

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

# **Sensibilisierung hitzeevozierter Ionenströme an nozizeptiven Spinalganglienneuronen der Ratte**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von

Matthias Firner  
aus Offenbach

Mainz, 2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Urban  
1. Gutachter:  
2. Gutachter:  
Tag der Promotion: 2. Mai 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1. Schmerz und Nozizeption . . . . .	7
1.2. Anatomische und physiologische Grundlagen . . . . .	7
1.3. Modulation nozizeptiver Antworten . . . . .	8
1.4. TRP-Kanäle als molekulare Grundlage der Transduktion noxischer Reize .	10
1.5. Das Spinalganglienneuron als Sinneszelle des nozizeptiven Systems . . . .	12
1.5.1. Hitzeinduzierte Ionenströme . . . . .	12
1.5.2. Strom und Verhalten . . . . .	12
1.5.3. Das Spinalganglienneuron als Modell seiner peripheren Endigung .	13
1.5.4. Inaktivierung und Tachyphylaxie . . . . .	13
1.5.5. Sensibilisierung hitzeinduzierter Ströme . . . . .	14
1.6. Intrazelluläre Signalkaskaden . . . . .	16
1.6.1. Proteinkinase A . . . . .	16
1.6.2. Proteinkinase C . . . . .	16
1.6.3. Aktivierung von Proteinkinasen durch Calciumionen . . . . .	17
<b>2. Ziel der Untersuchung</b>	<b>18</b>
<b>3. Material</b>	<b>19</b>
3.1. Geräte . . . . .	19
3.2. Elektrophysiologischer Ableitstand . . . . .	19
3.3. Werkzeuge . . . . .	20
3.4. Verbrauchsmaterial . . . . .	21
3.5. Chemikalien . . . . .	21
3.5.1. Organische Substanzen . . . . .	21
3.5.2. Lösungsmittel . . . . .	22
3.5.3. Salze . . . . .	22
3.5.4. Extrazellulärlösungen . . . . .	22
3.5.5. Intrazellulärlösungen . . . . .	23
3.6. Software . . . . .	24
<b>4. Methoden</b>	<b>25</b>
4.1. Präparation der Spinalganglien . . . . .	25
4.2. Präparation der Spinalganglienneurone . . . . .	25
4.3. Versuchsaufbau . . . . .	26

## Inhaltsverzeichnis

4.3.1. Elektrophysiologischer Untersuchungsstand . . . . .	26
4.3.2. Elektrophysiologie . . . . .	26
4.3.3. Applikation der Hitzereize mit einem schnellen Lösungswechsler . .	30
4.4. Pharmakologische Experimente . . . . .	32
4.5. Größenbestimmung der Spinalganglienzellen . . . . .	33
4.6. Qualitätskriterien . . . . .	33
4.7. Auswertung . . . . .	33
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
5.1. Eigenschaften des Hitzereizes . . . . .	35
5.2. Hitzesensibilität . . . . .	39
5.2.1. Zusammenhang zwischen RMP und $I_{\text{Hitze}}$ . . . . .	40
5.2.2. Zusammenhang zwischen Haltestrom und $I_{\text{Hitze}}$ . . . . .	40
5.3. Antworten auf Hitzereize . . . . .	42
5.4. Sensibilisierung des hitzeinduzierten Stroms . . . . .	42
5.5. Der capsaicininduzierte Strom . . . . .	45
5.6. Einfluss der intrazellulären Calciumkonzentration . . . . .	47
5.7. Beteiligung der intrazellulären MEK/ERK-Kaskade . . . . .	49
5.8. Sensibilisierung durch lange Hitzereize . . . . .	51
<b>6. Diskussion</b>	<b>54</b>
6.1. Sensibilisierung durch Capsaicin . . . . .	55
6.2. Calciumabhängigkeit der Sensibilisierung . . . . .	56
6.3. Sensibilisierung durch Hitze . . . . .	56
6.4. Intrazelluläre Signalkaskaden . . . . .	57
6.4.1. Durch Calciumionen aktivierte Proteinkinasen . . . . .	57
6.4.2. Die capsaicininduzierte Sensibilisierung ist MEK-vermittelt . . . .	59
6.5. Die Rolle von NO, Guanylatzyklase und cGMP . . . . .	59
6.6. Schlussfolgerungen . . . . .	60
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>8. Summary</b>	<b>63</b>
<b>A. Ergebnisanhang</b>	<b>65</b>
A.1. Einfluss der Trypsinbehandlung auf elektrophysiologische Messungen . . .	65
A.2. Funktioneller Einfluss der Trypsinbehandlung . . . . .	67
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>

# Abbildungsverzeichnis

4.1. Aufbau der elektrischen Ableitung . . . . .	28
4.2. Auswertung der Aktionspotentiale . . . . .	30
4.3. Detailansicht Lösungswechsler . . . . .	31
5.1. Zeitverlauf des ersten Hitzereizes . . . . .	37
5.2. Zeitverlauf des Hitzereizes mit Präinkubation . . . . .	38
5.3. Stromgrößenhistogramm . . . . .	39
5.4. Zusammenhang zwischen RMP und $I_{Hitze}$ . . . . .	40
5.5. Zusammenhang zwischen Haltestrom und $I_{Hitze}$ . . . . .	41
5.6. Hitzeantworten nach Applikation von Pharmaka . . . . .	43
5.7. gemittelte Hitzeantworten . . . . .	44
5.8. Korrelation der Sensibilisierung mit $I_{Caps}$ . . . . .	46
5.9. Hitzeantworten mit BAPTA . . . . .	48
5.10. Keine Sensibilisierung unter BAPTA trotz $I_{Caps}$ . . . . .	48
5.11. Hitzeantworten mit U0126 . . . . .	50
5.12. Keine Sensibilisierung unter U0126 trotz $I_{Caps}$ . . . . .	50
5.13. Zusammenhang zwischen Haltestrom und Sensibilisierung durch lange Hitze- zereize . . . . .	52
5.14. Hitzeantworten nach Applikation langer Hitzereize . . . . .	53
5.15. typische Hitzeantwort auf langen Hitzereiz . . . . .	53
A.1. Größenverteilung von DRG-Neuronen . . . . .	66

# Tabellenverzeichnis

5.1. Temperatur der Hitzereize . . . . .	35
5.2. Übersicht über die 144 abgeleiteten Spinalganglienneurone . . . . .	42
A.1. Auswirkungen von Trypsin auf Spinalganglienneurone . . . . .	66



# Abkürzungsverzeichnis

<b>AMH</b>	A-Faser Mechano-Hitze-Nozizeptor
<b>ANOVA</b>	Varianzanalyse (analysis of variances)
<b>AP</b>	Aktionspotential
<b>ASIC</b>	säuresensibler Ionenkanal (acid sensing ion channel)
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BAPTA</b>	1,2-Bis(2-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraaceticacid tetrapotassium salt ein sehr schneller und spezifischer Calciumchelator
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>CMH</b>	C-Faser Mechano-Hitze-Nozizeptor
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid, ein Lösungsvermittler für lipophile Substanzen
<b>DRG</b>	Spinalganglion (dorsal root ganglion)
<b>EGTA</b>	Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'tetraacetat ein Calciumchelator
<b>ERK</b>	extracellular signal related kinase
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HEPES</b>	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethane sulfonic acid) Puffersubstanz
<b>I<sub>Hitze</sub></b>	hitzeinduzierter Strom
<b>I<sub>Caps</sub></b>	capsaicininduzierter Strom
<b>LSD</b>	least significant differences
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinase
<b>MEK</b>	MAPK/extracellular signal related kinase kinase
<b>NGF</b>	nerve growth factor (Nervenwachstumsfaktor)
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>p. a.</b>	zur Analyse (pro analysi)
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>sem</b>	Fehler des Mittelwertes (standard error of mean)
<b>SNP</b>	Natriumnitroprussid (sodium nitroprusside)
<b>TRP</b>	transient receptor potential
<b>TRPV1</b>	transient receptor potential vanilloid receptor 1
<b>TTL</b>	Transistor-Transistor Logik
<b>TTX</b>	Tetrodotoxin
<b>U-0126</b>	MEK-Inhibitor
<b>VR1</b>	vanilloid receptor subtype 1 (alte Nomenklatur), jetzt TRPV1
<b>VRL-1</b>	vanilloid-receptor-like protein 1 (alte Nomenklatur), jetzt TRPV2
<b>YC-1</b>	Aktivator der Guanylatzyklase
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem



# 1. Einleitung

## 1.1. Schmerz und Nozizeption

Die International Association for the Study of Pain definiert Schmerz folgendermaßen (übersetzt in Lehrbuch der Schmerztherapie [Treede 2001]):

„Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebsschädigung verknüpft ist, oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“

Schmerz ist somit nicht nur eine Sinneswahrnehmung, sondern beinhaltet auch eine affektiv-emotionale Komponente und kann folglich ohne Vorliegen eines adäquaten, potentiell schädlichen Reizes auftreten.

Demgegenüber beschreibt der Begriff Nozizeption die Generierung und Verarbeitung von Signalen im peripheren und zentralen Nervensystem, welche Informationen über die Art, Lokalisation und Intensität schädigender oder potentiell schädigender Reize bereitstellt [Meyer *et al.* 1994]. Spezialisierte zelluläre Rezeptoren (Nozizeptoren) werden durch potentiell gewebsschädigende Reize aktiviert und sind die primären Sinneszellen des Schmerzsinn [Belmonte 1996].

## 1.2. Anatomische und physiologische Grundlagen

Nozizeptoren sind nicht auf eine bestimmte Region, ein Organ oder Organsystem beschränkt; sie innervieren Haut, Muskeln, Gelenke und innere Organe.

Das erste Neuron des nozizeptiven Systems, funktionell eine primäre Sinneszelle, befindet sich als pseudounipolare Nervenzelle im Spinalganglion beziehungsweise im Ganglion trigeminale. Nozizeptive Neurone sind typischerweise klein und haben in den peripheren Nerven nicht oder nur dünn myelinisierte Axone. Sie gehören zu den Fasertypen C oder A $\delta$  und erreichen ihre Zielorgane als freie Endigungen.

Die Entstehung nozizeptiver Signale findet zunächst in freien Nervenendigungen statt, wo die noxischen Reize Ionenströme und somit Membranpotentialänderungen hervorrufen. Diesen Vorgang nennt man Transduktion.

Transformation bezeichnet die Umwandlung dieser Membranpotentialänderungen (auch Rezeptorpotentiale oder Generatorpotentiale genannt) in Aktionspotentialfolgen [Treede 2001].

Diese werden von den nozizeptiven Afferenzen bis zu den zentralen Endigungen weitergeleitet und im Hinterhorn des Rückenmarkes synaptisch auf das zweite Neuron übertragen.

## 1. Einleitung

Nozizeption unterscheidet sich von anderen Sinnen in einigen Punkten. Im Gegensatz zu anderen Sinnen – auch zu anderen somatosensorischen Empfindungen wie Wärme oder Berührung – reagieren nozizeptive Afferenzen auf verschiedene Reize wie Hitze, Kälte, Druck, Zunahme der Protonenkonzentration sowie auf eine Vielzahl chemischer Substanzen [Szolcsanyi *et al.* 1988, Julius und Basbaum 2001].

Dabei reagieren die nicht myelinisierten C-Faser-Nozizeptoren auf verschiedene Reiztypen wie Hitze, Kälte, mechanische und chemische Reize; sie sind also polymodal. Sie werden daher auch als CMH (C-Faser Mechano-Hitze-Nozizeptoren) bezeichnet.

Nozizeptoren mit dünn myelinisierten A $\delta$ -Fasern haben nicht nur eine höhere Leitungsgeschwindigkeit, sondern auch unterschiedliche Reaktionsmuster, die sich in zwei Typen einteilen lassen:

Hochschwellige Mechanorezeptoren sind wenig gegen Hitze und chemische Reize empfindlich; sie können nach starker Sensibilisierung aber auch hitzeempfindlich werden und werden daher auch als Typ I A-Faser Mechano-Hitze-Nozizeptoren (Typ I AMH) bezeichnet.

Im Gegensatz hierzu sind Typ II AMHs, die nur in behaarter Haut vorkommen, kaum mechanisch aktivierbar, und reagieren schnell auf Hitze- und andere Reize [Treede 2001].

### 1.3. Modulation nozizeptiver Antworten

Die Antwort von Nozizeptoren kann in einem außergewöhnlich großen Ausmaß moduliert werden. So kann die Antwort auf einen lange applizierten Reiz mit der Zeit abnehmen, was als Adaptation bezeichnet wird. Nimmt die Antwort auf wiederholt applizierte Reize gleicher Stärke von Reiz zu Reiz ab, so liegt Ermüdung vor [Beitel und Dubner 1976, LaMotte 1983].

Im Gegensatz zu anderen Sinnen ist es jedoch ebenso möglich, durch wiederholte Applikation noxischer Reize nozizeptive Afferenzen für darauf folgende Reize zu sensibilisieren, indem sowohl die Aktivierungsschwelle gesenkt, als auch die Antwort auf überschwellige Reize verstärkt wird [Beitel und Dubner 1976, LaMotte 1983]. Diese Linksverschiebung der Reiz-Antwort-Funktion bezeichnet man als Sensibilisierung; die dadurch gesteigerte Schmerzempfindung als Hyperalgesie [Meyer *et al.* 1994].

In Abhängigkeit von der Entfernung zum Ort des sensibilisierenden Reizes gibt es zwei verschiedene Typen von Hyperalgesie [Perl 1984, Meyer *et al.* 1994].

Die primäre Hyperalgesie ist dabei streng auf das durch einen noxischen Reiz sensibilisierte Areal beschränkt und breitet sich nicht auf vorher nicht gereizte Anteile des rezeptiven Felds eines Nozizeptors aus [Thalhammer und LaMotte 1982, Schmelz *et al.* 1996]. Sie ist durch die Sensibilisierung primärer nozizeptiver Afferenzen erklärbar und wirkt sich sowohl auf mechanische als auch auf chemische und thermische Schmerzreize aus (Hitzehyperalgesie). Dabei kann die Aktivierungsschwelle unter die Körpertemperatur sinken und so Spontanschmerz auslösen.

Die sekundäre Hyperalgesie findet sich auch in der Umgebung des sensibilisierten Areals und ist auf mechanische Reize beschränkt. Ihre Maximalvariante ist die Allodynie, bei der auch streng nicht-noxische Reize, wie leichte Berührung der Haut als schmerzhaft

## 1. Einleitung

empfunden werden. Ihr liegen Mechanismen der Sensibilisierung im zentralen Nervensystem, hauptsächlich auf Rückenmarksebene zugrunde [Torebjörk *et al.* 1992, Treede *et al.* 1992, Meyer *et al.* 1994, Treede 2001].

Außer durch Verletzung des Gewebes, sei sie mechanisch oder durch elektromagnetische Strahlung ausgelöst, kann auch eine Reihe von Substanzen Nozizeptoren aktivieren oder sensibilisieren und damit primäre Hyperalgesie auslösen [Belmonte 1996]. Darunter fallen sowohl körperfremde Substanzen wie Capsaicin, Senföl, Carrageenan und Formalin, als auch körpereigene Substanzen wie Bradykinin, NGF, Serotonin, ATP, Protonen, Leukotriene, Prostaglandine, Anandamid und andere Arachidonsäurederivate [Treede *et al.* 1992, Meyer *et al.* 1994, Julius und Basbaum 2001].

**Capsaicin** Das Vanilloid Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-6-noneamid) ist der scharf schmeckende Inhaltsstoff der Chilischoten. Es ist bei intradermaler Injektion extrem schmerzhaft und verursacht eine lange anhaltende Hyperalgesie gegen Hitzeerize, allerdings ohne dabei eine nachweisbare Gewebsschädigung auszulösen [LaMotte *et al.* 1992, Treede *et al.* 1992].

Es erregt C-Faser Nozizeptoren [Marsh *et al.* 1987], aber nicht Mechanorezeptoren, Haarfollikelrezeptoren und Kaltrezeptoren [Szolcsányi *et al.* 1988] und ist somit eine Kennsubstanz für polymodale Schmerzrezeptoren.

**Senföl** Senföl, Formalin oder Chloroform sind Irritantien, die durch Schädigung der Haut eine Entzündungsreaktion hervorrufen und so Hyperalgesie auslösend wirken [Treede *et al.* 1992].

**Bradykinin** Das Nonapeptid Bradykinin wird bei Gewebsverletzung und Entzündung ausgeschüttet. Injektion von Bradykinin in Haut oder andere sensibel innervierte Gewebe ist schmerzhaft und löst Hyperalgesie, hauptsächlich durch Sensibilisierung von CMH Rezeptoren aus [Meyer *et al.* 1994].

**Protonen** Eine Verringerung des pH-Wertes im Gewebe ist schmerzhaft und führt zu Hyperalgesie. Säureapplikation mit einem pH-Wert von 5 auf die Haut erregt mindestens ein Drittel der polymodalen Nozizeptoren eines rezeptiven Feldes [Caterina *et al.* 2000]. Niedrige pH-Werte werden regelmäßig bei Entzündungsreaktionen beobachtet und sind zumindest teilweise für entzündungsbedingten Schmerz und Hyperalgesie verantwortlich [Meyer *et al.* 1994].

**Serotonin** Serotonin wird von Thrombozyten ausgeschüttet, und ist bei intradermaler Applikation ebenso wie bei Injektionen in Hautblasen schmerzhaft und löst Hyperalgesie aus. Es potenziert die nozizeptive Wirkung von Bradykinin [Meyer *et al.* 1994].

**Histamin** Mastzellen schütten bei Aktivierung, die auch durch aus nozizeptiven Endigungen freigesetzte Substanz P ausgelöst werden kann, Histamin aus. Histamin verur-

## 1. Einleitung

sacht Vasodilatation und Ödembildung; seine Rolle für das nozizeptive System ist noch unklar, da Histamin nicht Schmerz, sondern Juckreiz auslöst [Meyer *et al.* 1994].

**Arachidonsäurederivate** Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane und eine Reihe von anderen Substanzen werden oft als Derivate der Arachidonsäure zusammengefasst. Sie sind in der Regel nicht schmerzauslösend, können aber Hyperalgesie auslösen [Meyer *et al.* 1994].

**Stickstoffmonoxid** Auch Stickstoffmonoxid wird bei Entzündungsreaktionen freigesetzt. Die Injektion von NO-Donoren unter die Haut führt zu Hyperalgesie; dieser Effekt ist durch Zugabe von Hemmstoffen der Guanylatzyklase hemmbar [Aley *et al.* 1998].

### 1.4. TRP-Kanäle als molekulare Grundlage der Transduktion noxischer Reize

Der molekulare Mechanismus der Transduktion nozizeptiver Reize war lange unklar [Meyer *et al.* 1994, Belmonte 1996]. Da jedoch eine definierbare chemische Verwandtschaft zwischen verschiedenen schmerzauslösenden chemischen Substanzen besteht [Szolcsanyi und Jancso-Gabor 1975, 1976, Liu *et al.* 1997] und für Capsaicin eine dosisabhängige Wirkung beschrieben wurde [Szolcsanyi und Jancso-Gabor 1975, Simone *et al.* 1989], lag die Vermutung nahe, dass die Transduktion noxischer Reize durch spezifische Rezeptoren vermittelt wird.

Als ein möglicher Träger hitze- und capsaicininduzierter Einwärtsströme wurde durch Klonierung aus einer cDNA-Bibliothek der nichtselektive Kationenkanal VR1 (vanilloid receptor subtype 1) gefunden. Er kann durch Temperaturen von mehr als 42°C, eine Reihe von chemischen Substanzen einschließlich des Capsaicins, sowie eine erhöhte Protonenkonzentration aktiviert werden [Caterina *et al.* 1997].

Da verschiedenen, diesen „Capsaicinrezeptor“ aktivierenden Substanzen eine Vanilloidgruppe gemein ist, wurde dieser (eben nicht für Capsaicin spezifische) Ionenkanal als Vanilloidrezeptor 1 (VR1) bezeichnet [Caterina *et al.* 1997].

Aufgrund der Zugehörigkeit der Vanilloidrezeptoren zur übergeordneten Gruppe der TRP-Kanäle (transient receptor potential) wurde 2002 für zahlreiche Gene und ihre zugehörigen Proteine eine neue Terminologie eingeführt; VR1 wird nun als TRPV1 bezeichnet [Clapham *et al.* 2001, Montell *et al.* 2002].

Wie andere TRP-Kanäle auch, besteht TRPV1 aus sechs Transmembrandomänen mit einer Porenschleife zwischen der fünften und sechsten Transmembranregion [Caterina *et al.* 1997]. Die Bindungsstelle für Vanilloide ist intrazellulär [Jung *et al.* 1999], während der pH-Sensor auf der extrazellulären Seite liegt [Jordt *et al.* 2000]. TRPV1 bildet Homotetramere und möglicherweise auch Heterotetramere [Kedei *et al.* 2001].

Das humane Äquivalent des zunächst aus Ratten-DNA klonierten TRPV1 weist zu diesem eine Sequenzhomologie von 92% auf, hat ein ähnliches Verteilungsmuster und ähnliche funktionelle Eigenschaften [Hayes *et al.* 2000, McIntyre *et al.* 2001]. Im Gegensatz

## 1. Einleitung

zu Ratten-TRPV1 ist der humane TRPV1 leichter durch den kompetitiven Antagonisten Capsazepin hemmbar; unabhängig davon, ob der Kanal durch Capsaicin, niedrigen pH-Wert oder noxische Hitze aktiviert wurde [Mcintyre *et al.* 2001].

TRPV1 wurde außer in Spinalganglienneuronen und neuronalen Fasern, die bestimmte Organe innervieren (Blase [Yiangou *et al.* 2001], Prostata [Van der Aa *et al.* 2003, Stein *et al.* 2004], Lunge [Reilly *et al.* 2003, Kollarik und Undem 2004], gastrointestinalem Trakt [Ward *et al.* 2003] und Zahnhals [Renton *et al.* 2003]), auch in einigen Gehirna-realien [Sanchez *et al.* 2001, Mezey *et al.* 2000] nachgewiesen. Auch in nicht-neuronalem Gewebe wie Keratinozyten [Southall *et al.* 2003], Blasenurothelzellen [Birder *et al.* 2001], Granulozyten [Heiner *et al.* 2003] und Makrophagen [Chen *et al.* 2003] wird TRPV1 exprimiert; die genaue Funktion von TRPV1 in diesen Geweben ist derzeit allerdings noch weitgehend unklar.

Es wurden noch eine Reihe weiterer Rezeptoren mit ähnlichen Eigenschaften entdeckt, darunter auch TRPV2, ein Ionenkanal, der nicht auf Capsaicin oder niedrigen pH, aber auf Hitze von mehr als etwa 52°C reagiert und eine große Homologie (etwa 50 %) zum VR1 aufweist und daher zunächst VRL-1 (vanilloid receptor like subtype 1) genannt wurde [Caterina *et al.* 1999]. Dieser Rezeptor wird eher in mittelgroßen bis großen Spinalganglienneuronen, aber auch im Gehirn und nicht-neuronalen Geweben exprimiert [Caterina *et al.* 1999, Greffrath *et al.* 2003]. Vermutlich ist TRPV2 für die hitzeinduzierten Antworten von A-Faser Mechano-Hitze Nozizeptoren (AMH) der Gruppe I verantwortlich [Ahluwalia *et al.* 2002].

Neben diesen beiden Hitzerezeptoren wurden innerhalb der TRP-Familie noch zahlreiche weitere temperatursensible Ionenkanäle gefunden (Übersicht z.B. in Tominaga und Caterina 2004). TRPV3 ist ein nicht capsaicinsensibler, zum TRPV1 strukturhomologer und zu 40 % sequenzhomologer Ionenkanal, der durch Temperaturen von mehr als 35°C aktiviert wird [Xu *et al.* 2002, Smith *et al.* 2002]. TRPV3 wird in Spinalganglienneuronen mit TRPV1 koexprimiert und ist möglicherweise an der Bildung von TRPV1-Heterotetrameren beteiligt Smith *et al.* [2002]. TRPV4 ist zum TRPV1 zu 50 % sequenzhomolog und wird neben Temperaturen von mehr als etwa 30°C durch hypotone Umgebungen aktiviert. [Liedtke *et al.* 2000, Güler *et al.* 2002].

TRPM8 ist ein durch Menthol, Icillin und Eucalyptol sowie durch kühle Temperaturen von weniger als etwa 25°C aktivierter Ionenkanal [Peier *et al.* 2002, McKemy *et al.* 2002, Nealen *et al.* 2003]. TRPA1 wird durch kalte Temperaturen unter 17°C, durch Icillin, aber nicht durch Menthol aktiviert. TRPA1 wird mit TRPV1, nicht jedoch mit TRPM8 koexprimiert [Story *et al.* 2003, Okazawa *et al.* 2004]. Auch TRPA1 kann, ähnlich wie TRPV1, durch Entzündungsmediatoren wie Senföl oder Bradykinin aktiviert und sensibilisiert werden [Jordt *et al.* 2004, Bandell *et al.* 2004].

## 1.5. Das Spinalganglienneuron als Sinneszelle des nozizeptiven Systems

### 1.5.1. Hitzeinduzierte Ionenströme

Erstmals wurde 1996 durch Paolo Cesare und Peter McNaughton in kleinen Spinalganglienneuronen ein spezifisch durch Hitze induzierter Ionenstrom nachgewiesen, der sich durch Bradykinin sensibilisieren ließ [Cesare und McNaughton 1996].

Hitzeinduzierte Ionenströme lassen sich fast ausschließlich in kleinen Spinalganglienneuronen auslösen [Kirschstein *et al.* 1997], auch Capsaicinsensitivität ist, passend zur Beschränkung auf unmyelinisierte C-Fasern, ebenfalls auf kleine Zellen beschränkt [Holzer 1991, Vlachová und Vyklický 1993, Mar *et al.* 1996], und Hitze- und Capsaicinsensibilität sind hochgradig koexprimiert, was einen kausalen Zusammenhang nahe legt [Kirschstein *et al.* 1997, Nagy und Rang 1999a].

Capsazepin, ein kompetitiver Antagonist von Vanilloiden [Bevan *et al.* 1992] hemmt capsaicin- und hitzeinduzierte Ionenströme reversibel und dosisabhängig in TRPV1-transfizierten Zellen [Tominaga *et al.* 1998] und in Spinalganglienneuronen [Kirschstein *et al.* 1999, Liu und Simon 2000].

Der nichtselektive Kationenkanal TRPV1 wird von sensorischen Ganglienneuronen mit geringem Durchmesser exprimiert [Caterina *et al.* 1997, Michael und Priestley 1999, Ichikawa und Sugimoto 2001, Greffrath *et al.* 2003]. Der durch diesen Kanal geleitete Strom teilt viele Eigenschaften hitzeinduzierter Ströme aus nozizeptiven Spinalganglienneuronen, wie Schwellentemperatur, Sensibilisierbarkeit durch Capsaicin und niedrigen pH-Wert, gute Leitfähigkeit für Calcium, nur geringe Selektivität für monovalente Kationen und Hemmbarkeit durch Capsazepin [Caterina *et al.* 1997, Tominaga *et al.* 1998, Julius und Basbaum 2001, Welch *et al.* 2000]. Somit ist TRPV1 eines der wichtigen Moleküle der Transduktion noxischer Hitzereize.

### 1.5.2. Strom und Verhalten

Die Rolle von TRPV1 als der Sensor für leichte bis mittelstarke noxische Hitzereize bestätigt sich in Studien am Menschen, in denen eine Desensibilisierung capsaicinsensibler Afferenzen zu einem vollständigen Verlust der Wahrnehmbarkeit schwacher Hitzereize führt [Magerl *et al.* 2001].

Im Gegensatz dazu zeigen Verhaltensexperimente an TRPV1-knock-out Mäusen, welche weniger als ein Drittel der hitzesensiblen C-Fasern einer Wildtypmaus entwickeln, bei schwachen Hitzereizen kaum Unterschiede zu ihren TRPV1 exprimierenden Artgenossen, während sie starke Hitzereize eher tolerieren als diese. Paradoxiertweise ist sowohl auf Ebene der Spinalganglienneurone, als auch auf Rückenmarksebene bei diesen Tieren bei normaler Reaktion auf mechanische Reize eine deutlich eingeschränkte Reaktion auf leichte bis mittelstarke Hitze und auf erniedrigten extrazellulären pH-Wert festzustellen. Die Reaktion auf stärkere Hitzereize (über 53°C) ist dabei nicht eingeschränkt. Besonders bemerkenswert ist die bei TRPV1-knock-out Mäusen nahezu aufgehobene Hyperalgesie nach Applikation von chemischen Substanzen wie Senföl oder Carrageenan;

## 1. Einleitung

damit scheint TRPV1 eine entscheidende Rolle bei der inflammatorischen Hyperalgesie zu spielen [Caterina *et al.* 2000, Davis *et al.* 2000].

### 1.5.3. Das Spinalganglienneuron als Modell seiner peripheren Endigung

Um die Transduktionsmechanismen noxischer Hitzereize auf zellulärer Ebene zu untersuchen, müssen die Somata von Spinalganglienzellen als Modell ihrer peripheren Endigung verwendet werden, da diese aufgrund ihrer geringen Größe und des sie umgebenden Gewebes einer direkten Untersuchung nicht zugänglich ist. Dies ist möglich, da auch das Zellsoma weitgehend die für nozizeptive Neurone typischen Ionenkanäle exprimiert [Marsh *et al.* 1987, Belmonte 1996, Vyklický und Knotková-Urbancová 1996, Baccaglini und Hogan 1983, Kirschstein *et al.* 1997].

### 1.5.4. Inaktivierung und Tachyphylaxie

Werden Nozizeptoren wiederholt mit gleichen Reizen erregt, kommt es – wie bei anderen Sinnen auch – zu einer von Reiz zu Reiz kleiner werdenden Antwort [Treede 1995]. Dieser als Ermüdung bezeichnete Effekt ist von der Stärke der Reize und von ihrem zeitlichen Abstand abhängig und beruht auf Mechanismen im peripheren Nervensystem [LaMotte 1983, Adriaensen *et al.* 1984b, Meyer *et al.* 1994]. Auch Adaptation, also eine Verringerung der nozizeptiven Antwort auf einen gleichbleibend starken Reiz wurde für nozizeptive Afferenzen beschrieben [Adriaensen *et al.* 1984a, b, Treede 1995].

Inaktivierung ist das Korrelat der Adaptation auf Ebene der Transduktion und bezeichnet eine Verringerung des hitzeinduzierten Ionenstromes während konstanter Reizung. Entsprechend bezeichnet Tachyphylaxie die Abnahme des hitzeinduzierten Stroms von Reiz zu Reiz.

Für Capsaicin ist dieses Verhalten bekannt und vielfach beschrieben [Cholewinski *et al.* 1993, Meyer *et al.* 1994, Caterina *et al.* 1997, Shu und Mendell 1999]. Auch für hitzeinduzierte Ströme wurde bestätigt, dass repetitive Reize an Spinalganglienzellen keineswegs zu reproduzierbaren, sondern zu kleiner werdenden Antworten führen können [Schwarz *et al.* 2000].

Dabei ist die Dauer der applizierten Reize von großer Bedeutung; kurze Hitzestimuli von weniger als einer Sekunde führen nicht zu Inaktivierung oder Tachyphylaxie [Cesare und McNaughton 1996, Kirschstein *et al.* 1997, 1999].

In Abhängigkeit von Reizintensität und -dauer kann es auch zur Sensibilisierung nozizeptiver Afferenzen und somit zur Hyperalgesie kommen (siehe Abschnitt 1.3). Im Falle der sekundären Hyperalgesie sind dabei vor allem zentrale Prozesse wie die Aktivierung zentraler Nozizeptoren durch normalerweise nicht nozizeptive mechanosensible Afferenzen ursächlich. Die primäre Hyperalgesie beruht hingegen auf einer durch Entzündungsmediatoren und zellulären Botenstoffen ausgelösten Sensibilisierung der Nozizeptoren selbst [Treede *et al.* 1992, Meyer *et al.* 1994, Treede 2001].

### 1.5.5. Sensibilisierung hitzeinduzierter Ströme

Eine Vielzahl von Substanzen ist dafür bekannt, nozizeptive Reize zu verstärken. Diese Sensibilisierbarkeit der Nozizeption ist fundamental, so dass die erste Arbeit zu hitzeinduzierten Strömen an Spinalganglienneuronen sogar die Sensibilisierbarkeit durch Bradykinin als Kriterium dafür verwendete, dass es sich tatsächlich um ein nozizeptives Geschehen handelt [Cesare und McNaughton 1996].

Hitzeinduzierte Ströme werden durch eine Vielzahl von Substanzen sensibilisiert, exemplarisch werden einige davon vorgestellt.

**Capsaicin** Capsaicin sensibilisiert die Antworten hitzesensibler Spinalganglienneurone *in vitro*. Zwei Erklärungen für den Mechanismus sind denkbar: Zum einen eine direkte Interaktion am TRPV1 durch gleichzeitige Wirkung zweier Agonisten, zum anderen über intrazelluläre Signalkaskaden. Calciumionen galten sehr früh als möglicher second messenger [Wood *et al.* 1988], und die dadurch ausgelöste Sensibilisierung könnte durch Aktivierung zellulärer Regulatorproteine und Phosphorylierung von Ionenkanälen und verschiedenen Enzymen vermittelt sein [Guenther *et al.* 1999].

Tatsächlich zeigten Versuche, dass die capsaicininduzierte Sensibilisierung hitzeinduzierter Ströme unter Pufferung der intrazellulären Calciumkonzentration in calciumfreier Lösung aufgehoben war [Guenther *et al.* 1999].

**Bradykinin** Bradykinin wirkt über G-Protein-gekoppelte B2-Rezeptoren, die hauptsächlich von C-Faser-Neuronen exprimiert werden. Es stimuliert die Synthese von cGMP und die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat, was die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern und die Aktivierung von Proteinkinase C $\epsilon$  zur Folge hat [Burgess *et al.* 1989, Wood und Docherty 1997, Cesare *et al.* 1999a, Premkumar und Ahern 2000]. Phosphatidylinositolbisphosphat ist ein allosterischer Inhibitor von TRPV1, so dass Bradykinin auch über Disinhibition des TRPV1 sensibilisierend wirkt [Chuang *et al.* 2001].

**Arachidonsäurederivate** Prostaglandine binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche die intrazelluläre Konzentration von cAMP erhöhen [Levine und Reichling 1999]. Dadurch wird vor allem Proteinkinase A aktiviert, die durch Phosphorylierung verschiedener Ionenkanäle die Zelle leichter erregbar macht (siehe Abschnitt 1.6).

**Anandamid** (N-Arachidonylethanolamin) als endogene Substanz ist hier besonders hervorzuheben, da sie als endogener Ligand von TRPV1 diskutiert wird. Anandamid ist ein partieller Agonist an Cannabinoidrezeptoren vom Typ CB<sub>1</sub>, ist jedoch an CB<sub>2</sub> Rezeptoren funktionell unwirksam. Am TRPV1 ist es zumindest ein partieller Agonist und bindet an den gleichen Teil des TRPV1 wie Capsaicin. Es gelangt über einen spezifischen Transporter, den Anandamid Membrantransporter, ins Zellinnere und damit an die Ligandenbindungsstelle des TRPV1. Die meisten TRPV1-positiven Spinalganglienneurone (98 %) koexprimieren den CB<sub>1</sub> Rezeptor. Da TRPV1 und CB<sub>1</sub> einander entgegengesetzte Wirkungen auf die Nozizeption haben, kann Anandamid, je nach seiner Lokalisation



## 1. Einleitung

und Aktivität des Transportmoleküls, nozizeptive Antworten sowohl verstärken als auch inhibieren [Marzo *et al.* 2002]. Des Weiteren wird N-Arachidonoyldopamin (NADA), welches in einigen Gehirnarealen nachgewiesen wurde, und ebenfalls Agonist an TRPV1 und CB<sub>1</sub> Rezeptoren ist, als endogener Ligand diskutiert [Huang *et al.* 2002].

**Säure** Protonen können nozizeptive Neurone auf verschiedenen Wegen aktivieren; als wichtigste Rezeptoren werden die Gruppe der ASICs (acid sensing ion channels) und TRPV1 diskutiert [Julius und Basbaum 2001]. TRPV1 kann bei Raumtemperatur durch pH-Werte unter 6 aktiviert werden und reagiert darauf mit nicht inaktivierenden Strömen. Darüber hinaus wird TRPV1 durch Protonen konzentrationsabhängig gegen hitze- und capsaicininduzierte Reize sensibilisiert [Baumann und Martenson 2000, Jordt *et al.* 2000].

ASICs sind Ionenkanäle, die in Spinalganglienneuronen exprimiert werden. Bislang wurden mindestens fünf verschiedene Subtypen von durch Verringerung des pH-Wertes aktivierbaren Kanälen entdeckt, die vermutlich heteromere Komplexe bilden. Sie antworten schon auf relativ moderate pH-Wert Änderungen mit großen, schnell inaktivierenden Strömen.

Welcher oder ob einer dieser beiden Transduktionsmechanismen *in vivo* der Bedeutendere ist, wird noch diskutiert.

**ATP** Adenosintriphosphat aktiviert nozizeptive Afferenzen über selektiv von kleinen Spinalganglienneuronen exprimierte P2X<sub>3</sub>-Rezeptoren. Zusätzlich aktiviert es über metabotrope P2Y Rezeptoren Proteinkinase C und kann so TRPV1-vermittelte Ströme sensibilisieren [Wood und Docherty 1997, Tominaga *et al.* 2001].

**NO als mögliche sensibilisierende Substanz** Stickstoffmonoxid ist, ebenso wie Derivate der Arachidonsäure oder Bradykinin, ein Entzündungsmediator [Treede *et al.* 1992]. Der übliche Wirkmechanismus besteht in einer Aktivierung der Guanylatzyklase, welche cGMP synthetisiert und damit letztlich Proteinkinase C aktiviert [Jaffrey und Snyder 1995]. Neuronale NO-Synthase, Untereinheiten der löslichen Guanylatzyklase und cGMP-abhängige Proteinkinasen wurden in Spinalganglienneuronen nachgewiesen [Kummer *et al.* 1996, Qian *et al.* 1996], so dass NO durch einen Anstieg der cGMP-Konzentration Proteinkinase C aktivieren und somit sensibilisierend wirken könnte.

**NGF** Schon seit 1992 ist der Einfluss von NGF auf den Anteil capsaicin- oder hitzesensibler Neurone bekannt [Aguayo und White 1992]. Nerve Growth Factor (NGF) sensibilisiert capsaicininduzierte Ströme von Spinalganglienneuronen [Shu und Mendell 1999, Koltzenburg *et al.* 1999]. Darüber hinaus reguliert NGF konzentrationsabhängig die Menge von TRPV1-mRNA [Winston *et al.* 2001] und von TRPV1 in kultivierten Spinalganglienneuronen [Chuang *et al.* 2001].

Auch eine Subgruppe kälteempfindlicher Spinalganglienneurone, die normalerweise nicht capsaicinsensiblen, mentholsensitiven TRPM8-positiven Zellen werden unter An-

## 1. Einleitung

wesenheit von NGF capsaicinsensibel, was mit einer Entzündungsreaktion in Zusammenhang gebracht wird [Story *et al.* 2003].

NGF wirkt noch auf eine Vielzahl anderer Signalwege; es erhöht die Menge an phosphorylierter ERK und reduziert den retrograden axonalen Transport von ERK in DRG-Neuronen [Averill *et al.* 2001].

NGF wird für Zellkultur von Spinalganglienneuronen benötigt, da kultivierte Spinalganglienneurone unter Abwesenheit von NGF ihre nozizeptiven Eigenschaften, insbesondere die Capsaicinsensibilität, aber auch die Expression TTX-resistenter Natriumkanäle, verlieren [Winter *et al.* 1988, Aguayo und White 1992, Bevan und Winter 1995].

### 1.6. Intrazelluläre Signalkaskaden

Einer Hyperalgesie liegen langfristige Änderungen im Verhalten nozizeptiver Neurone zugrunde. Die durch membranständige Rezeptoren ausgelösten Signale sind an der Entstehung peripherer oder zentraler Sensibilisierung beteiligt und führen zur Modulation des nozizeptiven Systems, der zumindest teilweise unterschiedliche Phosphorylierungsmuster bestimmter Proteine zugrunde liegen, und langfristig zur Modifikation des nozizeptiven Systems, der eine Veränderung der Genexpression zugrunde liegt. [Cervero und Laird 1991, Malmberg 2000, Woolf und Salter 2000]. Insbesondere die Proteinkinasen A und C, sowie durch Calciumionen aktivierte Proteinkinasen spielen bei der Sensibilisierung der Nozizeption eine wichtige Rolle.

#### 1.6.1. Proteinkinase A

Experimente an Mäusen, denen die neuronspezifische regulatorische Untereinheit RI $\beta$  der Proteinkinase A fehlt, zeigen bei normaler akuter Nozizeption eine deutliche Reduktion der durch Entzündung ausgelösten Hyperalgesie [Malmberg *et al.* 1997a]. Dieser Effekt beruht vermutlich auf einer verminderten Entzündungsreaktion, die bei diesen Tieren beobachtet wurde [Malmberg 2000].

Ein weiterer Wirkmechanismus von Proteinkinase A ist die Phosphorylierung TTX-resistenter Natriumkanäle, welche an der Entstehung von Aktionspotentialen in nozizeptiven Neuronen eine entscheidende Rolle spielen. Es wurde gezeigt, dass sich hierdurch die Spannungsabhängigkeit TTX-resistenter Natriumkanäle in Richtung Hyperpolarisation verschiebt. Dies verringert das Maß an notwendiger Membrandepolarisation, das zum Auslösen eines Aktionspotentials notwendig ist [England *et al.* 1996, Gold *et al.* 1998].

#### 1.6.2. Proteinkinase C

Proteinkinase C spielt sowohl im zentralen wie im peripheren Nervensystem für die Regulation des nozizeptiven Systems eine wichtige Rolle [Malmberg 2000].

Mäuse, denen die Isoform PKC $\epsilon$  dieses Enzyms fehlt, welche in 90 % aller kleinen Spinalganglienneurone vorkommt, zeigen eine verringerte Sensibilität auf Adrenalin- und entzündungsinduzierte Hyperalgesie, nicht aber auf durch Prostaglandin E<sub>2</sub> ausgelöste

## 1. Einleitung

Hyperalgesie [Khasar *et al.* 1999]. Da PKC $\epsilon$  Vanilloidrezeptoren phosphorylieren und damit sensibilisieren kann [Premkumar und Ahern 2000, Numazaki *et al.* 2002] und sich die sensibilisierende Wirkung von Bradykinin und Anandamid durch Hemmstoffe der Proteinkinase C hemmen lässt [Premkumar und Ahern 2000], scheint PKC $\epsilon$  eine entscheidende Rolle bei der peripheren Sensibilisierung zu spielen.

Versuche mit Mäusen, welche die Isoform PKC $\gamma$  nicht exprimieren, zeigen eine verringerte thermische und mechanische Hyperalgesie nach Nervenverletzungen bei normaler Reaktion auf akute Schmerzreize. Dies scheint jedoch ausschließlich auf Mechanismen im zentralen Nervensystem zu beruhen, da PKC $\gamma$  nur im zentralen Nervensystem und nicht in Spinalganglien exprimiert wird [Malmberg *et al.* 1997b].

### 1.6.3. Aktivierung von Proteinkinasen durch Calciumionen

Nachdem intrazelluläre Calciumionen als second messenger diskutiert wurden [Guenther *et al.* 1999], stellt sich die Frage nach der Aktivierbarkeit von Proteinkinasen durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.

Einige Isoformen der Proteinkinase C, PKC $\gamma$  und PKC $\delta$ , werden durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert [Asaoka *et al.* 1992], und zumindest für PKC $\epsilon$  wurde eine Phosphorylierung des TRPV1 nachgewiesen; wobei Mutationen am TRPV1, welche eine Phosphorylierung an diesen Stellen verhindern, sich auch nicht mehr mit PKC-Aktivatoren sensibilisieren ließen [Numazaki *et al.* 2002].

Möglich wäre auch eine Aktivierung der Proteinkinase A, da einige Isoformen dieses Enzyms indirekt über eine Aktivierung von Adenylatzyklasen und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert werden [Mons und Cooper 1995]. Es wurde gezeigt, dass es durch Ionomycin-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration möglich ist, hitzeinduzierte Ionenströme an Spinalganglienneuronen zu sensibilisieren, und dass diese Sensibilisierung durch Hemmstoffe der PKA verhindert werden kann [Distler *et al.* 2003]. Allerdings verursacht ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Spinalganglienneuronen keinen Anstieg von cAMP, sondern von cGMP [Wood *et al.* 1989].

Auch eine Gruppe von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die extracellulär signal-related kinases (ERK), werden durch Depolarisierung der Zellmembran und Calciumeinstrom aktiviert [Rosen *et al.* 1994]. Diese Aktivierung geschieht durch die so genannte MAPK/ERK-Kinase (MEK), welche ERK phosphoryliert [Chang und Karin 2001]. ERK kommt in den meisten Spinalganglienneuronen vor; in nozizeptiven Neuronen wird es jedoch am stärksten exprimiert [Averill *et al.* 2001].

## 2. Ziel der Untersuchung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen einige der Mechanismen geklärt werden, die zur schnellen Sensibilisierung hitzeevozierter Ionenströme führen. Hierfür werden akut dissoziierte Spinalganglienneurone der Ratte als Modell ihrer peripheren Endigung verwendet und mittels Ganzzelleableitung in der patch-clamp-Technik untersucht.

Im Einzelnen soll ein Modell etabliert werden, mit dem akut dissoziierte Spinalganglienneurone auf drei aufeinander folgende Hitzereize gleich bleibende Antworten, insbesondere jedoch keine Tachyphylaxie zeigen.

Es soll verifiziert werden, ob lange Hitzereize von etwa 10 Sekunden Dauer zur Sensibilisierung hitzeevozierter Ionenströme führen können.

Durch Applikation von Capsaicin in einer niedrigen Konzentration sollen hitzeevozierte Ionenströme schnell und unabhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration sensibilisiert werden.

An der Sensibilisierung beteiligte Signalkaskaden sollen identifiziert und charakterisiert werden. Dabei soll versucht werden, hitzeinduzierte Ionenströme durch Stickstoffmonoxid oder andere Aktivatoren der Guanylatzyklase zu sensibilisieren.

Es soll geklärt werden, welche Auswirkungen ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration hat, und ob die MEK/ERK-Kaskade eine Rolle bei der peripheren Sensibilisierung spielt.

## 3. Material

### 3.1. Geräte

**Brutschrank** TK 2/56, Ehret, Emmendingen

**Brutschrank** NU 4500 E, NuAire, Plymouth, USA

**Computer** P2-300, 64MB RAM, Lion Electronics

**Elektrodenziehgerät** Flaming/Brown Micropipette Puller Type P-87, Sutter Instruments, Novato, USA

**Elektrodenschmiede** Eigenbau der Werkstatt des physiologischen Instituts

**Kaltlichtquelle** KL 1500 electronic, Schott, Mainz

**Kühl- und Gefrierschrank** Liebherr

**Laborrüttler** SG 20, IDL, Kehlheim

**Laborwaage** SBA-31, Scaltec, Heiligenstadt

**Laborwaage** SBA-52, Scaltec, Heiligenstadt

**pH-Messgerät** pH 525, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim

**Präpariermikroskop** Olympus, Tokyo, Japan

### 3.2. Elektrophysiologischer Ableitstand

**Dämpfungselemente** SLM M-1-A, Barry Controls, Surrey, England

**Faradayscher Käfig** Eigenbau durch die Werkstatt des physiologischen Instituts

**Schwingungsgedämpfter Tisch** Eigenbau durch die Werkstatt des physiologischen Instituts

**Mikroskop** inverses Mikroskop Leica DM-IRB, Leitz, Bensheim

**Motorisierter Mikromanipulator** MP 285, Sutter Instruments, Novato, USA

**Analog/Digital-Wandler** Digidata 1200B, Axon Instruments, Foster City, USA

**Oszilloskop** 10 MHz, Typ PM3233, Philips

### 3. Material

**Vorverstärker** mit Pipettenhalter, CV 201 Headstage, Axon Instruments, Foster City, USA

**Verstärker für elektrophysiologische Messungen** Axopatch 200A, Axon Instruments, Foster City, USA

**Digitales Thermometer** BAT-12, Physitemp, Clifton, USA

**Umschaltkasten** SWT-5 Thermocouple Selector, Physitemp, Clifton, USA

**Miniaturchermofühler** IT-1E Thermocouple Microprobe, Physitemp, Clifton, USA

**Infusionspumpen** Perfusor segura, B.Braun, Melsungen

**Durchflussheizung mit Steuergerät** Temperatur-Controller HT 1.2, VETEC, Dummerstorf

**Manueller Mikromanipulator** MM-33, Märzhäuser, Wetzlar

**Schrittmotorbetriebener Schlitten** für die Durchflussheizung und das Kopfteil des Lösungswechslers, Eigenbau durch die Werkstatt des physiologischen Instituts

**Steuerung Schrittmotor** Eigenbau durch die Werkstatt des physiologischen Instituts

**Kopfteil zur Applikation temperierter Extrazellulärlösung** Eigenbau der Arbeitsgruppe

**Absaugpumpe** Rollenpumpe, Desaga, Heidelberg

### 3.3. Werkzeuge

**Eppendorfpipetten** 250  $\mu$ l und 1000  $\mu$ l Eppendorf Research, Hamburg

**Infusionsschläuche** B. Braun, Melsungen

**Iridektomieschere** Hans Geuder Augeninstrumente, Heidelberg

**Mikropinzetten** Aesculap, Tuttlingen

**Pasteurpipetten** Carl Roth Laborbedarf, Karlsruhe

**Präparierscheren** Aesculap, Tuttlingen

### 3. Material

#### 3.4. Verbrauchsmaterial

**Borosilikatglaskapillaren** Länge 100 mm, Außendurchmesser 1,50 mm,  
Innendurchmesser 1,05 mm, Hilgenberg, Malsfeld

**Carbogen** 95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid, UN1014, Westfalen, Münster

**Filter für Extrazellulärlösung** Selecta 40, Schleicher & Schuell, Dassel

**Filter für Intrazellulärlösung** Minisart 0,45 µm und 0,2 µm, Sartorius, Göttingen

**Gewebekulturschalen** Cellstar 35/10, Greiner Labortechnik, Frickenhausen

**Keramiknadeln** MicroFil MF28G, World Precision Instruments, Berlin

**Kohlendioxid** UN1013, Westfalen, Münster

#### 3.5. Chemikalien

##### 3.5.1. Organische Substanzen

**Agar-Agar** Serva, Heidelberg

**Capsaicin** 8-methyl-N-vanillyl-6-noneamid, Stammlösung 20 mM in Ethanol,  
Endkonzentration 0,5 µM, Sigma

**Kollagenase** Typ CLS II, EC-Nummer 3.4.24.3 271 U/mg, Endkonzentration  
2710 U/ml, Biochrom, Berlin

**Nährlösung** Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 HAM 1:1  
Mixture, Sigma

**Penicillin/Streptomycin-Lösung** 10 000 U Penicillin + 10 mg Streptomycin je ml in  
0,9 % NaCl, Endkonzentration 100 U/ml Penicillin + 0,1 mg/ml Streptomycin,  
Sigma

**SNP** Natrium-Nitroprussid, Stammlösung 1 mM in Tyrode, Endkonzentration 10 µM,  
Sigma

**Trypsin** Typ1, EC-Nummer 3.4.21.4, Endkonzentration 0,5–1 mg/ml, Sigma,  
Taufkirchen

**U0126** 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadien, MEK Inhibitor,  
Stammlösung 10 mM in DMSO, Endkonzentration 10 µM, Promega, Mannheim

**YC-1** 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazol, Stammlösung 10 mM in DMSO,  
Endkonzentration 10 µM, Sigma

### 3. Material

#### 3.5.2. Lösungsmittel

**DMSO** Dimethylsulfoxid, reinst, Endkonzentration 0,1 %, Merck

**Ethanol** p. a., Endkonzentration 0,0125 %, Merck, Darmstadt

#### 3.5.3. Salze

**NaOH** Maßlösung 1 mol/l ( $\pm 0,1$  %), Merck

**KOH** Maßlösung 1 mol/l ( $\pm 0,1$  %), Merck

**CaCl<sub>2</sub>** p. a., Merck

**D(+)-Glucose** wasserfrei für biochemische Zwecke, Merck

**KCl** reinst, Merck

**MgCl<sub>2</sub>** p. a., Merck

**NaCl** p. a., Merck, Darmstadt

**NaHCO<sub>3</sub>** p. a., Merck

**BAPTA** 1,2-Bis(2-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraaceticacid tetrapotassium salt, Endkonzentration 10 mM, Sigma

**EGTA** Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'tetraacetat, Sigma

**HEPES** N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethane sulfonic acid), Sigma

**MgATP** Magnesiumsalz von Adenosintrisphosphat, Sigma

**Phenolrot** Phenolsulfonphthalein, Sigma

#### 3.5.4. Extrazellulärlösungen

Folgende Extrazellulärlösungen wurden für die Experimente verwendet:

**Nährlösung:** Zur Präparation und Aufbewahrung befanden sich die Ganglienzellen in einer Nährlösung. Dulbecco's Modified Eagle's Medium / F-12 HAM Nutrient Mixture 1:1 (Sigma) wurde in vollentsalztem und dann doppelt destillierten Wasser gelöst und mit 2,2 g NaHCO<sub>3</sub> (26,2 mM) sowie 10 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (Endkonzentration 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) versetzt, gefiltert und auf 1 Liter aufgefüllt. Diese Lösung wurde dann kontinuierlich mit Carbogen begast oder in einem Brutschrank mit geregelter Temperatur und geregelter 5-prozentigem Kohlendioxidgehalt verwendet, um einen pH-Wert von 7,35 einzustellen.



### 3. Material

**Extrazellulärlösung:** Die elektrophysiologischen Experimente wurden in folgender Lösung durchgeführt:

NaCl	145 mM
KCl	2,5 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM
Phenolrot	0,025 mM

Der pH-Wert wurde mit 1M NaOH bei Raumtemperatur beziehungsweise bei 50°C auf 7,4 eingestellt.

Dieser Lösung wurden gegebenenfalls Pharmaka wie Capsaicin, U0126, SNP oder YC-1 zugesetzt. Hierfür wurden zu etwa 45 ml dieser Extrazellulärlösung entweder 6,25 µl Capsaicin-Stammlösung (Endkonzentration 0,5 µM) oder 50 µl U0126-Stammlösung (Endkonzentration 10 µM) oder 500 µl SNP-Stammlösung (Endkonzentration 10 µM) oder 50 µl YC-1-Stammlösung (Endkonzentration 10 µM) zugesetzt, und dann mit Extrazellulärlösung auf 50 ml aufgefüllt.

SNP-haltige Lösungen wurden ausschließlich in lichtgeschützten und luftdichten Gefäßen für höchstens vier Stunden nach Ansetzen verwendet; die Stammlösung wurde für jeden Versuchstag neu angesetzt. Lösungen, die YC-1 oder U-0126 enthielten, wurden maximal sechs Stunden nach Ansetzen verwendet; die Stammlösungen wurden in Portionen von 50 µl aliquotiert und tiefgefroren gelagert.

#### 3.5.5. Intrazellulärlösungen

Es wurden zwei verschiedene Intrazellulärlösungen verwendet, die sich hauptsächlich durch die Affinität und Geschwindigkeit des verwendeten Calciumchelators unterscheiden. Die Lösungen wurden direkt nach dem Ansetzen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

**Intra-ATP** In Anlehnung an Cesare und McNaughton 1996 wurde folgende Intrazellulärlösung verwendet:

KCl	135 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,6 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,2 mM
HEPES	10 mM
EGTA	2 mM
MgATP	2,5 mM

Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit 1M KOH bei Raumtemperatur auf 7,3 eingestellt.

Die freie Ca<sup>2+</sup>-Konzentration dieser Lösung beträgt  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l.

### 3. Material

**Intra-BAPTA:** In einem Teil der Experimente wurde EGTA durch BAPTA ersetzt.

KCl	135 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,6 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,2 mM
HEPES	10 mM
BAPTA	10 mM
MgATP	2,5 mM

Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit 1M KOH bei Raumtemperatur auf 7,3 eingestellt.

Die freie Ca<sup>2+</sup>-Konzentration dieser Lösung beträgt  $8 \cdot 10^{-9}$  mol/l.

### 3.6. Software

Zur Aufnahme und Analyse der gewonnenen elektrophysiologischen Daten kam das Softwarepaket pClamp 8.2 von Axon Instruments zum Einsatz.

Zur Berechnung der freien Calciumkonzentration in Pufferlösungen kam das Programm „Sliders“ v.2.00 zum Einsatz (<http://www.stanford.edu/~cpatton>).  
(Stand 07.02.2003)

Auswertungen und Diagramme wurden zunächst mit Excel 97 (Microsoft) erstellt und mit XFig weiterverarbeitet. Statistische Auswertungen wurden mit Statistica 4.5 (StatSoft) berechnet.

## 4. Methoden

### 4.1. Präparation der Spinalganglien

Die für die Versuche verwendeten Sprague-Dawley-Ratten wurden bei Raumtemperatur gehalten und erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Für die hier vorgestellten elektrophysiologischen Experimente wurden 63 Ratten (47 männliche, 16 weibliche) mit einem Gewicht von 55–400 g (im Mittel 220 g, Standardabweichung 78 g) verwendet. In 12 Experimenten konnten entweder keine Daten erhoben werden oder die erhobenen Daten erfüllten nicht die in Abschnitt 4.6 aufgeführten Qualitätskriterien. Weitere 4 Ratten wurden für die Bestimmung der Größenverteilung von Spinalganglienneuronen verwendet. Für die einzelnen Versuche wurde kein bestimmtes Geschlecht bevorzugt.

Zu Beginn eines jeden Versuchstages wurde eine Ratte mittels Äthernarkose in einem Glasinkubator betäubt und dann schnell und schmerzfrei dekapitiert. Nach einem Hautschnitt vom Hals bis zum Becken wurden durch zwei paravertebrale Längsschnitte Rippen und Muskulatur mit einer Präparierschere knapp lateral der Kostovertebralgelenke durchtrennt. Mit einem Querschnitt knapp oberhalb des Kreuzbeins wurde die Wirbelsäule abgesetzt und nach Entfernung anhängenden Muskelgewebes und Durchtrennen der Wirbelbögen der Wirbelkanal eröffnet. Die dorsale Hälfte der Wirbelsäule mit dem sich darin befindenden Rückenmark wurde sofort in eisgekühlte und mit Carbogengas gesättigte Nährlösung gegeben.

Unter einem Präpariermikroskop wurden Rückenmark und Rückenmarkshäute aus dem Wirbelkanal entfernt. Durch vorsichtigen Zug mit einer Mikropinzette an den abgerissenen Hinterwurzeln wurden die Spinalganglien herausgelöst und in ein Kulturschälchen mit eisgekühlter Nährlösung überführt.

### 4.2. Präparation der Spinalganglienneurone

Die Fortsätze der Ganglien sowie umgebendes Bindegewebe und Blutgefäße wurden mit einer Iridektomieschere entfernt. Die Spinalganglien wurden in ein weiteres Schälchen überführt, welches mit Carbogengas gesättigte Nährlösung enthielt, und wurden zur Steigerung der Enzymwirkung mit der Iridektomieschere zerschnitten. Danach wurden sie in kollagenasehaltige Nährlösung überführt und für 45 Minuten auf einem Laborrüttler im Brutschrank bei 37°C und 100% Luftfeuchte in Carbogengasatmosphäre inkubiert. In einem Teil der Experimente wurde in den letzten 10 Minuten Trypsin (Endkonzentration 5–10 mg/ml) zugegeben (siehe Abschnitt A.1).

Durch viermaliges Überführen in frische Nährlösung wurde die Enzymlösung anschließend ausgewaschen und die angedauten Ganglien durch Ansaugen und Durchspülen in

hitzeisolierten Pasteur-Pipetten absteigenden Durchmessers mechanisch vereinzelt (triiert).

Jeweils 200–500  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurde in Kulturschälchen gegeben und bei 100 % Luftfeuchte, 5 %  $\text{CO}_2$  und  $32^\circ\text{C}$  in einem Brutschrank für mindestens eine Stunde inkubiert. In dieser Zeit setzten sich die Zellen ab und hafteten am Boden des Kulturschälchens an.

Aufgrund der Unwägbarkeiten, die durch den Einsatz von nerve growth factor (NGF) bei der Kultivierung von Spinalganglienneuronen zu erwarten wären, wurden in dieser Arbeit dissoziierte Zellen in Kurzzeitkultur ohne Zugabe von NGF verwendet.

### 4.3. Versuchsaufbau

#### 4.3.1. Elektrophysiologischer Untersuchungsstand

Der Versuchsaufbau wurde auf einem schwingungsgedämpften Tisch installiert und in einen Rahmen gestellt, der mit einem Metallkäfig zur Minimierung von elektromagnetischen Störungen versehen war.

Ein inverses Mikroskop (Leica) mit dem daran befestigten Mikromanipulator (Sutter MP 285), der den Pipettenhalter und Vorverstärker (Headstage CV 201) trägt, wurde auf dem schwingungsgedämpften Innentisch, der Lösungswechsler am äußeren Rahmen befestigt.

Auf dem Objektisch des Mikroskops wurden in eine Aussparung Gewebekulturschalen eingesetzt, in denen die Nervenzellen von einer Extrazellulärlösung umgeben waren.

Oszilloskop, Computer, Steuerungsmodul des Mikromanipulators, Patch-clamp Verstärker, A/D-Wandler und Absaugpumpe wurden in einem geschirmten und geerdeten 19-Zoll-Schrank neben dem eigentlichen Stand untergebracht. Die Steuerungseinheiten für den Lösungswechsler, die Heizung und das Thermometer wurden auf der anderen Seite neben dem Stand aufgestellt.

#### 4.3.2. Elektrophysiologie

In den elektrophysiologischen Experimenten der vorgelegten Arbeit wurden mit dem patch-clamp-Verfahren Ganzzelleableitungen von Spinalganglienneuronen durchgeführt. Dabei wurden Membranströme in der Spannungsklemme (voltage-clamp-Verfahren, siehe Abschnitt 4.3.2.1) und Membranpotentiale in der Stromklemme (current-clamp-Verfahren, siehe Abschnitt 4.3.2.2) registriert.

Da in Verstärkerschaltungen Elektronen, in biologischen Systemen aber Ionen als Ladungsträger des elektrischen Stroms dienen, muss an den Kontaktpunkten, der Bad- und der Messelektrode, ein geeigneter Übergang vom einen in das andere System untergebracht werden. Hierfür werden üblicherweise Silber/Silberchloridelektroden verwendet, die Ströme in beide Richtungen ermöglichen: Entweder gehen Chloridionen unter Elektronenaufnahme in Lösung, oder sie verbinden sich an der Elektrode mit elementarem Silber unter Elektronenabgabe und schlagen sich als  $\text{AgCl}$  nieder [Numberger und Draguhn 1996, Seite 102]. Eine Elektrode, die in eine Salzlösung taucht und elektrisch

#### 4. Methoden

leitend mit einer anderen Elektrode verbunden ist, ist ein galvanisches Element. Um sich daraus ergebende störende Potentiale zu vermeiden, wird an beiden Elektroden ein Silber/Silberchloridsystem mit gleicher Chloridionenkonzentration verwendet.

Als indifferente Elektrode (Badelektrode) diente ein chlorierter Silberdraht. Dieser war über in ein Glasröhrchen gefülltes Agar-Agar-Gel (Agarbrücke) elektrisch mit der Extrazellulärlösung verbunden, um die Chloridkonzentration in unmittelbarer Umgebung der Elektrode konstant zu halten und um das Einwaschen toxischer Silberionen in die Messkammer zu verhindern [Numberger und Draguhn 1996, Seite 64].

Die zum Patchen verwendeten Glaspipetten wurden mit einem Elektrodenziehgerät (Micropipette Puller Typ P-87) hergestellt und dann mit Hilfe einer Elektrodenschmiede (Microforge) hitzepoliert, um die Oberfläche der Pipettenspitze zu glätten und möglicherweise anhaftende Verunreinigungen zu entfernen. Direkt nach dem Polieren wurden die Spitzen der Ableitpipetten in ein mit Intrazellulärlösung gefülltes Glas getaucht, um die Pipettenspitze zu füllen. Das eigentliche Füllen der Ableitpipette mit Intrazellulärlösung erfolgte später mittels einer auf einer Spritze befestigten dünnen Keramikkanüle. Um Verunreinigungen und Schwebstoffe in der Intrazellulärlösung zu vermeiden, wurde ein Filter zwischen der Spritze und der Keramikkanüle verwendet.

Die befüllte Ableitpipette wurde direkt am Vorverstärker befestigt, ein chlorierter Silberdraht diente hierbei als Messelektrode. Das Ausgangssignal des Vorverstärkers wurde von einem steuerbaren Hauptverstärker (Axopatch 200A) weiterverarbeitet und an ein Oszilloskop sowie über einen Analog/Digital-Wandler an einen Computer weitergeleitet, auf welchem die digitalisierten Daten gespeichert und ausgewertet werden konnten (siehe Abbildung 4.1).

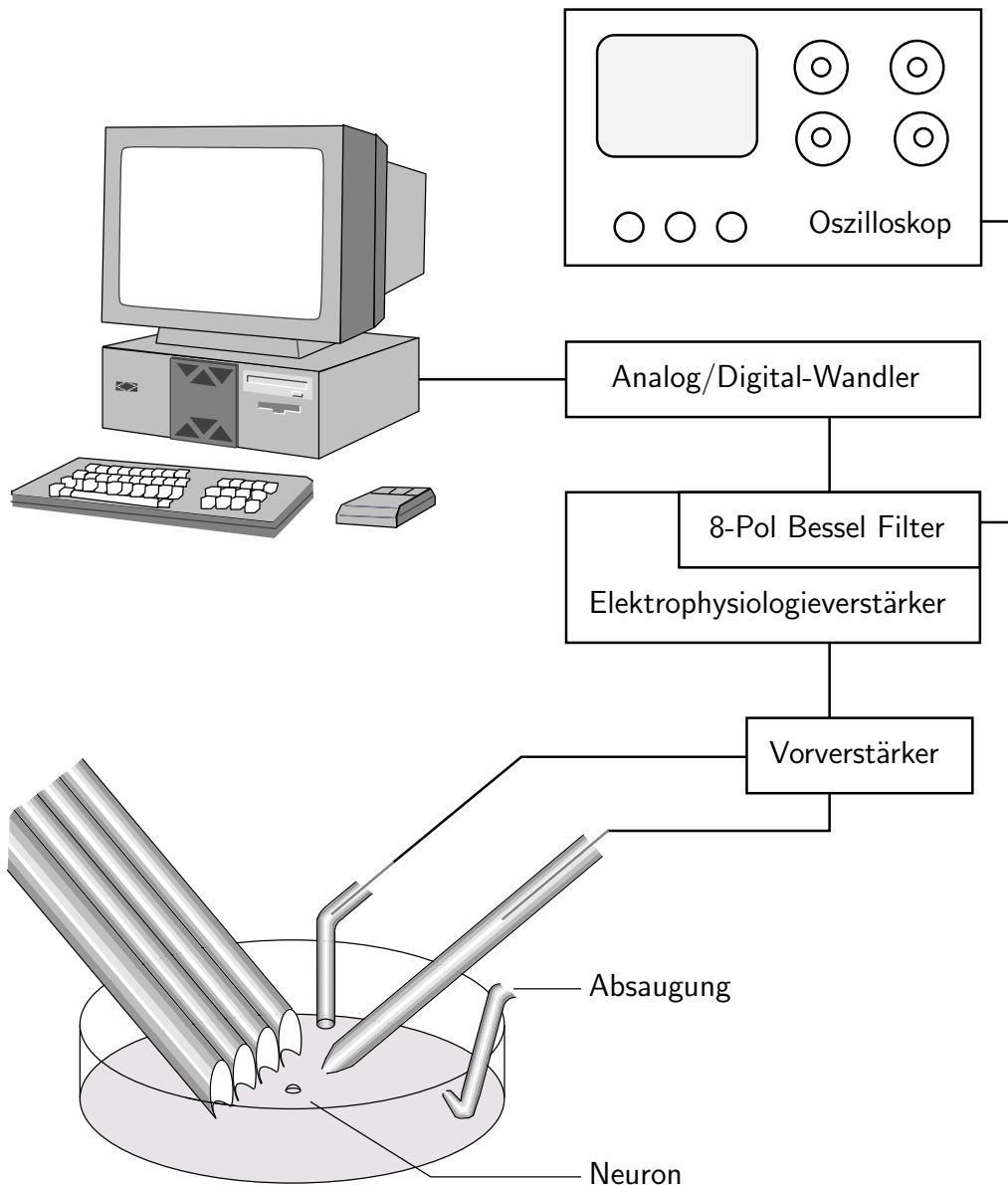
Die Digitalisierung der Daten erfolgte durchgängig mit einer Abtastrate von 4 kHz im voltage-clamp und 20 kHz im current-clamp Modus. Alle Signale wurden mit einem in den Hauptverstärker integrierten achtpoligen Besselfilter mit einer Grenzfrequenz von 2 kHz tiefpassgefiltert.

Vor dem Eintauchen der Ableitpipette in die Extrazellulärlösung wurde zunächst ein Überdruck von etwa 15 cm Wassersäule (etwa 1,47 kPa) auf die Pipette gegeben, um eine Verunreinigung zu vermeiden. Mit Hilfe der Brückenschaltung des Hauptverstärkers wurde der Pipettenstrom so gewählt, dass das Potentialgefälle zwischen Pipette und Badelektrode etwa 0 mV betrug.

Um den elektrischen Widerstand der gefüllten Ableitpipetten zu messen, wurden repetitiv rechteckförmige Spannungspulse von 5 mV auf die Ableitpipette appliziert. Der hierbei fließende Strom wurde mit Hilfe des angeschlossenen Oszilloskops bestimmt. Aus diesen Parametern wurde nach dem Ohm'schen Gesetz der Pipettenwiderstand berechnet, der bei 144 verwendeten Ableitpipetten 2,2–7,0 M $\Omega$  (im Mittel 3,7 M $\Omega$ , Standardabweichung 0,8 M $\Omega$ ) betrug.

Mit Hilfe des motorisierten Mikromanipulators wurde die Pipette anschließend dicht an die Zelloberfläche herangefahren. Dabei konnte ein leichter Anstieg des Pipettenwiderstandes beobachtet werden. Durch Anlegen eines Unterdruckes auf die Pipette wurde nun die Zellmembran an die Pipettenöffnung angesaugt, wobei der Pipettenwiderstand rapide anstieg und idealerweise einige Giga-Ohm erreichte (sogenannter „gigaseal“).

#### 4. Methoden



**Abbildung 4.1.:** Der Elektrophysiologieverstärker gibt die vom Vorverstärker kommenden Signale nach Filterung an ein Oszilloskop und an einen via Analog-Digital-Wandler angeschlossenen Computer weiter, auf welchem sie gespeichert und mittels geeigneter Software angezeigt und analysiert werden. In die Messkammer tauchen von links die vier parallelen Röhren des Lösungswechslers, die Ableitelektrode, von oben die Bad-elektrode und ganz rechts die Absaugung ein (siehe auch 5–9 in Abbildung 4.3).

## 4. Methoden

Um eine unkontrollierte Depolarisation der Zelle zu vermeiden, wurde vor dem Durchbrechen der Zellmembran eine Spannung von  $-60$  mV an die Pipette angelegt.

Durch vorsichtiges Erhöhen des Unterdruckes oder das Anlegen eines elektrischen Hochfrequenzpulses von einigen Millisekunden Dauer wurde nun der Membranfleck unter der Pipettenspitze zerstört und so eine direkte Verbindung zum Inneren der Zelle geschaffen.

Nach Durchbrechen der Zellmembran konnte ein verzögertes Erreichen des maximalen Stromes in Antwort auf den  $5$  mV Spannungspuls beobachtet werden. Bei der nun in den Stromkreis geschalteten Zelle handelt es sich elektrisch gesehen um die Verschaltung eines Widerstandes mit einem Kondensator (RC-Glied). Dabei entspricht der kapazitive Teil des RC-Gliedes im Wesentlichen der Membrankapazität und der resistive Teil dem seriellen Widerstand der Zelle [Numberger und Draguhn 1996, Seite 89]. Durch Kompensation dieser Effekte mittels einer speziellen Schaltung am Hauptverstärker wurden so die Membrankapazität und der serielle Widerstand bestimmt und zu mehr als  $80\%$  kompensiert.

Bei der elektrophysiologischen Ganzzellableitung gibt es zwei prinzipiell mögliche Verfahren, die Spannungsklemme (voltage-clamp-Verfahren) und die Stromklemme (current-clamp-Verfahren).

### 4.3.2.1. Das voltage-clamp-Verfahren

Beim voltage-clamp-Verfahren (Spannungsklemme) wird das Membranpotential der Zelle auf einem bestimmten Wert gehalten und der hierfür benötigte Strom (Haltestrom) bestimmt. Fließt nun aus anderer Quelle (zum Beispiel durch Öffnung von Ionenkanälen) ein Strom über die Membran der Zelle, so steigt der zum Halten des Membranpotentials benötigte Kompensationsstrom im gleichen Maß an. Der Membranstrom kann somit indirekt gemessen werden.

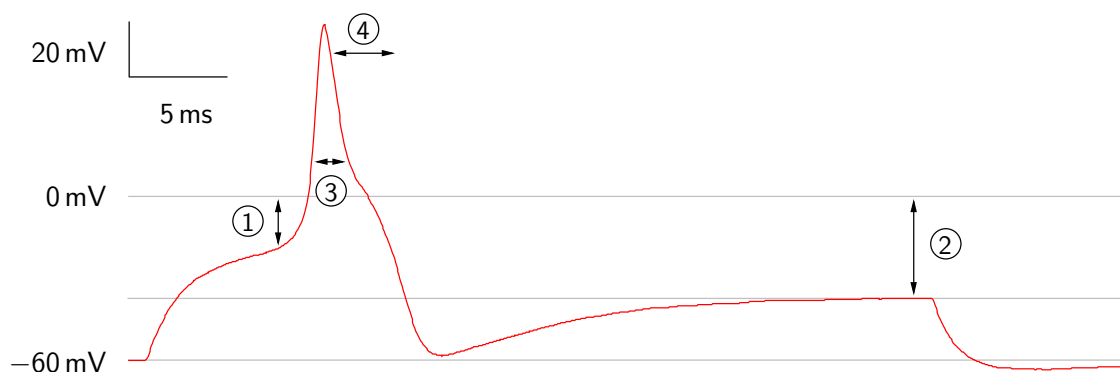
Durch offene Ionenkanäle strömen hauptsächlich positiv geladene Ionen in die Zelle, was zu einer Depolarisation führen würde; dies wird durch einen negativen Kompensationsstrom aus dem Verstärker ausgeglichen; Einwärtsströme positiv geladener Ionen erhalten somit ein negatives Vorzeichen, Auswärtsströme ein positives Vorzeichen.

Bei den hier vorgestellten Experimenten wurde ein Membranpotential von  $-60$  mV verwendet. Ausschließlich Zellen, die in Ruhe einen Haltestrom von höchstens  $-0,5$  nA benötigten, wurden in die weitere Auswertung einbezogen.

### 4.3.2.2. Das current-clamp-Verfahren

Beim current-clamp-Verfahren (Stromklemme) wird das Membranpotential bestimmt, während ein konstanter Strom auf die Zelle appliziert wird.

In den hier vorgestellten Experimenten wurden die Zellen durch Stromapplikation zunächst auf ein Membranpotential von  $-60$  mV gebracht und dann durch schrittweise rechteckförmige Strompulse von  $40$  ms Dauer depolarisiert (siehe Abbildung 4.2). Nach Überschreiten einer – für jede Zelle individuell bestimmten – Schwelle wird dabei ein Aktionspotential ausgelöst. Nur Zellen, bei denen ein überschießendes, also ein Mem-



**Abbildung 4.2.:** Ein typisches Aktionspotential eines Spinalganglienneurons. Folgende Parameter wurden bestimmt: 1: Aktionspotentialschwelle, 2: Größe des depolarisierenden Pulses und Grundlinie für die Höhe des Aktionspotentials 3: Breite des Aktionspotentials bei halber Amplitude, 4: Repolarisationszeit (Zeit der Repolarisation von 90 auf 10% der maximalen Amplitude). Zusätzlich wurde noch die zum Auslösen eines Aktionspotentials notwendige Stromstärke bestimmt.

branpotential von größer als 0 mV erreichendes Aktionspotential ausgelöst werden konnte, wurden für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen. Zusätzlich wurden noch das Vorhandensein einer Schulter sowie die Repolarisationszeit (an Stelle der Breite des Aktionspotentials) bestimmt. Die Breite des Aktionspotentials auf Höhe der halben Amplitude ist für Spinalganglienneurone kein geeigneter Parameter, da er oft, aber nicht immer, oberhalb der Schulter des Aktionspotentials liegt (siehe Abbildung 4.2).

### 4.3.3. Applikation der Hitzereize mit einem schnellen Lösungswechsler

Zur Applikation von Hitzereizen wurde ein schneller Lösungswechsler eingesetzt (siehe Abbildung 4.3). Durch Überspülen mit Extrazellulärlösung unterschiedlicher Temperatur wurden die Neurone auf die jeweils gewünschte Temperatur gebracht.

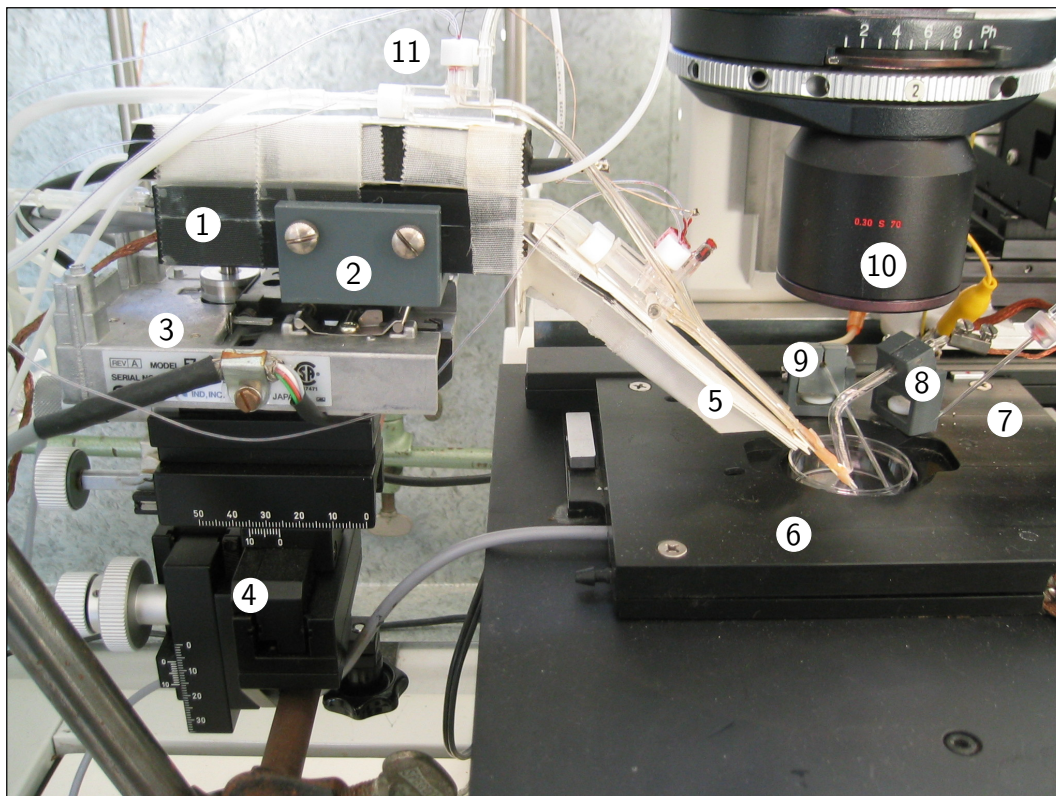
Vier Glasröhrchen mit einem Außendurchmesser von 1,6 mm und einem Innendurchmesser von 1,05 mm wurden parallel zueinander zusammengeklebt und am unteren Ende zweifach plan geschliffen (siehe Abbildung 4.1).

In diese Glasröhrchen wurden über speziell angefertigte T-Stücke je ein chlorierter Silberdraht zur Erdung und ein Thermofühler bis kurz vor den Auslass eingeführt. Jedes Röhrchen war mit einem separaten Infusionsschlauch verbunden.

Die Anordnung der Röhrchen samt Widerstandsheizung wurde auf einem Schlitten montiert und war mittels eines Schrittmotors parallel verschiebbar. Der Schrittmotor war mit einer Steuerelektronik verbunden, die es ermöglichte, die Anordnung jeweils um die Breite eines Röhrchens sprunghaft zu verschieben. Diese Sprünge konnten sowohl manuell, als auch durch einen TTL-Puls, der von der Aufzeichnungssoftware zu einem definierten Zeitpunkt erzeugt werden konnte, ausgelöst werden.

Diese Einheit aus Glasröhrchen, Heizung und verschiebbarem Schlitten, im folgenden als Lösungswechsler bezeichnet, wurde mittels eines mechanischen Mikromanipulators





**Abbildung 4.3.:** Detailansicht des schnellen Lösungswechslers. 1: Durchflusshheizung, 2: verschiebbarer Schlitten, 3: Schrittmotor mit Getriebe, 4: manueller Mikromanipulator, 5: parallel zusammengeklebte Glasröhrchen, 6: verschiebbarer Objektstisch mit Aufnahme für Gewebekulturschale, 7: Ableitpipette, 8: Badelektrode mit Agarbrücke, 9: Absaugung, 10: Kondensator des Mikroskops, 11: T-Stück für Erdung und Miniaturthermofühler

(Märzhäuser MM-33) so positioniert, dass die plane Unterfläche der Glasröhrchen etwa in der Mitte der Messkammer positioniert war.

Jedes der Röhrchen wurde aus einer 50 ml-Spritze gespeist, aus denen die Lösung zunächst nur durch die Schwerkraft getrieben und mittels eines Tropfenzählers steuerbar herausfloss. Im weiteren Verlauf der Experimente wurden Infusionspumpen verwendet, um eine konstante Flussrate von 1 ml/Minute zu erzielen.

Um zwischen Raumtemperlösung und Präinkubationslösung ohne zwischenzeitliche Erwärmung wechseln zu können, mussten die beiden nicht beheizten Röhrchen nebeneinander liegen. Daher wurden die zu den beiden äußeren Röhrchen führenden Schläuche durch ein Heizelement geführt, das auf 65–80°C erhitzt werden konnte. Durch den Abstand von etwa 15 cm bis zur Öffnung des Röhrchens, kühlte sich einerseits die Lösung auf 44–48°C ab, andererseits wurde das benachbarte Röhrchen hierbei auf 30–36°C erwärmt.

## 4. Methoden

Um die über die Zelle fließenden Lösungen wieder aus der Kammer zu entfernen, wurde auf der dem Lösungswechsler gegenüberliegenden Seite der Messkammer ein an eine Absaugpumpe angeschlossenes Glasröhrchen installiert (siehe Abbildung 4.1).

Da das Messen der Temperatur mit den Miniaturthermofühlern zu starken Störungen der elektrophysiologischen Ableitung führt, wurden die angegebenen Reiztemperaturen etwa drei Sekunden vor Beginn der Applikation gemessen. Um zu überprüfen, ob diese Temperatur mit derjenigen übereinstimmt, die an dem Ort in der Ableitkammer herrscht, an dem sich die Zelle befindet, wurden mittels eines dort positionierten Miniaturthermofühlers Kontrollmessungen durchgeführt. Die dabei gemessene Temperatur wich von der mit den Thermofühlern im Röhrchen gemessenen um weniger als 1°C ab.

Konstruktionsbedingt erlauben die Thermofühler zwar sehr exakte Temperaturbestimmungen, die zeitliche Auflösung des verwendeten Thermometers ist jedoch zu gering, um die schnelle Kinetik des applizierten Hitzereizes wiedergeben zu können [Schwarz *et al.* 2000].

Daher wurde die Kinetik in gesonderten Experimenten mittels offener Patchpipetten gemessen, die an Stelle der Zelle in der Ableitkammer positioniert wurden. An der sehr kleinen Grenzfläche zwischen der Intrazellulärlösung in der Pipette und der Extrazellulärlösung außerhalb derselben bildet sich nun ein elektrisches Potential (liquid junction potential) aus, das temperaturabhängig ist. Durch Messen dieses Grenzpotentials konnte der zeitliche Verlauf des Hitzereizes analysiert werden (siehe Abschnitt 5.1).

Eine quantitative Temperaturmessung ist mit dieser Methode allerdings langfristig nicht möglich, da mit der Zeit die Intrazellulärlösung in der Pipette durch die Extrazellulärlösung verdünnt wird, und somit das Konzentrationsgefälle der beteiligten Ionen immer weiter abfällt, ohne dass das Maß dieser Verdünnung genau bekannt wäre.

### 4.4. Pharmakologische Experimente

Um den Einfluss pharmakologischer Substanzen auf die hitzeinduzierten Ströme zu messen, wurden die Zellen mit drei aufeinander folgenden Temperatursprüngen von 30–36°C auf 43–48°C gereizt. Um reproduzierbare und somit vergleichbare Antworten zu erhalten und Tachyphylaxie, also eine Verringerung der Antwort von Reiz zu Reiz, zu vermeiden, wurden für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente kurze Hitzereize mit einer Dauer von einer Sekunde verwendet (siehe Abschnitt 1.5.4).

Das Interstimulusintervall betrug circa 40 Sekunden (Standardabweichung 7 Sekunden für das erste und 11 Sekunden für das zweite Intervall). Direkt vor dem zweiten Hitzereiz wurden die Neurone für zwei Sekunden mit Extrazellulärlösung überspült, die Kontrolllösung, 0,5 µM Capsaicin, 10 µM Natrium-Nitroprussid oder 10 µM YC-1 enthielt. Vor und nach diesen Applikationen wurden die Zellen mit normaler Extrazellulärlösung überspült.

Capsaicin wurde in Ethanol gelöst (siehe Abschnitt 3.5). Es wurde gezeigt, dass Ethanol in Konzentrationen von wenigstens 0,3 %, nicht jedoch in einer Konzentration von 0,1 %, Ströme an nozizeptiven Neuronen auslösen und hitze- und capsaicininduzierte Ströme verstärken kann [Trevisani *et al.* 2002]. Bei der in den vorgestellten Experimenten

## 4. Methoden

verwendeten Verdünnung lag die Ethanolkonzentration der Gesamtlösung bei 0,0125 %; es ist nicht zu erwarten, dass diese Konzentration einen Einfluss auf die Experimente haben könnte.

Natriumnitroprussid wurde ohne weiteres Lösungsmittel direkt in Extrazellulärlösung gelöst.

YC-1 und U0126 wurden in DMSO gelöst; die Konzentration von DMSO in der Gesamtlösung betrug in den vorgestellten Experimenten 0,1 %. Alle bekannten Effekte von DMSO auf Nervenzellen treten bei höheren Konzentrationen auf; zu nennen wären hier insbesondere die Reifungshemmung von Neuriten durch Konzentrationen von mehr als 1 % DMSO [Roisen 1975] und die Herabsetzung der Leitfähigkeit von C-Fasern durch Konzentrationen von mehr als 5 % [Evans *et al.* 1993].

Da für die verschiedenen Pharmaka verschiedene Vehikel verwendet wurden, enthielt die Kontrolllösung keinen Lösungsvermittler.

### 4.5. Größenbestimmung der Spinalganglienzellen

Der Durchmesser der Spinalganglienneurone wurde mittels eines skalierten Okulars ausgemessen. Bei ovalen Zellen wurde der Mittelwert aus dem größten und kleinsten Durchmesser bestimmt [Petersen und LaMotte 1991].

### 4.6. Qualitätskriterien

Für elektrophysiologische Experimente wurden ausschließlich runde Zellen mit einem Durchmesser von maximal 35  $\mu\text{m}$  verwendet, die keine sichtbaren Fortsätze aufwiesen, da bekannt ist, dass hitzesensible Zellen eher klein sind (siehe Abschnitt 1.5.1).

In die Auswertung einbezogen wurden nur Neurone, die

- bei  $-60\text{ mV}$  initial einen Haltestrom von betragsmäßig weniger als  $-0,5\text{ nA}$  benötigten,
- vor dem dritten Hitzereiz einen Haltestrom betragsmäßig weniger als  $-1\text{ nA}$  aufwiesen,
- ein überschießendes, also ein Membranpotential von größer als  $0\text{ mV}$  erreichendes Aktionspotential generieren konnten und
- bei denen drei direkt aufeinanderfolgende Messungen vor, mit und nach Substanzapplikation gelangen.

### 4.7. Auswertung

Soweit nicht anders angegeben verstehen sich alle Zahlenwerte als Mittelwert und Fehler des Mittelwertes (sem, standard error of mean). Zur Angabe von biologischen Variabilitäten wurde die Standardabweichung verwendet.

#### 4. Methoden

Als statistische Tests kamen der t-Test nach Student, ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen (ANOVA), und für *post-hoc* Analysen der least significant differences test (LSD) zur Anwendung; nicht symmetrische Verteilungen (Schiefe  $\geq 3$ ) wurden zuvor logarithmiert.

p-Werte kleiner 0,05 galten als statistisch signifikant. Eine  $\alpha$ -Adjustierung wurde nicht vorgenommen; die angegebenen Werte sind somit als deskriptiv anzusehen.

Digitalisierte Daten, die mit dem voltage-clamp-Verfahren (Spannungsklemme) gemessen wurden, wurden vor der weiteren Auswertung mit einem Gaußfilter mit einer Grenzfrequenz von 100 Hz tiefpassgefiltert. Daten, die aus Messungen mit offenen Pipetten stammen, wurden zusätzlich zur Reduktion von Netzbrummen mit einem schmalbandigen Sperrfilter (Bandsperrfilter, notch filter) mit einer Mittenfrequenz von 50 Hz und einer Bandbreite von 10 Hz gefiltert. Mit dem current-clamp-Verfahren gewonnene Daten wurden nicht zusätzlich gefiltert.

Bei der Bestimmung von maximalen Strömen wurde der Mittelwert des Signals über zwei Wellenberge und -täler an der Stelle des größten Ausschlages verwendet, um eine Überschätzung des maximalen Stromes durch nach der Filterung übriggebliebenes Rauschen zu minimieren.

Um die bei Experimenten mit langen Hitzereizen (Abschnitt 5.8) auftretende Zunahme des Haltestroms nicht fälschlicherweise dem hitzeinduzierten Strom zuzurechnen und statt dessen den tatsächlichen hitzeinduzierten Strom anzugeben, wurde der Haltestrom in der ersten Sekunde nach dem langen Hitzereiz vom Gesamtstrom subtrahiert.

Zur Darstellung von Stromverläufen (Abbildungen 5.7 und 5.15) wurde bei jeder Messung von allen Messpunkten der anfängliche Haltestrom subtrahiert und dann für jeden Messzeitpunkt der Mittelwert über alle Messungen gebildet.

Um ein Maß für die Ableitbarkeit von Neuronen zu bestimmen, wurde die Anzahl der durchschnittlich pro Versuchstag abgeleiteten Zellen durch die durchschnittliche Messzeit pro Versuchstag dividiert. Die Messzeit beginnt mit dem Suchen eines geeigneten Neurons und endet mit dem Einstellen der Experimente. Sie wurde aus dem automatisch erstellten Laborbuch des Messprogramms ausgelesen und betrug circa sechs Stunden je Versuchstag.

## 5. Ergebnisse

An 180 Zellen wurden die Stromantworten auf repetitive Hitzereize gemessen, 144 Zellen erfüllten die Qualitätskriterien und wurden weiter ausgewertet (siehe Abschnitt 4.6). Diese Zellen hatten einen Durchmesser zwischen 22 und 32,5  $\mu\text{m}$  (im Mittel 27,7  $\mu\text{m}$ , Standardabweichung 2,2  $\mu\text{m}$ ), eine Kapazität zwischen 9 und 40 pF (Mittelwert 21 pF, Standardabweichung 5 pF) und ein Ruhemembranpotential von  $-13$  bis  $-70$  mV (Mittelwert  $-33$  mV, Standardabweichung 10,5 mV). Der mittlere Haltestrom war  $-0,3$  nA (Standardabweichung 0,15 nA). Die Aktionspotentialschwelle lag bei  $-12,9$  mV (Standardabweichung 1,35 mV), um ein Aktionspotential auszulösen, waren im Mittel Ströme von mindestens 4,2 nA (Standardabweichung 1,7 nA) notwendig, (siehe auch Tabelle A.1). Fast alle Neurone (92 %) zeigten eine Schulter im Aktionspotential, die Repolarisationszeit betrug im Mittel 2,47 ms.

### 5.1. Eigenschaften des Hitzereizes

Die mittlere Temperatur der Extrazellulärlösung, mit der die Zellen vor der Applikation der Hitzereize überspült wurden, lag zwischen 31,7 und 35,1°C (siehe Tabelle 5.1). Die mittlere Reiztemperatur erreichte Werte zwischen 45,3 und 46,3°C. Die maximale Spannweite der applizierten Reize war 30–36°C für den Ausgangswert und 43,4–48°C für den Hitzereiz.

Nach dem Senden eines TTL-Pulses an die Steuerelektronik des Lösungswechslers vergeht eine gewisse Zeit, bis die Zelle tatsächlich von Extrazellulärlösung mit einer anderen Temperatur umflossen wird. Mit zehn offenen Ableitpipetten (2,7–5,5 M $\Omega$ ) wurden in 36 Messungen beim Wechsel zu heißer Lösung hin – zwischen dem Auslösen des Sprungs durch ein TTL-Signal (Marke A in Abbildung 5.1) und der ersten Antwort (Marke B in Abbildung 5.1) – Zeiten von  $69 \pm 5$  ms, beim Rücksprung  $67 \pm 4$  ms gemessen (Marken D und E in Abbildung 5.1). Das Maximum wurde nach  $292 \pm 29$  ms erreicht.

Die elektrische Antwort von gepatchten hitzesensiblen Zellen auf den Hitzereiz erfolgt  $180 \pm 11$  ms nach Auslösen des TTL-Pulses (Marke C in Abbildung 5.1). Sie fällt

	intra-ATP				Intra-BAPTA		U0126	
Präinkubation:	Kontrolle	Capsaicin	SNP	YC-1	Kontrolle	Capsaicin	Kontrolle	Capsaicin
Ausgangswert:	33,3 $\pm$ 0,1	33,0 $\pm$ 0,3	31,7 $\pm$ 0,2	34,0 $\pm$ 0,1	33,8 $\pm$ 0,1	34,3 $\pm$ 0,1	35,1 $\pm$ 0,1	34,6 $\pm$ 0,1
Präinkubation:	28,7 $\pm$ 0,2	29,5 $\pm$ 0,3	28,6 $\pm$ 0,3	29,4 $\pm$ 0,2	28,9 $\pm$ 0,2	30,5 $\pm$ 0,2	30,6 $\pm$ 0,3	30,7 $\pm$ 0,2
Hitzereiz:	45,3 $\pm$ 0,1	46,0 $\pm$ 0,1	45,7 $\pm$ 0,1	46,3 $\pm$ 0,1	45,3 $\pm$ 0,1	45,6 $\pm$ 0,1	46,1 $\pm$ 0,2	45,7 $\pm$ 0,1

**Tabelle 5.1.:** Übersicht über die Temperaturen der applizierten Hitzereize

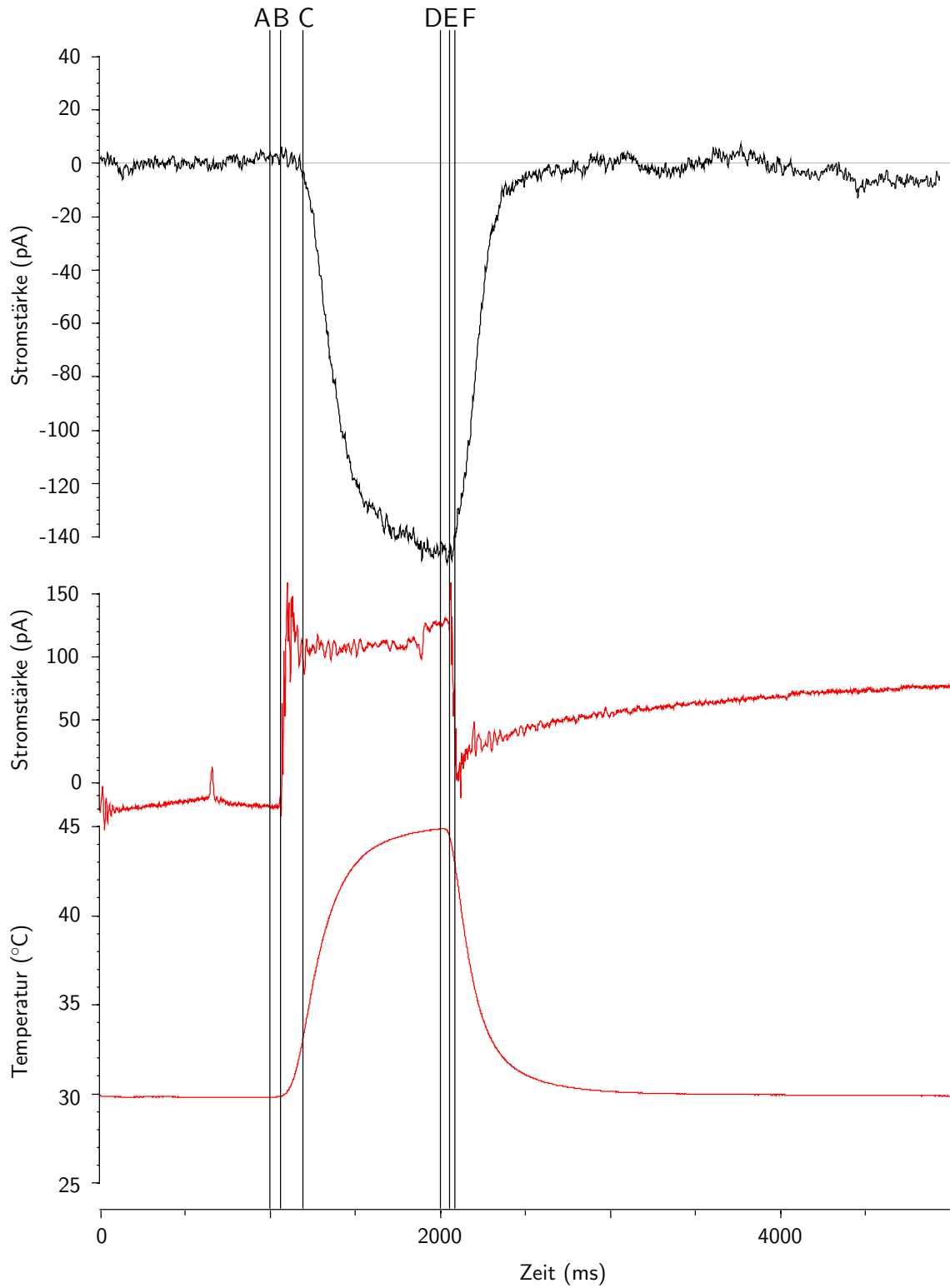
## 5. Ergebnisse

$80 \pm 8$  ms nach dem Rücksprungsignal (Marke F in Abbildung 5.1) stark ab und erreicht 10% des Ausgangswertes nach  $354 \pm 44$  ms.

Der zweite Reiz ist etwas komplexer aufgebaut (Abbildung 5.2). Vor dem Sprung zur heißen Extrazellulärlösung wird zunächst zu einem dritten Röhrchen gewechselt, um direkt vor dem Hitzereiz für zwei Sekunden Kontrolllösung oder Pharmaka zu applizieren. Da das Präapplikationsröhrchen weiter entfernt von dem beheizten Röhrchen liegt, ist seine Temperatur um  $3-4^{\circ}\text{C}$  niedriger als die des Kontrollröhrchens (siehe Tabelle 5.1).

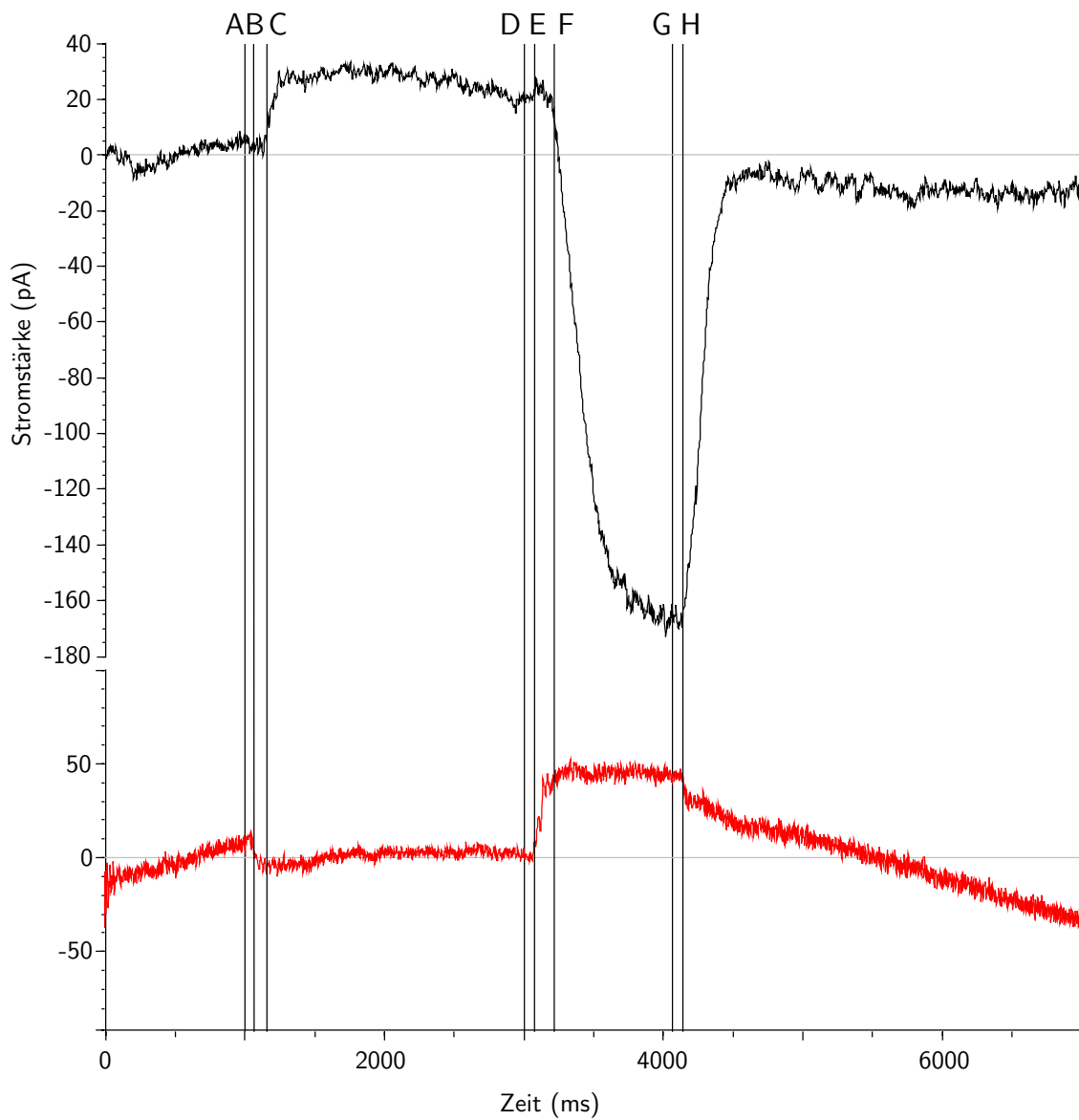
Die Verzögerung zwischen TTL-Signal und Temperaturwechsel an der Pipettenspitze war mit der des ersten Reizes vergleichbar und betrug in 25 Messungen mit acht Pipetten ( $2,7-5,5\text{ M}\Omega$ ) beim Wechsel zur Präinkubationslösung hin  $77 \pm 8$  ms (Marken A und B in Abbildung 5.2), zur heißen Lösung hin  $62 \pm 6$  ms (Marken D und E in Abbildung 5.2), und beim Rücksprung  $85 \pm 7$  ms (Marken G und H in Abbildung 5.2). Die maximale Temperatur wird nach  $214 \pm 43$  ms erreicht.

## 5. Ergebnisse



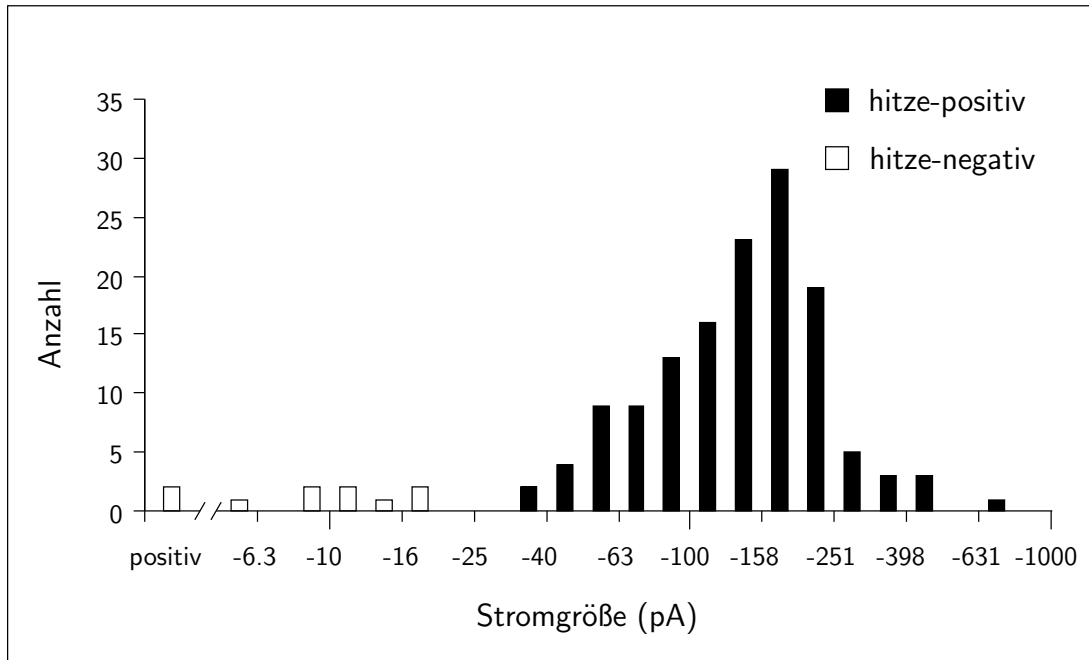
**Abbildung 5.1.:** Zeitverlauf der Hitzeantwort einer Nervenzelle (oben), der Antwort einer offenen Pipette (mitte) und eines Miniaturthermofühlers (unten) bei einem einsekündigen Hitzereiz

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.2.:** Zeitverlauf der Hitzeantwort einer Nervenzelle (oben) und der Antwort einer offenen Pipette (unten) bei einem einsekündigen Hitzereiz nach zwei Sekunden Präinkubation mit Kontrolllösung





**Abbildung 5.3.:** Histogramm der elektrischen Antworten von 144 Neuronen, die durch den ersten Hitzereiz ausgelöst wurden.

## 5.2. Hitzesensibilität

Die insgesamt 144 Neurone, die für die verschiedenen Untersuchungen herangezogen wurden, zeigten nicht normalverteilte Hitzeantworten auf den ersten applizierten Hitzereiz zwischen +9 und -650 pA. In einem logarithmisch aufgetragenen Histogramm der Stromgrößen (Abbildung 5.3) zeigt sich annähernd eine Normalverteilung der Stromantworten zwischen -40 pA und der größten Antwort (geschlossene Balken), sowie eine weitere Gruppe von Strömen, die deutlich darunter liegen (offene Balken). Diese Zellen antworteten auch auf nachfolgende Hitzeereize immer nur mit Einwärtsströmen von weniger als 40 pA oder zeigten Auswärtsströme.

Daher wurden alle Zellen, die auf den ersten Hitzereiz mit einem Einwärtsstrom von mehr als 40 pA ( $\log$ -Wert  $\geq 1,6$ ) antworteten, als Hitze-positive Zellen betrachtet.

Von 144 Zellen waren 10 nicht hitzesensibel (7%). Bemerkenswert ist, dass nicht hitzesensible Neurone sich auch in Eigenschaften, die noch vor der Applikation jeglicher Reize gemessen wurden, von hitzesensiblen unterscheiden; daher wurden sie bei weiteren Analysen ausgeschlossen.

Nicht hitzesensible Neurone hatten ein signifikant negativeres Ruhemembranpotential ( $-45 \pm 5$  versus  $-32 \pm 0,8$  mV;  $p < 0,001$ ) und benötigten einen kleineren Haltestrom ( $-0,15 \pm 0,06$  versus  $-0,31 \pm 0,01$  nA;  $p < 0,001$ ). Die Aktionspotentialschwelle nicht hitzesensibler Neurone ist negativer ( $-19 \pm 2,1$  versus  $-12,5 \pm 0,5$  mV;  $p < 0,001$ ) und sie lösten schon bei kleineren Strömen Aktionspotentiale aus ( $2,36 \pm 0,44$  versus  $4,34 \pm 0,14$  nA;

## 5. Ergebnisse

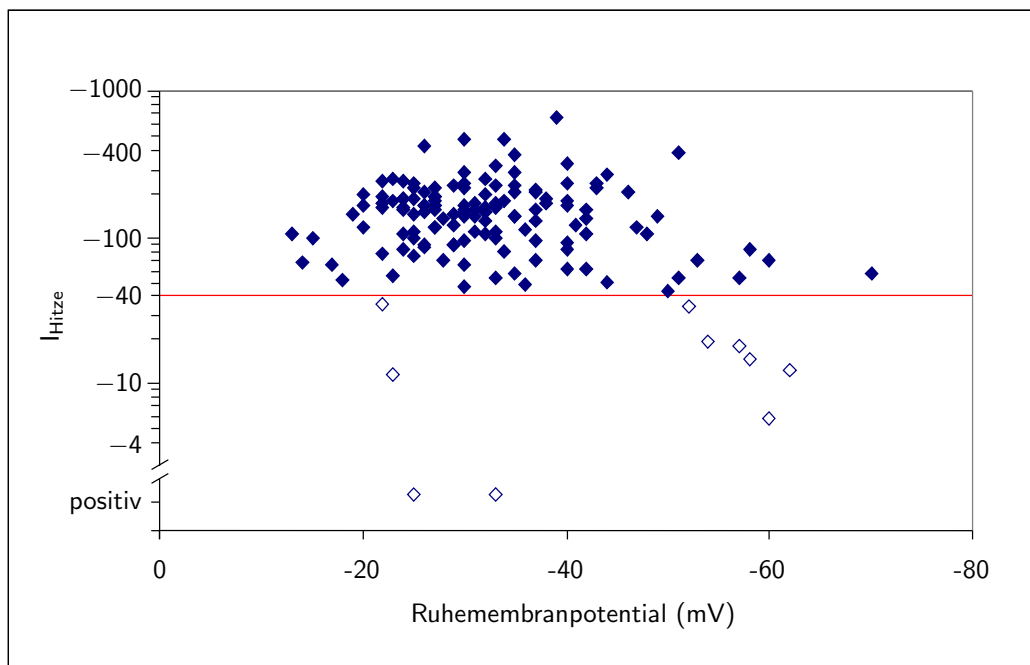
$p < 0,001$ ). Unterschiede in der Breite der Aktionspotentiale oder der Repolarisationszeit gab es nicht ( $2,69 \pm 0,14$  versus  $2,6 \pm 0,36$  beziehungsweise  $2,42 \pm 0,12$  versus  $3,0 \pm 0,45$ ); ebenso hatten auch alle nicht-hitze-sensiblen Neurone eine Schulter im Aktionspotential (siehe Abbildung 4.2).

Der hitzeinduzierte Strom ist kein Artefakt schlechter Messbedingungen, da es weder einen Zusammenhang mit dem Ruhemembranpotential, noch mit dem Haltestrom gibt.

### 5.2.1. Zusammenhang zwischen Ruhemembranpotential und hitzeinduziertem Strom

Der Logarithmus des hitzeinduzierten Stromes korreliert nicht mit dem Ruhemembranpotential ( $r = 0,35$ ); das gilt auch, wenn man die Gruppe der hitzesensiblen ( $r = 0,14$ ) oder der nicht hitzesensiblen Neurone ( $r = 0,34$ ) einzeln betrachtet.

Ohne die vorgenommene Logarithmierung sind die Korrelationskoeffizienten noch niedriger; derjenige für alle Neurone ( $r = -0,15$ ) ebenso wie die Koeffizienten für die Gruppe der hitzesensiblen ( $r = -0,04$ ) oder der nicht hitzesensiblen ( $r = 0,13$ ) Neurone allein.



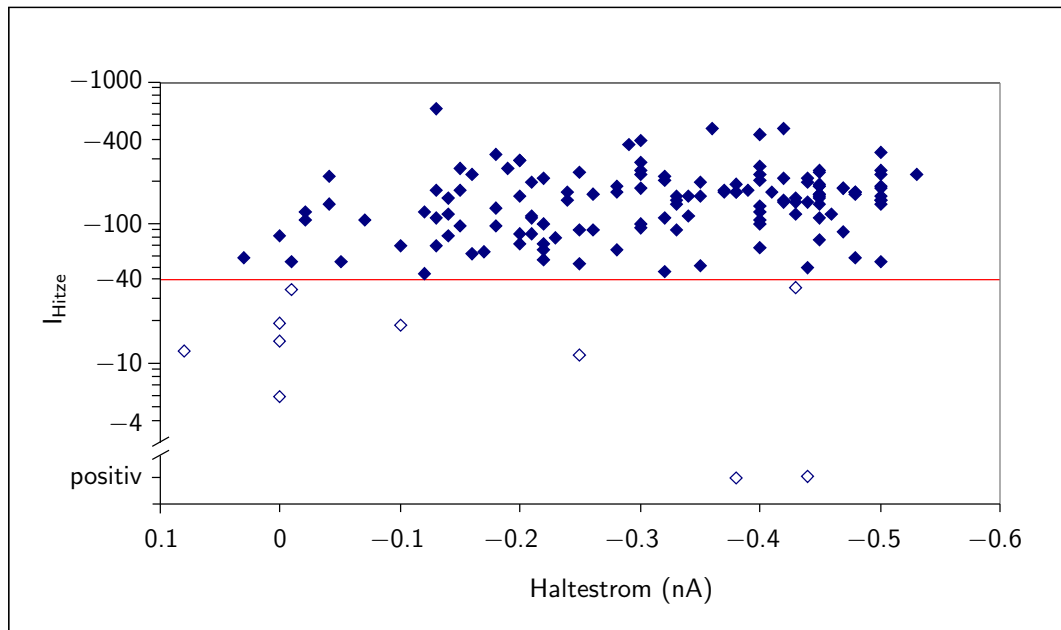
**Abbildung 5.4.:** Der hitzeinduzierte Strom korreliert nicht mit dem Ruhemembranpotential. Die rote Linie gibt die Schwelle für Hitzesensibilität an.

### 5.2.2. Zusammenhang zwischen Haltestrom und hitzeinduziertem Strom

Der Logarithmus des hitzeinduzierten Stromes korreliert nicht mit dem Haltestrom der Neurone ( $r = -0,42$ ); das gilt auch, wenn man die Gruppe der hitzesensiblen ( $r = 0,26$ ) oder der nicht hitzesensiblen Zellen ( $r = -0,39$ ) einzeln betrachtet.

## 5. Ergebnisse

Auch hier sind die Korrelationskoeffizienten ohne die vorgenommene Logarithmierung noch niedriger, sowohl für alle ( $r=0,23$ ), als auch für die Gruppe der hitzesensiblen ( $r=0,16$ ) und der nicht hitzesensiblen Zellen ( $r=-0,31$ ).



**Abbildung 5.5.:** Der hitzeinduzierte Strom korreliert nicht mit dem Haltestrom. Die rote Linie gibt die Schwelle für Hitzesensibilität an.

### 5.3. Antworten auf Hitzereize

Drei aufeinander folgende Hitzereize wurden an 144 Neuronen mit einem Interstimulusintervall von  $40 \pm 1$  Sekunden (Spannweite 26–68 bzw. 29–99 Sekunden) appliziert. Insgesamt acht verschiedene Kombinationen von Pharmaka wurden verwendet (siehe Tabelle 5.2).

In der Kontrollgruppe mit 30 Neuronen waren 25 Neurone (83 %) hitzesensibel; die Maxima der hitzeinduzierten Ströme in diesen Zellen betragen im Mittel  $-152 \pm 16$  pA,  $-167 \pm 17$  pA und  $-178 \pm 17$  pA (vergleiche Abbildung 5.6, weiße Balken und Abbildung 5.7, Reihe A).

Das Maximum der hitzeinduzierten Ströme erreichten die Zellen im Mittel nach  $789 \pm 40$  ms,  $764 \pm 45$  ms und  $767 \pm 35$  ms. Bis 5 ms vor Ende des Hitzereizes nahmen die mittleren Hitzeantworten im Sinne einer Inaktivierung um 12 % ab und betragen noch  $-135 \pm 16$  pA,  $-145 \pm 19$  pA und  $-158 \pm 18$  pA.

Mit der hier vorgestellten Methode lassen sich bei Spinalganglienneuronen repetitiv reproduzierbare hitzeinduzierte Einwärtsströme erzielen.

Präinkubation:	intra-ATP				Intra-BAPTA		U0126	
	Kontrolle	Capsaicin	SNP	YC-1	Kontrolle	Capsaicin	Kontrolle	Capsaicin
hitzesensibel:	25	26	19	30	6	13	3	12
nicht hitzesensibel:	5	1	3	1	0	0	0	0
<b>Gesamt:</b>	30	27	22	31	6	13	3	12

**Tabelle 5.2.:** Übersicht über die 144 abgeleiteten Spinalganglienneurone

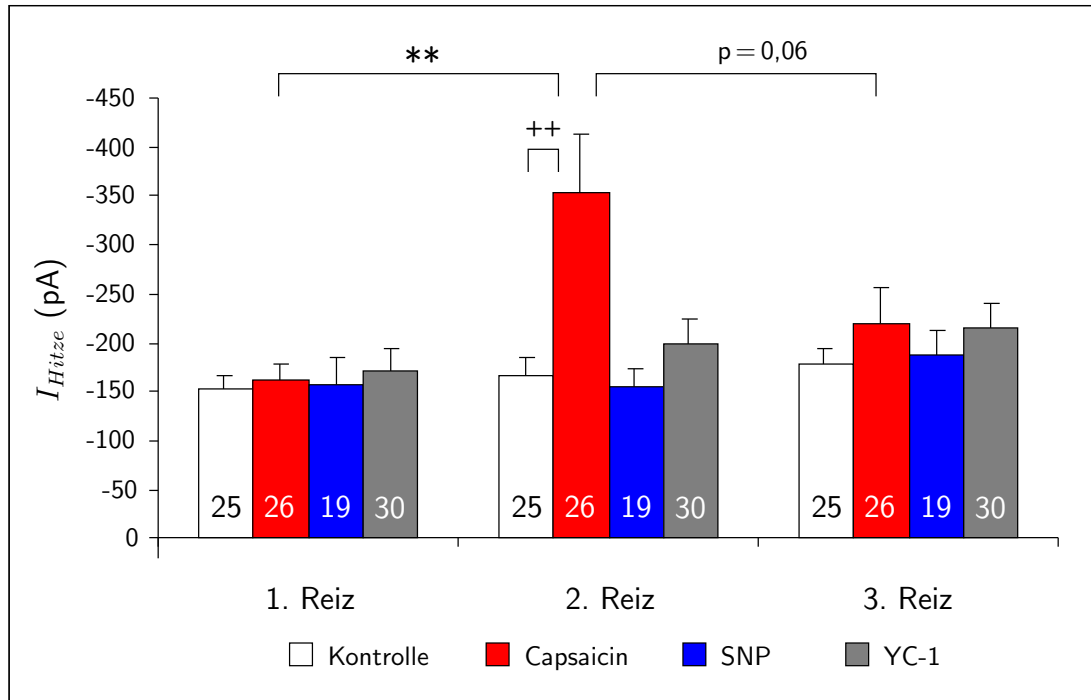
### 5.4. Sensibilisierung des hitzeinduzierten Stroms

Eine Gruppe von 26 Neuronen wurde für zwei Sekunden vor dem zweiten Hitzestimulus mit  $0,5 \mu\text{M}$  Capsaicin superfundiert (Abbildung 5.6, rote Balken und Abbildung 5.7, Reihe B). Dies vergrößerte signifikant ( $p < 0,005$ , t-Test) den zweiten hitzeinduzierten Strom auf das  $2,65 \pm 0,55$ -fache. Dieser Effekt zeigte eine inkomplette Erholung ( $-161 \pm 17$  pA,  $-353 \pm 60$  pA und  $-220 \pm 37$  pA; erste versus dritte Antwort  $p = 0,03$ ; zweite versus dritte Antwort  $p = 0,06$ , t-Test).

Die Präinkubation mit Capsaicin hatte keinen Einfluss auf den Zeitverlauf der Ströme; die maximale Antwort wurde nach  $749 \pm 44$  ms,  $712 \pm 45$  ms respektive  $799 \pm 58$  ms erreicht. Auch hier nahmen die hitzeinduzierten Ströme zum Ende des Hitzereizes hin etwas ab (Reduktion um maximal 13 %;  $-142 \pm 17$  pA,  $-306 \pm 50$  pA und  $-206 \pm 37$  pA; vergleiche auch Abbildung 5.7).

Die Applikation des NO-Donors Natriumnitroprussid (SNP,  $10 \mu\text{M}$ ) bei 19 Neuronen hatte keinen Einfluss auf die Größe des hitzeinduzierten Stromes (Abbildung 5.6, blaue Balken;  $-158 \pm 27$  pA,  $-155 \pm 20$  pA und  $-188 \pm 25$  pA).

## 5. Ergebnisse



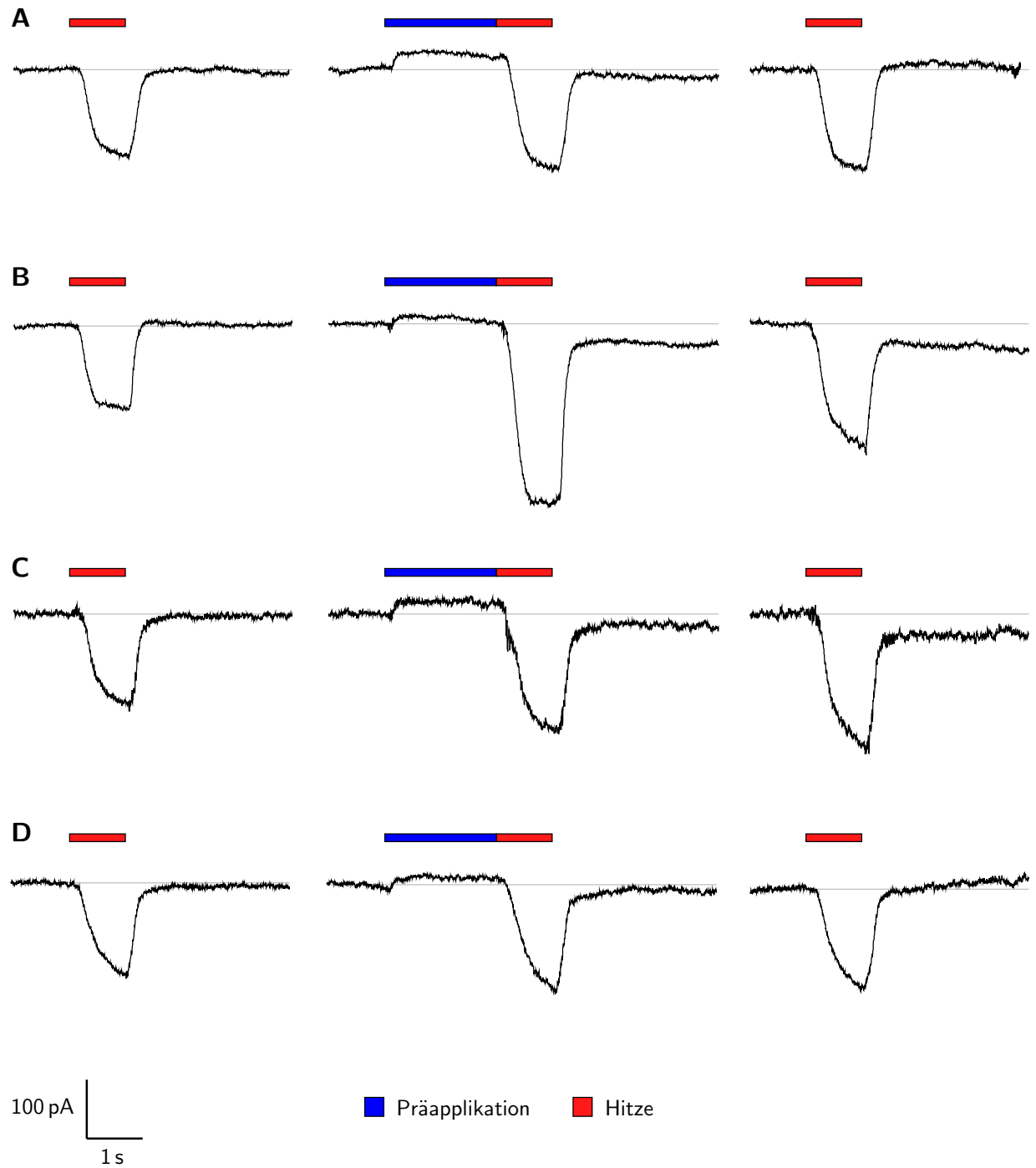
**Abbildung 5.6.:** Applikation von Capsaicin, nicht jedoch von Stickstoffmonoxid oder YC-1 für 2 Sekunden, sensibilisiert reversibel die Hitzeantworten von Spinalganglienneuronen. \*\* versus erste Antwort  $p < 0,005$ , t-Test für verbundene Stichproben; ++ versus zweite Antwort der Kontrollgruppe  $p < 0,01$ , t-Test; erste versus dritte Antwort  $p = 0,06$ , t-Test für verbundene Stichproben

Das Maximum der Ströme wird kurz vor Ende des Reizes nach  $633 \pm 63$  ms,  $734 \pm 57$  ms respektive  $709 \pm 54$  ms erreicht; danach kommt es zu einer Inaktivierung von 8–12 % auf Ströme von  $-147 \pm 29$  pA,  $-138 \pm 20$  pA und  $-165 \pm 25$  pA.

Auch YC-1 ( $10 \mu\text{M}$ ), ein Aktivator der Guanylatzyklase, hatte in 30 Zellen keinen signifikanten Einfluss auf den hitzeinduzierten Strom (graue Balken;  $-171 \pm 22$  pA,  $-198 \pm 25$  pA und  $-215 \pm 26$  pA).

Das Maximum der Ströme wird kurz vor Ende des Reizes nach  $786 \pm 29$  ms,  $846 \pm 21$  ms respektive  $834 \pm 29$  ms erreicht; danach kommt es zu einer Inaktivierung von 6–8 % auf Ströme von  $-158 \pm 22$  pA,  $-187 \pm 24$  pA und  $-203 \pm 25$  pA.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.7.:** Gemittelte Hitzeantworten nach Stimulation mit Hitze (roter Balken) und Präinkubation vor dem zweiten Reiz (blauer Balken). **A:** Kontrollgruppe ( $n = 25$ ), **B:** zusätzlich Präinkubation von Capsaicin ( $n = 26$ ), **C:** mit BAPTA in der Intrazellulärlösung ( $n = 6$ ), **D:** mit BAPTA und Präinkubation von Capsaicin ( $n = 13$ ).

## 5.5. Der capsaicininduzierte Strom

Die technisch bedingte Abkühlung (etwa 3–4°C) während der Präinkubationsphase (Abbildung 5.7, blauer Balken) verursachte in 25 Zellen der Kontrollgruppe einen Auswärtsstrom von  $32 \pm 9$  pA (siehe Abbildung 5.7, Reihe A). Dieser Strom zeigte eine gewisse Inaktivierung und betrug in den letzten 5 ms vor Ende der Präinkubationsphase im Mittel  $+19 \pm 8$  pA. Dieser Strom korrelierte nicht mit der zweiten Hitzeantwort oder der Änderung von der ersten zur zweiten Antwort.

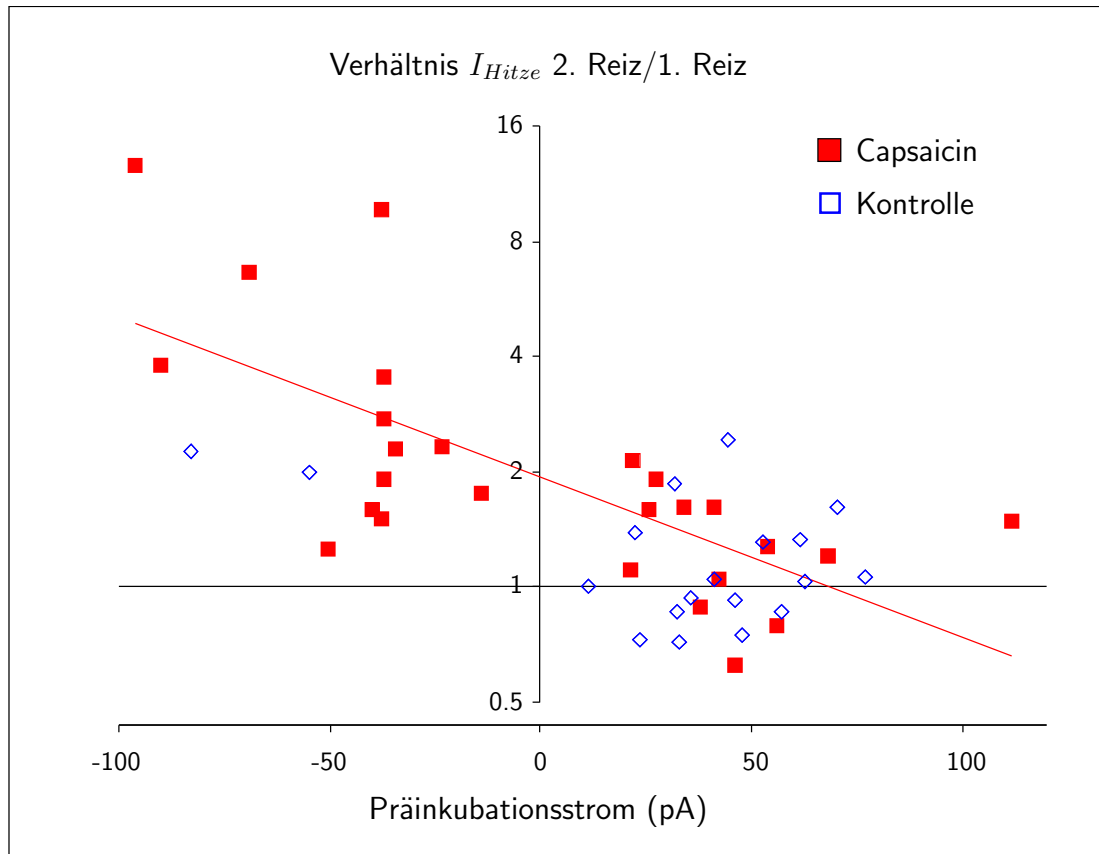
Die 26 Zellen, die mit Capsaicin ( $0,5 \mu\text{M}$ ) präinkubiert wurden, (Reihe B in Abbildung 5.7) zeigten einen signifikant kleineren Strom von  $-1 \pm 10$  pA ( $p < 0,01$ , LSD *post-hoc* Test). Die Präinkubation mit Capsaicin muss also einen Effekt auf die Zellen haben, der diesen Auswärtsstrom (zufälligerweise) genau aufhebt, das heißt Präinkubation mit Capsaicin bewirkt einen kleinen Einwärtsstrom von etwa 33 pA. Dieser Strom zeigte während der Präinkubation keine signifikante Veränderung; kurz vor Ende der Präinkubation lag der resultierende Gesamtstrom immer noch bei  $0 \pm 8$  pA ( $p = 0,85$ ; t-Test für verbundene Stichproben).

Die Größe dieses capsaicininduzierten Einwärtsstromes korreliert mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = -0,7$  signifikant ( $p < 0,001$ ) mit dem Logarithmus des Verhältnisses von zweiter zu erster Hitzeantwort (siehe Abbildung 5.8). Das Verhältnis wurde logarithmiert, da Verhältnisse immer nicht-normalverteilt sind; außerdem ist die Korrelation mit dem nicht logarithmierten Verhältnis etwas schlechter ( $r = -0,6$ ).

Bei einer stufenweisen Analyse der partiellen Korrelationskoeffizienten erklärt dieser capsaicininduzierte Strom die Größe der zweiten Hitzeantwort besser, als sie durch die Größe der ersten Antwort erklärt wird. Die partiellen Korrelationskoeffizienten betragen 0,67 ( $p < 0,001$ ) für den capsaicininduzierten Strom, respektive 0,51 ( $p < 0,01$ ) für die Größe der ersten Antwort, bei einer Gesamtkorrelation von 0,71 ( $p < 0,001$ ).

In allen anderen Gruppen korrelierte der Strom während der Präinkubation nicht mit der Änderung der Antwort vom ersten zum zweiten Stimulus; der nicht signifikante partielle Korrelationskoeffizient beträgt 0,22 ( $p = 0,87$ ).

Die Größe der zweiten Hitzeantwort korreliert in allen Gruppen außer der Capsaicin-Gruppe ausschließlich mit der Größe der ersten Hitzeantwort ( $r = 0,73$ ,  $p < 0,0001$ , Analyse der Partialkorrelationen).



**Abbildung 5.8.:** Die Sensibilisierung durch Capsaicin korreliert logarithmisch mit der Größe des durch Capsaicin induzierten Stromes während der Präinkubation. Die rote Linie entspricht der Regressionsgeraden für Capsaicin ( $r = -0,7$ ,  $p < 0,001$ ). Die Regression in der Kontrollgruppe war nicht signifikant ( $r = -0,29$ ).



## 5.6. Einfluss der intrazellulären Calciumkonzentration

Für die Sensibilisierung hitzeinduzierter Ströme gibt es zwei mögliche Mechanismen. Einerseits könnte die gleichzeitige Aktivierung des Rezeptors durch einen chemischen Liganden und durch Hitze den induzierten Strom durch direkte Interaktion am Rezeptor verstärken.

Andererseits soll eine durch capsaicininduzierte Ströme ausgelöste Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration sensibilisierend auf hitzeinduzierte Ströme wirken [Guenther *et al.* 1999].

Um den Einfluss der intrazellulären Konzentration freier Calciumionen auf die Sensibilisierung hitzeinduzierter Ströme untersuchen zu können, wurde der Intrazellulärlösung BAPTA (10 mM), ein sehr schneller und selektiver Calciumchelator zugesetzt [Tsien 1980, Marks und Maxfield 1991].

Das rasche Abfangen freier intrazellulärer Calciumionen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die hitzeinduzierten Ströme von 6 Zellen unter Kontrollbedingungen (Abbildung 5.7, Reihe C und Abbildung 5.9, weiße versus blaue Balken). Die Maxima der hitzeinduzierten Ströme betragen  $-153 \pm 29$  pA,  $-205 \pm 32$  pA und  $-221 \pm 46$  pA.

Die Maxima der hitzeinduzierten Ströme wurden erst am Ende des Hitzereizes nach  $899 \pm 22$  ms,  $928 \pm 21$  ms respektive  $938 \pm 21$  ms erreicht. Dadurch war nur noch eine Inaktivierung von 3,5 % zu beobachten ( $-148 \pm 29$  pA,  $-200 \pm 31$  pA und  $-221 \pm 51$  pA).

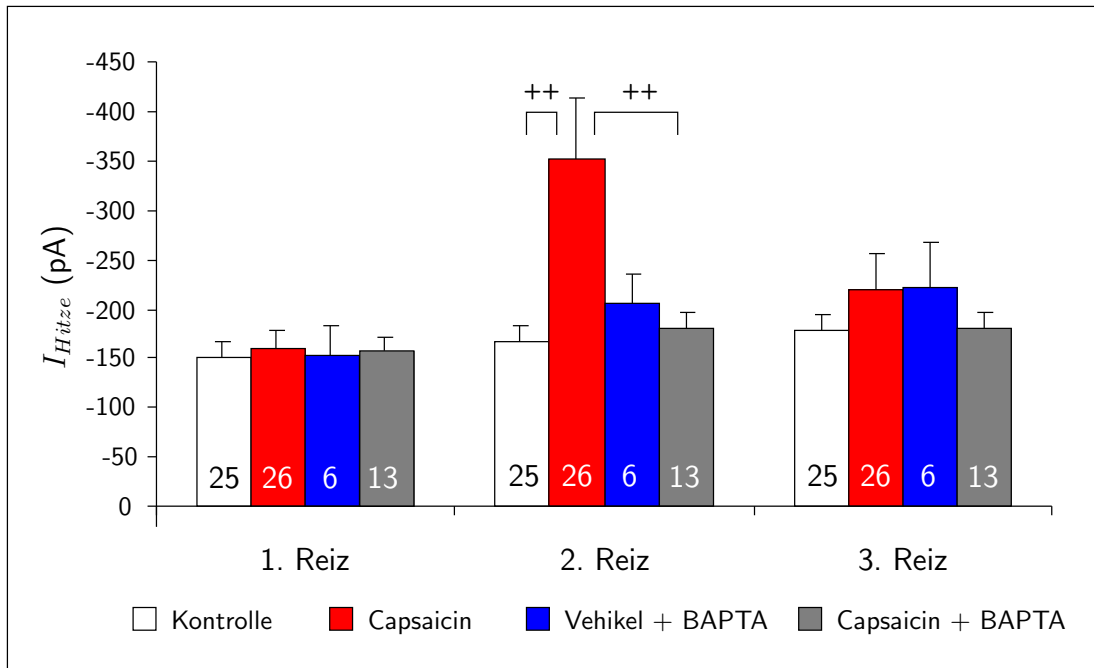
Auch die kleinen abkühlungsbedingten Ströme (Maximum  $+32 \pm 5$  pA; 5 ms vor Ende der Präinkubation  $+17 \pm 7$  pA; Unterschied nicht signifikant) oder capsaicininduzierten Ströme (Maximum  $+4 \pm 13$  pA; 5 ms vor Ende der Präinkubation  $+8 \pm 9$  pA; Unterschied nicht signifikant) wurden durch BAPTA nicht beeinflusst und unterschieden sich sowohl in der Kontroll- als auch in der Capsaicin-Gruppe nicht signifikant von den Werten ohne BAPTA ( $+32 \pm 5$  versus  $+32 \pm 9$  pA,  $p = 0,89$  und  $+4 \pm 13$  versus  $-1 \pm 10$  pA  $p = 0,74$ , t-Test).

Die intrazelluläre Applikation von BAPTA verhinderte allerdings in 13 Neuronen vollständig die Sensibilisierung des hitzeinduzierten Stromes durch Präinkubation mit Capsaicin vor dem zweiten Hitzereiz (Abbildung 5.7, Reihe D und Abbildung 5.9, graue Balken; maximale Ströme  $-159 \pm 14$  pA,  $-181 \pm 16$  pA,  $-181 \pm 15$  pA).

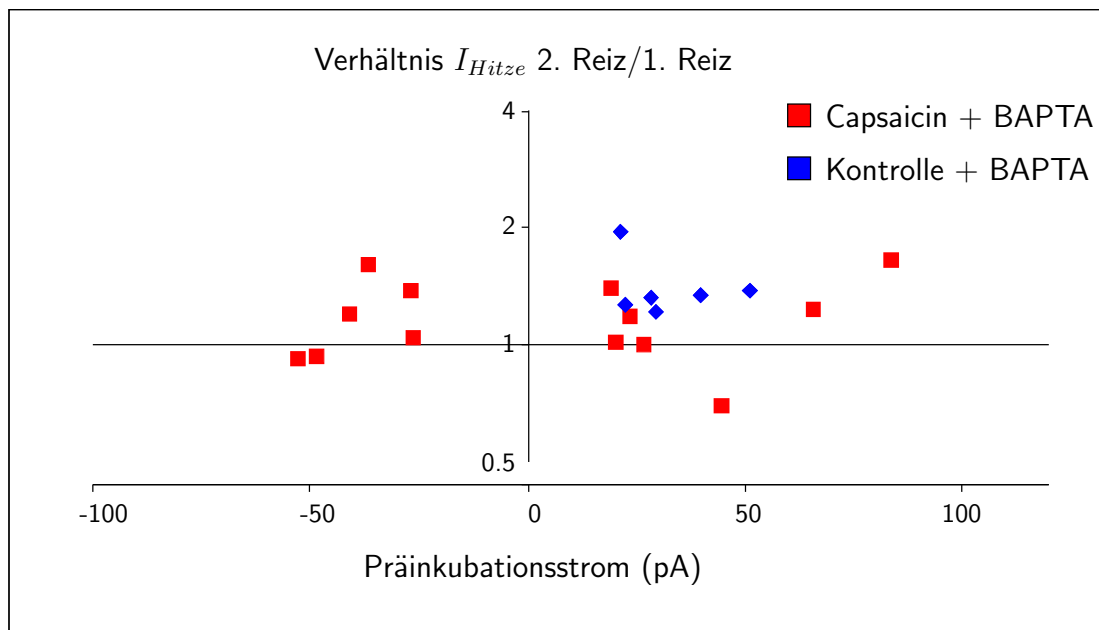
Auch hier erreichten die hitzeinduzierten Antworten ihr Maximum gegen Ende des Hitzereizes nach  $925 \pm 14$  ms,  $936 \pm 20$  ms und  $915 \pm 25$  ms und inaktivierten maximal 3 % auf  $-155 \pm 14$  pA,  $-176 \pm 16$  pA und  $-175 \pm 17$  pA.

Durch BAPTA wurde die Korrelation zwischen capsaicininduziertem Strom und Steigerung der zweiten Hitzeantwort aufgehoben (siehe Abbildung 5.10).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.9.:** Die Sensibilisierung der Hitzeantworten durch Capsaicin ist abhängig von einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. ++ Capsaicin versus zweite Antwort der Kontrollgruppe  $p < 0,01$ , t-Test; ++ Capsaicin versus Capsaicin und BAPTA  $p = 0,01$ , t-Test



**Abbildung 5.10.:** Obwohl ein capsaicininduzierter Strom ausgelöst wird, ist die Sensibilisierung unter dem Einfluss von BAPTA aufgehoben.

## 5.7. Beteiligung der intrazellulären MEK/ERK-Kaskade

Ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration löst die Sensibilisierung hitzeinduzierter Ionenströme aus; vermutlich durch Aktivierung intrazellulärer Proteinkinasen. Die MEK/ERK-Kaskade ist eine durch Anstieg der Calciumionenkonzentration auslösbare Signalkaskade, die in nozizeptiven Neuronen exprimiert wird und deren Aktivität bei peripherer Sensibilisierung *in vivo* erhöht ist [Averill *et al.* 2001, Dai *et al.* 2002]. ERK wird in TRPV1-positiven Spinalganglienneuronen *in vivo* unter anderem durch Behandlung mit Capsaicin aktiviert; diese Aktivierung ist mit U0126 hemmbar und reduziert capsaicininduzierte Hyperalgesie [Dai *et al.* 2002].

Um eine mögliche Beteiligung der ERK/MEK-Kaskade bei der Sensibilisierung des hitzeinduzierten Stromes zu untersuchen, wurde der MEK-Inhibitor U0126 (10  $\mu$ M) zur Lösung gegeben, welche die Zellen bei Raumtemperatur umspült.

Unter Zugabe von U0126 zeigten 3 Zellen unter Kontrollbedingungen hitzeinduzierte Ströme von  $-150 \pm 50$  pA,  $-180 \pm 61$  pA und  $-197 \pm 66$  pA.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der hitzeinduzierten Ströme zwischen den Zellen mit U0126 und den Zellen der Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p=0,96$ ,  $p=0,8$ ,  $p=0,73$  1.-3. Reiz Kontrolle vs. U0126, t-Test).

Das Maximum der hitzeinduzierten Ströme wurde nach  $770 \pm 128$  ms,  $898 \pm 46$  ms und  $968 \pm 15$  ms erreicht. Es kam nicht zu einer Inaktivierung der hitzeinduzierten Ströme; 5 ms vor Ende des Hitzereizes wurden Stromstärken von  $-150 \pm 52$  pA,  $-178 \pm 66$  pA und  $-195 \pm 66$  pA gemessen.

Während der Präinkubation mit Kontrolllösung kam es zu einem Auswärtsstrom von  $+31 \pm 5$  pA; dieser Strom inaktivierte signifikant bis zum Ende der Präinkubation auf  $+23 \pm 4$  pA ( $p=0,04$ , t-Test für verbundene Stichproben).

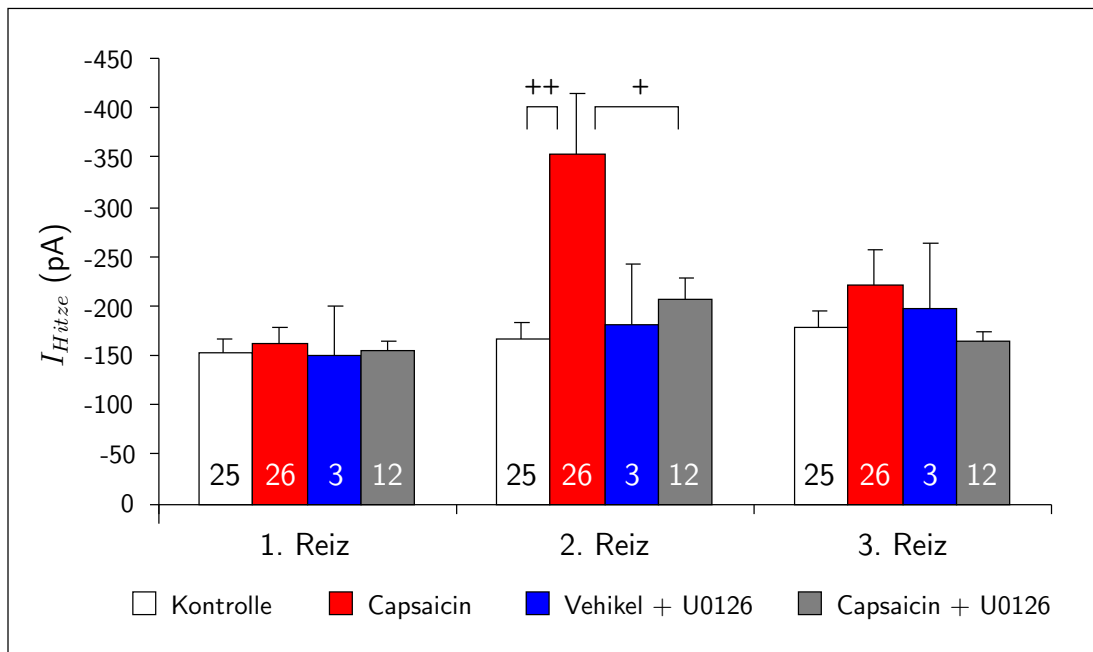
Bei Applikation von U0126 und Präinkubation von Capsaicin vor dem zweiten Hitzereiz war bei 12 untersuchten Zellen die capsaicininduzierte Sensibilisierung hitzeevozierter Ströme aufgehoben ( $-154 \pm 11$  pA,  $-208 \pm 21$  pA und  $-163 \pm 9$  pA).

In der Statistik zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit U0126 ( $p=0,89$   $p=0,6$ ,  $p=0,38$ , 1.-3. Reiz U0126-Kontrolle versus U0126 und Capsaicin, t-Test) oder ohne U0126 ( $p=0,94$   $p=0,16$ ,  $p=0,58$ , 1.-3. Reiz U0126 und Capsaicin versus Kontrolle, t-Test). Es findet sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Capsaicingruppe mit und ohne U0126 ( $p=0,03$ , 2. versus 2. Reiz, t-Test).

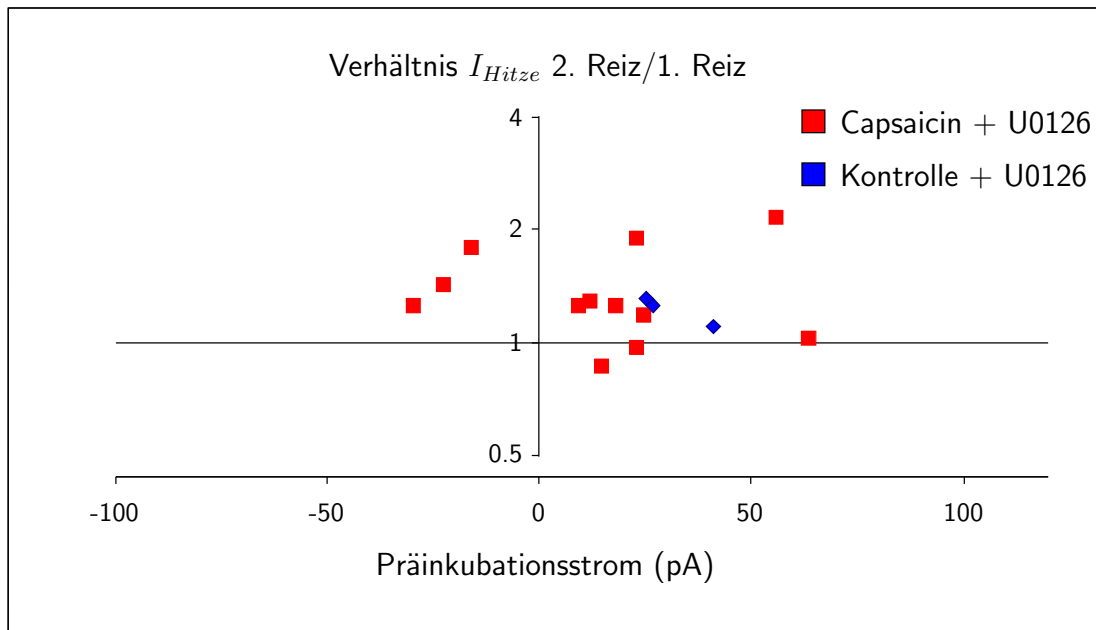
Die hitzeinduzierten Ströme erreichten ihr Maximum nach  $792 \pm 50$  ms,  $754 \pm 37$  ms und  $766 \pm 63$  ms und inaktivierten um bis zu 10 % auf  $-145 \pm 12$  pA,  $-186 \pm 16$  pA und  $-161 \pm 15$  pA.

Nur wenige Zellen in der Gruppe mit Capsaicin und U0126 zeigten während der Präinkubation einen Einwärtsstrom (siehe Abbildung 5.12). Daher war in dieser Gruppe der capsaicininduzierte Strom kleiner und weder von der Kontrollgruppe noch von der Capsaicingruppe signifikant verschieden ( $15 \pm 8$  pA). Wie auch in der Capsaicingruppe inaktivierte der capsaicininduzierte Strom nicht und war 5 ms vor Ende der Präinkubation mit  $+13 \pm 5$  pA von seinem Maximum nicht signifikant verschieden ( $p=0,64$ , t-Test für verbundene Stichproben).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.11.:** Die Sensibilisierung der Hitzeantworten ist abhängig von der Aktivität der MEK/ERK-Kaskade. ++ Capsaicin versus zweite Antwort der Kontrollgruppe  $p < 0,01$ , t-Test; + Capsaicin versus Capsaicin und U0126  $p = 0,03$ , t-Test



**Abbildung 5.12.:** Obwohl ein capsaicininduzierter Strom ausgelöst wird, ist die Sensibilisierung unter dem Einfluss von U0126 aufgehoben.

## 5.8. Sensibilisierung durch lange Hitzereize

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Sensibilisierung von hitzeinduzierten Strömen durch Applikation eines 10-sekündigen Hitzereizes an Stelle einer Substanzapplikation möglich ist.

Da diese Experimente nicht im Vordergrund standen, wurden sie als nachgeschaltete Experimente nach den zuvor beschriebenen Experimenten an den Zellen durchgeführt, so noch eine gute Ableitung der Spinalganglienneurone möglich war. Dies war bei insgesamt 45 Neuronen der Fall; 39 von diesen erfüllten die Qualitätskriterien für die zunächst durchgeführten Experimente. Die Neurone waren also im Vorfeld mehreren Hitzereizen sowie verschiedenen pharmakologischen Substanzen ausgesetzt.

Das größte Problem bei diesen Experimenten bestand darin, dass durch längere Hitzereize der Haltestrom der elektrophysiologischen Ableitung regelmäßig sehr groß wurde oder die Ableitelektrode gänzlich den Kontakt zur Zellmembran verlor.

Eine mögliche Erklärung dieses Effektes (der in geringerem Maße auch bei den kürzeren Hitzereizen auftritt) könnte die durch Erwärmung ausgelöste Verringerung der Membranviskosität der Nervenzellen sein, welche dazu führt, dass der dichte Abschluss der Messelektrode mit der Zellmembran nicht mehr gewährleistet ist und der Leckstrom so groß wird, dass keine verlässliche Aussage über den über die Zellmembran fließenden Strom mehr gemacht werden kann.

In einem Teil der Experimente konnte jedoch auch nach 10-sekündiger Hitzeapplikation noch eine gute Ableitung erzielt werden; 13 Zellen erfüllten die Qualitätskriterien und wurden näher untersucht (siehe Abschnitt 4.6).

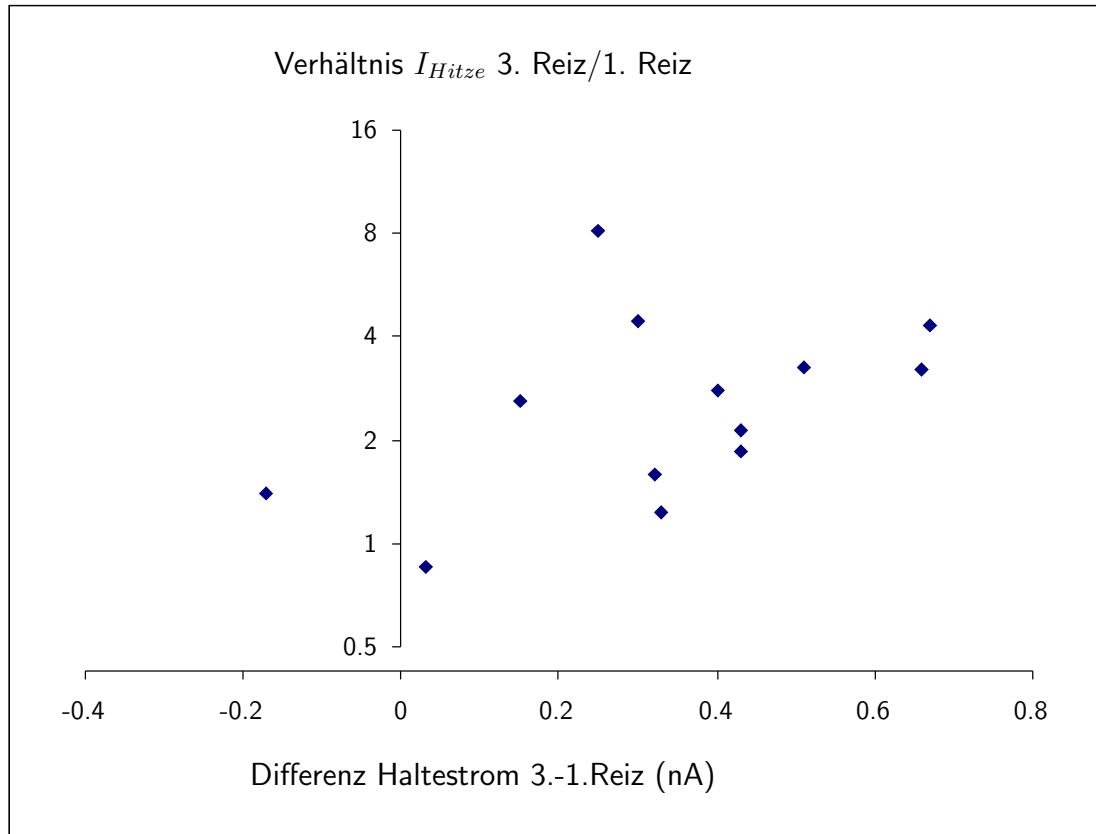
Diese Zellen wurden nach einem einsekündigen Kontrollreiz (von  $33,3 \pm 0,5^\circ\text{C}$  auf  $45,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ) für 10 Sekunden einem Hitzereiz von  $45,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$  ausgesetzt. Anschließend folgte ein weiterer einsekündiger Kontrollreiz (von  $33,3 \pm 0,4^\circ\text{C}$  auf  $45,9 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ).

Dabei stieg der hitzeinduzierte Strom in diesen Zellen von Reiz zu Reiz an und vergrößerte sich auf mehr als das zweifache (siehe Abbildung 5.14, rote Balken;  $-152 \pm 27 \text{ pA}$ ,  $-299 \pm 53$  und  $-374 \pm 56 \text{ pA}$ ). Diese Steigerung war sowohl dem ersten Hitzereiz gegenüber signifikant ( $p < 0,005$ , t-Test für verbundene Stichproben), als auch gegenüber dem jeweiligen Reiz der Kontrollgruppe ( $p < 0,005$  respektive  $p < 0,0005$ , t-Test für nicht verbundene Stichproben).

Dabei ist die Steigerung der hitzeinduzierten Antwort keine Funktion einer schlechteren Ableitung; sie korreliert weder mit dem Haltestrom ( $r = 0,12$ ), noch mit der relativen ( $r = 0,43$ ) oder absoluten Zunahme ( $r = 0,26$ ) des Haltestroms zwischen den Reizen. Die größte Korrelation ( $r = 0,45$ ) findet sich zwischen dem Logarithmus des Verhältnisses zwischen der Antwort nach und der Antwort vor dem langen Hitzereiz und der absoluten Zunahme des Haltestroms; dieser Zusammenhang ist nicht signifikant (siehe Abbildung 5.13). Auch bei der ersten Hitzeantwort gibt es – zumindest bei Halteströmen unter  $500 \text{ pA}$  – keinen Zusammenhang zwischen Haltestrom und hitzeinduziertem Strom (siehe Abschnitt 5.2.2).

Die unterschiedliche Vorgeschichte der Zellen spielte dabei keine Rolle: die Antwort auf den einsekündigen Hitzereiz vor der Applikation des langen Hitzereizes unterschied sich nicht signifikant von der auf den allerersten Hitzereiz ( $p = 0,69$ ), es gab keine Korrelation

## 5. Ergebnisse

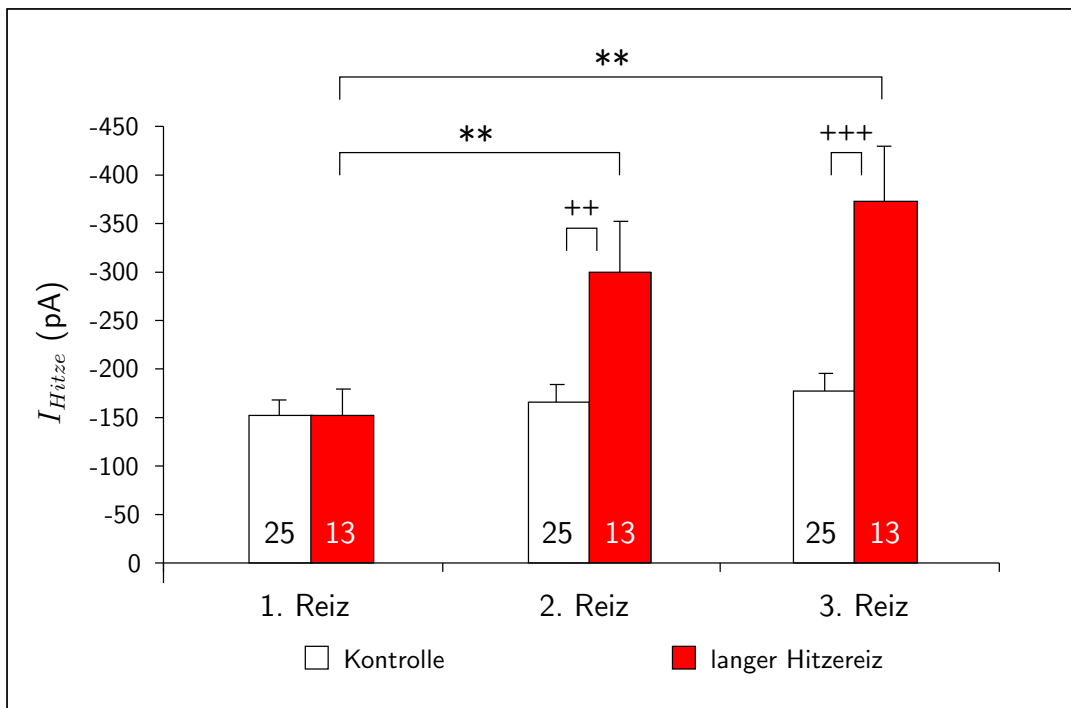


**Abbildung 5.13.:** Die Sensibilisierung durch lange Hitzereize korreliert nicht mit der Zunahme des Haltestromes ( $r = 0,45$ , nicht signifikant).

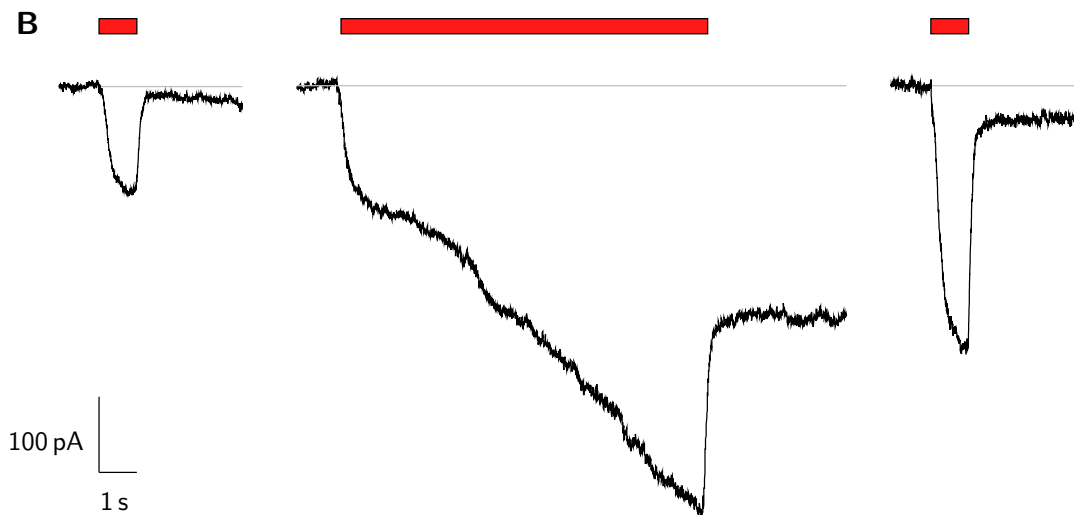
zwischen einer Vorbehandlung und dem Ausmaß der Sensibilisierung oder der Zunahme des Haltestromes.

Zehntsekündige Hitzereize lösen eine Sensibilisierung aus, die wenigstens 30 Sekunden anhält und ebenso ausgeprägt ist, wie die Sensibilisierung durch  $0,5 \mu\text{M}$  Capsaicin.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.14.:** Applikation eines zehnssekündigen Hitzeereizes sensibilisiert die nachfolgende Antwort ebenso gut wie die Applikation von Capsaicin. \*\* versus erste Antwort,  $p < 0,005$ , t-Test für verbundene Stichproben; ++ versus zweite Antwort der Kontrollgruppe,  $p < 0,005$ , +++ versus dritte Antwort der Kontrollgruppe,  $p < 0,0005$ , t-Test



**Abbildung 5.15.:** Gemittelte Hitzeantworten bei langer Stimulation mit Hitze (roter Balken)

## 6. Diskussion

Im Gegensatz zu vorausgegangenen Arbeiten mit nahezu gleichem Versuchsaufbau, bei denen Inaktivierung und Tachyphylaxie bei repetitiver Reizung nozizeptiver Spinalganglien-neurone beschrieben wurden [Schwarz *et al.* 2000], wurde in dieser Arbeit die Sensibilisierung hitzeinduzierter Ströme untersucht. Hierfür wurden kürzere (genau eine Sekunde) und weniger starke (Reiztemperaturen von etwa 45–46°C) Hitzereize verwendet. Von diesen wird vermutet, dass sie nicht inaktivieren und keine Tachyphylaxie auslösen (siehe Abschnitt 1.5.4).

Da hitzeinduzierte Ströme in dieser Arbeit in Zellen der Kontrollgruppe nach etwa 770 ms, im Extremfall aber auch erst nach mehr als 900 ms ihr Maximum erreichen, inaktivierten die Zellen bei den hier verwendeten einsekündigen Hitzereizen nicht.

Auch die Arbeit von Cesare und McNaughton, die mit kurzen (600 ms) und vergleichbar starken (49°C) Hitzereizen arbeiteten, zeigte keine Inaktivierung oder Sensibilisierung durch aufeinander folgende Hitzereize.

Die in dieser Arbeit abgeleiteten Ströme waren etwa um den Faktor 10 kleiner als die von Schwarz *et al.* [2000]. Zahlreiche Arbeiten berichten jedoch über ähnliche Ströme von etwa 100–500 pA, je nach applizierter Temperatur [Cesare und McNaughton 1996, Kirschstein *et al.* 1997, 1999, Guenther *et al.* 1999, Vyklický *et al.* 1999]. Dies ist vermutlich auf die verwendete Intrazellulärlösung zurückzuführen, da im Prinzip die gleichen Materialien und Methoden wie bei Schwarz *et al.* zur Anwendung kamen, die verwendete Intrazellulärlösung jedoch im Wesentlichen der von Cesare und McNaughton entspricht, der bei einer Reiztemperatur von 46°C über Antworten von etwa 160 pA berichtet. Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit gemessenen hitzeinduzierten Strömen (siehe Abschnitt 5.3).

Das im Vergleich zu Schwarz *et al.* niedrigere Haltepotential von  $-60$  mV führt ebenfalls zu kleineren Stromantworten.

In dieser Arbeit wurden nur hitzeinduzierten Ströme von mehr als 40 pA akzeptiert, da sich zwei Gruppen von Zellen mit voneinander verschiedenen Eigenschaften unterscheiden ließen (siehe Abschnitt 5.2). Alle Zellen, die auf den ersten Hitzereiz mit einem Strom von weniger als 40 pA antworteten, antworteten auch auf folgende Reize nicht mit größeren Strömen. Dieser Schwellenwert passt zu den Ergebnissen von Cesare und McNaughton, welche ähnlich große Ströme und eine ähnliche Intrazellulärlösung verwendeten und Ströme größer als 50 pA als hitzeinduziert betrachteten.



## 6.1. Sensibilisierung durch Capsaicin

Capsaicin ist ein Aktivator nozizeptiver Neurone, zusätzlich sensibilisiert es die Antworten von hitzeempfindlichen Spinalganglienneuronen auf Hitzereize (siehe Abschnitt 1.5.5) [Wood *et al.* 1988, Kirschstein *et al.* 1997, Vlachová *et al.* 2001].

In einigen Arbeiten, welche die Wirkung von Capsaicin auf hitzeinduzierte Ströme untersuchten, ergab sich die Vermutung, dass diese Sensibilisierung innerhalb von Sekunden einsetzt, da schon kurze Zeit nach Superfusion mit Capsaicin deutlich größere Ströme messbar waren [Kirschstein *et al.* 1997, Vlachová *et al.* 2001]. Auch Experimente am Menschen, in denen Capsaicin intradermal oder topisch appliziert wurde, zeigen eine innerhalb von Sekunden einsetzende Hyperalgesie gegen mechanische und thermische Reize [LaMotte *et al.* 1992].

Dies deutet auf einen schnellen Mechanismus der Sensibilisierung hin. Da Capsaicin und Hitzereize den gleichen zellulären Rezeptor aktivieren [Caterina *et al.* 1997, Tomina-ga *et al.* 1998], ist eine Interaktion der beiden Agonisten am gemeinsamen Rezeptor ein möglicher Mechanismus dieser Sensibilisierung. Ebenfalls postuliert wurde die Möglichkeit, dass von der intrazellulären Calciumkonzentration abhängige Signalkaskaden eine Sensibilisierung hitzeinduzierter Ströme auslösen könnten [Wood *et al.* 1988, Guenther *et al.* 1999]. Dagegen spricht jedoch zunächst die schnelle Kinetik der Sensibilisierung.

Ziel dieser Arbeit war es, durch niedrig dosiertes Capsaicin eine Sensibilisierung hitzeinduzierter Ströme an nozizeptiven Spinalganglienneuronen auszulösen. Die  $EC_{50}$  für die Wirkung von Capsaicin an Spinalganglienneuronen der Ratte wird von Oh *et al.* mit  $1,1 \mu\text{M}$ , von Lopshire und Nicol mit  $1,4 \mu\text{M}$  angegeben [Oh *et al.* 1996, Lopshire und Nicol 1998]. Durch die in dieser Arbeit gewählte Dosis von  $0,5 \mu\text{M}$  und die kurze Reizdauer von 2 Sekunden, sollte eine Desensibilisierung verhindert, der durch Capsaicin ausgelöste Calciumeinstrom in die Zelle minimiert, aber dennoch eine Sensibilisierung sicher ausgelöst werden.

Durch die gewählte Konzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  Capsaicin wurde ein kleiner (etwa 33 pA), aber doch signifikanter Einwärtsstrom ausgelöst, dessen Größe signifikant mit der Sensibilisierung der hitzeinduzierten Antwort korreliert (siehe Abschnitt 5.5).

Auch bei vorhergehenden Arbeiten zur Sensibilisierung hitzeinduzierter Ionenströme durch Bradykinin wurden nur die Zellen sensibilisiert, die auf die Präinkubation mit einem Strom von wenigstens 10 pA antworteten, was auf etwa die Hälfte der hitzesensiblen Zellen zutrifft [Cesare und McNaughton 1996].

Das Ausmaß der Sensibilisierung scheint dabei vor allem von der Capsaicinkonzentration und weniger von der Zeit abhängig zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde mit  $0,5 \mu\text{M}$  Capsaicin für 2 Sekunden eine Steigerung des hitzeinduzierten Stromes auf das 2,65-fache erzielt; Guenther *et al.* konnten mit  $1 \mu\text{M}$  Capsaicin für 15 Sekunden die Hitzeantwort auf das 5,15-fache steigern.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die Steigerung des hitzeinduzierten Stromes gut mit dem capsaicininduzierten Strom, also einem Einstrom von Calciumionen in die Zelle, korreliert ( $r = -0,7$ ). Dies passt zu der bereits beschriebenen Korrelation der fluorimetrisch gemessenen intrazellulären Calciumionenkonzentration mit der Amplitude des hitzeinduzierten Stromes ( $r = 0,74$ ) [Guenther *et al.* 1999].

## 6.2. Calciumabhängigkeit der Sensibilisierung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Sensibilisierung quasi sofort, zumindest innerhalb von zwei Sekunden, stattfindet, und bei einer Capsaicinkonzentration von  $0,5\ \mu\text{M}$  innerhalb von 30 s reversibel ist. Dies deutet auf einen sehr schnellen, membranständigen Mechanismus für die Sensibilisierung hin, der unabhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration arbeitet.

Dies ist jedoch nicht der Fall; durch die Hemmung der Sensibilisierung durch BAPTA konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ein entscheidender Schritt der Sensibilisierung ist.

Auch in anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass BAPTA die Sensibilisierung von hitzeinduzierten Strömen nach Applikation von Capsaicin verhindert [Guenther *et al.* 1999]. Die Kinetik dieser Sensibilisierung war nicht genau bekannt; in der Arbeit von Guenther *et al.* wurde der Hitzestimulus etwa 10 Sekunden nach der Capsaicinzugabe appliziert.

Aus fluorimetrischen Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration ist bekannt, dass bereits nach wenigen Sekunden die intrazelluläre Calciumkonzentration ansteigt [Lazar *et al.* 2003].

Inaktivierung und Tachyphylaxie sind im Gegensatz dazu unabhängig von der intra- oder extrazellulären Calciumkonzentration [Schwarz *et al.* 2000].

## 6.3. Sensibilisierung durch Hitze

Applikation von Hitzereizen mit einer Dauer von mehr als einer Sekunde führt üblicherweise zur Inaktivierung; wiederholte Applikation von Hitzereizen zu Tachyphylaxie, also zu kleiner werdenden Antworten [Tominaga *et al.* 1998, Cesare *et al.* 1999b, Schwarz *et al.* 2000].

Allerdings wurde eine durch Hitzereize ausgelöste Sensibilisierung von nozizeptiven Afferenzen schon vielfach beschrieben [LaMotte 1983, Meyer *et al.* 1994]. Beitel und Dubner beschreiben die Sensibilisierung von C-Faser Neuronen bei extrazellulärer Ableitung von Aktionspotentialen aus dem Ganglion trigeminale von Rhesusaffen nach 30-sekündiger Applikation eines Hitzereizes von  $48^\circ\text{C}$  auf die Gesichtshaut [Beitel und Dubner 1976]. Thalhammer und LaMotte berichten über die Sensibilisierung der Antworten von Einzel-faserableitungen nach Applikation eines 7-sekündigen Hitzereizes auf die Rückseite der Hand von Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) [Thalhammer und LaMotte 1982].

Diese Experimente fanden jedoch immer an der intakten Haut statt und hatten ein wesentlich langsameren Verlauf, da die Sensibilisierung einige Minuten nach dem konditionierenden Reiz gemessen wurde. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass durch unspezifische Gewebsschädigung freigesetzte Entzündungsmediatoren, und nicht der Hitzereiz selbst diese Sensibilisierung vermitteln.

Eine Sensibilisierung von Spinalganglienneuronen durch Hitzereize wurde bislang noch nicht beschrieben.

## 6. Diskussion

Die in dieser Arbeit beobachtete Sensibilisierung ist kein Artefakt einer schlechteren Ableitung. Die Zunahme des Haltestroms um etwa 330 pA, was in etwa einer Verdoppelung des Haltestroms entspricht, ist durch eine Zunahme des Leckstroms erklärbar, welche durch eine Abnahme der Membranviskosität bei steigender Temperatur entstehen kann. Die dadurch zusätzlich eingeführte Leitfähigkeit wird durch den höheren Haltestrom ausgeglichen und hat keine Auswirkung auf die Größe des hitzeinduzierten Stroms. Es findet sich keine Korrelation zwischen der Zunahme des Haltestroms und der Zunahme der hitzeevozierten Ströme (siehe Abschnitt 5.8).

Die Applikation langer Hitzereize führt unter den vorgestellten Versuchsbedingungen noch während der Applikation des Reizes zur Sensibilisierung, was zunächst im Gegensatz zu vorangegangenen Experimenten steht [Schwarz *et al.* 2000]. Es ist davon auszugehen, dass für die Sensibilisierung durch lange Hitzereize bestimmte Randbedingungen gegeben sein müssen. Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels angeführt, kommt hierfür vor allem die verwendete Intrazellulärlösung in Betracht; möglich ist auch, dass das im Vergleich zu Schwarz *et al.* geringere Haltepotential die Sensibilisierung begünstigt.

Obwohl Capsaicin und Hitze am gleichen Ionenkanal angreifen, sensibilisiert Capsaicin Spinalganglienneurone sehr schnell gegen Hitze; dieser Effekt wurde bei kurzer Applikationsdauer von Hitze selbst jedoch nicht beobachtet. Dieser scheinbare Widerspruch könnte dadurch erklärt werden, dass Spinalganglienneurone nach Stimulation durch Capsaicin wesentlich mehr Calcium aufnehmen als nach Stimulation durch Hitze; im konkreten Fall von 0,5  $\mu$ M Capsaicin fast dreimal mehr als durch Stimulation mit einem Hitzereiz von 46°C [Nagy und Rang 1999b]. Eine Erklärung könnte die unterschiedliche Leitfähigkeit des TRPV1 für Calcium in Abhängigkeit vom Stimulus beziehungsweise der Temperatur sein; für Capsaicin wird eine im Vergleich zu Hitzereizen etwa zweifach höhere Calciumleitfähigkeit des Kanals angegeben [Caterina *et al.* 1997, Tominaga *et al.* 1998, Nagy und Rang 1999b].

### 6.4. Intrazelluläre Signalkaskaden

Es stellt sich die Frage, wie ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration eine Sensibilisierung hitzeevozierter Ströme vermittelt. Daher sollten die Auswirkungen einer Hemmung der auf den Calciumeinstrom in das Neuron folgenden Signalkaskade auf die capsaicinvermittelte Sensibilisierung untersucht werden. Hierfür kommen vor allem durch Calciumionen aktivierte Proteinkinasen in Frage (siehe Abschnitt 1.6.3).

#### 6.4.1. Durch Calciumionen aktivierte Proteinkinasen

Calcium ist der second-messenger der capsaicininduzierten Sensibilisierung. Es wurde vermutet, dass durch Calcium aktivierbare Proteinkinasen wie bestimmte Isoformen der PKA und PKC ein Teil der Signalkaskade sein könnten, welche zur Sensibilisierung führt, zumal PKA- und PKC-kompatible Phosphorylierungsstellen im TRPV1 gefunden wurden [Guenther *et al.* 1999, Malmberg 2000, Numazaki *et al.* 2002].

Es wurde nachgewiesen, dass verschiedene Phosphorylierungszustände die Sensitivität des TRPV1 steuern können. Für PKC $\epsilon$  wurde nachgewiesen, dass sie TRPV1 an

## 6. Diskussion

spezifischen Aminosäuren phosphorylieren kann; Mutationen am TRPV1, welche eine Phosphorylierung an diesen Stellen verhindern, lassen sich mit Aktivatoren der Proteinkinase C nicht mehr sensibilisieren [Numazaki *et al.* 2002].

Direkte Phosphorylierung des TRPV1 durch Proteinkinase A ist nicht für die Sensibilisierung hitzeinduzierter Ionenströme verantwortlich [Lee *et al.* 2000].

Durch Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration und Membrandepolarisation werden auch extracellular related kinases (ERK) aktiviert. Sie gehören zur Gruppe der mitogen activated kinases (MAPK) und werden durch die MAPK/ERK Kinase (MEK) phosphoryliert und dadurch aktiviert [Rosen *et al.* 1994, Chang und Karin 2001]. Calciumionen können ERK über verschiedene Wege aktivieren. Einerseits aktiviert ein Calciumeinstrom in die Zelle Ras, welches über eine weitere Kinase, vermutlich Raf, dann MEK aktiviert [Rosen *et al.* 1994]. Ein anderer Weg, der an Spinalganglienneuronen gezeigt wurde, führt über die Aktivierung von Phosphatidylinositol 3-Kinase, welche Phosphatidylinositoltriphosphat bildet und ERK aktiviert [Zhuang *et al.* 2004].

Die ERK ist üblicherweise an langsamen und langfristigen Änderungen des Zellzustandes wie Genexpression, Zellproliferation und Zelltod beteiligt, jedoch keineswegs darauf beschränkt. Es gibt zahlreiche Hinweise auf eine andere Funktion von ERK in terminal differenzierten Zellen, vor allem des Nervensystems, in welchem diese Proteinkinasen an der Regulation der Erregbarkeit und der synaptischen Plastizität beteiligt sind [Rosen *et al.* 1994, Chang und Karin 2001, Sweatt 2001].

Nach Capsaicininjektion *in vivo* wurde in TRPV1-positiven C-Faser-Neuronen ein Anstieg der Menge phosphorylierter ERK gemessen, ebenso stieg nach elektrischer Stimulation in Abhängigkeit von der Frequenz und nach Reizung mit noxischer Hitze in Abhängigkeit von der Temperatur die Menge an phosphorylierter ERK in Spinalganglienneuronen an [Dai *et al.* 2002]. Dieser Anstieg war durch zusätzliche Applikation des spezifischen MEK-Inhibitors U0126 hemmbar. In Verhaltensexperimenten wurde außerdem gezeigt, dass U0126 dosisabhängig capsaicininduzierte Hyperalgesie reduziert [Dai *et al.* 2002].

Damit scheint die MEK/ERK-Kaskade eine wichtige Rolle bei der capsaicininduzierten Hyperalgesie zu spielen, auch wenn eine direkte Wirkung von ERK auf den TRPV1 noch nicht nachgewiesen wurde.

Allerdings gibt es zahlreiche Verbindungen zwischen den Signalwegen; so können in Hippocampusneuronen PKC und PKA MEK aktivieren (und umgekehrt) [Adams *et al.* 1999, Roberson *et al.* 1999]. In Hippocampusneuronen wurde auch gezeigt, dass Proteinkinase A für die calciumabhängige Aktivierung von ERK unerlässlich ist [Dajas-Bailador *et al.* 2002]. Proteinkinase C $\delta$ , nicht aber PKC $\epsilon$ , kann MEK und ERK aktivieren [Ueda *et al.* 1996]. Proteinkinase C kann in Muskelzellen ERK aktivieren [Donsmark *et al.* 2003]. In Darmepithelzellen wurde gezeigt, dass cAMP unabhängig von PKA in der Lage ist, ERK zu aktivieren [Rudolph *et al.* 2004].

Auch die Sensibilisierung durch NGF ist vermutlich ERK-vermittelt. NGF führt zur Phosphorylierung von ERK und verhindert den retrograden axonalen Transport von ERK [Averill *et al.* 2001], während Applikation von U0126 die NGF-induzierte Hyperalgesie inhibiert [Obata *et al.* 2004].

#### 6.4.2. Die capsaicininduzierte Sensibilisierung ist MEK-vermittelt

Aufgrund des durch *in vivo*-Experimenten vermuteten Zusammenhangs der peripheren Sensibilisierung mit der Aktivierung der MEK/ERK-Kaskade wurde versucht, durch U0126, einen spezifischen Hemmstoff dieser Kaskade, die capsaicininduzierte Sensibilisierung zu inhibieren.

Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass U0126 die Sensibilisierung hitzeinduzierter Antworten nahezu vollständig aufhebt (siehe Abschnitt 5.7).

Zwar zeigten die Neurone in der U0126-Gruppe auch kleinere capsaicininduzierte Ströme; die capsaicininduzierten Ströme waren kleiner als die der Capsaicin-Gruppe ohne U0126. Dieser Unterschied war zwar nicht signifikant, allerdings gab es auch keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Capsaicin, so dass eine niedriger ausfallende Sensibilisierung zu erwarten wäre.

Es gibt in der bisher veröffentlichten Fachliteratur keinen Hinweis darauf, dass U0126 capsaicininduzierte Ströme hemmt, was eine Wirkung durch Blockade des Capsaicinrezeptors selbst recht unwahrscheinlich macht.

Im Gegensatz zu PD98059 ist U0126 ein sehr spezifischer Inhibitor der MEK, insbesondere inhibiert es nicht die Aktivität von Proteinkinase A oder Proteinkinase C, für die ein Einfluss auf die Sensibilisierung bereits gezeigt wurde [Favata *et al.* 1998, Ahn *et al.* 1999, Adams *et al.* 1999, Davies *et al.* 2000, Cohen 2003].

Die hohe Geschwindigkeit der Signalkaskade spricht für eine enge räumliche Nähe zum TRPV1, also eine Membranständigkeit der beteiligten Proteine, welche gegen eine Beteiligung zytosolischer Faktoren wie Proteinkinase C spricht. In olfaktorischen Neuronen des Wurmes *Caenorhabditis elegans* führt die Applikation von Geruchsstoffen innerhalb weniger Sekunden zur Aktivierung von ERK [Hirotsu *et al.* 2000].

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass neben den bereits bekannten Proteinkinasen A und C die extracellular signal related kinase (ERK) beziehungsweise die sie aktivierende MAPK/ERK Kinase (MEK) ein sehr schnell (deutlich unter zwei Sekunden) aktivierbares intrazelluläres Signalsystem ist, welches bei der Regulation der Empfindlichkeit nozizeptiver Spinalganglienneurone eine entscheidende Rolle spielt.

Durch das immer größere Verständnis der Funktionsweise des nozizeptiven Systems ergeben sich laufend neue Ansätze für die Entwicklung neuer Analgetika. So könnte durch Beeinflussung spezifischer intrazellulärer Proteinkinasen der Phosphorylierungszustand und damit die Aktivierbarkeit von Ionenkanälen, die der Transduktion noxischer Reize dienen, positiv beeinflusst werden. Neuere, noch spezifischere Inhibitoren der MEK können der Forschung und später auch der Therapie neue Möglichkeiten eröffnen [Wityak *et al.* 2004].

#### 6.5. Die Rolle von NO, Guanylatzyklase und cGMP

Weder Natriumnitroprussid noch der Aktivator der löslichen Guanylatzyklase YC-1 konnten in den vorgestellten Experimenten eine Sensibilisierung auslösen [Firner *et al.* 2003]. Hierfür sind viele Gründe denkbar.

## 6. Diskussion

Die Konzentration könnte zu niedrig gewählt worden sein. Dagegen spricht, dass ähnliche Konzentrationen bereits erfolgreich in anderen Zellen Guanylatzyklase aktivieren konnten [Southam und Garthwaite 1991, Mulsch *et al.* 1997, Hebeiss und Kilbinger 1998, Wegener *et al.* 1997].

Möglich wäre auch, dass die im Zytoplasma gelöst vorliegende Guanylatzyklase durch das Anpatchen der Zelle soweit verdünnt worden ist, dass sie keine beobachtbare Wirkung mehr entfaltet. Allerdings ist es möglich, mit der patch-clamp-Technik NO- und cGMP-abhängige Prozesse zu untersuchen [Thethi und Duszyk 1999, Ropero *et al.* 1999].

Eine schlüssigere Erklärung könnte sein, dass auch das Substrat der Guanylatzyklase, das Guanosintriphosphat (GTP) verdünnt wurde und somit selbst bei starker Aktivierung der Guanylatzyklase keine für eine nachweisbare Wirkung ausreichende Menge an cGMP gebildet werden kann. Da das Ausmaß der möglicherweise stattfindenden Verdünnung unbekannt ist und sicher auch von Durchmesser und Form der Spitze der Ableitpipette abhängt, ist es nur schwer möglich, GTP in genau der korrekten Menge zu substituieren.

Als zytosolisch ablaufender Prozess könnte die Sensibilisierung durch cGMP-abhängige Prozesse auch sehr viel langsamer sein als die Sensibilisierung durch Capsaicin, so dass die Applikationsdauer der Guanylatzyklase-Aktivatoren für eine Sensibilisierung zu kurz war.

Ebenso ist es natürlich möglich, dass Stickstoffmonoxid nicht zu einer Sensibilisierung von Ionenströmen an Spinalganglienneuronen führt, sondern seine vermutete Wirkung auf andere Art und Weise entfaltet, beispielsweise durch Modulation der Kodierung von Strömen in Aktionspotentiale.

### 6.6. Schlussfolgerungen

Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Natriumnitroprussid oder YC-1, beides Aktivatoren der Guanylatzyklase konnte keine Sensibilisierung auslösen, wobei eine Wirkung dieser Substanzen unter anderen Versuchsbedingungen nicht ausgeschlossen werden kann.

Applikation von 0,5  $\mu\text{M}$  Capsaicin für zwei Sekunden führt bei kleinen Spinalganglienneuronen zu einem kleinen Einwärtsstrom von etwa 33 pA und direkt danach zu einer Vergrößerung hitzeevozierter Ströme um das 2,65-fache und ist nach 30 Sekunden fast vollständig reversibel. Die Größe der Sensibilisierung korreliert dabei mit dem capsaicin-induzierten Strom ( $r = -0,7$ ).

Die capsaicininduzierte Sensibilisierung lässt sich durch intrazelluläre Gabe von 10 mM BAPTA inhibieren; auch die schnelle capsaicininduzierte Sensibilisierung ist somit entgegen der ursprünglichen Hypothese von einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig.

Durch den spezifischen MEK-Inhibitor U0126 lässt sich die Sensibilisierung vollständig inhibieren; somit ist die MEK/ERK-Kaskade entscheidend an der capsaicininduzierten Sensibilisierung beteiligt. Die schnelle Kinetik ist dabei nur durch eine membranständige oder zumindest membran nahe Lokalisation dieser Proteinkinasen erklärbar.

Lange Hitzereize können ebenfalls eine deutliche Sensibilisierung hitzeevozierter Ströme an Spinalganglienneuronen auslösen.

## 7. Zusammenfassung

Die freien Endigungen von Spinalganglienneuronen sind für die Detektion schmerzhafter Reize verantwortlich. Dabei rufen thermische, chemische oder mechanische Reize Ionenströme über die Membran und dadurch Membranpotentialänderungen hervor. Diese noxisch induzierten Ströme sind in großem Ausmaß durch chemische Substanzen und andere Reize modulierbar.

Der Ionenkanal TRPV1 ist für die Detektion zahlreicher chemischer Reize und zumindest eines Teils der noxischen Hitzereize verantwortlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige der Mechanismen geklärt, die zur schnellen Sensibilisierung hitzeevozierter Ionenströme führen. Hierfür wurden akut dissoziierte Spinalganglienneurone der Ratte als Modell ihrer peripheren Endigung verwendet und mittels Ganzzelleableitung in der patch-clamp-Technik untersucht.

Die Verwendung von Trypsin während der Präparation von Spinalganglienneuronen hat keinen funktionellen Einfluss auf hitze- oder capsaicininduzierte Ströme, verbessert aber die Untersuchungsbedingungen für das patch-clamp-Verfahren.

Bei 144 akut dissoziierten Spinalganglienneuronen wurden die Stromantworten auf drei im Abstand von 40 s durch Überspülen mit 45,3 bis 46,3°C heißer Extrazellulärlösung applizierte einsekündige Hitzereize gemessen. Dabei ließen sich repetitiv reproduzierbare hitzeinduzierte Einwärtsströme von etwa 160 pA erzielen; es konnte keine Tachyphylaxie und nahezu keine Inaktivierung beobachtet werden.

Direkt vor dem zweiten Hitzereiz wurden die Neurone für zwei Sekunden mit Extrazellulärlösung überspült, die Kontrolllösung, 0,5  $\mu$ M Capsaicin, 10  $\mu$ M Natriumnitroprussid oder 10  $\mu$ M YC-1 enthielt. Es fand sich kein Hinweis, dass Stickstoffmonoxid oder die Guanylatzyklase einen signifikanten Beitrag zur Sensibilisierung von hitzeinduzierten Strömen in Spinalganglienneuronen leisten, wobei ein durch den Versuchsaufbau bedingtes Auswaschen zytosolischer Faktoren, die für den Signalweg notwendig sind, nicht ausgeschlossen werden kann.

Bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M löst Capsaicin für zwei Sekunden einen sehr kleinen Einwärtsstrom von etwa 33 pA aus und führt innerhalb von zwei Sekunden zu einer schnell reversiblen Sensibilisierung von hitzeinduzierten Einwärtsströmen in Spinalganglienneuronen ( $p < 0,01$ ). Das Ausmaß der Sensibilisierung ist proportional zur Größe des capsaicininduzierten Stromes ( $r = -0,7$ ,  $p < 0,001$ ).

Konstant halten der intrazellulären Calciumkonzentration mittels des Calciumchelatorts BAPTA verhindert die capsaicininduzierte Sensibilisierung hitzeinduzierter Ströme an Spinalganglienneuronen. Demzufolge beruht die capsaicininduzierte Sensibilisierung trotz der schnellen Kinetik nicht auf einer synergistischen Wirkung der beiden Agonisten Capsaicin und Hitze auf ihren gemeinsamen Rezeptor; vielmehr ist sie von einer Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration abhängig.

## 7. Zusammenfassung

Funktionelle Änderungen der zellulären Funktion werden häufig durch Proteinkinasen vermittelt. Die zur Gruppe der MAP-Kinasen gehörende ERK (extracellular signal related kinase) wird bei Membrandepolarisation und Calciumeinstrom in die Zelle durch MEK (MAPK/extracellular signal related kinase kinase) aktiviert. Blockade der MEK/ERK-Kaskade durch den spezifischen MEK-Hemmstoff U0126 führt ebenfalls zu einer Aufhebung der Sensibilisierung der Hitzeantworten durch Capsaicin.

Applikation von Capsaicin führt innerhalb von zwei Sekunden zu einer schnell reversiblen Sensibilisierung hitzeevozierter Ionenströme an nozizeptiven Spinalganglienneuronen. Diese Sensibilisierung wird durch einen Calciumeinstrom in die Zelle und die dadurch eintretende Aktivierung von Proteinkinasen hervorgerufen. Die MEK/ERK-Kaskade ist ein sehr schnell (deutlich unter 2s) aktivierbares intrazelluläres Signalsystem, welches bei der Regulation der Empfindlichkeit nozizeptiver Spinalganglienneurone eine entscheidende Rolle spielt; die schnelle Kinetik ist dabei nur durch eine membranständige oder zumindest membran nahe Lokalisation dieser Proteinkinasen erklärbar. Durch Applikation zehntausendstel Hitzereize lässt sich ebenfalls eine Sensibilisierung hitzeevozierter Ionenströme auslösen, die ebenso ausgeprägt ist, wie die Sensibilisierung durch 0,5  $\mu$ M Capsaicin ( $p < 0,005$ ).

Durch das immer größere Verständnis der Funktionsweise des nozizeptiven Systems ergeben sich ständig neue Ansätze für die Entwicklung neuer Analgetika. So könnte durch Modulation spezifischer intrazellulärer Proteinkinasen der Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivierbarkeit von Ionenkanälen, die der Transduktion noxischer Reize dienen, positiv beeinflusst werden. Neuere, noch spezifischere Inhibitoren der MEK können der Forschung und später auch der Therapie neue Möglichkeiten eröffnen.



## 8. Summary

The free endings of dorsal root ganglion neurones are responsible for the detection of painful stimuli. Thermal, chemical and mechanical stimuli cause ionic currents across the cell membrane and thereby changes of the membrane potential. These noxious inducible currents can be modulated by chemical substances and other stimuli on a large scale.

The ion channel TRPV1 is responsible for detecting many chemical and at least part of noxious thermal stimuli.

The goal of this work was to clarify some of the mechanisms leading to fast sensitisation of heat-induced ionic currents. Therefore acutely dissociated dorsal root ganglion neurones of the rat were used as a model of their peripheral ending and were investigated using whole-cell patch clamp.

The usage of trypsin during the preparation of dorsal root ganglion neurones has no functional influence towards heat- or capsaicin-induced currents, but greatly improves investigation conditions.

The current responses of 144 acutely dissociated dorsal root ganglion neurones to three subsequent heat pulses lasting for one second, which were applied at 40 s intervals by overflowing with extracellular solution having a temperature of 45.3 to 46.3°C, were measured. Reproducible heat-induced currents of about 160 pA could repetitively be obtained; no tachyphylaxis and nearly no inactivation could be observed.

Directly prior to the second heat stimulus, the neurones were superfused with extracellular solution containing control solution, 0.5 µM capsaicin, 10 µM sodium nitroprusside or 10 µM YC-1. There was no hint that nitric oxide or guanylyl cyclase contribute a significant part to the sensitisation of heat-induced currents in dorsal root ganglion neurones. However, a setup-related wash-out of cytosolic factors necessary for the signalling pathway cannot be excluded.

Given for two seconds at a concentration of 0.5 µM, capsaicin triggers a very small inward current of about 33 pA and leads within two seconds to a quickly reversible sensitisation of heat-induced inward currents in dorsal root ganglion neurones ( $p < 0,01$ ). The amount of sensitisation is proportional to the capsaicin-induced current's size ( $r = -0.7$ ,  $p < 0.001$ ).

Keeping the intracellular calcium concentration constant using the calcium chelator BAPTA prevented the capsaicin-induced sensitisation of heat-induced currents in dorsal root ganglion neurones. As a result, the capsaicin-induced sensitisation – despite its fast kinetics – is not based on a synergistic effect of the two agonists capsaicin and heat on their common receptor; it is rather dependent on an increase of free intracellular calcium ions.

Functional changes of cellular function are often mediated by protein kinases. ERK (extracellular signal related kinase), belonging to the MAPK group of kinases, is being

## 8. Summary

activated by MEK (MAPK/extracellular signal related kinase kinase) following membrane depolarisation and calcium influx into the cell. Blocking the MEK/ERK cascade using the specific MEK inhibitor U0126 likewise inhibits sensitisation of answers to noxious heat by capsaicin.

Application of capsaicin causes within two seconds a quickly reversible sensitisation of heat-induced currents in dorsal root ganglion neurones. This sensitisation is caused by an influx of calcium ions into the cell and the thereby caused activation of protein kinases. The MEK/ERK cascade is a very quickly (clearly less than two seconds) activatable intracellular signalling pathway playing a vital role in the regulation of nociceptive neurones' sensitivity. The fast kinetics are only explainable with a membrane-attached or at least near-membrane localisation of these kinases. Application of ten second lasting heat stimuli also triggers a sensitisation of heat-induced currents, which is as pronounced as the sensitisation caused by 0.5  $\mu$ M capsaicin.

The ever-increasing knowledge of the nociceptive systems functionality constantly yields new approaches for the development of new analgetics. By modulating specific intracellular protein kinases, the phosphorylation status and therewith the activatability of ion channels transducing noxious stimuli could be positively influenced. Newer, even more specific MEK inhibitors could provide new means for both science and therapy.

# A. Ergebnisanhang

## A.1. Einfluss der Trypsinbehandlung auf elektrophysiologische Messungen

Gewöhnlicherweise werden Zellen, die mit der patch-clamp Technik untersucht werden sollen, im Rahmen der Präparation einer enzymatischen Behandlung mit Trypsin unterzogen. Diese Behandlung könnte jedoch an der Zelloberfläche gelegene Proteine andauern. Da in der vorliegenden Arbeit Eigenschaften hitzeinduzierter Ströme untersucht werden, die von transmembranären Rezeptorproteinen getragen werden, könnte eine Trypsinbehandlung die Messungen verfälschen. Daher wurde versucht, auf die Trypsinbehandlung zu verzichten. Zuvor wurde jedoch untersucht, ob dies bei unserer Präparation Einfluss auf die Neurone hat.

Um einen möglichen Einfluss der Trypsinbehandlung auf die Größenverteilung der Zellen zu untersuchen, wurde an vier Versuchstieren eine Größenbestimmung der Neurone bei insgesamt 1772 Zellen mit und ebenso vielen Zellen ohne Trypsinbehandlung durchgeführt (siehe Abbildung A.1).

Zellen aus einem Versuchstier wurden auf Gewebekulturschalen verteilt, von denen die Hälfte mit Trypsin behandelt wurde. An jedem Tag wurden gleich viele mit Trypsin behandelte wie nicht behandelte Zellen gezählt. Um Reihenfolgeeffekte auszuschließen, wurde die Reihenfolge der auszuzählenden Kulturschälchen randomisiert.

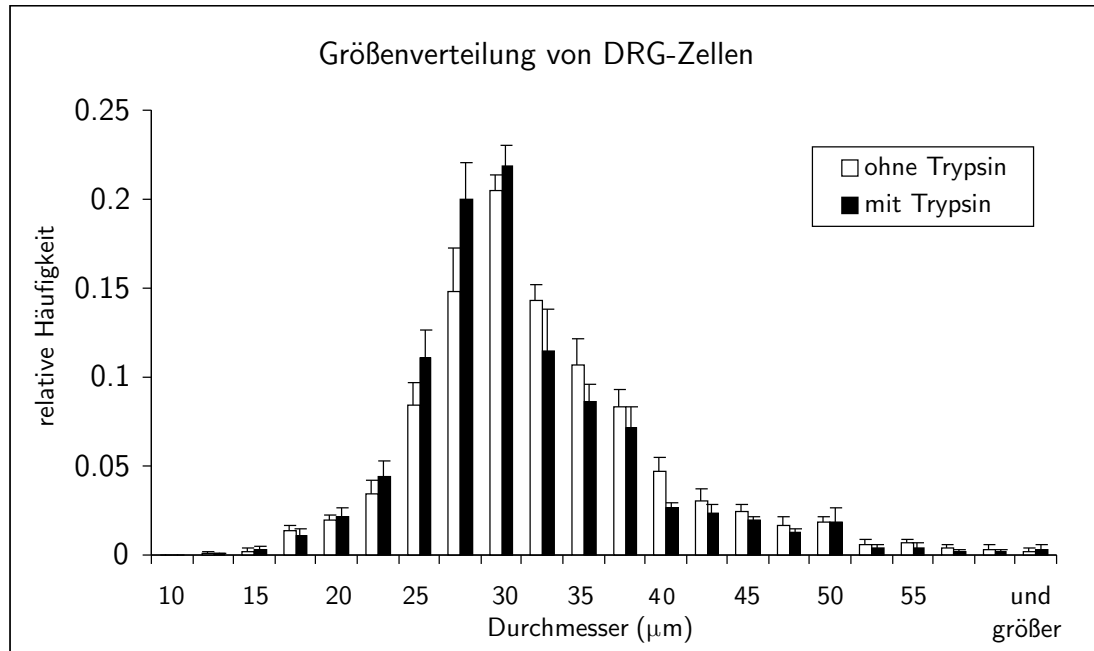
Für jeden Versuchstag wurde ein Histogramm erstellt und die mittlere Größe der Spinalganglienneurone bestimmt. Danach wurden die Daten über vier Versuchstage gemittelt.

Es ergab sich eine rechts schiefe Größenverteilung mit einem Maximum bei etwa 30, und zwei Schultern bei 37,5 und 50  $\mu\text{m}$ . Dies entspricht der Erwartung, drei verschiedene Gruppen von Neuronen zu finden, die zu C- A $\delta$ - und A $\beta$ -Fasern gehören.

Die über vier Tage gemittelte Größe der nicht mit Trypsin behandelten Zellen lag bei  $32,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$ , die der behandelten bei  $31,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$ . Dieser Unterschied war signifikant ( $p < 0,05$ , t-Test für verbundene Stichproben).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Ruhemembranpotential, im Haltestrom oder der Aktionspotentialschwelle zwischen mit Trypsin und nicht mit Trypsin behandelten Zellen festgestellt werden (siehe Tabelle A.1).

Allerdings fiel auf, dass nach Weglassen der Trypsinbehandlung, nur noch sehr wenige Zellen pro Versuchstag erfolgreich untersucht werden konnten. An 24 Versuchstagen, an denen ohne Trypsin gearbeitet wurde, konnte im Schnitt nur alle 4,2 Stunden eine gute Ableitung erzielt werden (bezogen auf die reine Messzeit), so dass je Versuchstag im Mittel 1,6 Neurone abgeleitet wurden. An den 51 Tagen, an denen mit Trypsin präpariert



**Abbildung A.1.:** Größenverteilung von DRG-Neuronen: An vier Versuchstieren wurde der Durchmesser von je 1772 mit und ohne Trypsin präparierten Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier Experimenten  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes.

wurde, gelang etwa alle 2,5 Stunden eine stabile Ableitung, so dass pro Versuchstag im Schnitt 2,4 Neurone erfolgreich untersucht werden konnten. Dieser Unterschied war signifikant ( $p < 0,05$ , t-Test).

Die Zugabe von Trypsin hatte also einen erheblichen Einfluss auf die Ableitbarkeit von Spinalganglienneuronen.

	Anzahl	Größe $\mu\text{m}$	Kapazität $\text{pF}$	Haltestrom $\text{nA}$	RMP $\text{mV}$	AP-Schwelle $\text{nA}$
mit Trypsin:	47	$27,8 \pm 0,32$	$21,6 \pm 0,67$	$-0,32 \pm 0,02$	$-32,4 \pm 1,45$	$4,26 \pm 0,24$
ohne Trypsin:	23	$28,3 \pm 0,37$	$21,5 \pm 0,97$	$-0,28 \pm 0,04$	$-34,1 \pm 2,39$	$4,03 \pm 0,35$

**Tabelle A.1.:** Eigenschaften hitzesensibler Spinalganglienneurone in Abhängigkeit von der Präparation mit und ohne Trypsin. Angegeben ist der initiale Haltestrom bei  $-60 \text{ mV}$ . RMP: Ruhemembranpotential, AP-Schwelle: minimaler Strom, der erforderlich ist, um ein Aktionspotential auszulösen.

## A.2. Funktioneller Einfluss der Trypsinbehandlung

Ein Teil der untersuchten Spinalganglienneurone aus der Kontroll- der Capsaicin- und der SNP-Gruppe wurde nicht mit Trypsin vorbehandelt. Die Vorbehandlung mit Trypsin verbesserte die Ableitbarkeit der Nervenzellen erheblich. Diese Vorbehandlung könnte Einfluss auf die Funktionseigenschaften der Neurone haben. Dies war jedoch in den vorgestellten Experimenten nicht der Fall. Die hitzeinduzierten Ströme auf den ersten Hitzereiz der nicht mit Trypsin behandelten Zellen erreichten im Mittel ein Maximum von  $-162 \pm 23$  pA, die mit Trypsin behandelten Zellen antworteten mit  $-155 \pm 12$  pA. Dieser Unterschied war nicht signifikant ( $p=0,76$ , t-Test). Auch in den Antworten auf den zweiten und dritten Hitzereiz zeigten sich in der Kontroll- und SNP-Gruppe keine Unterschiede zwischen mit Trypsin vorbehandelten und nicht behandelten Zellen.

Durch Capsaicin war in der Trypsin-Gruppe die Antwort auf den zweiten Reiz im Mittel  $2,25 \pm 0,5$ , mal größer als die auf den ersten Reiz, bei nicht mit Trypsin behandelten Zellen lag die Sensibilisierung bei  $3,29 \pm 1,2$ ; dieser Unterschied war nicht signifikant ( $p=0,44$ , t-Test). Da die Verteilung dieser Ströme stark von der Normalverteilung abweicht (Schiefe 3,2 respektive 2,1) wurden diese Werte logarithmiert. Auch beim Vergleich der logarithmierten Werte (Mittelwerte  $0,256 \pm 0,06$  respektive  $0,341 \pm 0,12$ ) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,5$ , t-Test).

Der capsaicin-induzierte Strom der mit Trypsin behandelten Neurone war von dem der nicht behandelten Neurone ebenfalls nicht signifikant verschieden ( $p=0,38$ , t-Test).

Es kann also mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass die Behandlung mit Trypsin in der vorliegenden Arbeit funktionelle Veränderungen an Spinalganglienneuronen hervorruft.

# Literaturverzeichnis

- Van der Aa, F., Roskams, T., Blyweert, W., De Ridder, D. (2003) Interstitial cells in the human prostate: a new therapeutic target? *Prostate* **56**: 250–255.
- Adams, J. P., Selcher, J. C., Sweatt, J. D. (1999) U0126: An effective inhibitor of MAPK activation in neuronal tissue. *Neural Notes* **5**: 14–16.
- Adriaensen, H., Gybels, J., Handwerker, H. O., van Hees, J. (1984a) Nociceptor discharges and sensations due to prolonged noxious mechanical stimulation - a paradox. *Human Neurobiology* **3**: 53–58.
- Adriaensen, H., Gybels, J., Handwerker, H. O., van Hees, J. (1984b) Suppression of C-fibre discharges upon repeated heat stimulation may explain characteristics of concomitant pain sensations. *Brain Research* **302**: 203–211.
- Aguayo, L. G., White, G. (1992) Effects of nerve growth factor on TTX- and capsaicin-sensitivity in adult rat sensory neurons. *Brain Research* **570**: 61–67.
- Ahluwalia, J., Rang, H., Nagy, I. (2002) The putative role of vanilloid receptor-like protein-1 in mediating high threshold noxious heat-sensitivity in rat cultured primary sensory neurons. *The European Journal of Neuroscience* **16**: 1483–1489.
- Ahn, N. G., Tolwinski, N. S., Hughes, H., Hsiao, K., Goueli, S. A. (1999) U0126: An inhibitor of MKK/ERK signal transduction in mammalian cells. *Promega Notes* **1**: 4.
- Aley, K. O., Mccarter, G., Levine, J. D. (1998) Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *The Journal of Neuroscience* **18**: 7008–7014.
- Asaoka, Y., Nakamura, S., Yoshida, K., Nishizuka, Y. (1992) Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 414–417.
- Averill, S., Delcroix, J. D., Michael, G. J., Tomlinson, D. R., Fernyhough, P., Priestley, J. V. (2001) Nerve growth factor modulates the activation status and fast axonal transport of ERK 1/2 in adult nociceptive neurones. *Molecular Cell Neuroscience* **18**: 183–196.
- Baccaglioni, P. I., Hogan, P. G. (1983) Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 594–598.

- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., Earley, T. J., Patapoutian, A. (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**: 849–857.
- Baumann, T. K., Martenson, M. E. (2000) Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin-gated channels. *The Journal of Neuroscience* **20**: RC80–U12.
- Beitel, R. E., Dubner, R. (1976) Response of unmyelinated (C) polymodal nociceptors to thermal stimuli applied to monkey's face. *Journal of Neurophysiology* **39**: 1160–1175.
- Belmonte, C. (1996) Signal transduction in nociceptors: general principles. In: Belmonte, C., Cervero, F. (Hg.) *Neurobiology of Nociceptors*, book chapter 10. Oxford University Press, Seiten 243–257.
- Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I. F., Rang, H. P., Shah, K., Walpole, C. S. J., Yeats, J. C. (1992) Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *British Journal of Pharmacology* **107**: 544–552.
- Bevan, S., Winter, J. (1995) Nerve growth factor (NGF) differentially regulates the chemosensitivity of adult rat cultured sensory neurons. *The Journal of Neuroscience* **15**: 4918–4926.
- Birder, L. A., Kanai, A. J., deGroat, W. C., Kiss, S., Nealen, M. L., Burke, N. E., Dineley, K. E., Watkins, S., Reynolds, I. J., Caterina, M. J. (2001) Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 13396–13401.
- Burgess, G. M., Mullaney, I., McNeill, M., Dunn, P. M., Rang, H. P. (1989) Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *The Journal of Neuroscience* **9**: 3314–3325.
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeit, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., Julius, D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**: 306–313.
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., Julius, D. (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**: 436–441.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816–824.
- Cervero, F., Laird, J. M. A. (1991) One pain or many pains? A new look at pain mechanisms. *News in Physiological Sciences* **6**: 268–273.
- Cesare, P., Dekker, L. V., Sardini, A., Parker, P. J., McNaughton, P. A. (1999a) Specific involvement of PKC $\epsilon$  in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* **23**: 617–624.

## Literaturverzeichnis

- Cesare, P., McNaughton, P. (1996) A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 15435–15439.
- Cesare, P., Moriondo, A., Vellani, V., McNaughton, P. A. (1999b) Ion channels gated by heat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 7658–7663.
- Chang, L., Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37–40.
- Chen, C.-W., Lee, S. T., Wu, W. T., Fu, W.-M., Ho, F.-M., Lin, W. W. (2003) Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *British Journal of Pharmacology* **140**: 1077–1087.
- Cholewinski, A., Burgess, G. M., Bevan, S. (1993) The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **55**: 1015–1023.
- Chuang, H.-H., Prescott, E. D., Kong, H. Y., Shields, S., Jordt, S.-E., Basbaum, A. I., Chao, M. V., Julius, D. (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P-2-mediated inhibition. *Nature* **411**: 957–962.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., Strübing, C. (2001) The TRP ion channel family. *Nature Reviews. Neuroscience* **2**: 387–396.
- Cohen, P. (2003) The effective use of protein kinase inhibitors. *Celltransmissions* **19**: 11–14.
- Dai, Y., Iwata, K., Fukuoka, T., Kondo, E., Tokunaga, A., Yamanaka, H., Tachibana, T., Liu, Y., Noguchi, K. (2002) Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *The Journal of Neuroscience* **22**: 7737–7745.
- Dajas-Bailador, F. A., Soliakov, L., Wonnacott, S. (2002) Nicotine activates the extracellular signal-regulated kinase 1/2 via the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and protein kinase A, in SH-SY5Y cells and hippocampal neurones. *Journal of Neurochemistry* **80**: 520–530.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical Journal* **351**: 95–105.
- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S. A., Rance, K., Grau, E., Harper, A. J., Pugh, P. L., Rogers, D. C., Bingham, S., Randall, A., Sheardown, S. A. (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**: 183–187.



- Distler, C., Rathee, P. K., Lips, K. S., Obreja, O., Neuhuber, W., Kress, M. (2003) Fast Ca<sup>2+</sup>-induced potentiation of heat-activated ionic currents requires cAMP/PKA signaling and functional AKAP anchoring. *Journal of Neurophysiology* **89**: 2499–2505.
- Donsmark, M., Langfort, J., Holm, C., Ploug, T., Galbo, H. (2003) Contractions activate hormone-sensitive lipase in rat muscle by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Physiology* **550**: 845–854.
- England, S., Bevan, S., Docherty, R. J. (1996) PGE(2) modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP- protein kinase A cascade. *The Journal of Physiology* **495**: 429–440.
- Evans, M. S., Reid, K. H., Sharp, J. B. J. (1993) Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. *Neuroscience Letters* **150**: 145–148.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Dyk, D. E. V., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., Trzaskos, J. M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 18623–18632.
- Firner, M., Greffrath, W., Treede, R.-D. (2003) Rapid facilitation of heat-induced currents in dorsal root ganglion neurons of rats by capsaicin but not via nitric oxide or soluble guanylyl cyclase pathway. Abstract. Vorgestellt auf der 82. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Bochum.
- Gold, M. S., Levine, J. D., Correa, A. M. (1998) Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2- induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *The Journal of Neuroscience* **18**: 10345–10355.
- Greffrath, W., Binzen, U., Schwarz, S., Saaler-Reinhardt, S., Treede, R.-D. (2003) Co-expression of heat sensitive vanilloid receptor subtypes in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* **14**: 2251–2255.
- Guenther, S., Reeh, P. W., Kress, M. (1999) Rises in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mediate capsaicin- and proton-induced heat sensitization of rat primary nociceptive neurons. *The European Journal of Neuroscience* **11**: 3143–3150.
- Güler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., Caterina, M. (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *The Journal of Neuroscience* **22**: 6408–6414.
- Hayes, P., Meadows, H. J., Gunthorpe, M. J., Harries, M. H., Duckworth, D. M., Cairns, W., Harrison, D. C., Clarke, C. E., Ellington, K., Prinjha, R. K., Barton, A. J. L., Medhurst, A. D., Smith, G. D., Topp, S., Murdock, P., Sanger, G. J., Terrett, J., Jenkins, O., Benham, C. D., Randall, A. D., Gloger, I. S., Davis, J. B. (2000) Cloning

- and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* **88**: 205–215.
- Hebeiss, K., Kilbinger, H. (1998) Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase inhibits acetylcholine release and excitatory motor transmission in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* **82**: 623–629.
- Heiner, I., Eisfeld, J., Luckhoff, A. (2003) Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium* **33**: 533–540.
- Hirotsu, T., Saeki, S., Yamamoto, M., Iino, Y. (2000) The Ras-MAPK pathway is important for olfaction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **404**: 289–293.
- Holzer, P. (1991) Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews* **43**: 143–201.
- Huang, S. M., Bisogno, T., Trevisani, M., AlHayani, A., DePetrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T. J., Krey, J. F., Chu, C. J., Miller, J. D., Davies, S. N., Geppetti, P., Walker, J. M., DiMarzo, V. (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 8400–8405.
- Ichikawa, H., Sugimoto, T. (2001) VR1-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion. *Brain Research* **890**: 184–188.
- Jaffrey, S. R., Snyder, S. H. (1995) Nitric oxide: a neural messenger. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **11**: 417–440.
- Jordt, S.-E., Bautista, D. M., Chuang, H.-H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Hogestatt, E. D., Meng, I. D., Julius, D. (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**: 260–265.
- Jordt, S. E., Tominaga, M., Julius, D. (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 8134–8139.
- Julius, D., Basbaum, A. I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**: 203–210.
- Jung, J., Hwang, S. W., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Kim, W. B., Kim, D., Oh, U. (1999) Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *The Journal of Neuroscience* **19**: 529–538.
- Kedei, N., Szabo, T., Lile, J. D., Treanor, J. J., Olah, Z., Iadarola, M. J., Blumberg, P. M. (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 28613–28619.

## Literaturverzeichnis

- Khasar, S. G., Lin, Y.-H., Martin, A., Dadgar, J., McMahon, T., Wang, D., Hundle, B., Aley, K. O., Isenberg, W., Mccarter, G., Green, P. G., Hodge, C. W., Levine, J. D., Messing, R. O. (1999) A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron* **24**: 253–260.
- Kirschstein, T., Büsselberg, D., Treede, R.-D. (1997) Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters* **231**: 33–36.
- Kirschstein, T., Greffrath, W., Büsselberg, D., Treede, R.-D. (1999) Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. *Journal of Neurophysiology* **82**: 2853–2860.
- Kollarik, M., Udem, B. J. (2004) Activation of bronchopulmonary vagal afferent nerves with bradykinin, acid and vanilloid receptor agonists in wild-type and TRPV1-/- mice. *The Journal of Physiology* **555**: 115–123.
- Koltzenburg, M., Bennett, D. L., Shelton, D. L., McMahon, S. B. (1999) Neutralization of endogenous NGF prevents the sensitization of nociceptors supplying inflamed skin. *The European Journal of Neuroscience* **11**: 1698–1704.
- Kummer, W., Behrends, S., Schwarzmüller, T., Fischer, A., Koesling, D. (1996) Subunits of soluble guanylyl cyclase in rat and guinea-pig sensory ganglia. *Brain Research* **721**: 191–195.
- LaMotte, R. H. (1983) Information processing in cutaneous nociceptors in relation to sensations of pain. *Federation Proceedings* **42**: 2548–2552.
- LaMotte, R. H., Lundberg, L. E. R., Torebjörk, H. E. (1992) Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin. *The Journal of Physiology* **448**: 749–764.
- Lazar, J., Szabo, T., Kovacs, L., Blumberg, P. M., Biro, T. (2003) Distinct features of recombinant rat vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**: 2228–2240.
- Lee, Y.-S., Lee, J.-A., Jung, J. Y., Oh, U., Kaang, B.-K. (2000) The cAMP-dependent kinase pathway does not sensitize the cloned vanilloid receptor type 1 expressed in *Xenopus* oocytes or *Aplysia* neurons. *Neuroscience Letters* **288**: 57–60.
- Levine, J. D., Reichling, D. B. (1999) Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: Wall, P. D., Melzack, R. (Hg.) *Textbook of Pain*, 4. Auflage. Churchill Livingstone, Seiten 59–84.
- Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M., Heller, S. (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**: 525–535.

- Liu, L., Lo, Y. C., Chen, I. J., Simon, S. A. (1997) The responses of rat trigeminal ganglion neurons to capsaicin and two nonpungent vanilloid receptor agonists, olvanil and glyceryl nonamide. *The Journal of Neuroscience* **17**: 4101–4111.
- Liu, L., Simon, S. A. (2000) Capsaicin, acid and heat-evoked currents in rat trigeminal ganglion neurons: relationship to functional VR1 receptors. *Physiology and Behavior* **69**: 363–378.
- Lopshire, J. C., Nicol, G. D. (1998) The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E-2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: Whole-cell and single-channel studies. *The Journal of Neuroscience* **18**: 6081–6092.
- Magerl, W., Fuchs, P. N., Meyer, R. A., Treede, R.-D. (2001) Roles of capsaicin-insensitive nociceptors in pain and secondary hyperalgesia. *Brain* **124**: 1754–1764.
- Malmberg, A. B. (2000) Protein kinase subtypes involved in injury-induced nociception. In: Sandkühler, J., Bromm, B., Gebhart, G. F. (Hg.) *Nervous System Plasticity and Chronic Pain*, Progress in Brain Research, Band 129, book chapter 4. Elsevier, Seiten 51–59.
- Malmberg, A. B., Brandon, E. P., Idzerda, R. L., Liu, H. T., Mcknight, G. S., Basbaum, A. I. (1997a) Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Neuroscience* **17**: 7462–7470.
- Malmberg, A. B., Chen, C., Tonegawa, S., Basbaum, A. I. (1997b) Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC gamma. *Science* **278**: 279–283.
- Mar, L. P. D., Cardenas, C. G., Scroggs, R. S. (1996) Capsaicin preferentially affects small-diameter acutely isolated rat dorsal root ganglion cell bodies. *Experimental Brain Research* **111**: 30–34.
- Marks, P. W., Maxfield, F. R. (1991) Preparation of solutions with free calcium concentration in the nanomolar range using 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid. *Analytical Biochemistry* **193**: 61–71.
- Marsh, S. J., Stansfeld, C. E., Brown, D. A., Davey, R., McCarthy, D. (1987) The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. *Neuroscience* **23**: 275–289.
- Marzo, V. D., Blumberg, P. M., Szallasi, A. (2002) Endovanilloid signaling in pain. *Current Opinion in Neurobiology* **12**: 372–379.
- Mcintyre, P., Mclatchie, L. M., Chambers, A., Phillips, E., Clarke, M., Savidge, J., Toms, C., Peacock, M., Shah, K., Winter, J., Weerasakera, N., Webb, M., Rang, H. P., Bevan, S., James, I. F. (2001) Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *British Journal of Pharmacology* **132**: 1084–1094.

## Literaturverzeichnis

- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M., Julius, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**: 52–58.
- Meyer, R. A., Campbell, J. N., Raja, S. N. (1994) Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall, P. D., Melzack, R. (Hg.) *Textbook of Pain*, 3. Auflage. Churchill Livingstone, Seiten 13–44.
- Mezey, E., Tóth, Z. E., Cortright, D. N., Arzubi, M. K., Krause, J. E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P. M., Szallasi, A. (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3655–3660.
- Michael, G. J., Priestley, J. V. (1999) Differential expression of the mrna for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *The Journal of Neuroscience* **19**: 1844–1854.
- Mons, N., Cooper, D. M. (1995) Adenylate cyclases: critical foci in neuronal signaling. *Trends in Neurosciences* **18**: 536–542.
- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R. J., Bruford, E. A., Caterina, M. J., Clapham, D. E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A. M., Schultz, G., Shimizu, N., Zhu, M. X. (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular Cell* **9**: 229–231.
- Mulsch, A., Bauersachs, J., Schafer, A., Stasch, J. P., Kast, R., Busse, R. (1997) Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *British Journal of Pharmacology* **120**: 681–689.
- Nagy, I., Rang, H. (1999a) Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a subpopulation of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **88**: 995–997.
- Nagy, I., Rang, H. P. (1999b) Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. *The Journal of Neuroscience* **19**: 10647–10655.
- Nealen, M. L., Gold, M. S., Thut, P. D., Caterina, M. J. (2003) TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *Journal of Neurophysiology* **90**: 515–520.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., Tominaga, M. (2002) Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C epsilon and identification of two target serine residues. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 13375–13378.

## Literaturverzeichnis

- Numberger, M., Draguhn, A. (1996) Patch-Clamp-Technik. Nummer ISBN 3-8274-0023-6 in Labor im Fokus. Spektrum Akademischer Verlag. Mit einem Geleitwort von Bert Sakmann.
- Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Mizushima, T., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Noguchi, K. (2004) Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in the dorsal root ganglion following inflammation near the nerve cell body. *Neuroscience* **126**: 1011–1021.
- Oh, U., Hwang, S. W., Kim, D. H. (1996) Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience* **16**: 1659–1667.
- Okazawa, M., Inoue, W., Hori, A., Hosokawa, H., Matsumura, K., Kobayashi, S. (2004) Noxious heat receptors present in cold-sensory cells in rats. *Neuroscience Letters* **359**: 33–36.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A. (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**: 705–715.
- Perl, E. R. (1984) Pain and nociception. In: Darian-Smith, I. (Hg.) *Handbook of Physiology, Sect. 1: The Nervous System, Vol. III: Sensory Processes, Part 2*, book chapter 20. American Physiological Society, Seiten 915–975.
- Petersen, M., LaMotte, R. H. (1991) Relationships between capsaicin sensitivity of mammalian sensory neurons, cell size and type of voltage gated Ca-currents. *Brain Research* **561**: 20–26.
- Premkumar, L. S., Ahern, G. P. (2000) Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* **408**: 985–990.
- Qian, Y., Chao, D. S., Santillano, D. R., Cornwell, T. L., Nairn, A. C., Greengard, P., Lincoln, T. M., Brecht, D. S. (1996) cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *The Journal of Neuroscience* **16**: 3130–3138.
- Reilly, C. A., Taylor, J. L., Lanza, D. L., Carr, B. A., Crouch, D. J., Yost, G. S. (2003) Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicological Sciences: an official Journal of the Society of Toxicology* **73**: 170–181.
- Renton, T., Yiangou, Y., Baecker, P. A., Ford, A. P., Anand, P. (2003) Capsaicin receptor VR1 and ATP purinoceptor P2X3 in painful and nonpainful human tooth pulp. *Journal of Orofacial Pain* **17**: 245–250.
- Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratieck, C., Sweatt, J. D. (1999) The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to

## Literaturverzeichnis

- cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *The Journal of Neuroscience* **19**: 4337–4348.
- Roisen, F. J. (1975) The effects of dimethyl sulfoxide on neurite development in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences* **243**: 279–298.
- Ropero, A. B., Fuentes, E., Rovira, J. M., Ripoll, C., Soria, B., Nadal, A. (1999) Non-genomic actions of 17beta-oestradiol in mouse pancreatic beta-cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *The Journal of Physiology* **521 Pt 2**: 397–407.
- Rosen, L. B., Ginty, D. D., Weber, M. J., Greenberg, M. E. (1994) Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* **12**: 1207–1221.
- Rudolph, J. A., Poccia, J. L., Cohen, M. B. (2004) Cyclic AMP activation of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2: implications for intestinal cell survival through the transient inhibition of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 14828–14834.
- Sanchez, J. F., Krause, J. E., Cortright, D. N. (2001) The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* **107**: 373–381.
- Schmelz, M., Schmidt, R., Ringkamp, M., Forster, C., Handwerker, H. O., Torebjörk, H. E. (1996) Limitation of sensitization to injured parts of receptive fields in human skin C-nociceptors. *Experimental Brain Research* **109**: 141–147.
- Schwarz, S., Greffrath, W., Büsselberg, D., Treede, R.-D. (2000) Inactivation and tachyphylaxis of heat-evoked inward currents in nociceptive primary sensory neurones of rats. *The Journal of Physiology* **528**: 539–549.
- Shu, X., Mendell, L. M. (1999) Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin. *Neuroscience Letters* **274**: 159–162.
- Simone, D. A., Baumann, T. K., LaMotte, R. H. (1989) Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. *Pain* **38**: 99–107.
- Smith, G. D., Gunthorpe, M. J., Kelsell, R. E., Hayes, P. D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J. E., Jerman, J. C., Walhin, J. P., Ooi, L., Egerton, J., Charles, K. J., Smart, D., Randall, A. D., Anand, P., Davis, J. B. (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **418**: 186–190.
- Southall, M. D., Li, T., Gharibova, L. S., Pei, Y., Nicol, G. D., Travers, J. B. (2003) Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **304**: 217–222.

## Literaturverzeichnis

- Southam, E., Garthwaite, J. (1991) Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices. *Neuroscience Letters* **130**: 107–111.
- Stein, R. J., Santos, S., Nagatomi, J., Hayashi, Y., Minnery, B. S., Xavier, M., Patel, A. S., Nelson, J. B., Futrell, W. J., Yoshimura, N., Chancellor, M. B., De Miguel, F. (2004) Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *The Journal of Urology* **172**: 1175–1178.
- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**: 819–829.
- Sweatt, J. D. (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of Neurochemistry* **76**: 1–10.
- Szolcsanyi, J., Anton, F., Reeh, P. W., Handwerker, H. O. (1988) Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Research* **446**: 262–268.
- Szolcsanyi, J., Jancso-Gabor, A. (1975) Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung* **25**: 1877–1881.
- Szolcsanyi, J., Jancso-Gabor, A. (1976) Sensory effects of capsaicin congeners. Part II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung* **26**: 33–37.
- Szolcsányi, J., Anton, F., Reeh, P. W., Handwerker, H. O. (1988) Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Research* **446**: 262–268.
- Thalhammer, J. G., LaMotte, R. H. (1982) Spatial properties of nociceptor sensitization following heat injury of the skin. *Brain Research* **231**: 257–265.
- Thethi, K., Duszyk, M. (1999) Nitric oxide inhibits whole-cell current in cystic fibrosis pancreatic epithelial cells. *Pancreas* **19**: 158–166.
- Tominaga, M., Caterina, M. J. (2004) Thermosensation and pain. *Journal of Neurobiology* **61**: 3–12.
- Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., Julius, D. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**: 531–543.
- Tominaga, M., Wada, M., Masu, M. (2001) Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and



## Literaturverzeichnis

- hyperalgesia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**: 6951–6956.
- Torebjörk, H. E., Lundberg, L. E. R., LaMotte, R. H. (1992) Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia. The Journal of Physiology **448**: 765–780.
- Treede, R.-D. (1995) Peripheral acute pain mechanisms. Australasian Annals of Medicine **27**: 213–216.
- Treede, R.-D. (2001) Physiologische Grundlagen der Schmerzentstehung und Schmerztherapie. In: Zenz, M., Jurna, I. (Hg.) Lehrbuch der Schmerztherapie, 2 Auflage, Kapitel 3. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Seiten 39–63.
- Treede, R.-D., Meyer, R. A., Raja, S. N., Campbell, J. N. (1992) Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. Progress in Neurobiology **38**: 397–421.
- Trevisani, M., Smart, D., Gunthorpe, M. J., Tognetto, M., Barbieri, M., Campi, B., Amadesi, S., Gray, J., Jerman, J. C., Brough, S. J., Owen, D., Smith, G. D., Randall, A. D., Harrison, S., Bianchi, A., Davis, J. B., Geppetti, P. (2002) Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. Nature Neuroscience **5**: 546–551.
- Tsien, R. Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. Biochemistry **19**: 2396–2404.
- Ueda, Y., Hirai, S. I., Osada, S. I., Suzuki, A., Mizuno, K., Ohno, S. (1996) Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. The Journal of Biological Chemistry **271**: 23512–23519.
- Vlachová, V., Lyfenko, A., Orkand, R. K., Vyklický, L. (2001) The effects of capsaicin and acidity on currents generated by noxious heat in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurones. The Journal of Physiology **533**: 717–728.
- Vlachová, V., Vyklický, L. (1993) Capsaicin-induced membrane currents in cultured sensory neurons of the rat. Physiological Research **42**: 301–311.
- Vyklický, L., Knotková-Urbancová, H. (1996) Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? Physiological Research **45**: 1–9.
- Vyklický, L., Vlachová, V., Vitásková, Z., Dittert, I., Kabát, M., Orkand, R. K. (1999) Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. The Journal of Physiology **517**: 181–192.
- Ward, S. M., Bayguinov, J., Won, K.-J., Grundy, D., Berthoud, H. R. (2003) Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. The Journal of Comparative Neurology **465**: 121–135.

## Literaturverzeichnis

- Wegener, J. W., Gath, I., Forstermann, U., Nawrath, H. (1997) Activation of soluble guanylyl cyclase by YC-1 in aortic smooth muscle but not in ventricular myocardium from rat. *British Journal of Pharmacology* **122**: 1523–1529.
- Welch, J. M., Simon, S. A., Reinhart, P. H. (2000) The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13889–13894.
- Winston, J., Toma, H., Shenoy, M., Pasricha, P. J. (2001) Nerve growth factor regulates VR-1 mRNA levels in cultures of adult dorsal root ganglion neurons. *Pain* **89**: 181–186.
- Winter, J., Forbes, C. A., Sternberg, J., Lindsay, R. M. (1988) Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. *Neuron* **1**: 973–981.
- Wityak, J., Hobbs, F. W., Gardner, D. S., Santella, J. B. r., Petraitis, J. J., Sun, J.-H., Favata, M. F., Daulerio, A. J., Horiuchi, K. Y., Copeland, R. A., Scherle, P. A., Jaffe, B. D., Trzaskos, J. M., Magolda, R. L., Trainor, G. L., Duncia, J. V. (2004) Beyond U0126. Dianion chemistry leading to the rapid synthesis of a series of potent MEK inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **14**: 1483–1486.
- Wood, J. N., Coote, P. R., Minhas, A., Mullaney, I., McNeill, M., Burgess, G. M. (1989) Capsaicin-induced ion fluxes increase cyclic GMP but not cyclic AMP levels in rat sensory neurones in culture. *Journal of Neurochemistry* **53**: 1203–1211.
- Wood, J. N., Docherty, R. (1997) Chemical activators of sensory neurons. *Annual Review of Physiology* **59**: 457–482.
- Wood, J. N., Winter, J., James, I. F., Rang, H. P., Yeats, J., Bevan, S. (1988) Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *The Journal of Neuroscience* **8**: 3208–3220.
- Woolf, C. J., Salter, M. W. (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**: 1765–1769.
- Xu, H., Ramsey, I. S., Kotecha, S. A., Moran, M. M., Chong, J. A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., Distefano, P. S., Curtis, R., Clapham, D. E. (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**: 181–186.
- Yiangou, Y., Facer, P., Ford, A., Brady, C., Wiseman, O., Fowler, C. J., Anand, P. (2001) Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder. *BJU International* **87**: 774–779.
- Zhuang, Z.-Y., Xu, H., Clapham, D. E., Ji, R.-R. (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *The Journal of Neuroscience* **24**: 8300–8309.