflusst werden, verschiebt sich die Aufspaltung. **B** Einfluss positiver bzw. negativer Ladung im Bereich der Cholinkopfgruppe von DMPC. Durch die Konformationsänderung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kohlenstoffatome verändert sich die chemische Umgebung der Deuteronen, wodurch für positive Ladungen das  $\alpha$ -Splitting reduziert und eine Zunahme der  $\beta$ -Aufspaltung bewirkt wird. Dies ist für negative Ladungen entgegengesetzt (Abbildung erstellt in Anlehnung an Schwarz<sup>124</sup>).

Zur Vorbereitung der orientierten Proben wurden 6 Glasplättchen mit Methanol gereinigt. Auf 5 dieser Plättchen wurde Lipidlösung bzw. Lipid-Lokalanästhetika-Lösung in Methanol aufgetragen. Die Konzentration der Stammlösung DMPC betrug 40 mg/ml und für DMPCd<sub>4</sub> 20 mg/ml. Für die Lokalanästhetika wurden 100 mM

Stammlösungen hergestellt. Für die einzelnen Proben wurden 143  $\mu\text{l}$  DMPC-Stammlösung sowie 15  $\mu\text{l}$  DMPCd<sub>4</sub>-Stammlösung vereint und anschließend je das entsprechende Volumen Lokalanästhetikum zugegeben, um Lokalanästhetika-Lipid-Verhältnisse zwischen 1:0,5 und 1:40 zu erhalten. Die Proben wurden auf 250  $\mu\text{l}$  mit Methanol aufgefüllt und gleichmäßig auf 5 Glasplättchen verteilt. Die Trocknung erfolgte unter dem Abzug und die Proben wurden über Nacht in einem Exsikkator unter Vakuum gelagert, um verbleibende Lösungsmittelreste zu entfernen. Zur Hydratisierung wurden die Glasplättchen aufeinander gestapelt, wobei ein 6. Plättchen zum Abdecken hinzugefügt wurde, und anschließend bei 48°C und circa 100% Luftfeuchtigkeit über Nacht gelagert. Im Anschluss wurden die Plättchen mit Parafilm versiegelt. Für das <sup>2</sup>H-NMR-Experiment wurde eine Solid-Echo-Sequenz verwendet, die aus zwei 90°-Pulsen bei jeweils 195 W und einer Dauer von 6  $\mu\text{s}$  bestand. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde durch die Scananzahl von 7168 Scans verbessert und die Auswertung erfolgte mittels TopSpin (Version 4.0.6, Bruker BioSpin). Die Interpretation der Deuteriumaufspaltung erfolgte in Anlehnung an frühere Studien, die zeigten, dass positiv geladene Amphiphile typischerweise eine Verringerung des  $\alpha$ -Splittings und eine Zunahme des  $\beta$ -Splittings bewirken, während negativ geladene Moleküle den entgegengesetzten Effekt hervorrufen. Dies lässt Rückschlüsse auf die Orientierung der Cholingruppe und die Position der geladenen Gruppen an der Membranoberfläche zu.<sup>125,126</sup>

### 7.3.4 <sup>2</sup>H-NMR Mobilität der Lipidketten

Der Einfluss der untersuchten Amphiphile auf die Mobilität der Lipidketten wurde über ein Ordnungsparameterprofil bestimmt, das aus den <sup>2</sup>H-NMR-Spektren deuterierter Vesikelpollen erstellt wurde. Der errechnete Ordnungsparameter ( $S_{\text{CD}}$ ) wird dabei gegen die Kettenposition der Kohlenstoffatome ( $C_n$ ) aufgetragen (Abbildung 53C). Durch den Einsatz von Lipidvesikeln wurden bei den <sup>2</sup>H-NMR-Messungen Pake-Dubletts aufgezeichnet (Abbildung 53A), die als zwei sich überlappende Pulverspektren erschienen. Die orientierten Spektren konnten anschließend mittels des mathematischen Verfahrens de-Pake-ing rekonstruiert werden (Abbildung 53B).<sup>169</sup> Die Ordnungsparameter wurden berechnet, indem die Aufspaltung der Energieniveaus durch die Aufspaltung der Energieniveaus ohne Bewegung von 250 kHz dividiert wurde. Ein hoher  $S_{\text{CD}}$ -Wert ist ein Indikator für eine ausgeprägte Ordnung innerhalb der Lipidketten, was auf eine eingeschränkte Flexibilität sowie eine bevorzugt

## Methoden

senkrechte Orientierung zur Lipidmembranebene hinweist. Im Gegensatz dazu deutet ein niedriger  $S_{CD}$ -Wert auf eine erhöhte Beweglichkeit der Acylketten und eine weniger ausgeprägte Orientierung hin.<sup>124,127,170</sup> Die Dicke der Kettenregion der Membrandoppelschicht  $2D_C$  und die Fläche pro Lipid  $A$  wurden aus den Ordnungsparametern nach Formel (2) und (3) abgeleitet, wobei  $N$  die Anzahl der Kohlenstoffatome in einer Kette,  $\langle S_{CD} \rangle$  der durchschnittliche Ordnungsparameter und  $S_P$  der durchschnittliche Ordnungsparameter der Plateau-Region ( $C_2 - C_6$ ) ist.<sup>140</sup>

$$2D_C = 2[1,27\text{\AA}(N - 3)(0,5 + \langle S_{CD} \rangle)] + 3,75\text{\AA} \quad (2)$$

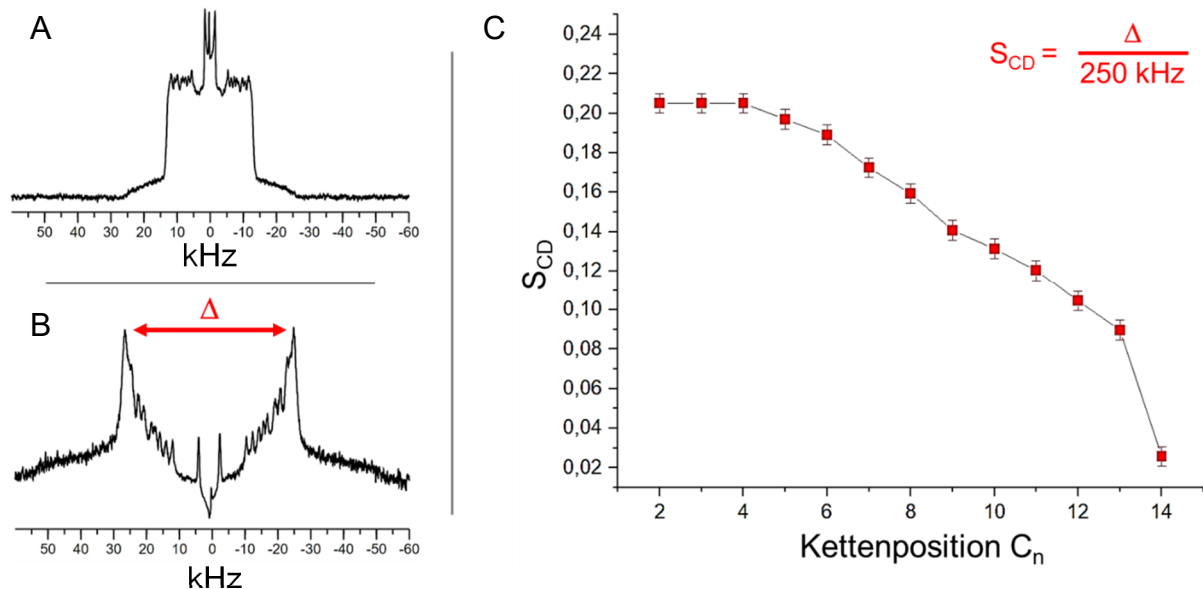
$$A = 2 \left[ 27,6\text{\AA}^2 / \left( 1,27(0,5 + S_P) \right) \right] \quad (3)$$

Für die  $^2\text{H}$ -NMR-Experimente wurden die Proben auf zwei unterschiedliche Weisen hergestellt. Vesikelpuben bestanden aus 4 mg DMPC, 1 mg DMPCd<sub>54</sub> und 5 mg DMPG, wobei letzteres analog zu Myristinsäure (siehe Kapitel 7.3.2) zugesetzt wurde, um die positiv geladenen, amphiphilen Moleküle an der Membran zu halten. Das zu untersuchende Amphiphil wurde im Verhältnis 1:5 zugegeben. Nachdem die Probe in Methanol/Chloroform gelöst und das Lösungsmittel mithilfe von Argon entfernt wurde, wurde das verbleibende Lösungsmittel durch Trocknung in einem Exsikkator unter Vakuum über Nacht entfernt. Anschließend wurde ddH<sub>2</sub>O im Gewichtsverhältnis 1:1 zugegeben und die Proben jeweils fünfmal eingefroren bzw. aufgetaut. Nach Überführung in NMR-Probengefäße für die Festkörper-NMR wurden diese auf Eis temperiert in ein Bruker Avance III HD 500 MHz Widebore-Spektrometer eingebracht. Die Aufnahme der  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren erfolgte unter Verwendung des Pulsprogramms Solid Echo, das zwei 90°-Pulse beinhaltet. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 308 K von Schwarz<sup>124</sup> durchgeführt. Dabei kamen eine Pulslänge von 4  $\mu\text{s}$ , eine Aufnahmezeit von 32,8 ms sowie eine Wiederholzeit von 0,25 s zum Einsatz. Pro Messung wurden 10000 Scans ausgeführt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und die Datensätze anschließend in TopSpin (Version 4.3.0, Bruker BioSpin) addiert, wobei ein Line Broadening von 75 Hz angewandt wurde.

Die orientierten Proben wurden aus multilamellaren DMPC-Vesikeln ohne DMPG hergestellt, um den Einfluss von Lokalanästhetika auf die Lipidbeweglichkeit bei verschiedenen Lokalanästhetika-Lipid-Verhältnissen zu untersuchen. Hierfür wurden

## Methoden

4,5 mg DMPC, 0,5 mg DMPCd<sub>54</sub> sowie die für das gewünschte Verhältnis (1:0,5 bis 1:40) erforderliche Menge Lokalanästhetikum gemeinsam in Methanol gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter Stickstoff und Vakuum wurde die Lipidmischung mit 250 µl 2mM HEPES-Puffer (pH 7,2) hydratisiert, resuspendiert und fünf Mal eingefroren und aufgetaut. Anschließend wurden die Proben gleichmäßig auf fünf Glasplättchen aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden die Plättchen gestapelt, mit einem weiteren Glasplättchen abgedeckt und über Nacht bei 48°C und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluss wurden die hydratisierten Proben mit Parafilm versiegelt, bevor die <sup>2</sup>H-NMR-Messungen durchgeführt wurden. Die Festkörper-NMR-Messungen wurden an einem Bruker Avance III HD 500 MHz Widebore-Spektrometer, wobei die <sup>2</sup>H-NMR-Spektren unter Verwendung einer Solid-Echo-Pulssequenz aufgenommen wurden (zwei 90°-Pulse von jeweils 6 µs bei etwa 8000 Scans).



**Abbildung 53: Pake-Dublett, numerische Rekonstruktion und Ordnungsparameterprofil**

**A** <sup>2</sup>H-NMR-Pake-Dublett einer deuterierten Lipidvesikelprobe. Dieses kommt durch die Überlappung zweier Pulverspektren zustande. **B** Rekonstruiertes orientiertes Spektrum. Jedes Dublett entspricht einem Kohlenstoffatom in der Kohlenstoffkette der Lipidmoleküle. **C** Berechnete  $S_{CD}$  können zu einem Ordnungsparameterprofil zusammengefasst werden, bei dem die einzelnen  $S_{CD}$  gegen die Kettenposition  $C_n$  aufgetragen werden. (Abbildung verändert entnommen aus S. Schwarz<sup>124</sup>)

## 7.4 Andere analytische Methoden

Zur Visualisierung der Proteinstrukturen wurde UCSF ChimeraX (Version 1.10) verwendet, ein Programm zur molekularen Visualisierung und Analyse (*Pettersen et al., 2021*).<sup>171</sup> Die zugrunde liegenden Strukturdaten stammen aus der RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). In den Abbildungen wird jeweils nur die zugehörige PDB-ID angegeben und der entsprechende Artikel zitiert.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Goldberg, D. S. & McGee, S. J. Pain as a global public health priority. *BMC Public Health* **11**, 770 (2011).
2. De Ridder, D., Adhia, D. & Vanneste, S. The anatomy of pain and suffering in the brain and its clinical implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **130**, 125–146 (2021).
3. Lurie, J. M. & Javaid, A. Visualizing Global Chronic Pain. *Anesth. Analg.* **138**, 918 (2024).
4. Grzybowski, A. Cocaine and the Eye: A Historical Overview. *Ophthalmologica* **222**, 296–301 (2008).
5. Goldstein, R. A., DesLauriers, C. & Burda, A. M. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity—A Review. *Dis. Mon.* **55**, 6–38 (2009).
6. World Health Organization. *Web Annex A. Model List of Essential Medicines – 23rd List, 2023*. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2023.02> (2023).
7. Fleckenstein, A. [Mechanism of local anesthesia]. *Klin. Wochenschr.* **28**, 452–453 (1950).
8. Butterworth, J. F. & Strichartz, G. R. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology* **72**, 711–734 (1990).
9. Catterall, W. A. Forty Years of Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Epilepsy. *Neurochem. Res.* **42**, 2495–2504 (2017).
10. Tsuchiya, H. & Mizogami, M. Interaction of Local Anesthetics with Biomembranes Consisting of Phospholipids and Cholesterol: Mechanistic and Clinical Implications for Anesthetic and Cardiotoxic Effects. *Anesthesiol. Res. Pract.* **2013**, 297141 (2013).

11. Lirk, P., Picardi, S. & Hollmann, M. W. Local anaesthetics: 10 essentials. *Eur. J. Anaesthesiol. EJA* **31**, 575 (2014).
12. Lo, B. *et al.* Local Anesthetic Actions on Thromboxane-Induced Platelet Aggregation. *Anesth. Analg.* **93**, 1240 (2001).
13. Hollmann, M. W., Durieux, M. E. & Graf, B. M. Novel local anaesthetics and novel indications for local anaesthetics. *Curr. Opin. Anesthesiol.* **14**, 741 (2001).
14. Cassuto, J., Sinclair, R. & Bonderovic, M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **50**, 265–282 (2006).
15. Yu, S., Wang, B., Zhang, J. & Fang, K. The development of local anesthetics and their applications beyond anesthesia. *Int J Clin Exp Med* **12**, 13203–13220 (2019).
16. Garmon, E. H., Hendrix, J. M. & Huecker, M. R. Topical, Local, and Regional Anesthesia and Anesthetics. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).
17. Enthoven, W. T. M., Roelofs, P. D. D. M., Deyo, R. A., van Tulder, M. W. & Koes, B. W. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for chronic low back pain. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2**, CD012087 (2016).
18. Stein, C. [Pain inhibition by opioids-new concepts]. *Schmerz Berl. Ger.* **33**, 295–302 (2019).
19. Sunara, P., Krnic, D. & Puljak, L. Adverse drug reactions of non-opioid and opioid analgesics reported to Croatian national authority from 2007 to 2014. *Acta Medica Acad.* **46**, 94–104 (2017).
20. Huerta, C., Castellsague, J., Varas-Lorenzo, C. & García Rodríguez, L. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of ARF in the general population. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **45**, 531–539 (2005).

21. Rooyen, H. V. Local anaesthetic agent toxicity. *South. Afr. J. Anaesth. Analg.* **16**, 83–88 (2010).
22. Fábíán, B., Segá, M., Voloshin, V. P., Medvedev, N. N. & Jedlovsky, P. Lateral Pressure Profile and Free Volume Properties in Phospholipid Membranes Containing Anesthetics. *J. Phys. Chem. B* **121**, 2814–2824 (2017).
23. Cantor, R. S. Breaking the Meyer-Overton Rule: Predicted Effects of Varying Stiffness and Interfacial Activity on the Intrinsic Potency of Anesthetics. *Biophys. J.* **80**, 2284–2297 (2001).
24. Grage, S. L., Culetto, A., Ulrich, A. S. & Weinschenk, S. Membrane-Mediated Activity of Local Anesthetics. *Mol. Pharmacol.* **100**, 502–512 (2021).
25. Becker, D. E. & Reed, K. L. Local Anesthetics: Review of Pharmacological Considerations. *Anesth. Prog.* **59**, 90–102 (2012).
26. Rodrigues da Silva, G. H. *et al.* Schwann cells exposed to articaine display distinct toxic pathways compared to lidocaine. *Chem. Biol. Interact.* **406**, 111315 (2025).
27. Bockholt, R. & Mirus, M. [Principles of the pharmacology of local anesthetics]. *Anaesthesiol.* **73**, 204–220 (2024).
28. Larsen, R. Lokalanästhetika. *Anästh. Intensivmed. Für Fachpflege* 186–196 (2016) doi:10.1007/978-3-662-50444-4\_12.
29. Neal, J. M., Neal, E. J. & Weinberg, G. L. American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine Local Anesthetic Systemic Toxicity checklist: 2020 version. *Reg. Anesth. Pain Med.* **46**, 81–82 (2021).
30. Macfarlane, A. J. R., Gitman, M., Bornstein, K. J., El-Boghdadly, K. & Weinberg, G. Updates in our understanding of local anaesthetic systemic toxicity: a narrative review. *Anaesthesia* **76 Suppl 1**, 27–39 (2021).

31. Binshtok, A. M., Bean, B. P. & Woolf, C. J. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* **449**, 607–610 (2007).
32. Singh, R., Patel, P. & Al Khalili, Y. Benzocaine. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).
33. Chen, J.-L., Liu, S.-T., Wu, C.-C., Chen, Y.-C. & Huang, S.-M. The Potency of Cytotoxic Mechanisms of Local Anesthetics in Human Chondrocyte Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 13474 (2024).
34. Tsuchiya, H., Ueno, T., Mizogami, M. & Takakura, K. Local anesthetics structure-dependently interact with anionic phospholipid membranes to modify the fluidity. *Chem. Biol. Interact.* **183**, 19–24 (2010).
35. Tsuchiya, H., Ueno, T., Mizogami, M. & Takakura, K. Do local anesthetics interact preferentially with membrane lipid rafts? Comparative interactivities with raft-like membranes. *J. Anesth.* **24**, 639–642 (2010).
36. Kinoshita, M., Chitose, T. & Matsumori, N. Mechanism of local anesthetic-induced disruption of raft-like ordered membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1863**, 1381–1389 (2019).
37. Heimburg, T. & Jackson, A. D. On soliton propagation in biomembranes and nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 9790–9795 (2005).
38. Weizenmann, N., Huster, D. & Scheidt, H. A. Interaction of local anesthetics with lipid bilayers investigated by <sup>1</sup>H MAS NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818**, 3010–3018 (2012).
39. Marsh, D. Lateral Pressure Profile, Spontaneous Curvature Frustration, and the Incorporation and Conformation of Proteins in Membranes. *Biophys. J.* **93**, 3884–3899 (2007).



40. Schutz, A. *et al.* Local anaesthetic properties of ambroxol hydrochloride lozenges in view of sore throat. Clinical proof of concept. *Arzneimittelforschung*. **52**, 194–199 (2002).
41. Pobudkowska, A., Śliwińska, A. & Nosol, K. Physicochemical Properties and Solubility of Hydrochloride Mucolytic Agents. *J. Solut. Chem.* **50**, 652–666 (2021).
42. Leffler, A., Reckzeh, J. & Nau, C. Block of sensory neuronal Na<sup>+</sup> channels by the secreolytic ambroxol is associated with an interaction with local anesthetic binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* **630**, 19–28 (2010).
43. Malerba, M. & and Ragnoli, B. Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 1119–1129 (2008).
44. Weiser, T. Ambroxol: A CNS Drug? *CNS Neurosci. Ther.* **14**, 17–24 (2008).
45. Drukarch, B., Jacobs, G. E. & Wilhelmus, M. M. M. Solving the crisis in psychopharmacological research: Cellular-membrane(s) pharmacology to the rescue? *Biomed. Pharmacother.* **130**, 110545 (2020).
46. Vetulani, J. & Nalepa, I. Antidepressants: past, present and future. *Eur. J. Pharmacol.* **405**, 351–363 (2000).
47. Bonilla-Jaime, H. *et al.* Depression and Pain: Use of Antidepressants. *Curr. Neuropharmacol.* **20**, 384–402 (2022).
48. Moraczewski, J., Awosika, A. O. & Aedma, K. K. Tricyclic Antidepressants. in *StatPearls [Internet]* (StatPearls Publishing, 2023).
49. Jimenez, X. F. Beyond depression: Other uses for tricyclic antidepressants. *Cleve. Clin. J. Med.* **86**, 807 (2019).
50. Edinoff, A. N. *et al.* Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Adverse Effects: A Narrative Review. *Neurol. Int.* **13**, 387–401 (2021).
51. Sansone, R. A. & Sansone, L. A. Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitors: A Pharmacological Comparison. *Innov. Clin. Neurosci.* **11**, 37–42 (2014).

52. Dharmshaktu, P., Tayal, V. & Kalra, B. S. Efficacy of Antidepressants as Analgesics: A Review. *J. Clin. Pharmacol.* **52**, 6–17 (2012).
53. Caccia, S. Metabolism of the Newer Antidepressants. *Clin. Pharmacokinet.* **34**, 281–302 (1998).
54. Rudorfer, M. V. & Potter, W. Z. Metabolism of Tricyclic Antidepressants. *Cell. Mol. Neurobiol.* **19**, 373–409 (1999).
55. Sawynok, J., Esser, M. J. & Reid, A. R. Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. *J. Psychiatry Neurosci.* **JPN 26**, 21–29 (2001).
56. Ogata, N., Yoshii, M. & Narahashi, T. Psychotropic drugs block voltage-gated ion channels in neuroblastoma cells. *Brain Res.* **476**, 140–144 (1989).
57. Sudoh, Y., Cahoon, E. E., Gerner, P. & Wang, G. K. Tricyclic antidepressants as long-acting local anesthetics. *Pain* **103**, 49–55 (2003).
58. Gray, A. M., Spencer, P. S. & Sewell, R. D. The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. *Br. J. Pharmacol.* **124**, 669–674 (1998).
59. Stein, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1685–1690 (1995).
60. Antkiewicz-Michaluk, L., Romańska, I., Michaluk, J. & Vetulani, J. Role of calcium channels in effects of antidepressant drugs on responsiveness to pain. *Psychopharmacology (Berl.)* **105**, 269–274 (1991).
61. McCarson, K. E., Duric, V., Reisman, S. A., Winter, M. & Enna, S. J. GABA(B) receptor function and subunit expression in the rat spinal cord as indicators of stress and the antinociceptive response to antidepressants. *Brain Res.* **1068**, 109–117 (2006).

62. Sawynok, J., Reid, A. R., Liu, X. J. & Parkinson, F. E. Amitriptyline enhances extracellular tissue levels of adenosine in the rat hindpaw and inhibits adenosine uptake. *Eur. J. Pharmacol.* **518**, 116–122 (2005).
63. Gaulton, A. *et al.* The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **45**, D945–D954 (2017).
64. Hille, B. Ionic channels: molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lect.* **82**, 47–69 (1986).
65. Alexander, S. P. H. *et al.* The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2023/24: Ion channels. *Br. J. Pharmacol.* **180**, S145–S222 (2023).
66. Jentsch, T. J., Hübner, C. A. & Fuhrmann, J. C. Ion channels: Function unravelled by dysfunction. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1039–1047 (2004).
67. Patino, G. A. & Isom, L. L. Electrophysiology and Beyond: Multiple roles of Na<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunits in development and disease. *Neurosci. Lett.* **486**, 53–59 (2010).
68. Körner, J. *et al.* Sodium Channels and Local Anesthetics—Old Friends With New Perspectives. *Front. Pharmacol.* **13**, (2022).
69. King, G. F., Escoubas, P. & Nicholson, G. M. Peptide toxins that selectively target insect Na(V) and Ca(V) channels. *Channels Austin Tex* **2**, 100–116 (2008).
70. Hirschberg, B., Rovner, A., Lieberman, M. & Patlak, J. Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.* **106**, 1053–1068 (1995).
71. Hernandez, C. M. & Richards, J. R. Physiology, Sodium Channels. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).
72. Favre, I., Moczydlowski, E. & Schild, L. On the structural basis for ionic selectivity among Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> in the voltage-gated sodium channel. *Biophys. J.* **71**, 3110–3125 (1996).

73. Kontis, K. J. & Goldin, A. L. Sodium Channel Inactivation Is Altered by Substitution of Voltage Sensor Positive Charges. *J. Gen. Physiol.* **110**, 403–413 (1997).
74. Bagal, S. K., Marron, Brian E, Owen, Robert M, Storer, R Ian & Swain, N. A. Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. *Channels* **9**, 360–366 (2015).
75. Noland, C. L. *et al.* Structure-guided unlocking of NaX reveals a non-selective tetrodotoxin-sensitive cation channel. *Nat. Commun.* **13**, 1416 (2022).
76. Nau, C. & Wang, G. K. Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *J. Membr. Biol.* **201**, 1–8 (2004).
77. Muroi, Y. & Chanda, B. Local anesthetics disrupt energetic coupling between the voltage-sensing segments of a sodium channel. *J. Gen. Physiol.* **133**, 1–15 (2009).
78. McNulty, M. M. *et al.* Charge at the lidocaine binding site residue Phe-1759 affects permeation in human cardiac voltage-gated sodium channels. *J. Physiol.* **581**, 741–755 (2007).
79. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug- receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* **69**, 497–515 (1977).
80. Sherwood, T. W., Frey, E. N. & Askwith, C. C. Structure and activity of the acid-sensing ion channels. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **303**, C699–C710 (2012).
81. Deval, E. *et al.* Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol. Ther.* **128**, 549–558 (2010).
82. Kweon, H.-J. & Suh, B.-C. Acid-sensing ion channels (ASICs): therapeutic targets for neurological diseases and their regulation. *BMB Rep.* **46**, 295–304 (2013).

83. Cristofori-Armstrong, B. & Rash, L. D. Acid-sensing ion channel (ASIC) structure and function: Insights from spider, snake and sea anemone venoms. *Neuropharmacology* **127**, 173–184 (2017).
84. Sun, D. *et al.* Structural insights into human acid-sensing ion channel 1a inhibition by snake toxin mambalgin1. *eLife* **9**, e57096 (2020).
85. Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C. & Lazdunski, M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* **386**, 173–177 (1997).
86. Vullo, S. & Kellenberger, S. A molecular view of the function and pharmacology of acid-sensing ion channels. *Pharmacol. Res.* **154**, 104166 (2020).
87. Kellenberger, S. & Schild, L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol. Rev.* **82**, 735–767 (2002).
88. Wemmie, J. A., Taugher, R. J. & Kreple, C. J. Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 461–471 (2013).
89. Boiko, N., Kucher, V., Wang, B. & Stockand, J. D. Restrictive Expression of Acid-Sensing Ion Channel 5 (Asic5) in Unipolar Brush Cells of the Vestibulocerebellum. *PLoS ONE* **9**, e91326 (2014).
90. Dulai, J. S., Smith, Ewan St. John & Rahman, T. Acid-sensing ion channel 3: An analgesic target. *Channels* **15**, 94–127 (2021).
91. Booth, I. R. & Blount, P. The MscS and MscL Families of Mechanosensitive Channels Act as Microbial Emergency Release Valves. *J. Bacteriol.* **194**, 4802–4809 (2012).
92. Cox, C. D., Bavi, N. & Martinac, B. Bacterial Mechanosensors. *Annu. Rev. Physiol.* **80**, 71–93 (2018).
93. Edwards, M. D. *et al.* Characterization of three novel mechanosensitive channel activities in Escherichia coli. *Channels Austin Tex* **6**, 272–281 (2012).

94. Wang, W. *et al.* The structure of an open form of an E. coli mechanosensitive channel at 3.45 Å resolution. *Science* **321**, 1179–1183 (2008).
95. Kung, C., Martinac, B. & Sukharev, S. Mechanosensitive Channels in Microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 313–329 (2010).
96. Rasmussen, T., Flegler, V. J., Rasmussen, A. & Böttcher, B. Structure of the Mechanosensitive Channel MscS Embedded in the Membrane Bilayer. *J. Mol. Biol.* **431**, 3081–3090 (2019).
97. Vásquez, V., Sotomayor, M., Cordero-Morales, J., Schulten, K. & Perozo, E. A Structural Mechanism for MscS Gating in Lipid Bilayers. *Science* **321**, 1210–1214 (2008).
98. Steinbacher, S., Bass, R., Strop, P. & Rees, D. C. Structures of the Prokaryotic Mechanosensitive Channels MscL and MscS. in *Current Topics in Membranes* vol. 58 1–24 (Academic Press, 2007).
99. Nguyen, T., Clare, B., Guo, W. & Martinac, B. The effects of parabens on the mechanosensitive channels of E. coli. *Eur. Biophys. J. EBJ* **34**, 389–395 (2005).
100. Kamaraju, K. & Sukharev, S. The membrane lateral pressure-perturbing capacity of parabens and their effects on the mechanosensitive channel directly correlate with hydrophobicity. *Biochemistry* **47**, 10540–10550 (2008).
101. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
102. Cantor, R. S. Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers. *Biophys. J.* **76**, 2625–2639 (1999).
103. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science* **327**, 46–50 (2010).
104. Phillips, R., Ursell, T., Wiggins, P. & Sens, P. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* **459**, 379–385 (2009).

105. Ripa, I., Andreu, S., López-Guerrero, J. A. & Bello-Morales, R. Membrane Rafts: Portals for Viral Entry. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
106. Andra, V. V. S. N. L., Pammi, S. V. N., Bhatraju, L. V. K. P. & Ruddaraju, L. K. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. *Bionanoscience* **12**, 274–291 (2022).
107. Liu, P., Chen, G. & Zhang, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* **27**, 1372 (2022).
108. Has, C. & Sunthar, P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *J. Liposome Res.* **30**, 336–365 (2020).
109. Swaay, D. van & deMello, A. Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab. Chip* **13**, 752–767 (2013).
110. Salvador-Castell, M. *et al.* Characterisation of a synthetic Archeal membrane reveals a possible new adaptation route to extreme conditions. *Commun. Biol.* **4**, 653 (2021).
111. Ilias, N., Richmond, R., Selvarajah, gayathri thevi, Azmi, I. & Ajat, M. Structural complexity and physical mechanism of self-assembled lipid as nanocarriers: A review. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* **31**, 26–35 (2023).
112. Subczynski, W. K., Pasenkiewicz-Gierula, M., Widomska, J., Mainali, L. & Raguz, M. High cholesterol/low cholesterol: Effects in biological membranes Review. *Cell Biochem. Biophys.* **75**, 369–385 (2017).
113. Flegler, V. J., Rasmussen, T. & Böttcher, B. How Functional Lipids Affect the Structure and Gating of Mechanosensitive MscS-like Channels. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15071 (2022).
114. Beverley, K. M. & Levitan, I. Cholesterol regulation of mechanosensitive ion channels. *Front. Cell Dev. Biol.* **12**, 1352259 (2024).

115. Knox, C. *et al.* DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024. *Nucleic Acids Res.* **52**, D1265–D1275 (2024).
116. Strichartz, G. R., Sanchez, V., Arthur, G. R., Chafetz, R. & Martin, D. Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:buffer partition coefficients and pKa values of clinically used drugs. *Anesth. Analg.* **71**, 158–170 (1990).
117. Benet, L. Z., Broccatelli, F. & Oprea, T. I. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. *AAPS J.* **13**, 519–547 (2011).
118. ChemAxon Ltd. Marvin 22.17.0, Calculator Plugins. (2022).
119. Tsuchiya, H. & Mizogami, M. Interaction of Local Anesthetics with Biomembranes Consisting of Phospholipids and Cholesterol: Mechanistic and Clinical Implications for Anesthetic and Cardiotoxic Effects. *Anesthesiol. Res. Pract.* **2013**, 297141 (2013).
120. Kushnareva, Y. & Dell, E. J. *Membrane Fluidity Measurement Using UV Fluorescence Polarization*. <https://www.bmglabtech.com/en/application-notes/membrane-fluidity-measurement-using-uv-fluorescence-polarization/> (2009).
121. Fluksman, A. & Benny, O. A robust method for critical micelle concentration determination using coumarin-6 as a fluorescent probe. *Anal. Methods* **11**, 3810–3818 (2019).
122. Filippov, A. V., Khakimov, A. M. & Munavirov, B. V. <sup>31</sup>P NMR Studies of Phospholipids. in *Annual Reports on NMR Spectroscopy* (ed. Webb, G. A.) vol. 85 27–92 (Academic Press, 2015).
123. Spiess, H. W. Multidimensional solid state NMR: A unique tool for the characterisation of complex materials. *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.* **101**, 153–168 (1997).



124. Schwarz, S. M. Untersuchung des Einflusses von Lokalanästhetika und Psychopharmaka auf Lipidmembranen mittels Festkörper-NMR. (Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie (IOC), 2024). (Unveröffentlicht).
125. Scherer, P. G. & Seelig, J. Electric charge effects on phospholipid headgroups. Phosphatidylcholine in mixtures with cationic and anionic amphiphiles. *Biochemistry* **28**, 7720–7728 (1989).
126. Seelig, J., MacDonald, P. M. & Scherer, P. G. Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes. *Biochemistry* **26**, 7535–7541 (1987).
127. Huster, D. Solid-state NMR spectroscopy to study protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 1146–1160 (2014).
128. Lu, F., Sun, J., Sun, T., Cheng, H. & Yang, S. Fluorescence-based measurements of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in cancer cells using Fluo-4 and confocal live cell imaging. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1843**, 63–68 (2018).
129. Guha, S., Ghimire, J., Wu, E. & Wimley, W. C. The Mechanistic Landscape of Membrane Permeabilizing Peptides. *Chem. Rev.* **119**, 6040–6085 (2019).
130. Posson, D. J., Rusinova, R., Andersen, O. S. & Nimigean, C. M. Stopped-flow fluorometric ion flux assay for ligand-gated ion channel studies. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1684**, 223–235 (2018).
131. Romeo, M., Mazzotta, E., Perrotta, I. D. & Muzzalupo, R. Lidosomes: Innovative Vesicular Systems Prepared from Lidocaine Surfadrug. *Pharmaceutics* **14**, 2190 (2022).
132. Fernández, M. S. & Calderón, E. Formation of micelles and membrane action of the local anesthetic tetracaine hydrochloride. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **597**, 83–91 (1980).

133. Weaver, K. D., Van Vorst, M. P., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D. R. & Elliott, G. D. Interaction of organic salts with artificial biological membranes: A model for elucidating cellular interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 1856–1862 (2013).
134. N. Ngo, D. T., Q. Nguyen, T., K. Huynh, H. & T. Nguyen, T. Thermodynamics of selective serotonin reuptake inhibitors partitioning into 1,2-dioleoyl- sn-glycero -3-phosphocholine bilayers. *RSC Adv.* **10**, 39338–39347 (2020).
135. Seelig, A., Allegrini, P. R. & Seelig, J. Partitioning of local anesthetics into membranes: surface charge effects monitored by the phospholipid head-group. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **939**, 267–276 (1988).
136. Akutsu, H. & Seelig, J. Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochemistry* **20**, 7366–7373 (1981).
137. Watts, A. & Poile, T. W. Direct determination by <sup>2</sup>H-NMR of the ionization state of phospholipids and of a local anaesthetic at the membrane surface. *Biochim. Biophys. Acta* **861**, 368–372 (1986).
138. Castro, V. *et al.* NMR investigations of interactions between anesthetics and lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 2604–2611 (2008).
139. Kim, C., Spano, J., Park, E.-K. & Wi, S. Evidence of pores and thinned lipid bilayers induced in oriented lipid membranes interacting with the antimicrobial peptides, magainin-2 and aurein-3.3. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 1482–1496 (2009).
140. Grage, S. L., Afonin, S., Kara, S., Buth, G. & Ulrich, A. S. Membrane Thinning and Thickening Induced by Membrane-Active Amphipathic Peptides. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, (2016).
141. Ipsen, J. H., Mouritsen, O. G. & Bloom, M. Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. The effects of cholesterol. *Biophys. J.* **57**, 405–412 (1990).

142. Kuroda, Y., Nasu, H., Fujiwara, Y. & Nakagawa, T. Orientations and Locations of Local Anesthetics Benzocaine and Butamben in Phospholipid Membranes as Studied by  $^2\text{H}$  NMR Spectroscopy. *J. Membr. Biol.* **177**, 117–128 (2000).
143. Lin, J. *et al.* Inhibition of acid sensing ion channel currents by lidocaine in cultured mouse cortical neurons. *Anesth. Analg.* **112**, 977–981 (2011).
144. Leng, T. *et al.* Local Anesthetic Lidocaine Inhibits TRPM7 Current and TRPM7-Mediated Zinc Toxicity. *CNS Neurosci. Ther.* **21**, 32–39 (2014).
145. Tsuji, T., Morita, S., Ikeda, Y. & Terada, T. Enzymatic fluorometric assays for quantifying all major phospholipid classes in cells and intracellular organelles. *Sci. Rep.* **9**, 8607 (2019).
146. Tarasenko, D. & Meinecke, M. Protein-dependent membrane remodeling in mitochondrial morphology and clathrin-mediated endocytosis. *Eur. Biophys. J.* **50**, 295–306 (2021).
147. Martinac, B., Adler, J. & Kung, C. Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *Nature* **348**, 261–263 (1990).
148. Ridone, P. *et al.* “Force-from-lipids” gating of mechanosensitive channels modulated by PUFAs. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **79**, 158–167 (2018).
149. Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D. M. & Martinac, B. Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 696–703 (2002).
150. Moschetta, M. *et al.* Modulation of Mechanosensitive Potassium Channels by a Membrane-targeted Nongenetic Photoswitch. *J. Phys. Chem. B* **127**, 8869–8878 (2023).
151. Lichtenberg, D., Ahyayauch, H. & Goñi, F. M. The Mechanism of Detergent Solubilization of Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **105**, 289–299 (2013).

152. Tazawa, K. & Yamazaki, M. Effect of monolayer spontaneous curvature on constant tension-induced pore formation in lipid bilayers. *J. Chem. Phys.* **158**, 081101 (2023).
153. Stumpf, A. Funktionelle Rekonstitution von bakteriellen Kanälen in Lipid Vesikel. (Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie (IOC), 2024). (Unveröffentlicht).
154. Huang, J., Villemain, J., Padilla, R. & Sousa, R. Mechanisms by which T7 lysozyme specifically regulates T7 RNA polymerase during different phases of transcription 1. *J. Mol. Biol.* **293**, 457–475 (1999).
155. Spehr, V., Frahm, D. & Meyer, T. F. Improvement of the T7 expression system by the use of T7 lysozyme. *Gene* **257**, 259–267 (2000).
156. Schlegel, S. *et al.* Optimizing Membrane Protein Overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3). *J. Mol. Biol.* **423**, 648–659 (2012).
157. Lefrançois, P., Goudeau, B. & Arbault, S. Electroformation of phospholipid giant unilamellar vesicles in physiological phosphate buffer. *Integr. Biol.* **10**, 429–434 (2018).
158. Dolder, N. The Challenges of Measuring Membrane Protein Function in Giant Unilamellar Vesicles. (Philosophisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bern, 2022). (Unveröffentlicht).
159. Shokri, A. & Larsson, G. Characterisation of the *Escherichia coli* membrane structure and function during fedbatch cultivation. *Microb. Cell Factories* **3**, 9 (2004).
160. Mukherjee, N. *et al.* The activation mode of the mechanosensitive ion channel, MscL, by lysophosphatidylcholine differs from tension-induced gating. *FASEB J.* **28**, 4292–4302 (2014).

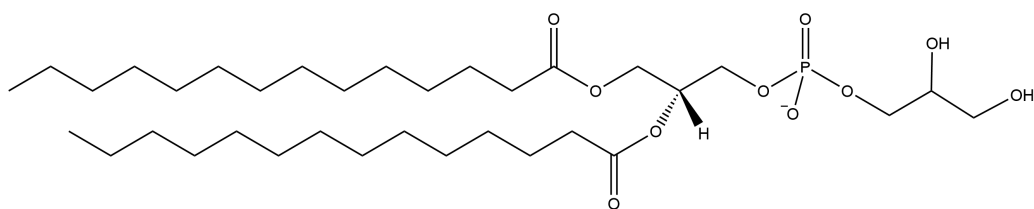
161. Yang, Y. L. & Lai, T. W. Native expression of ASIC1a and ASIC1b human homologues in the HEK 293 cell line allows pharmacological evaluation of analgesics targeting acid sensation in humans. *NeuroReport* **31**, 865 (2020).
162. Zhang, J., Yuan, H., Yao, X. & Chen, S. Endogenous ion channels expressed in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **474**, 665–680 (2022).
163. Gee, K. R. *et al.* Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium* **27**, 97–106 (2000).
164. Distribution. in *Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists* (ed. Kwon, Y.) 73–82 (Springer US, Boston, MA, 2002). doi:10.1007/0-306-46820-4\_5.
165. Piotto, M., Saudek, V. & Sklenář, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665 (1992).
166. Marrink, S.-J. & Mark, A. E. Molecular View of Hexagonal Phase Formation in Phospholipid Membranes. *Biophys. J.* **87**, 3894–3900 (2004).
167. Siegel, D. P., Green, W. J. & Talmon, Y. The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions: a study using temperature-jump cryo-electron microscopy. *Biophys. J.* **66**, 402–414 (1994).
168. Strandberg, E. & Ulrich, A. S. NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. *Concepts Magn. Reson. Part A* **23A**, 89–120 (2004).
169. McCabe, M. A. & Wassail, S. R. Rapid deconvolution of NMR powder spectra by weighted fast Fourier transformation. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **10**, 53–61 (1997).
170. Sternin, E., Bloom, M. & Mackay, A. L. De-pake-ing of NMR spectra. *J. Magn. Reson.* 1969 **55**, 274–282 (1983).

171. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* **30**, 70–82 (2021).

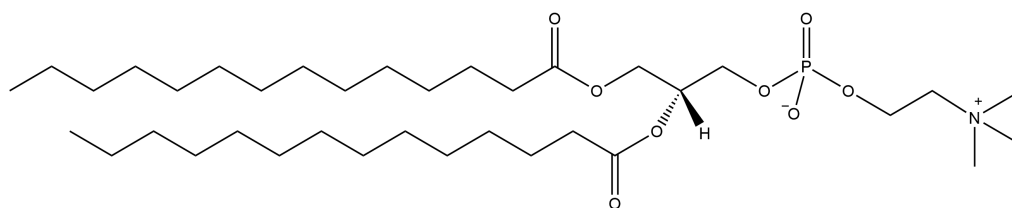
## 9 Anhang

### 9.1 Struktur der eingesetzten Lipide

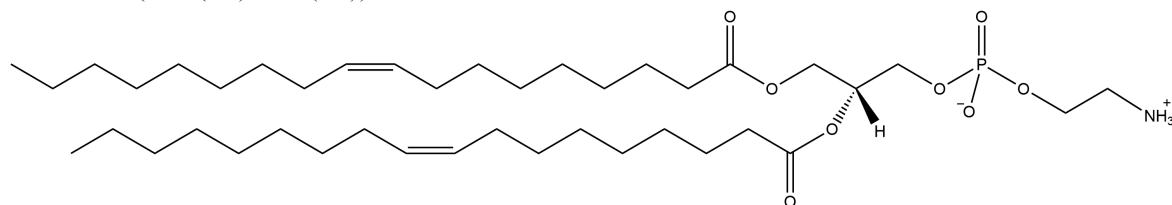
DMPG; PG(14:0/14:0)



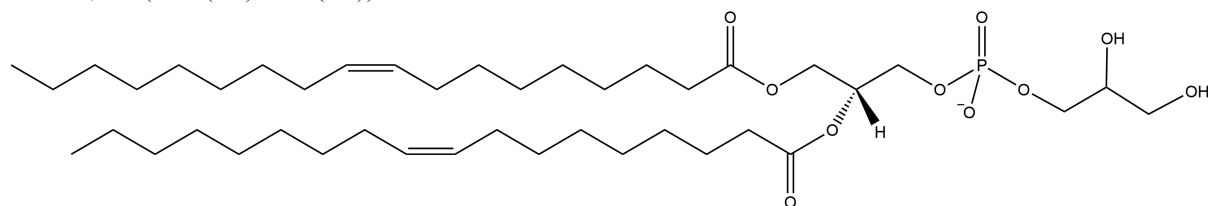
DMPC; PC(14:0/14:0)



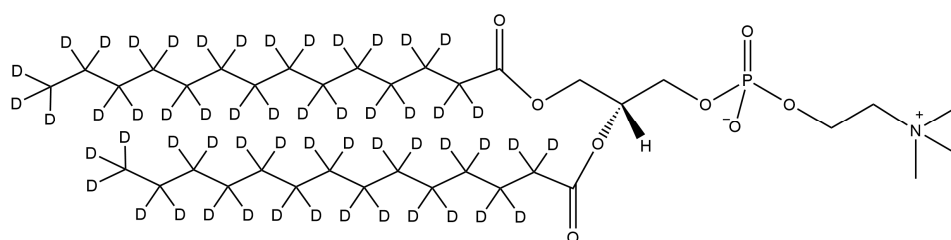
DOPE; PE(18:1(9Z)/18:1(9Z))



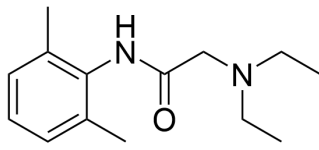
DOPG; PG(18:1(9Z)/18:1(9Z))



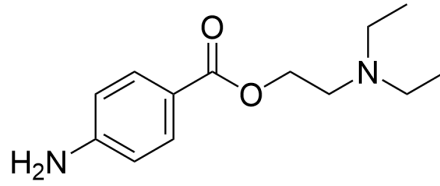
DMPCd54; PC(14:0/14:0)



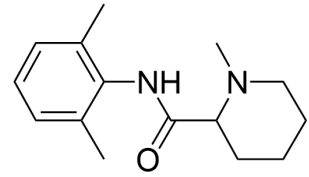
## 9.2 Struktur der untersuchten Lokalanästhetika



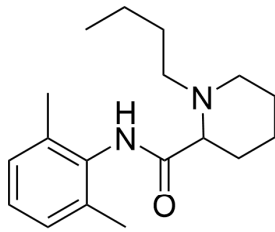
Lidocain



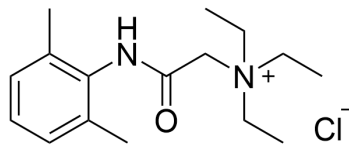
Procain



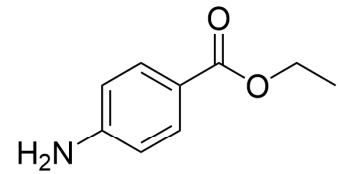
Mepivacain



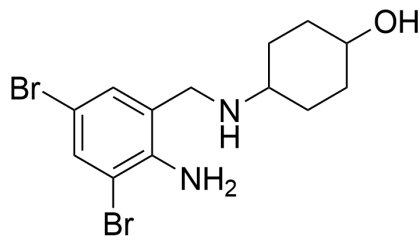
Bupivacain



QX314Cl

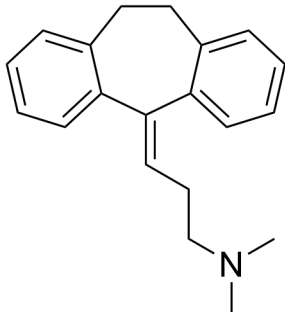


Benzocain

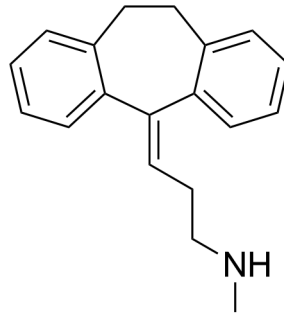


Ambroxol

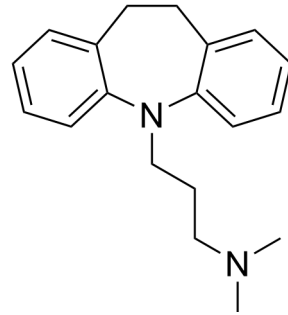
### 9.3 Struktur der untersuchten Antidepressiva



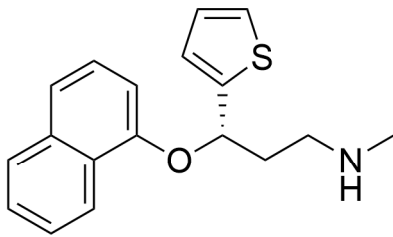
Amitriptylin



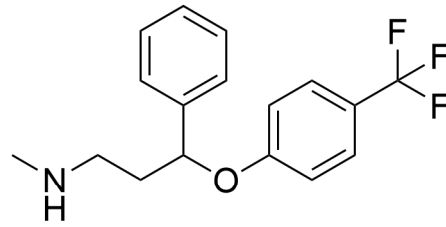
Nortriptylin



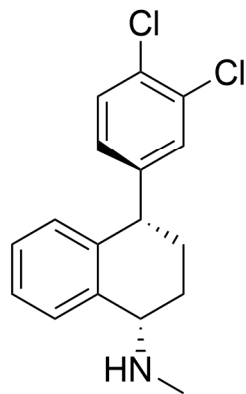
Imipramin



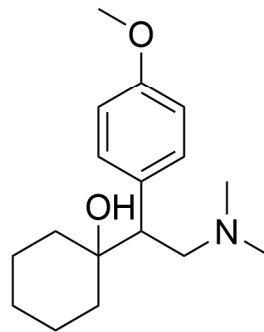
Duloxetine



Fluoxetine



Sertraline



Venlafaxine



## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Amid- und Ester-Lokalanästhetika.....	3
Abbildung 2: Untersuchte Lokalanästhetika in dieser Arbeit.....	5
Abbildung 3: Wirkmechanismen von Lokalanästhetika.....	6
Abbildung 4: Laterales Druckprofil einer Lipidmembran .....	7
Abbildung 5: Struktur des Mukolytikums Ambroxol.....	8
Abbildung 6: Untersuchte Antidepressiva in dieser Arbeit .....	10
Abbildung 7: Aufbau eukaryotischer spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle....	13
Abbildung 8: Zustände von spannungsgesteuerten Natriumionenkanälen.....	14
Abbildung 9: ASIC-Monomer Struktur.....	16
Abbildung 10: Struktur des humanen homotrimeren ASIC1a .....	17
Abbildung 11: ASIC-Kinetik – Zustände der Kanäle .....	17
Abbildung 12: MscS-Homoheptamer.....	19
Abbildung 13: MscL-Homopentamer .....	20
Abbildung 14: Lipidmembran mit Lipid-Raft.....	22
Abbildung 15: Aufbau verschiedener Lipidvesikel .....	23
Abbildung 16: Lipidphasen und Membrankrümmung .....	24
Abbildung 17: Untersuchte Lokalanästhetika und Antidepressiva .....	28
Abbildung 18: Membranverteilung der untersuchten Lokalanästhetika .....	31
Abbildung 19: Membranverteilung der untersuchten Antidepressiva.....	32
Abbildung 20: Coumarin-6 Struktur sowie Absorptions- und Emissionsspektrum ....	34
Abbildung 21: CMC der untersuchten Lokalanästhetika.....	35
Abbildung 22: CMC der untersuchten Antidepressiva .....	37
Abbildung 23: DPH-Struktur sowie Absorptions- und Emissionsspektrum .....	38
Abbildung 24: DPH-Fluoreszenzpolarisation in DMPC-Liposomen mit Lokalanästhetika.....	39
Abbildung 25: DOPE-Phasenübergang und Modifikation durch Lokalanästhetika ...	41
Abbildung 26: DOPE-Phasenübergang unter Einfluss von Lokalanästhetika und Antidepressiva .....	42
Abbildung 27: Einfluss von Lokalanästhetika auf Lipid-Kopfgruppen via $^2\text{H}$ NMR....	44
Abbildung 28: Ordnungsparameter via $^2\text{H}$ -NMR-Spektren der DMPCd <sub>54</sub> /DMPG- Vesikel .....	46
Abbildung 29: Ordnungsparameterprofile der Lokalanästhetika .....	47
Abbildung 30: Ordnungsparameterprofile der Antidepressiva .....	47

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31: Membranparameter für verschiedene Lokalanästhetikum-Lipid-Verhältnisse .....	50
Abbildung 32: Fluoreszenzsignal des ASIC-Calcium-Influx in HEK293-Zellen .....	51
Abbildung 33: Einfluss der Lokalanästhetika auf den Calcium-Influx via ASICs .....	51
Abbildung 34: SDS-PAGE-Gele für MscS und MscL mit variierender Rhamnosekonzentration .....	53
Abbildung 35: Konzentrationsbestimmung von MscS und MscL via Biuret-Assay ...	54
Abbildung 36: GUVs mit rekonstituiertem MscS und Zusatz von Lokalanästhetika ..	55
Abbildung 37: GUVs mit rekonstituiertem MscL und Zusatz von Lokalanästhetika ..	57
Abbildung 38: GUVs ohne rekonstituierte mechanosensitive Kanäle .....	58
Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopie von GUVs mit hohen Lokalanästhetikakonzentrationen .....	59
Abbildung 40: Postulierte Eindringtiefe der Lokalanästhetika in Membranen .....	62
Abbildung 41: Postulierte Eindringtiefe der Antidepressiva in Membranen.....	63
Abbildung 42: Membranmodulation durch amphiphile Moleküle und Auswirkungen auf ASICs.....	72
Abbildung 43: Mechanismus der Membranauflösung durch Detergenzien.....	75
Abbildung 44: Funktionsweise des Biuret-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung.....	92
Abbildung 45: Protonengetriggerte ASIC-Aktivierung & Fluo-4 Fluoreszenz nach Calciuminflux .....	95
Abbildung 46: Beladung und Deesterifizierung von Fluo-4 AM.....	96
Abbildung 47: Thallium-Influx-Assay mit ANTS als Fluoreszenzfarbstoff .....	98
Abbildung 48: Bestimmung der CMC mittels Coumarin-6.....	100
Abbildung 49: Quantifizierung des membranassoziierten Amphiphils via $^1\text{H}$ -NMR	102
Abbildung 50: Phasenübergang lamellar zu hexagonal.....	104
Abbildung 51: $^{31}\text{P}$ -Spektren von Vesikelpollen in lamellarer und invertiert hexagonaler Phase .....	105
Abbildung 52: $\alpha$ - und $\beta$ -Aufspaltung in $^2\text{H}$ -NMR-Experimenten.....	106
Abbildung 53: Pake-Dublett, numerische Rekonstruktion und Ordnungsparameterprofil .....	109

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Physikochemische Eigenschaften der Lokalanästhetika und Psychopharmaka .....	30
Tabelle 2: Zusammenfassung CMC der Lokalanästhetika bei pH 7,4 .....	34
Tabelle 3: Zusammenfassung CMC der Antidepressiva bei pH 7,4 .....	36
Tabelle 4: Zusammenfassung der Phasenübergangstemperaturen und Phasenübergangsbreiten.....	43
Tabelle 5: Zusammenfassung der relevanten Werte bezüglich der Lipiddynamik ....	49
Tabelle 6: Zusammenfassung CMC der Lokalanästhetika und Antidepressiva .....	65
Tabelle 7: BSA-Verdünnungsreihe zur Konzentrationsbestimmung via Biuret-Assay .....	93
Tabelle 8: Protokoll zur Elektroformation von GUVs.....	94

## 12 Publikationsliste

### 12.1 Publikationen in Fachjournalen und in Vorbereitung

#### **Diarylethene-Based Photoswitchable Inhibitors of Serine Proteases.**

Angew Chem Int Ed Engl. **2021** Sep 27;60(40):21789-21794.

Babii, O.; Afonin, S.; Diel, C.; Huhn, M.; Dommermuth, J.; Schober, T.; Koniev, S.; Hrebonkin, A.; Nesterov-Mueller, A.; Komarov, I. V.; Ulrich, A. S.

#### **Role of the lipid matrix in the action of local anesthetics.** (In Bearbeitung).

Culetto, A. & Huhn, M. (gleichberechtigte Erstautoren); Schwarz, S.; Tian, L.; Hamballer, M.; Afonin, S.; Muhle-Goll, C.; Martinac, B.; Buth, G.; Watts, A.; Weinschenk, S.; Ulrich, A. S.; Grage, S. L.

#### **Membrane-mediated modulation of mechanosensitive and acid-sensing ion channels by local anesthetics.** (In Bearbeitung).

Huhn, M.; Vollmer, S.; Stumpf, A.; Walther, T.; Ulrich, A. S.; Afonin, S.; Grage, S.L.

## 12.2 Tagungsbeiträge

Präsentation auf der 7th Heidelberg Conference TLA/ Neural Therapy (Juli 2022).

Titel: *Membrane-mediated activity of local anesthetics*

Autoren: Huhn, M.; Culetto, A.; Tian, L.; Afonin, S.; Grage, S. L.; Ulrich, A. S. (Karlsruhe Institute of Technology, Germany) Weinschenk, S. (University of Heidelberg, Germany) Ridone, P.; Martinac, B. (Victor Chang Cardiac Research Institute, Australia)