

**Expression der
pronozizeptiven Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2
und des antinozizeptiven Cannabinoidrezeptors CB1
in Spinalganglienneuronen der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von

Uta Binzen

geb. in Zell an der Mosel

Mainz, 2007

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

28.04.2008

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Das nozizeptive System	1
1.2 Molekulare Mechanismen der Nozizeption und Antinozizeption	3
1.2.1 Die transienten Rezeptor-Potenzial-Kanäle vom Vanilloidrezeptortyp (TRPV)	5
1.2.2 Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.4	11
1.2.3 Der Cannabinoidrezeptor 1 (CB1)	13
2. Zielsetzung	16
3. Materialien	19
3.1 Chemikalien	19
3.2 Verbrauchsmaterialien	22
3.3 Geräte	23
3.4 Enzyme	24
3.5 Kits	24
3.6 Antikörper	25
3.6.1 Primärantikörper	25
3.6.2 Sekundärantikörper	25
3.7 Zelllinien und Bakterienstämme	25
3.8 Vektoren	26
3.9 Versuchstiere	26
3.10 Primer und Sonden	26
4. Methoden	28
4.1 Molekularbiologische Methoden	28
4.1.1 Kultivierung von Bakterien in Suspension	28
4.1.2 Kultivierung von Bakterien auf Agarplatten	28
4.1.3 Kryokonservierung von Bakterien	29

4.1.4	DNA-Plasmidpräparation	29
4.1.5	RNA-Präparation	30
4.1.6	Spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	31
4.1.7	Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese	31
4.1.8	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
4.1.9	Reinigung von DNA-Fragmenten aus einer PCR-Reaktion	33
4.1.10	Herstellung rekombinanter DNA.....	34
4.1.10.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	34
4.1.10.2	Ligation linearer DNA	35
4.1.11	Herstellung kompetenter Bakterien	36
4.1.12	Transformation kompetenter Bakterien.....	37
4.1.13	Die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	37
4.1.13.1	Primerdesign	38
4.1.13.2	Reverse Transkription von mRNA mit gekoppelter PCR (<i>RT-PCR</i>)	38
4.1.13.3	Amplifikations-PCR	39
4.1.13.4	Checking-PCR	40
4.1.14	Expression von Proteinen in Prokaryoten.....	41
4.1.14.1	Konstruktion eines Expressionsklons	42
4.1.14.2	Bakterielle Proteinexpression	43
4.1.15	Expression von Proteinen in Eukaryoten.....	43
4.2	Proteinbiochemische Methoden	44
4.2.1	Präparation und Affinitätsreinigung eines Fusionsproteins.....	44
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	45
4.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
4.2.4	Coomassie Brilliant-Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	48
4.2.5	Immunoblot.....	48
4.2.5.1	Western-Blot.....	49
4.2.5.2	Immundetektion von Proteinen auf dem Blot.....	50
4.2.6	ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>).....	50
4.3	Zellbiologische Methoden	52
4.3.1	Kultivierung von Eukaryotenzellen.....	52
4.3.1.1	Kultivierung von Myelom-, Hybridom- und HEK-Zellen	52
4.3.1.2	Akut dissoziierte Spinalganglienneurone	53

4.3.2	Kryokonservierung von Zellen	54
4.3.3	Transfektion	54
4.3.4	Herstellung monoklonaler Antikörper	56
4.3.4.1	Immunsierung	56
4.3.4.2	Präparation von Makrophagen als Unterlage	57
4.3.4.3	Fusion	58
4.3.4.4	Anzucht der Hybridomzellen	60
4.3.4.5	Reklonierung	60
4.3.4.6	Subklassentypisierung monoklonaler Antikörper	60
4.3.5	Immunochemische Färbung von Geweben und Zellen	61
4.3.5.1	Präparation von Gewebe	61
4.3.5.2	Immunhistochemische Färbung von Gewebe	61
4.3.5.3	Immunzytochemische Färbung von Zellen	63
4.3.5.4	Präabsorptionskontrolle	64
4.3.6	<i>In situ</i> -Hybridisierung	64
4.3.6.1	Sondenmarkierung	65
4.3.6.2	Dot Blot zur Überprüfung der Sondenmarkierung	65
4.3.6.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung im Gewebe	66
4.3.7	Kalzium-Imaging	67
5.	Ergebnisse	69
5.1	Die Expression von TRPV1 und TRPV2 in Spinalganglienneuronen (Schnitte versus akut dissoziierte Zellen)	69
5.2	Capsaicin verändert die Expression von TRPV1 und TRPV2	72
5.3	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen TRPV1 und TRPV2	74
5.3.1	Herstellung der Immunsierungsproteine	74
5.3.1.1	Klonierung	75
5.3.1.2	Proteinexpression	78
5.3.2	Analyse der Mäuseseren	79
5.3.3	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	81
5.3.3.1	Spezifität	82
5.3.3.2	Subklassen-ELISA	83
5.3.3.3	Vergleich der monoklonalen Antikörper mit den Kaninchenseren	84

5.4	Charakterisierung der Wirkung von Capsaicin	85
5.4.1	Capsaicin-Präinkubation	85
5.4.2	Langzeitinkubation von Spinalganglien mit Capsaicin	87
5.5	TRPV1 im heterologen Expressionssystem: eine C-terminale Splice-Variante	92
5.5.1	Klonierung und Transfektion	92
5.5.2	Funktionelle Charakterisierung	94
5.6	Ko-Expression der pronozizeptiven Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2	97
5.7	Ko-Expression von TRPV1 und TRPV2 mit dem spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kv1.4	99
5.8	Ko-Expression mit dem antinozizeptiven Cannabinoidrezeptor 1	102
5.8.1	CB1 mit TRPV1 und TRPV2	103
5.8.2	CB1 mit Kv1.4	106
5.8.3	CB1-mRNA mit TRPV1, TRPV2 und Kv1.4	107
6.	Diskussion	110
A.	Die pronozizeptiven Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2	111
6.1	TRPV1 und TRPV2 im 1. Neuron der nozizeptiven Bahn	112
6.2	TRPV1 ist mit TRPV2 ko-exprimiert	115
6.3	Von TRPV1 existieren mehrere Splice-Varianten	116
6.4	Die C-terminale Splice-Variante Vr.3'sv ist Capsaicin-sensitiv	120
6.5	Capsaicin degeneriert nicht alle TRPV1-positiven Neurone	123
6.5.1	Degeneration TRPV1-positiver Neurone	124
6.5.2	Funktionelle Charakterisierung der Capsaicinwirkung bei Langzeitapplikation ..	126
B.	Antinozizeptiv wirksame Membranproteine	128
6.6	TRPV1-Neurone ko-exprimieren den Cannabinoidrezeptor CB1	129
6.7	Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.4 als Marker nozizeptiver Spinalganglienneurone	130
6.8	Zusammenspiel der pro- und antinozizeptiven Membranproteine	132
6.9	Schlussfolgerungen	137
7.	Zusammenfassung	139

8.	Literaturverzeichnis	141
9.	Anhang	161
9.1	Sequenzen	161
9.2	Tabellen	164
10.	Abkürzungsverzeichnis	166
	Veröffentlichungen	171

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema über die Rezeption und Weiterleitung noxischer Reize.....	2
Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie.....	7
Abb. 3: Aufbau der TRP-Kanäle (am Beispiel von TRPV1).....	8
Abb. 4: Transduktion und Transformation noxischer Reize.....	11
Abb. 5: Aufbau des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.4.....	12
Abb. 6: Signaltransduktionswege des Cannabinoidrezeptors CB1.....	15
Abb. 7: Expression von TRPV1 und TRPV2 in Spinalganglien der Ratte.....	70
Abb. 8: Wirkung von Capsaicin auf die Expression von TRPV1 und TRPV2.....	73
Abb. 9: Sequenzen und Homologiebereiche von TRPV1 und TRPV2.....	75
Abb. 10: RT-PCR mit genspezifischen Primern für TRPV1 und TRV2 (N-Termini).....	76
Abb. 11: Basen- und abgeleitete AS-Sequenzen der Sequenzierung von TRPV1 und TRPV2.....	77
Abb. 12: Bakterielle Proteinexpression der N-Termini von TRPV1 und TRPV2.....	78
Abb. 13: Reaktivität der Mäuseseren im ELISA auf TRPV1- bzw. TRPV2-N-Terminus.....	79
Abb. 14: Spezifität der Mäuseseren, die gegen TRPV1 und TRPV2 gerichtet sind.....	80
Abb. 15: Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen TRPV1 und TRPV2.....	82
Abb. 16: Doppelfärbung der monoklonalen Antikörper mit den Kaninchenseren.....	84
Abb. 17: TRPV1 und TRPV2 nach Capsaicin-Präinkubation detektiert mit den mAK.....	86
Abb. 18: Einfluss von Capsaicin auf die Neurone bei anhaltender Applikation.....	89
Abb. 19: Vergleich der verschiedenen Neuronengruppen unter Capsaicin-Langzeitinkubation.....	90
Abb. 20: RT-PCR mit genspezifischen Primern für TRPV1-Volllänge.....	92
Abb. 21: C-terminale Sequenz des klonierten TRPV1-Proteins.....	93
Abb. 22: Färbung der HEK-Zellen, die die C-terminale TRPV1 Variante exprimieren.....	94
Abb. 23: Kalzium-Imaging der HEK-Zellen, die die C-terminale Splice-Variante exprimieren.....	95
Abb. 24: Wirkung von Capsaicin und Capsazepin auf TRPV1-exprimierende HEK-Zellen.....	96
Abb. 25: Ko-Expression von TRPV1 und TRPV2 in Spinalganglien der Ratte.....	97
Abb. 26: Ko-Expressionsuntersuchung mit den monoklonalen Antikörpern.....	98
Abb. 27: Ko-Expression von TRPV1 und Kv1.4 in Spinalganglien der Ratte.....	100
Abb. 28: Ko-Expression von TRPV2 und Kv1.4 in Spinalganglien der Ratte.....	101
Abb. 29: Ko-Expression von TRPV1 und CB1 in Spinalganglien der Ratte.....	104
Abb. 30: Ko-Expression von TRPV2 und CB1 in Spinalganglien der Ratte.....	105
Abb. 31: Ko-Expression von Kv1.4 und CB1 in Spinalganglien der Ratte.....	106
Abb. 32: Ko-Expression von TRPV1 und CB1-mRNA in Spinalganglien der Ratte.....	107
Abb. 33: Ko-Expression von TRPV2 und CB1-mRNA in Spinalganglien der Ratte.....	108
Abb. 34: Ko-Expression von CB1-mRNA und Kv1.4 in Spinalganglien der Ratte.....	109
Abb. 35: Schema über das funktionelle Zusammenspiel von CB1 und Kv1.4.....	133

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Iontrope und metabotrope Rezeptoren mit ihren Neurotransmittern	4
Tab. 2: Klassifizierung nicht-myelinisierter C-Fasern	5
Tab. 3: Häufigkeit und Größe TRPV1- und TRPV2-positiver Spinalganglienneurone	71
Tab. 4: Einwirkung von Capsaicin auf die Expression von TRPV1 und TRPV2	73
Tab. 5: TRPV1 und TRPV2 nach Capsaicininkubation detektiert mit dem mAChR	87
Tab. 6: Sequenzen der Splice Stellen von TRPV1 und Vr.3'sv	117
Tab. 7: Häufigkeit TRPV1-positiver Spinalganglienneurone	119
Tab. 8: Ko-Expression von TRPV1, TRPV2, Kv1.4 und CB1 in Spinalganglienschnitten	164
Tab. 9: Expression von TRPV1, TRPV2, Kv1.4 und CB1 in Spinalganglien neuronen der Ratte	165

1. Einleitung

1.1 Das nozizeptive System

Das nozizeptive System erkennt und verarbeitet noxische Reize, d.h. Reize, die aktuell oder potentiell eine Gewebeschädigung bewirken und einen adäquaten Reiz für die Nozizeptoren darstellen. Nozizeptoren sind spezifische Sinneszellen, die ausschließlich oder differenziell durch noxische Reize erregt werden. Nozizeption bedeutet daher die neuronale Kodierung der Information über noxische Reize. Schmerz dagegen ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird. Zu der Nozizeption kommt somit eine bewusste Wahrnehmung und affektiv-emotionale Komponente hinzu (Treede, 2007; Treede, 2001; Handwerker, 1999; Merskey *et al.*, 1979).

Das erste Neuron der nozizeptiven Bahn ist von der Funktion her eine primäre Sinneszelle und befindet sich im Spinalganglion (Hinterwurzelganglion oder DRG - **D**orsal **R**oot **G**anglion und Ganglion Gasseri). Es handelt sich um ein pseudounipolares Neuron, dessen Axon sich innerhalb des Ganglions in die periphere Afferenz, die die Haut oder andere Organe innerviert und die zentrale Afferenz, die zum Rückenmark zieht, aufteilt. Im Rückenmark sind die Nervenendigungen mit spezifischen Neuronen im schichtartig organisierten Hinterhorn (Lamina I-VI) verschaltet. Neurone, die nozizeptive Informationen aufnehmen und weiterleiten, liegen überwiegend in den Schichten I, II und V (NS-Neurone, nozizeptor-spezifisch). Die nozizeptive Spinalganglienzelle ist eher klein und die Afferenzen zählen zu den C-Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit von 0,4 – 2 m/s und den A δ -Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit von 2-33 m/s. Dabei korreliert die Leitungsgeschwindigkeit mit der Größe des Zellkörpers der Spinalganglienzelle wobei die kleineren Zellen die langsamer leitenden C-Fasern ausbilden (**Abb. 1**). Nicht-myelinisierte C-Faser-Nozizeptoren werden auch als CMH (C-Faser Mechano-Hitze-Nozizeptoren) bezeichnet wohingegen bei den dünn myelinisierten A δ -Fasern Typ I und Typ II AMH (A-Fasern Mechano-Hitze-Nozizeptoren) unterschieden werden, die unterschiedlich stark auf mechanische und thermische Reize reagieren (Treede, 2007; Julius und Basbaum, 2001; Treede, 2001, Handwerker, 1999).

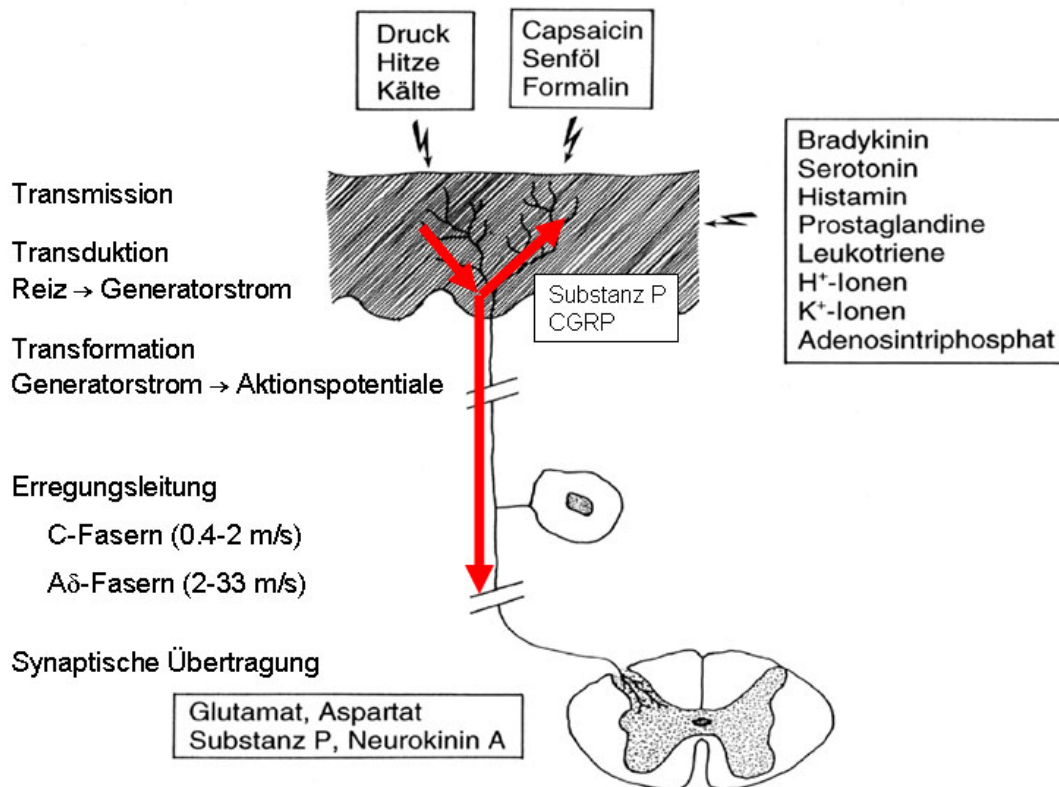


Abb. 1: Schema über die Rezeption und Weiterleitung noxischer Reize.

Noxische Reize verschiedener Natur gelangen von der Hautoberfläche zu den freien Nervenendigungen der Spinalganglienzellen (Transmission), die die Reize in einen Generatorstrom (Transduktion) und schließlich in eine Folge von Aktionspotentialen umwandeln (Transformation). Diese werden nach zentral ins Rückenmark weitergeleitet und dort über synaptische Überträgerstoffe auf das zweite Neuron übertragen. Die Nervenendigungen der Spinalganglienzellen setzen auch in der Peripherie Mediatoren frei, die auch nicht-neuronales Gewebe aktivieren und somit eine Entzündung auslösen können (aus Treede in Zenz, Jurna: Lehrbuch der Schmerztherapie. WVG, 2. Auflage, 2001, S.39ff; modifiziert).

Als adäquate noxische Reize kommen physikalische Reize von mechanischer (Druck) und thermischer Natur (Hitze und Kälte) in Frage, sowie chemische Reize die einen Brennschmerz auslösen (Capsaicin, Senföl, Formalin), wobei die nozizeptiven Afferenzen polymodal sind, d.h. von verschiedenen Reizen erregt werden können (Julius und Basbaum, 2001; Caterina *et al.*, 2000; Tominaga *et al.*, 1998; Szolcsanyi *et al.*, 1988). Die Reize werden in der Peripherie von den Endigungen der nozizeptiven Neurone erfasst und in Ionenströme und somit Membranpotenzialänderungen umgewandelt (Transduktion). Bei der anschließenden Transformation werden die Membranpotenzialänderungen in Aktionspotenzialfolgen umgewandelt, diese über die gesamte Länge des Axons bis zu den zentralen Endigungen im Rückenmark fortgeleitet und synaptisch auf das zweite Neuron und schließlich in die höheren

Hirnzentren übertragen. Als synaptische Überträgerstoffe werden sowohl erregende Aminosäuren als auch Neuropeptide freigesetzt (Treede, 2007; Scholz und Woolf, 2002; Treede, 2001; Basbaum und Jessell, 2000) (**Abb. 1**).

Nozizeptoren antworten nicht nur bei akutem Schmerz sondern sind auch an anhaltenden und pathologischen Schmerzzuständen beteiligt (akute Plastizität). Durch die Freisetzung der chemischen Mediatoren von den Nervenendigungen der sensorischen Neurone einerseits und dem nicht-neuronalen Gewebe andererseits, kommt es nach einer Verletzung zu einer verstärkten Schmerzempfindung (Hyperalgesie). Die Sensitivität der Nozizeptoren gegenüber thermischen Reizen ist durch die Herabsetzung der Aktivierungsschwelle, eine gesteigerte Antwort auf überschwellige Reize und Spontanaktivität erhöht (periphere Sensibilisierung). Bei der zentralen Sensibilisierung findet eine veränderte nozizeptive Signalübertragung im Rückenmark statt. Im Gegensatz zur peripheren Sensibilisierung ist bei der zentralen Sensibilisierung die Sensitivität auf mechanische Reizantworten erhöht (Julius und Basbaum, 2001; Treede, 2001).

1.2 Molekulare Mechanismen der Nozizeption und Antinozizeption

Nozizeptoren können eine große Anzahl verschiedener Reize erfassen, da sie an ihren Endigungen mit verschiedenen Membranproteinen ausgestattet sind und diese wiederum durch mehrere Reize aktiviert werden können. Die Zelle kann somit auf sehr komplexe Änderungen in der äußeren Umgebung antworten (Scholz und Woolf, 2002; Julius und Basbaum, 2001; Treede, 2001; Tominaga *et al.*, 1998). Man unterscheidet dabei die ionotropen Rezeptoren bzw. ligandengesteuerten Ionenkanäle und die metabotropen bzw. G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (**Tab. 1**).

Tab. 1: Ionotrope und metabotrope Rezeptoren mit ihren Neurotransmittern

Ionotrope Rezeptoren	Metabotrope Rezeptoren
TRPV1 (Capsaicin, Hitze, Protonen)	CB1, CB2 (Cannabinoide)
ASICs (Protonen)	Opioidrezeptoren (Opioide)
nikotinischer AchR (Acetylcholin)	muskarinischer AchR (Acetylcholin)
P2X (ATP)	P2Y (ATP)
5-HT ₃ (Serotonin)	5-HT _{1,2,4} (Serotonin)
GABA _{A,C} (GABA)	GABA _B (GABA)
AMPA (Glutamat)	metabotroper GluR (Glutamat)
NMDA (Glutamat)	$\alpha_{1,2}$ (Noradrenalin)

Die nozizeptiven Neurone sind keine einheitliche Neuronengruppe sondern bestehen aus verschiedenen Subpopulationen, die in ihrem Expressionsmuster für verschiedene Membranproteine variieren und somit eine funktionelle Vielfalt in der sensorischen neuronalen Signalübertragung bewirken (Petruska *et al.*, 2000; Cardenas *et al.*, 1995). Nicht-myelinisierte C-Fasern werden in zwei Gruppen eingeteilt: die peptiderge Untergruppe enthält Neuropeptide wie CGRP (calcitonin gene-related protein) und Substanz P, exprimiert den Tyrosinkinase Rezeptor TrkA und reagiert somit auf den Wachstumsfaktor NGF (nerve growth factor) während die zweite Population den Rezeptorkomplex für GDNF (glial-derived neurotrophic factor) sowie P2X₃, ein Subtyp eines ATP-getriebenen Ionenkanals, exprimiert und eine Bindung von Isolectin B₄ (IB₄) aufweist (Vydyanathan *et al.*, 2005; Julius und Basbaum, 2001; Guo *et al.*, 1999; Stucky und Lewin, 1999; Snider und McMahon, 1998; **Tab. 2**). Diese neurochemischen Unterschiede bedeuten, dass IB₄-positive und IB₄-negative kleine DRG-Neurone funktionelle Unterschiede aufweisen.

Tab. 2: Klassifizierung nicht-myelinisierter C-Fasern

Peptiderge Untergruppe	Nicht-peptiderge Untergruppe
IB ₄ -negativ	IB ₄ -positiv
CGRP	GDNF-Rezeptor-Komplex
Substanz P	P2X ₃
TrkA (NGF-sensitiv)	

1.2.1 Die transienten Rezeptor-Potenzial-Kanäle vom Vanilloidrezeptortyp (TRPV)

Als erstes Membranprotein das spezifisch an nozizeptiven Transduktionsmechanismen beteiligt ist, wurde der Vanilloidrezeptor VR1 (vanilloid receptor subtype 1) aus einer cDNA-Bibliothek kloniert und durch seine Aktivierbarkeit durch das Vanilloid Capsaicin, der scharfe Inhaltsstoff der Chilischote, auch als Capsaicinrezeptor bezeichnet (Caterina und Julius, 2001; Caterina *et al.*, 1997). Nach der neuen Terminologie, die sich bei der Identifizierung an Sequenzhomologien orientiert, gehört VR1 zu den transienten Rezeptor-Potenzial-Kanälen vom Vanilloidrezeptortyp (TRPV) und wird fortan als TRPV1 bezeichnet (Montell *et al.*, 2002a; Clapham *et al.*, 2001).

Das Protein TRPV1 wurde zuerst in den Hinterwurzelganglien (DRGs) und trigeminalen Ganglien (TGs) gefunden, ist aber ebenso in spinalen und peripheren Nervenendigungen exprimiert (Tominaga *et al.*, 1998; Caterina *et al.*, 1997). So findet es sich in neuronalen Fasern, die bestimmte Organe innervieren wie z.B. Blase, Prostata, Lunge (Kollarik und Udem, 2004; Stein *et al.*, 2004; Reilly *et al.*, 2003; Renton *et al.*, 2003; Van der Aa *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2003; Yiangou *et al.*, 2001b), im Gehirn (Liapi und Wood, 2005; Sanchez *et al.*, 2001; Mezey *et al.*, 2000) sowie in nicht-neuronalen Zellen (Saunders *et al.*, 2007; Rutter *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2003; Heiner *et al.*, 2003; Southall *et al.*, 2003; Birder *et al.*, 2001).

TRPV1 wird in den kleinen nozizeptiven Spinalganglienneuronen exprimiert und durch Anlagerung von Capsaicin oder anderen Vanilloiden wie Resiniferatoxin oder Olvanil geöffnet, ebenso durch noxische Hitzereize um 43°C, Protonen, dem Endovanilloid und Cannabinoidrezeptor 1 (CB1)-Liganden Anandamid, den Eicosanoiden 12-(S)-HPETE, 15-

(S)-HPETE, 5-(S)-HPETE und Leukotrien B₄ (Nilius und Voets, 2005; Pedersen *et al.*, 2005; Van der Stelt und Di Marzo, 2004; Montell *et al.*, 2002b; Watanabe *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2000; Zygmunt *et al.*, 1999; Caterina *et al.*, 1997). Die Vanilloidbindestelle befindet sich intrazellulär, der pH-Sensor dagegen liegt extrazellulär (Ferrier-Montiel *et al.*, 2004; Jordt und Julius, 2002; Jordt *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 1999; **Abb. 3**). Capsaicin, Resiniferatoxin oder niedriger pH aktivieren keines der anderen Mitglieder der TRPV-Unterfamilie (Alexander *et al.*, 2007).

Bei der großen Familie der transienten Rezeptor-Potenzial Kanäle (TRPs) handelt es sich um nicht-selektive Kationenkanäle, die über verschiedene Mechanismen an den Änderungen des intrazellulären Kalziums und Natriums beteiligt sind und somit die Zelle depolarisieren (Ramsey *et al.*, 2006; Nilius und Voets, 2005; Pedersen *et al.*, 2005). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration bzw. ihre Änderung spielt in vielen Prozessen eine Rolle wie z.B. bei Muskelkontraktionen, Transmitterausschüttung, Zellproliferation, Gentranskription und Zelltod (Berridge, 2000). Da sich TRPs in vielen Säugetiergeweben finden, sind sie gut geeignet um Natrium, Kalzium und die Membranspannung sowohl in erregbaren, als auch nicht-erregbaren Zellen zu regulieren (Ramsey *et al.*, 2006; Nilius und Voets, 2005; Pedersen *et al.*, 2005).

Der Prototyp des TRP-Kanals wurde im Phototransduktionsweg von *Drosophila* entdeckt (Montell, 2005; Julius und Basbaum, 2001). Da sich die verschiedenen TRP-Kanäle sehr in ihrer Selektivität und der Art der Aktivierung voneinander unterscheiden werden sie über Sequenzhomologien identifiziert und nach einer neuen Terminologie klassifiziert (Montell *et al.*, 2002a; Clapham *et al.*, 2001).

Es existieren sieben Unterfamilien: TRPC (**C**anonical: TRPC1-7), TRPM (**M**elastatin: TRPM1-8), TRPV (**V**anilloid: TRPV1-6), TRPA (**A**nkyrin: TRPA1 als einziges Mitglied), TRPP (**P**olycystin: TRPP1-3), TRPML (**M**ucolipin: TRPML1-3) und TRPN (**N**o mechanoreceptor potential C oder NOMPC: bisher nur in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* und Zebrafisch). Von TRPP und TRPML ist bisher nur sehr wenig bekannt. Diese Kanäle sind aber von besonderem Interesse, da sie an verschiedenen humanen Erkrankungen beteiligt sind (Ramsey *et al.*, 2006; Nilius und Voets, 2005; Pedersen *et al.*, 2005; **Abb. 2**).

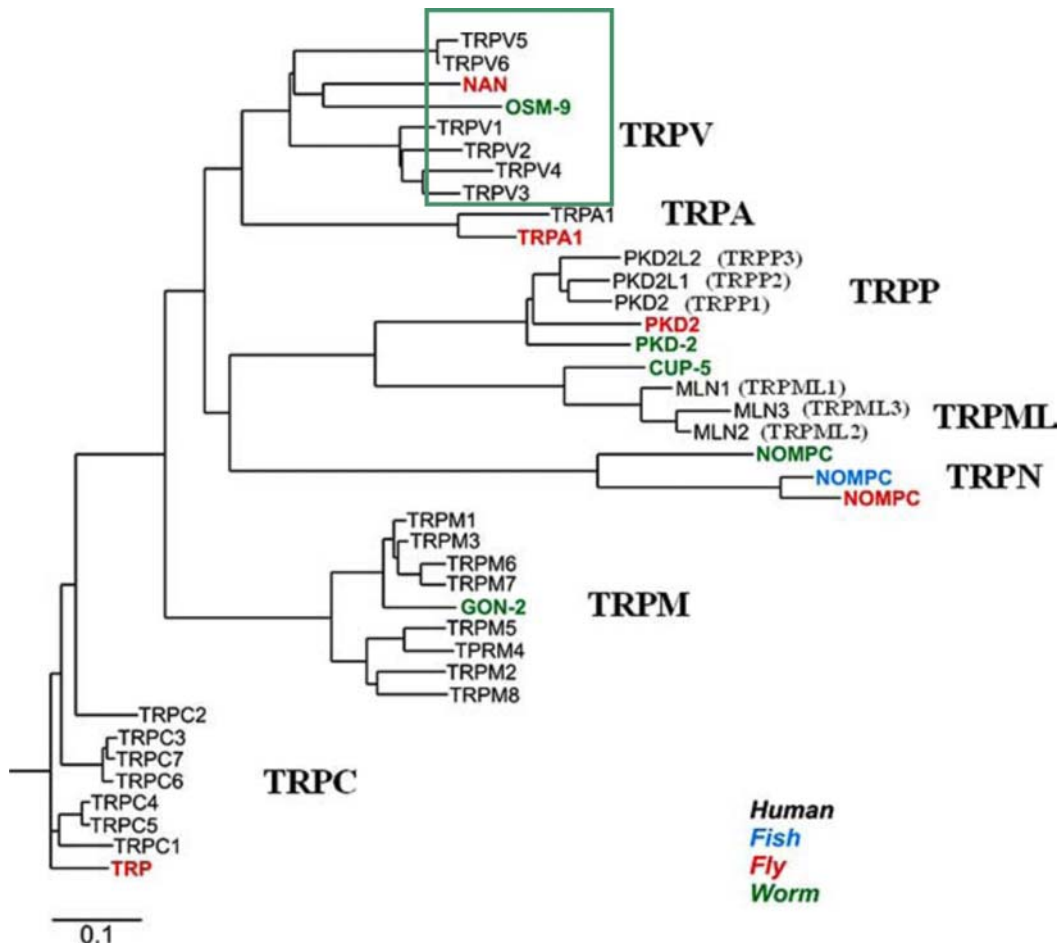


Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie.

Säugetier TRPs sind in schwarz, Zebrafisch *Danio rerio* in blau, *Drosophila melanogaster* in rot und *Caenorhabditis elegans* in grün dargestellt. Der Größenmaßstab repräsentiert die evolutionäre Entfernung als Anzahl der Substitutionen pro Aminosäure (aus Nilius und Voets, 2005; modifiziert).

Funktionelle TRP Kanäle setzen sich aus vier Untereinheiten zusammen, wobei sowohl eine Homo- als auch Heterotetramerbildung möglich ist. Die einzelnen Untereinheiten bestehen aus sechs Transmembran- (TM) Domänen mit einer Porenschleife zwischen der 5. (S5) und 6. (S6) Transmembrandomäne, und sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen intrazellulär (Abb. 3).

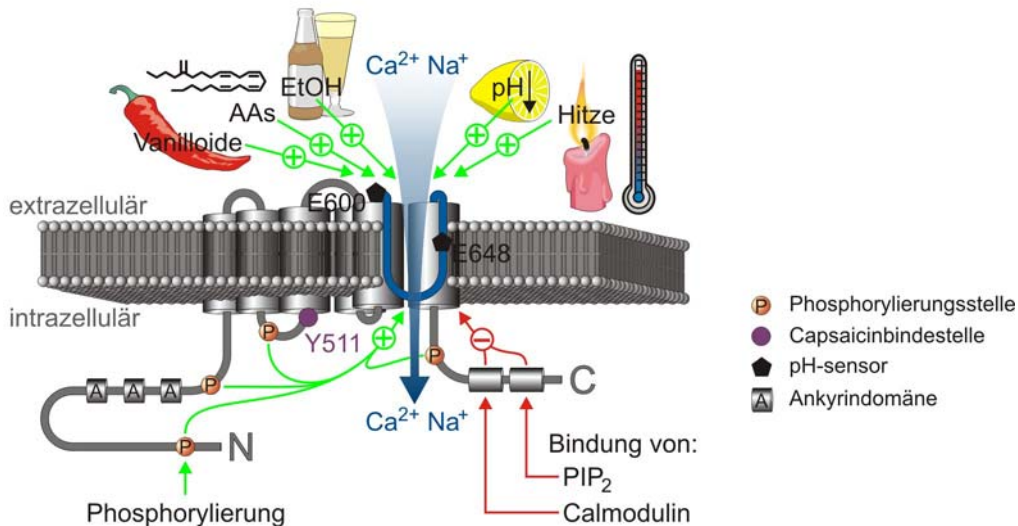


Abb. 3: Aufbau der TRP-Kanäle (am Beispiel von TRPV1).

Die Kanäle bilden sechs Transmembrandomänen (S1-S6; graue Zylinder) mit einer Porenschleife zwischen S5 und S6 (blau). N- und C-Terminus liegen intrazellulär und enthalten drei Ankyrindomänen, Phosphorylierungsstellen und Bindungsstellen für Calmodulin und das Phospholipid PIP₂. Aus vier solcher Untereinheiten bildet sich ein Tetramer und somit ein funktioneller Kanal. Markiert sind die Capsaicinbindestelle als Kreis in lila bei Aminosäure 511 und die pH-Sensoren als schwarze Fünfecke bei den Aminosäuren 600 und 648 (Ferrier-Montiel *et al.*, 2004) (aus Greffrath, 2006; modifiziert).

Alle TRPs sind Kationenkanäle, wobei die Permeabilität für verschiedene mono- und divalente Kationen zwischen den Isoformen stark variiert (Ramsey *et al.*, 2006; Nilius und Voets, 2005; Pedersen *et al.*, 2005). Sie werden durch eine Reihe von Reizen aktiviert wie extra- und intrazelluläre Botenstoffe, chemischer, mechanischer und osmotischer Stress und einige auch von dem Füllzustand intrazellulärer Kalziumspeicher (Clapham, 2003).

Die Unterfamilie der Vanilloidrezeptoren (TRPVs) besteht aus sechs Mitgliedern, die sich aufgrund von Struktur und Funktion in vier Gruppen aufteilen lassen: TRPV1 / TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 / 6. Alle Mitglieder besitzen drei bis fünf NH₂-terminale Ankyrinwiederholungen (Benham *et al.*, 2002; Gunthorpe *et al.*, 2002). TRPV1, 2, 3 und 4 haben Permeabilitätsverhältnisse P_{CA} / P_{NA} zwischen ~ 1 und ~ 10 und sind thermosensitiv, wobei TRPV1 und TRPV4 noch durch viele andere Reize aktiviert werden können. TRPV5 und TRPV6 sind die einzigen Kalzium-selektiven Kanäle der TRPV-Familie und werden durch Kalzium reguliert (Ramsey *et al.*, 2006; Nilius und Voets, 2005; Pedersen *et al.*, 2005).

Die genomische Organisation des Gens für TRPV1 lässt auf mehrere Splice-Varianten schließen (Xue *et al.*, 2001). Schumacher *et al.* konnten 2000 eine N-terminale Splice-Variante von TRPV1 aus der Ratte isolieren (Vr.5'sv), die sich darin unterscheidet, dass ihr der Großteil der intrazellulären N-terminalen Domäne und die Ankyrinwiederholungen fehlt. Es konnte gezeigt werden, dass Vr.5'sv auf mRNA-Ebene in Geweben exprimiert wird die Capsaicin-sensitiv sind, wie Spinalganglienneurone, das Gehirn und periphere Blutzellen. Die Splice-Variante wird jedoch im Vergleich zu TRPV1 in den Ganglien auf einem sehr niedrigen Level exprimiert (Sanchez *et al.*, 2001). Funktionell exprimiert in *Xenopus* Oocyten und eukaryotischen Zellen ist Vr.5' nicht sensitiv für Capsaicin, Resiniferatoxin, Protonen oder Hitzereize um 50°C. Da der übrige Teil inklusive der Transmembrandomänen und des C-Terminus identisch ist mit TRPV1, scheint die N-terminale Domäne für die Bildung eines funktionellen Rezeptors, der durch Vanilloide und Hitzereize aktivierbar ist, wichtig zu sein (Schumacher *et al.*, 2000). Die Splice-Variante TRPV1var aus der Niere besteht aus 248 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs und könnte als Regulator für TRPV1 dienen (Tian *et al.*, 2006). Auch im humanen Gewebe konnte eine mRNA-Splice-Variante isoliert werden (TRPV1b), die funktionelle Ionenkanäle bildet und von Hitzereizen um 47°C aktiviert wird, nicht jedoch von Capsaicin oder Protonen (Lu *et al.*, 2005). TRPV1b scheint ein natürlich vorkommender negativer Regulator von TRPV1 zu sein (Vos *et al.*, 2006). In der Maus existiert die Splice-Variante TRPV1β, die alleine nicht funktionell ist aber TRPV1 negativ regulieren kann (Wang *et al.*, 2004). Eine weitere N-terminale Variante scheint auch an der osmosensorischen Transduktion beteiligt zu sein (Naeini *et al.*, 2006).

TRPV1 kann durch verschiedene direkte und indirekte Mechanismen sensibilisiert werden, so dass seine Aktivierbarkeit gesteigert ist (Greffrath, 2006). Bei einer Hyperalgesie sinkt die Schwelle für die Aktivierbarkeit der Nozizeptoren, bei der Allodynie sind sie bereits durch nicht-noxische Reize aktivierbar (Silbernagl und Despopoulos, 2007). Bei TRPV1 haben Protonen z.B. zwei Hauptfunktionen: Der Rezeptor kann einerseits bei Raumtemperatur aktiviert werden, wenn der extrazelluläre pH unter pH6 fällt, andererseits verstärken Protonen die Antwort auf Capsaicin oder Hitze und bewirken dies über einen Konzentrationsbereich, der sich bei der lokalen Azidose findet, die durch Gewebeverletzungen hervorgerufen wird (Tominaga *et al.*, 1998).

Durch langanhaltende Aktivierung kann TRPV1 jedoch auch desensibilisiert werden, so dass der Rezeptor nicht ein weiteres Mal aktivierbar ist. In einem unmittelbaren Effekt nach

Ligandenbindung kommt es zunächst zur Dephosphorylierung von TRPV1, z.B. durch Calcineurin, einer Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Phosphatase. Diese Dephosphorylierung kann durch die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII-Kinase) wieder aufgehoben werden. Da für die Bindung der Vanilloide an TRPV1 die Phosphorylierung an Ser502 und Thr704 notwendig ist, scheint der Aktivierungs- / Desensibilisierungszustand durch Ligandenbindung über das Verhältnis von Phosphorylierung und Dephosphorylierung kontrolliert zu sein (Jung *et al.*, 2004; Docherty *et al.*, 1996). Capsaicin hat aber auch eine zytotoxische Wirkung und führt bei Dauerapplikation vermutlich zu einem Absterben der TRPV1-positiven Neurone. Da die Neurone nicht erneut aktivierbar sind, entsteht eine Analgesie. Daher wird diese Substanz zur Schmerzbehandlung eingesetzt (Greffrath, 2006). Die Neurone durchlaufen durch die Inkubation mit Capsaicin eine Reihe von morphologischen, neurochemischen und histochemischen Veränderungen (Holzer, 1991).

Im Jahr 1999 klonierten Caterina *et al.* den strukturell ähnlichen Vanilloidrezeptor VRL1 (vanilloid-receptor like protein 1), der nach neuer Nomenklatur als TRPV2 bezeichnet wird und 50% Homologie zu TRPV1 aufweist (Montell *et al.*, 2002a). TRPV2 wird im Gegensatz zu TRPV1 in den mittleren und größeren Spinalganglienneuronen exprimiert. Da er durch Temperaturen um 52°C aktiviert wird scheint er ein Transduktionsmolekül für höherschwellige Hitzereize und somit für die hitzeinduzierten Antworten von A-Faser Mechano-Hitze-Nozizeptoren (AMH) der Gruppe I verantwortlich zu sein, gegenüber Capsaicin und Protonen ist er jedoch insensitiv (Greffrath *et al.*, 2003; Ahluwalia *et al.*, 2002b; Caterina *et al.*, 1999; Treede *et al.*, 1995). Neben den Spinalganglienneuronen ist er auch in den trigeminalen Ganglien, im Rückenmark, im Gehirn und im nicht-neuronalen Gewebe exprimiert (Saunders *et al.*, 2007; Dietrich *et al.*, 2006; Nagasawa *et al.*, 2007; Bender *et al.*, 2005; Liapi und Wood, 2005; Rutter *et al.*, 2005; Yazulla und Studholme, 2004; Caterina *et al.*, 1999). Neben noxischer Hitze dienen auch Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (insulin growth factor 1) und Neuropeptide wie HA (head activator) als Aktivatoren (Pedersen *et al.*, 2005). Er scheint zudem als Mechanosensor in der glatten Gefäßmuskulatur zu dienen (Beech *et al.*, 2004; Muraki *et al.*, 2003).

1.2.2 Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.4

Der durch einen Reiz entstehende Ionenstrom an der peripheren Nervenendigung wird durch spannungsgesteuerte Natriumkanäle in Aktionspotenziale umgewandelt und zur zentralen Endigung weitergeleitet. Zusätzlich finden sich an den peripheren Endigungen spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, die durch Repolarisation die Inaktivierung der Natriumkanäle aufheben und so dazu beitragen, das tonische Generatorpotenzial in repetitive Aktionspotenziale zu transformieren. Die Aktionspotenziale werden mit unverminderter Amplitude über die Nervenfasern weitergeleitet und führen am zentralen Ende zur Ausschüttung von Neurotransmittern (z.B. Glutamat). Die präsynaptischen Endigungen enthalten spannungsgesteuerte Kalziumkanäle, die das ankommende Aktionspotenzial mit der Exozytose der synaptischen Vesikel, welche die Neurotransmitter enthalten, verbinden (Silbernagl und Despopoulos, 2007; Treede, 2007; **Abb. 4**).

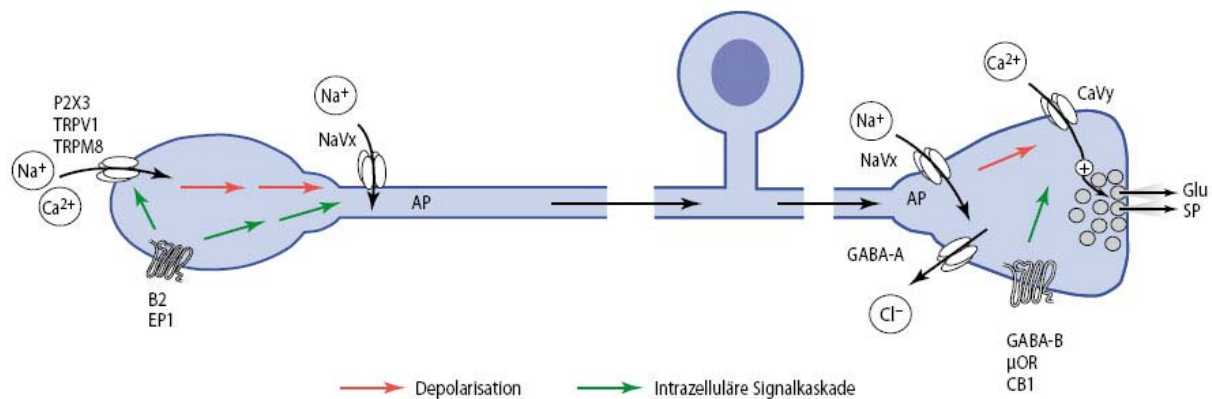


Abb. 4: Transduktion und Transformation noxischer Reize.

Ein noxischer Reiz bewirkt einen Einstrom von Natrium- und Kalziumionen. Sobald das Membranpotenzial bis zur Schwelle depolarisiert ist, öffnen spannungsabhängige Natriumkanäle und es kommt zur Bildung von Aktionspotentialen, die über das Axon bis zur zentralen Nervenendigung weitergeleitet werden. Durch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle werden die ankommenden Aktionspotenziale mit der Exozytose der synaptischen Vesikel und somit der Neurotransmitterausschüttung verbunden. An der präsynaptischen Endigung finden sich Rezeptoren für Neurotransmitter und Neuromodulatoren wie z.B. endogene Cannabinoide, da an dieser Stelle Hemmprozesse durch präsynaptische Hemmung wirken können (aus Treede, 2007).

Von den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen sind vor allem die transient aktiven (A-Typ) Kaliumkanäle von Bedeutung, da sie einen schnell inaktivierenden spannungsgesteuerten transienten Auswärtsstrom vermitteln. Aktive präsynaptische A-Typ-Kanäle können

Aktionspotenziale, die mit einer niedrigen Frequenz ankommen, repolarisieren, so dass der Kalziumeinstrom nicht ausreicht, um die Neurotransmitterfreisetzung auszulösen. Bei hohen Frequenzen inaktivieren diese Kanäle, die Aktionspotenziale sind verlängert und der Kalziumeinstrom reicht für die Neurotransmitterausschüttung aus (Pongs, 1999). Zu den Kaliumkanälen die einen schnell inaktivierenden auswärts gleichrichtenden A-Typ-Strom vermitteln und somit die Repolarisierung des Membranpotenzials und die Erregbarkeit regulieren zählt der Kv1.4. Er gehört zu den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen (Kv, voltage-gated) der Unterfamilie Kv1 (es gibt 1-6) und ist selektiv permeabel für Kalium. Wie auch die Vanilloidrezeptoren besteht er aus 6 Transmembrandomänen mit einer Porenschleife zwischen TM5 und TM6. Der N- und der C-Terminus liegen beide intrazellulär. Am N-Terminus befindet sich ein Inaktivierungsball, der an das S4 / 5-Segment binden kann. Aus 4 Untereinheiten bilden sich Homo- bzw. Heterotetramere (Rasband *et al.*, 2001; Pongs, 1999 und 1992; Safronov *et al.*, 1996; Stühmer *et al.*, 1989; **Abb. 5**). Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist Kv1.4 in präsynaptischen Terminalien zu finden und scheint die Ausschüttung von Neurotransmittern zu regulieren (Trimmer und Rhodes, 2004; Cooper *et al.*, 1998).

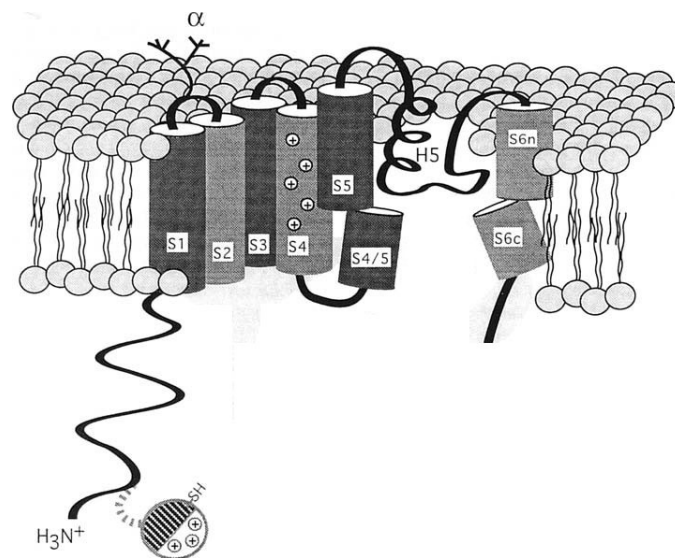


Abb. 5: Aufbau des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.4

Die Mitglieder der Kv-Familie bestehen aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) mit einer Porenschleife zwischen S5 und S6. N- und C-Terminus liegen beide intrazellulär. Der Inaktivierungsball am N-Terminus kann an das S4 / S5-Segment binden. Aus vier Untereinheiten bildet sich ein funktioneller Kanal (aus Dolly und Parcej, 1996; modifiziert).

Im Gegensatz zu Natrium- und Kalziumkanälen hat die Expression von Kaliumkanälen in den Spinalganglienneuronen erst vor kurzem Aufmerksamkeit erlangt (Passmore *et al.*, 2003; Rasband *et al.*, 2001). Von den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen die man in diesen Neuronen findet, ist nur Kv1.4 hauptsächlich in den kleineren Zellen exprimiert, wo er als Homomer vorliegt (Rasband *et al.*, 2001). Diese Zellen sind ebenso positiv für die Bindung von IB₄, dem Marker der nicht-peptidergen Subklasse nozizeptiver Neurone (**Tab. 2**). Es konnte gezeigt werden, dass in diesen IB₄- und Kv1.4-positiven Zellen die Entladungseigenschaften durch A-Typ-Kaliumkanäle, somit möglicherweise Kv1.4, beeinflusst werden (Vydyanathan *et al.*, 2005). In trigeminalen Ganglien wird eine Ko-Expression von TRPV1 und Kv1.4 als sehr wahrscheinlich angenommen (Tanimoto *et al.*, 2005), in den Neuronen der Spinalganglien konnte diese jedoch bis jetzt noch nicht gezeigt werden. Es ist somit unklar, ob Kv1.4 in einem Teil oder in allen nozizeptiven Neuronen exprimiert wird und dort möglicherweise eine Rolle bei der Antinozizeption übernimmt, da seine Aktivierung zu einer reduzierten Aktionspotenzialfrequenz und somit zu einer Hemmung der neuronalen Erregbarkeit führt.

Die Aktivierung von Kv1.4 ist über den Grad seiner Phosphorylierung reguliert (Tao *et al.*, 2005; Nitabach *et al.*, 2002; Roeper *et al.*, 1997). Die Proteinkinase A phosphoryliert Ser229 in der hochkonservierten T1-Domäne von Kv1.4 (Tao *et al.*, 2005). Die Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Proteinkinase phosphoryliert Kv1.4 im N-terminalen Bereich, was zu einer Verlangsamung der Inaktivierung und einem beschleunigten Erholen vom inaktiven Zustand führt (Roeper *et al.*, 1997). Das Verhältnis zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung wird dabei jeweils über die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration reguliert (Tao *et al.*, 2005; Roeper *et al.*, 1997).

1.2.3 Der Cannabinoidrezeptor 1 (CB1)

Von Cannabinoiden nimmt man an, dass sie die zentrale und / oder periphere Antinozizeption über metabotrope Cannabinoidrezeptoren vermitteln (Cravatt und Lichtman, 2004; Howlett *et al.*, 2004; Pertwee, 2001). Bislang wurden die zwei Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 identifiziert, bei denen es sich nicht um Ionenkanäle sondern um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren handelt. CB1 ist vor allem im ZNS hauptsächlich im Hippocampus, Striatum, Substantia nigra und dem cerebralen Kortex, aber auch in Astrozyten und Mikrogliazellen

sowie in peripheren Geweben exprimiert. Die Konzentration im peripheren Gewebe ist niedriger als im zentralen, was jedoch nicht eine geringere Bedeutung von CB1 in der Peripherie bedeuten soll. In den zentralen und peripheren Nervenendigungen können diese Rezeptoren die Neurotransmitterfreisetzung modulieren. CB2 dagegen findet sich hauptsächlich im Gewebe des Immunsystems, wo er die Zytokinausschüttung reguliert (Diaz-Laviada und Riuz-Llorente, 2005; Pertwee, 2005 und 2001; Howlett *et al.*, 2004).

Die Cannabinoidrezeptoren gehören zu der Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine und besitzen eine Proteinstruktur von sieben membran-durchspannenden Helices. Der intrazelluläre C-Terminus assoziiert mit den G-Proteinen während der extrazelluläre N-Terminus glykosyliert ist (Sugiura und Waku, 2002). Die Rezeptoren sind durch G-Proteine negativ an die Adenylatzyklase und positiv an die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) gekoppelt. CB1 ist zusätzlich durch G-Proteine an Ionenkanälen gekoppelt. Er aktiviert den spannungsgesteuerten A-Typ-Kaliumstrom in hippocampalen Neuronen, sowie die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (GIRK) und inaktiviert N-, L- und P/Q-Typ-Kalziumkanäle sowie D-("delayed rectifier") Typ-Kaliumkanäle, so dass es zu einer Hemmung der neuronalen Erregbarkeit kommt. Desweiteren findet sich eine negative Kopplung an die M-Typ-Kaliumkanäle (Diaz-Laviada und Riuz-Llorente, 2005; Howlett, 2004; Pertwee, 2001; Ameri, 1999). Die Kopplung an die A-Typ- und D-Typ-Kaliumkanäle erfolgt über einen sehr komplexen Signaltransduktionsweg über die Adenylatzyklase, Proteinkinase A (PKA) durch cAMP und die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Kanäle (Mu *et al.*, 1999 und 2000; Hampson *et al.*, 1995; Deadwyler *et al.*, 1995 und 1993; **Abb. 6**).

Neben den exogenen Agonisten für den Cannabinoidrezeptor existieren auch körpereigene Agonisten. Dem Endocannabinoidsystem kommt durch die Modulation der Neurotransmitterausschüttung und die Modulation der Immunfunktion eine große biologische Bedeutung zu. Bei den endogenen Agonisten handelt es sich um Eicosanoide wie z.B. Anandamid und 2-AG (Arachidonoylglycerol), welche beide bei Bedarf produziert werden oder aus vesikulären Speichern freigesetzt werden können (Cravatt und Lichtman, 2004; Howlett *et al.*, 2004).

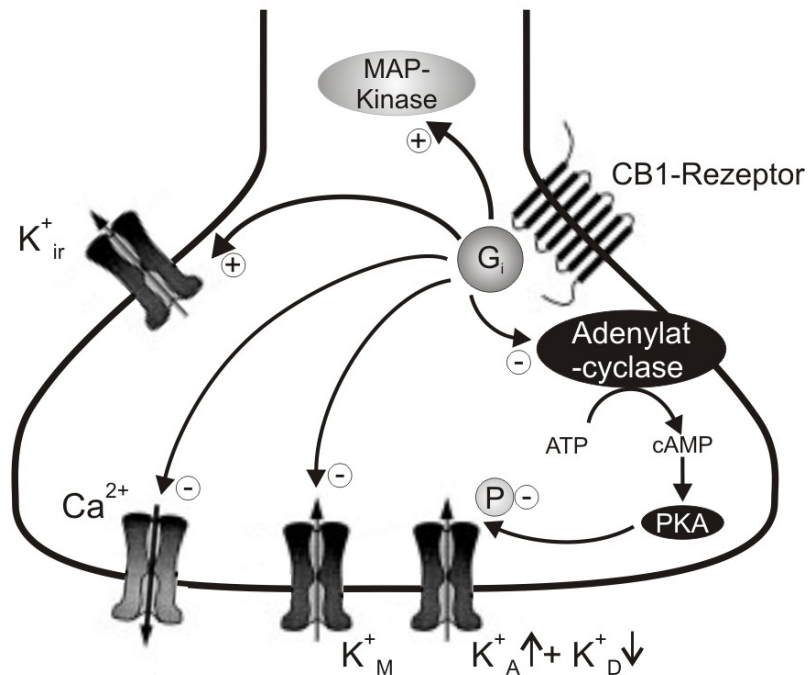


Abb. 6: Signaltransduktionswege des Cannabinoidrezeptors CB1.

Dargestellt ist eine präsynaptische Nervenendigung. Cannabinoidrezeptoren bestehen aus sieben Transmembrandomänen (S1-S7), der N-Terminus befindet sich extrazellulär und der C-Terminus, an den die G-Proteine koppeln, intrazellulär. CB1 ist positiv an die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase), an einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (K_{ir}^+) und den spannungsgesteuerten A-Typ-Kaliumkanal gekoppelt, negativ an die Adenylatzyklase, so dass die Bildung von cAMP reduziert ist, an N-, L- und P/Q-Typ spannungsabhängige Kalziumkanäle sowie D- und M-Typ-Kaliumkanäle. Die Kopplung an die A- und D-Typ-Kaliumkanäle erfolgt über die Adenylatzyklase (aus Ameri, 1999; modifiziert).

Das Expressionsmuster von CB1 in Spinalganglienneuronen wird sehr kontrovers diskutiert und reicht von 25 % (Bridges *et al.*, 2003) bis 100 % (Sanudo-Pena *et al.*, 1999). Die Ko-Expression mit nozizeptiven Markern variiert ebenso zwischen den Studien zwischen 24 % (CB1 und CGRP, Hohmann und Herkenham, 1999a) und 82 % der CB1-positiven Neuronen (CB1 and TRPV1, Ahluwalia *et al.*, 2000). Desweiteren ist das Ausmaß, in dem CB1 in präsynaptischen Terminalien nozizeptiver Afferenzen im Hinterhorn des Rückenmarks exprimiert wird noch nicht eindeutig gezeigt (Salio *et al.*, 2002; Morisset *et al.*, 2001; Farquhar-Smith *et al.*, 2000; Hohmann *et al.*, 1999; Hohmann und Herkenham, 1998).

2. Zielsetzung

Verschiedene Klassen nozizeptiver Spinalganglienneurone detektieren schmerzhafte Reize mit einer Vielzahl von liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanälen und leiten sie zentralwärts übers Hinterhorn des Rückenmarks zum Gehirn weiter, wo eine Schmerzempfindung ausgelöst wird. Endogene Cannabinoide dagegen können modulierend auf die Signalübertragung und somit antinozizeptiv wirken. Das genaue Expressionsmuster und Zusammenspiel verschiedener pro- bzw. antinozizeptiv agierender Membranproteine in den Neuronen ist bislang noch nicht aufgeklärt. Diese Arbeit konzentriert sich auf zwei Schlüssel-moleküle der nozizeptiven Signaltransduktion (TRPV1 und TRPV2) und auf ein endogenes Hemmsystem (CB1), das neuerdings neben den Opiaten als potenziell wichtiger Schmerzmodulator diskutiert wird. Die Spinalganglienneurone produzieren im Zellkörper alle für die Transduktion benötigten Proteine und transportieren diese zu der Endigung. Die Somata dienen daher in dieser Arbeit als Modell ihrer eigenen peripheren und zentralen Endigung.

Die pronozizeptiven transienten Rezeptor-Potenzial-Kanäle (TRP) der Vanilloidfamilie, TRPV1 und TRPV2, sind Transduktionsmoleküle für mäßige und starke Hitzereize. TRPV1 wird zusätzlich durch Capsaicin, Protonen und Endovanilloide aktiviert. Da Expressionsanalysen meist an Schnitten von Spinalganglien, funktionelle Untersuchungen dagegen an Zellkulturen durchgeführt werden, soll zunächst untersucht werden, ob sich die Expression dieser Rezeptoren zwischen diesen beiden Präparationsansätzen unterscheidet oder sich die Ergebnisse miteinander vergleichen lassen.

Capsaicin ist nicht nur einer der chemischen Aktivatoren von TRPV1 sondern auch ein Neurotoxin, nach dessen Einwirkung es zu einer Desensibilisierung, d.h. Abnahme der Sensitivität für schmerzhafte Reize kommt. Es ist jedoch unklar, ob die betroffenen Neurone durch die Wirkung der Substanz absterben oder die Expression des Rezeptors in den Zellen beeinflusst wird. Durch Inkubation einer Kultur von Spinalganglienneuronen mit Capsaicin soll die Wirkung der Substanz auf TRPV1- und TRPV2-exprimierende Zellen untersucht werden, indem die Anzahl positiver Zellen nach der Behandlung durch immunochemische Färbungen bestimmt wird. Die Wirkung von Capsaicin auf TRPV1-exprimierende Zellen soll zusätzlich funktionell über die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Spinalganglienneuronen und im heterologen Expressionssystem näher charakterisiert werden.

Neben TRPV1 findet sich in den Spinalganglienneuronen auch die mRNA einer Capsaicin-insensitiven N-terminalen Splice-Variante (Vr.5'sv), deren Proteinexpression bislang noch nicht gezeigt ist. Die exprimierenden Zellen werden mit einem Antikörper gegen den C-Terminus des Rezeptors detektiert und sind somit auf Proteinebene nicht von den Capsaicin-sensitiven Neuronen zu unterscheiden. Es sollen monoklonale Antikörper gegen die N-Termini von TRPV1 und TRPV2 hergestellt werden, so dass sie sich in einer Doppelfärbung mit den C-terminal gerichteten Kaninchenseren einsetzen lassen, um einerseits nur die Capsaicin-sensitiven TRPV1-positiven Zellen zu detektieren und andererseits eine möglicherweise funktionell unterschiedliche N-terminale Splice-Variante von TRPV2 zu erkennen. Mit diesen Antikörpern soll ebenfalls der Einfluss von Capsaicin auf die TRPV1- und TRPV2-positiven Neurone analysiert werden.

Obwohl TRPV1 und TRPV2 in unterschiedlich großen Spinalganglienneuronen exprimiert werden und zwei unterschiedliche Arten von Hitzeantworten vermitteln überlappen dennoch die Größenverteilungen der exprimierenden Zellen. Neben der Entwicklung der monoklonalen Antikörper soll mit den kommerziell erhältlichen Antikörpern für TRPV1 und TRPV2 (gegen den C-Terminus gerichtet; für TRPV1 aus dem Meerschweinchen) mit Immunofluoreszenz-Doppelfärbungen an Spinalganglienschnitten untersucht werden, ob eine Zellpopulation mit TRPV1-TRPV2-ko-exprimierenden Neuronen existiert.

Im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die sich bei der Untersuchung der peripheren Antinozizeption durch Herabsetzung der Transformation auf die Natriumkanäle fokussieren, soll in dieser Arbeit der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.4 betrachtet werden, da er als A-Typ-Kanal schnell inaktivierende auswärts gleichrichtende Ströme vermittelt und somit an der Kontrolle der repetitiven Entladungen und der Neurotransmitterausschüttung beteiligt ist. Seine Aktivierung bewirkt ebenso eine Herabsetzung der Transformation und somit eine periphere antinozizeptive Wirkung. Er konnte bislang in den kleinen Spinalganglienneuronen nachgewiesen werden. Seine Ko-Expression mit den pronozizeptiven Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2 soll durch Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen in Schnitten von Spinalganglien untersucht werden.

Cannabinoide vermitteln zentrale und/oder periphere Antinozizeption über den Cannabinoidrezeptor CB1. CB1 gehört zum Endocannabinoidsystem und ist modulierend an der Übertragung der Aktionspotenziale auf das zweite Neuron beteiligt. Ein Ligand von CB1,

das Endocannabinoid Anandamid, aktiviert auch TRPV1 stellt somit auch ein Endovanilloid dar. Um ein mögliches funktionelles Zusammenspiel der Vanilloidrezeptoren und CB1 bei der Nozizeption / Antinozizeption aufzuklären, soll die Ko-Expression dieser Rezeptoren an Schnitten von Spinalganglien analysiert werden. Da der Cannabinoidrezeptor Kaliumkanäle aktivieren kann und somit möglicherweise auch den spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kv1.4, soll auch die Ko-Expression dieser beiden Membranproteine untersucht werden. Zu der Häufigkeit von CB1 gibt es sehr widersprüchliche Angaben. Daher sollen die Expressions- bzw. Ko-Expressionsexperimente für CB1 sowohl auf Proteinebene durch Antikörperfärbungen als auch auf mRNA-Ebene durch *in situ*-Hybridisierung durchgeführt werden.

3. Materialien

3.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Stammlösung: Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose (Universal: 0,05-50 kbp)	Peqlab, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Blocking-Reagenz für <i>in situ</i> -Hybridisierung	Roche, Mannheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (X-Phosphat, BCIP)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Capsaicin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Capsazepin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Caseinhydrolysat	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant-Blue R250	Serva, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM (high glucose) mit L-Glutamin	PAA, Cölbe
DMEM F12 mit L-Glutamin (Trockensubstanz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Leiter: GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Roth
Essigsäure (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol $\geq 99,8\%$, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraacetat (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Flüssigstickstoff	Linde, Wiesbaden

Formamid (FA)	Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (Standard und Clone)	PAA, Coelbe
Freunds Adjuvans, komplett und inkomplett	Sigma-Aldrich, Steinheim
FURA 2-AM	Merck, Darmstadt
Geneticin (G418)	PAA, Coelbe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Halothan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HAT-Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
HBSS-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
HT-Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
Hybridoma-SFM Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kollagenase	Biochrom, Berlin
L-Glutamin (100fach Konzentrat)	PAA, Coelbe
LipofectAMINE PLUS™	Invitrogen, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt

di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nickel-Nitriloessigsäure (NTA)	Qiagen, Hilden
Nitrotetrazoliumblauschlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
dNTP-Set	Roche, Mannheim
Opti-Mem Serum	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
PBS-Trockensubstanz ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Biochrom, Berlin
Penicillin / Streptomycin	PAA, Cölbe
p-Phenylendiamin (OPD)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol (PEG) 1500	Serva, Heidelberg
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein Leiter für niedermolekulare Proteine Prestained (Benchmark)	Bio-Rad, München Invitrogen, Karlsruhe
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tissue Tek	SLEE, Mainz
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglykol)	Roth, Karlsruhe
Trypsin / EDTA (0,05 % / 0,02 %)	Biochrom, Berlin
TSS-Lösung (<i>Transformation and Storage Solution</i>)	Biozym, Hess. Oldendorf
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30% (H_2O_2)	Roth, Karlsruhe

3.2 Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papier (0,34mm)	Roth, Karlsruhe
Cellophanfolie	Insula, Mannheim
Deckgläser, rund: \varnothing 12 mm	Roth, Karlsruhe
quadratisch und rechteckig	
Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe
Drigalsky-Spatel	Roth, Karlsruhe
Einfrierboxen	Roth, Karlsruhe
Gazenetz (60 μ m)	Eckert Franz GmbH, Waldkirch
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Küvetten	Neolab, Heidelberg
Mikrotestplatten für ELISA (Falcon, flexible Platten)	Becton Dickinson, Heidelberg
Multilochplatten: 96-, 24-, 6-Loch	Nunc, Wiesbaden
Nylon-Blottingmembran, positiv geladen	Roche, Mannheim
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße	MWG Biotech, Ebersberg
Petrischalen \varnothing 94 mm für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen ART mit Filtereinsatz	Biozym, Hess. Oldendorf
Plastikfolie	Plastibrand Brand, Wertheim
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Blottingmembran	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße: 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Säulen für Proteinaufreinigung	Bio-Rad, München
Skalpell	Fine Science Tools, Heidelberg
Spritzen versch. Größen	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter, Porengröße 0,2 μ m	Sartorius, Göttingen
Zählkammer Neubauer	Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen: 25, 175 und 225 cm ²	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturpipetten versch. Größen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen \varnothing 35, 60 und 94 mm	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschälchen 60 μ , ibiTreat	Ibidi, München
Zentrifugenröhrchen: 10, 15 und 50 ml	Nunc, Wiesbaden

3.3 Geräte

Agarosegelsystem Perfect Blue	Peqlab
Autoklav	Webeco, Ober-Ramstadt
Brutschränke:	
Queue StabilTherm (Modell QNW 300)	Nunc, Wiesbaden
Typ BK 2 / 56	Ehret, Emmendingen
ELISA-Reader Titertek Multiskan Plus MK II	Bartolomey, Rheinbach
Fluoreszenzmikroskop AH3	Olympus, Planegg
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Folien-Schweißgerät (Severin)	Roth, Karlsruhe
Gefrierschrank Modell Basic, -85°C	Nunc, Wiesbaden
Geltrocknungsrahmen	Roth, Karlsruhe
Heizblock Dri Block DB-2D	Techne, Stone, UK
Kalzium-Imaging System	TILL Phototonics
mit Mikroskop Olympus IX70	Olympus
Kryostat	Slee, Mainz
Laminar Flow Sterilbank	Nunc, Wiesbaden
Laser Scanning Mikroskop TCS SP2	Leica, Bensheim
Magnet-Heizrührer	Heidolph, Kehlheim
pH-Meter pH 525	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
Pipetten versch. Größen	Eppendorf, Hamburg
Pipetten für Multilochplatten	Eppendorf, Hamburg
Powersupply Consort E802	Peqlab, Erlangen
Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten, Iridek- tomieschere)	Fine Science Tools, Heidelberg
Proteinelektrophoresesystem Perfect Blue	Peqlab, Erlangen
Schüttelinkubator mit Heizhaube Certomat H / R	Braun, Melsungen
SemiDry-Blottingkammer	Peqlab, Erlangen
Spektrophotometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Stickstofftonne VHC35	Taylor-Wharton Harsco, Husum
Thermocycler Primus 96 Plus	MWG-Biotech, Ebersberg

Transilluminator mit Geldokumentationssystem	UVP Limited, Cambridge; UK
Vortexer MS 2 Minishaker	IKA, Staufen
Waagen:	
Scaltec SBA 52	Labotec, Wiesbaden
Scaltec SBA 31	Labotec, Wiesbaden
Wasserbad mit Thermostat und Schüttler	Köttermann, Hänigsen
Wippschüttler mit Haube und Thermostat	Heidolph, Kehlheim
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Sorvall RC-5B	Du Pont, Bad Nauheim

3.4 Enzyme

<i>Bam HI</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>EcoRI</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Hind III</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Xba I</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Genecraft, Lüdinghausen

3.5 Kits

Antikörper Isotypisierungskit	Sigma-Aldrich, Steinheim
DIG Oligonucleotide Tailing Kit	Roche, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
E.Z.N.A. [®] Cycle-Pure Kit	Peqlab, Erlangen
E.Z.N.A. [®] Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
E.Z.N.A. [®] Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
E.Z.N.A. [®] Total RNA Kit	Peqlab, Erlangen
Superscript First Strand Synthesis System	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe

3.6 Antikörper

3.6.1 Primärantikörper

Anti-CB1 N-term (N-15), Ziege, mit Blocking-Peptid	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-His, monoklonal, Maus	Pharmacia-Biotech, Freiburg
Anti-TRPV1 C-term, Kaninchen	M. J. Caterina, Baltimore, USA
Anti-TRPV1 C-term, Meerschweinchen	Chemicon, Temecula, USA
Anti-TRPV2 C-term, Kaninchen	M. J. Caterina, Baltimore, USA
Anti-Kv1.4, monoklonal, Maus	S. Saaler-Reinhardt, Mainz

3.6.2 Sekundärantikörper

Anti-DIG-Alkalische Phosphatase, Schaf	Roche, Mannheim
Anti-Kaninchen-IgG-Cy3, Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-Alkalische Phosphatase, Ziege	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Maus-IgG-Cy3, Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-FITC, Esel	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-Peroxidase (POD), Ziege	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Meerschweinchen-IgG-FITC, Esel	Dianova, Hamburg
Anti-Ziege-IgG-FITC, Esel	Dianova, Hamburg

3.7 Zelllinien und Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS	Novagen (Merck), Darmstadt
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Novablue)	Novagen (Merck), Darmstadt
HEK293 (Human embryonic kidney cells)	LGC Promochem GmbH, Wesel
P3 x 63 Ag 8.653 (ATCC CRL 1580)	LGC Promochem GmbH, Wesel

3.8 Vektoren

pGEM-T Vector System I	Promega, Mannheim
pET-28a	Novagen (Merck), Darmstadt
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe

3.9 Versuchstiere

Mäuse:	Balb / C	weiblich
Ratten:	Sprague Dawley	männlich und weiblich

Alle Tiere wurden von der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz bezogen.

3.10 Primer und Sonden

Primer für pGEMT

SP6	5' -GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'	62°C
T7	5' -AAT ACG ACT CAC TAT AG-3'	46°C

Primer für pcDNA3

pcDNA3-SP6	5' -GCA TTT AGG TGA CAC TAT AG-3'	56°C
T7	5' -AAT ACG ACT CAC TAT AG-3'	46°C

Primer für pET28a

T7-pET-vor	5' -TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG-3'	54°C
T7-pET-rück	5' -GCT AGT TAT TGC TCA GCG GT-3'	58°C

Spezifische Primer für die Klonierung von TRPV1- und TRPV2-N-Terminus

VR1-RTF4 (1-20)	5' -CAG CTC CAA GGC ACT TGC TC-3'	62°C
VR1-RTR4 (705-724)	5' -GTC ATG TTC CGC CGT TCA AT-3'	60°C
VR1-RTF2 (29-47)	5' -GTG TGC CTG CAC CTA GCT G-3'	62°C
VR1-RTR9 (2759-2778)	5' -TTG GAG ATC ATG GTT GGA TA-3'	56°C
VRL1-RTF1(18-37)	5' -GTC CAC TGT GTG AGA CGA AC-3'	62°C
VRL1-RTR4(823-841)	5' -GCG ATG TGC AGC GCA CTG T-3'	62°C

Degenerierte Primer für die prokaryotische Proteinexpression

VR1-F1 (84-101)	5' - GGA TTC GAA CAA CGG GCT AGC TTA-3'	54°C
VR1-R1 (384-401)	5' - GAA TTC CTA CTT CTC ACC AGC GGA GAC-3'	58°C
VR1-VL-F1 (75-92)	5' - GAA TTC GAA AGG ATG GAA CAA CGG-3'	54°C
VR1-VL-R1 (2584-2600)	5' - TCT AGA CCA TTA TTT CTC CCC TG-3'	50°C
VRL1-F1 (333-349)	5' - GGA TTC ACT TCA GCC TCC AGC CC-3'	56°C
VRL1-R1 (564-581)	5' - AAG CTT CTA GAC CAC ACT GAA GAG TCG-3'	56°C

Das eingebaute Stopcodon ist **fett** markiert und die artifiziellen Schnittstellen **grün**. Dabei

kodiert GGA TCC *für BamHI*
 GAA TTC *EcoRI*
 TCT AGA *Xba I*
 AAG CTT *HindIII*.

Sonden für die *in situ*-Hybridisierung (gegen den N-Terminus von CB1)

Anti-Sense 5' -GAG GTC TGT GGT GAT GGT ACG GAA GGT GGT GTC TGC AAG
 GCC ATC TAG GAT CGA CTT CAT-3'

Sense 5' -ATG AAG TCG ATC CTA GAT GGC CTT GCA GAC ACC ACC TTC
 CGT ACC ATC ACC ACA GAC CTC-3'

Sämtliche Primer und Sonden wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von Bakterien in Suspension

LB-Medium: 1 % NaCl [w/v]
 0,5 % Hefeextrakt [w/v]
 1 % Caseinhydrolysat [w/v] auf pH 7.0 einstellen

Das LB-Medium wurde für 30 min autoklaviert und nach dem Abkühlen mit den entsprechenden Bakterien (*E. coli XLI-Blue* bzw. *E. coli Bl21 DE3 pLysS*) entweder aus einer Bakteriensuspension von einem Glycerolstock (**4.1.3**) oder von einer Agarplatte gepickten Kolonie (**4.1.2**) angeimpft. Waren die Bakterien zuvor mit einem Plasmid transformiert worden, wurde dem Medium das entsprechende selektierende Antibiotikum zugefügt (100 µg / ml Ampicillin für den pGEMT-Vektor; 50 µg / ml Kanamycin für den pET-Vektor; **3.8**, **4.1.10.2**, **4.1.14.1**). Plasmidfreie *E. coli XLI-Blue* wurden in Tetracyclin-haltigem Medium kultiviert (10 µg / ml). Die Kulturen wurden über Nacht (ü.N.) bei 220 – 250 rpm und 37°C unter Sauerstoffzufuhr auf dem Bakterieninkubator gezüchtet.

4.1.2 Kultivierung von Bakterien auf Agarplatten

LB-Agar: LB-Medium (**4.1.1**)
 1,5 % Agar [w/v] auf pH 7.0 einstellen

Der LB-Agar wurde durch 30-minütiges Autoklavieren verflüssigt, auf 50°C abgekühlt, je nach verwendetem Plasmid mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (100 µg / ml Ampicillin, 40 µg / ml Kanamycin; **4.1.1**), für die Blau / Weiß-Selektion (**4.1.10.2**) 1 mM IPTG und 0,02 % [w/v] X-Gal zugegeben und in Petrischalen ausgegossen (20 ml pro Schale). Die Bakterien wurden durch Ausplattieren mit einem Drigalsky-Spatel auf den Nährboden aufgebracht und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.1.3 Kryokonservierung von Bakterien

Zur Langzeitlagerung wurde eine Bakteriensuspension mit 18 % Glycerol [v/v] gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der Glycerolanteil schützte dabei die Zellen, da Kristallbildung beim Einfrieren und Auftauen verhindert wurde (Sambrook *et al.*, 1989).

4.1.4 DNA-Plasmidpräparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde der *E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I* der Firma Peqlab eingesetzt. Dieser Kit eignete sich für eine Aufreinigung von bis zu 25 µg Plasmid-DNA aus einer 10 ml Bakterienkultur und kombinierte dabei eine modifizierte alkalische Lyse mit den selektiven und reversiblen DNA-Bindungseigenschaften von HiBind[®]-Silikamembranen sowie der Schnelligkeit und leichten Durchführbarkeit von Zentrifugationssäulenmethoden. Bis auf Ethanol zur Komplettierung des DNA-Waschpuffers und *Aqua dest.* für die Elution waren alle benötigten Materialien und Puffer Bestandteile des Kits.

Die Bakterien einer 5 ml über-Nacht-Kultur (Ü.N.K.) (4.1.1) wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 10000 x g pelletiert und in 250 µl RNase-haltiger Lösung I durch vortexen resuspendiert. Es wurden 250 µl Lösung II zugegeben und durch vier- bis sechsmaliges Invertieren gemischt bis ein klares Lysat entstand. Durch die Zugabe von 350 µl Lösung III und mehrmaliges Invertieren wurde das Lysat neutralisiert und es bildete sich ein weißes, flockiges Präzipitat, das sich durch 10-minütige Zentrifugation bei 10000 x g abtrennen ließ. Der klare Überstand wurde auf eine HiBind[®]-Miniprep-Zentrifugensäule gegeben, für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, die Säule mit 500 µl HB-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit komplettiertem DNA-Waschpuffer und je 1-minütiger Zentrifugation (10000 x g) wurde die Säule durch eine zusätzliche Zentrifugation getrocknet. Die an die Matrix gebundene und gereinigte DNA konnte mit 50 µl *Aqua dest.* und 1 minütiger Zentrifugation bei 10000 x g eluiert und anschließend bei -20°C gelagert werden.

4.1.5 RNA-Präparation

Zur Isolation von RNA aus Gewebe wurde der *E.Z.N.A.*[®] *Total RNA Kit* der Firma Peqlab eingesetzt. Dieses Kit eignete sich für die Isolierung von bis zu 100 µg Gesamtzell-RNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben und kombinierte die selektiven und reversiblen Bindungseigenschaften von HiBind[®]-Silikamembranen mit der Schnelligkeit und leichten Durchführbarkeit von Zentrifugationssäulenmethoden. Aufzuarbeitende Zellen und Gewebe wurden zunächst homogenisiert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert, wobei alle vorhandenen RNasen und sonstige Enzyme effizient inhibiert wurden. Bis auf Ethanol zur Komplettierung des DNA-Waschpuffers und 2-Mercaptoethanol zur Komplettierung des TRK-Puffers waren alle benötigten Materialien und Puffer Bestandteile des Kits.

Um die sehr empfindliche RNA zu schützen, mussten alle verwendeten Materialien von RNasen befreit werden. Lösungen und Puffern wurde 0,1 % [v/v] des RNase-Inhibitors DEPC (Diethylpyrocarbonat) zugesetzt, Reaktionsgefäße in 0,1 % DEPC-haltiges *Aqua dest.* gelegt und ü.N. inkubiert. Zur Inaktivierung von DEPC wurden am folgenden Tag alle behandelten Materialien und Lösungen für 1 h autoklaviert.

Bis zu 40 mg Gewebe (Spinalganglien aus der Ratte; **4.3.5.1**) wurde in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe wurde mit 400 µl komplettiertem TRK-Lyse-Puffer (20 µl β-Mercaptoethanol je ml Puffer) versetzt und mit einem Spritzenstempel homogenisiert. Nach Zugabe der gleichen Menge (400 µl) 70 %igen Ethanols und gutem Durchmischen wurde das Homogenisat für 2 min bei 16000 x g zentrifugiert, der Überstand auf eine Säule gegeben, für 1 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach dem Waschen der Säule (1 x mit 750 µl Waschpuffer I und 2 x mit komplettiertem Waschpuffer II bei je 1-minütiger Zentrifugation von 16000 x g), konnte sie durch eine weitere Zentrifugation getrocknet und die RNA mit 40 µl RNase-freiem *Aqua dest.* und Zentrifugation bei 16000 x g eluiert werden. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

4.1.6 Spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Konzentrationsmessungen werden u.a. nach einer DNA-Plasmid- (4.1.4) oder einer RNA-Präparation (4.1.5) durchgeführt. Nukleinsäuren besitzen bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum, das man sich für diese Bestimmung zunutze macht. Die Reinheit der Nukleinsäuren berechnet sich aus dem Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm. Dabei gilt für reine DNA ein Verhältnis A_{260} / A_{280} von 1,8 - 2,0 und für reine RNA von 1,9 - 2,0 (Brown, 1993). Nicht vollständig entfernte Phenolreste und Proteine, die unter anderem aus aromatischen Aminosäuren aufgebaut sind, absorbieren bei 280 nm und stellen so Kontaminationen dar, die den Quotienten A_{260} / A_{280} verringern.

Nach entsprechender Verdünnung der Nukleinsäurelösung wurde deren Absorption ermittelt und die Konzentration von DNA bzw. RNA in der Lösung nach Ausubel *et al.* (1994) errechnet:

Konzentration doppelsträngiger DNA ($\mu\text{g} / \text{ml}$):	50 x OD260
Konzentration einzelsträngiger DNA ($\mu\text{g} / \text{ml}$):	37 x OD260
Konzentration einzelsträngiger RNA ($\mu\text{g} / \text{ml}$):	40 x OD260

4.1.7 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Als Trägermaterial wird dabei ein inertes, elektrisch neutrales Gel aus Agarose verwendet. Agarose ist ein aus Meeresalgen gewonnenes, komplex vernetztes, gelierfähiges Polysaccharid, dessen Vernetzung einen Molekularsiebeffekt der Gelporen bewirkt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren ist reziprok proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes (McDonell und Studier, 1977; Helling *et al.*, 1974). Eine Änderung der Agarosekonzentration beeinflusst den Siebeffekt des Gels durch eine Veränderung der Porengröße.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

TBE-Laufpuffer:	90 mM	Tris-HCl, pH 8.3
	90 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA

6-fach Probenpuffer:	0,25 %	Bromphenolblau [w/v]
	40 %	Saccharose [w/v]

Für die Herstellung der Gele wurde das *Perfect Blue Agarosegelsystem* der Firma Peqlab verwendet. Es wurden 1 %ige Gele mit einer Dicke von 0,5 cm hergestellt, die sich zu einer Trennung von Fragmenten zwischen 500 und 10000 Basenpaaren (bp) eigneten. Die Agarose wurde in TBE-Puffer zum Kochen gebracht, nach Abkühlung auf ca. 60°C in den abgedichteten Gelschlitten ausgegossen und ein Probenkamm zum Formen der Probenaschen eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine mit dem Laufpuffer TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und in die Geltaschen die mit 6-fach Probenpuffer versetzten DNA-Proben pipettiert. Die Saccharose im Probenpuffer bewirkte ein schnelles Absinken der DNA und das Bromphenolblau erzeugte eine Farbfront (Laufhöhe 300 bp), über die sich der Gellauf kontrollieren ließ. Ein DNA-Größenstandard ermöglichte später die Bestimmung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente sowie eine Konzentrationsabschätzung. Es wurde eine Spannung von 4 - 5 V pro cm² Gelfläche angelegt und die Elektrophorese gestoppt, sobald die Bromphenolblaufront zwei Drittel des Gels passiert hatte. Sollten DNA-Fragmente einer bestimmten Größe nach der Elektrophorese aus der Agarose extrahiert werden (**4.1.8**), wurden dickere Gele (ca. 0,8 cm) mit breiteren Taschen verwendet, so dass ein größeres Probenvolumen aufgetragen werden konnte.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für wenige Minuten in ein Ethidiumbromidbad (0,02 % [w/v] Ethidiumbromid in TBE) gelegt. Der Fluoreszenzfarbstoff lagerte sich als Interkalator zwischen einzelne Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls ein, so dass die DNA-Fragmente bei der Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 254 - 300 nm sichtbar gemacht werden konnten (Crawford und Waring, 1967).

Für die Dokumentation wurde das digitale Bildverarbeitungssystem Imagestore 5000 der Firma UVP, Cambridge (UK), bestehend aus Transilluminator, Videokamera, Stativ, Computer und Thermoprinter, eingesetzt.

4.1.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel, eine Technik um DNA zu reinigen und einzelne DNA-Fragmente aus komplexen Reaktionsgemischen zu isolieren, wurde mit dem *E.Z.N.A.*[®] *Gel Extraction Kit* der Firma Peqlab durchgeführt. Die isolierte DNA konnte anschließend direkt für verschiedene Folgeexperimente eingesetzt werden. Bis auf Ethanol zur Komplettierung des SPW-Waschpuffers und *Aqua dest.* für die Elution der DNA waren alle benötigten Materialien und Puffer Bestandteile des Kits.

Nach Abschluss der Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid (4.1.7) wurde die entsprechende DNA-Bande unter UV-Licht detektiert und mit einem Skalpell mit möglichst wenig überschüssiger Agarose ausgeschnitten. Da UV-Strahlung zu DNA-Schäden führen kann, wurde auf eine möglichst kurze Expositionszeit geachtet. Das DNA-Agarose-Stück wurde in ein sauberes und vorher gewogenes Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Bindepuffer pro Gramm Agarose versetzt und für 7 min bei 55 - 65°C inkubiert, wobei das Reaktionsgefäß alle 2 – 3 min geschüttelt wurde. Nach dem Lösen der Agarose sollte der Bindepuffer eine hellgelbe Farbe aufweisen. War er jedoch orange oder rötlich musste durch Zugabe von 5 µl 5 M Na-Acetat-Lösung (pH 5.2) der pH-Wert korrigiert werden. Maximal 650 µl der DNA-Agarose-Lösung wurden auf eine HiBind[®]-DNA-Zentrifugensäule gegeben und für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Nach einem optionalen Waschschrift mit 300 µl Bindepuffer wurde die Säule zweimal mit 750 µl SPW-Waschpuffer gewaschen und für je 1 min bei 10000 x g zentrifugiert, wobei vor der Zentrifugation 2 – 3 min gewartet wurde. Durch eine zusätzliche Zentrifugation wurde die Säule getrocknet und die DNA konnte mit 30 µl Elutionspuffer oder *Aqua dest.* von der Membran gelöst werden.

4.1.9 Reinigung von DNA-Fragmenten aus einer PCR-Reaktion

DNA aus PCR-Reaktionsansätzen (4.1.13) wurde vor der weiteren Verwendung (z.B. Reamplifikationen, PCR-Sequenzierungen, Restriktionen oder Ligationen) von störenden Verunreinigungen wie Primer, Nukleotiden oder Enzymen mit dem *E.Z.N.A.*[®] *Cycle-Pure Kit* der Firma Peqlab befreit, bei dem die Ansätze mit einem speziellen Bindepuffer gemischt und an eine HiBind[®]-Silikamembran gebunden werden. Bis auf Ethanol zur Komplettierung des

DNA-Waschpuffers und *Aqua dest.* für die Elution waren alle benötigten Materialien und Puffer Bestandteile des Kits.

Zu dem Volumen des PCR-Ansatzes wurde das gleiche Volumen XP1-Puffer gegeben und durch vortexen sorgfältig gemischt. Diese Mischung wurde auf eine HiBind®-Zentrifugensäule pipettiert, für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die Säule zweimal mit 750 µl des komplettierten SPW-Waschpuffers gewaschen, wobei jeweils für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert wurde. Durch eine zusätzliche Zentrifugation wurde die Säule getrocknet und die DNA mit 40 µl *Aqua dest.* durch eine 1 minütige Zentrifugation bei 10000 x g eluiert.

4.1.10 Herstellung rekombinanter DNA

4.1.10.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA an bestimmten und für jedes Enzym spezifischen Stellen durch Lösen der Phosphodiesterbindungen schneiden. Es handelt sich dabei meist um palindromartige Erkennungssequenzen aus etwa vier bis acht Basenpaaren (Nathans und Smith, 1975). Einige der Enzyme schneiden den DNA-Doppelstrang in der Mitte der Sequenz und es entstehen glatte Enden ("blunt ends"), andere dagegen schneiden versetzt, so dass die entstehenden Fragmente an ihren Enden kurze, überstehende Einzelstrangabschnitte ("*sticky ends*") besitzen. Die Vektoren, in die DNA-Fragmente eingebaut werden können, verfügen über Bereiche mit einer hohen Dichte an Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen ("*multiple cloning sites*"). Werden Vektor und DNA mit den gleichen zwei Enzymen geschnitten, können sie über die entstandenen kohäsiven Enden miteinander verbunden werden (Ligation, **4.1.10.2**).

Restriktionsansatz: 3 µl enzymspezifischer 10-fach Puffer
 5 - 6 µg DNA
 1 µl Enzymlösung
 ad. 30 µl Gesamtvolumen mit *Aqua dest.*

Die Restriktion wurde für 2 h bei 37°C inkubiert, die Enzyme für 20 min bei 65°C inaktiviert, die entstandenen DNA-Fragmente mittels einer Elektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Gel eluiert (**4.1.7** und **4.1.8**). Bei einem Doppel-Restriktionsansatz mit zwei Enzymen (je 1 µl) wurde der Universalpuffer Y-Tango⁺-Puffer je nach Enzym in einfacher oder doppelter Konzentration eingesetzt, um die ideale Salzkonzentration einzustellen.

4.1.10.2 Ligation linearer DNA

Ein DNA-Fragment kann mit einem linearisierten Vektor verbunden (ligiert) werden durch die Bildung neuer Phosphodiesterbindungen zwischen den überhängenden Enden beider Moleküle. Dieser Vorgang wird durch eine DNA-Ligase unter Verbrauch von ATP katalysiert (Weiss *et al.*, 1968). Die Selektionierung erfolgreich ligierter Vektoren erfolgt mittels der vektorspezifischen Antibiotikaresistenz. Einige Vektoren erlauben die Kontrolle der Insertion der DNA mittels der Blau / Weiß-Selektion. Diese Vektoren tragen neben dem Antibiotikum-Resistenzgen das *lacZ'*-Gen, welches einen funktionalen Teil der β -Galactosidase kodiert. Die β -Galactosidase ist für den Abbau von Lactose zu Glucose und Galactose verantwortlich (Ullmann *et al.*, 1967). Durch die Insertion von Fremd-DNA wird die Genstruktur für dieses Enzym zerstört. Bei der Verwendung von Agarplatten die das Lactoseanalogon X-Gal sowie IPTG als Induktor des Enzyms enthalten, zeichnen sich Kolonien, welche den Vektor ohne Insert beinhalten, durch eine blaue Färbung aus. X-Gal wird hier durch die Galactosidase zu einem blauen Produkt umgesetzt. Kolonien die Plasmide mit eingebauter DNA enthalten bleiben dagegen weiß, da das *lacZ'*-Gen zerstört ist und so keine funktionale β -Galactosidase entstehen kann.

Für die Ligation mit dem linearisierten Vektor pGEM-T wurde an das DNA-Fragment im Anschluss an die PCR (**4.1.13**) durch eine Inkubation für 10 min bei 74°C 3'-Adenosin-Überhänge angefügt, die an die 5'-Thymidin-Überhänge im Vektor binden konnten. Zirkularisierte Vektoren (z.B. für die bakterielle Proteinexpression; **4.1.14**) wurden mit Restriktionsendonukleasen so geschnitten, dass die daraus resultierenden kohäsiven Enden kompatibel zu denen der DNA-Fragmente waren (**4.1.10.1**). Es wurden äquimolare Mengen der Reaktionspartner eingesetzt, um eine Selbstligation des Vektors bzw. der DNA zu vermeiden.

Ligationsansatz für den pGEMT-Vektor: 5 µl 2-fach Rapid Ligationspuffer
 1 µl pGEMT-Vektor
 3 µl PCR-Ansatz
 1 µl Ligase (= 1U), für 2 h bei Raumtemperatur

Ligationsansatz für linearisierte Vektoren: 1 µl 10-fach Ligationspuffer
 10 – 50 ng geschnittener Vektor
 10 – 50 ng Fragment
 1 µl (= 1U) T4-DNA-Ligase
 ad. 10 µl *Aqua dest.*, ü.N. bei 4°C

Ein anschließendes Erhitzen für 10 min auf 65°C diente der Inaktivierung der Ligase.

4.1.11 Herstellung kompetenter Bakterien

Damit Fremd-DNA durch die mechanische Barriere der bakteriellen Zellwand in das Innere einer Zelle gelangen kann, muss die Permeabilität der Zellwand erhöht werden. Die Fähigkeit zur Aufnahme von DNA wird als Kompetenz bezeichnet und dadurch erreicht, dass die Bakterien in einer Lösung resuspendiert werden, die Polyethylenglykol, DMSO und divalente Kationen enthält (TSS: *Transformation and Storage Solution*). Die so präparierten Bakterien können über einen längeren Zeitraum bei -70°C gelagert werden (Chung *et al.*, 1989).

Eine Ü.N.K. (4.1.1) von *E. coli XL1-Blue* wurde 1:50 mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis die Zellen bei 600 nm eine Dichte von 0.25 – 0.4 besaßen (OD₆₀₀: ein Maß für die Zelldichte) und sich somit in ihrer frühen Log-Phase befanden. Währenddessen wurde die 2 x TSS-Lösung auf Eis aufgetaut, mit der gleichen Menge an sterilem *Aqua dest.* verdünnt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt. Pro ml Zellsuspension wurden 100 µl TSS-Lösung benötigt. Je 1 ml Bakteriensuspension wurden für 1 – 2 min bei 4°C und 5000 x g abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl eiskalter 1 x TSS-Lösung resuspendiert und die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien konnten bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt werden.

4.1.12 Transformation kompetenter Bakterien

Als Transformation wird das Einschleusen von DNA in kompetente Bakterien bezeichnet (Hanahan, 1983). Nach der Anheftung der DNA-Moleküle an die Zellwand der Wirtszellen wird die eigentliche Aufnahme in die Bakterien meist durch einen Hitzeschock initiiert. Handelt es sich bei dem DNA-Molekül um ein Plasmid, dessen Replikationsstartpunkt von der Wirtszelle erkannt wird, so kann es in dieser Zelle repliziert werden.

Ein Aliquot kompetenter Bakterien (4.1.11) wurde 5 min auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz (4.1.10.2) bzw. 100 pg - 10 ng DNA (4.1.4) gemischt, für 2 min auf Eis inkubiert, einem Hitzeschock von 30 sec bei 42°C unterzogen und noch einmal für 2 min auf Eis inkubiert. Alternativ konnten die kompetenten Bakterien nach dem Mischen mit der DNA für 10 min auf Eis, 10 min bei Raumtemperatur (RT) und 10 min auf Eis inkubiert werden. Der Transformationsansatz wurde in 1 ml LB-Medium überführt und für 1 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert, damit das im Plasmid enthaltene Resistenzgen exprimiert werden konnte. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min bei 4500 x g und RT pelletiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert, mit einem Drigalsky-Spatel auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum und bei Blau / Weiß-Selektion IPTG und X-Gal enthielten, ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert (4.1.2). Von den gewachsenen (weißen) Kolonien wurden Ü.N.K.s angesetzt (4.1.1) um die Plasmid-DNA zu präparieren (4.1.4), die dann für weitere Experimente (wie Sequenzierung oder Restriktion) zur Verfügung standen.

4.1.13 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch Anwendung dieser Technik ist es möglich, definierte DNA-Sequenzen *in vitro* enzymatisch zu synthetisieren (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1985). Dabei werden zwei Oligonukleotid-Primer verwendet, die zu jeweils einem Strang der DNA-Doppelhelix komplementär sind, somit mit diesem hybridisieren und den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Die Synthese des zur Ausgangs-DNA komplementären DNA-Stranges von den Primern aus ("*Elongation*") wird von einer thermostabilen DNA-Polymerase unter Verbrauch freier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) katalysiert. Ein sich wiederholender Zyklus aus drei Schritten beinhaltet die Denaturierung der Nukleinsäuren bei 95°C, die Anlagerung der Primer an das einzelsträngige Template ("*Annealing*") sowie die Elongation.

4.1.13.1 Primerdesign

Bei den für die Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes benötigten Primern handelt es sich um kurze, einzelsträngige Oligonukleotide. Für das Herstellen der Primer sind einige Richtlinien zu beachten:

- die Länge der Primer sollte zwischen 20 und 26 bp liegen
- der G / C-Gehalt der Primer sollte 60 % betragen
- am 3'-Ende sollte ein A oder T sein
- große Schmelztemperaturunterschiede eines Primerpaares sind zu vermeiden
- keine sich wiederholenden Nukleotidbereiche
- keine inter- oder intramolekular-komplementären 3'-Enden
- keine Sequenzen, die potenziell Haarnadelschleifen bilden

Die Berechnung der Schmelz- und somit der Hybridisierungstemperatur erfolgt mit der Formel nach Thein und Wallace (1986):

$$T_m = (\text{Anzahl von A} + \text{T}) \times 2 + (\text{Anzahl von G} + \text{C}) \times 4$$

Um einen amplifizierten DNA-Abschnitt über Restriktionsendonukleasen in einen linearisierten Vektor einbauen zu können (4.1.10, 4.1.14.1, 4.1.15) werden degenerierte Primer benötigt, die enzym-spezifische Erkennungspalindrome enthalten und bei Bedarf ein Stopcodon. Die degenerierten Primer hybridisieren somit nicht zu 100 % mit der DNA. Die Schnittstellen dürfen in der Sequenz nicht noch einmal vorkommen. Alle zusätzlichen Nukleotide werden bei der Berechnung der Hybridisierungstemperatur nicht berücksichtigt.

4.1.13.2 Reverse Transkription von mRNA mit gekoppelter PCR (RT-PCR)

Um bestimmte Gene im pro- bzw. eukaryotischen System exprimieren zu können, wird die präparierte Poly(A)-mRNA (4.1.5) unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primers in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (reverse Transkription) und der entsprechende Bereich der DNA mit sequenz-spezifischen Primern amplifiziert. Diese Methode bezeichnet man als

RT-PCR. Die Synthese des zur RNA komplementären ersten cDNA-Stranges wird durch eine Reverse Transkriptase katalysiert.

Es wurde das *Superscript First Strand Synthesis System* der Firma Gibco (Invitrogen) verwendet, das alle benötigten Substanzen enthielt. Von der präparierten Total-RNA (**4.1.5**) wurden 8 µl mit 1 µl dNTPs und 1 µl Oligo(dT)-Primer versetzt, für 5 min bei 65°C inkubiert und für 1 min auf Eis abgekühlt. Der Reaktionsmix setzte sich aus 2 µl 10-fach Puffer, 4 µl MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT sowie 1 µl RNase Out Inhibitor zusammen, wobei darauf zu achten war, dass die Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert wurden. Der Reaktionsmix wurde mit dem RNA-Primer-Mix vorsichtig gemischt, 1 min bei 10000 x g zentrifugiert und für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl der Reversen Transkriptase *Superscript* wurde der Ansatz für 50 min bei 42°C inkubiert. Eine Terminierung der Reaktion erfolgte für 15 min bei 70°C, der Ansatz wurde kurz auf Eis abgekühlt, 1 µl RNase H hinzugefügt und für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Dies ergab ein Volumen von 20 µl, von dem 2 µl für die anschließende Amplifikations-PCR eingesetzt wurden (**4.1.13.3**).

4.1.13.3 Amplifikations-PCR

Die Amplifikation eines DNA-Fragmentes aus dem RT-Ansatz (**4.1.13.2**) wurde mit dem *Expand High Fidelity PCR System* der Firma Roche durchgeführt. Das Kit enthielt einen Enzymmix aus einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase und einer Tgo-DNA-Polymerase, wobei die Tgo-DNA-Polymerase eine Korrekturlese- (*Proofreading*)-Funktion besaß, die falsch eingebaute Nukleotide sofort korrigierte.

Ein Reaktionsansatz für die PCR wurde wie folgt angesetzt:

Mix 1:	1 µl	dNTPs	(= 10 nmol)
	2 µl	Vorwärts-Primer	(= 20 pmol)
	2 µl	Rückwärts-Primer	(= 20 pmol)
	2 µl	DNA (hier RT-Ansatz), ad. 25 µl mit sterilem <i>Aqua dest.</i>	

Mix 2:	19,25 µl	steriles <i>Aqua dest.</i>
	5 µl	Expand High Fidelity 10-fach Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)
	0,75 µl	Expand High Fidelity Enzym Mix (= 2,6 U pro Reaktion).

Mix 1 und Mix 2 wurden auf Eis angesetzt, zusammenpipettiert, vorsichtig gemischt und im PCR-Thermocycler inkubiert. Die Konzentrationen einzelner Komponenten konnten nach Bedarf variiert werden. Die Dauer und Temperatur von Denaturierung, Annealing und Elongation richteten sich nach den Primern bzw. der Länge der zu amplifizierenden DNA. Für eine ungerichtete Klonierung in den Vektor pGEMT musste noch eine 10-minütige Inkubation bei 74°C erfolgen, so dass 3'-Adenosin-Überhänge gebildet wurden (**4.1.10.2**).

Einstellung des PCR-Gerätes:

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initialdenaturierung	95°C	2 – 5 min	1 x
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	Tm-Primer	45 sec	35 – 40 x
Elongation	74°C	1 min pro kb	
3'-A-Enden	20°C	10 min	
Abkühlung	4°C	forever	

Die erste Amplifikation wurde mit genspezifischen Primern durchgeführt, die zweite mit degenerierten Primern, die einen weiter innenliegenden Teil der DNA flankierten und die Sequenzen für die Restriktionsenzyme besaßen (**3.10**, **4.1.13.1**). Der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte über die Agarose-Gelelektrophorese (**4.1.7**). Dabei wurden 15 µl eines PCR-Ansatzes mit 3 µl 6-fach Probenpuffer versetzt und im Gel aufgetrennt.

4.1.13.4 Checking-PCR

Diese Methode diente nach der Transformation eines Plasmids in kompetente Bakterien der Überprüfung der vorangegangenen Ligation, mit Primern, die mit der Vektorsequenz hybridisieren und dabei die *multiple cloning site* des Vektors und somit das eingebaute Fragment flankieren.

Die nach der Transformation auf den Agarplatten gewachsenen Klone wurden in je 10 µl LB-Medium überführt. Im Falle der Blau / Weiß-Selektion (**4.1.10.2**) wurden weiße Kolonien ausgewählt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden 2 µl der Bakteriensuspension zu 10 µl eines Standard-PCR-Ansatzes gegeben:

Standard-PCR-Ansatz:	5 µl	10-fach PCR-Puffer
	2,5 mM	MgCl ₂
	10 nmol	dNTPs
	10 pmol	Vorwärts-Primer
	10 pmol	Rückwärts-Primer
	1 U	<i>Taq</i> -Polymerase
	ad. 50 µl mit <i>Aqua dest.</i> (reicht für 5 Checking-PCR-Ansätze)	

Die PCR wurde nach dem Protokoll der Amplifikations-PCR durchgeführt (**4.1.13.3**), es wurde nur die Temperatur für das Annealing der Primer und die Elongationszeit angepasst (**3.10**). Im Anschluss an die PCR wurden die 12 µl des Ansatzes mit 2,4 µl des 6-fach Probenpuffers versetzt und mit der Gelelektrophorese analysiert (**4.1.7**). Dabei war zu beachten, dass sich die Fragmentlänge um die vektorspezifischen Bereiche noch erhöhte.

4.1.14 Expression von Proteinen in Prokaryoten

Proteine lassen sich in hohen Konzentrationen in Bakterien *in vivo* synthetisieren und über Affinitätschromatographie aufreinigen. Die für das Protein kodierende DNA-Sequenz wird in den Leserahmen (*in frame*) des für die bakterielle Proteinexpression geeigneten Vektors (hier: pET28a) so eingebaut, dass sie hinter einem starken Promotor zu liegen kommt. Zusammen mit der inklonierten DNA wird eine Sequenz abgelesen die für einen Anhang kodiert (z.B. sechs Histidine: *His-Tag*). Es entsteht ein Fusionsprotein, das über diesen Anhang später gereinigt werden kann und für vielfältige Anwendungen (z.B. Herstellung von Antikörpern; **4.3.4**) zur Verfügung steht.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Expressionsvektor pET-28a besitzt N-terminal einen *His*- und einen *T7-Tag*, zusätzlich C-terminal einen *His-Tag*, sowie ein Resistenzgen für Kanamycin. Die Expressionsregion des Vektors wird durch die T7-RNA-Polymerase

abgelesen. Bei den entsprechenden Wirtszellen handelt es sich um *E.coli BL21 DE3 pLysS*. Diese beinhalten eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens unter Kontrolle des lacUV5-Promoters, der durch Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG), ein physiologisch nicht verwertbares Galactosederivat, induziert wird (Studier und Moffatt, 1986). Die Bakterien enthalten zusätzlich ein Plasmid, das für das T7-Lysozym kodiert, einen natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase. Das in wenigen Kopien vorliegende T7-Lysozym unterdrückt die Basalexpression der T7-RNA-Polymerase vor der Induktion und stabilisiert somit die pET-Rekombinanten. Nach der Induktion nimmt die Menge an Polymerase zu, wodurch die Unterdrückung der Basalexpression durch das T7-Lysozym aufgehoben wird.

4.1.14.1 Konstruktion eines Expressionsklons

Das zur Ligation in den Expressionsvektor benötigte DNA-Fragment wurde mit Hilfe einer RT-PCR (4.1.13.2) aus Spinalganglien-RNA (4.1.5) amplifiziert, nach einer PCR mit genspezifischen und degenerierten Primern (3.10, 4.1.13.3) zunächst über eine ungerichtete T/A-Klonierung mit dem pGEMT-Vektor ligiert (4.1.10.2) und in *E.coli XLI-Blue* transformiert (4.1.12). Bei dem Design der Primer war darauf zu achten, dass die DNA-Sequenz *in frame* zum N-terminalen *His-Tag* in den pET-28a-Vektor eingebaut wurde, so dass das Start-ATG vom Vektor verwendet werden konnte. Der Rückwärtsprimer musste dann für das Stopcodon kodieren (3.10, 4.1.13.1).

Die über Nacht gewachsenen weißen Kolonien wurden mit einer Checking-PCR (4.1.13.4) unter Verwendung der Primer SP6 und T7 (3.10) auf die korrekte Länge des eingebauten Inserts überprüft. Von den positiven Klonen wurde dann je eine 5 ml-Ü.N.K. unter Zusatz von 100 μ g/ml Ampicillin (4.1.2) angelegt und das Plasmid präpariert (4.1.4). Unter Verwendung der entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurde einerseits das Insert aus pGEM-T herausgeschnitten und andererseits der Expressionsvektor pET-28a linearisiert. Nach der Elektrophorese wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel aufgereinigt (4.1.8) und miteinander ligiert (4.1.10.2). Mit diesen Ligationsansätzen wurden wiederum *E. coli XLI-Blue* Bakterien transformiert und auf Kanamycin-haltigen Agarplatten ausplattiert (4.1.12). Gewachsene Kolonien wurden am nächsten Tag durch eine Checking-PCR mit den Primern T7-pET-vor und T7-pET-rück (3.10) auf die korrekte Insert-Länge überprüft (4.1.13.4). Von den positiven Klonen wurde dann je eine 5 ml-Ü.N.K. unter Zusatz von

Kanamycin angesetzt (4.1.2), das Plasmid präpariert (4.1.4) und durch eine Sequenzierung auf die Richtigkeit und Vollständigkeit der Basenabfolge überprüft. Anschließend konnten die konstruierten Plasmide in die geeigneten Expressionsbakterien *E. coli* B121 DE3 pLysS transformiert und die Proteine exprimiert werden (4.1.14.2). Die Sequenzierungen wurden von der Firma Genterprise an der Universität Mainz durchgeführt.

4.1.14.2 Bakterielle Proteinexpression

Eine Ü.N.K. (4.1.1) von 5 ml eines Expressionsklons (4.1.14.1) wurde 1:50 mit Kanamycin-haltigem LB-Medium verdünnt, bei 37°C und 250 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war und mit 1 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde für weitere 4 h wachsen lassen, die Bakterien für 20 min bei 3500 x g pelletiert und das Pellet bei -80°C eingefroren. Aus diesem Pellet konnte das exprimierte Protein isoliert und aufgereinigt werden (4.2.1).

4.1.15 Expression von Proteinen in Eukaryoten

Trotz der geringen Ausbeute bietet die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen einen bedeutenden Vorteil. Viele Proteine eukaryotischen Ursprungs benötigen posttranslationale Modifikationen, die Bakterien jedoch nicht durchführen. Sie können daher nur in eukaryotischen Wirtszellen korrekt exprimiert werden. Zusätzlich können die Proteine in ihrem nativen Zustand untersucht werden. Das Einschleusen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen bezeichnet man als Transfektion. In seltenen Fällen wird dabei die Fremd-DNA in das Genom der Wirtszelle stabil integriert. Die DNA-Sequenz die für das Protein kodiert, wird in einen Vektor eingebaut, der für die Transfektion eukaryotischer Zellen geeignet ist (hier pcDNA3). Bei der transienten Transfektion werden die transfizierten Zellen nur für die entsprechenden Experimente eingesetzt und nicht weiter kultiviert. Eine stabile Transfektion, bei der die Zellen in Kultur gehalten werden, wird durch das auf dem Vektor liegende Resistenzgen (z.B. Neomycin-Phosphotransferase) und die Selektion mittels eines Antibiotikums (z.B. Geneticin) möglich gemacht.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Expressionsvektor pcDNA3 besitzt den CMV-Enhancer / Promoter, der für eine konstitutive Expression des Proteins in den Wirtszellen

sorgt. Weitere Kennzeichen des Vektors sind ein Polyadenylierungssignal und eine Transkriptionsterminierungs-Sequenz am 3'-Ende des Polylinkers. Neben der Neomycinresistenz für die spätere Selektionierung transfizierter Zellen besitzt der Vektor eine Ampicillinresistenz für die Selektion während der Klonierung.

Die Herstellung des Expressionsklons verlief analog zu dem bei Prokaryoten angewandten Verfahren (4.1.14.1). Bei dem Design der Primer war darauf zu achten, dass die amplifizierte DNA Start-ATG und Stopcodon enthielt. Die DNA wurde mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 ligiert, die damit transformierten *E. coli XL1-Blue* Bakterien auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert (4.1.12) und die gewachsenen Kolonien durch eine Checking-PCR mit den Primern pcDNA3-SP6 und T7 (3.10) auf die korrekte Länge des Inserts überprüft (4.1.13.4). Nachdem positive Klone durch Sequenzierung auf die Richtigkeit der Basenabfolge untersucht worden waren, konnten eukaryotische Zellen mit der DNA transfiziert werden (4.3.3). Die Sequenzierungen wurden von der Firma Genterprise an der Universität Mainz durchgeführt.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Präparation und Affinitätsreinigung eines Fusionsproteins

Das Prinzip der Aufreinigung von Fusionsproteinen beruht auf der Bindung des *His-Tags* an immobilisierte Ni^{2+} -Ionen, die zusammen mit Nitrilotriessigsäure (Nitrilo-tri-aceticacid, NTA) einen Chelatkomplex ausbilden (Hochuli *et al.*, 1987). Dieser Komplex in Form von sphärischen Nickel-NTA-Partikeln gekoppelt an Agarose stellt das Säulenmaterial dar (Sulkowski, 1989; Porath *et al.*, 1975). Gebundene *His-Tag*-Proteine können durch ein Herabsetzen des pH-Wertes von der Ni-NTA-Matrix freigesetzt werden, da sie durch die Protonierung der Histidinreste nicht mehr mit Ni^{2+} in Wechselwirkung treten können.

Puffer B: 100 mM NaH_2PO_4
10 mM Tris
8 M Harnstoff mit NaOH auf einen pH von 8.0 einstellen

Puffer C:	100 mM	NaH ₂ PO ₄	
	10 mM	Tris	
	8 M	Harnstoff	mit HCl auf einen pH von 6.3 einstellen
Puffer D:	100 mM	NaH ₂ PO ₄	
	10 mM	Tris	
	8 M	Harnstoff	mit HCl auf einen pH von 5.9 einstellen
Puffer E:	100 mM	NaH ₂ PO ₄	
	10 mM	Tris	
	8 M	Harnstoff	mit HCl auf einen pH von 4.5 einstellen

Das Bakterienpellet (**4.1.14.2**) wurde für 15 min auf Eis aufgetaut, in 5 ml Puffer B pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und für 1 h bei RT gerührt, um die Zellen zu lysieren. Die Expressionsbakterien *E. coli* Bl21 DE3 pLysS enthielten ein internes Lysozym, so dass Einfrieren und Auftauen der Bakterien bereits zur Lyse führte. Sobald die Lösung transparent erschien, war die Lyse vollständig und die Zelltrümmer wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 10000 x g und RT pelletiert. Je 4 ml klares Lysat wurden mit 1 ml 50%iger Ni-NTA-Agarose-Lösung versetzt (vorher mit Puffer B äquilibriert) und für 15-60 min bei 200 rpm und RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Lysat-Harz-Suspension wurde in eine leere Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen, um ihn später auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel zu untersuchen. Es wurde vier Mal mit Puffer C gewaschen, wobei auch die Waschfraktionen für eine spätere Analyse aufbewahrt werden konnten. Die Elution des Proteins erfolgte viermal mit je 0,5 ml Puffer D und viermal mit je 0,5 ml Puffer E. Um die großen Mengen an Harnstoff aus der Elutionslösung zu entfernen, wurden die Proben im Dialyseschlauch über Nacht gegen zwei Liter PBS dialysiert und anschließend eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt (**4.2.2**).

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der eluierten Proteine wird photometrisch nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Das Reagenz *Roti-Quant* enthält Coomassie Brilliant-Blue R250 welches in drei Zuständen vorkommt (kationisch, neutral, anionisch), die bei unterschiedlichen

Wellenlängen absorbieren. Durch Bindung eines Proteins, hauptsächlich mit seinen basischen Aminosäuren, wird der Farbstoff in den anionischen Zustand überführt, was zu einer Absorptionsänderung bei 595 nm führt.

150 µl eines Proteinextraktes, 150 µl jeder Stufe einer BSA-Konzentrationsreihe (0,060; 0,125; 0,250; 0,500 und 1 mg / ml BSA in PBS) sowie 150 µl Probenpuffer als Blindprobe wurden in den Löchern einer 96-Loch Platte mit je 150 µl Roti-Quant gemischt und die Extinktion bei 595 nm photometrisch mittels eines ELISA-Lesegerätes bestimmt. Mit allen Reaktionsansätzen wurden drei Messungen durchgeführt, aus denen sich später ein Mittelwert berechnen ließ. Anhand der durch die BSA-Konzentrationsreihe ermittelten Eichkurve konnte die Menge an Protein in den Eluaten bestimmt werden.

4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt (Laemmli, 1970; Raymond und Weintraub, 1959). Das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt eine Denaturierung der Proteine und lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an diese an, so dass die entstandenen Komplexe im elektrischen Feld zur Anode wandern. Deren negative Nettoladung ist dabei proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte (Weber und Osborn, 1969). Über Disulfidbrücken kovalent verknüpfte Proteinuntereinheiten werden durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol voneinander getrennt.

Die Polyacrylamidgele bilden sich durch Polymerisation von Acrylamid-Monomeren und Quervernetzung mit N,N'-Methylenbisacrylamid aus, wobei die Polymerisierungsreaktion von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert wird. Bei der diskontinuierlichen SDS-Page (Ornstein, 1964) ist das Sammelgel niederprozentiger als das Trenngel, so dass es an der Grenze dieser beiden Gele zu einem Sammeln der Proben kommt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

SDS-Laufpuffer:	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1 %	SDS [w/v]
5-fach SDS-Probenpuffer:	250 mM	Tris-HCl, pH 6.8
	50 %	Glycerol [v/v]
	10 %	SDS [w/v]
	0,5 %	Bromphenolblau [w/v]
	500 mM	DTT [w/v]

Zusammensetzung der Gele:

	Sammelgel 6 % (5 ml)	Trenngel 8 % (10 ml)	Trenngel 10 % (10 ml)	Trenngel 12 % (10 ml)	Trenngel 15 % (10 ml)
Rotiphorese Gel-30	1 ml	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
1,0 M Tris-HCl, pH 6.8	1,25 ml	---	---	---	---
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	---	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10% [w/v]	0.05 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
<i>Aqua dest.</i>	2,7 ml	4,7 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,4 ml
APS	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Temed	0,01 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml

Für die Herstellung der Gele wurde das *Perfect Blue Doppelgelsystem Twin S* der Firma Peqlab verwendet, mit dem je zwei Gele mit 10 x 10 cm und je 10 Probenaschen gegossen werden konnten. Für ein Gel wurden zwei gereinigte Glasplatten mit Abstandshalter (0,8 mm) voneinander getrennt zunächst am System und anschließend auf der Gießbasis befestigt. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war wurde das Sammelgel gegossen, wobei sofort der Probenkamm zum Ausbilden der Probenaschen eingesetzt wurde.

Die Proteinproben (4.2.1) wurden mit 5-fach SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenvergleich lief ein

Molekulargewichtsstandard mit. Die Pufferkammern wurden mit SDS-Laufpuffer gefüllt und eine Spannung von 120 - 140 V angelegt.

4.2.4 Coomassie Brilliant-Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Coomassie Brilliant-Blue R250 wird zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen eingesetzt, da es unspezifisch an Proteine nicht aber an die Gelmatrix bindet. Proteine erscheinen daher nach der Färbung des Gels als blaue Banden auf farblosem Hintergrund. Die unspezifische Proteinfärbung beruht auf elektrostatischen Bindungen und apolaren Wechselwirkungen (Andrews, 1986).

Coomassie-Färbelösung: 2,5 % Coomassie Brilliant-Blue R250 [w/v]
 45 % Methanol [v/v]
 10 % Essigsäure [v/v]
 45 % *Aqua dest.* [v/v]

Coomassie-Entfärber: 20 % Methanol [v/v]
 10 % Essigsäure [v/v]
 70 % *Aqua dest.* [v/v]

Nach der Elektrophorese (4.2.3) wurde das Gel ü.N. in der Coomassie-Färbelösung auf einem Wippschüttler inkubiert und unter mehrmaligem Lösungswechsel so lange entfärbt, bis sich die Banden deutlich abzeichneten. Zur Langzeitaufbewahrung konnten die Gele bei RT zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet werden.

4.2.5 Immunoblot

Beim Immunoblot-Verfahren werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine quantitativ aus dem Gel auf die Oberfläche einer immobilisierenden Polyvinylidendifluorid (PVDF) - Membran transferiert, so dass die Proteine für den Nachweis mit immunologischen Methoden zugänglich werden (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979). Sie werden von einem

proteinspezifischen Primärantikörper detektiert und durch einen enzymgekoppelten Sekundärantikörper mit anschließender Substratinkubation sichtbar gemacht.

4.2.5.1 Western-Blot

Blottingpuffer: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 20 % Methanol [v/v]

Blockierungslösung: 3 % Milchpulver in TBS [w/v]

TBS: 50 mM Tris-HCl
 150 mM NaCl auf pH 7.5 einstellen

Der Transfer wurde nach dem *Semi-Dry Blotting*-Verfahren im "Sandwich-Aufbau" durchgeführt (Westermeier *et al.*, 1989). Dazu wurde eine PVDF-Membran von der Größe des Gels für 1 min in Methanol inkubiert und anschließend in Blottingpuffer äquilibriert. Auf acht Lagen mit Blottingpuffer getränktes Filterpapier wurde das Gel (4.2.3) gelegt, darauf die Membran und noch einmal acht Lagen Blottingpapier. Dieser Aufbau wurde so in die Blottingkammer gelegt, dass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode zeigten. Der Transfer der Proteine erfolgte durch Anlegen von 1 mA / cm² für 6 min / Prozentigkeit des Gels. Handelte es sich bei dem Marker nicht um einen gefärbten (*prestained*) Marker, so wurde die Markerspür nach dem Transfer abgetrennt, mit Coomassie-Lösung (4.2.4) ü.N. inkubiert und am folgenden Tag mit Entfärberlösung und Methanol entfärbt. Der übrige Blot wurde ü.N. bei 4°C in der Blockierungslösung inkubiert, um die noch freien Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

4.2.5.2 Immundetektion von Proteinen auf dem Blot

TBS:	50 mM	Tris	
	150 mM	NaCl	auf pH 7.5 einstellen
P3:	100 mM	Tris-HCL	
	100 mM	NaCl	
	50 mM	MgCl ₂	auf pH 9.5 einstellen
Substratlösung:	17,5 µl	NBT	(Stamm: 100 mg / ml in 70 % Dimethylformamid)
	22,5 µl	BCIP	(Stamm: 50 mg / ml in 100 % Dimethylformamid)
			in 10 ml P3

Die Membran wurde nach der Inkubation mit Blockierungslösung (4.2.5) kurz mit TBS gewaschen und für 1 h mit Primärantikörper (angesetzt in Blockierungslösung) unter Schütteln bei RT inkubiert. Stand nur wenig Antikörperlösung zur Verfügung wurde der Blot in Folie eingeschweißt. Nach fünfmaligem Waschen für je 3 min wurde für 1 h mit Sekundärantikörperlösung (angesetzt in TBS) inkubiert. Der Sekundärantikörper war mit der alkalischen Phosphatase gekoppelt, die durch eine BCIP (X-Phosphat = 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) enthaltende Substratlösung die Proteine als blau-violette Banden sichtbar machte. Dafür wurde nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:10000) der Blot dreimal für je 3 min mit TBS gewaschen, zum Wechseln des pH-Wertes zweimal für je 3 min mit P3 Puffer und anschließend im Dunkeln bei 37°C in Substratlösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen in Leitungswasser gestoppt und der Blot getrocknet.

4.2.6 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Bei dem *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) werden Proteine statt an eine Membran an den Kunststoffboden einer Mikrotitertestplatte, i.d.R. nicht kovalent gebunden. Nicht gebundenes Protein kann abgewaschen und gebundenes über ein Primär- und Sekundärantikörper-System detektiert werden. Mit dieser Methode kann bei gleichbleibender Antikörperkonzentration die Menge eines Proteins in Lösung bestimmt werden, bzw. bei

gleichbleibender Proteinkonzentration die Menge eines Antikörpers (der Antikörpertiter) sowie seine Spezifität. Der ELISA wird somit bei der Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) zur Antikörpertiterbestimmung der immunisierten Mäuse bzw. zur Charakterisierung der mAK verwendet. Es wird mit einem Peroxidase (POD)-gekoppelten Sekundärantikörper gearbeitet, der das Substrat p-Phenylendiamin (OPD) umsetzt, dessen Farbumschlag bei 492 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Platten sollten mit Proteinkonzentrationen von 0,5 bis 20 µg / ml beschichtet werden. Zuviel an Protein führt zur Ablösung von der Platte und Störung des Nachweises (Harlow und Lane, 1988; Voller *et al.*, 1979; Engvall und Perlmann, 1971; Miles und Hales, 1968; Catt und Tregear, 1967).

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

PBST: 0,1 % Tween in PBS [v/v]

Blockierungslösung: 1,5 % BSA in PBS [w/v]

Substratpuffer: 50 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
25 mM Natriumcitrat auf pH 5.0 einstellen

Substratlösung: 400 µl OPD-Lösung (0,4 % in Substratpuffer)
600 µl Citratpuffer, pH 5.0
5 µl H₂O₂

Abstopplösung: 2,5 M H₂SO₄

Die Antigenverdünnungen wurden in PBS angesetzt, mit 50 µl pro Vertiefung in die Löcher einer 96er-Mikrotiterplatte pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Es wurde 3 x mit je 150 µl PBST gewaschen und die unspezifischen Bindestellen mit je 150 µl der Blockierungslösung für 1 h bei RT blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 150 µl PBST erfolgte die Inkubation mit je 50 µl der Primärantikörper ü.N. bei 4°C. Als Negativkontrolle diente PBS. Ungebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit je 150 µl PBST entfernt und die Löcher mit je 50 µl Sekundärantikörper (Peroxidase-gekoppelt; 1:20000 in PBS) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 3 x Waschen mit je 150 µl PBST sowie 3 x je 150 µl *Aqua dest.* erfolgte die Substratreaktion mit je 50 µl Substratlösung bei 37 °C im Dunkeln, die mit je 25 µl Abstopplösung beendet wurde.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Kultivierung von Eukaryotenzellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5 % CO₂ im Brutschrank gehalten. Um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden, wurde mit sterilen bzw. autoklavierten Lösungen und sterilisierten Materialien unter einer Sterilbank gearbeitet.

4.3.1.1 Kultivierung von Myelom-, Hybridom- und HEK-Zellen

Medium 1: DMEM, High Glucose (enthielt L-Glutamin)
10 % Fötale Kälberserum (FCS) [v/v]
Penicillin / Streptomycin (100-fach) [v/v]

Medium 2: Hybridoma-SFM Medium
15 % FCS PAA Clone [v/v]
L-Glutamin (100-fach) [v/v]
Penicillin / Streptomycin (100-fach) [v/v]

Trypsin / EDTA: 0,05 % / 0,02 % [w/v]

Beschichtungslösung: Poly-L-Lysin (10 µg / ml in *Aqua dest.*)

Die Myelom- und HEK-Zellen wurden in Medium 1 und die Hybridomzellen in Medium 2 bei 37°C kultiviert. Sobald die Zellkulturflasche zu 100 % mit Zellen bewachsen war, wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 2 ml sterilem PBS pro 75 cm² gewaschen und mit 1 ml steriler Trypsin / EDTA-Lösung pro 75 cm² inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche lösten. Das Trypsin wurde mit Medium inaktiviert und ein Teil der Zellen in eine neue Flasche mit frischem Medium überführt. Um die Myelomzellen vor einer Fusion (4.3.4) zu expandieren wurden alle Zellen einer Flasche in eine Flasche der nächsten Größe mit frischem Medium überführt und weiter kultiviert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Um die Zellen immunzytochemisch färben zu können,

wurden sie auf sterile Deckgläser, die sich in einer 24-Loch Platte befanden, oder in Zellkulturschälchen der Firma Ibidi (μ -dish, ibiTreat) ausgesät. Um die Haftung der Zellen zu verbessern, wurden die Deckgläser und Schälchen für 10 min mit der Beschichtungslösung Poly-L-Lysin inkubiert, diese abgesaugt und die Deckgläser für 2 h getrocknet.

Das Medium, in dem die Hybridomzellen kultiviert worden waren, wurde nach dem Passagieren aufbewahrt, da sich darin die von den Zellen produzierten Antikörper befanden.

4.3.1.2 Akut dissoziierte Spinalganglienneurone

Die Neurone der Spinalganglien (4.3.5.1) werden vereinzelt (dissoziiert) und nach maximal 24 h in Kultur (hier bei 34°C) für die Experimente eingesetzt, so dass es sich nicht um eine Langzeitkultur sondern akut dissoziierte Zellen handelt. Da die Zellen aus Gewebe gewonnen werden und nicht immortalisiert sind, wird diese Kultur als Primärkultur bezeichnet. Die neuronalen Zellen können sich dabei nicht weiter teilen.

Medium: DMEM-F12 (enthält L-Glutamin)
Penicillin / Streptomycin (100-fach) [v/v]
26 mM Natriumhydrogencarbonat

Beschichtungslösung: Poly-L-Lysin (10 μ g / ml in *Aqua dest.*)

Kollagenaselösung: 5 mg / ml in DMEM-F12

Capsaicin-Stammlösung: 20 mM in Ethanol

Nach der Präparation des Gewebes (4.3.5.1) wurden die Ganglien in die Kollagenaselösung überführt, in der sie mit einer Iridektomieschere zerschnitten wurden, so dass die Kollagenase die Hülle besser abbauen konnte. Es wurde für 1 h bei 34°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Auswaschen der Kollagenase wurden die Ganglienstücke dreimal in neues Medium überführt und anschließend in wenig Medium zur Zellenvereinzelnung trituiert. Die Zelllösung wurde entweder auf sterile Deckgläser oder in die Zellkulturschälchen der Firma Ibidi (μ -dish, ibiTreat) mit 70 μ l Zelllösung pro Deckglas bzw. Schälchen verteilt. Nach 2-3 h hatten sich

die Zellen abgesetzt und es konnte mit Medium aufgefüllt werden. Um die Haftung der Zellen zu verbessern wurden die Deckgläser bzw. Schälchen mit Poly-L-Lysin beschichtet (**4.3.1.1**).

Zur Untersuchung der Wirkung von Capsaicin wurde bei der einen Hälfte der Zellen dem Medium Capsaicinlösung (Verdünnung der Stammlösung von 1:2000; Endkonzentration 10 µM) und bei der anderen Hälfte die gleiche Menge Ethanol (1:2000 100 %iges Ethanol) als Vehikelkontrolle mit verschiedenen Inkubationszeiten zugesetzt. Nach Beendigung der Experimente wurden die Zellen fixiert, um sie immunzytochemisch zu untersuchen (**4.3.5.3**).

4.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen können über einen langen Zeitraum hinweg im flüssigen Stickstoff aufbewahrt werden. Um zu verhindern, dass sich intrazelluläre Eiskristalle bilden, muss dem Medium das Gefrierschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt werden (Wells und Bibb, 1986).

Einfriermedium: 70 % Medium (mit L-Glutamin und Penicillin / Streptomycin)
 20 % FCS [v/v]
 10 % DMSO [v/v]

Die trypsinierten (**4.3.1.1**) und pelletierten Zellen (400 x g für 5 min) aus einer 75 cm² Zellkulturflasche wurden in 5 ml Einfriermedium aufgenommen, auf drei Kryoröhrchen verteilt, ü.N. bei –80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Der Auftauvorgang sollte schnell erfolgen. Die Kryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln aufgetaut, die Zellsuspension in 7 ml Medium überführt, für 5 min bei 400 x g zentrifugiert, die Zellen in 7 ml des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche überführt.

4.3.3 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellkulturzellen. Dabei unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle

(transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion). Bei der Lipofektion wird genetisches Material mit Hilfe von Liposomen (Vesikel die sehr leicht mit der Zellmembran fusionieren) in die Zelle eingebracht. Es wurde mit dem *LipofectAMINE PLUSTM* Reagenz der Firma Invitrogen gearbeitet.

Lösung A: 1 µg DNA
 100 µl Opti-MEM-Serum

Lösung B: 3 µl Lipofectamine
 100 µl DMEM

Medium 1: **4.3.1.1**
 zur Selektion: 200 µg / ml Geneticin (G418)

Es wurden $2,5 \times 10^4$ HEK-Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte, die sterile mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser enthielt, oder in ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Zellkulturschälchen der Firma Ibidi (μ -dish, ibiTreat) ausgesät (**4.3.1.1**) und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 80 % hatten. Lösung A wurde mit 6 µl Plus-Reagenz versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Das Plus-Reagenz ermöglichte durch seine Bindung an die DNA eine effizientere Bildung von Liposomen-Nukleinsäure-Komplexen. Nach Zufügen von Lösung B wurde für weitere 15 min bei RT inkubiert, so dass sich DNA / Liposomenkomplexe bilden konnten. Die Zellen wurden mit 2 ml serumfreiem DMEM gewaschen, da FCS und Antibiotika den Transfektionsvorgang stören. Von den Zellen wurde das Medium abgesaugt, das DNA / Liposomengemisch mit 0,8 ml DMEM versetzt, auf die Zellen gegeben und für 3 – 4 h bei 34°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch durch 4 ml Kulturmedium ersetzt und nach 24 - 72 h konnten die Zellen auf den Deckgläsern oder im Schälchen immunzytochemisch (**4.3.5.3**) auf ihre Proteinexpression oder im Kalzium-Imaging (**4.3.7**) untersucht werden.

Zur Herstellung stabil transfizierter Zellen wurde dem Kulturmedium das Neomycin-Analogon Geneticin (G418) zugegeben. Dies ermöglichte die Trennung transfizierter Zellen, welche die exogene DNA inklusive dem Neomycin-Phosphotransferase-Gen aufgenommen hatten, von nicht-transfizierten Zellen ohne Resistenz. Die Zellen wurden 48 – 60 h nach Beginn der Transfektion trypsiniert und in Selektionsmedium transferiert (**4.3.1.1**). Nach ca.

2 Wochen waren alle nicht-transfizierten Zellen abgestorben und überlebende Zellen wurden in Selektionsmedium weiter kultiviert.

4.3.4 Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Produktion monoklonaler Antikörper (mAK) werden die nur über einen kurzen Zeitraum hinweg lebensfähigen antikörperproduzierenden B-Lymphoblasten aus der Milz einer immunisierten Maus durch Fusion mit Zellen der Myelomzelllinie P3 x Ag 8.653 (*ATCC CRL 1580*) immortalisiert. Die Myelomzellen besitzen gute Fusionseigenschaften und induzieren eine hohe Syntheserate an monoklonalen Antikörpern. Voraussetzung ist, dass sie selber keine Antikörper produzieren. Sie besitzen einen Enzymdefekt im Reservestoffwechsel bei der Synthese von Nukleinsäuren, der die Selektion erfolgreich fusionierter Hybridomzellen ermöglicht. Der Hauptstoffwechsel wird durch Zusatz von Aminopterin zum Kulturmedium blockiert und die Hybridomzellen können das zugesetzte Hypoxanthin und Thymidin durch Verwendung der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) verwenden, da sie durch die Milzzellen die Fähigkeit erlangt haben diesen Nebenstoffwechselweg zu nutzen. Nicht fusionierte Milzzellen besitzen nur eine geringe Lebensdauer.

4.3.4.1 Immunisierung

Durch die Applikation immunogenen Materials wird die Entwicklung von Antikörpern bzw. antikörperproduzierender Zellen induziert. Es entwickeln sich bei der Primärantwort zunächst Antikörper der Subklasse IgM, durch weitere Immunisierungen erfolgt der Klassenwechsel zur Subklasse IgG, die es dem Organismus ermöglicht schneller auf das Antigen zu reagieren. Das komplette Freund's Adjuvans ist eine Wasser-in-Öl-Emulsion die hitzeinaktivierte Mycobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) enthält und somit zu einer Verstärkung der Immunantwort gegen das applizierte Material führt. Dem inkompletten Freund's Adjuvans fehlen diese Bakterien (Massegeff *et al.*, 1993).

Physiologische Kochsalzlösung:	0,9 %	NaCl in <i>Aqua dest.</i>
1. Immunisierungslösung: (Ansatz für je eine Maus)	100 µg ad. 250 µl 250 µl	Protein (4.2.1) mit physiologischer Kochsalzlösung Freunds Adjuvans (komplett / inkomplett)
2. Immunisierungslösung: (Ansatz für je eine Maus)	50 µg ad. 500 µl	Protein (4.2.1) mit physiologischer Kochsalzlösung

Es wurden weibliche, neun Wochen alte Balb / C-Mäuse verwendet, die zunächst mit der 1. Immunisierungslösung intraperitoneal gespritzt wurden. Diese Grundimmunisierung erfolgte im Beisein von komplettem Freunds Adjuvans. Die zweite Immunisierung folgte nach drei Wochen mit der 1. Immunisierungslösung im Beisein von inkomplettem Freunds Adjuvans, jede weitere im Abstand von drei Wochen mit der 2. Immunisierungslösung. Die Reduktion der Antigenmenge sollte dabei den Klassenwechsel von IgM- zu IgG-Antikörpern fördern. Insgesamt wurde mindestens viermal immunisiert, wobei die letzte Immunisierung drei bis vier Tage vor der Fusion erfolgte.

4.3.4.2 Präparation von Makrophagen als Unterlage

Die fusionierten Zellen werden auf Makrophagen als Unterlage ausplattiert, da sie die Kulturbedingungen für die heranwachsenden Hybridomzellen verbessern. Sie entfernen einerseits tote Zellen durch Phagozytose und produzieren andererseits Wachstumsfaktoren (Hlinak *et al.*, 1987). Bei der Isolierung von Makrophagen aus der Bauchhöhle kann mit $1 - 5 \times 10^6$ Makrophagen pro Maus (Balb / C, weiblich, ca. 10 Wochen alt) gerechnet werden.

HAT-Medium: Hybridoma-SFM Medium
 15 % FCS PAA Clone [v/v]
 L-Glutamin (100-fach) [v/v]
 Penicillin / Streptomycin (100-fach) [v/v]
 HAT (50-fach) [v/v]

Einen Tag vor der Fusion wurde den Mäusen der Bauchraum mit sterilem HBSS-Puffer ausgespült. Die so gewonnenen Zellen wurden 5 min bei 400 x g zentrifugiert, in 5 ml HAT-Medium aufgenommen und mit einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Sie wurden mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen pro 96er Loch (= 5×10^5 pro Platte = 5×10^6 pro 10 Platten) auf insgesamt zehn 96-Loch-Platten mit 100 μ l / Loch ausplattiert. Überschüssige Makrophagen wurden in Medium 1 (4.3.1.1) mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro cm^2 ausgesät und für eine Woche kultiviert, um konditioniertes Medium zu erhalten. Die Zellen wurden bei 37°C und einer 5 %igen CO_2 -Konzentration inkubiert.

4.3.4.3 Fusion

Die Milz einer immunisierten Maus enthält ca. $1 - 1.5 \times 10^8$ B-Lymphoblasten. Da man die Milzzellen mit den Myelomzellen in einem Verhältnis von 1:1 mischen möchte, werden ca. vier volle 225er Zellkulturflaschen benötigt, die am Tage der Fusion expandierende Myelomzellen enthalten.

Die Myelomzellen wurden zehn Tage vor der geplanten Fusion in Kultur genommen und expandiert (4.3.1.1). Am Tag der Fusion wurden sie abtrypsiniert, für 10 min bei 400 x g abzentrifugiert, in 10 ml serumfreiem DMEM resuspendiert und aus einer 1:10-Verdünnung ausgezählt. Die Myelomzellen wurden erneut zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen mit einem Überschuss an serumfreiem Medium gespült. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Pellets in 10 – 20 ml serumfreiem Medium vereinigt.

Die Milz wurde der immunisierten Maus steril entnommen, zunächst in ein Röhrchen mit serumfreiem Medium gelegt, auf einem sterilen Gazenetz (60 μ m Porengröße), das über ein Becherglas gespannt war, mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und mit 10 ml serumfreiem DMEM und einem sterilen Spritzenstempel durchpassiert. Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette weiter suspendiert und die Zellen aus einer 1:10-Verdünnung gezählt. Dabei wurden nur die stark lichtbrechenden B-Lymphoblasten gezählt.

Die Myelom- und die Milzzellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und die verschiedenen Ansätze in 50 ml Röhrchen aufgeteilt:

- zum Ausplattieren waren 10 Platten für eine Milz vorgesehen, d.h. 5×10^7 Milzzellen wurden mit der gleichen Anzahl Myelomzellen gemischt;
- die restlichen Milzzellen wurden mit der entsprechenden Menge Myelomzellen gemischt werden um sie nach der Fusion wegzufrieren.

Die Ansätze wurden für 10 min bei 400 x g zentrifugiert und mit Medium für 1 h auf Eis inkubiert. Die weißen Myelomzellen und die roten Milzzellen blieben in getrennten Schichten übereinander liegen (Milzzellen rot, Myelomzellen weiß). Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und die Zellen durch Klopfen des Röhrchens vermischt. Es wurde 1 ml auf 37°C vorgewärmtes Polyethylenglykol (PEG) tropfenweise innerhalb einer Minute zugegeben und die Zellen in der Pipette resuspendiert. Über einen Zeitraum von 5 min wurden 5 ml serumfreies DMEM tropfenweise zugegeben, um das PEG langsam auszuverdünnen, wobei die Suspension nach jedem Tropfen geschüttelt wurde. Weitere 45 ml DMEM wurden langsam unter Schütteln dazugegeben. Das Ausverdünnen des PEGs sollte innerhalb von 10 – 15 min erfolgt sein. Die fusionierten Zellen wurden für 10 min bei 200 x g zentrifugiert, vorsichtig in 4 ml HAT-Medium resuspendiert (**4.3.4.2**), je 2 ml der Zelllösung in je 46 ml HAT-Medium gegeben und mit 100 µl / Loch auf die mit Makrophagen (**4.3.4.2**) vorbereiteten Platten ausplattiert.

Die Zellen des zweiten Röhrchens wurden nach dem gleichen Verfahren fusioniert aber nach dem letzten Zentrifugieren wurden die empfindlichen Hybridzellen in Einfriermedium (**4.3.2**) resuspendiert und mit 1×10^7 Zellen pro 0.7 – 1 ml Medium pro Kryoröhrchen verteilt und weggefroren (**4.3.2**). Die Zellmenge wurde so gewählt, dass beim späteren Auftauen die Zellen eines Röhrchens auf einer Platte mit Makrophagen ausplattiert werden konnte.

4.3.4.4 Anzucht der Hybridomzellen

HAT-Medium: **4.3.4.2**

HT-Medium: Hybridoma-SFM Medium

15 % FCS PAA Clone [v/v]

L-Glutamin (100-fach) [v/v]

Penicillin / Streptomycin (100-fach) [v/v]

HT (50-fach) [v/v]

Eine Woche nach der Fusion wurden die wachsenden Klone markiert und die Platten mit HAT-Medium gefüttert. Ebenso nach einer weiteren Woche. Nach zwei Wochen konnte auf HT-Medium gewechselt werden. Sobald das Loch zu zwei Dritteln bewachsen war, wurden die Klone auf ihre Antikörperproduktion mittels ELISA (4.2.6) oder immunchemischer Färbungen (4.3.5) hin getestet. Die positiven Klone wurden schrittweise von der 96-Loch-Platte über die 24-Loch-Platte bis zu den Zellkulturflaschen expandiert.

4.3.4.5 Reklonierung

Da nach einer Fusion mehr als ein Klon pro Loch gewachsen sein konnte, musste nach dem Expandieren der positiv getesteten Zellen die Kultur rekloniert werden. Dabei wurden die Zellen so ausgezählt und in eine 96-Loch-Platte ausplattiert, dass sich nur eine Zelle pro Loch befand, aus der sich dann ein Klon bilden konnte, der nur einen bestimmten Antikörper synthetisierte (Einzelzellaussaat, Limiting-Dilution-Klonierung, Methode nach Coller und Coller, 1983).

4.3.4.6 Subklassentypisierung monoklonaler Antikörper

Die Subklassentypisierung der monoklonalen Antikörper wurde mit einem *Antikörper-Isotypisierungskit* der Firma Sigma-Adrich als ELISA (4.2.6) durchgeführt. Eine Mikrotiterplatte wurde mit den subklassenspezifischen Antikörpern anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3 anti-IgM und anti-IgA (je 1:1000 in PBS; 50 µl / Loch) beschichtet und

ohne Blockierungsschritt mit Primär- und Sekundärantikörper detektiert. Dabei erfolgten alle Inkubationsschritte für 1 h bei 37°C.

4.3.5 Immunochemische Färbung von Geweben und Zellen

Um Proteine in Geweben oder Zellen zu detektieren wird ebenso wie im Immunoblot (4.2.5) und im ELISA (4.2.6) mit einem System aus Primär- und Sekundärantikörper gearbeitet. In diesem Fall jedoch sind die Sekundärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Emission von Photonen angeregt wird. Als Fluorochrome können Cy3 oder FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) dienen. Cy3 wird durch grünes Licht (553 nm) zur Emission von rotem Licht (575 nm) und FITC durch blaues Licht (495 nm) zur Emission von grünem Licht (525 nm) angeregt. Durch die Kombination verschiedener Primärantikörper und Fluorochrome sind Doppelmarkierungen möglich.

4.3.5.1 Präparation von Gewebe

Für die Präparation der Spinalganglien wurden die Ratten mit Halothan narkotisiert, dekapitiert, aus der Wirbelsäule die Ganglien herauspräpariert und von diesen mit einer Iridektomieschere die Fortsätze abgeschnitten. Sollten von den Ganglien Schnitte für die Immunhistochemie (4.3.5.2) angefertigt werden, so wurden 4 – 6 Ganglien in einen Tropfen Tissue Tek, das sich auf einem Kupferstück befand, eingebettet, auf Trockeneis durchgefroren und bei -80°C gelagert. Die Gefrierschnitte von 10 – 15 µm Dicke wurden an einem Kryostat angefertigt, auf Objektträger gezogen und bei RT trocknen lassen. Diese Objektträger konnten bei -80°C in der geschlossenen Box aufbewahrt werden. Zur Anlegung einer Primärkultur wurde mit den Ganglien wie unter 4.3.1.2 beschrieben fortgeföhren.

4.3.5.2 Immunhistochemische Färbung von Gewebe

Die Schnitte (4.3.5.1) wurden aus -80°C entnommen und für 1 h bei RT in der geschlossenen Box aufgetaut. Vor Beginn der Antikörperinkubation musste das Gewebe fixiert werden, um

die Antigene zu immobilisieren und für die Antikörper zugänglich zu machen. Die zellulären Strukturen durften dabei nicht zerstört und das Epitop nicht maskiert oder verändert werden (Harlow und Lane, 1988). Dabei richtete sich die Art der Fixierung vor allem nach dem verwendeten Primärantikörper.

Fixierlösungen: 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS [w/v]
 Eiskaltes Methanol mit EGTA
 Eiskaltes Aceton

Blockierungslösung: 10 % Fötale Kälberserum (FCS) in PBS
 + 0.1 % Triton [v/v] (bei der PFA-Fixierung)

Eindeckmittel: a) PBS / Glycerol (50:50)
 b) 1 mg / ml p-Phenylendiamin in PBS mit 70 % Glycerol, pH 8.5
 (gelagert bei -20°C)

Die aufgetauten Schnitte wurden jeweils 10 min in der entsprechenden Fixierlösung inkubiert (PFA bei RT; Aceton und Methanol bei -20°C), 2 x für je 5 min mit PBS gewaschen und zum Blocken der unspezifischen Bindestellen für 10 – 30 min bei RT mit Blockierungslösung überschichtet. Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgte ü.N. bei 4°C. Es wurde anschließend 3 x für je 10 min mit PBS gewaschen, der Sekundärantikörper für 1 – 2 h bei RT inkubiert, 3 x für je 5 min mit PBS gewaschen und mit einem Deckglas und Eindeckmittel eingedeckt. Um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden wurden die Deckgläser mit Nagellack umschlossen. Alle Verdünnungen wurden in Blockierungslösung angesetzt und die Inkubationen in einer feuchten Kammer durchgeführt. Bei Doppelmarkierungen wurden zwei Färbungen nacheinander durchgeführt und anschließend eingedeckt. Einfachfärbungen wurden entweder am Fluoreszenzmikroskop Axiophot der Firma Zeiss als Dias aufgenommen und eingescannt oder an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus als digitale Bilder mit der Analysissoftware aufgenommen. Doppelfärbungen wurden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS SP2 der Firma Leica aufgenommen und dabei sequentiell gescannt, um eine gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Kanäle zu verhindern.

4.3.5.3 Immunzytochemische Färbung von Zellen

Die Zellen aus der Zellkultur (4.3.1.2) mussten wie das gefrorene Gewebe vor Beginn der Antikörperfärbung fixiert werden. Dabei standen ebenfalls mehrere Fixierlösungen zur Verfügung.

Fixier- und Blockierungslösungen sowie Eindeckmittel: 4.3.5.2

Waren die Zellen auf Deckgläsern gewachsen, so wurden diese aus den Kulturschalen entnommen und in eine neue 24-Loch-Platte überführt, die mit der entsprechenden Fixierlösung gefüllt war. Von den Zellen in den Zellkulturschälchen wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und mit Fixierlösung überschichtet. Mit PFA wurden die Zellen für 30 min bei 4°C fixiert, 2 x für je 5 min mit PBS gewaschen und 10 min in einer 0,1 %igen Triton-X-100-Lösung inkubiert, um die Zellwand löchrig zu machen. In eiskaltem Aceton und Methanol wurden die Zellen für je 10 min bei -20°C fixiert und 2 x für je 5 min mit PBS gewaschen. Nach dem Blockieren für 30 min bei RT erfolgte die Primärantikörperinkubation ü.N. bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen 3 x für je 10 min mit PBS gewaschen, für 1 – 2 h bei RT mit Sekundärantikörper inkubiert und 3 x für je 5 min mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden mit der Zelleseite nach unten mit Eindeckmittel auf einen Objektträger aufgebracht und die Zellen in den Zellkulturschälchen durch Auflegen eines Deckglases zusammen mit Eindeckmittel eingedeckt. Um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden wurden die Deckgläser mit Nagellack umschlossen. Alle Verdünnungen wurden in Blockierungslösung angesetzt und die Inkubationen in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Zur längeren Aufbewahrung von fixierten noch ungefärbten Zellen wurden die Deckgläser nach der PFA-Fixierung mit sterilem PBS gewaschen und anschließend in sterilem PBS bei 4°C aufbewahrt und nach der Methanol- bzw Aceton-Fixierung in der Fixierlösung bei -20°C gelagert.

4.3.5.4 Präabsorptionskontrolle

Zur Spezifizierung polyklonaler Seren wird der Antikörper mit einem Blocking Peptid inkubiert und somit seine Bindung auf Zellen bzw. im Gewebe verhindert. Der Antikörper wird in der höchstmöglichen Verdünnung, in der gerade noch eine Färbung zu erkennen ist, verwendet und mit einem 5-fachen Überschuss an Antigen für 2 h bei RT inkubiert, bevor die Färbung auf dem Gewebe stattfindet.

Zwei Ansätze: 1) Peptid-Lösung: Antikörper + 5-fache Menge Antigen
2) Nicht-Peptid-Lösung: Antikörper + PBS (als Kontrolle)

Die fixierten und blockierten Präparate wurden mit diesen Ansätzen inkubiert und das Färbeprotokoll für den entsprechenden Antikörper durchgeführt (4.3.5.2).

4.3.6 *In situ*-Hybridisierung

Bei der *in situ*-Hybridisierung wird statt des Proteins die mRNA in Gewebe oder Zellen nachgewiesen. Dabei wird die mRNA mit einer einzelsträngigen DNA-Sonde (Oligonukleotidsonde) detektiert, an der Digoxigenin (DIG) -Moleküle hängen. Ein anti-DIG-Antikörper ist mit der Alkalischen Phosphatase gekoppelt, die eine Substratlösung aus NBT und BCIP umsetzt (4.2.5.2). Die Voraussetzung für die Herstellung von synthetischen Oligonukleotiden ist die Kenntnis der Sequenz des zu untersuchenden Gens. Die mRNA stellt den kodierenden Strang des Gens dar. Bei der Antisense-Sonde muss die Sondensequenz aus der Abfolge der entsprechenden komplementären Basen bestehen, so dass sie an die mRNA binden kann. Die Sense-Sonde dagegen entspricht der Sequenz des kodierenden Stranges und sollte somit nicht im Gewebe binden. Um stabile Hybride mit der zu detektierenden mRNA ausbilden zu können, sollten die Oligonukleotide 30 - 50 Basen lang sein. Diese kurzen Sonden haben den Vorteil, dass sie gut ins Gewebe eindringen können. Die Hybridisierungstemperatur hängt von vielen Faktoren wie der Länge der Sonde, dem GC-Gehalt sowie der Konzentration an monovalenten Kationen ab. Daher wird die optimale Temperatur experimentell ermittelt. Um eine Schädigung des Gewebes durch zu hohe Temperaturen zu vermeiden, wird Formamid (FA) zugegeben, das die Temperatur um 0,72°C pro Prozent Formamid herabsetzt. Alle Lösungen müssen steril bzw. RNase-frei sein (4.1.5).

4.3.6.1 Sondenmarkierung

Für die Markierung der Sonden wurde der *DIG Oligonucleotid Tailing Kit* der Firma Roche verwendet. Bis auf *Aqua dest.*, 0,2 M EDTA, 4 M LiCl und Ethanol p.a. waren alle Lösungen Bestandteile des Kits.

Markierungsansatz:	100 pmol	Oligonukleotid
	4 µl	Reaktionspuffer
	4 µl	CoCl ₂ -Lösung
	1 µl	DIG-dUTP
	1 µl	dATP
	1 µl	Terminale Transferase
	ad. 20 µl	mit <i>Aqua dest.</i>

Der Ansatz wurde gemischt, abzentrifugiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zufügen von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8.0) gestoppt und die Sonde mit Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl eiskaltem (-20°C) Ethanol p.a. durch Inkubation ü.N. bei -20°C gefällt. Die Proben wurden 30 min bei 16000 x g zentrifugiert, das Pellet mit 50 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, noch einmal zentrifugiert, getrocknet und in 20 µl sterilem *Aqua dest.* aufgenommen.

4.3.6.2 Dot Blot zur Überprüfung der Sondenmarkierung

Puffer I:	100 mM	Tris-HCl	
	150 mM	NaCl	pH 7.5
Puffer II:	1 %	Blocking-Reagenz der Firma Roche	in Puffer I
Anti-DIG-AP:	1:5000	in Blocking Puffer	
NBT-Puffer:	100 mM	Tris-HCl	
	100 mM	NaCl	
	50 mM	MgCl ₂	pH 9.5

Substratlösung: 45 µl NBT (Stamm: 100 mg / ml in 70 % Dimethylformamid)
35 µl BCIP (Stamm: 50 mg / ml in 100% Dimethylformamid)
in 10 ml NBT-Puffer

Die markierten Sonden (**4.3.6.1**) sowie die Kontrollsonde aus dem Kit wurden 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 in *Aqua dest.* verdünnt und je 1 µl jeder Verdünnungsstufe auf eine Nylonmembran getropft. Die Membran wurde für 30 min bei RT getrocknet, 5 min in Puffer I, 15 min in Puffer II und 45 min in Antikörperlösung inkubiert. Es wurde 2 x für je 10 min in Puffer I, 1 x für 5 min in NBT-Puffer gewaschen und der Blot für 30 min - 1 h in Substratlösung im Dunkeln bei 37°C entwickelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Membran in PBS gewaschen und bei RT getrocknet.

4.3.6.3 *In situ*-Hybridisierung im Gewebe

PTW: 0,1 % Tween 20 in PBS

PBT: 2 mg / ml BSA in PTW

SSC (20-fach): 3 M NaCl
0,3 M Na₃-Citrat pH 7.0

Sonden: 1:30 in 2-fach SSC / FA (50 / 50)

Anti-DIG-AP: 1:100 in Puffer II (**4.3.6.2**)

Eindeckmittel: PBS / Glycerol (50:50)

Die eingefrorenen Schnitte (**4.3.5.1**) wurden für 1 h bei RT aufgetaut, 10 min bei RT mit 4 % PFA fixiert (**4.3.5.2**) und 2 x für je 5 min mit PTW gewaschen. Die Objektträger wurden um die Schnitte herum trockengewischt, jeder Schnitt mit 50 µl der verdünnten Sonden beschichtet und luftblasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt. Die Inkubation erfolgte ü.N. in einem Wasserbad mit der Sonden-spezifischen Temperatur. Neben der Sense-Sonde diente die Inkubation mit 2-fach SSC / FA als Negativkontrolle.

Nachdem die Deckgläser durch Waschen in 2-fach SSC abgelöst worden waren, wurden die Schnitte 3 x für je 20 min in 0,1-fach SSC, 2 x für je 5 min in PBT gewaschen und 15 min in Puffer II (4.3.6.2) geblockt. Anschließend wurden die Schnitte mit 50 µl anti-DIG-AP-Lösung pro Schnitt für 1 h bei 37°C inkubiert, 2 x für je 5 min mit PBT, 2 x für je 5 min mit NBT-Puffer (4.3.6.2) gewaschen und mit 50 µl Substratlösung (4.3.6.2) pro Schnitt im Dunkeln bei 37°C für 30 min - 1 h entwickelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde für 5 min in PBS gewaschen und die Schnitte mit Eindeckmittel und einem Deckglas eingedeckt. Um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden wurden die Deckgläser mit Nagellack umschlossen. Die positive Reaktion konnte als blauer Niederschlag lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Sollte die *in situ*-Hybridisierung mit einer immunhistochemischen Färbung kombiniert werden, so wurde zunächst die *in situ*-Hybridisierung entwickelt und anschließend die Antikörperfärbung durchgeführt (4.3.5.2).

4.3.7 Kalzium-Imaging

Die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration als ein Maß für die Aktivierung der Zelle wird mit dem Fluoreszenzfarbstoff FURA 2 ratiometrisch gemessen. Als Acetoxymethylester FURA 2-AM dringt er leicht in die Zellen ein. Dort wird der Acetoxymethylesterrest abgespalten und der Farbstoff kann sich innerhalb der Zelle anreichern. Das Absorptionsmaximum von Fura 2 verschiebt sich von 380 nm für Kalzium-freien Farbstoff zu 340 nm für Kalzium-gebundenen Farbstoff. Werden die resultierenden Emissionen (gemessen bei 510 nm) als das Verhältnis der Emission bei Anregung mit 340 nm zu der Emission bei Anregung mit 380 nm dargestellt, so entspricht dies dem Verhältnis von gebundenem zu ungebundenem Kalzium. Steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration an, wird der Anteil von ungebundenem Farbstoff kleiner, der von gebundenem größer und das Verhältnis der Emissionen bei 340 zu 380 nm nimmt zu (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Fura-Tyrode:	137,6 mM	NaCl	
	5,4 mM	KCl	
	0,5 mM	MgCl ₂	
	1,8 mM	CaCl ₂	
	10 mM	HEPES	
	5 mM	Glucose	mit NaOH auf pH 7.35 einstellen

Fura 2-AM-Stammlösung: 1 mM in DMSO

Capsaicin-Stammlösung: 20 mM in Ethanol

Capsazepin-Stammlösung: 10 mM in DMSO

Die Zellen einer Primärkultur (4.3.1.2) oder transfizierter HEK-Zellen ausgesät in Zellkulturschälchen (4.3.1.1, 4.3.3) wurden 3 x mit je 2 ml Fura-Tyrode gewaschen und für 45 min mit 1-3 μ M Fura 2-AM (angesetzt in Tyrode-Lösung) im Dunkeln bei RT inkubiert. Der Farbstoff wurde durch fünfmaliges Waschen mit je 2 ml Fura-Tyrode ausgewaschen. Nachdem sich zu Beginn der Messung eine Basislinie eingestellt hatte wurde je nach Versuch 10 μ M Capsaicin-, 1 μ M Capsaicin-, 10 μ M Capsazepin- oder 1 μ M Capsaicin- + 10 μ M Capsazepinlösung appliziert und die Veränderung des Verhältnisses von 340 zu 380 nm verfolgt. Capsaicin wurde 1:2000 bzw. 1:20000 und Capsazepin 1:1000 in Fura-Tyrode verdünnt, jeweils 1-3 ml der entsprechenden Lösung zu den Zellen gegeben und bei Bedarf mit Fura-Tyrode ausgewaschen. Es war eine automatische Absaugvorrichtung angeschlossen. Sollten verschiedene Lösungen nacheinander appliziert werden, wurde gewartet, bis die Kalziumkonzentration wieder die Basislinie erreicht hatte. Bei dem Kalzium-Imaging-System handelte es sich um das *TILL-Vision Photonics Imaging System* mit der Software-Version TILL Vision 4.

5. Ergebnisse

5.1 Die Expression von TRPV1 und TRPV2 in Spinalganglienneuronen (Schnitte versus akut dissoziierte Zellen)

Die Expression von TRPV1 und TRPV2 wurde bislang meist an Schnitten der Spinalganglien untersucht, die Elektrophysiologie dagegen an akut dissoziierten Zellen durchgeführt. Es sollte zunächst untersucht werden, ob sich die Expression von TRPV1 und TRPV2 in den beiden Arten der Gewebepräparation unterscheiden.

Von je fünf adulten Ratten (ca. 150 - 200 g) wurden die Ganglien präpariert (**4.3.5.1**) und zum Anfertigen von Gewebeschnitten in Tissue Tek eingebettet (**4.3.5.1**) oder als akut dissoziierte Zellen in einer Primärkultur angelegt (**4.3.1.2**). Die Rezeptoren wurden immunochemisch mit anti-TRPV1- und anti-TRPV2-Kaninchenserum von M.J. Caterina (**3.6.1**) als Primärantikörper und anti-Kaninchen-Cy3 (**3.6.2**) als Sekundärantikörper angefärbt, wobei jeweils mit PFA fixiert wurde (**4.3.5.2**, **4.3.5.3**). Die verwendeten Kaninchenseren waren gegen den C-Terminus der Rezeptoren gerichtet (Caterina *et al.*, 1997 und 1999). Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Optimas 6.2, indem durch Umrandung die Zellen gezählt und ihre Größe bestimmt wurde. (**Abb. 7**).

In Schnitten von Spinalganglien wurden 3738 Neurone und von akut dissoziierten Zellen 2249 Neurone untersucht. Es war ca. je ein Drittel aller Zellen positiv für TRPV1 ($35,7 \pm 0,5$ % bzw. $38,8 \pm 1,6$ %) und je ein Zehntel positiv für TRPV2 ($7,3 \pm 0,4$ % bzw. $8,5 \pm 1,1$ %). Zwischen den beiden Präparationen unterschieden sich die Expressionen der Rezeptoren nicht signifikant voneinander ($P = 0,11$ für TRPV1 und $P = 0,37$ für TRPV2), ebenso zeigte sich die gleiche Verteilung im Größenhistogramm. TRPV1 wurde hauptsächlich in den kleinen und TRPV2 in den größeren Zellen exprimiert. Der mittlere Durchmesser der Zellen in den Schnitten war signifikant kleiner als der in den akut dissoziierten Zellen ($P < 0,05$ für TRPV1 und $P < 0,01$ für TRPV2) und TRPV1-positive Neurone waren signifikant kleiner als TRPV2-positive Neurone ($P < 0,001$) (**Abb. 7**, **Tab. 3**).

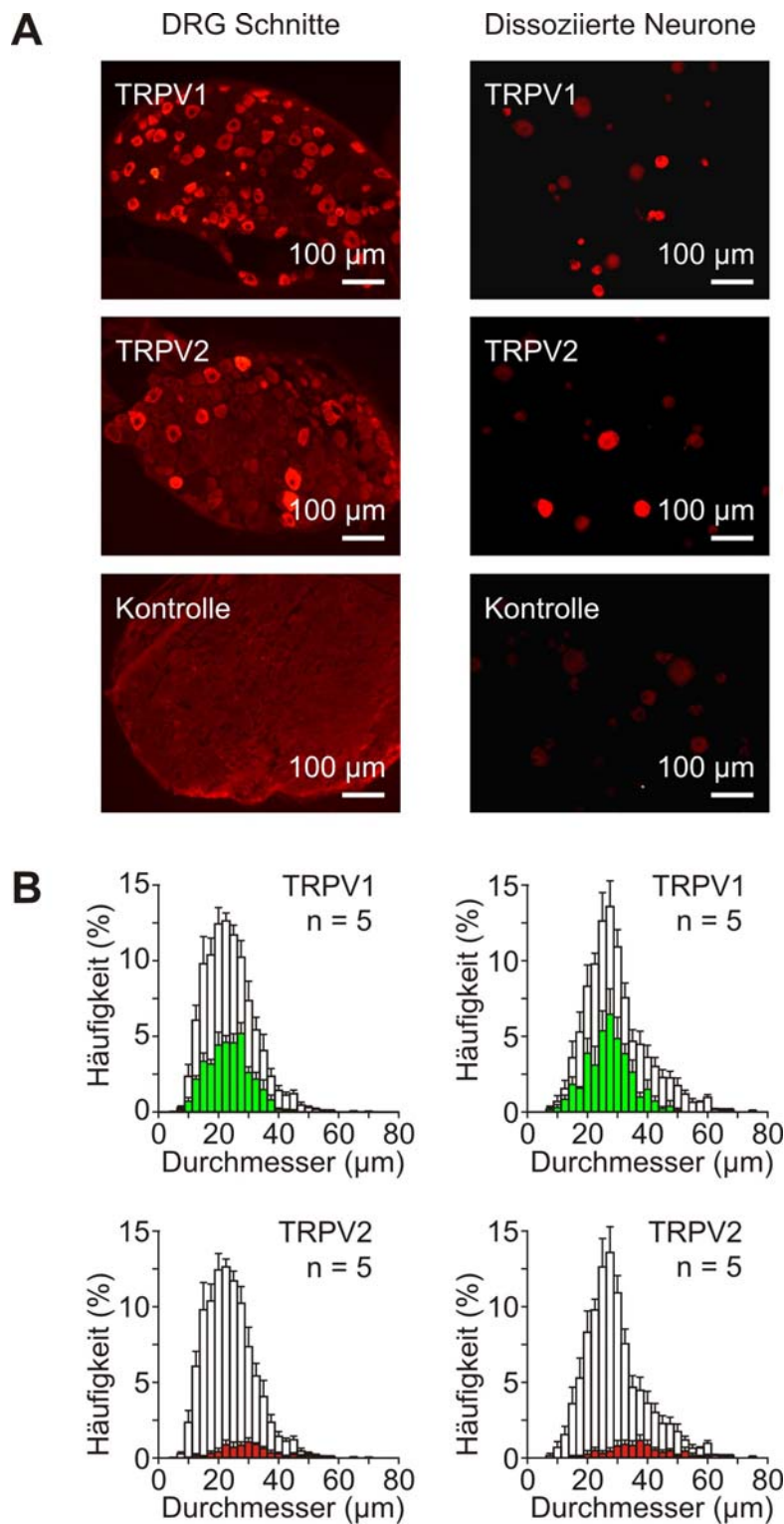


Abb. 7: Expression von TRPV1 und TRPV2 in Spinalganglien der Ratte.

A. Immunochemische Färbungen der Spinalganglien. TRPV1 ist in vielen kleinen Neuronen (1. Reihe), TRPV2 bevorzugt in wenigen größeren Zellen exprimiert (2. Reihe). Die Negativkontrolle ohne Primärantikörper liefert kein spezifisches Signal (3. Reihe). Größenmaßstab: 100 μm . **B.** Größenhistogramme der positiven im Vergleich zu allen Zellen. Das Verteilungsmuster aller Zellen (offene Balken), von TRPV1 (grüne Balken) und TRPV2 (rote Balken) unterscheidet sich zwischen den Präparationen nicht signifikant voneinander. Es sind die mittleren Durchmesser (\pm S.E.M) von 5 Experimenten dargestellt.

Tab. 3: Häufigkeit und Größe TRPV1- und TRPV2-positiver Spinalganglienneurone

	Anzahl der Tiere (n)	Häufigkeit (%)	Durchmesser (μm)
TRPV1			
akut dissoziiert	5	$38,8 \pm 1,6$	$26,8 \pm 1,6$
Schnitte	5	$35,7 \pm 0,5$	$22,3 \pm 0,9^+$
TRPV2			
akut dissoziiert	5	$8,5 \pm 1,1^{***}$	$34,8 \pm 0,8^{**}$
Schnitte	5	$7,3 \pm 0,4^{***}$	$27,6 \pm 1,7^{++,*}$

- + P < 0,05 Schnitte versus akut dissoziierte Zellen
 ++ P < 0,01 Schnitte versus akut dissoziierte Zellen
 * P < 0,05 versus TRPV1-positive Zellen
 ** P < 0,01 versus TRPV1-positive Zellen
 *** P < 0,001 versus TRPV1-positive Zellen; Student t-Test, ungepaart

Da sich die Expression der Kanäle zwischen akut dissoziierten Zellen und Schnitten nicht signifikant unterschieden hat, konnten die Ergebnisse, die mit beiden Präparationen gewonnen wurden, miteinander verglichen werden. Die immunhistochemischen Färbungen bei der Herstellung der monoklonalen Antikörper (5.3) und bei den Ko-Expressionsuntersuchungen (5.6, 5.7, 5.8) wurden an Gefrierschnitten der Neurone durchgeführt, da sich mit dieser Präparation mehr Zellen untersuchen liessen, Capsaicin-Inkubations- und Kalzium-Imaging-Experimente (5.2, 5.4.1) dagegen an akut dissoziierten Zellen.

5.2 Capsaicin verändert die Expression von TRPV1 und TRPV2

Capsaicin ist ein Neurotoxin und bewirkt morphologische, neurochemische und histochemische Veränderungen in sensorischen Neuronen (Holzer, 1991). Um die Wirkung von Capsaicin auf die Expression der Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2 zu untersuchen, wurden akut dissoziierte Spinalganglienneurone nach dem Absetzen der Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ in Medium inkubiert, das entweder 10 µM Capsaicin (1:2000 aus einer 20 mM Stammlösung) oder die gleiche Menge Ethanol (1:2000 100 %iges Ethanol) als Vehikelkontrolle enthielt (**4.3.1.2**). Dabei wurden verschiedene Versuchsbedingungen verwendet:

1. Capsaicin für 8 min, direkt (nach 30 min) fixiert,
2. Capsaicin für 8 min, nach 16 h fixiert,
3. Capsaicin für > 6 h, dann fixiert.

Die Zellen wurden mit PFA fixiert und mit anti-TRPV1- und anti-TRPV2-Kaninchenseren immunochemisch detektiert und ausgewertet (**3.6**, **4.3.5.3**, **5.1**). Mit den verschiedenen Inkubationszeiten für Capsaicin sollte getestet werden, ob bereits eine kurze Inkubation Einfluss auf die Expression der Rezeptoren hat. Die Fixierung nach 16 h bei 8-minütiger Capsaicininkubation sollte Aufschluss darüber geben, ob eine eventuelle Reduzierung der TRPV1-Expression reversibel sein könnte.

In allen drei Versuchsansätzen zeigte die Kontrollbedingung mit Ethanol eine Expression von TRPV1 in ungefähr je einem Drittel aller Zellen ($39,4 \pm 1,0$ %) und für TRPV2 in je einem Zehntel ($8,4 \pm 0,5$ %) (vgl. **5.1**). Die Inkubation mit Capsaicin für 8 min hatte keinen Einfluss auf die Expression von TRPV1 und TRPV2 ($38,7 \pm 1,9$ % und $9,1 \pm 2,0$ % bei direkter Fixierung bzw. $38,4 \pm 1,2$ % und $10,3 \pm 1,2$ % bei Fixierung nach 16 h). Nach einer Capsaicininkubation von > 6 h dagegen kam es zu einer signifikanten Abnahme TRPV1-exprimierender Zellen (von $38,1 \pm 3,6$ % auf $11,9 \pm 2,7$ %; $P < 0,01$) sowie einer signifikanten Zunahme TRPV2-exprimierender Zellen (von $7,4 \pm 0,8$ % auf $12,1 \pm 1,4$ %; $P < 0,05$) (**Abb. 8**, **Tab. 4**).

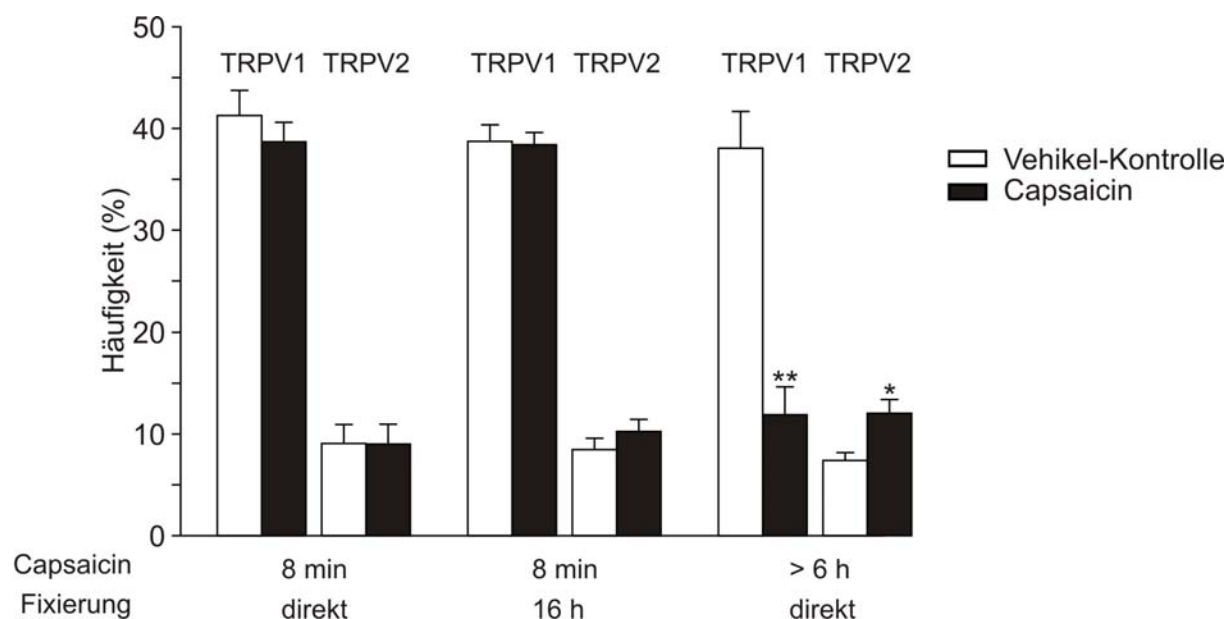


Abb. 8: Wirkung von Capsaicin auf die Expression von TRPV1 und TRPV2.

Dargestellt sind die Häufigkeiten von TRPV1 und TRPV2 in akut dissoziierten Spinalganglienneuronen unter verschiedenen Versuchsbedingungen (weiße Balken: Kontrolle; schwarze Balken: Capsaicininkubation). Erst eine Inkubationszeit für Capsaicin von > 6 h führt zu einer signifikanten Abnahme TRPV1-positiver Neurone und einer signifikanten Zunahme TRPV2-positiver Neurone. Dargestellt sind die mittleren Durchmesser (\pm S.E.M). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; (Tab. 4).

Tab. 4: Einwirkung von Capsaicin auf die Expression von TRPV1 und TRPV2

Inkubation, Fixierung	TRPV1		TRPV2	
	n	Häufigkeit (%)	n	Häufigkeit (%)
8 min, direkt				
Kontrolle	3	41,3 \pm 2,5	3	9,1 \pm 1,9
Capsaicin	3	38,7 \pm 1,9	3	9,1 \pm 2,0
8 min, nach 16 h				
Kontrolle	5	38,8 \pm 1,6	5	8,5 \pm 1,1
Capsaicin	4	38,4 \pm 1,2	5	10,3 \pm 1,2
> 6 h, direkt				
Kontrolle	4	38,1 \pm 3,6	4	7,4 \pm 0,8
Capsaicin	4	11,9 \pm 2,7**	3	12,1 \pm 1,4*

* $P < 0,05$ versus Kontrolle

** $P < 0,01$ versus Kontrolle; Student t-Test, ungepaart

Durch die Wirkung des Capsaicins degenerierten die TRPV1-exprimierenden Neurone, dies führte zu einer Verringerung der Gesamtzahl der Zellen und somit zu einer Zunahme des prozentualen Anteils TRPV2-exprimierender Zellen. Ungefähr 22 % der ursprünglich TRPV1-positiven Neurone konnten aber nach Capsaicininkubation mit dem anti-TRPV1-Kaninchenserum noch immunzytochemisch detektiert werden (**Tab. 4**).

Das anti-TRPV1-Kaninchenserum (**3.6.1**) war gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet und detektierte somit auch die Capsaicin-insensitive N-terminale Splice-Variante von TRPV1 (Vr.5'sv). Daher sollten monoklonale Antikörper gegen den N-terminalen Bereich von TRPV1 und TRPV2 hergestellt werden, um die Wirkung von Capsaicin auf die Expression von TRPV1 und TRPV2 besser untersuchen zu können.

5.3 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen TRPV1 und TRPV2

Für die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen die N-terminalen Bereiche der Ionenkanäle TRPV1 und TRPV2 sowie deren weitere Charakterisierung sollten die entsprechenden Bereiche der Kanäle als rekombinante Proteine in genügend großer Menge exprimiert und aufgereinigt werden.

5.3.1 Herstellung der Immunisierungsproteine

Da TRPV2 (761 Aminosäuren) zu TRPV1 (838 Aminosäuren) 49% Homologie aufweist, müssen die zur Immunisierung verwendeten Bereiche der Rezeptoren so wenig homolog als möglich zueinander sein, um Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit dem jeweils anderen Rezeptor zu vermeiden. Bei den Vanilloidrezeptoren finden sich die ausgeprägtesten Homologien bei den Ankyrinwiederholungen und den Transmembrandomänen während die N- und C-terminalen Bereiche stärker voneinander abweichen (Caterina *et al.*, 1999). Die Primer zur Amplifikation der N-Termini wurden so gewählt, dass für TRPV1 die Aminosäuren 1-107 und für TRPV2 die Aminosäuren 1-84 exprimiert wurden. Bei den so exprimierten Proteinen ist TRPV1-N-Term 18 % homolog zu TRPV2-N-Term und folglich TRPV2-N-Term 30 % zu TRPV1-N-Term (**Abb. 9**).

```

TRPV1 MEQRASLDSEESSESPQENSCLDPPDRDPNCKPPVKPHIFTRSRTRLFGKGDSEEE---ASPLDCFYEEGGL 72
TRPV2 MTSASS-PPAFRLETS DG-DEEGNAE-----VNKGKQEP----PEMSEPFQREDR 46

TRPV1 ASCPIITVSSVLTIQRFPGDGPASVRPSSQDSVSAGEKPPRLYDRRSTFDAY 121
TRPV2 NSSPQIKVNLNFIKRPPKN---TSAPSQQE-----PDR-FDRDRLFSVV 84

```

Abb. 9: Sequenzen und Homologiebereiche von TRPV1 und TRPV2.

Dargestellt sind die Sequenzen der N-terminalen Bereiche von TRPV1 und TRPV2. Die homologen Bereiche sind durch graue Schattierungen markiert (nach Caterina *et al.*, 1999).

5.3.1.1 Klonierung

Von 20 Ganglien aus der Wirbelsäule einer Ratte wurde die RNA präpariert (4.1.5) und mittels photometrischer Messung (4.1.6) eine Konzentration von 98 ng / μ l (= 3,9 μ g insgesamt) bestimmt. Dies war zu wenig um sie in einem Agarosegel auf ihre Intaktheit zu überprüfen. Die RNA wurde mit der reversen Transkriptase und dem Oligo-dT-Primer in cDNA (4.1.13.2) umgeschrieben und mittels genspezifischer Primer (VR1-RTF4 und VR1-RTR4; VRL1-RTF1 und VRL1-RTR4; 3.10, 9.1) die N-terminalen Bereiche von TRPV1 und TRPV2 amplifiziert (4.1.13.3). Nach der Agarose-Gelelektrophorese (4.1.7) zeigte sich, dass RNA-Präparation und RT-PCR funktioniert hatten. Die Amplifikation von TRPV1 ergab eine sehr starke Bande zwischen 700 und 800 bp (errechnete Sequenzlänge 724 bp), die von TRPV2 jedoch nur eine schwache Bande etwas über der 800 bp-Markerbande (errechnete Sequenzlänge 824 bp) (Abb. 10).

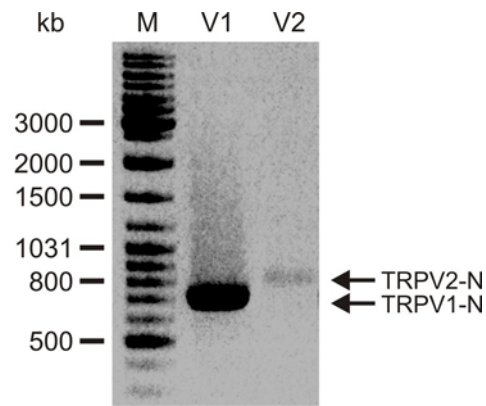


Abb. 10: RT-PCR mit genspezifischen Primern für TRPV1 und TRV2 (N-Termini).

Bahn 1: Marker; Bahn 2:N-Terminus von TRPV1 mit einer starken Bande zwischen 700 und 800 bp (errechnete Länge 724 bp); Bahn 3:N-Terminus von TRPV2 mit einer schwachen Bande zwischen 800 und 900 bp (errechnete Länge 824 bp).

Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden aus dem Gel eluiert (4.1.8) und eine Klonierungs-PCR mit degenerierten Primern angesetzt (VR1-F1 mit VR1-R1; VRL1-F1 mit VRL1-R1; 3.10, 4.1.13.3). Die PCR-Produkte (TRPV1: 330 bp; TRPV2: 261 bp) wurden über pGEMT in den Expressionsvektor pET-28a (3.8) für die bakterielle Proteinexpression einkloniert (4.1.14.1) und in kompetente *E. coli XL1-Blue* transformiert (4.1.12). Dabei wurden für TRPV1 die Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *EcoRI* und für TRPV2 *BamHI* und *HindIII* verwendet.

Bevor die konstruierten Plasmide in die Expressionsbakterien transformiert werden konnten, wurden die Sequenzen der Klone pET-28a-TRPV1-N-VI und pET-28a-TRPV2-N-I von der Firma Genterprise in Mainz mit den Primern T7-pET-vor und T7-pET-rück (3.10) überprüft (Abb. 11). Die Sequenz des amplifizierten Bereichs von TRPV2 entsprach zu 100% der publizierten Sequenz (Acc.No. AF129113, 9.1). Bei TRPV1 dagegen war es an Position 367 zu einem Basen- und folglich zu einem Aminosäureaustausch gekommen (366CCG → CAG, bezogen auf die publizierte mRNA Acc.No. AF029310, 9.1, führt zu dem Aminosäureaustausch 96 P → Q). Dieser Austausch war neben weiteren bereits von Jahnelt *et al.* (2001) berichtet worden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich um die richtige TRPV1-Sequenz handelte. Somit wurde mit den beiden sequenzierten Klonen weiter gearbeitet und nach der Transformation in *E. coli BL21 DE3 pLysS* Expressionskulturen angesetzt (4.1.12, 4.1.14).

pET28a-TRPV1-N-VI

	M G S S H H H H H	9
TTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACC	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAT	27
H S S G L V P R G S H M A S M T G G Q Q M G R G S		34
CACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATCC		102
E Q R A S L D S E E S E S P P Q E N S C L D P P D		59
GAACAACGGGCTAGCTTAGACTCAGAGGAGTCTGAGTCCCCACCCCAAGAGAACTCCTGCCTGGACCCTCCAGAC		177
R D P N C K P P P V K P H I F T T R S R T R L F G		84
AGAGACCCTAACTGCAAGCCACCTCCAGTCAAGCCCCACATCTTCACTACCAGGAGTCGTACCCGGCTTTTGGG		252
K G D S E E A S P L D C P Y E E G G L A S C P I I		109
AAGGTGACTCGGAGGAGGCCTCTCCCTGGACTGCCCTTATGAGGAAGGCGGGCTGGCTTCTGCCATATCATC		327
T V S S V L T I Q R P G D G P A S V R Q S S Q D S		134
ACTGTCAGCTCTGTTCTAACTATCCAGAGGCCTGGGATGGACCTGCCAGTGTCCAGGCAAGTCATCCCAGGACTCC		402
V S A G E K *		140
GTCTCCGCTGGTGAGAAGTAGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCA		477
CCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAG		511

pET28a-TRPV2-N-I

	M G S S H H H H H	9
TTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACC	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAT	27
H S S G L V P R G S H M A S M T G G Q Q M G R G S		34
CACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATCC		102
T S A S S P P A F R L E T S D G D E E G N A E V N		59
ACTTCAGCCTCCAGCCCCCAGCTTTCAGGCTGGAGACTTCCGATGGAGATGAAGAGGGCAATGCTGAGGTGAAC		177
K G K Q E P P P M E S P F Q R E D R N S S P Q I K		84
AAGGGGAAGCAGGAACCGCCCCCATGGAGTCACCATTCAGAGGGAGGACCGGAATTCCTCCCCTCAGATCAA		252
V N L N F I K R P P K N T S A P S Q Q E P D R F D		109
GTGAACCTCAACTTCATAAAGAGACCTCCTAAAAACACTTCTGCTCCCAGCCAGCAGGAGCCAGATCGGTTTGAC		327
R D R L F S V V *		117
CGTGACCAGCTCTTCAGTGTGGTCTAGAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCG		402
GCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAA		426

Abb. 11: Basen- und abgeleitete AS-Sequenzen der Sequenzierung von TRPV1 und TRPV2.

Start-ATG und Stopcodon sind **fett** markiert, das Stopcodon zusätzlich durch einen Stern (*) gekennzeichnet, der His-Tag **violett** und der Beginn der Rezeptorsequenz **orange**. 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche sind **türkis** und der kodierende Bereich schwarz. TRPV1-N-Terminus ist 140 AS und TRPV2-N-Terminus 117 AS lang, was rechnerisch ein Molekulargewicht von 15,4 kDa für TRPV1 und 12,9 kDa für TRPV2 ergibt. Bei TRPV1 führt ein Basenaustausch zu einem AS-Austausch (**rot** markiert).

5.3.1.2 Proteinexpression

Nach der Aufreinigung über den His-Tag (4.2.1) wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese (4.2.3, 4.2.4) auf ihr Molekulargewicht (anhand der Laufhöhe), die Expressionsmenge und den Grad der Aufreinigung überprüft. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran konnten die Proteine mit einem anti-His-Antikörper immunochemisch detektiert werden (4.2.5, Abb. 12).

Der Proteintotalextrakt von TRPV1-N-Terminus zeigte eine dominante Bande bei ca. 22 kDa, die auch in der aufgereinigten Proteinlösung zu erkennen war und sich mit einem anti-His-Antikörper detektieren ließ. Der Proteintotalextrakt von TRPV2-N-Terminus zeigte eine dominante Bande bei ca. 17 kDa. Eine zusätzliche unspezifische Bande bei ca. 25 kDa war in den aufgereinigten Proteinlösungen im SDS-Gel jedoch nicht im Immunoblot zu erkennen (Abb. 12). Mittels der photometrischen Konzentrationsbestimmung (4.2.2) wurde die Konzentration von TRPV1-N mit 0,5 mg/ml und die von TRPV2-N mit 0,2 mg/ml bestimmt und die Proteine zur Immunisierung von Mäusen wie unter 4.3.4.1 beschrieben eingesetzt.

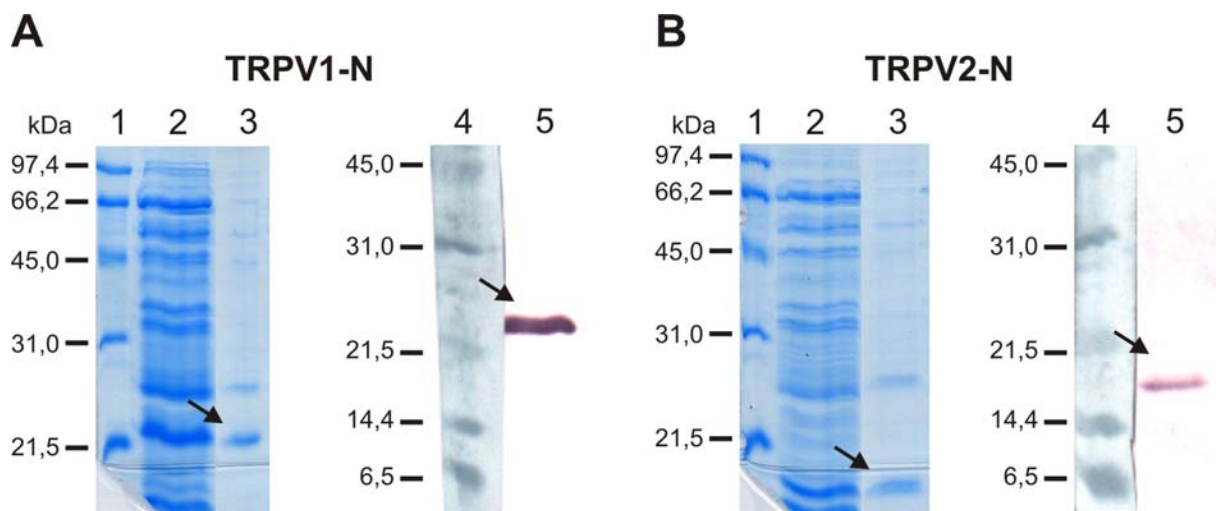


Abb. 12: Bakterielle Proteinexpression der N-Termini von TRPV1 und TRPV2.

A: TRPV1-N-Terminus. **B:** TRPV2-N-Terminus. Links ist jeweils das SDS-Gel mit Coomassie-Färbung und rechts der Immunoblot detektiert mit anti-His-Antikörper. Bahn 1: Marker; Bahn 2: Totalextrakt (10 μ l); Bahn 3: aufgereinigtes Protein (TRPV1: 10 μ l; TRPV2: 20 μ l); Bahn 4: Marker; Bahn 5: aufgereinigtes Protein (TRPV1: 10 μ l; TRPV2: 20 μ l). TRPV1-N-Terminus zeigt eine Bande bei ca. 22 kDa und TRPV2-N-Terminus bei ca. 17 kDa.

5.3.2 Analyse der Mäuseseren

Nach der 3. Immunisierung wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene abgenommen und der Antikörpertiter mittels ELISA (4.2.6) bestimmt, um die Maus mit dem höchsten Antikörpertiter für die Fusion einzusetzen, da diese am besten auf die Immunisierung reagiert hatte. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 5 µg / ml an die Platte gecoatet und mit einer Verdünnungsreihe der Mäuseseren detektiert (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000, 1:256000, 1:512000 und 1:1024000) sowie PBS zur Bestimmung der Hintergrundwerte (unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers). In **Abb. 13** ist jeweils für eine mit TRPV1 und TRPV2 immunisierte Maus das Ergebnis eines ELISA als Beispiel dargestellt.

Sowohl die TRPV1- als auch die TRPV2-immunisierte Maus zeigte eine deutliche Immunantwort auf das zur Immunisierung verwendete Protein. Diese Reaktivität war stärker als auf das Protein des anderen Rezeptors, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Mäuse Antikörper gegen TRPV1 bzw. TRPV2 gebildet hatten. Es kam jedoch auch zu einer Immunantwort gegen Vektorbestandteile oder den His-Tag, womit sich die Reaktivität auf das jeweils andere Protein erklären ließ.

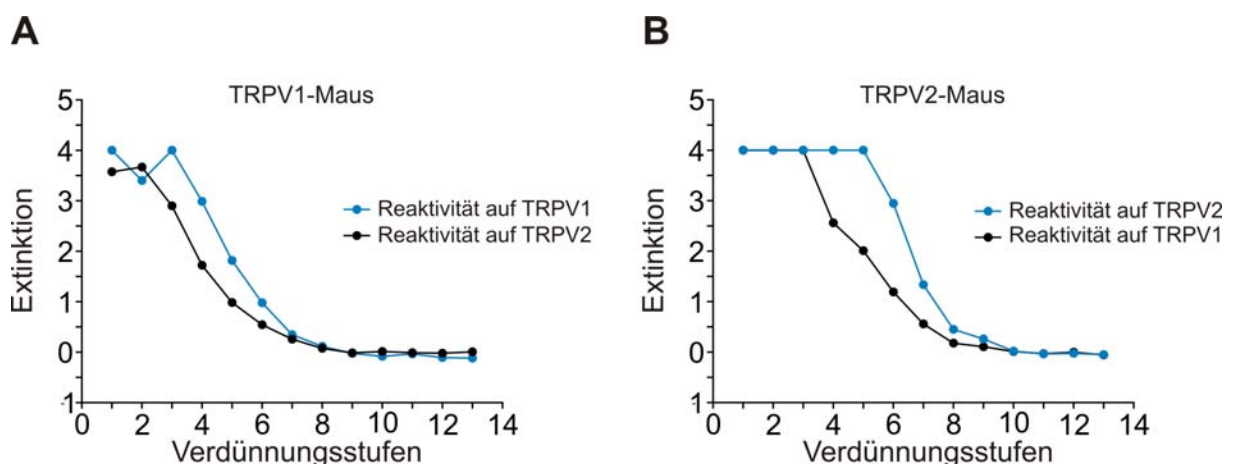


Abb. 13: Reaktivität der Mäuseseren im ELISA auf TRPV1- bzw. TRPV2-N-Terminus.

Die Reaktivität der Mäuseseren ist dargestellt als Wert der Extinktion bei 492 nm nach Abzug des Hintergrundwertes. Die Verdünnungsstufen 1-13 entsprechen den Verdünnungen von 1:250 bis 1:1024000. **A:** Mit TRPV1-N-Terminus immunisierte Maus. Sie reagiert auf TRPV1 stärker als auf TRPV2. **B:** Mit TRPV2-N-Terminus immunisierte Maus. Sie reagiert auf TRPV2 stärker als auf TRPV1.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Seren mit Immunfluoreszenzfärbungen (4.3.5.2) und im Immunoblot (4.2.5) getestet. Für die Immunhistochemie konnten die Seren in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:1000 und für den Immunoblot in 1:2000 verwendet werden. Die Schnitte wurden mit Methanol fixiert und die Primärantikörper mit anti-Maus-Cy3 bzw. anti-Maus-FITC (3.6.2) detektiert (Abb. 14).

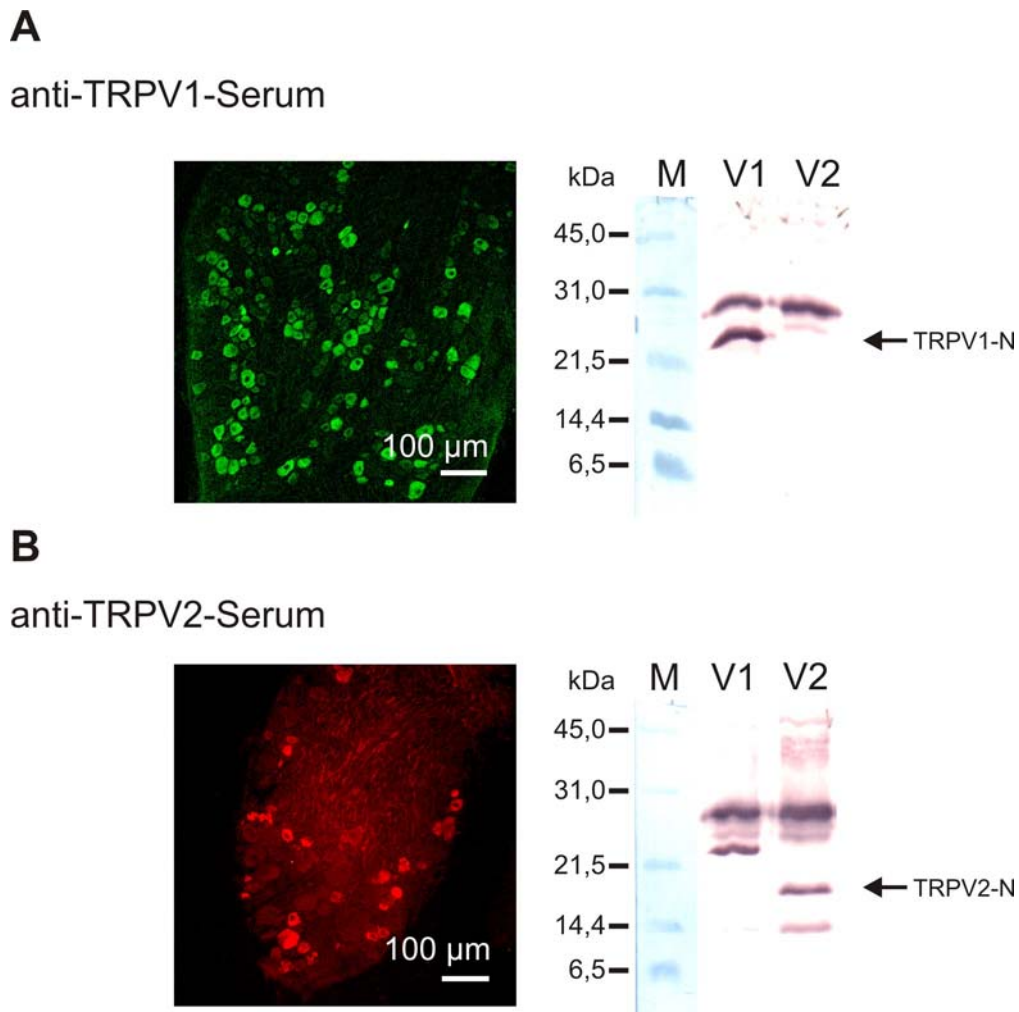


Abb. 14: Spezifität der Mäuseseren, die gegen TRPV1 und TRPV2 gerichtet sind.

Der linke Teil der Abbildung zeigt Anfärbungen von Spinalganglienschnitten (Größenmaßstab: 100 µm) und der rechte Teil Immunoblots: Bahn 1: Marker; Bahn 2: TRPV1-N-Terminus; Bahn 3: TRPV2-N-Terminus. **A:** Anti-TRPV1-Serum. **B:** Anti-TRPV2-Serum. Die Seren zeigen eine Färbungen auf das jeweilig zur Immunisierung eingesetzte Protein, aber auch Reaktivitäten mit dem His-Tag und Vektorbestandteilen.

Das anti-TRPV1-Mausserum zeigte im Schnitt von Spinalganglien eine Anfärbung vieler kleiner Neurone, das anti-TRPV2-Serum dagegen eine Anfärbung weniger größerer Neurone

(vergleiche **Abb. 7**, Färbung der Kaninchenserum). Beide Mausseren reagierten im Immunoblot auf das jeweils zur Immunisierung eingesetzte Protein sowie auf die zusätzliche obere Bande, die in beiden Proteinaufreinigungen enthalten war (**Abb. 12**). Das anti-TRPV2-Serum zeigte desweiteren eine Bindung an TRPV1-N-Terminus, eine Reaktivität die auf anti-His-Antikörper zurückzuführen war. Der His-Tag wurde nach den Proteinaufreinigungen nicht abgespalten. Somit enthielt das anti-TRPV2-Serum mehr unspezifische Antikörper als das anti-TRPV1-Serum (**Abb. 14**).

Die Seren der immunisierten Mäuse reagierten im ELISA und im Immunoblot stärker mit dem zur Immunisierung verwendeten Protein und zeigten in Spinalganglienschnitten die typische Färbung TRPV1- bzw. TRPV2-positiver Zellen. Die zusätzlich gebildeten Antikörper waren gegen die in der Proteinexpression enthaltenen bakteriellen Bestandteile sowie gegen den His-Tag gerichtet. Da die Spezifität der Färbung am besten in den immunhistochemischen Färbungen zu erkennen war, erfolgte das Screening der monoklonalen Antikörper durch Färbung von Spinalganglienschnitte.

5.3.3 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Die Milz aus den Mäusen mit den höchsten Antikörpertitern wurden zur Fusion mit Myelomzellen eingesetzt (**4.3.4**) und die wachsenden Klone auf die von ihnen produzierten Antikörper untersucht. Ein Screening im ELISA unter Verwendung der zur Immunisierung eingesetzten Proteine wäre zu ungenau gewesen, da nicht zwischen spezifischen Antikörpern gegen die Rezeptoren und unspezifischen gegen Vektorbestandteile oder His-Tag (**Abb. 14**) hätte unterschieden werden können. Das Screening wurde daher mit Immunfluoreszenzfärbungen an Schnitten von Spinalganglien durchgeführt und positive Klone expandiert. Es fanden sich zunächst sehr viele sowohl TRPV1- als auch TRPV2-positiv Klone, von denen die meisten jedoch sehr instabil waren und entweder nicht expandiert werden konnten oder ihre Antikörperproduktion nach kurzer Zeit wieder einstellten.

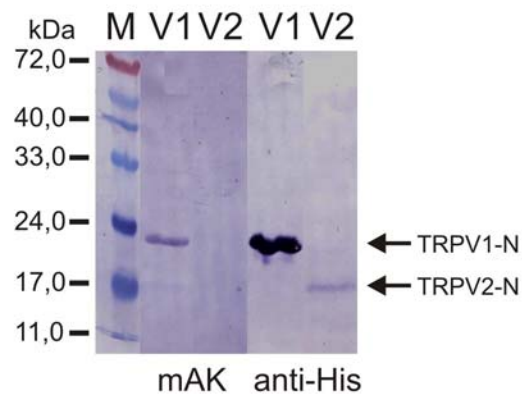
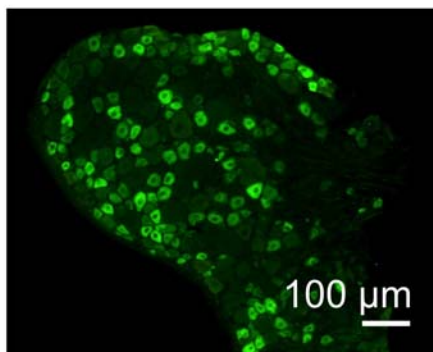
Für TRPV1 konnte der Klon mit der Bezeichnung 3C11 und für TRPV2 der Klon mit der Bezeichnung E1E3 selektiert werden.

5.3.3.1 Spezifität

Wie bei der Charakterisierung der Mäuseseren (5.3.2) wurden die monoklonalen Antikörper an Schnitten von Spinalganglien und im Immunoblot getestet (vgl. **Abb. 14**, **4.2.5**, **4.3.5.2**). Die Schnitte wurden mit Methanol fixiert, die monoklonalen Antikörper als unverdünnter Zellkulturüberstand und anti-Maus-Cy3 bzw. anti-Maus-FITC als Sekundärantikörper eingesetzt (3.6.2). Zur Kontrolle wurden im Immunoblot die rekombinanten Proteine zusätzlich mit einem anti-His-Antikörper (3.6.1, **Abb. 12**, **Abb. 15**) detektiert.

A

Anti-TRPV1-mAK 3C11



B

Anti-TRPV2-mAK: E1E3

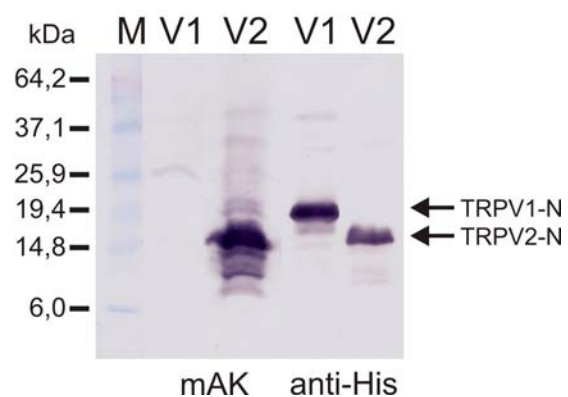
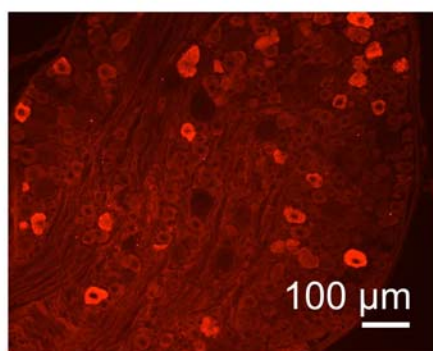


Abb. 15: Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen TRPV1 und TRPV2.

Der linke Teil der Abbildung zeigt Anfärbungen von Spinalganglienschnitten (Größenmaßstab: 100 µm) und der rechte Teil Immunoblots: Bahn 1: Marker; Bahn 2 + 4: TRPV1-N-Terminus; Bahn 3 + 5: TRPV2-N-Terminus. Bahn 2 + 3 sind mit dem mAK; Bahn 4 + 5 mit anti-His-Antikörper inkubiert. **A:** Anti-TRPV1-mAK 3C11. **B:** Anti-TRPV2-mAK E1E3. Die mAk zeigen TRPV1- bzw. TRPV2-spezifische Färbungen

Der anti-TRPV1-mAK 3C11 zeigte im Schnitt von Spinalganglien eine Anfärbung vieler kleiner Neurone (vgl. **Abb. 7** und **Abb. 14**). Im Immunoblot reagierte er nur schwach mit TRPV1-N-terminalem Protein, aber nicht mit TRPV2. Die Kontrollfärbung mit dem anti-His-Antikörper zeigte jedoch, dass hier TRPV2-N-terminales Protein nur in geringen Mengen vorlag, so dass die fehlende Reaktivität auf TRPV2 nicht unbedingt als Negativkontrolle gewertet werden konnte. Die spezifische Färbung in den Spinalganglien und die Reaktivität mit dem Protein im Immunoblot bestätigten jedoch seine Spezifität (**Abb. 15**). Die schwache Reaktivität im Immunoblot im Vergleich zur immunochemischen Färbung wies darauf hin, dass der Antikörper gegen ein Konformationsepitop gerichtet zu sein schien, an das er im nativen Zustand gut, im denaturierten Zustand jedoch nur schwach binden konnte.

Der anti-TRPV2-mAK E1E3 zeigte im Schnitt von Spinalganglien eine Anfärbung weniger aber größerer Neurone (vgl. **Abb. 7** und **Abb. 14**). Im Immunoblot reagierte er nur mit TRPV2-N-terminalem Protein, nicht jedoch mit TRPV1. Die Kontrollfärbung mit dem anti-His-Antikörper zeigte, dass beide Proteine in gleicher Menge vorhanden waren, so dass es sich bei diesem mAK um einen spezifischen anti-TRPV2-Antikörper handelte (**Abb. 15**). Die Reaktivität des Antikörpers im Immunoblot und den immunochemischen Färbungen war gleich stark, so dass er gegen ein diskontinuierliches Epitop gerichtet zu sein schien, an das er sowohl im nativen als auch im denaturierten Zustand gut binden konnte. Die starke Reaktivität im Immunoblot wies auf eine hohe Affinität des Antikörpers hin.

5.3.3.2 Subklassen-ELISA

Für die experimentelle Verwendung im Labor sind IgG-Antikörper besser geeignet als IgM, da sie höhere Affinitäten besitzen und aufgrund eines niedrigeren Molekulargewichts (IgM-Antikörper liegen als Pentamere vor) besser löslich sind. IgM-Antikörper können daher schnell ausfallen und starke Hintergrundreaktivitäten bewirken. Zudem können IgG-Antikörper besser aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden (Harlow and Lane, 1988). Zur Subklassentypisierung der mAK 3C11 und E1E3 wurden anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b und anti-IgG3-Antikörper an eine Mikrotiterplatte gekoppelt und ein Subklassen-ELISA durchgeführt (**4.3.4.6**).

Der anti-TRPV1-mAK 3C11 konnte als IgG2b und der anti-TRPV2-mAK E1E3 als IgG1 klassifiziert werden. Somit hatte im Laufe der Immunantwort der Klassenswitch von IgM auf IgG stattgefunden.

5.3.3.3 Vergleich der monoklonalen Antikörper mit den Kaninchenseren

Zur weiteren Spezifizierung wurden die monoklonalen, gegen die N-Termini der Rezeptoren gerichteten, Antikörper (**Abb. 15**) durch Doppelfärbung mit den C-terminal gerichteten Kaninchenseren (**5.1, Abb. 7**) verglichen. Spinalganglienschnitte wurden mit Methanol fixiert und nacheinander die Färbung des mAk (detektiert mit anti-Maus-FITC, grün) mit dem entsprechenden Kaninchenserum (detektiert mit anti-Kaninchen-Cy3, rot) durchgeführt (**4.3.5.2, Abb. 16**).

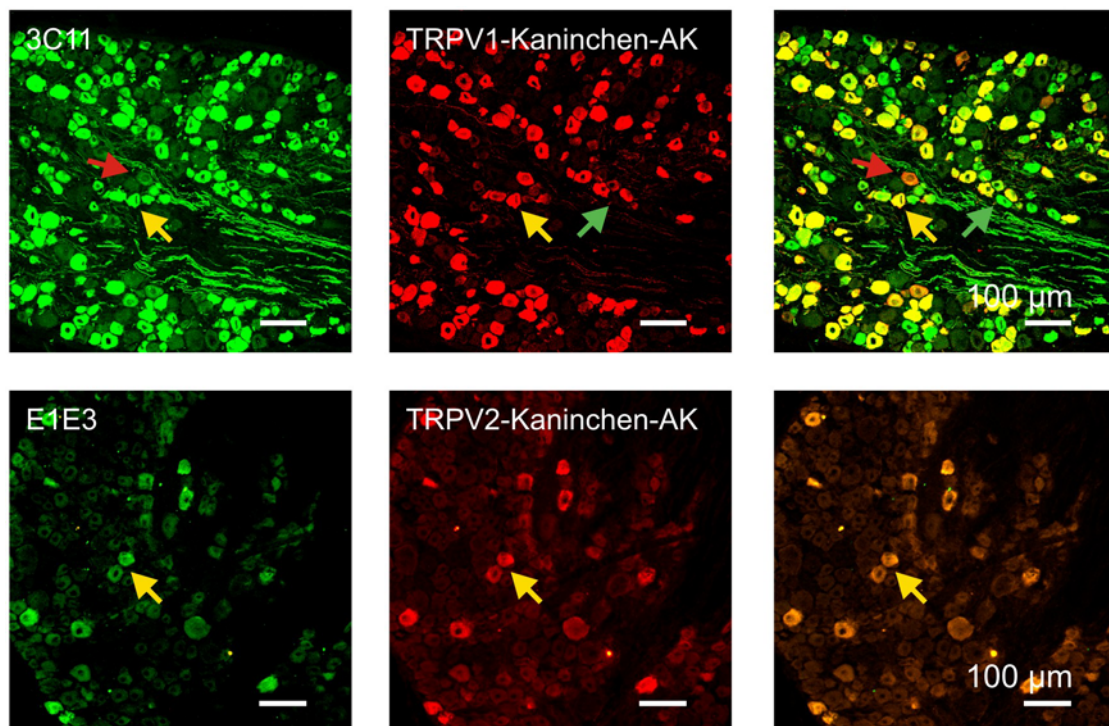


Abb. 16: Doppelfärbung der monoklonalen Antikörper mit den Kaninchenseren.

Repräsentative Beispiele von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen der monoklonalen Antikörper mit den entsprechenden Kaninchenantikörpern. Grün: mAK; rot: Kaninchen-AK; gelb: Doppelfärbung. **Obere Reihe:** anti-TRPV1-mAK 3C11 mit anti-TRPV1-Kaninchenserum. **Untere Reihe:** mAK E1E3 mit anti-TRPV2-Kaninchenserum. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, die nur einen Marker (rot, grün) oder beide Marker (gelb) zeigen. Größenmaßstab: 100 μm .

Die Doppelfärbung des anti-TRPV1-mAK 3C11 mit anti-TRPV1-Kaninchenserum zeigte, dass die beiden Antikörper nicht vollständig die gleichen Zellen färbten. Dabei zeigten ~ 87 % der Zellen die mit dem C-terminal gerichteten Serum gefärbt werden konnten auch eine Färbung mit dem N-terminal gerichteten mAK 3C11. Dies entsprach ~ 60 % der mAK-positiven Neuronen. Die Zellen die nur mit dem Kaninchenserum detektiert werden konnten (~ 13 % der positiven Zellen) enthielten möglicherweise nur die N-terminale Splice-Variante Vr.5'sv, die mit dem mAK nicht detektierbar war. Der mAK 3C11 markierte ~ 40 % der Neurone, die sich nicht mit dem C-terminalen Serum nachweisen liessen. Zum einen besitzt der mAK möglicherweise eine höhere Sensitivität für den Rezeptor als das Serum, zum anderen existiert eventuell analog zur N-terminalen Splice-Variante ein TRPV1-Protein mit einem veränderten C-Terminus, das somit nicht mit dem Serum detektierbar wäre. Die Doppelfärbung des anti-TRPV2-mAK E1E3 mit anti-TRPV2-Kaninchenserum zeigte dagegen eine vollständige Übereinstimmung des Färbemusters dieser beiden Antikörper.

5.4 Charakterisierung der Wirkung von Capsaicin

5.4.1 Capsaicin-Präinkubation

Um zu überprüfen, ob mit dem gegen den N-Terminus von TRPV1 gerichteten Antikörper nach Capsaicininkubation (5.2) noch TRPV1-positive Zellen detektierbar sind, wurden akut dissoziierte Spinalganglienneurone (4.3.1.2) nach dem Absetzen der Zellen ü.N. bei 34°C und 5 % CO₂ in Medium inkubiert, das entweder 10 µM Capsaicin (1:2000 aus einer 20 mM Stammlösung) oder die gleiche Menge Ethanol (1:2000 100 %iges Ethanol) als Vehikelkontrolle enthielt. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit anti-TRPV1-Kaninchenserum, anti-TRPV1-mAK 3C11 sowie anti-TRPV2-mAK E1E3 immunochemisch detektiert und ausgewertet (3.6, 4.3.5.3, 5.1, 5.2).

In der Kontrollbedingung mit Ethanol detektierte der monoklonale anti-TRPV1-Antikörper 3C11 $49,7 \pm 1,9$ % aller Neurone und somit einen signifikant größeren Anteil ($P < 0,001$) als das anti-TRPV1-Kaninchenserum, das nur $32,1 \pm 0,7$ % der Neurone markierte. Der monoklonale anti-TRPV2-Antikörper E1E3 dagegen detektierte den gleichen Anteil an Zellen wie das anti-TRPV2-Kaninchenserum (vgl. **Abb. 8**, **Tab. 3**, **Tab. 4**, **Tab. 5**), jedoch signifikant weniger als der anti-TRPV1-mAK ($P < 0,001$). Sowohl bei den Zellen, die mit

dem C-terminalen Kaninchenserum als auch bei denen, die mit dem N-terminalen mAK gegen TRPV1 gefärbt wurden, führte die Inkubation von Capsaicin ü.N. zu einer signifikanten Abnahme der positiven Zellen ($P < 0,001$; vgl. **Abb. 8**, **Tab. 4**, **Tab. 5**). Mit dem C-terminalen Kaninchenserum konnten noch ~11 % positive Neurone und mit dem mAK 3C11 noch ~19 % positive Neurone nachgewiesen werden, dies entsprach ~25 % bzw. ~24 % der TRPV1-positiven Neurone vor der Inkubation. Wie auch bei dem Kaninchenserum nahm der Anteil TRPV2-positiver Neurone, die mit dem mAK E1E3 gefärbt worden waren, signifikant zu ($P < 0,01$) (**Abb. 17**, **Tab. 5**, **5.2**).

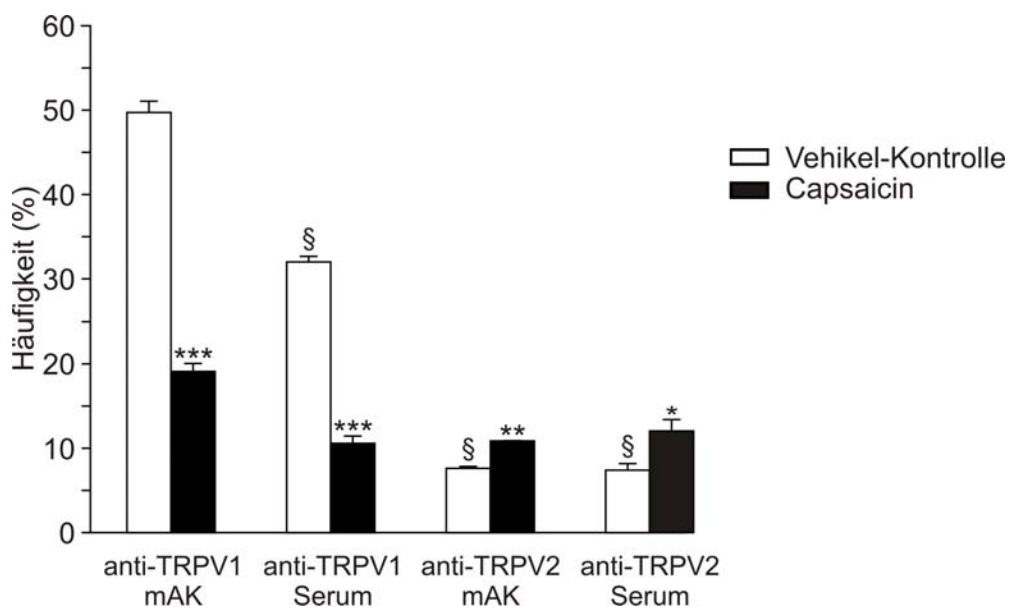


Abb. 17: TRPV1 und TRPV2 nach Capsaicin-Präinkubation detektiert mit den mAK.

Dargestellt sind die Häufigkeiten von TRPV1 und TRPV2 in akut dissoziierten Spinalganglienneuronen detektiert mit verschiedenen Primärantikörpern (N-terminal gerichtete mAK 3C11 und E1E3 sowie C-terminal gerichtete anti-TRPV1- und TRPV2-Kaninchenserum). Die weißen Balken entsprechen der Vehikelkontrolle und die schwarzen der Capsaicininkubation. Der N-terminal gerichtete anti-TRPV1-mAK detektiert die Hälfte aller Neurone, das C-terminale Kaninchenserum dagegen nur ein Drittel. Nach Inkubation mit Capsaicin zeigt sich bei beiden Antikörpern eine Reduktion der positiven Zellen um drei Viertel. Der anti-TRPV2-mAK detektiert den gleichen Anteil an Zellen wie das Kaninchenserum (Daten aus **Abb. 8**, **Tab. 4**). Dargestellt sind die mittleren Durchmesser (\pm S.E.M). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, behandelte versus unbehandelte Kultur; § $P < 0,001$, versus anti-TRPV1-mAK (**Tab. 5**).

Tab. 5: TRPV1 und TRPV2 nach Capsaicininkubation detektiert mit dem mAK

	n	Häufigkeit (%)	
		Kontrolle	Capsaicin
mAK anti-TRPV1	3	49,8 ± 1,3	19,2 ± 1,0 ^{***}
Serum anti-TRPV1	3	32,1 ± 0,7 [§]	10,7 ± 0,9 ^{***}
mAK anti-TRPV2	2	7,7 ± 0,2	11,0 ± 0,01 ^{**}

^{**} P < 0,01 versus Kontrolle

^{***} P < 0,001 versus Kontrolle

[§] P < 0,001 mAK versus Serum; Student t-Test ungepaart

Da auch mit dem N-terminalen mAK nach Capsaicininkubation noch TRPV1-positive Zellen nachgewiesen werden konnten, sollte die Wirkung von Capsaicin auf die Neurone durch Beobachtung der intrazellulären Kalziumkonzentration näher untersucht werden (5.4.2). Desweiteren sollte TRPV1 als vollständiger Rezeptor kloniert und im heterologen Expressionssystem charakterisiert werden (5.5).

5.4.2 Langzeitinkubation von Spinalganglien mit Capsaicin

Da auf Proteinebene nach Capsaicininkubation ü.N. noch TRPV1-positive Zellen detektiert werden konnten (5.2, 5.4.1), wirkt die Substanz scheinbar nicht auf alle TRPV1-positiven Zellen toxisch. Möglicherweise verfügen die überlebenden Zellen über einen Schutzmechanismus und werden nicht so stark von Capsaicin aktiviert oder die anhaltende Applikation von Capsaicin führt nicht zu einem stetigen Anstieg des intrazellulären Kalziums. Um dies näher zu untersuchen wurde eine Primärkultur (4.3.1.2) analog zu den Präinkubationsexperimenten in 5.2 und 5.4.1 ü.N. in Capsaicin-haltigem (10 µM Capsaicin; 1:2000 aus einer 20 mM Stammlösung) oder als Kontrolle Ethanol-haltigem (1:2000 100 %iges Ethanol) Medium kultiviert, die Zellen mit dem ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff Fura 2-AM (3 µM) beladen und die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch das Verhältnis der Emission bei Anregung mit 340 zu 380 nm gemessen (4.3.7). In 2

Experimenten wurde zu den Neuronen aus der Kontrollkultur 5 ml 10 μ M Capsaicin-haltige Tyrodelösung gegeben und die Zellen für mehr als 5 h darin inkubiert. Bei einem dieser beiden Experimente wurden anschließend die funktionellen Eigenschaften der Zellen durch Applikation von 5 ml 140 mM Kaliumlösung getestet. Mit der Capsaicin-behandelten Primärkultur sollte überprüft werden, ob auch nach langer Behandlung noch Capsaicin-sensitive Zellen enthalten sind. Eine Zelle wurde als Capsaicin-sensitiv gewertet, sobald die intrazelluläre Kalziumkonzentration eine Zunahme $> 20\%$ zeigte (Greffrath *et al.*, 2001).

Anhand ihrer Reaktivität auf Capsaicin wurden die Spinalganglienneurone in drei Gruppen unterteilt:

- die Capsaicin-insensitiven Zellen (**negative** Zellen)
- die Capsaicin-sensitiven Zellen, die sich erholen (**reversibel positive** Zellen)
- die Capsaicin-sensitiven Zellen, die sich nicht erholen (**irreversibel positive** Zellen).

In **Abb. 18** sind exemplarisch verschiedene Capsaicin-sensitive Neurone zum einen in Fluoreszenzbildern und zum anderen im zeitlichen Verlauf der gemessenen Werte abgebildet. Dabei bedeutet die Farbveränderung im Fluoreszenzbild von blau nach rot eine Zunahme der Kalziumkonzentration. Durch den Vergleich der lichtmikroskopischen Aufnahmen vor und nach dem Experiment ist zu erkennen, dass Neurone durch die Capsaicininkubation absterben (Zelle 1 und 2) während andere sich nach dem initialen Anstieg von Ca^{2+} wieder erholen (Zelle 3 und 4).

Von insgesamt 88 untersuchten Neuronen aus $n=2$ Experimenten waren 63 (71,6 %) sensitiv für Capsaicin und 25 (28,4 %) insensitiv. Bei 39,7 % der positiven Zellen (25 von 63) zeigte sich nach der initialen Antwort auf Capsaicin eine Abnahme der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die Zellen konnten sich demnach erholen und waren reversibel positiv, wobei die Erholung für mindestens 90 Minuten anhalten musste, um die Zellen als reversibel positiv zu klassifizieren. Bei den irreversibel positiven Zellen (38 von 63 = 60,3 %) stieg dagegen die Kalziumkonzentration stetig an und führte zu einem Absterben der Zellen. In $n=1$ Experiment, in dem die Neurone am Ende auf ihre Funktionalität getestet wurden, zeigten 54,6 % (6 von 11) der reversibel positiven Zellen eine Antwort auf die Applikation von 140 mM Kaliumlösung. Bei zwei Zellen dieser Gruppe kam es im späteren Verlauf des Experimentes zu einem Wiederanstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (**Abb. 18**, z.B. Zelle 2).

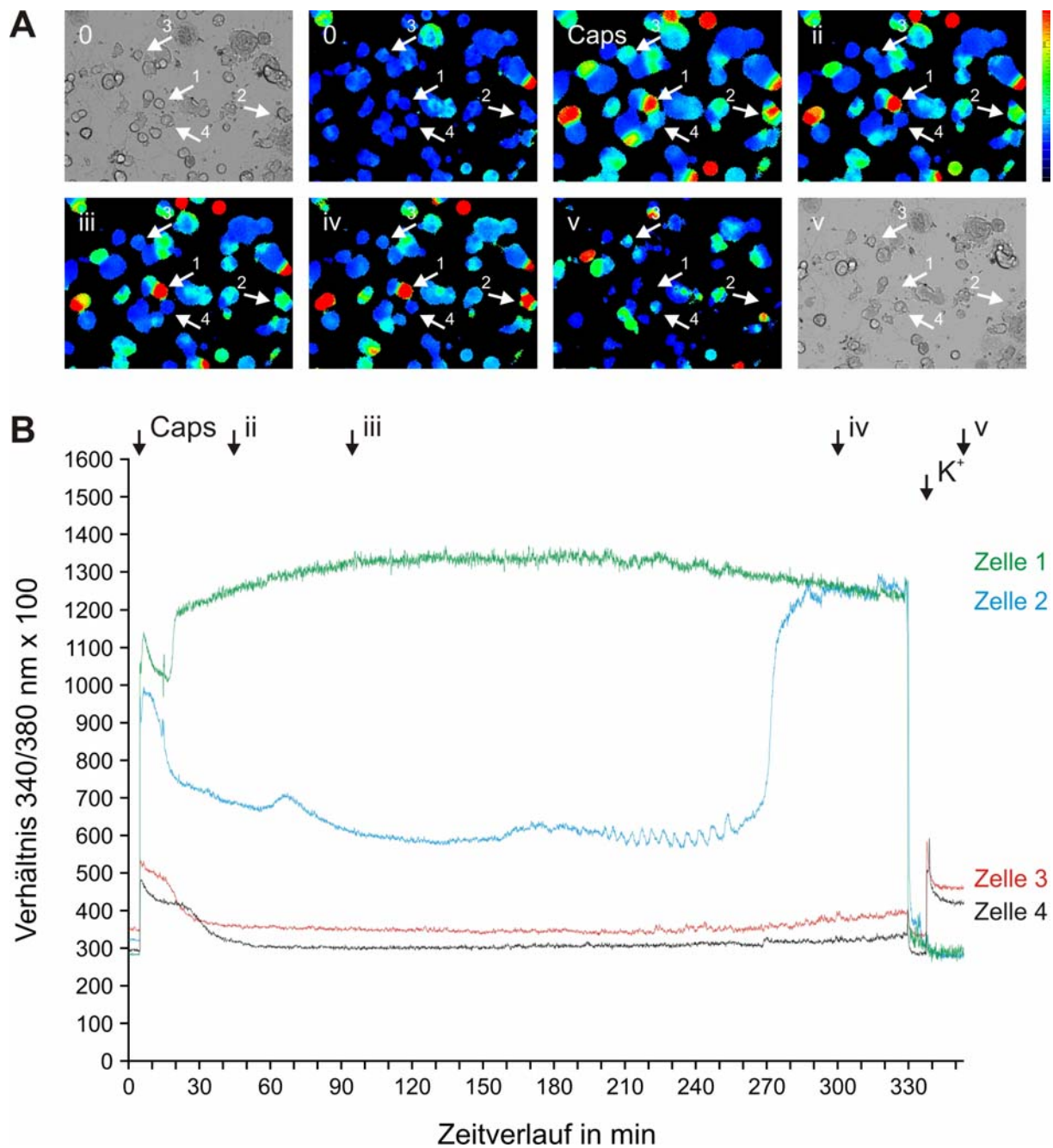


Abb. 18: Einfluss von Capsaicin auf die Neurone bei anhaltender Applikation.

Repräsentative Beispiele von Spinalganglienneuronen nach Zugabe von Capsaicin bei anhaltender Applikation von mehr als 5 h. **A:** Bildausschnitt der untersuchten Zellen im Durchlicht vor und nach dem Experiment (links oben, rechts unten) und in der Fluoreszenz zu Beginn des Experimentes (0), bei Capsaicingabe (Caps) und zu den Zeitpunkten ii, iii, iv und v, die in Teilbild B mit Pfeilen markiert sind. **B:** Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration der Zellen 1-4, die in Teilbild A mit Pfeilen markiert sind. Neben den Markierungen für die Zeitpunkte, zu denen die Bilder in Teilbild A aufgenommen wurden findet sich die Markierung für die Zugabe von 140 mM Kaliumlösung (K⁺). Zelle 1 zeigt einen stetigen Anstieg der Kalziumkonzentration und stirbt somit unter dem Einfluss von Capsaicin ab; Zelle 2 erholt sich zunächst und stirbt dann im Verlauf des Experimentes ab; die Zellen 3 und 4 sind sensitiv für Capsaicin, erholen sich wieder und können durch die Applikation von Kalium erneut aktiviert werden.

Abb. 19 zeigt die Mittelwerte der Gruppen der negativen, reversibel positiven und irreversibel positiven Zellen.

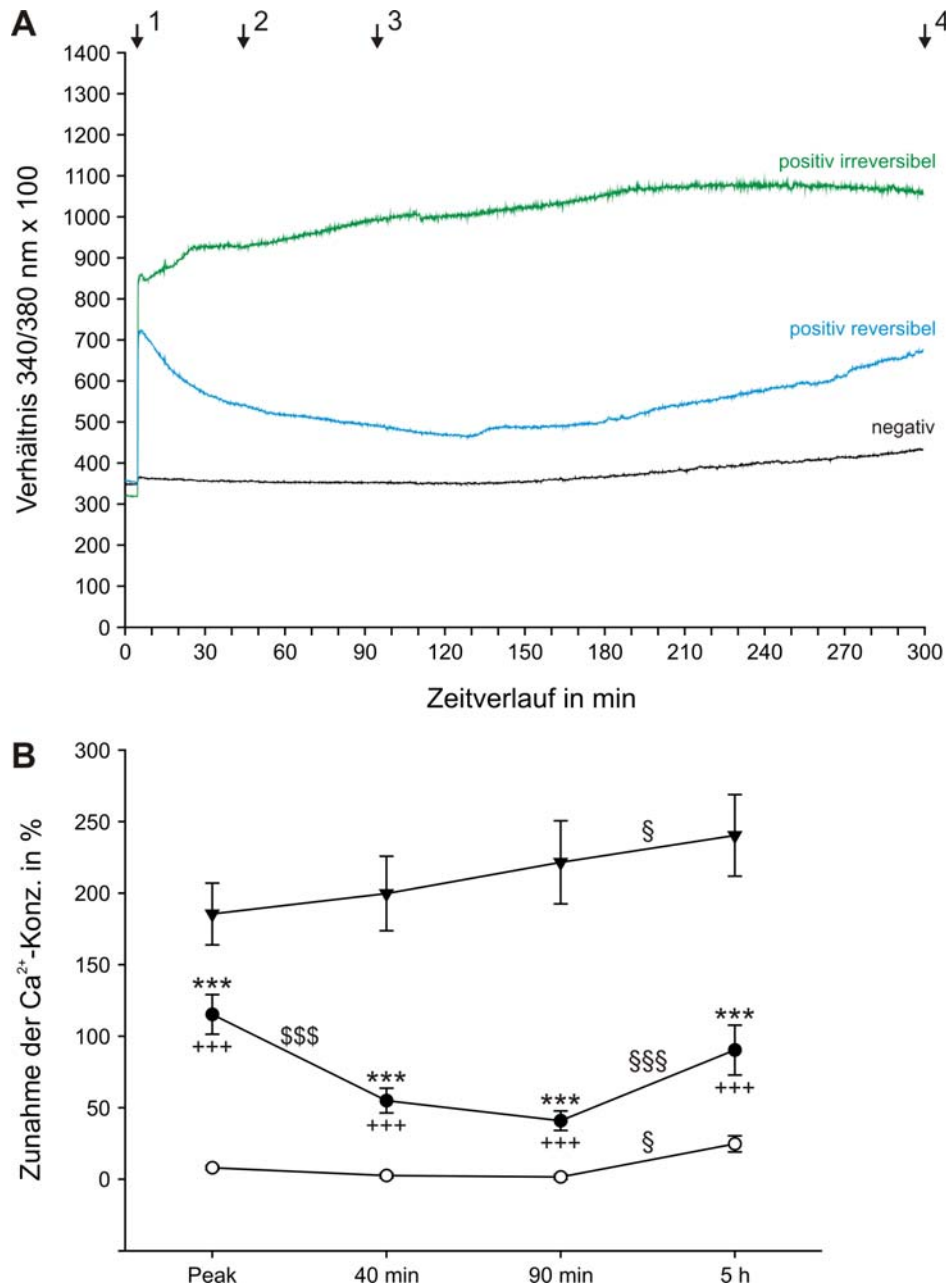


Abb. 19: Vergleich der verschiedenen Neuronengruppen unter Capsaicin-Langzeitinkubation. Die Neurone werden anhand ihrer Reaktivität auf die anhaltende Inkubation mit Capsaicin ($10 \mu\text{M}$) über 5 h in negative, reversibel positive und irreversibel positive Zellen unterteilt. **A:** Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration im Mittel im zeitlichen Verlauf. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte für die Werte in Teilbild B. **B:** Prozentuale Veränderung der Kalziumkonzentration im Mittel \pm S.E.M. 5 min, 40 min und 90 min nach Capsaicinapplikation sowie 5 h nach Beginn des Experimentes. $+++$ $P < 0,001$, reversibel positive versus negative; $***$ $P < 0,001$, reversibel positive versus irreversibel positive; $$$$$ $P < 0,001$, Peak versus 40 min; $§$ $P < 0,05$, $$$$$ $P < 0,001$, 90 min versus 5 h (2-Wege Anova für wiederholte Messungen, LSD Post Hoc Test).

Die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen geben den jeweiligen charakteristischen Verlauf wieder (**Abb. 19A**). Dabei zeigte sich ein hochsignifikanter Effekt der Gruppen ($F_{(2, 85)} = 28,74$; $P < 0,001$) und über die Zeit ($F_{(3,255)} = 14,82$; $P < 0,001$), sowie eine hochsignifikante Interaktion ($F_{(6, 255)} = 12,93$, $P < 0,001$) (2-Wege Anova für wiederholte Messungen). Die reversibel positiven Zellen zeigten zu jedem Messzeitpunkt eine signifikant stärkere Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration als die negativen Zellen ($P < 0,001$), sowie eine signifikant niedrigere Zunahme als die irreversibel positiven Zellen ($P < 0,001$). Desweiteren kam es bei den reversibel positiven Zellen nach dem initialen Peak in den folgenden 90 min zu einer signifikanten Abnahme der Kalziumkonzentration ($P < 0,001$). Die signifikante Zunahme des intrazellulären Kalziums im weiteren Verlauf der reversibel positiven und der negativen Gruppe sprach für einen Capsaicin-unabhängigen Effekt, da er auch in der Gruppe der negativen Zellen zu beobachten war ($P < 0,05$ für die negativen und die irreversibel positiven, $P < 0,001$ für die reversibel positiven) (**Abb. 19B**).

Wurde die Primärkultur ü.N. mit Capsaicin behandelt, so wiesen die Zellen eine schlechte Haftung auf und es konnten nur wenige Zellen im Kalzium-Imaging beobachtet werden. Von 4 untersuchten Zellen fand sich jedoch noch eine Capsaicin-sensitive Zelle, die mit einer kleinen Antwort reagierte. Es konnte somit gezeigt werden, dass nicht alle TRPV1-positiven bzw. Capsaicin-sensitiven Neurone auch bei anhaltender Inkubation mit Capsaicin absterben und dass sich auch nach 5 h noch funktionelle Capsaicin-sensitive Zellen finden.

5.5 TRPV1 im heterologen Expressionssystem: eine C-terminale Splice-Variante

Um die funktionellen Eigenschaften von TRPV1 näher zu charakterisieren, sollte die vollständige Sequenz des Rezeptors amplifiziert, in einen eukaryotischen Expressionsvektor inkloniert und in HEK-Zellen transfiziert werden.

5.5.1 Klonierung und Transfektion

Von der Ratten-cDNA (5.3.1.1) wurde mit den genspezifischen Primern VR1-RTF2 und VR1-RTR9; 3.10, 9.1) die Volllänge-Sequenz von TRPV1 amplifiziert (4.1.13.3) und mit dem PCR-Ansatz eine Agarose-Gelelektrophorese (4.1.7) durchgeführt. Es zeigte sich eine Bande zwischen 2500 und 3000 bp (errechnete Sequenzlänge 2750 bp; Abb. 20).

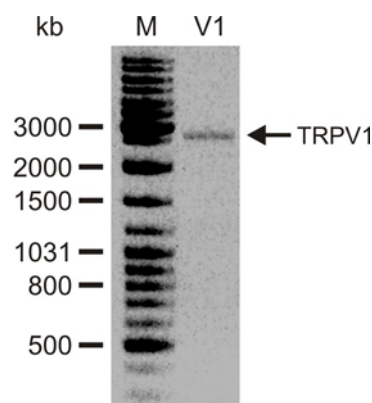


Abb. 20: RT-PCR mit genspezifischen Primern für TRPV1-Volllänge.

Bahn 1: Marker; Bahn 2: TRPV1-Volllänge mit einer Bande zwischen 2500 und 3000 bp (errechnete Länge 2750 bp).

Das entsprechende DNA-Fragment wurde aus dem Gel eluiert (4.1.8) und eine Klonierungs-PCR mit den degenerierten Primern VR1-VL-F1 und VR1-VL-R1 angesetzt (3.10, 4.1.13.3, 9.1). Das PCR-Produkt (2538 bp) wurde über pGEMT in den Expressionsvektor pcDNA3 (3.8) für die eukaryotische Proteinexpression inkloniert (4.1.15) und in kompetente *E. coli* XLI-Blue transformiert (4.1.12). Dabei wurden die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XbaI* verwendet. Vor der Transfektion des konstruierten Plasmids in HEK293-Zellen wurde

die Sequenz von der Firma Genterprise in Mainz mit den Primern T7 und SP6 (**3.10**) überprüft. Vom N-Terminus ausgehend entsprach die Sequenzierung der publizierten Sequenz (**Acc.No. AF029310**). Im C-Terminus dagegen fand sich zwischen Exon 15 und Exon 16 eine Insertion von 104 Basen, die aus dem Intronbereich zwischen Exon 15 und Exon 16 stammte. Die Insertion führte zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zu einer veränderten Aminosäuresequenz ab Aminosäure 782 der publizierten Sequenz. Stattdessen kodiert die Insertion für 29 neue Aminosäuren und ein Stopcodon, so dass dieses exprimierte Protein statt den ursprünglichen 838 nur 810 Aminosäuren lang war (**Abb. 21**).

T L S F S L R S G R D R V S L C S P G F P G T H Y	796
ACCCTGAGCTTCTCCCTGAGGTCAGGCCGAGACAGGGTTTCTCTATGTAGCCCTGGCTTTCCTGGAACCTACTAT	2388
V D Q A G L E L T E I H L S *	810
GTAGACCAGGCTGGCCTTGAACCTCACAGAGATCCATCTGTCTTGAGTGCTGGGATTAAAGTTTCAGGGAGAACT	2463
GGAAGAACTTTGCCCTGGTTCCCTTCTGAGGGATGCAAGCACTCGAGATAGACATGCCACCCAGCAGGAAGAAG	2538
TTCAACTGAAGCATTATACGGGATCCCTTAAGCCAGAGGATGCTGAGGTTTTCAAGGATTCATGGTCCCAGGGG	2613
AGAAATAATGG	2624

Abb. 21: C-terminale Sequenz des klonierten TRPV1-Proteins.

Basen- und abgeleitete AS-Sequenzen. Das Stopcodon ist **fett** und durch einen Stern (*) markiert, Exon 15 **rosa**, Exon 16 **blau** und die Insertion **grün**. Die Insertion von 104 Basen bewirkt eine Verschiebung des Leserahmens und somit eine veränderte Expression des C-Terminus. In der mRNA sind Exon 15 und Exon 16 wie in der ursprünglichen Sequenz enthalten. Das Protein hat eine Länge von 810 Aminosäuren.

Das pcDNA3-TRPV1-Konstrukt wurde zur Transfektion von HEK293-Zellen verwendet (**4.3.3**) und die auf Deckgläsern gewachsenen Zellen unter Verwendung des C-terminal gerichteten Kaninchenserums (**3.6.1, 5.1**) sowie des N-terminal gerichteten Mausserums (**5.3.2**) immunzytochemisch (**4.3.5.3**) auf die Proteinexpression untersucht.

Mit dem eigenen N-terminal gerichteten Mausserum (**5.3.2, Abb. 14**) konnte der von den HEK-Zellen exprimierte TRPV1-Rezeptor mit dem veränderten C-Terminus nachgewiesen werden. Der C-terminal gerichtete Antikörper aus dem Kaninchen dagegen konnte an das Protein nicht mehr binden. Die Kontrollfärbung ohne Primärantikörper zeigte keinerlei Hintergrundreaktivität der Sekundärantikörper (**Abb. 22**).

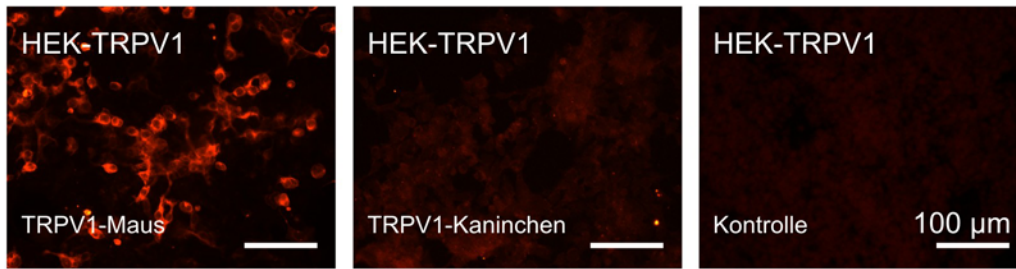


Abb. 22: Färbung der HEK-Zellen, die die C-terminale TRPV1 Variante exprimieren.

Repräsentative Beispiele von Immunfluoreszenzfärbungen des anti-TRPV1-Mausserums (links), des anti-TRPV1-Kaninchenserums (Mitte) und der Kontrolle ohne Primärantikörper (rechts) von TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen. Nur das gegen den N-Terminus gerichtete Mausserum kann das Protein mit dem veränderten C-Terminus detektieren, nicht jedoch der C-terminal gerichtete Kaninchenantikörper. Größenmaßstab: 100 µm.

Für die funktionelle Analyse dieses neuen TRPV1-Proteins wurden die transfizierten Zellen mit Kalzium-Imaging-Experimenten auf ihre Reaktivität gegenüber dem Agonisten Capsaicin und dem Antagonisten Capsazepin näher untersucht (4.3.7, 5.5.2).

5.5.2 Funktionelle Charakterisierung

Es wurden HEK-Zellen in Zellkulturschälchen mit dem pCDNA3-TRPV1-Konstrukt transfiziert (4.1.15, 4.3.3, 5.5.1) bzw. stabil exprimierende HEK-TRPV1-Zellen sowie nicht-transfizierte HEK-Zellen in Zellkulturschälchen ausgesät (4.3.1.1) und nach 1-2 Tagen mit 1 µM Fura 2-AM beladen (4.3.7). Nacheinander wurden 1 µM Capsaicin- (10 sec), 10 µM Capsazepin- (30 sec), 10 µM Capsazepin- + 1 µM Capsaicin- (10 sec) und noch einmal 1 µM Capsaicinlösung (10 sec) appliziert. Zwischen den Applikationen wurden die Substanzen mit Fura-Tyrode ausgewaschen und die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration über das Verhältnis der Emission bei Anregung mit 340 zu 380 nm verfolgt (4.3.7, Abb. 23).

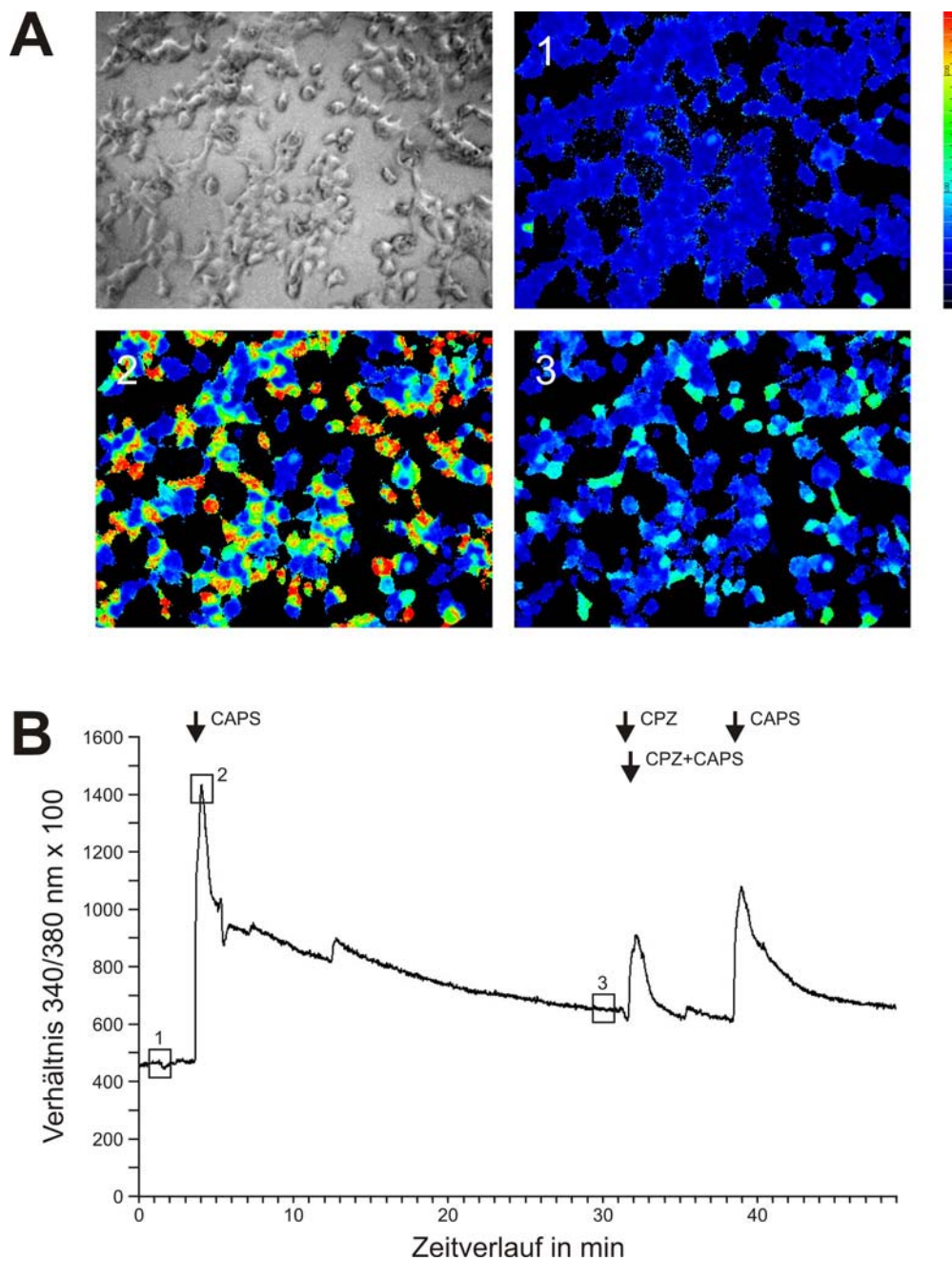


Abb. 23: Kalzium-Imaging der HEK-Zellen, die die C-terminale Splice-Variante exprimieren.

A: Untersuchte HEK-Zellkultur, transfiziert mit pCDNA3-TRPV1 im Durchlicht (links oben) und in der Fluoreszenz (340/380 nm) während des Kalzium-Imaging-Experimentes zu den Zeitpunkten 1, 2 und 3, die in Teilbild B mit Kästchen markiert sind. Je stärker rot die Zelle gefärbt ist desto höher ist das intrazelluläre Kalzium. **B:** Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration dargestellt als das Verhältnis der Emission bei der Anregung von 340 zu 380 nm aufgetragen gegen die Zeit in min. Die Kästchen mit den Ziffern 1, 2 und 3 markieren die Zeitpunkte zu denen die Bilder in Teilbild A aufgenommen wurden. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte zu denen die verschiedenen Substanzen appliziert wurden. Dargestellt ist der Mittelwert aus $n = 9$ ROIs aus $n = 1$ Experiment. CAPS: Capsaicin (1 μ M); CPZ: Capsazepin (10 μ M).

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde als Summe aller Zellen in einem Teilbereich (ROI: region of interest) des Bildausschnittes gemessen, wobei 7-10 ROIs aus einem Bildausschnitt ausgewertet wurden. In **Abb. 23** ist der Mittelwert von $n = 9$ ROIs aus $n = 1$ Experiment exemplarisch dargestellt. Nicht-transfizierte HEK-Zellen dienten als Kontrolle und zeigten keine Reaktivität auf die Applikation von Capsaicin. Die TRPV1-exprimierenden HEK-Zellen reagierten in $n = 5$ Experimenten mit $n = 45$ ROIs nach Applikation von Capsaicin mit einer signifikanten Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration um $211,4 \pm 12,1 \%$ ($P < 0,001$) und waren somit sensitiv für Capsaicin. In $n = 2$ Experimenten mit $n = 20$ ROIs zeigte sich nach Capsaicinapplikation eine signifikante Zunahme um $179,5 \pm 13,6 \%$. Durch die Zugabe von Capsazepin, einem kompetitiven TRPV1-Antagonisten, wurde diese Zunahme auf $80,5 \pm 7,9 \%$ reduziert, d.h. signifikant um $55,2 \pm 3,2 \%$ verringert ($P < 0,001$). Die Hemmung des Rezeptors mit Capsazepin war reversibel, da die Zellen nach Auswaschen des Antagonisten mit Fura-Tyrode durch eine weitere Capsaicinabgabe einen Anstieg des intrazellulären Kalziums von $109 \pm 8,3 \%$ zeigten. Dies entsprach einer signifikanten Steigerung gegenüber der Wirkung des Antagonisten um $44,9 \pm 8,6 \%$ ($P < 0,001$) (**Abb. 24**).

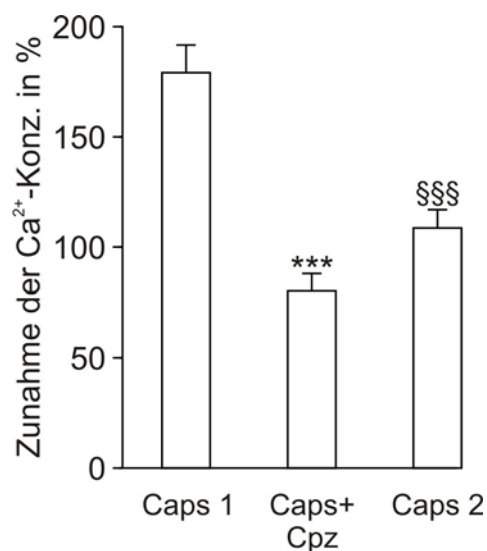


Abb. 24: Wirkung von Capsaicin und Capsazepin auf TRPV1-exprimierende HEK-Zellen.

Dargestellt ist die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration nach der aufeinander folgenden Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Capsaicin und $10 \mu\text{M}$ Capsazepin auf TRPV1-exprimierende HEK-Zellen. Capsaicin bewirkt eine signifikante Zunahme des intrazellulären Kalziums, die durch Capsazepin um $55,2 \pm 3,2 \%$ signifikant blockiert werden kann. Dieser Effekt ist reversibel, da nach Auswaschen des Antagonisten die Zellen durch Capsaicin wieder um $44,9 \pm 8,6 \%$ stärker aktiviert werden können. Caps: Capsaicin; Cpz: Capsazepin; *** $P < 0,001$, Caps+Cpz versus Caps 1; \$\$\$ $P < 0,001$, Caps+Cpz versus Caps 2; Student t-Test, gepaart

5.6 Ko-Expression der pronozizeptiven Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2

Obwohl TRPV2-exprimierende Neurone signifikant größer waren als TRPV1-exprimierende, zeigte sich dennoch eine Überlappung der Größenverteilung der beiden Populationen (5.1, Abb. 7), die auf eine mögliche Ko-Expression der beiden Rezeptoren hinwies. Die Ko-Expression von TRPV1 und TRPV2 wurde durch Doppelfärbungen an PFA-fixierten Schnitten der Spinalganglien mit anti-TRPV1-Serum aus dem Meerschweinchen (FITC-markiert, grün) und anti-TRPV2-Serum aus dem Kaninchen (Cy3-markiert, rot) durchgeführt (3.6, 4.3.5.2, 5.1, Abb. 25).

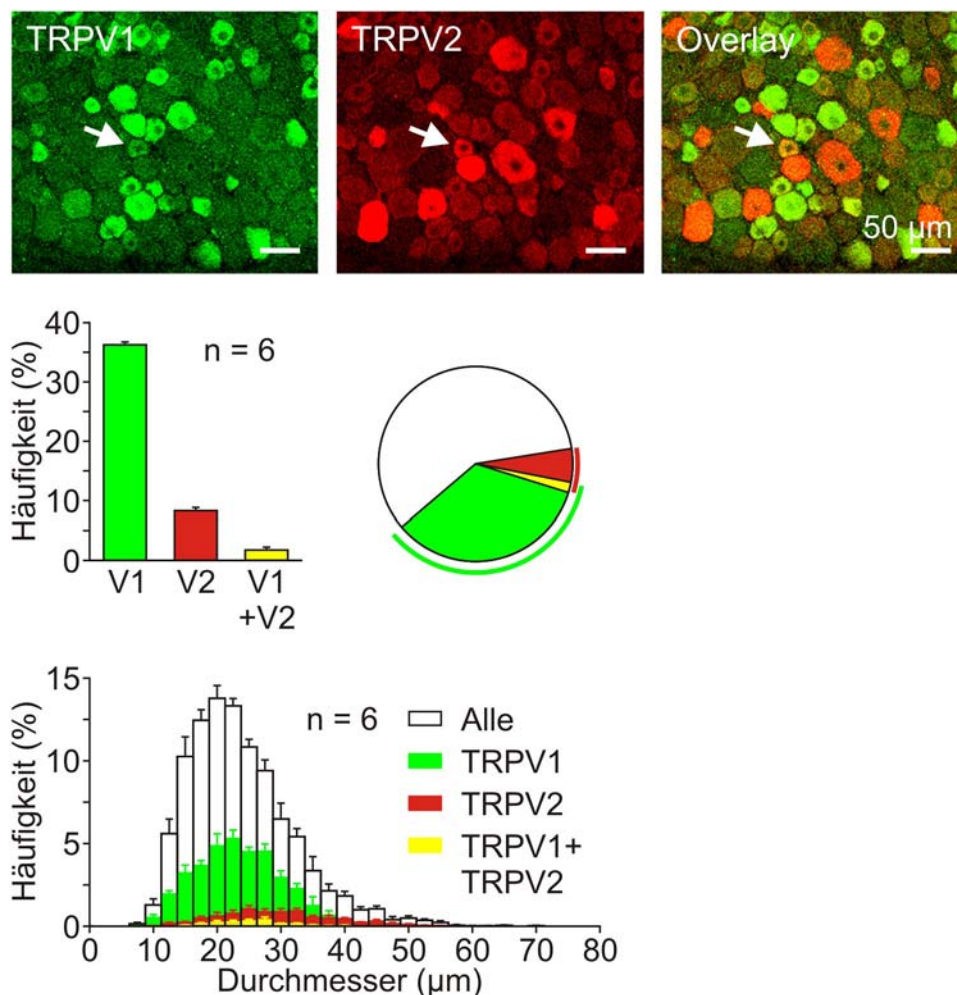


Abb. 25: Ko-Expression von TRPV1 und TRPV2 in Spinalganglien der Ratte.

Repräsentative Beispiele von Schnitten (obere Reihe), Histogrammen (mittlere Reihe) sowie Größenverteilung der Häufigkeit (untere Reihe), die das Maß der Überlappung der positiven Zellen anzeigen. Grün: TRPV1; rot: TRPV2; gelb: Ko-Expression. Die Pfeile zeigen auf eine Zelle, die beide Marker exprimiert. Größenmaßstab: 50 µm; "n" entspricht der Anzahl der verwendeten Tiere.

Von insgesamt 11268 ausgewerteten Neuronen aus 14 Tieren waren $32,3 \pm 1,2$ % TRPV1-positiv mit einem mittleren Durchmesser von $20,4 \pm 0,6$ μm und von insgesamt 9920 ausgewerteten Neuronen aus 13 Tieren waren $6,2 \pm 0,7$ % TRPV2-positiv mit einem signifikant größeren mittleren Durchmesser ($P < 0,001$) von $27,8 \pm 0,6$ μm . Die Analyse von 3730 Neuronen aus sechs Tieren ergab 71 TRPV1-TRPV2-ko-exprimierende Zellen mit einer schwachen aber eindeutig positiven Färbung. Dies entsprach ungefähr 2 % aller und somit ungefähr 20 % der TRPV2-positiven Neurone. Der mittlere Durchmesser dieser doppelt-positiven Zellen betrug $24,7 \pm 1,2$ μm und lag somit in der Mitte der mittleren Durchmesser von TRPV1 und TRPV2 (**Abb. 25, Tab. 8 und Tab. 9 in 9.2**).

Diese Untersuchung wurde ebenfalls mit den gegen die N-Termini der Rezeptoren gerichteten monoklonalen Antikörpern (3C11, E1E3; **5.3.3, Abb. 15, Abb. 16**) in Kombination mit dem entsprechenden Kaninchenserum in einer Doppelfärbung (**4.3.5.2**) durchgeführt. Die Spinalganglienschnitte wurden mit Methanol fixiert, die monoklonalen Antikörper mit anti-Maus-FITC (grün) und die Kaninchenseren mit anti-Kaninchen-Cy3 (rot) markiert (**Abb. 26**).

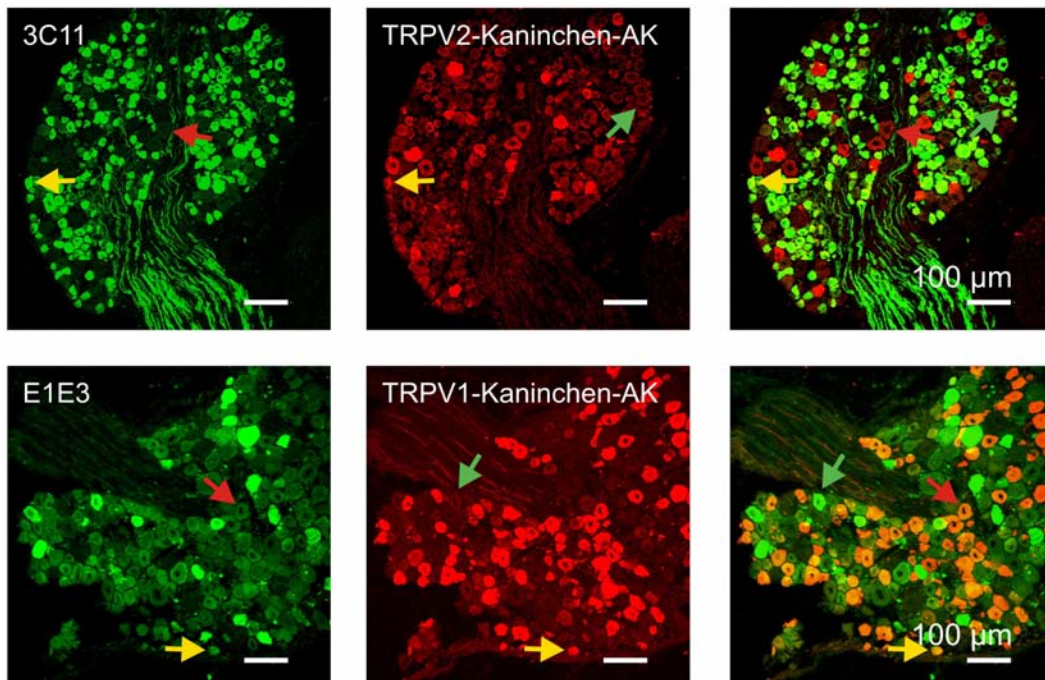


Abb. 26: Ko-Expressionsuntersuchung mit den monoklonalen Antikörpern.

Repräsentative Beispiele von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen der monoklonalen Antikörper mit dem jeweilig anderen Kaninchenantikörper. Grün: mAK; rot: Kaninchen-AK; gelb: Doppelfärbung. **Obere Reihe:** anti-TRPV1-mAK 3C11 mit anti-TRPV2-Kaninchenserum. **Untere Reihe:** mAK E1E3 mit anti-TRPV1-Kaninchenserum. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, die nur einen Marker (rot, grün) oder beide Marker (gelb) zeigen. Größenmaßstab: 100 μm .

Wie auch bei der vorangegangenen Ko-Expressionsuntersuchung von TRPV1 mit TRPV2 (**Abb. 25, Tab. 8 in 9.2**) ergab die Doppelfärbung des anti-TRPV2-mAK E1E3 mit dem anti-TRPV1-Serum aus dem Kaninchen, dass ~ 5 % der TRPV1-positiven Neurone auch TRPV2 exprimierten und ~ 24 % der TRPV2-positiven auch TRPV1. Bei der Doppelfärbung des anti-TRPV1-mAK 3C11 mit anti-TRPV2-Kaninchenserum zeigten dagegen nur ~ 2,5 % der TRPV1-positiven Neurone auch eine Färbung für TRPV2. Dies entsprach wie bei den vorangegangenen Doppelfärbungen wiederum ~ 21 % der TRPV2-positiven Zellen. Dieser Unterschied liess sich durch den größeren Anteil an Zellen, der durch den mAK 3C11 detektiert wurde, erklären (**5.3.3.3, Abb. 16, Abb. 26**).

5.7 Ko-Expression von TRPV1 und TRPV2 mit dem spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kv1.4

Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.4 könnte als schnell inaktivierender, auswärts gleichrichtender A-Typ Kanal antinozizeptiv wirken. Er reguliert vor allem die Repolarisierung des Membranpotenzials und die elektrische Leitfähigkeit. Seine Expression in kleinen Spinalganglienneuronen wurde bereits gezeigt (Rasband *et al.*, 2001), eine Ko-Expression mit TRPV1 oder TRPV2 ist jedoch unklar. Diese möglichen Ko-Expressionen wurden durch Doppelfärbungen an Aceton-fixierten Schnitten der Spinalganglien mit anti-Kv1.4-mAK von Frau Saaler-Reinhardt (FITC-markiert, grün) und anti-TRPV1-bzw. anti-TRPV2-Kaninchenserum von M. J. Caterina (Cy3-markiert, rot) durchgeführt. Die Spezifität des anti-Kv1.4 mAK K4C1 wurde durch Immunoblot und HEK-Zellfärbungen nachgewiesen (**3.6, 4.3.5.2**) (Binzen *et al.*, 2006).

Von insgesamt 14342 ausgewerteten Neuronen aus fünf Tieren fanden sich $35,7 \pm 0,5$ % Kv1.4-positive Neurone mit einem mittleren Durchmesser von $18,6 \pm 0,6$ μm (**Tab. 9**).

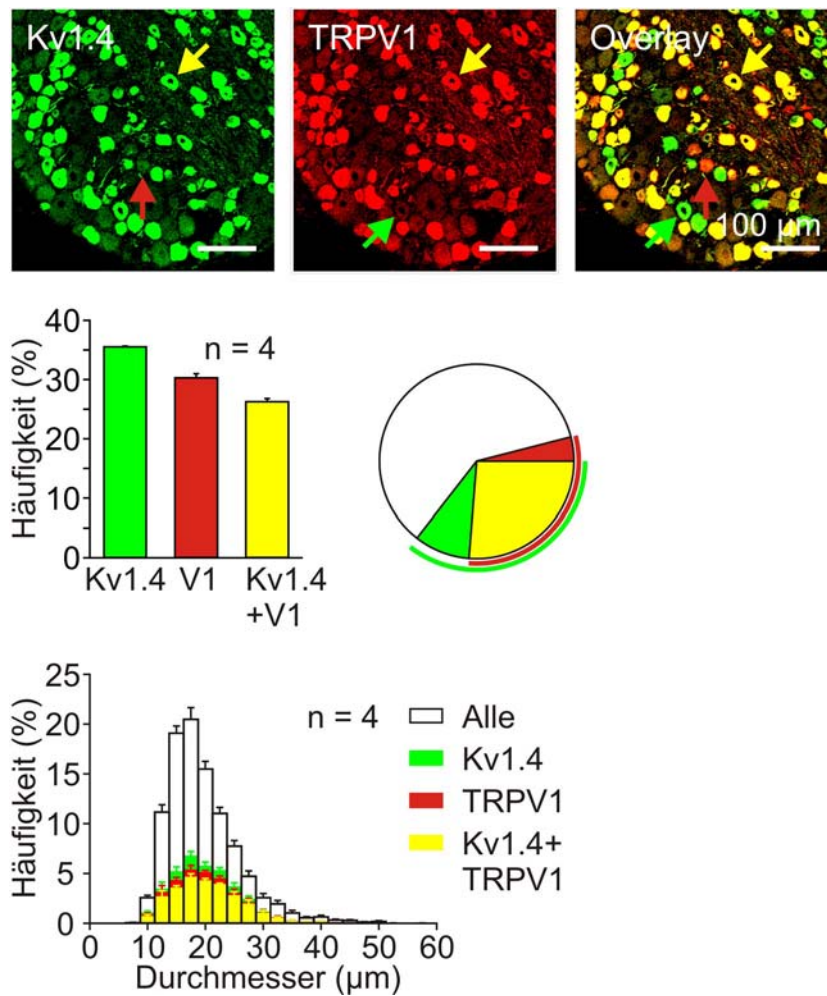


Abb. 27: Ko-Expression von TRPV1 und Kv1.4 in Spinalganglien der Ratte.

Repräsentative Beispiele von Schnitten (obere Reihe), Histogrammen (mittlere Reihe) sowie Größenverteilung der Häufigkeit (untere Reihe), die das Maß der Überlappung der positiven Zellen anzeigen. Grün: Kv1.4; rot: TRPV1; gelb: Ko-Expression. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, die nur einen Marker (rot, grün) oder beide Marker (gelb) zeigen. Größenmaßstab: 100 µm; “n” entspricht der Anzahl der verwendeten Tiere.

Die Analyse von 4811 Neuronen aus vier Tieren ergab, dass die meisten TRPV1-positiven Neurone auch Kv1.4-positiv waren ($86,8 \pm 1,8 \%$) und dass ein Großteil der Kv1.4-positiven Neurone auch TRPV1 exprimierten ($73,9 \pm 1,5 \%$). Dies entsprach $26,3 \pm 0,5 \%$ aller Neurone. Die mittleren Durchmesser der TRPV1- und Kv1.4-positiven Neurone unterschieden sich nicht signifikant voneinander (**Abb. 27, Tab. 8 in 9.2**).

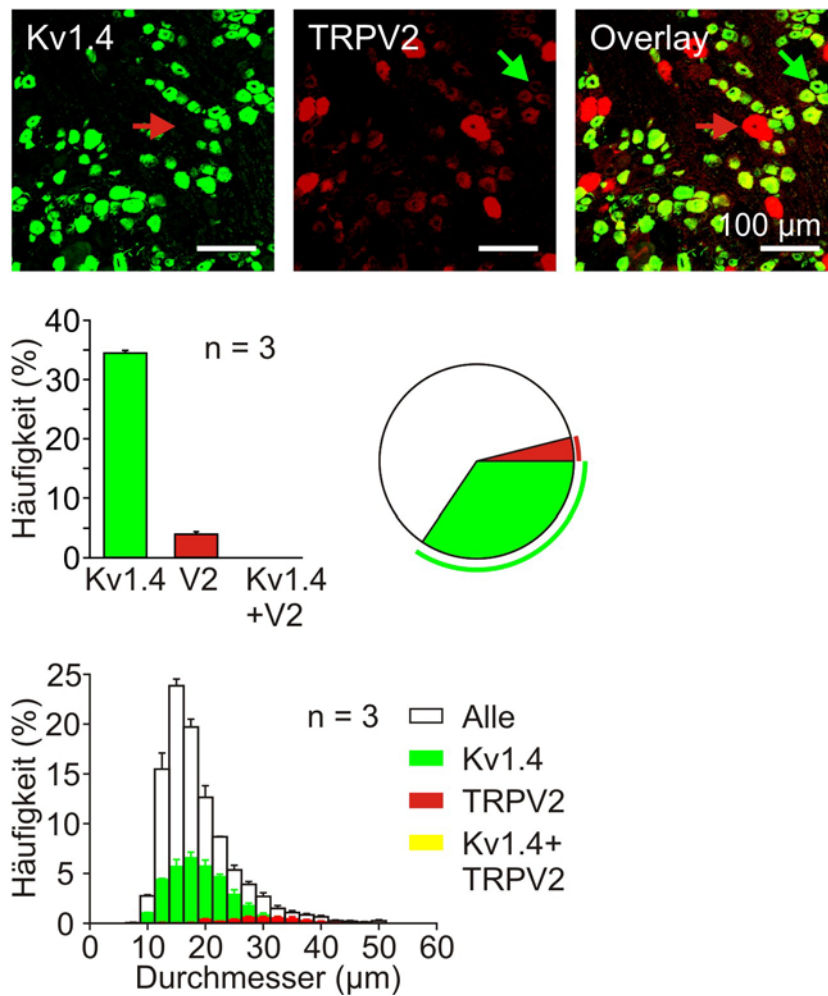


Abb. 28: Ko-Expression von TRPV2 und Kv1.4 in Spinalganglien der Ratte.

Repräsentative Beispiele von Schnitten (obere Reihe), Histogrammen (mittlere Reihe) sowie Größenverteilung der Häufigkeit (untere Reihe), die das Maß der Überlappung der positiven Zellen anzeigen. Grün: Kv1.4; rot: TRPV2; gelb: Ko-Expression. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, die nur einen Marker (rot, grün) zeigen. Größenmaßstab: 100 µm; "n" entspricht der Anzahl der verwendeten Tiere.

In 3593 Spinalganglienneuronen konnten keine Zellen identifiziert werden, die Kv1.4 mit TRPV2 ko-exprimierten (Abb. 28, Tab. 8 in 9.2).

5.8 Ko-Expression mit dem antinozizeptiven Cannabinoidrezeptor 1

Der Cannabinoidrezeptor 1 (CB1) ist an der Vermittlung peripherer und / oder zentraler Antinozizeption beteiligt. Daher ist seine mögliche Expression in nozizeptiven Spinalganglienneuronen von besonderem Interesse. Da seine Expression im zentralen und peripheren Nervensystem jedoch sehr kontrovers diskutiert wird, sollten neben der Expression des Proteins auch die Expression der mRNA untersucht werden. Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurden an Aceton-fixierten Schnitten der Spinalganglien mit einem anti-CB1-Antikörper aus der Ziege (FITC-markiert, grün) und anti-TRPV1- bzw. anti-TRPV2-Kaninchenserum sowie anti-Kv1.4 mAK (Cy3-markiert, rot) durchgeführt. Da der anti-CB1-Antikörper aus der Ziege eine Inkubationszeit von bis zu 72 h benötigte, wurde immer zuerst diese Färbung entwickelt und die Spezifität des Antikörpers durch eine Präabsorptionskontrolle überprüft (3.6, 4.3.5.2, 4.3.5.4; Binzen *et al.*, 2006). Die *in situ*-Hybridisierung-Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurden an PFA-fixierten Schnitten der Spinalganglien durchgeführt. Aufgrund der Empfindlichkeit der mRNA wurde zunächst die *in situ*-Hybridisierung durchgeführt und nach der Entwicklung in Substratlösung die Antikörperfärbung angeschlossen. Die Hybridisierungstemperatur für die DIG-markierten CB1-sense- und CB1-antisense-Sonden betrug 44°C (3.10, 4.3.6).

Von insgesamt 8880 ausgewerteten Neuronen aus 7 Tieren fanden sich $36,4 \pm 0,5$ % CB1-positive Neurone in der Immunfluoreszenz mit einem mittleren Durchmesser von $19,5 \pm 0,7$ μm und von 3819 Neuronen aus 2 Tieren $57,1 \pm 2,5$ % CB1-mRNA-positive Neurone mit einem mittleren Durchmesser von $20,7 \pm 2,1$ μm . Die *in situ*-Hybridisierung detektierte somit einen größeren Anteil CB1-positiver Neurone als die Antikörperfärbung. Da die Größenverteilung aller Zellen jedoch gleich war konnte davon ausgegangen werden, dass die gleichen Zellpopulationen ausgezählt worden waren. Sowohl von den kleinen als auch den größeren Zellen waren CB1-mRNA-positive Zellen, in denen das Protein nicht nachweisbar war (Abb. 32, Abb. 33, Abb. 34 im Vergleich zu Abb. 29, Abb. 30, Abb. 31; Tab. 9 in 9.2).

5.8.1 CB1 mit TRPV1 und TRPV2

Das Expressionsmuster dieser Doppelfärbungen erinnerte sehr an die Doppelfärbungen von TRPV1 und TRPV2 mit Kv1.4 (**Abb. 27, Abb. 28**). Für die Ko-Expressionsuntersuchung von CB1 mit TRPV1 ergab die Analyse von 2717 Neuronen aus vier Tieren, dass die Mehrheit der TRPV1-positiven Neurone auch CB1 exprimierten ($85,0 \pm 3,3 \%$) und die meisten der CB1-positiven auch TRPV1 ($69,4 \pm 6,5 \%$). Dies entsprach $24,4 \pm 2,7 \%$ aller Neurone. Die mittleren Durchmesser der CB1- und TRPV1-positiven Neurone unterschieden sich nicht signifikant voneinander (**Abb. 29, Tab. 8 in 9.2**).

Für die Ko-Expressionsuntersuchung von CB1 mit TRPV2 ergab die Analyse von 2597 Neuronen aus vier Tieren, dass nur 6 von 2597 Zellen ein Ko-Expression von TRPV2 mit CB1 zeigten, ein Prozentsatz, der nicht signifikant von 0 % verschieden war ($p = 0,2$; Studentischer T-Test, gepaart). Dies entsprach $6,2 \pm 3,9 \%$ der TRPV2-positiven aber nur $0,6 \pm 0,4 \%$ der CB1-positiven Zellen. Die mittleren Durchmesser der CB1- und TRPV1-positiven Neurone unterschieden sich signifikant voneinander ($P < 0,001$) (**Abb. 30, Tab. 8 in 9.2**).

Somit zeigten die Doppelfärbungen von CB1 und Kv1.4 mit TRPV1 und TRPV2 ein sehr ähnliches Färbemuster und die hohen Ko-Expressionen von CB1 und Kv1.4 mit TRPV1 in den kleinen Spinalganglienneuronen liessen auf eine hohe Ko-Expression von Kv1.4 und CB1 schliessen.

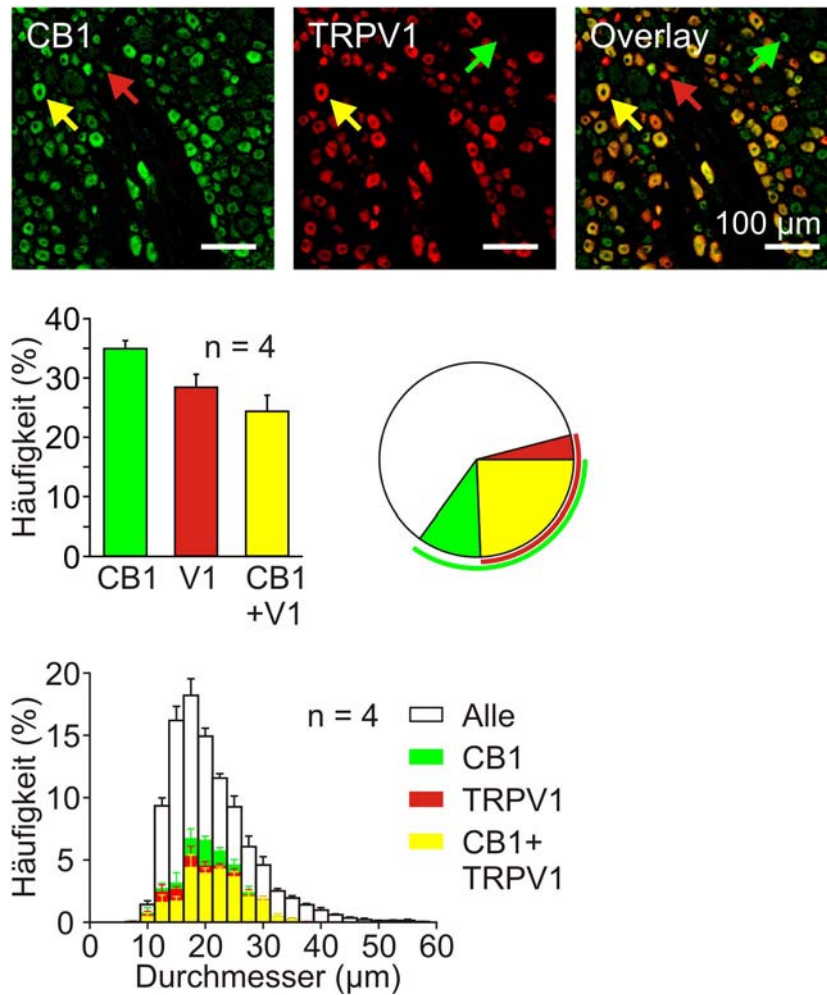


Abb. 29: Ko-Expression von TRPV1 und CB1 in Spinalganglien der Ratte

Repräsentative Beispiele von Schnitten (obere Reihe), Histogrammen (mittlere Reihe) sowie Größenverteilung der Häufigkeit (untere Reihe), die das Maß der Überlappung der positiven Zellen anzeigen. Grün: CB1; rot: TRPV1; gelb: Ko-Expression. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, die nur einen Marker (rot, grün) oder beide Marker (gelb) zeigen. Größenmaßstab: 100 µm; "n" entspricht der Anzahl der verwendeten Tiere.

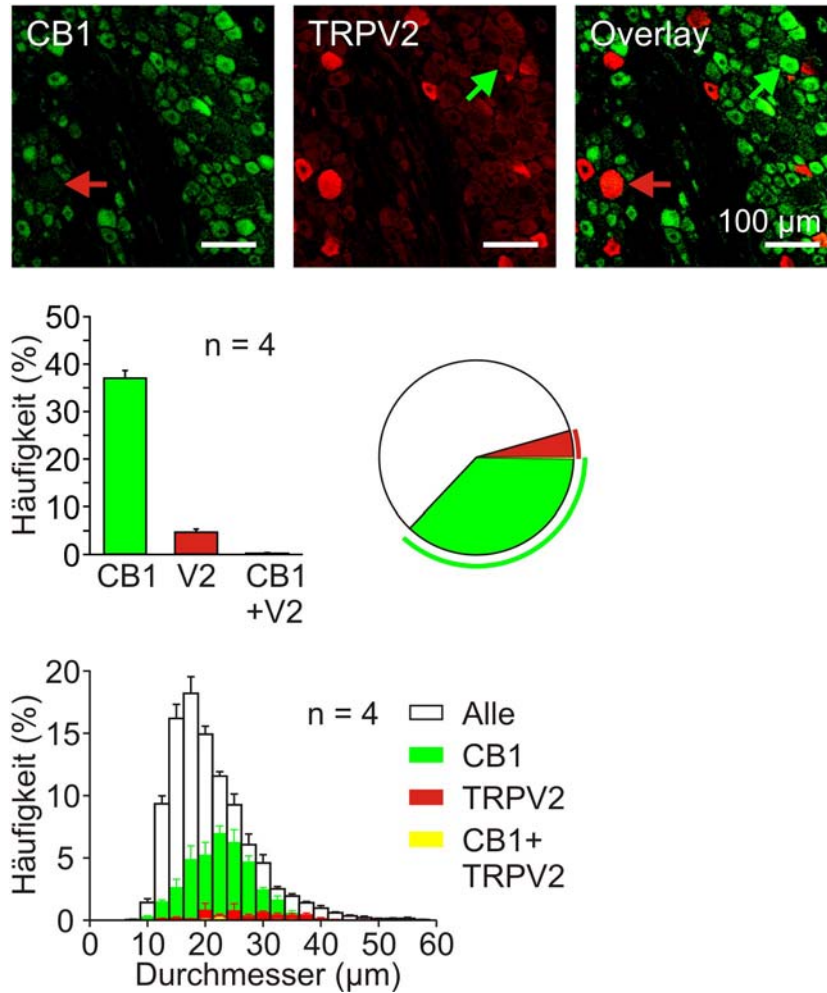


Abb. 30: Ko-Expression von TRPV2 und CB1 in Spinalganglien der Ratte.

Repräsentative Beispiele von Schnitten (obere Reihe), Histogrammen (mittlere Reihe) sowie Größenverteilung der Häufigkeit (untere Reihe), die das Maß der Überlappung der positiven Zellen anzeigen. Grün: CB1; rot: TRPV2; gelb: Ko-Expression. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, die nur einen Marker (rot, grün) zeigen. Größenmaßstab: 100 μm; “n” entspricht der Anzahl der verwendeten Tiere.

5.8.2 CB1 mit Kv1.4

Wie vermutet exprimiert die Mehrzahl der Kv1.4-positiven Neurone CB1 ($93,1 \pm 0,1 \%$) und die Mehrzahl der CB1-positiven Neurone Kv1.4 ($90,2 \pm 0,6 \%$). Dies entsprach $33,9 \pm 0,4 \%$ aller Neurone (Abb. 31, Tab. 8 in 9.2).

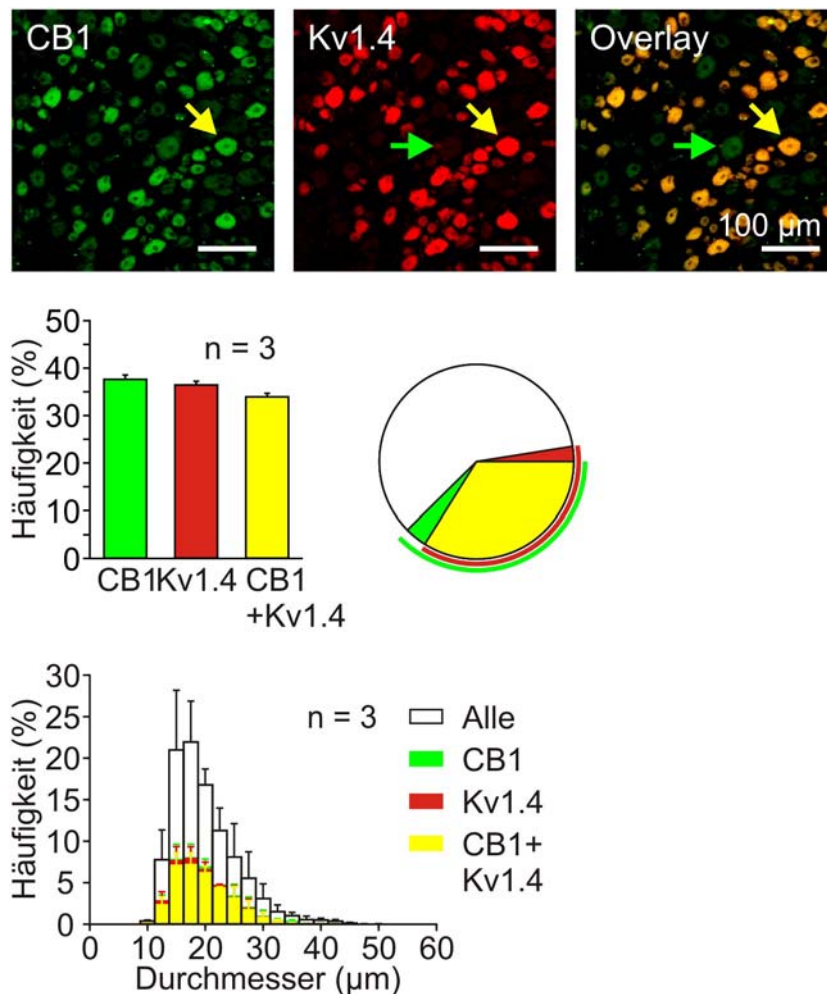


Abb. 31: Ko-Expression von Kv1.4 und CB1 in Spinalganglien der Ratte.

Repräsentative Beispiele von Schnitten (obere Reihe), Histogrammen (mittlere Reihe) sowie Größenverteilung der Häufigkeit (untere Reihe), die das Maß der Überlappung der positiven Zellen anzeigen. Grün: CB1; rot: Kv1.4; gelb: Ko-Expression. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, die nur einen Marker (rot, grün) oder beide Marker (gelb) zeigen. Größenmaßstab: 100 µm; “n” entspricht der Anzahl der verwendeten Tiere.

Somit konnte eine Ko-Expression von TRPV1, CB1 und Kv1.4 in einer Subpopulation der Spinalganglienneurone nachgewiesen werden.

5.8.3 CB1-mRNA mit TRPV1, TRPV2 und Kv1.4

Wie in der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung (Abb. 29) exprimierten ca. vier Fünftel aller TRPV1-positiven Zellen ($78,8 \pm 8,6\%$) in der *in situ*-Hybridisierung-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung die CB1-mRNA, entsprechend $24,4 \pm 0,2\%$ aller Neurone. Da der Anteil an CB1-mRNA-positiven Zellen aber insgesamt größer war, zeigten nur $43,5 \pm 1,5\%$ der CB1-mRNA-positiven Zellen eine positive Reaktivität für TRPV1. Die mittleren Durchmesser der CB1- und TRPV1-positiven Neurone unterschieden sich auch hier nicht signifikant voneinander (Abb. 32, Tab. 8 in 9.2).

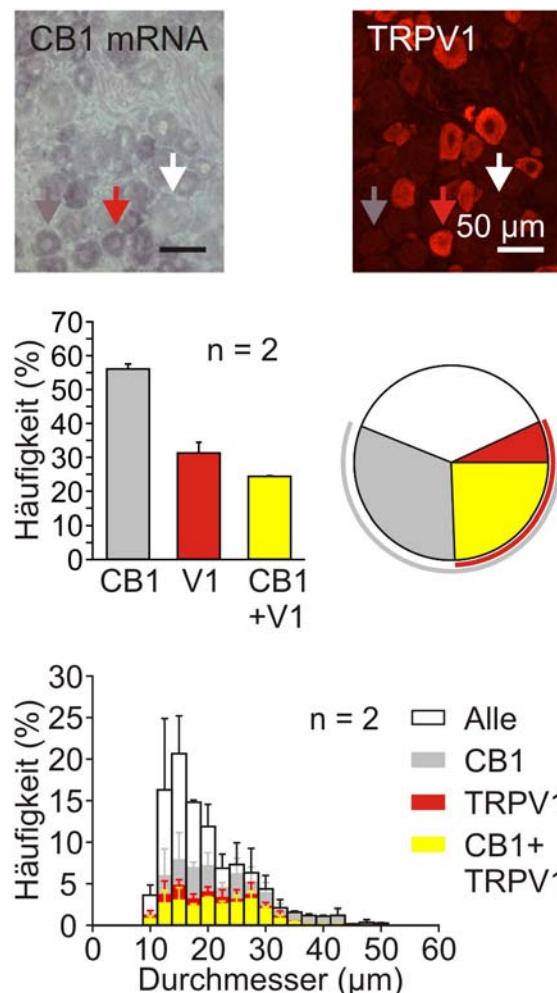


Abb. 32: Ko-Expression von TRPV1 und CB1-mRNA in Spinalganglien der Ratte.

Repräsentative Beispiele von Schnitten (obere Reihe), Histogrammen (mittlere Reihe) sowie Größenverteilung der Häufigkeit (untere Reihe), die das Maß der Überlappung der positiven Zellen anzeigen. Grau: CB1; rot: TRPV1; gelb: Ko-Expression. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, die nur einen Marker (lila), beide Marker (rot) oder keinen Marker (weiß) zeigen. Größenmaßstab: 50 µm; "n" entspricht der Anzahl der verwendeten Tiere.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen auf Proteinebene (**Abb. 30**) ko-exprimierten $82,4 \pm 17,7\%$ der TRPV2-positiven Neurone CB1-mRNA. Dies entsprach $4,0 \pm 0,4\%$ der CB1-mRNA-positiven und somit $2,2 \pm 0,3\%$ aller Zellen. Diese doppelt gefärbte Population an Zellen hatte einen größeren Durchmesser ($32,2 \pm 2,6\ \mu\text{m}$) (**Abb. 33, Tab. 8 in 9.2**).

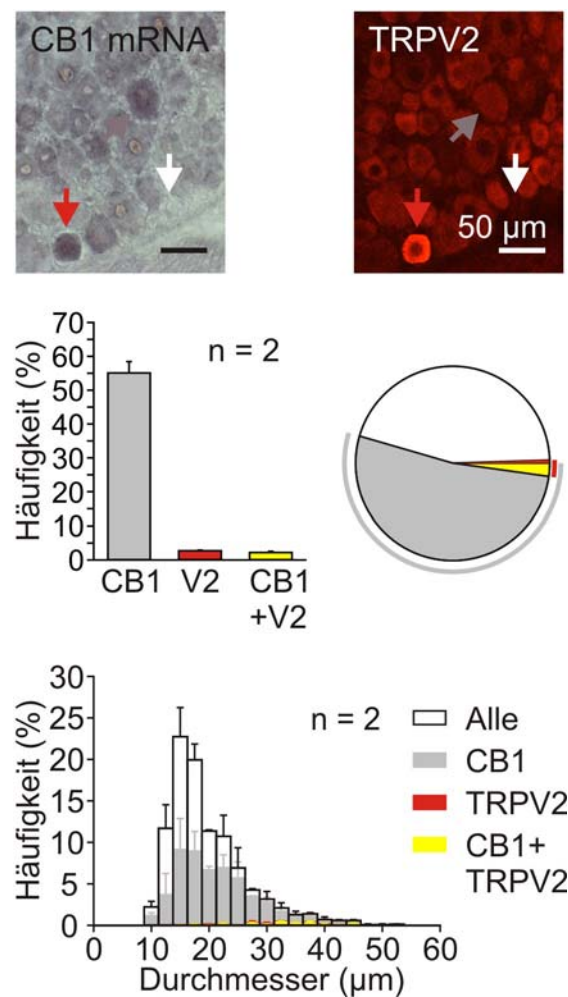


Abb. 33: Ko-Expression von TRPV2 und CB1-mRNA in Spinalganglien der Ratte.

Repräsentative Beispiele von Schnitten (obere Reihe), Histogrammen (mittlere Reihe) sowie Größenverteilung der Häufigkeit (untere Reihe), die das Maß der Überlappung der positiven Zellen anzeigen. Grau: CB1; rot: TRPV2; gelb: Ko-Expression. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, die nur einen Marker (lila), beide Marker (rot) oder keinen Marker (weiß) zeigen. Größenmaßstab: $50\ \mu\text{m}$; “n” entspricht der Anzahl der verwendeten Tiere.

Ebenso wie bei TRPV1 exprimierten die gleiche Anzahl Kv1.4-positiver Zellen CB1-mRNA wie auch Protein ($92,0\%$ CB1-mRNA und $\sim 93\%$ Protein). Dies entsprach $46,7\%$ der CB1-mRNA-positiven Zellen (**Abb. 31, Abb. 34, Tab. 8 in 9.2**).

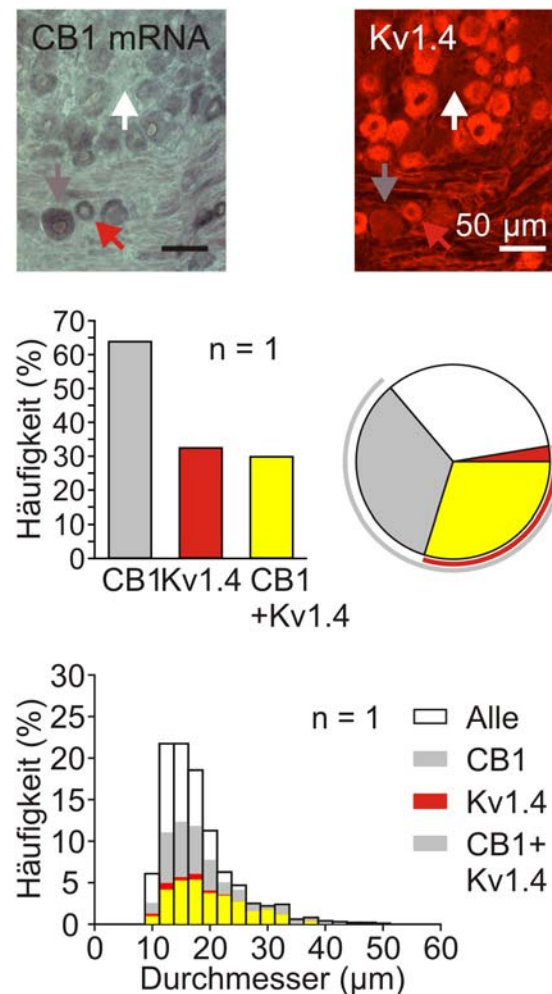


Abb. 34: Ko-Expression von CB1-mRNA und Kv1.4 in Spinalganglien der Ratte.

Repräsentative Beispiele von Schnitten (obere Reihe), Histogrammen (mittlere Reihe) sowie Größenverteilung der Häufigkeit (untere Reihe), die das Maß der Überlappung der positiven Zellen anzeigen. Grau: CB1; rot: Kv1.4; gelb: Ko-Expression. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen, die nur einen Marker (lila), beide Marker (rot) oder keinen Marker (weiß) zeigen. Größenmaßstab: 50 µm; "n" entspricht der Anzahl der verwendeten Tiere.

Die Ergebnisse auf mRNA-Ebene bestätigten die Ergebnisse auf Protein-Ebene mit einer hohen Ko-Expression von TRPV1 und CB1 sowie Kv1.4 und CB1. Die Population von CB1-mRNA-TRPV2-positiven Neuronen mit einem größeren Durchmesser schien das CB1-Protein nicht zu exprimieren.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der pronozizeptiv wirksamen Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2, des antinozizeptiv wirksamen Cannabinoidrezeptors CB1 sowie des möglicherweise an der Antinozizeption beteiligten spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.4 in den Spinalganglienneuronen der Ratte nachgewiesen. Die hier erstmalig beschriebene Ko-Expression von TRPV1 mit CB1 und Kv1.4 in einer Untergruppe der Neurone weist dabei darauf hin, dass diese drei Membranproteine bei der nozizeptiven / antinozizeptiven Signalverarbeitung zusammenwirken. Für TRPV2 dagegen fand sich weder die Ko-Expression mit CB1 noch mit Kv1.4.

Ebenso wurde in dieser Arbeit erstmalig die Ko-Expression der beiden Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2 in einer weiteren Untergruppe der Neurone beschrieben. Inzwischen haben andere Arbeitsgruppen diese Ko-Expression bestätigt und ihr in den Spinalganglienneuronen eine funktionelle Bedeutung bei der Sensibilisierung durch wiederholte starke Hitzereize zugeordnet.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben Volllänge-TRPV1 verschiedene Splice-Varianten in den Spinalganglienneuronen exprimiert werden. Eine bislang noch nicht in der Literatur beschriebene und daher neue C-terminale Splice-Variante, als Vr.3'sv bezeichnet, wurde isoliert und charakterisiert. Sie ist ebenso wie Volllänge-TRPV1 durch Capsaicin aktivierbar. Ihr kommt möglicherweise wie auch den anderen bereits für TRPV1 beschriebenen Splice-Varianten aus der Ratte (Vr.5'sv und TRPV1var) ebenfalls eine Bedeutung bei der Modulierung der TRPV1-Aktivität zu.

Für Capsaicin, ein Agonist am TRPV1 mit neurotoxischen Eigenschaften, wurde nachgewiesen, dass nur ein Teil aber nicht alle TRPV1-positiven sowie Capsaicin-sensitiven Zellen absterben. Funktionelle Analysen zeigten in den überlebenden Capsaicin-sensitiven Zellen trotz anhaltender Inkubation mit Capsaicin keine Daueraktivierung, sondern einen transienten Kalziumeinstrom. Somit reagieren nicht alle Capsaicin-sensitiven Neurone in der gleichen Art und Weise auf die Applikation des Agonisten. Es wäre denkbar, dass dieses Verhalten mit der Expression / Ko-Expression verschiedener Splice-Varianten zusammenhängt.

A. Die pronozizeptiven Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2

Die Empfindung "Schmerz" wird ausgelöst, wenn die peripheren Terminalien der nozizeptiven Neurone durch schmerzhafte Reize erregt werden. Um die verschiedenen noxischen Reize von thermischer, mechanischer und chemischer Art in eine neuronale Erregung umzuwandeln sind an den Terminalien eine Vielzahl von Membranproteinen exprimiert (Treede *et al.*, 2007 und 2001; Scholz und Woolf, 2002; Julius und Basbaum, 2001). Der polymodale Rezeptor TRPV1 aus der Familie der transienten Rezeptor-Potenzial-(TRP) Kanäle wird durch verschiedene schmerzauslösende Reize wie Capsaicin, Ethanol, Protonen oder noxische Hitze um 43°C aktiviert und es kommt zu einem depolarisierenden Einwärtsstrom (Tominaga *et al.*, 1998; Caterina *et al.*, 1997). TRPV1 ist somit an der Nozizeption beteiligt, d.h. der Aufnahme und Weiterleitung noxischer Reize, und wird daher als pronozizeptiv bezeichnet. Studien an TRPV1-knock-out-Tieren bestätigen die Beteiligung dieses Rezeptors am Schmerzempfinden auf Capsaicin und Protonen. Für Hitzereize ist er jedoch nicht der einzig exprimierte Transduktionskanal (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000).

TRPV1 ist zudem in Entzündungsprozesse involviert. Beim Asthma bronchiale beispielsweise wird TRPV1 durch Feinstäube aktiviert und bei Blasenentzündungen durch den endogenen Liganden Anandamid (Agopyan *et al.*, 2004; Dinis *et al.*, 2004). Studien an TRPV1-knock-out Tieren zeigen, dass bei diesen Tieren die entzündungsbedingte Hypersensitivität gegen Hitzereize reduziert ist (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). Die bei Entzündungen freigesetzten Mediatoren aus neuronalen und nicht-neuronalen Zellen bewirken eine Sensibilisierung des Rezeptors und folglich eine Herabsetzung der Hitzeschwelle. Die Körpertemperatur kann somit zum noxischen Reiz werden und den während einer Entzündung entstehenden Schmerz erklären (Greffrath *et al.*, 2006). Eine gesteigerte Schmerzempfindung kann auch dadurch entstehen, dass im Verlauf von Erkrankungen die Expression von TRPV1 gesteigert wird (Brustschmerzen nach mammachirurgischen Eingriffen: Gopinath *et al.*, 2005; Chronischer Husten: Groneberg *et al.*, 2004; Morbus Hirschsprung: Facer *et al.*, 2001; Morbus Crohn: Yiangou *et al.*, 2001a; neuropathische Erkrankungen: Facer *et al.*, 2007; Lauria *et al.*, 2006; Nervenverletzungen: Hudson *et al.*, 2001).

Der strukturell ähnliche Vanilloidrezeptor TRPV2 wird ebenfalls in den Spinalganglien exprimiert und wie auch TRPV1 von noxischen Hitzereizen aktiviert. Seine Aktivierungsschwelle liegt jedoch deutlich über der von TRPV1 bei 52°C (Caterina *et al.*, 1999) und er ist somit für die Nozizeption der stärkeren Hitzereize verantwortlich. Da es auch bei TRPV2 zu einer gesteigerten Expression kommen kann, spricht dies für die Beteiligung dieses Rezeptors am neuropathischen Schmerz nach Nervenverletzungen (Frederick *et al.*, 2007) sowie an der Hitzehyperalgesie gegen starke Hitzereize im Verlauf von Entzündungen nach der chemischen Desensibilisierung von TRPV1 (Shimosato *et al.*, 2005).

6.1 TRPV1 und TRPV2 im 1. Neuron der nozizeptiven Bahn

In der vorliegenden Arbeit wurde TRPV1 in je einem Drittel und TRPV2 in je einem Zehntel aller Spinalganglienneurone nachgewiesen (**Tab. 9** in **9.2**). Die zentralen und peripheren Terminalien sind aufgrund ihrer geringen Größe nur schwer zugänglich, so dass die Expression der Rezeptoren in den Somata der Neurone untersucht wurde. Diese dienen als *in vitro*-Modell für ihre zentralen und peripheren Endigungen, da sie alle Proteine produzieren, die in den Terminalien benötigt werden. Der Vergleich mit der Literatur zeigt zwar, dass die für TRPV1 und TRPV2 gefundenen Häufigkeiten etwas unter den bisher veröffentlichten Daten liegen, dabei dürfen aber die methodischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen nicht außer Acht gelassen werden. So kommen unterschiedliche Antikörper und RNA-Sonden zum Einsatz, die sich sowohl in Spezifität als auch Qualität voneinander unterscheiden. Desweiteren gibt es subjektive Bewertungskriterien für die Positivität einer gefärbten Zelle. Auch kann sich die Expression der Vanilloidrezeptoren unter bestimmten Bedingungen verändern. So gibt es für TRPV1 in Neuronen, die verschiedene Organe innervieren, unterschiedliche Häufigkeiten (Funakoshi *et al.*, 2006; Aoki *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2005) ebenso wie entwicklungsabhängige Expressionsunterschiede (Hjerling-Leffler *et al.*, 2007; Funakoshi *et al.*, 2006; Tamura *et al.*, 2005). Neurotrophische Faktoren, wie sie bei einer Entzündung entstehen, führen ebenfalls zu einer Veränderung der TRPV1-Expression (Amaya *et al.*, 2004 und 2003). Diese neurotrophischen Faktoren werden bei Langzeit-Zellkulturen verwendet um ihren Effekt auf die Expression bestimmter Rezeptoren zu untersuchen oder gelten als *in vitro*-Modell für eine Entzündung (Endres-Becker *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2006; Elitt *et al.*, 2006; Ahluwalia *et al.*, 2002a). Zusätzlich beeinflussen Erkrankungen und entzündliche Prozesse die Expression von TRPV1 und TRPV2 (Facer *et*

al., 2007; Frederick *et al.*, 2007; Lauria *et al.*, 2006; Gopinath *et al.*, 2005; Shimosato *et al.*, 2005; Groneberg *et al.*, 2004; Facer *et al.*, 2001; Hudson *et al.*, 2001; Yiangou *et al.*, 2001a). In anderen Arbeitsgruppen wurde TRPV1 bislang beim Proteinnachweis in 40 % bis 50 % (Kim *et al.*, 2006; Tamura *et al.*, 2005; Ahluwalia *et al.*, 2002a und 2000; Caterina *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1999) und beim mRNA-Nachweis in 35 % bis 47 % der Spinalganglienneurone gefunden (Kobayashi *et al.*, 2005a und 2005b; Ugawa *et al.*, 2005; Michael und Priestly, 1999). Im trigeminalen Ganglion, dem sensiblen Ganglion für Gesicht und Kopf, fanden sich 46 % TRPV1-positive Zellen (Tanimoto *et al.*, 2005). TRPV2 ist in 15-23 % aller Spinalganglienneurone (Shimosato *et al.*, 2005; Tamura *et al.*, 2005; Ahluwalia *et al.*, 2002b; Caterina *et al.*, 1999) und in 14 % der trigeminalen Neurone (Ichikawa und Sugimoto, 2000) exprimiert.

Neben den beschriebenen Faktoren, die die Expression der Vanilloidrezeptoren beeinflussen, wäre es denkbar, dass die verschiedenen Arten, die Spinalganglienneurone für die weiteren experimentellen Untersuchungen aufzuarbeiten, sich auf die Expression auswirken können. Zur Aufklärung der an der Nozizeption beteiligten Mechanismen in diesen Neuronen werden sowohl Expressionsanalysen als auch funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Für die Expressionsanalysen von Membranproteinen können Schnitte von gefrorenem oder perfundiertem Gewebe (Elitt *et al.*, 2006; Lauria *et al.*, 2006; Malin *et al.*, 2006; Greffrath *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2001 und 1999; Rasband *et al.*, 2001; Caterina *et al.*, 1999 und 1997; Tominaga *et al.*, 1998) aber auch kultivierte Zellen (Anand *et al.*, 2006; Ahluwalia *et al.*, 2002a, 2002b und 2000) verwendet werden. Funktionelle Untersuchungen in der Elektrophysiologie oder im Kalzium-Imaging werden an kultivierten Zellen durchgeführt (Endres-Becker *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2006; Elitt *et al.*, 2006; Malin *et al.*, 2006; Ohta *et al.*, 2006; Ahluwalia *et al.*, 2002b; Lyfenko *et al.*, 2002; Greffrath *et al.*, 2001; Savidge *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2000; Szöke *et al.*, 2000; Kirschstein *et al.*, 1997; Bleakman *et al.*, 1990). Die Ganglien müssen entweder als Ganzes präpariert und geschnitten oder für das Anlegen einer Zellkultur die einzelnen Zellen isoliert werden. Die Schnitte repräsentieren dabei den Zustand *in situ*, da sich während dieser schnell ablaufenden Präparation die Expression der Proteine nicht verändert. Beim Vereinzeln (Dissoziation) aber sind die Neurone verdauenden Enzymen sowie starker mechanischer Belastung ausgesetzt. Diese Bearbeitungen könnten sich auf die Expression der Rezeptoren auswirken. Zusätzlich werden zu Beginn beider Präparationen die Fortsätze von den Zellen abgeschnitten. Dies kann ein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen Schnittpräparat und Zellkultur bedeuten, da

Proteine, die *in vivo* sehr effektiv in die Terminalien transportiert werden im Schnittpräparat im Soma der Zellen nicht nachweisbar sind. In den kultivierten Zellen dagegen werden sie im Soma neu synthetisiert, um dann nach wenigen Tagen in die neu ausgebildeten Fortsätze transportiert zu werden. Die Proteine sind dann mittels Antikörperfärbung im Soma nachweisbar. Den Kulturen müssen wiederum neurotrophische Faktoren zugesetzt werden, um die Expression bestimmter Membranproteine zu gewährleisten. Bei Ahluwalia *et al.* (2002a) zeigt sich beispielsweise, dass Wachstumsfaktoren bei der Langzeitkultur wichtig sind, um die Expression von TRPV1 aufrecht zu erhalten. Dies führt dazu, dass sich bei verschiedenen Kulturbedingungen unterschiedliche Häufigkeiten ergeben.

In verschiedenen Teilen dieser Arbeit wurde einerseits mit Schnittenpräparaten und andererseits mit Zellkulturen von Spinalganglienneuronen gearbeitet. Um die gewonnenen Ergebnisse vergleichen und zueinander in Beziehung setzen zu können, müssen die Veränderungen auf die Expression bekannt sein, die sich durch die Präparationen bzw. die Kultivierungsbedingungen ergeben. Der direkte Vergleich der Expressionshäufigkeiten von TRPV1 und TRPV2 im Schnittpräparat zu den Zellen in Kultur zeigte nun, dass es bei den hier verwendeten Kulturbedingungen keine Unterschiede zwischen den beiden Präparationsmethoden gab (**Abb. 7, Tab. 3**). Da es sich um adulte, gesunde Ratten handelte, waren auch weder entwicklungsabhängige noch krankheitsbedingte Einflüsse auf die Expression von Bedeutung. Es wurden jeweils die Ganglien aus allen Segmenten präpariert und für die immunochemischen Nachweise eingesetzt. Die Ergebnisse spiegeln somit die mittlere Häufigkeit der Rezeptoren über die verschiedenen Segmente der Wirbelsäule wieder (**Abb. 7, Tab. 3, Tab. 9**). Es unterschieden sich lediglich die gemessenen mittleren Durchmesser der Zellen voneinander, wobei er in den Schnitten signifikant kleiner war als in den akut dissoziierten Zellen (**Tab. 3**). Dies erklärt sich dadurch, dass bei den akut dissoziierten Zellen immer der maximale Durchmesser gemessen werden kann während die Zellen in den Schnitten nicht immer in ihrem maximalen Durchmesser angeschnitten sind (Coggeshall, 1992).

Da es sich bei den hier verwendeten akut dissoziierten Zellen um Kurzzeitkulturen von maximal 16 h ohne den Einfluss des Wachstumsfaktors NGF handelte (**4.3.1.2**), hatte der Vorgang der Präparation keine Auswirkung auf die Expression der Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2. Die aus beiden Methoden gewonnenen Ergebnisse können daher miteinander verglichen und zueinander in Beziehung gesetzt werden.

6.2 TRPV1 ist mit TRPV2 ko-exprimiert

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Ko-Expression von TRPV1 mit TRPV2 in einer kleinen Subpopulation der Spinalganglienneurone nachgewiesen werden. Obwohl TRPV1 hauptsächlich in den kleinen und TRPV2 in den größeren Neuronen exprimiert wird, überlappen sich dennoch die beiden Größenverteilungen. Anhand der Daten zeigte sich, dass der mittlere Durchmesser dieser Population ko-exprimierender Zellen nun genau in diesem überlappenden Bereich lag. Zudem lag er zwischen den mittleren Durchmessern der einzelnen TRPV1- bzw. TRPV2-positiven Populationen (**Abb. 7**, **Abb. 25**, **Tab. 3**; Greffrath *et al.*, 2003; Ma 2002 und 2001; Caterina *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1999). TRPV1 und TRPV2 sind sowohl auf A δ - als auch auf C-Faser-Neuronen nachgewiesen worden (Ma, 2002 und 2001), so dass eine Ko-Expression der beiden Rezeptoren in Spinalganglienneuronen wahrscheinlich war. Auch wenn sowohl vor als auch nach dieser Arbeit in der Literatur die Meinung vertreten wurde, dass keine TRPV1-TRPV2-ko-exprimierenden Neurone existieren (Ahluwalia *et al.*, 2002b: Untersuchung einer 48 h-Kultur; Lewinter *et al.*, 2004: Schnitte) so wies der hohe Anteil TRPV2-positiver Neurone, die auch TRPV1 exprimieren (20 %) auf eine funktionelle Bedeutung dieser Population von Neuronen hin. Die hier gefundene Ko-Expression wurde zusätzlich durch die Verwendung weiterer TRPV1- / TRPV2-spezifischer Antikörper bestätigt (**Abb. 26**). Inzwischen konnte die Existenz dieser Ko-Expression in den Spinalganglienneuronen und im Gehirn auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Rau *et al.*, 2007; Liapi und Wood, 2005; Rutter *et al.*, 2005). In den Neuronen war dabei, analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die absolute Häufigkeit der ko-exprimierenden Zellen gering, im Gehirn dagegen war sie stärker ausgeprägt. Dabei können die beiden Rezeptoren als zwei funktionelle Kanäle nebeneinander oder in Form eines Heterotetramers vorkommen. Sowohl im heterologen Expressionssystem als auch in den Spinalganglien liegt eine TRPV1-TRPV2-Heterotetramerbildung vor (Hellwig *et al.*, 2005; Rutter *et al.*, 2005).

Eine solche Heterotetramerbildung kann zu veränderten funktionellen Eigenschaften führen, wie bereits am Beispiel von TRPV1 und TRPV3 gezeigt wurde. Dort führt die Ko-Expression zu einer Zunahme der Sensitivität von TRPV1 gegenüber Capsaicin und Protonen (Smith *et al.*, 2002). Durch Heterotetramerbildung wird daher die Diversität von Ionenkanälen innerhalb der TRP-Familie und die Möglichkeit auf viele verschiedene noxische Reize zu reagieren erhöht. Erste Untersuchungen im heterologen Expressionssystem mit TRPV1-TRPV2-ko-exprimierenden Zellen zeigten allerdings einen bimodalen hitzeinduzierten Strom,

der aus der nacheinander erfolgenden Aktivierung von TRPV1 und TRPV2 resultierte und keine veränderten physiologischen Eigenschaften der Zellen vermuten liess (Caterina *et al.*, 1999). Eine aktuelle Arbeit (Rau *et al.*, 2007) mit genau klassifizierten Spinalganglienneuronen identifizierte jetzt aber TRPV1-TRPV2-ko-exprimierende Neurone mit besonderen funktionellen Eigenschaften. Diese Zellen waren Capsaicin-sensitiv und hatten im Vergleich zu heterolog-exprimiertem TRPV1 vergleichbare Hitzeschwellen. Es konnte aber nicht der von Caterina *et al.* (1999) postulierte bimodale Verlauf des hitzeinduzierten Stroms gesehen werden, sondern dort nahm der Strom vielmehr mit zunehmender Temperatur stetig zu. Die Expression von TRPV2 in TRPV1-positiven Zellen bewirkte vor allem, dass diese Zellen eine Sensibilisierung durch wiederholte starke Hitzereize zeigten (HHS: heat-heat-sensitization). Dabei unterschieden sich die Neurone auch in dem innervierten Gewebe, da die ko-exprimierenden Neuronen zu den tieferliegenden Geweben und die TRPV1- oder TRPV2-positiven zur Haut führten. Da nach Nervenverletzungen die Expression von TRPV1 in den großen Somata der A-Faser-Neurone erhöht ist, die normalerweise TRPV2 exprimieren (Hudson *et al.*, 2001), kann die Ko-Expression und die damit verbundenen veränderten funktionellen Eigenschaften unter pathophysiologischen Bedingungen in den Spinalganglienneuronen von größerer Bedeutung sein als unter physiologischen Bedingungen.

6.3 Von TRPV1 existieren mehrere Splice-Varianten

Wie unter 6.1 beschrieben schwanken die Häufigkeiten für die Expression von TRPV1 zwischen verschiedenen Publikationen. Die genomische Struktur des TRPV1-Gens gibt Hinweise auf eine Vielzahl von möglichen Splice-Varianten (Xue *et al.*, 2001), so dass sich hier neben den bereits beschriebenen Faktoren wie Antikörperqualität, subjektive Kriterien bei der Bewertung, organspezifische, entwicklungsabhängige oder krankheitsbedingte Expressionsunterschiede, eine weitere Erklärungsmöglichkeit für diese unterschiedlichen Häufigkeiten ergibt. Dieser Erklärungsansatz wird durch die in dieser Arbeit erstmals beschriebene C-terminale Splice-Variante von TRPV1, auf deren Existenz es bislang in der Literatur noch keine Hinweise gibt, weiter gestärkt.

Diese neue C-terminale Variante wird in Anlehnung an die im 5'-Bereich veränderte Variante Vr.5'sv (Schumacher *et al.*, 2000) als Vr.3'sv bezeichnet. Sie besitzt im Vergleich zu der

publizierten Sequenz für den Rezeptor (**Acc.No. AF029310, 9.1**) zwischen Exon 15 und Exon 16 eine Insertion von 104 Basen, die aus dem Intronbereich zwischen Exon 15 und 16 stammen. Es kommt zu einer Verschiebung des Leserahmens und folglich entsteht ein verkürztes Protein mit 810 statt 838 Aminosäuren mit einem im Vergleich zu Volllänge-TRPV1 veränderten C-Terminus (**Abb. 21**). Die Insertion hat die typischen Splice-Erkennungsstellen (**gt** und **ag**, **Tab. 6**), so dass es zu einem alternativen Splicing kommen kann. Bei der Insertion von 104 Basen handelt es sich demnach um ein neues Exon (bezeichnet als 16a, **Tab. 6**; persönliche Mitteilung von Herrn Hschdz. Dr. Dirk Pravitt, Uniklinikum Mainz; Vazquez und Valverde, 2006; Xue *et al.*, 2001).

Tab. 6: Sequenzen der Splicestellen von TRPV1 und Vr.3'sv

Exon/Intron	Exon (bp)	Intron (kb)	Exon-Intron-Verbindung
TRPV1			
XV	116	4.654	CCGAG gt gaggt.....ctct cag TTTCA
XVI	423		
Vr.3'sv			
XV	116	3.447	CCGAG gt gaggt.....att ccag ACAGG
XVIa	104	1103	TAAAG gt gtgcc.....ctct cag TTTCA
XVI	423		

Die vollständige genomische Sequenz für TRPV1 (**Acc.No. NW 047336**) wurde 2006 in der Datenbank veröffentlicht. Erst dann war es möglich die Sequenz der Insertion zu identifizieren. Vr.3'sv wurde aus der Spinalganglien-mRNA der Ratte isoliert, so dass es sich um eine tatsächlich vorkommende bislang noch nicht beschriebene alternativ gesplizierte mRNA von TRPV1 und nicht um einen Artefakt handelt.

Bislang wurde für die Ratte die N-terminale Splice-Variante Vr.5'sv (Eilers *et al.*, 2007; Schumacher *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2001) sowie TRPV1var (Tian *et al.*, 2006) beschrieben. Vr.5'sv beginnt erst bei Nukleotid 588 der Originalsequenz von TRPV1 und enthält zusätzlich im verbleibenden N-Terminus eine spezifische Sequenz sowie eine Deletion. TRPV1var dagegen besteht lediglich aus 253 Aminosäuren. Diese setzen sich aus den ersten 248

Aminosäuren von TRPV1-Volllänge gefolgt von fünf neuen Aminosäuren zusammen. Die fünf neuen Aminosäuren entstehen durch eine Insertion von 101 Basen zwischen Exon 5 und 6, die auch bei Vr.5'sv vorkommt und zu einem Abbruch der Transkription führen. Neben den Spinalganglien konnte die mRNA von TRPV1var auch in der Niere nachgewiesen werden. Durch die Expression dieser verschiedenen Varianten mit veränderten C- und N-terminalen Bereichen erklären sich die unterschiedlichen Häufigkeiten, die sich je nach verwendetem Antikörper bzw. RNA-Sonde ergeben. Während Volllänge-TRPV1 sowohl von N- als auch C-terminalen Antikörpern detektierbar ist, kann Vr.5'sv nur von einem C-terminalen und TRPV1var sowie Vr.3'sv nur von einem N-terminalen Antikörper nachgewiesen werden. Allein durch die Antikörperfärbung ist es jedoch nicht möglich das genaue Expressionsmuster der verschiedenen Varianten von TRPV1 in den einzelnen Zellen der Spinalganglien zu bestimmen. So können Zellen, die von beiden Antikörpern angefärbt werden entweder Volllänge-TRPV1 mit einem intakten N- und C-Terminus alleine und / oder N- und C-terminale Splice-Varianten nebeneinander exprimieren.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten TRPV1-spezifischen monoklonalen Antikörper gegen den N-Terminus des Rezeptors (**5.3.3, Abb. 15, Abb. 16**) im Vergleich zum C-terminalen Antikörper zeigten sich nun die Expressionsunterschiede der intakten C- und N-terminalen Bereiche und somit Expressionsunterschiede der Splice-Varianten. Da der monoklonale Antikörper 50 % der Neurone als TRPV1-positiv identifizierte (**Abb. 17, Tab. 5**), wurde in signifikant mehr Neuronen ein intakter N-Terminus als ein intakter C-Terminus exprimiert. Die **Tabelle 7** zeigt den Vergleich der Daten in der Literatur bei N- versus C-terminaler Detektion. Der hohe Anteil TRPV1-positiver Neurone, die mit dem N-terminalen Antikörper detektiert werden lässt auf eine hohe Expression der Varianten mit intaktem N-Terminus und somit eine große funktionelle Bedeutung schliessen.

Es gibt nur wenige Arbeiten, die den direkten Vergleich zwischen N- und C-terminaler Detektion genauer betrachten (Woodbury *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 1999). Dabei finden sich in beiden Studien keine Unterschiede in der Expressionshäufigkeit. Der hier entwickelte N-terminale Antikörper detektiert genauso viele Neurone als TRPV1-positiv wie diese beiden Studien. Im Vergleich mit anderen Arbeiten scheint dort jedoch die C-terminale Expression überschätzt zu sein. Es wäre auch denkbar, dass sich wie bei Volllänge-TRPV1 die Expression der Splice-Varianten unter verschiedenen Bedingungen verändern kann.

Die Ergebnisse der mRNA-Sonden (**Tab. 7**) können mit denen der Proteinexpression nicht direkt verglichen werden, da sie keine Unterteilung zwischen N- und C-terminaler Expression zulassen. Sie binden an große Bereiche des Rezeptors, wodurch sie alle Volllänge-TRPV1 detektieren. Die Bindung an die Splice-Varianten lässt sich dabei nur schwer beurteilen. Die Sonde von Kobayashi *et al.* (2005a und b) bindet noch an TRPV1var, nicht jedoch an Vr.5'sv. Bei Michael und Priestly, 1999 sowie Ugawa *et al.*, 2005 überlappen sie immer nur teilweise, so dass ein Nachweis ungewiss ist.

Tab. 7: Häufigkeit TRPV1-positiver Spinalganglienneurone

Nachweis des Proteins

Antikörperspezifität	Häufigkeit	Publikation
C-terminal	30 %	Binzen <i>et al.</i> , 2006
	32 %	vorliegende Arbeit
	36-39 %	Greffrath <i>et al.</i> , 2003
	40 %	Caterina <i>et al.</i> , 1997
	42 %	Ahluwalia <i>et al.</i> , 2000
	50 %	Guo <i>et al.</i> , 1999
N-terminal	40 %	Kim <i>et al.</i> , 2006
	50 %	Guo <i>et al.</i> , 1999
	50 %	vorliegende Arbeit

Nachweis der mRNA

Lage der Sonde	Häufigkeit	Publikation
60-682	35-40 %	Ugawa <i>et al.</i> , 2005
149-505	42-47 %	Kobayashi <i>et al.</i> , 2005a und b
509-2634	47 %	Michael und Priestly, 1999

Die Doppelfärbung der beiden hier verwendeten anti-TRPV1-Antikörper zeigte desweiteren, dass nahezu alle Zellen, die mit dem C-terminalen Kaninchenserum detektiert wurden auch

von dem N-terminalen mAK 3C11 nachgewiesen werden konnten (87 % der positiven Zellen für das C-terminale Serum, **5.3.3.3, Abb. 16**), so dass lediglich eine kleine Population dieser positiven Neurone (13 %) nur einen intakten C- aber keinen N-Terminus exprimiert. Nach dem bisherigen Kenntnisstand über die Existenz von TRPV1-Splice-Varianten kann es sich dabei demnach nur um die N-terminale Variante Vr.5'sv (Schumacher *et al.*, 2000) handeln. Da signifikant mehr Zellen mit dem N-terminalen mAK angefärbt wurden, konnten nur 60 % dieser positiven Zellen auch von dem C-terminalen Serum nachgewiesen werden (**5.3.3.3**). Die übrigen 40 % exprimierten nur einen intakten N- aber keinen C-Terminus und können demnach die hier neu beschriebene C-terminale Variante Vr.3'sv und / oder TRPV1var (Tian *et al.*, 2006) exprimieren. Es bleibt jedoch zu beachten, dass möglicherweise noch weitere Splice-Varianten von TRPV1 existieren, wie sie auch im humanen und murinen Gewebe gefunden wurden (Naeini *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004). Daher muss bei der Untersuchung der Expression dieses Rezeptors auf die Spezifität der verwendeten Antikörper bzw. RNA-Sonden geachtet werden. Dies ist insbesondere im Vergleich zu funktionellen Untersuchungen von großer Bedeutung, da die Splice-Varianten funktionelle Unterschiede aufweisen (**6.4, 6.5.2**).

Im Gegensatz zu TRPV1 zeigte bei TRPV2 die Doppelfärbung des N-terminalen mAK E1E3 mit dem C-terminalen Kaninchenserum eine vollständige Übereinstimmung der Färbemuster beider Antikörper (**5.3.3.3, Abb. 16**). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass in allen Zellen der vollständige Rezeptor mit intakten N- und C-terminalen Bereichen exprimiert wird und keine Splice-Varianten existieren. Auch gibt es bislang in der Literatur keinen Hinweis darauf, dass solche Varianten existieren könnten.

6.4 Die C-terminale Splice-Variante Vr.3'sv ist Capsaicin-sensitiv

Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Splice-Varianten von TRPV1 aus der Ratte wird in dieser Studie gezeigt, dass die neue Variante Vr.3'sv im heterologen Expressionssystem trotz des veränderten C-Terminus immer noch durch Capsaicin aktivierbar ist und diese Aktivierbarkeit durch Capsazepin blockiert werden kann (s. Volllänge-TRPV1; Caterina *et al.*, 1999; **Abb. 23, Abb. 24**). Demnach stellt diese neue Variante ebenso wie Volllänge-TRPV1 einen pronozizeptiven Membrankanal dar. Vr.5'sv dagegen ist im heterologen Expressionssystem insensitiv für Capsaicin, noxische Hitzereize, Protonen sowie

Resiniferatoxin und bildet daher einen nicht-funktionellen Kanal. Ko-exprimiert mit TRPV1 kann Vr.5'sv aber dessen Aktivierung durch diese Reize blockieren (Eilers *et al.*, 2007; Schumacher *et al.*, 2000). Antikörperfärbungen zeigen, dass sich die Proteine ko-lokalisiert in der Plasmamembran finden (Eilers *et al.*, 2007). Ob es sich dabei aber um die Ko-Expression zweier Kanäle oder eine Heterotetramerbildung handelt ist bislang noch nicht untersucht und somit der genaue Mechanismus der Blockierung noch ungeklärt. Bei TRPV1var dagegen fehlen die Transmembrandomänen, so dass dieses Protein nicht an der Zelloberfläche exprimiert und im Gegensatz zu Vr.5'sv keinen Kanal bilden kann. In Assoziation an TRPV1 moduliert TRPV1var aber dessen Aktivierung (Tian *et al.*, 2006). Die humane Variante TRPV1b (Vos *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2005) und die murine Variante TRPV1 β (Wang *et al.*, 2004) weisen beide Veränderungen im Exon 7 auf. Bei TRPV1b fehlt Exon 7 vollständig und bei TRPV1 β 10 Aminosäuren davon. TRPV1b kann noch auf Hitzreize reagieren (Lu *et al.*, 2005), TRPV1 β bildet aber keinen funktionellen Kanal, beide Proteine können aber mit TRPV1 Heterotetramere bilden, die vergleichsweise instabil sind. Es wird folglich weniger Protein an der Zelloberfläche exprimiert, was einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit TRPV1-positiver Zellen hat. Es wäre denkbar, dass Vr.3'sv veränderte funktionelle Eigenschaften besitzt, indem andere Agonisten-Konzentrationen für die Aktivierung notwendig sind oder die Sensitivität für Hitze oder Protonen verändert ist. Es wäre auch möglich, dass beispielsweise durch Heterotetramerbildung die Aktivierung von TRPV1 beeinflusst wird. Dies wurde bisher noch nicht untersucht.

Mögliche funktionelle Unterschiede von Vr.3'sv können sich aus dem veränderten C-Terminus im Vergleich zu Volllänge-TRPV1 ergeben, der durch die Insertion von 104 Basen entstanden ist (**Abb. 21**). Für die funktionellen Eigenschaften von TRPV1 sind sowohl der N- als auch der C-Terminus von Bedeutung. Die Capsaicinbindestelle liegt intrazellulär zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne oder auch ein Fehlen des N-Terminus wie bei der Splice-Variante Vr.5'sv führt zur Insensitivität gegenüber Capsaicin (Hellwig *et al.*, 2005; Ferrier-Montiel *et al.*, 2004; Jordt und Julius, 2002; Jung *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 2000). Mit der Konstruktion von Deletionsklonen konnte aber gezeigt werden, dass erst eine Deletion des C-Terminus von mehr als 73 Aminosäuren zu einer Veränderung der Sensitivität gegenüber Capsaicin oder Protonen führt (Hellwig *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004a; Vlachova *et al.*, 2003). Vr.3'sv ist im Vergleich zu TRPV1 lediglich um 28 Aminosäuren verkürzt und die Aktivierbarkeit durch Capsaicin konnte hier im heterologen Expressionssystem nachgewiesen werden (**Abb. 23**, **Abb. 24**). Durch die Insertion der Basen und die folgende

Leserasterverschiebung (**Abb. 21**) bilden sich von AS 782 an 29 neue Aminosäuren, so dass die letzten 56 Aminosäuren von Volllänge-TRPV1 so in Vr.3'sv nicht vorhanden sind. Dem neuen C-Terminus fehlt dadurch bis auf wenige Aminosäuren die Phosphatitylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2)-Bindedomäne. Diese ist für die Regulierung des Rezeptors von großer Bedeutung, da die Bindung von PIP2 an diese Domäne zur Inhibierung des Rezeptors führt (Prescott und Julius, 2003). Vr.3'sv kann daher vermutlich nicht über PIP2 reguliert werden. Im C-Terminus findet sich bei den AS 684-721 die für die Tetramerisierung wichtige TRP-Domäne (Hellwig *et al.*, 2005; Garcia-Sanz *et al.*, 2004). Da die TRP-Domäne in Vr.3'sv noch enthalten ist, können sich funktionelle Kanäle bilden, wie die Expression im heterologen Expressionssystem gezeigt hat.

Der C-Terminus ist auch für die Sensitivität gegenüber Hitzereizen von Bedeutung (Brauchi *et al.*, 2006; Prescott und Julius, 2003; Vlachova *et al.*, 2003). Die Verkürzung des C-Terminus um 31 und 42 Aminosäuren hat eine Reduktion der Hitzeschwelle um 3 bzw. 9°C zur Folge. Da hiervon die PIP2-Binde-Domäne nicht betroffen ist scheinen Konformationsänderungen dafür verantwortlich zu sein (Vlachova *et al.*, 2003). Aber auch das Fehlen der PIP2-Domäne hat einen großen Effekt auf die Sensitivität gegenüber Hitzereizen. Prescott und Julius (2003) konnten nachweisen, dass das Fehlen der Aminosäuren 777 bis 792, die die PIP2-Domäne enthalten, eine Absenkung der Hitzeschwelle bewirkt. Je mehr Aminosäuren darüber hinaus entfernt werden (777-820), umso stärker sinkt die Schwelle ab. TRPV3 beispielsweise, dem im Vergleich zu TRPV1 die PIP2-Domäne fehlt, wird von Temperaturen um die 35°C aktiviert (Peier *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002). Da Vr.3'sv ebenfalls keine PIP2-Bindedomäne besitzt, könnte die Sensitivität gegen Hitzereize verändert sein. Die transfizierten Zellen wurden jedoch bei 34°C im Brutschrank kultiviert. Die Schwelle kann somit nicht allzu weit abgesenkt sein, da sich ansonsten unter diesen Kulturbedingungen eine anhaltende Aktivierung hätte zeigen müssen.

Im Vergleich zu Volllänge-TRPV1 bildet Vr.3'sv zwar einen veränderten aber lediglich um 28 Aminosäuren verkürzten C-Terminus mit 29 neuen Aminosäuren aus. Die Funktion dieses neuen C-terminalen Endes ist bislang unklar. Es könnte für veränderte funktionelle Eigenschaften verantwortlich sein. Ebenso könnte Vr.3'sv ko-exprimiert / assoziiert mit TRPV1 die funktionellen Eigenschaften von TRPV1 modulieren, wie es für andere Splice-Varianten gezeigt wurde (Eilers *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004).

6.5 Capsaicin degeneriert nicht alle TRPV1-positiven Neurone

TRPV1 wird durch Capsaicin, den scharfen Inhaltsstoff der Chilischote, aktiviert und es kommt zu einem Einstrom von extrazellulärem Kalzium in die Zelle (Liu *et al.*, 2004b; Eun *et al.*, 2001; Greffrath *et al.*, 2001; Savidge *et al.*, 2001; Dedov und Roufogalis, 2000 und 1998; Caterina *et al.*, 1997; Bleakman *et al.*, 1990). Zusätzlich kann über TRPV1 Kalzium aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden (Liu *et al.*, 2003; Eun *et al.*, 2001). Dabei besitzt dieses Vanilloid eine zytotoxische Wirkung und führt zur Degeneration von Neuronen und anderer TRPV1-exprimierender Zellen u.a. Mikroglia oder Bronchialgewebe (Amantini *et al.*, 2007 und 2004; Lo *et al.*, 2005; Reilly *et al.*, 2005 und 2003; Shin *et al.*, 2003; Szöke *et al.*, 2002; Creppy *et al.*, 2000; Richeux *et al.*, 2000 und 1999; Caterina *et al.*, 1997; Cochereau *et al.*, 1997; Holzer *et al.*, 1991). Der Kalziumeinstrom nach Aktivierung von TRPV1 führt zu einer Ansammlung von Kalzium in den Mitochondrien der Neurone und bei anhaltender Applikation von Capsaicin zur Apoptose durch die Zerstörung des mitochondrialen Membranpotenzials. Das apoptotische Absterben der Zellen ist gekennzeichnet durch DNA-Fragmentation, TUNEL-Anfärbung und ein Schrumpfen des Nukleus in einer Caspase-abhängigen Art (Shin *et al.*, 2003; Dedov *et al.*, 2001; Dedov und Roufogalis, 2000; Duchon, 2000; Reed und Green, 2000; Kruman und Mattson, 1999; Green und Reed, 1999). Zusätzlich wird die Proteinsynthese inhibiert (Han *et al.*, 2007; Creppy *et al.*, 2000; Cochereau *et al.*, 1997) und die Cytokinproduktion getriggert (Reilly *et al.*, 2005). Neben der Wirkung über TRPV1 (Caterina *et al.*, 1997) kann Capsaicin als lipophile Substanz auch in die Zellen diffundieren (Creppy *et al.*, 2000), so dass Capsaicin auch TRPV1-unabhängige Effekte bewirken kann.

Beim Auftragen auf die Haut erregt Capsaicin die in der Haut liegenden nozizeptiven Nervenfasern, die beim Einwirken von niedrig-dosiertem Capsaicin über einen langen oder hoch-dosiertem Capsaicin über einen kurzen Zeitraum im Folgenden nicht mehr auf Capsaicin sowie weitere schädliche und unschädliche Reize reagieren können (Desensibilisierung; Malmberg *et al.*, 2004; Magerl *et al.*, 2001; Nolano *et al.*, 1999; Cholewinski *et al.*, 1993; Simone und Ochoa, 1991; Bjerring und Arendt-Nielsen, 1989; Szolcsanyi *et al.*, 1988). Dabei kommt es zu einer Reduktion der Sensitivität vor allem gegenüber Hitzereizen sowie einer Zunahme der Latenz (Malmberg *et al.*, 2004; Magerl *et al.*, 2001; Nolano *et al.*, 1999), nicht jedoch zu einem vollständigen Sensitivitätsverlust. Zeitgleich findet sich eine starke, z.T. vollständige, Reduktion der immunhistochemischen Marker für die peripheren

Nervenendigungen (Malmberg *et al.*, 2004; Khalili *et al.*, 2001; Nolano *et al.*, 1999). Die Degeneration der epidermalen Nervenfasern ist jedoch reversibel (Hahn *et al.*, 2007; Khalili *et al.*, 2001; Nolano *et al.*, 1999; Schicho *et al.*, 1999; Simone *et al.*, 1998; Donnerer *et al.*, 1996), vor allem unter dem Einfluss von NGF (Schicho *et al.*, 1999; Donnerer *et al.*, 1996).

6.5.1 Degeneration TRPV1-positiver Neurone

Die durch das Vanilloid hervorgerufene Desensibilisierung bzw. Degeneration der epidermalen Nervenfasern dient als Model einer selektiven Schädigung bzw. Ausschalten TRPV1-positiver Fasern, um einerseits deren Funktion und andererseits deren Reinnervierungseigenschaften zu bestimmen (Hahn *et al.*, 2007; Malmberg *et al.*, 2004; Magerl *et al.*, 2001; Schicho *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wird nun gezeigt, dass unter unseren *in vitro*-Bedingungen die Zellen für mehr als 10 min mit Capsaicin behandelt werden müssen, um eine signifikante Abnahme TRPV1-positiver Neurone zu bewirken (**Abb. 8, Tab. 4**). Dabei zeigten sich keine Unterschiede, ob das Neurotoxin für 6 h oder für 16 h auf den Zellen inkubiert wurde. Es kam nie zu einem Absterben aller TRPV1-positiver Neurone, da auch nach 16 h noch ein Viertel der positiven Neurone vorhanden waren. Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt zwar, dass *in vivo* durch das Auftragen von Capsaicincreme eine vollständige Reduktion der epidermalen Nervenfasern (ENFs) zu beobachten ist (Khalili *et al.*, 2001), meist findet sich aber nur eine Abnahme zwischen 60 und 80 % (Malmberg *et al.*, 2004; Nolano *et al.*, 1999). Dies wird dadurch bestätigt, dass zwar eine reduzierte aber dennoch nachweisbare Sensitivität gegenüber mechanischen und thermischen Reizen übrig bleibt (Malmberg *et al.*, 2004; Magerl *et al.*, 2001; Nolano *et al.*, 1999). Die noch verbleibende Hitzesensitivität wird möglicherweise über den TRPV2 vermittelt, da er Capsaicin-insensitiv ist und die ihn exprimierenden Fasern nach Capsaicininkubation übrig bleiben. Die verwendeten Konzentrationen von Capsaicin und die Inkubationszeiten sind nicht einheitlich und so können die Ergebnisse nur bedingt miteinander verglichen werden. Zudem ist der Nachweis der Fasern *in vivo* sehr schwierig, was ebenfalls die weite Streuung der Ergebnisse erklärt. Mit der hier verwendeten Konzentration von Capsaicin (10 μ M) und einer Inkubationszeit von mehr als sechs Stunden entspricht der Verlust von 75 % der TRPV1-positiven Zellen dem Verlust der ENFs (Malmberg *et al.*, 2004; Nolano *et al.*, 1999). Da die Färbung von TRPV1 und die Auswertung in der Zellkultur deutlich weniger fehleranfällig ist als bei den Hautfärbungen, ergibt sich aus dieser Studie der eindeutige

Nachweis, dass durch die langanhaltende Inkubation mit Capsaicin nicht alle TRPV1-positiven Neurone ausgeschaltet werden.

Bedingt durch das Absterben TRPV1-positiver Neurone verringert sich die Gesamtzellpopulation. Die Zunahme TRPV2-positiver Neurone um 50 % ist daher nur relativ (**Abb. 8, Tab. 4**), da sich die (unveränderte) Anzahl der TRPV2-positiven Neurone auf eine geringere Gesamtzellzahl bezieht. Die Einwirkung von Capsaicin führt bei TRPV2 demnach nicht zu einer Hochregulierung des Rezeptors, wie es bei Entzündungsreaktionen oder Nervenverletzungen vorkommt (Frederick *et al.*, 2007; Shimosato *et al.*, 2005). Da in dieser Arbeit TRPV1-TRPV2-ko-exprimierende Neurone nachgewiesen wurden (**Abb. 25**) und eine andere Arbeitsgruppe diese als Capsaicin-sensitiv klassifizierten (Rau *et al.*, 2007), könnte es durch die Inkubation mit Capsaicin auch zu einem Absterben dieser ko-exprimierenden Neurone kommen. Dies würde dann zu einer Reduktion der TRPV2-positiven Neurone führen. Die relative Zunahme der TRPV2-positiven Zellen weist aber darauf hin, dass dies nicht der Fall ist, so dass die Ko-Expression mit TRPV2 möglicherweise einen Einfluss auf die Degeneration der Neurone hat. Diesen ko-exprimierenden Zellen konnte bislang bereits eine Bedeutung bei der Sensibilisierung gegen Hitze nachgewiesen werden (Rau *et al.*, 2007). Über eine veränderte Reaktivität gegenüber Capsaicin gibt es jedoch noch keine Studien.

Obwohl sich mit den gegen die verschiedenen Bereiche von TRPV1 gerichteten Antikörpern unterschiedliche Häufigkeiten für TRPV1 fanden (**Tab. 7**), war das Maß, in dem TRPV1-positive Zellen überlebten (jeweils 25 %), unabhängig von der Expression der verschiedenen TRPV1-Formen (**Abb. 17, Tab. 5**). Es müssen jeweils Mechanismen in der Zelle vorhanden sein, die ein Absterben der Zellen verhindern. Eine Erklärungsmöglichkeit stellt dabei die Splice-Variante Vr.5'sv dar (Schumacher *et al.*, 2000). Die hier gewonnenen Daten sprechen dafür, dass sie in 13 % der C-terminal detektierbaren Zellen alleine exprimiert wird (**6.3**) und dementsprechend die Zellen zwar TRPV1-positiv sind, aufgrund ihrer Insensitivität gegenüber Capsaicin aber von der Wirkung der Substanz nicht beeinflusst werden. Da aber nur 13 % der Neurone diese Variante alleine exprimieren im Vergleich dazu aber 25 % überleben, kann nicht die alleinige Expression der Capsaicin-insensitiven Splice-Variante Vr.5'sv in den Neuronen für das Überleben der Zellen verantwortlich sein. Die Ko-Expression verschiedener Splice-Varianten von TRPV1 mit dem funktionellen Rezeptor moduliert seine Aktivierung (**6.5.2**; Eilers *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2006), so dass es denkbar wäre, dass diese Ko-Expression die Zellen vor der schädigenden Wirkung des Neurotoxins

schützen kann. Auch muß es für das Verbleiben der TRPV1-positiven Zellen, die mit dem N-terminalen Antikörper angefärbt werden, eine andere Erklärung als die alleinige Expression von Vr.5'sv geben, da der N-terminale Antikörper nicht an diese Variante binden kann. Die hier beschriebene neue Variante Vr.3'sv könnte ebenfalls in der Ko-Expression mit TRPV1 eine schützende Wirkung ausüben. Um die Wirkung von Capsaicin auf die Zellen weiter zu untersuchen, wurde die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration unter dem Einfluß des Vanilloids näher betrachtet.

6.5.2 Funktionelle Charakterisierung der Capsaicinwirkung bei Langzeitapplikation

In den Experimenten zur Untersuchung der funktionellen Wirkung von Capsaicin auf die Spinalganglienneurone sind hier mit 70 % deutlich mehr Zellen Capsaicin-sensitiv als bei den Expressionsuntersuchungen Zellen TRPV1-positiv sind (33-50 %, **5.4.2, Tab. 5, Tab. 9**). Diese Angabe deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten (Liu *et al.*, 2006; Ohta *et al.*, 2006; Greffrath *et al.*, 2001). Die Unterschiede lassen sich zum einen damit erklären, dass eine geringe Proteinmenge zwar für die Funktionalität der Zellen ausreicht, nicht jedoch für einen Nachweis mittels Antikörperfärbung. Zum anderen unterliegt der Proteinnachweis einer subjektiven Bewertung, so dass die Detektionsschwellen zwischen verschiedenen Betrachtern unterschiedlich sind. Die Tatsache, dass nicht alle TRPV1-positiven Neurone durch die Capsaicininkubation absterben, spiegelt sich in der Art und Weise wieder, wie sich Capsaicin-sensitive Zellen bei langanhaltender Inkubation von Capsaicin verhalten. Die irreversibel positiven Neurone (60 %) sterben durch einen stetigen Kalziumeinstrom ab, während die reversibel positiven Neurone (40 %) nur einen transienten Kalziumeinstrom zeigen (**Abb. 18, Abb. 19**). Somit ist hier der funktionelle Nachweis erbracht, dass Capsaicin nicht in allen sensitiven Neuronen eine Degeneration bewirkt. Dies entspricht der Reduktion der epidermalen Nervenfasern von 60-75% und erklärt die verbleibenden Sensitivitäten aus den *in vivo*-Experimenten. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass in den vorliegenden Experimenten ein Teil dieser Zellen am Ende noch funktionell aktivierbar waren. Auch in einer Kultur, die ü.N. mit Capsaicin behandelt worden war, fand sich noch eine funktionelle Capsaicin-sensitive Zelle (**5.4.2**).

Bei den funktionellen Untersuchungen scheinen im Vergleich zur Proteinexpression mehr Neurone die Wirkung von Capsaicin zu überleben (40 versus 25%). Dies hängt jedoch wieder mit der Tatsache zusammen, dass sich funktionell mehr Zellen nachweisen lassen als durch Antikörperfärbung. Zudem war die Inkubationsdauer von Capsaicin bei den Untersuchungen zum Proteinnachweis länger als bei den funktionellen Experimenten, so dass es noch zu weiteren TRPV1-abhängigen oder –unabhängigen Effekten des Capsaicins kommen kann.

Die Arbeit von Han *et al.* (2007) mit TRPV1 im heterologen Expressionssystem zeigt für alle Zellen bei langanhaltender Inkubation mit Capsaicin den gleichen Verlauf wie die irreversibel positiven Spinalganglienneurone. Dies lässt vermuten, dass die alleinige Expression von Volllänge-TRPV1 zu einer Degeneration der Zellen führt. Die Ko-Expression von TRPV1 mit Vr.5'sv bewirkt jedoch eine dosis-abhängigen Inhibierung der Aktivierung von TRPV1 im heterologen Expressionssystem (Eilers *et al.*, 2007). Dies wäre eine Erklärung dafür, dass die Population der reversibel positiven Zellen im Mittel eine signifikant schwächere Aktivierung durch Capsaicin zeigt als die irreversibel positiven (**Abb. 18**, **Abb. 19**). Die Expression dieser Splice-Variante bzw. die Ko-Expression mit TRPV1 konnte bislang auf Einzelzellebene in den Spinalganglienneuronen noch nicht gezeigt werden. Da bei Eilers *et al.* (2007) Capsaicin jeweils nur für eine kurze Zeit gegeben wurde, kann noch keine Aussage darüber getroffen werden, welchen Einfluss die Splice-Variante bei langanhaltender Inkubation mit Capsaicin zeigt. Sie bewirkt möglicherweise nicht nur eine Abnahme der Aktivierung sondern verhindert auch einen stetigen Kalziumeinstrom. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass Vr.5'sv in den Ganglien deutlich weniger stark exprimiert wird als TRPV1 (Sanchez *et al.*, 2001) und sie ihre blockierende Wirkung entweder nur in einem kleinen Teil der Zellen oder in mehreren Zellen in geringem Maß ausüben kann. Auch TRPV1var könnte für das Überleben der Zellen verantwortlich sein. Hier stellt sich die Sache jedoch nicht so einfach dar wie für Vr.5'sv, da diese Variante je nach zellulärem Kontext TRPV1 sowohl positiv als auch negativ modulieren kann. In transfizierten HEK-293-Zellen führt die Ko-Expression zu einer Verstärkung der Antwort auf Resiniferatoxin (RTX) und in einem Teil der Zellen auch zu einer Abnahme der Schwellenkonzentration für RTX. In Cos-7-Zellen dagegen, einem epithelialen Zellmodell, resultiert die Ko-expression in einer Blockierung der TRPV1-Aktivierung (Tian *et al.*, 2006). Ihre genaue Funktionsweise und Bedeutung in den Spinalganglien ist jedoch bislang ungeklärt. Sie könnte aber an dem Überleben der TRPV1-positiven Zellen beteiligt sein. Da auch Splice-Varianten als negative Modulatoren im menschlichen und murinen Gewebe nachgewiesen wurden (Vos *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2005;

Wang *et al.*, 2004), kommt eventuell auch der hier charakterisierten bislang unentdeckten Splice-Variante Vr.3'sv eine vergleichbare Funktion zu. Da sie jedoch Capsaicin-sensitiv ist könnte sie eher aufgrund möglicher veränderter funktioneller Eigenschaften durch das neue C-terminale Ende (Hellwig *et al.*, 2005; Vlachova *et al.*, 2003) zwar durch Capsaicin aktiviert werden, aber nur einen transienten Kalziumeinstrom bewirken und dadurch das Absterben der Zellen verhindern. Möglicherweise spielt hier die Dephosphorylierung von TRPV1 eine Rolle, da über das Verhältnis von Phosphorylierung und Dephosphorylierung scheinbar der Aktivierungszustand von TRPV1 reguliert wird (Jung *et al.*, 2004; Docherty *et al.*, 1996).

B. Antinozizeptiv wirksame Membranproteine

Neben pronozizeptiven Membranproteinen wie TRPV1 oder TRPV2, die noxische Reize detektieren, wird in den Spinalganglienneuronen auch der metabotrope Cannabinoidrezeptor 1 (CB1) exprimiert (Amaya *et al.*, 2006; Ahluwalia *et al.*, 2002a und 2000; Khasabova *et al.*, 2002; Bridges *et al.*, 2003; Sanudo-Pena *et al.*, 1999). Dieser vermittelt Effekte, die der Nozizeption entgegenwirken, wie Experimente mit CB1-Agonisten und –Antagonisten zeigen, die zentral und / oder peripher verabreicht wurden (Agarwal *et al.*, 2007; Amaya *et al.*, 2006; Khodayar *et al.*, 2006; Johanek und Simone, 2004; Bridges *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2001; Hohmann *et al.*, 1998). In Zellkulturen konnte die Wirkung der Cannabinoide auf den Kalziumeinstrom nachgewiesen werden (Oshita *et al.*, 2005; Khasabova *et al.*, 2002; Millns *et al.*, 2001). Desweiteren bestätigen Untersuchungen an CB1-knock-out-Tieren die Beteiligung von CB1 an der Antinozizeption (Agarwal *et al.*, 2007; Massa *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 1999).

Metabotrope Rezeptoren können G-Protein-vermittelt auch auf Ionenkanäle wirken und diese entweder direkt oder indirekt regulieren (Yost, 1999). Ein solcher Ionenkanal, dessen Expression in den Spinalganglien bereits nachgewiesen wurde, ist der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.4. Er ist durch seine funktionellen Eigenschaften sehr interessant, da er einen schnell inaktivierenden auswärts gleichrichtenden A-Typ Kaliumstrom vermittelt und somit die Dauer und Frequenz der Aktionspotenziale und die Membranrepolarisierung reguliert (Rasband *et al.*, 2001; Yost, 1999; Pongs, 1999 und 1992; Cooper *et al.*, 1998; Safronov *et al.*, 1996; Stühmer *et al.*, 1989). Er kann somit, sofern mit CB1 und den Vanilloidrezeptoren ko-exprimiert, an der Antinozizeption beteiligt sein.

6.6 TRPV1-Neurone ko-exprimieren den Cannabinoidrezeptor CB1

In der vorliegenden Arbeit wurde das CB1-Protein in 36 % aller Neurone und die mRNA in 57 % aller Neurone detektiert (Binzen *et al.*, 2006). Dabei haben die CB1-Protein-positiven Zellen einen kleinen mittleren Durchmesser, wohingegen beim Nachweis der mRNA neben zusätzlichen kleineren Neuronen vor allem eine Population größerer Neurone gefunden wurde (**5.8, Tab. 9**; Binzen *et al.*, 2006). Die zusätzlichen mRNA-positiven Zellen scheinen die mRNA nicht zu translatieren. Es ermöglicht ihnen aber eventuell unter bestimmten Bedingungen in kurzer Zeit das Protein hochzuregulieren. Die Hochregulierung von CB1 ist bereits sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene im Thalamus, Rückenmark und den Spinalganglien gezeigt worden (Wang *et al.*, 2007; Amaya *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2003; Siegling *et al.*, 2001). Es wäre auch denkbar, dass in den mRNA-positiven Zellen das Protein sehr effizient zu den peripheren und / oder zentralen Terminalien transportiert (Ständer *et al.*, 2005; Hohmann *et al.*, 1999; Hohmann und Herkenham, 1999b) und somit aus dem Soma entfernt wird.

In anderen Arbeitsgruppen wurde die Expression von CB1-Protein und -mRNA in den Spinalganglienneuronen zwar schon gezeigt, die gefundenen Häufigkeiten schwanken jedoch sehr stark. So exprimieren in Schnitten 25 bis 100 % der Zellen das Protein (Bridges *et al.*, 2003; Sanudo-Pena *et al.*, 1999) und in Kultur 47 bis 57 % (Ahluwalia *et al.*, 2002a und 2000), die mRNA findet sich in 25 % der Neurone (Amaya *et al.*, 2006; Bridges *et al.*, 2003). Wie auch bei TRPV1 können hier methodische Unterschiede der Nachweise bei den unterschiedlichen Häufigkeiten eine Rolle spielen. Die Färbung des CB1-Rezeptors auf Proteinebene gestaltet sich zudem schwierig, da lange Inkubationszeiten benötigt werden um eine nachweisbare Färbung zu erhalten.

Die in dieser Studie gefundenen Häufigkeiten für CB1 werden aber zusätzlich durch die Ko-Expression mit TRPV1 gestützt. Trotz der unterschiedlichen Häufigkeiten CB1-mRNA- und CB1-Protein-positiver Neurone, ko-exprimieren dennoch gleich viele TRPV1-positive Zellen CB1-Protein und -mRNA (80 bzw. 85 % mRNA versus Protein; **Abb. 29, Abb. 32, Tab. 8**; Binzen *et al.*, 2006). Dies bestätigt die Vermutung über ein funktionelles Zusammenwirken dieser Membranproteine (Agarwal *et al.*, 2007; Ahluwalia *et al.*, 2000). Die Literatur ist auch zur Ko-Expression von TRPV1 mit CB1 nicht einheitlich. Während es auf der einen Seite Arbeitsgruppen gibt bei denen nahezu alle TRPV1-positiven Neurone auch CB1 exprimieren

(Agarwal *et al.*, 2007; Ahluwalia *et al.*, 2000), was für ein funktionelles Zusammenspiel bei der nozizeptiven Signalverarbeitung spricht, so gibt es andere, die in lediglich 7-40 % der TRPV1-positiven Neurone auch CB1 nachweisen können (Amaya *et al.*, 2006; Bridges *et al.*, 2003).

6.7 Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.4 als Marker nozizeptiver Spinalganglienneurone

Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.4 wurde bislang ebenfalls in kleinen Spinalganglienneuronen gefunden (Vydyanathan *et al.*, 2005; Rasband *et al.*, 2001). Es gab jedoch bislang keinen Nachweis für die Ko-Expression mit TRPV1 und / oder CB1 und somit einer Beteiligung an der nozizeptiven Signalverarbeitung. Die Ko-Expression der Carboanhydrase mit TRPV1 einerseits und mit Kv1.4 andererseits im trigeminalen Ganglion liess die Ko-Expression dieser beiden Kanäle lediglich vermuten (Tanimoto *et al.*, 2005). Diese Studie hier zeigt jetzt, dass Kv1.4 sowohl mit TRPV1 als auch mit CB1 ko-exprimiert wird (**Abb. 27, Abb. 31, Abb. 34, Tab. 8**; Binzen *et al.*, 2006). Kv1.4 kann somit als geeigneter Marker für nozizeptive Neurone dienen. Ungefähr ein Viertel aller Spinalganglienneurone exprimieren diese drei Membranproteine was auf ein Zusammenspiel unter Beteiligung des Kv1.4 schliessen lässt. Kv1.4 wird als einzige der Kv1-Untereinheiten hauptsächlich in den kleinen Spinalganglienneuronen exprimiert ist und es wird von ihm angenommen, dass er für die C-Faser-Erregbarkeit verantwortlich ist (Rasband *et al.*, 2001; Yoshimura und de Groat, 1999). Kv1.4 vermittelt einen schnell inaktivierenden Kaliumstrom und es konnte gezeigt werden, dass Kv1.4-positive Neurone eine A-Strom-vermittelte Unterdrückung der Aktionspotenzialbildung zeigen (Vydyanathan *et al.*, 2005).

Für TRPV2 dagegen konnte weder eine Ko-Expression mit CB1-Protein noch mit Kv1.4 nachgewiesen werden (**Abb. 28, Abb. 30, Tab. 8**). Somit sind diese beiden antinozizeptiven Membranproteine nicht an der Modulierung der durch TRPV2-vermittelten Antworten beteiligt. Ein mögliches Zusammenspiel lässt lediglich die Ko-Expression mit der CB1-mRNA in den Terminalien vermuten, da der Großteil der TRPV2-positiven Zellen CB1-mRNA ko-exprimiert (**Abb. 33**), dort das Protein aber vermutlich sehr effektiv in die Terminalien transportiert wird. Möglicherweise kann CB1 aber auch während Entzündungen schnell hochreguliert werden um dann auch in diesen Zellen antinozizeptive Effekte zu

vermitteln. Der genaue funktionelle Zusammenhang bleibt jedoch unklar. Im Gegensatz zu den kleinen Neuronen wird in den größeren Spinalganglienneuronen die Kv1-Untereinheiten Kv1.1, Kv1.2 und Kv β 2.1 exprimiert, die einen langsam inaktivierenden D-("delayed rectifier") Typ Kaliumkanal ausbilden (Rasband *et al.*, 2001). Diese könnten an der TRPV2-vermittelten Signalweiterleitung beteiligt sein. Da TRPV2-positive Zellen kein CB1-Protein und Kv1.4 exprimieren, können auch in den TRPV1-TRPV2-ko-exprimierenden Zellen diese beiden Proteine nicht enthalten sein. Auch können sie keine CB1-mRNA enthalten, da TRPV1-positive Zellen genauso viel CB1-Protein wie mRNA exprimieren. In diesen Zellen existieren demnach keine CB1-vermittelten antinocizeptiven Signalwege.

In dieser Studie konnten die Membranproteine CB1, TRPV1 und Kv1.4 in den Somata der Spinalganglienneurone nachgewiesen werden. Da sie Terminalien in die Peripherie und nach zentral ausbilden, um die noxischen Reize zum Rückenmark weiterzuleiten, lässt die Expression der Proteine im Soma auf eine Expression in den zentralen und / oder peripheren Terminalien schließen. Sowohl die Expression von TRPV1 (Facer *et al.*, 2007; Elitt *et al.*, 2006; Lauria *et al.*, 2006; Malin *et al.*, 2006; Ständer *et al.*, 2004) als auch CB1 (Amaya *et al.*, 2006; Ständer *et al.*, 2005; Hohmann und Herkenham, 1999b) konnte in der Peripherie bereits nachgewiesen werden. Für die Expression von Kv1.4 in den peripheren Terminalien gibt es bislang noch keinerlei Anhaltspunkte.

TRPV1 findet sich im Rückenmark sowohl prä- als auch postsynaptisch in Lamina I und II (Sikand und Premkumar, 2007; Baccei *et al.*, 2003; Hwang und Valtschanoff, 2003; Guo *et al.*, 2001; Valtschanoff *et al.*, 2001; Tominaga *et al.*, 1998) und CB1 im Hinterhorn ebenfalls in Lamina II (Salio *et al.*, 2002). Die Angaben über die Terminalien der C-Fasern, die CB1 präsynaptisch exprimieren sind jedoch nicht einheitlich (0-50%; Farquhar-Smith *et al.*, 2000; Hohmann *et al.*, 1999; Hohmann und Herkenham, 1998). Die präsynaptische Lokalisation lässt sich aber von der Immunfärbung des CB1 in den Spinalganglien und im Lissauer Trakt herleiten (Salio *et al.*, 2002). Kv1.4 konnte zwar im Rückenmark der Ratte in Gliazellen nachgewiesen werden, jedoch bislang nicht in den Nervenendigungen (Edwards *et al.*, 2002). Obwohl Kv1.4 bislang weder in den peripheren noch den zentralen Terminalien der Spinalganglienneuron nachgewiesen werden konnte ist jedoch seine Expression dort durch sein Vorhandensein in den Somata der Neurone sehr wahrscheinlich, um die Schmerzweiterleitung von der Peripherie ins Gehirn zu modulieren.

Dementsprechend konnten neben TRPV1 (Cristino *et al.*, 2006; Liapi und Wood, 2005; Toth *et al.*, 2005) und CB1 (Cristino *et al.*, 2006; Kawamura *et al.*, 2006; Morozov und Freund, 2003; Egertova und Elphick, 2000; Pettit *et al.*, 1998; Tsou *et al.*, 1998) auch Kv1.4 (Trimmer und Rhodes, 2004; Cooper *et al.*, 1998) in verschiedenen Bereichen des Gehirns, u.a. dem Hippocampus, von Ratte und Maus nachgewiesen werden. Es gibt dort sogar Hinweise auf eine Ko-Lokalisation von CB1 und TRPV1 (Cristino *et al.*, 2006), auch wenn die Funktionalität präsynaptischer TRPV1-Rezeptoren im Gehirn noch nicht nachgewiesen ist (Köfalvi *et al.*, 2006; Marinelli *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2002; Al-Hayani *et al.*, 2001).

6.8 Zusammenspiel der pro- und antinozizeptiven Membranproteine

Die Ko-Expressionsanalysen geben einen Hinweis darauf, dass die Membranproteine TRPV1, CB1 und Kv1.4 miteinander in Wechselwirkung treten könnten. Aus den Daten, die über diese Proteine bislang existieren lässt sich ein Modell erstellen, wie diese Wechselwirkung an den zentralen und peripheren Terminalien aussehen könnte. (**Abb. 35**). Dabei wird angenommen, dass der Cannabinoid Rezeptor Kv1.4 aktivieren kann und dieser somit an der Vermittlung der antinozizeptiven Effekte beteiligt ist. Der Kv1.4 ist daher besonders interessant, da er einen schnell inaktivierenden A-Strom vermittelt.

Ein noxischer Reiz an der peripheren Endigung der Spinalganglienneurone führt zu einem Einstrom von Natrium- und Kalziumionen und somit zu Membranpotenzialänderungen. Durch die Öffnung spannungsgesteuerter Natriumkanäle werden die Ionenströme in Aktionspotenziale umgewandelt, die dann bis zur zentralen Endigung weitergeleitet werden. In der peripheren Terminalie wird Kv1.4 neben anderen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen durch die Membranpotenzialänderungen aktiviert. Er beeinflusst dabei durch seine Eigenschaft als A-Typ-Kaliumkanal die Dauer und Frequenz der Aktionspotenziale, da er schnell aktiviert und auch wieder schnell inaktiviert (Pongs *et al.*, 1999; Debanne *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 1997; Roeper *et al.*, 1997; Safronov *et al.*, 1996). Wird nun Kv1.4 zusätzlich über CB1 aktiviert, kann er die Bildung von Aktionspotenzialen und somit die Signalweiterleitung unterdrücken. An den zentralen Terminalien führen die weitergeleiteten Aktionspotenziale zu einer Aktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle, wodurch wiederum spannungsgesteuerte Kalziumkanäle öffnen. Dies führt zu einem Kalziumeinstrom, der die Neurotransmitterfreisetzung aus den synaptischen Vesikeln bewirkt. Kv1.4 kann auch

hier durch Spannungsänderung einerseits oder indirekt über CB1 aktiviert werden. Die durch seine Aktivierung stattfindende Repolarisation führt zu einer verminderten Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle. Somit führt die Aktivierung von Kv1.4 letztendlich zu einer verminderten Neurotransmitterausschüttung und somit einer verminderten Signalweiterleitung (**Abb. 35**).

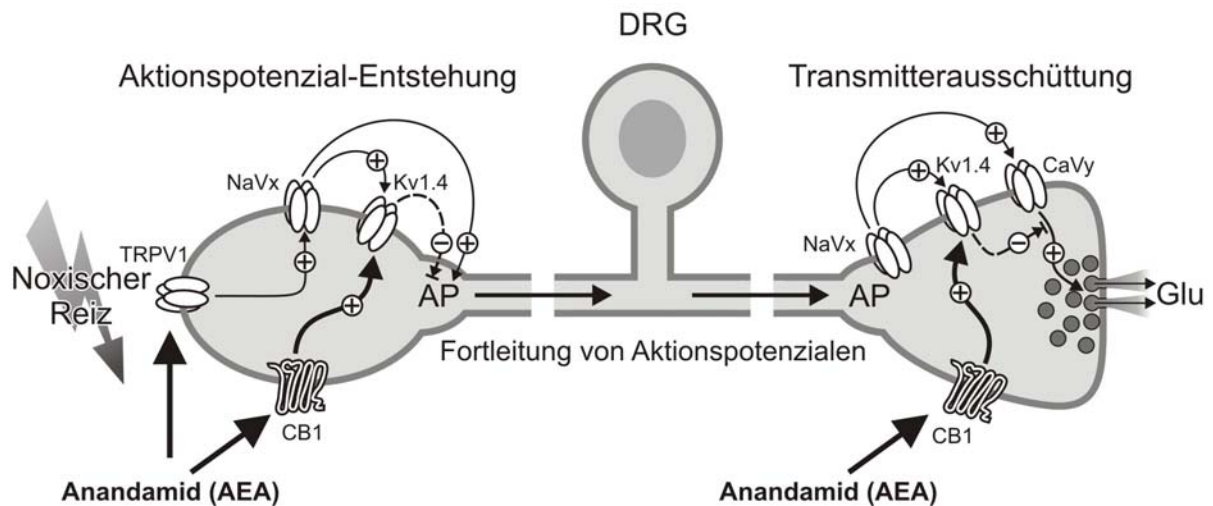


Abb. 35: Schema über das funktionelle Zusammenspiel von CB1 und Kv1.4.

Der am peripheren Ende des Neurons durch einen noxischen Reiz und Öffnung von TRPV1 ausgelöste Einstrom von Natrium- und Kalziumionen führt zur Öffnung spannungsgesteuerter Natriumkanäle und zur Entstehung von Aktionspotentialen. Die Aktivierung von CB1 kann über die Aktivierung von Kv1.4 die Bildung der Aktionspotenziale und somit die elektrische Erregbarkeit unterdrücken. Am zentralen Ende des Neurons kommt es durch das Aktionspotential zur Öffnung spannungsabhängiger Natrium- und im Folgenden von Kalziumkanälen. Durch das einströmende Kalzium kommt es zur Verschmelzung der Vesikel mit der Membran und somit zur Freisetzung der Neurotransmitter. Die Aktivierung von Kv1.4 über CB1 bewirkt eine Repolarisation und somit eine weniger starke Öffnung der Kalziumkanäle. Dies führt wiederum zu einer verminderten Neurotransmitterausschüttung. Die endocannabinoide Substanz Anandamid aktiviert sowohl TRPV1 als auch CB1 und wirkt vor allem am zentralen Ende als endogener Modulator der Nozizeption (aus Binzen *et al.*, 2006; modifiziert).

Die zentrale sowie periphere antinozizeptive Wirkung von CB1 konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Hinweise auf die zentrale Wirkung der Cannabinoide ergeben sich aus Experimenten in denen die Substanz intrathekal, also in die Flüssigkeit, die das Rückenmark umspült, gegeben werden kann oder direkt im Rückenmark appliziert wird. Selektive CB1-Agonisten unterdrücken die nozizeptive Signalübertragung im Rückenmark, wie Experimente mit diesen Neuronen bei elektrischer Stimulation zeigen (Kelly und Chapman, 2001; Harris *et al.*, 2000). Auch die durch Hitzereize ausgelöste Aktivität im

lumbalen Rückenmark wird durch die Aktivierung der Cannabinoidrezeptoren unterdrückt (Hohmann *et al.*, 1998), wie auch die durch Capsaicin ausgelösten Aktivierungen (Johanek *et al.*, 2001). Es zeigte sich ebenso, dass das Cannabinoidsystem an verschiedenen Entzündungsreaktionen beteiligt ist, wie solche die durch Karrageen (Harris *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 1998a), Adjuvantien (Martin *et al.*, 1999) oder Formalin (Khodayar *et al.*, 2006) ausgelöst werden. Die zentrale Aktivierung von CB1 und Vermittlung antinozizeptiver Effekte wurde auch in einem Tiermodell zum neuropathischen Schmerz nachgewiesen (Fox *et al.*, 2001).

Aber auch der peripheren Aktivierung der CB1-Rezeptoren kommt eine große Bedeutung zu. Richardson *et al.* (1998b) zeigten zum ersten Mal, dass Anandamid lokal appliziert die Karrageen-induzierte thermische Hyperalgesie und die Entwicklung von Ödemen unterdrückt. Ebenso zeigt diese Studie, dass Anandamid die durch Capsaicin ausgelöste Neurotransmitterfreisetzung verhindert. So können peripher applizierte CB1-Agonisten die durch Capsaicin (Rukwied *et al.*, 2003; Johanek *et al.*, 2001; Ko und Woods, 1999), Hitzreize (Johanek und Simone, 2004) oder Formalin (Calignano *et al.*, 1998) vermittelten Effekte hemmen. Die Beteiligung der peripheren Cannabinoidrezeptoren konnte auch im Modell des neuropathischen Schmerzes nachgewiesen werden (Fox *et al.*, 2001). Sagar *et al.* (2005) wies die Bedeutung des CB1 in den Spinalganglienneuronen von neuropathischen Tieren in der Zellkultur nach. Bei Agarwal *et al.* (2007) zeigt sich die Bedeutung der peripheren Cannabinoidrezeptoren durch die Entwicklung spezieller CB1-knock-out-Tiere, bei denen nur die peripheren CB1-Rezeptoren fehlten, die zentralen jedoch vorhanden waren. In diesen Tieren kam es zu einem nahezu vollständigen Verlust der systemischen Cannabinoid-induzierten Analgesie. Die Autoren schliessen aus ihren Ergebnissen, dass die Cannabinoidrezeptoren in der Peripherie für die Schmerzkontrolle über Endocannabinoide aber auch exogene Cannabinoide von Bedeutung sind. Zudem werden die von CB1-vermittelten Effekte in der Peripherie durch eine Zunahme der Expression während einer Adjuvantien-induzierten Entzündung bewirkt (Amaya *et al.*, 2006).

Indizien die dafür sprechen, dass Cannabinoide der TRPV1-Aktivierung entgegenwirken können, ergeben sich bereits daraus, dass in Zellkulturen nachgewiesen werden konnte, dass die Applikation von CB1-Agonisten den durch Spannung ausgelösten Kalziumeinstrom inhibieren (Khasabova *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2001), so dass die analgetische Wirkung von Cannabinoiden durch präsynaptische Inhibierung der Neurotransmitterausschüttung in

sensorischen Neuronen hervorgerufen wird. CB1 kann der TRPV1-induzierten Antwort entgegenwirken, da die Aktivierung von CB1 mit HU210 zur Inhibierung des Capsaicin-induzierten Kalziueinstroms (Oshita *et al.*, 2005, Millns *et al.*, 2001). Die Wirkung der Cannabinoide auf die TRPV1-vermittelte Antwort wird durch *in vivo*-Experimente bestätigt (Rukwied *et al.*, 2003; Johanek *et al.*, 2001; Ko und Woods, 1999; Li *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 1998b).

Eine direkte Wirkung des Cannabinoidrezeptors auf den Kv1.4 konnte bislang noch nicht gezeigt werden. Experimente mit Schnitten vom Cerebellum der Ratte zeigen, dass CB1 über die Aktivierung präsynaptischer Kaliumkanäle indirekt spannungsgesteuerte Kalziumkanäle inhibiert. Daran sind zum einen die GIRK-Kaliumkanäle und die 4-Aminopyridin (4-AP)-sensitiven Kaliumkanäle beteiligt. 4-AP ist ein Kaliumkanalblocker für A-Typ-Ströme (Daniel *et al.*, 2004; Daniel und Crepel, 2001). Ein Hinweis darauf, dass es sich bei dem 4-AP-sensitiven Kaliumkanal um den Kv1.4 handelt gibt die Arbeit von Vydyanathan *et al.* (2005). Dort findet sich in den Spinalganglienneuronen mit einem 4-AP-sensitiven Kaliumstrom die mRNA für Kv1.4 in den IB4-positiven Neuronen. Auch in hippocampalen Neuronen führt die Aktivierung von CB1 zur Aktivierung eines A-Strom-Kanals (Mu *et al.*, 2000 und 1999; Deadwyler *et al.*, 1995; Hampson *et al.*, 1995). In diesem Falle ist es jedoch so, dass der durch die CB1-Aktivierung ablaufende Signalweg die Inhibierung der PKA und daraus resultierend eine Dephosphorylierung zur Folge hat. Da aber Kv1.4 zur Aktivierung die Phosphorylierung benötigt (Tao *et al.*, 2005; Roeper *et al.*, 1997) sind hier andere A-Typ-Kanäle an der Signalvermittlung beteiligt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die neuroprotektive Substanz Riluzol eine Oxidierung eines Cysteins in der N-terminalen Inaktivierungsdomäne von Kv1.4 bewirkt. Die so verlängerte Aktivierung von Kv1.4 durch eine Verlangsamung der Inaktivierung bewirkt eine cAMP-unabhängige Inhibierung der Glutamatfreisetzung in den Nervenendigungen durch einen reduzierten Depolarisations-abhängigen Kalziueinstrom (Xu *et al.*, 2001). Auch wenn die genauen Signaltransduktionswege noch nicht bekannt sind, so spricht doch die gefundene Ko-Expression von CB1 mit Kv1.4 dafür, dass CB1 über diesen Kaliumkanal antinozizeptive Effekte vermitteln kann.

Der endogenen Substanz Anandamid kommt in der nozizeptiven Signalverarbeitung eine besondere Bedeutung zu. Als Agonist von CB1 wurde in tierexperimentellen Studien seine Beteiligung bei der Inhibierung der nozizeptiven Signalübertragung an zentralen und

peripheren Terminalien im Verlauf von Entzündungen gezeigt (Harris *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 1998a und b). Anandamid ist aber auch ein Agonist von TRPV1 (Fischbach *et al.*, 2007; Ahluwalia *et al.*, 2003b; Jerman *et al.*, 2002; Tognetto *et al.*, 2001; Zygmunt *et al.*, 1999) und somit sowohl ein Endocannabinoid als auch ein Endovanilloid, wodurch es sowohl pro- als auch antinozizeptiv wirken kann. Dabei zeigt sich, dass Anandamid zu einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration in Spinalganglienneuronen führt (Fischbach *et al.*, 2007) sowie einer Zunahme der Neurotransmitterausschüttung aus diesen Zellen (Ahluwalia *et al.*, 2003b). Dabei hat die Konzentration von Anandamid einen Einfluß darauf, ob der CB1- oder TRPV1-vermittelte Effekt überwiegt, da für die CB1-Aktivierung geringe Konzentrationen ausreichen, für TRPV1 dagegen höhere Konzentrationen nötig sind (Ahluwalia *et al.*, 2003b). Dies bestätigen auch Experimente an Schnitten vom Rückenmark (Tognetto *et al.*, 2001). Sowohl in Zellkulturen (Fischbach *et al.*, 2007) als auch in tierexperimentellen Studien zeigt sich (Horvath *et al.*, 2007), dass bei hohen Anandamidkonzentrationen CB1 und TRPV1 ko-aktiviert werden, da die Blockierung von CB1 zu einer stärkeren Anandamidantwort über TRPV1 führt. Bei den höheren Konzentrationen an Anandamid werden sowohl TRPV1 und CB1 aktiviert, die durch TRPV1 vermittelte Antwort übersteigt jedoch die von CB1 (Fischbach *et al.*, 2007). Ahluwalia *et al.* (2003a) konnte desweiteren zeigen, dass die Aktivierung CB1-TRPV1-ko-exprimierender Neurone selber zu einer Ausschüttung von Anandamid führt. Auch hier zeigt die Blockierung von CB1 eine Zunahme der durch Capsaicin ausgeschütteten Anandamidmenge. Da Anandamid auf der einen Seite die Neurotransmitterausschüttung Capsaicin-sensitiver Neurone reguliert und auf der anderen Seite durch die Aktivierung Capsaicin-sensitiver Neurone produziert und freigesetzt wird, kommt ihm eine wichtige Bedeutung als endogener Regulator im Endocannabinoidsystem zu (Fischbach *et al.*, 2007 Ahluwalia *et al.*, 2003a und b). Die Wirkung ist vor allem konzentrationsabhängig, da Anandamid zu CB1 eine höhere Affinität hat als zu TRPV1 (Ahluwalia *et al.*, 2003b; Tognetto *et al.*, 2001). Die antinozizeptive Wirkung über CB1 erfolgt bei niedrigen Konzentrationen und die pronozizeptive über TRPV1 bei hohen Konzentrationen, so dass die nozizeptive Signalübertragung abhängig von der Konzentration der endogenen Substanz moduliert werden kann. Anandamid bewirkt einen Einstrom von Kalzium in die Zelle bei gleichzeitiger Ko-Aktivierung von CB1 (Fischbach *et al.*, 2007).

6.9 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression der pronozizeptiven Vanilloidrezeptoren TRPV1 und TRPV2 in den Spinalganglienneuronen nachgewiesen und die bisherigen Angaben aus der Literatur bestätigt werden. Durch den Vergleich der Expressionen im Schnittpräparat, das die Situation *in situ* darstellt, mit einer Kurzzeitzellkultur wurde nachgewiesen, dass die Zellen keinem Kultur- bzw. Präparationseffekt unterliegen, da die Häufigkeiten der Rezeptoren gleich ist. Erst bei einer Langzeitkultur ist der Zusatz von Wachstumsfaktoren nötig, da ansonsten die Expression insbesondere für TRPV1 abnimmt (Ahluwalia *et al.*, 2002a). Es ist somit möglich, Daten von Experimenten, die auf unterschiedlichen Präparationsansätzen beruhen, direkt miteinander zu vergleichen. Um in der Zellkultur die Situation *in vivo* am besten nachzustellen sollten die Zellen möglichst bald nach der Präparation weiter untersucht werden.

Im Laufe dieser Arbeit wurden erstmalig TRPV1-TRPV2-ko-exprimierende Spinalganglienneurone gezeigt (Greffrath *et al.*, 2003). Diese Ko-Expression wurde zwar vorher auch schon von anderen Arbeitsgruppen untersucht, konnte aber bis zu diesem Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden. Inzwischen ist die Ko-Expression weiter bestätigt worden, wobei ihr in den Neuronen bei der Sensibilisierung gegen wiederholte Hitzreize eine funktionelle Bedeutung zugewiesen werden konnte.

Die hier gefundene neue C-terminale Splice-Variante Vr.3'sv erweitert die Anzahl bereits existierender Splice-Varianten und gibt somit einen weiteren Einblick in die Regulationsmöglichkeiten von TRPV1. Sie hat zwischen Exon 15 und 16 eine Insertion von 104 Basen, so dass sie bedingt durch einen Rasterschub einen anderen C-Terminus exprimiert als Volllänge-TRPV1. Obwohl sie eine Sensitivität gegenüber Capsaicin aufweist, könnte der veränderte C-Terminus ihre funktionellen Eigenschaften beeinflussen. Es wäre möglich, dass sie von anderen Agonistenkonzentrationen bzw. Hitzereizen aktiviert wird als Volllänge-TRPV1 und somit auch die Aktivierbarkeit durch noxische Reiz verändert ist. Ebenso wäre es möglich, dass sie ebenso wie die bisher bekannten Splice-Varianten (Eilers *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2006; Schumacher *et al.*, 2000) die Aktivierbarkeit von TRPV1 beeinflusst. Für die Erforschung pronozizeptiver Signalwege ist die genaue funktionelle Bedeutung dieser Variante von großer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle TRPV1-positiven

Neurone absterben, woran möglicherweise auch diese Variante beteiligt ist. Das genaue Expressionsmuster und die funktionellen Eigenschaften müssen noch weiter erforscht werden.

Die Erforschung antinozizeptiver Signalwege ist für die Entwicklung neuer Medikamente besonders wichtig. Die Expression des Cannabinoidrezeptors CB1 in den Spinalganglien spricht für seine Expression in den peripheren Terminalien. Mittlerweile konnte in Verhaltensexperimenten nachgewiesen werden, dass Agonisten auch auf die in der Peripherie exprimierten Cannabinoidrezeptoren eine antinozizeptive und analgetische Wirkung haben ohne Nebenwirkungen auf das ZNS auszuüben (Agarwal *et al.*, 2007; Dogrul *et al.*, 2003; Rukwied *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2001). Somit ergeben sich hier die Möglichkeiten Medikamente gegen Schmerzen zu entwickeln, die lokal wirken können.

Die in dieser Arbeit gefundene Ko-Expression von TRPV1 mit CB1 und dem spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kv1.4 lässt vermuten, dass diese drei Membranproteine an der nozizeptiven / antinozizeptiven Signalverarbeitung beteiligt sind. Dabei wird davon ausgegangen, dass der CB1 seine antinozizeptive Wirksamkeit über den Kv1.4 weitergibt. Dies führt zu einem weiteren neuen Ansatzpunkt bei der Entwicklung von Medikamenten, die statt am CB1 am Kv1.4 wirken könnten. Die neuroprotektive Substanz Riluzol, die den Kv1.4 aktiviert (Xu *et al.*, 2001) wird bislang in der Therapie der Motoneuronen-Erkrankung amyotrophe Lateralsklerose eingesetzt. Im Tiermodell wurden ihr bereits antinozizeptive Effekte nachgewiesen (Coderre *et al.*, 2007; Munro *et al.*, 2007), die Ergebnisse in Humanexperimenten sprechen jedoch dagegen (Galer *et al.*, 2000; Hammer *et al.*, 1999). Andere Substanzen wie Flupirtin und Retigabin sind bekannte Öffner von KCNQ-Kaliumkanälen (Jakob und Krieglstein, 1997; Kornhuber *et al.*, 1999; Passmore *et al.*, 2003; Wu und Dworetzky, 2005), aber ihre möglichen Effekte auf Kv1.4 sind noch nicht bekannt. Daher müssen die genauen Signalwege von CB1 über Kv1.4 in Zukunft näher untersucht werden.

7. Zusammenfassung

Das nozizeptive System erkennt und verarbeitet noxische Reize, d.h. Reize, die eine Gewebeschädigung bewirken können. Nozizeptive Neurone aus den Spinalganglien detektieren diese Reize mit einer Vielzahl von liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanälen, wandeln sie in Aktionspotenzialentladungen um und leiten sie zentralwärts übers Hinterhorn des Rückenmarks zum Gehirn weiter, wo eine Schmerzempfindung ausgelöst wird. Die transienten Rezeptor-Potenzial-Kanäle der Vanilloidrezeptorfamilie, TRPV1 und TRPV2, sind die klassischen Transduktionsmoleküle für noxische Hitzereize in den Spinalganglien und werden von Reiztemperaturen über 43°C bzw. 52°C aktiviert. TRPV1 wird in vielen kleinen Neuronen, TRPV2 dagegen in wenigen größeren exprimiert. Neben den pronozizeptiven werden auch antinozizeptive Membranproteine in den Neuronen exprimiert wie z.B. der metabotrope Cannabinoidrezeptor CB1. Er koppelt an spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, die neben Natrium- und Kalziumkanälen ebenfalls an der neuronalen Erregbarkeit beteiligt sind. Von den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen könnte der Kv1.4, der einen schnell inaktivierenden A-Strom vermittelt, an den antinozizeptiven Signalwegen beteiligt sein. Um die molekulare Physiologie der Regulation von Nozizeption und Antinozizeption zu charakterisieren, wurde die Expression bzw. Ko-Expression dieser Membranproteine auf der einen als auch die funktionelle Charakterisierung von TRPV1 auf der anderen Seite im Soma der Spinalganglienneurone und im heterologen Expressionssystem untersucht.

TRPV1 wurde in einem Drittel und TRPV2 in je einem Zehntel aller Spinalganglienneurone nachgewiesen, mit TRPV1 in den kleinen und TRPV2 in den größeren Zellen. Das Expressionsmuster veränderte sich nicht, auch wenn unterschiedliche Präparationsmethoden, die für die Aufarbeitung der Zellen für verschiedene experimentelle Ansätze notwendig sind, verwendet wurden. Somit können die aus Expressionsanalysen und funktionellen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse miteinander verglichen werden. Obwohl die beiden Mitglieder der Vanilloidrezeptorfamilie in unterschiedlich großen Zellen exprimiert werden, so überlappen sich dennoch ihre Größenverteilungen. Durch Ko-Expressionsanalysen konnten hier zum ersten Mal TRPV1-TRPV2-ko-exprimierende Neurone detektiert werden. Diese Ko-Expression bzw. Heterotetramerbildung wurde mittlerweile von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Desweiteren wurde den TRPV1-TRPV2-ko-exprimierenden Neuronen eine Bedeutung bei der Sensibilisierung gegen Hitzereize zugewiesen.

Mit dem in dieser Arbeit neu entwickelten N-terminalen Antikörper gegen TRPV1 konnte gezeigt werden, dass für TRPV1 verschiedene Splice-Varianten existieren. Neben den bereits bekannten Splice-Varianten konnte hier die neue Variante Vr.3'sv isoliert werden. Diese besitzt zwischen Exon 15 und 16 eine Insertion aus 104 Basen und bildet daher einen veränderten C-Terminus aus. Vr.3'sv war im Gegensatz zu anderen Varianten trotz des veränderten C-Terminus immer noch durch Capsaicin aktivierbar. Vr.3'sv bildete im heterologen Expressionssystem funktionelle Kanäle aus und könnte somit als Homo- oder Heterotetramer die Eigenschaften TRPV1-positiver Neurone beeinflussen. Möchte man die Häufigkeit des Rezeptors in einem Gewebe bestimmen, so ist die Wahl des Antikörpers von entscheidender Bedeutung.

TRPV1 wird durch das Vanilloid Capsaicin aktiviert, wobei diese Substanz neurotoxisch ist und eine Degeneration von Neuronen und epidermaler Nervenfasern bewirkt. Hier wurde gezeigt, dass nicht alle TRPV1-positiven Neurone bei langer Inkubationszeit absterben, unabhängig davon welche Varianten von TRPV1 exprimiert werden. Die funktionellen Untersuchungen zeigten, dass auch Capsaicin-sensitive Zellen sich unter Einfluss des Agonisten wieder erholen und somit überleben können. Diese Zellen scheinen über einen Schutzmechanismus zu verfügen, der möglicherweise von den verschiedenen Splice-Varianten vermittelt wird. Für den Vanilloidrezeptor TRPV2 gibt es keine Hinweise auf die Existenz von Splice-Varianten.

Ko-Expressionsanalysen zeigten, dass der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.4 in nahezu allen TRPV1- aber nicht TRPV2-positiven Neuronen exprimiert wird. Desweiteren ko-exprimierten nahezu alle TRPV1-positiven Neurone auch Cannabinoidrezeptor CB1-Protein und -mRNA. Diese fast vollständige Ko-Lokalisation von CB1 und Kv1.4 in nozizeptiven Spinalganglienneuronen spricht für eine funktionell synergistische Aktivität zwischen CB1 und Kv1.4. Der Kaliumkanal kann unter der regulativen Kontrolle durch CB1 zwei wichtige Rollen in der Antinozizeption entfalten: Als Vermittler von A-Typ-Kaliumströmen ist er zum einen an der Kontrolle der repetitiven Entladungen in der Peripherie und zum anderen an der Kontrolle der Transmitterausschüttung zentral beteiligt. Es ergeben sich daraus Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Medikamente. Mit Kv1.4-Aktivatoren und/oder peripher wirkenden Cannabinoiden könnten die Nebenwirkungen der Cannabinoide im zentralen Nervensystem umgangen werden.

8. Literaturverzeichnis

- Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, Rubino T, Michalski CW, Marsicano G, Monory K, Mackie K, Marian C, Batkai S, Parolaro D, Fischer MJ, Reeh P, Kunos G, Kress M, Lutz B, Woolf CJ, Kuner R (2007): Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* **10**: 870-879
- Agopyan N, Head J, Yu S, Simon SA (2004): TRPV1 receptors mediate particulate matter-induced apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**: L563-572
- Ahluwalia J, Rang H, Nagy I (2002b): The putative role of vanilloid receptor-like protein-1 in mediating high threshold noxious heat-sensitivity in rat cultured primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* **16**: 1483-1489
- Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Capogna M, Nagy I (2002a): Cannabinoid 1 receptors are expressed by nerve growth factor- and glial cell-derived neurotrophic factor-responsive primary sensory neurones. *Neuroscience* **110**: 747-753
- Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Nagy I (2003b): Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 *in vitro*. *Eur j Neurosci* **17**: 2611-2618
- Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I (2000): Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* **100**: 685-688
- Ahluwalia J, Yaqoob M, Urban L, Bevan S, Nagy I (2003a): Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. *J Neurochem* **84**: 585-591
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2007): Guide to receptors and channels (GRAC). 2nd edition (2007 Revision). *Br J Pharmacol* **150**: S1-S168
- Al-Hayani A, Wease KN, Ross RA, Pertwee RG, Davies SN (2001): The endogenous cannabinoid anandamide activates vanilloid receptors in the rat hippocampal slice. *Neuropharmacology* **41**: 1000-1005
- Amantini C, Mosca M, Lucciarini R, Perfumi M, Morrone S, Piccoli M, Santoni G (2004): Distinct thymocyte subsets express the vanilloid receptor VR1 that mediates capsaicin-induced apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **11**: 1342-1356
- Amantini C, Mosca M, Nabissi M, Lucciarini R, Caprodossi S, Arcella A, Giangaspero F, Santoni G (2007): Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation. *J Neurochem* **102**: 977-990
- Amaya F, Oh-hashii K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, Tominaga M, Tanaka Y, Tanaka M (2003): Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res* **963**: 190-196
- Amaya F, Shimosato G, Kawasaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji RR, Tanaka M (2006): Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. *Pain* **124**: 175-183
- Amaya F, Shimosato G, Nagano M, Ueda M, Hashimoto S, Tanaka Y, Suzuki H, Tanaka M (2004): NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci* **20**: 2303-2310

- Ameri A (1999): The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* **58**: 315-348
- Anand U, Otto WR, Casula MA, Day NC, Davis JB, Bountra C, Birch R, Anand P (2006): The effect of neurotrophic factors and morphology, TRPV1 expression and capsaicin responses of cultured human DRG sensory neurons. *Neurosci Lett* **399**: 51-56
- Andrews AT (1986): *Electrophoresis. Theory, techniques, and biochemical and clinical applications.* Second edition. Oxford University Press, Oxford, GB
- Aoki Y, Ohtori S, Takahashi K, Ino H, Douya H, Ozawa T, Saito T, Moriya H (2005): Expression and co-expression of VR1, CGRP, and IB4-binding glycoprotein in dorsal root ganglion neurons in rat: differences between the disc afferents and the cutaneous afferents. *Spine* **30**: 1496-1500
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1994): *Current protocols in molecular biology.* John Wiley and Sons Inc., NY, USA
- Baccei ML, Bardoni R, Fitzgerald M (2003): Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: glutamate release by capsaicin and menthol. *J Physiol* **549**: 231-242
- Basbaum AI, Jessell TM (2000) in *Principles of Neural Science* (eds Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM): 472-491 (McGraw-Hill, New York)
- Beech DJ, Muraki K, Flemming R (2004): Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. *J Physiol* **559**: 685-706
- Bender FLP, Mederos y Schnitzler M, Li Y, Ji A, Weihe E, Gudermann T, Schäfer MKH (2005): The temperature-sensitive ion channel TRPV2 is endogenously expressed and functional in the primary sensory cell line F-11. *Cell Physiol Biochem* **15**: 183-194
- Benham CD, Davis JB, Randall AD (2002): Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* **42**: 873-888
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000): The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 11-21
- Binzen U, Greffrath W, Hennessy S, Bausen M, Saaler-Reinhardt S, Treede RD (2006): Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **142**: 527-539
- Birder LA, Kanai AJ, deGroat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ (2001): Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13396-13401
- Bjerring P, Arendt-Nielsen L (1989): Use of a new Argon laser technique to evaluate changes in sensory and pain thresholds in human skin following topical capsaicin treatment. *Skin Pharmacol* **2**: 162-167
- Bleakman D, Brorson JR, Miller RJ (1990): The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells. *Br J Pharmacol* **101**: 423-431
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

- Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R (2006): A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci* **26**: 4835-4840
- Bridges D, Ahmad K, Rice ASC (2001): The synthetic cannabinoid WIN55, 212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* **133**: 586-594
- Bridges D, Rice ASC, Egertová M, Elphick MR, Winter J, Michael GJ (2003): Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using *in situ* hybridisation and immunohistochemistry. *Neuroscience* **119**: 803–812
- Brown TA (1993): *Gentechnologie für Einsteiger. Grundlagen, Methoden, Anwendungen.* Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg
- Burnette WN (1981): Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**: 195-203
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D (1998): Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* **394**: 277-281
- Cardenas CG, Del Mar LP, Scroggs RS (1995): Variation in serotonergic inhibition of calcium channel currents in four types of rat sensory neurons differentiated by membrane properties. *J Neurophysiol* **74**: 1870–1879
- Caterina MJ, Julius D (2001): The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* **24**: 487-517
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitze KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000): Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**: 306-313
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999): A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**: 436-441
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824
- Catt K, Tregear GW (1967): Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. *Science* **153**: 1570-1572
- Cholewinski A, Burgess GM, Bevan S (1993): The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **55**: 1015-1023
- Clapham DE (2003): TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517-524
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001): The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* **2**: 387-396
- Chen CW, Lee ST, Wu WT, Fu WM, Ho FM, Lin WW (2003): Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *Br J Pharmacol* **140**: 1077–1087
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli* transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2172-2175

- Cochereau C, Sanchez D, Creppy EE (1997): Tyrosine prevents capsaicin-induced protein synthesis inhibition in cultured cells. *Toxicology* **117**: 133-139
- Coderre TJ, Kumar N, Lefebvre D, Yu JS (2007): A comparison of the glutamate release inhibitor and anti-allodynic effects of gabapentin, lamotrigine, and riluzole in a model of neuropathic pain. *J Neurochem* **100**: 1289-1299
- Coggeshall RE (1992): A consideration of neuronal counting methods. *Trends Neurosci* **15**: 9-13
- Coller HA, Coller BS (1983): Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limited dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. *Meths Enzymol* **121**: 412-417
- Cooper EC, Milroy A, Jan YN, Jan LY, Lowenstein DH (1998): Presynaptic localization of Kv1.4-containing A-type potassium channels near excitatory synapses in the hippocampus. *J Neurosci* **18**: 965-974
- Cravatt BF, Lichtman AH (2004): The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J Neurobiol* **61**: 149-160
- Crawford LV, Waring MJ (1967): Supercoiling of polyoma virus DNA measured by its interaction with ethidium bromide. *J Mol Biol* **25**: 23-30
- Creppy EE, Richeux F, Carratú MR, Cuomo V, Cochereau C, Ennamany R, Saboureau D (2000): Cytotoxicity of capsaicin in monkey kidney cells: lack of antagonistic effects of capsazepine and Ruthenium red. *Arch Toxicol* **73**: 40-47
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006): Immunohistochemical localization of cannabinoid type1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* **139**: 1405-1415
- Daniel H, Crepel F (2001): Control of Ca(2+) influx by cannabinoid and metabotropic glutamate receptors in rat cerebellar cortex requires K(+) channels. *J Physiol* **537**: 793-800
- Daniel H, Rancillac A, Crepel F (2004): Mechanisms underlying cannabinoid inhibition of presynaptic Ca2+ influx at parallel fibre synapses of the rat cerebellum. *J Physiol* **557**: 159-174
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000): Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**: 183-187
- Deadwyler SA, Hampson RE, Bennett BA, Edwards TA, Mu J, Pacheco MA, Ward SJ, Childers SR (1993): Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Receptors Channels* **1**: 121-134
- Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S (1995): Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther* **273**: 734-743
- Debanne D, Guerinéau NC, Gähwiler BH, Thompson SM (1997): Action-potential propagation gated by an axonal I_A-like K⁺ conductance in hippocampus. *Nature* **389**: 286-289
- Dedov VN, Mandadi S, Armati PJ, Verkhratsky A (2001): Capsaicin-induced depolarisation of mitochondria in dorsal root ganglion neurons is enhanced by vanilloid receptors. *Neuroscience* **103**: 219-226

- Dedov VN, Roufogalis BD (1998): Rat dorsal root ganglion neurones express different capsaicin-evoked Ca²⁺ transients and permeabilities to Mn²⁺. *Neurosci Lett* **248**: 151-154
- Dedov VN, Roufogalis BD (2000): Mitochondrial calcium accumulation following activation of vanilloid (VR1) receptors by capsaicin in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **95**: 183-188
- Diaz-Laviada I, Ruiz-Llorente L (2005): Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini Rev Med Chem* **5**: 619–630
- Dietrich A, Chubanov V, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T (2006): Cation channels of the transient receptor potential superfamily: Their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacol Ther* **112**: 744-760
- Dinis P, Charrua A, Avelino A, Yaqoob M, Bevan S, Nagy I, Cruz F (2004): Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. *J Neurosci* **24**: 11253-11263
- Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HWGM (1996): Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflügers Archiv* **431**: 828-837
- Dogrul A, Gul H, Akar A, Yildiz O, Bilgin F, Guzeldemir E (2003): Topical cannabinoid antinociception: synergy with spinal sites. *Pain* **105**: 11-16
- Dolly JO, Parcej DN (1996): Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr* **28**: 231-253
- Donnerer J, Amann R, Schuligoi R, Skofitsch G (1996): Complete recovery by nerve growth factor of neuropeptide content and function in capsaicin-impaired sensory neurons. *Brain Res* **741**: 103-108
- Duchen MR (2000): Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* **529**: 57-68
- Edwards L, Nashmi R, Jones O, Backx P, Ackerley C, Becker L, Fehlings MG (2002): Upregulation of Kv1.4 protein and gene expression after chronic spinal cord injury. *J Comp Neurol* **443**: 154-167
- Egertova M, Elphick MR (2000): Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB1. *J Comp Neurol* **422**: 159-171
- Eilers H, Lee SY, Hau CW, Logvinova A, Schumacher MA (2007): The rat vanilloid receptor splice variant VR.5'sv blocks TRPV1 activation. *Neuroreport* **18**: 969-973
- Elitt CM, McIlwrath SL, Lawson JJ, Malin SA, Molliver DC, Cornuet PK, Koerber HR, Davis BM, Albers KM (2006): Artemin overexpression in skin enhances expression of TRPV1 and TRPA1 in cutaneous sensory neurons and leads to behavioral sensitivity to heat and cold. *J Neurosci* **26**: 8578-8587
- Endres-Becker J, Heppenstall PA, Mousa SA, Labuz D, Oksche A, Schafer M, Stein C, Zollner C (2007): Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. *Mol Pharmacol* **71**: 12-18
- Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**: 871-879

- Eun SY, Jung SJ, Park YK, Kwak J, Kim SJ, Kim J (2001): Effects of capsaicin on Ca(2+) release from the intracellular Ca(2+) stores in the dorsal root ganglion cells of adult rats. *Biochem Biophys Res Commun* **285**: 1114-1120
- Facer P, Casula MA, Smith GD, Benham CD, Chessell IP, Bountra C, Sinisi M, Birch R, Anand P (2007): Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy. *BMC Neurol* **7**: 11
- Facer P, Knowles CH, Tam PK, Ford AP, Dyer N, Baecker PA, Anand P (2001): Novel capsaicin (VR1) and purinergic (P2X3) receptors in Hirschsprung's intestine. *J Pediatr Surg* **36**: 1679-1684
- Farquhar-Smith WP, Egertova M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice ASC, Elphick MR (2000): Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci* **15**: 510-521
- Ferrier-Montiel A, Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Planells-Cases R (2004): Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* **271**: 1820-1826
- Fischbach T, Geffrath W, Nawrath H, Treede RD (2007): Effects of anandamide and noxious heat on intracellular calcium concentration in nociceptive drg neurons of rats. *J Neurophysiol* **98**: 929-938
- Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, James I (2001): The role of central and peripheral cannabinoid (1) receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* **92**: 91-100
- Frederick J, Buck ME, Matson DJ, Cortright DN (2007): Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury. *Biochem Biophys Res Commun* **358**: 1058-1064
- Funakoshi K, Nakano M, Atobe Y, Goris RC, Kadota T, Yazama F (2006): Differential development of TRPV1-expressing sensory nerves in peripheral organs. *Cell Tissue Res* **323**: 27-41
- Galer BS, Twilling LL, Harle J, Cluff RS, Friedman E, Rowbotham MC (2000): Lack of efficacy of riluzole in the treatment of peripheral neuropathic pain conditions. *Neurology* **55**: 971-975
- Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sanchez E, Fernandez-Ballester G, Ferrier-Montiel A (2004): Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* **24**: 5307-5314
- Gopinath P, Wan E, Holdcroft A, Facer P, Davis JB, Smith GD, Bountra C, Anand P (2005): Increased capsaicin receptor TRPV1 in skin nerve fibers and related vanilloid receptors TRPV3 and TRPV4 in keratinocytes in human breast pain. *BMC Woman's Health* **5**: 2
- Green DR, Reed JC (1999): Mitochondria and apoptosis. *Science*. **281**: 1309-1312
- Geffrath W (2006): The capsaicin receptor: "TRPing" transduction for painful stimuli. *Der Schmerz* **20**: 219-225
- Geffrath W, Binzen U, Schwarz ST, Saaler-Reinhardt S, Treede RD (2003): Co-expression of heat sensitive vanilloid receptor subtypes in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* **14**: 2251-2255

- Greffrath W, Kirschstein T, Nawrath H, Treede RD (2001): Changes in cytosolic calcium in response to noxious heat and their relationship to vanilloid receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **104**: 539-550
- Groneberg DA, Niimi A, Dinh QT, Cosio B, Hew M, Fischer A, Chung KF (2004): Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* **170**: 1276-1280
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440-3450
- Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB (2002): The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **23**: 183-191
- Guo A, Simone DA, Stone LS, Fairbanks CA, Wang J, Elde R (2001): Developmental shift of vanilloid receptor 1 (VR1) terminals into deeper regions of the superficial dorsal horn: correlation with a shift from TrkA to Ret expression by dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci* **14**: 293-304
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R (1999): Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X₃ purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* **11**: 946-958
- Hahn K, Triolo P, Hauer BS, McArthur JC, Polydefkis M (2007): Impaired reinnervation in HIV infection following experimental denervation. *Neurology* **68**: 1251-1256
- Hammer NA, Lilleso J, Pedersen JL, Kehlet H (1999): Effect of riluzole on acute pain and hyperalgesia in humans. *Br J Anaesth* **82**: 718-722
- Hampson RE, Evans GJ, Mu J, Zhuang SY, King VC, Childers SR, Deadwyler SA (1995): Role of cyclic AMP dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "A-current" in cultured rat hippocampal neurons. *Life Sci* **56**: 2081-2088
- Han P, McDonald HA, Bianchi BR, Kouhen RE, Vos MH, Jarvis MF, Faltynek CR, Moreland RB (2007): Capsaicin causes protein synthesis inhibition and microtubule disassembly through TRPV1 activities both on the plasma membrane and intracellular membranes. *Biochem Pharmacol* **73**: 1635-1645
- Hanahan D (1983): Studies of the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Handwerker HO (1999): Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Harlow E, Lane D (1988): Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Harris J, Drew LJ, Chapman V (2000): Spinal anandamide inhibits nociceptive transmission via cannabinoid receptor activation in vivo. *Neuroreport* **11**: 2817-2819
- Heiner I, Eisfeld J, Lückhoff A (2003): Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium* **33**: 533-540
- Helling RB, Goodman HM, Boyer HW (1974): Analysis of R. EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose gel-electrophoresis. *J Virol* **14**: 1235-1244

- Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G, Schaefer M (2005): Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* **118**: 917-928
- Hjerling-Leffler J, AlQatari M, Ernfors P, Koltzenburg M (2007): Emergence of functional sensory subtypes as defined by transient receptor potential channel expression. *J Neurosci* **27**: 2435-2443
- Hlinak A, Jahn S, Grunow R, Mehl M, Heider G, Baehr R (1987): Optimierungsversuche zur Klonierung von Maus-Maus- und Maus-Mensch-Hybridomen unter Verwendung verschiedener Feederzelltypen. *Mh Vet-Med* **42**: 801-804
- Hochschuli E, Dobeli H, Schacher A (1987): New metal chelate adsorbant selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues. *J Chromatog* **411**: 177-184
- Hoffmann DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D (1997): K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* **387**: 869-875
- Hohmann AG, Briley EM, Herkenham M (1999): Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res* **822**: 17-25
- Hohmann AG, Herkenham M (1998): Regulation of cannabinoid and mu opioid receptors in rat lumbar spinal cord following neonatal capsaicin treatment. *Neurosci Lett* **252**: 13-16
- Hohmann AG, Herkenham M (1999a): Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label *in situ* hybridization study. *Neuroscience* **90**: 923-931
- Hohmann AG, Herkenham M (1999b): Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience* **92**: 1171-1175
- Hohmann AG, Tsou K, Walker JM (1998): Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55,212-2. *Neurosci Lett* **257**: 119-122
- Holzer P (1991): Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* **43**: 143-201
- Horvath G, Kekesi G, Nagy E, Benedek G (2007): The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level. *Pain* May 26
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004): Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* **47** (Suppl 1): 345-358
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002): An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8400-8405
- Hudson LJ, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J (2001): VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci* **13**: 2105-2114
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U (2000): Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6155-6160

- Hwang SJ, Oh JM, Valtchanoff JG (2005): Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons support different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. *Brain Res* **1047**: 261-266
- Hwang SJ, Valtchanoff JG (2003): Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Lett* **349**: 41-44
- Ichikawa H, Sugimoto T (2000): Vanilloid receptor 1-like receptor-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal nervous system. *Neuroscience* **101**: 719-725
- Jahnel R, Dreger M, Gillen C, Bender O, Kurreck J, Hucho F (2001): Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur J Biochem* **268**: 5489-5496
- Jakob R, Krieglstein J (1997): Influence of flupirtine on a G-protein coupled inwardly rectifying potassium current in hippocampal neurones. *Br J Pharmacol* **122**: 1333-1338
- Jerman JC, Gray J, Brough SJ, Ooi L, Owen D, Davis JB, Smart D (2002): Comparison of effects of anandamide at recombinant and endogenous rat vanilloid receptors. *Br J Anaesth* **89**: 882-887
- Johanek LM, Heitmiller DR, Turner M, Nader N, Hodges J, Simone DA (2001): Cannabinoids attenuate capsaicin-evoked hyperalgesia through spinal and peripheral mechanisms. *Pain* **93**: 303-315
- Johanek LM, Simone DA (2004): Activation of peripheral cannabinoid receptors attenuates cutaneous hyperalgesia produced by a heat injury. *Pain* **109**: 432-442
- Jordt SE, Julius D (2002): Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* **108**: 421-430
- Jordt, SE, Tominaga, M, Julius, D (2000): Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8134-8139
- Julius D, Basbaum AI (2001): Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**: 203-210
- Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, Kim D, Oh U (1999): Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci* **19**: 529-538
- Jung J, Lee SY, Hwang SW, Cho H, Shin J, Kang YS, Kim S, Oh U (2002): Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* **277**: 44448-44454
- Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U (2004): Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biochem Chem* **279**: 7048-7054
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M (2006): The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* **26**: 2991-3001
- Kelly S, Chapman V (2001): Selective Cannabinoid CB1 receptor activation inhibits spinal nociceptive transmission in vivo. *J Neurophysiol* **86**: 3061-3064
- Khalili N, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Simone DA (2001): Influence of thermode size for detecting heat pain dysfunction in a capsaicin model of epidermal nerve fiber loss. *Pain* **91**: 241-250

- Khasabova IA, Simone DA, Seybold VS (2002): Cannabinoids attenuate depolarization-dependent Ca^{2+} influx in intermediate-size primary afferent neurons of adult rats. *Neuroscience* **115**: 613-625
- Khodayar MJ, Shafaghi B, Naderi N, Zarrindast MR (2006): Antinociceptive effect of spinally administered cannabinergic and 2-adrenoceptor drugs on the formalin test in rat: possible interactions. *J Psychopharmacol* **20**: 67-74
- Kim SR, Kim SU, Oh U, Jin BK (2006): Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca^{2+} -mediated mitochondrial damage and *cytochrome c* release. *J Immunol* **177**: 4322-4329
- Kirschstein T, Büsselberg D, Treede RD (1997): Co-expression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* **231**: 33-36
- Ko MC, Woods JG (1999): Local administration of delta9-tetrahydrocannabinol attenuates capsaicin-induced thermal nociception in rhesus monkeys: a peripheral cannabinoid action. *Psychopharmacology* **143**: 322-326
- Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K (2005b): Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A δ /C-fibers and colocalization with Trk receptors. *J Comp Neurol* **493**: 596-606
- Kobayashi K, Fukuoka T, Yamanaka H, Dai Y, Obata K, Tokunaga A, Noguchi K (2005a): Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Comp Neurol* **481**: 377-390
- Köfalvi A, Oliveira CR, Cunha RA (2006): Lack of evidence for functional TRPV1 vanilloid receptors in rat hippocampal nerve terminals. *Neurosci Lett* **403**: 151-156
- Kollarik M, Udem BJ (2004): Activation of bronchopulmonary vagal afferent nerves with bradykinin, acid and vanilloid receptor agonists in wild-type and TRPV1-/-mice. *J Physiol* **555**: 115-123
- Kornhuber J, Bleich S, Wiltfang J, Maler M, Parsons CG (1999): Flupirtine shows functional NMDA receptor antagonism by enhancing Mg^{2+} block via activation of voltage independent potassium channels. *J Neural Transm* **106**: 857-867
- Kruman II, Mattson MP (1999): Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem* **72**: 529-540
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lauria G, Morbin M, Lombardi R, Capobianco R, Camozzi F, Pareyson D, Manconi M, Geppetti P (2006): Expression of capsaicin receptor immunoreactivity in human peripheral nervous system and in painful neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* **11**: 262-271
- Lewinter RD, Skinner K, Julius D, Basbaum AI (2004): Immunoreactive TRPV-2 (VRL-1), a capsaicin receptor homolog, in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* **470**: 400-408
- Li J, Daughters RS, Bullis C, Bengiamin R, Stucky MW, Brennan J, Simone DA (1999): The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats. *Pain* **81**: 25-33

- Liapi A, Wood JN (2005): Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein TRPV2 and the capsaicin receptor TRPV1 in the adult rat cerebral cortex. *Eur J Neurosci* **22**: 825-834
- Lim G, Sung B, Ji RR, Mao JR (2003): Upregulation of spinal cannabinoid-1 receptors following nerve injury enhances the effects of WIN 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain* **105**: 275-283
- Liu B, Ma W, Ryu S, Qin F (2004a): Inhibitory modulation of distal C-terminal on protein kinase C-dependent phospho-regulation of rat TRPV1 receptors. *J Physiol* **560**: 627-638
- Liu M, Huang W, Wu D, Priestly JV (2006): TRPV1, but not P2X₃, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. *Eur J Neurosci* **24**: 1-6
- Liu M, Liu MC, Magoulas C, Priestly JV, Willmott NJ (2003): Versatile regulation of cytosolic Ca²⁺ by vanilloid receptor 1 in rat dorsal root ganglion neurons. *J Biol Chem* **278**: 5462-5472
- Liu M, Willmott NJ, Michael GJ, Priestly JV (2004b): Differential pH and capsaicin responses of *griffonia simplicifolia* IB4 (IB4)-positive and IB4-negative small sensory neurons. *Neuroscience* **127**: 659-672
- Lo YC, Yang YC, Wu IC, Kuo FC, Liu CM, Wang HW, Kuo CH, Wu JY, Wu DC (2005): Capsaicin-induced cell death in a human gastric adenocarcinoma cell line. *World J Gastroenterol* **11**: 6254-6257
- Lu G, Henderson G, Liu L, Reinhart PH, Simon SA (2005): TRPV1b, a functional human vanilloid receptor splice variant. *Mol Pharmacol* **67**: 1119-1127
- Lyfenko A, Vlachova V, Vyklicky L, Dittert I, Kress M, Reeh PW (2002): The effects of excessive heat on heat-activated membrane currents in cultured dorsal root ganglia neurons from neonatal rat. *Pain* **95**: 207-214
- Ma QP (2001): Vanilloid receptor homologue, VRL1, is expressed by both A- and C-fiber sensory neurons. *Neuroreport* **12**: 3693-3695
- Ma QP (2002): Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. *Neurosci Lett* **319**: 87-90
- Magerl W, Fuchs PN, Meyer RA, Treede RD (2001): Roles of capsaicin-insensitive nociceptors in cutaneous pain and secondary hyperalgesia. *Brain* **124**: 1754-1764
- Malin SA, Molliver DC, Koerber HR, Cornuet P, Frye R, Albers KM, Davis BM (2006): Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors *in vitro* and produce thermal hyperalgesia *in vivo*. *J Neurosci* **26**: 8588-8599
- Malmberg AB, Mizisin AP, Calcutt NA, von Stein T, Robbins WR, Bley KR (2004): Reduced heat sensitivity and epidermal nerve fiber immunostaining following single applications of high-concentration capsaicin patch. *Pain* **111**: 360-367
- Marinelli S, Di Marzo V, Berretta N, Matias I, Maccarrone M, Bernardi G, Mercuri NB (2003): Presynaptic facilitation of glutamergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci* **23**: 3136-3144
- Martin WJ, Loo CM, Basbaum AI (1999): Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain* **82**: 199-205

- Massa F, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Monory K, Cravatt BF, Ferri GL, Sibaev A, Storr M, Lutz B (2004): The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clinical Invest* **113**: 1202-1209
- Massegeff RF, Albert WH, Staines NA (1993): *Methods of immunological analysis*. VCH Verlag, Weinheim
- McDonnell MW, Studier MN (1977): Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* **110**: 119-146
- Merskey H, Albe-Fessard D, Bonica JJ, Carmon A, Dubner R, Kerr FWL, Lindblom U, Mumford JM, Nathan PW, Noordenbos W, Pagni CA, Renner MJ, Sternbach RA, Sunderland S (1979): Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. *Pain* **6**: 249-252
- Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A., Blumberg PM, 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. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3655–3660
- Michael GJ, Priestly JV (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. *J Neurosci* **19**: 1844-1854
- Miles LEM, Hales CN (1968): Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* **219**: 186-189
- Millns PJ, Chapman V, Kendall DA (2001): Cannabinoid inhibition of the capsaicin-induced calcium response in rat dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol* **132**: 969-971
- Montell C (2005): Drosophila TRP channels. *Pflügers Archiv* **451**: 19-28
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V (2002b): The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**: 595-598
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002a): A unified nomenclature for a superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* **9**: 229-231
- Morisset V, Ahluwalia J, Nagy I, Urban L (2001): Possible mechanisms of cannabinoid-induced antinociception in the spinal cord. *Eur J Pharmacol* **429**: 93–100
- Morozov YM, Freund TF (2003): Post-natal development of type 1 cannabinoid receptor immunoreactivity in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **18**: 1213-1222
- Mu J, Zhuang SY, Hampson RE, Deadwyler SA (2000): Protein kinase-dependent phosphorylation and cannabinoid receptor modulation of potassium A current (I_A) in cultured rat hippocampal neurons. *Pflügers Archiv* **439**: 514-546
- Mu J, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA (1999): Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther* **291**: 893-902

- Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Qant Biol **51**: 263-273
- Munro G, Erichsen HK, Mirza NR (2007): Pharmacological comparison of anticonvulsant drugs in animal models of persistent pain and anxiety. Neuropharmacol **53**: 609-618
- Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa, M, Imaizumi Y (2003): TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. Circ Res **93**: 829–838
- Naeini RS, Witty MF, Seguela P, Bourque CW (2006): An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. Nat Neurosci **9**: 93-98
- Nagasawa M, Nakagawa Y, Tanaka S, Kojima I (2007): Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages. J Cell Physiol **210**: 692-702
- Nathans D, Smith HO (1975): Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. Annu Rev Biochem **44**: 273-293
- Nilius B, Voets T (2005): TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. Pflügers Archiv **451**: 1-10
- Nitabach MN, Llamas DA, Thompson IJ, Collins KA, Holmes TC (2002): Phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent modes of modulation of *shaker* family voltage-gated potassium channels by Src family protein tyrosine kinases. J Neurosci **22**: 7913-7922
- Nolano M, Simone DA, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T, Hazen E, Kennedy WR (1999): Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. Pain **81**: 135-145
- Ohta T, Ikemi Y, Murakami M, Imagawa T, Otsuguro K, Ito S (2006): Potentiation of transient receptor potential V1 functions by activation of metabotropic 5-HT receptors in rat primary sensory neurons. J Physiol **576**: 809-822
- Ornstein L (1964): Disc electrophoresis-background and theory. Ann N Y Acad Sci **121**: 321-349
- Oshita K, Inoue A, Tang HB, Nakata Y, Kawamoto M, Yuge O (2005): CB1 cannabinoid receptor stimulation modulates transient receptor potential vanilloid receptor 1 activities in calcium influx and substance P release in cultured dorsal root ganglion cells. J Pharmacol Sci **97**: 377-985
- Passmore GM, Selyanko AA, Mistry M, Al Qatari M, Marsh SJ, Matthews EA, Dickenson AH, Brown TA, Burbidge SA, Main M, Brown DA (2003): KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. J Neurosci **23**: 7227–7236
- Pedersen, SF, Owsianik G, Nilius B (2005): TRP channels: An overview. Cell Calcium **38**: 233-252
- Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002): A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. Science **296**: 2046-2049
- Pertwee RG (2001): Cannabinoid receptors and pain. Prog Neurobiol **63**: 569–611
- Pertwee RG (2005): Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. Life Sci **76**: 1307-1324

- Petruska JC, Napaporn J, Johnson RD, Gu JGG, Cooper BY (2000): Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: Histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents. *J Neurophysiol* **84**: 2365–2379
- Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA (1998): Immunohistochemical localization of the neuronal cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* **51**: 391-402
- Pongs O (1992): Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol Rev* **72**: S69–S88
- Pongs O (1999): Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett* **452**: 31–35
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599
- Prescott ED, Julius D (2003): A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* **300**: 1284-1288
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006): An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**: 619-647
- Rasband MN, Park EW, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Trimmer JS (2001): Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13373–13378
- Rau KK, Jiang N, Johnson RD, Cooper BY (2007): Heat sensitization in skin and muscle nociceptors expressing distinct combinations of TRPV1 and TRPV2 protein. *J Neurophysiol* **97**: 2651-2662
- Raymond S, Weintraub L (1959): Acrylamid gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**: 711
- Reed JC, Green DR (2000): Remodeling for demolition: changes in mitochondrial ultrastructure during apoptosis. *Mol Cell* **9**: 1-3
- Reilly CA, Johansen ME, Lanza DL, Lee J, Jin JO, Yost GS (2005): Calcium-dependent and independent mechanisms of capsaicin receptor (TRPV1)-mediated cytokine production and cell death in human bronchial epithelial cells. *J Biochem Mol Toxicol* **19**: 266-275
- Reilly CA, Taylor JL, Lanza DL, Carr BA, Crouch DJ, Yost GS (2003): Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicol Sci* **73**: 170–181
- Renton T, Yiangou Y, Baecker PA, Ford AP, Anand P (2003): Capsaicin receptor VR1 and ATP purinoceptor P2X3 in painful and nonpainful human tooth pulp. *J Orofac Pain* **17**: 245–250
- Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM (1998a): Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur J Pharmacol* **345**: 145-153
- Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM (1998b): Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain* **75**: 111-119
- Richeux F, Cascante M, Ennamany R, Saboureau D, Creppy EE (1999): Cytotoxicity and genotoxicity of capsaicin in human neuroblastoma cells SHSY-5Y. *Arch Toxicol* **73**: 403-409

- Richeux F, Cascante M, Ennamany R, Sanchez D, Sanni A, Saboureau D, Creppy EE (2000): Implications of oxidative stress and inflammatory process in the cytotoxicity of capsaicin in human endothelial cells: lack of DNA strand breakage. *Toxicology* **147**: 41-49
- Roeper J, Lorra C, Pongs O (1997): Frequency-dependent inactivation of mammalian A-type K⁺ channel Kv1.4 regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurosci* **17**: 3379-3391
- Ross RA, Coutts AA, McFarlane SM, Anavi-Goffer S, Irving AJ, Pertwee RG, MacEwan DJ, Scott RH (2001): Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology* **40**: 221-232
- Rukwied R, Watkinson A, McGlone F, Dvorak M (2003): Cannabinoid agonists attenuate capsaicin-induced responses in human skin. *Pain* **102**: 283-288
- Rutter AR, Ma QP, Leveridge M, Bonnert TP (2005): Heteromerization and colocalization of TrpV1 and TrpV2 in mammalian cell lines and rat dorsal root ganglia. *Neuroreport* **16**: 1735-1739
- Safronov BV, Bischoff U, Vogel W (1996): Single voltage-gated K⁺ channels and their functions in small dorsal root ganglion neurones of rat. *J Physiol* **493**: 393-408
- Sagar DR, Kelly S, Millns PJ, O'Shaughnessey CT, Kendall DA, Chapman V (2005): Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Eur J Neurosci* **22**: 371-379
- Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354
- Salio C, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M (2002): Pre- and postsynaptic localizations of the CB1 cannabinoid receptor in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* **110**: 755-764
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular cloning, a laboratory manual*. Second edition 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sanchez JF, Krause JE, Cortright DN (2001): The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* **107**: 373-381
- Sañudo-Peña MC, Strangman NM, Mackie K, Walker JM, Tsou K (1999): CB1 receptor localization in rat spinal cord and roots, dorsal root ganglion, and peripheral nerve. *Acta Pharmacol Sin* **20**: 1115-1120
- Saunders CIM, Kunde DA, Crawford A, Geraghty DP (2007): Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Mol Immunol* **44**: 1429-1435
- Savidge JR, Ranasinghe SP, Rang HP (2001): Comparison of intracellular calcium signals evoked by heat and capsaicin in cultured rat dorsal root ganglion neurons and in cell line expressing the rat vanilloid receptor VR1. *Neuroscience* **102**: 177-184
- Schicho R, Skofitsch G, Donnerer J (1999): Regenerative effect of human recombinant NGF on capsaicin-lesioned sensory neurons in the adult rat. *Brain Res* **815**: 60-69
- Scholz J, Woolf CJ (2002): Can we conquer pain? *Nat Neurosci* **5** (Suppl.): 1062-1067
- Schumacher MA, Moff I, Sudanagunta SP, Levine JD (2000): Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor. *J Biol Chem* **275**: 2756-2762

- Schwarz S, Greffrath W, Büsselberg D, Treede RD (2000): Inactivation and tachyphylaxis of heat-evoked inward currents in nociceptive primary sensory neurones of rats. *J Physiol* **528**: 539-549
- Shimosato G, Amaya F, Ueda M, Tanaka Y, Decosterd I, Tanaka M (2005): Peripheral inflammation induces up-regulation of TRPV2 expression in rat DRG. *Pain* **119**: 225-232
- Shin CY, Shin J, Kim BM, Wang MH, Jang JH, Surh YJ, Oh U (2003): Essential role of mitochondrial permeability transition in vanilloid receptor 1-dependent cell death of sensory neurons. *Mol Cell Neurosci.* **24**: 57-68
- Siegling A, Hofmann HA, Denzer D, Mauler F, De Vry J (2001): Cannabinoid CB1 receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* **415**: R5-R7
- Sikand P, Premkumar LS (2007): Potentiation of glutamergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. *J Physiol* **581**: 631-647
- Silbenagl S, Despopoulos A (2007): Taschenatlas Physiologie. 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Simone DA, Nolano M, Johnson T, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR (1998): Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: Correlation with sensory function. *J Neurosci* **18**: 8947-8954
- Simone DA, Ochoa J (1991): Early and late effects of prolonged topical capsaicin on cutaneous sensibility and neurogenic vasodilatation in humans. *Pain* **47**: 285-294
- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB (2002): TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **418**: 186-190
- Snider WD, McMahon SB (1998): Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors. *Neuron* **20**: 629-632
- Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB (2003): Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **304**: 217-222
- Ständer S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metzger D, Steinhoff M (2004): Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol* **13**: 129-139
- Ständer S, Schmelz M, Metzger D, Luger T, Rukwied R (2005): Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J Dermatol Sci* **38**: 177-188
- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, Patel AS, Nelson JB, Futrell WJ, Yoshimura N, Chancellor MB, De Miguel F (2004): Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol* **172**: 1175-1178
- Stucky CL, Lewin GR (1999): Isolectin B-4-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci* **19**: 6497-6505
- Stühmer W, Ruppersberg JP, Schröter KH, Sakmann B, Stocker M, Giese KP, Pusch A, Baumann A, Pongs O (1989): Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J* **8**: 3235-3244

- Studier FW, Moffatt BA (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130
- Sugiura T, Waku K (2002). Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J Biochem* **132**: 7-12
- Sulkowski E (1989): The saga of IMAC und MIT. *Bioessays* **10**: 170-175
- Szöke E, Balla Z, Csernoch L, Czeh G, Szolcsanyi J (2000): Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones. *Neuroreport* **11**: 1949-1952
- Szöke E, Seress L, Szolcsányi (2002): Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience* **113**: 925-937
- Szolcsanyi J, Anton F, Reeh PW, Handwerker HO (1988): Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Res* **446**: 262-268
- Tamura S, Morikawa Y, Senba E (2005): TRPV2, a capsaicin receptor homologue, is expressed predominantly in the neurotrophin-3-dependent subpopulation of primary sensory neurons. *Neuroscience* **130**: 223-228
- Tanimoto T, Takeda M, Nasu M, Kadoi J, Matsumoto S (2005): Immunohistochemical co-expression of carbonic anhydrase II with Kv1.4 and TRPV1 in rat small-diameter trigeminal ganglion neurons. *Brain Res* **1044**: 262-265
- Tao Y, Zeng R, Shen B, Jia J, Wang Y (2005): Neuronal transmission stimulates the phosphorylation of Kv1.4 channel at Ser229 through protein kinase A1. *J Neurochem* **94**: 1512-1522
- Thein SL, Wallace RB (1986): The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. *Human genetic diseases: A practical approach*. Ed Davis KE, IRL Press, Herndon, Virginia: 33-50
- Tian W, Fu Y, Wang DH, Cohen DM (2006): Regulation of TRPV1 by a novel renally expressed rat TRPV1 splice variant. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**: F117-F126
- Tognetto M, Amadesi S, Harrison S, Creminon C, Trevisani M, Carreras M, Matera M, Geppetti P, Bianchi A (2001): Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J Neurosci* **21**: 1104-1109
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998): The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**: 531-543
- Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Csiba L, Blumberg PM (2005): Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **135**: 162-168
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354
- Treede RD (2001): Physiologische Grundlagen der Schmerzentstehung und Schmerztherapie. In: Zenz M, Jurna I (Hg.): *Lehrbuch der Schmerztherapie*, 2. Auflage, Kapitel 3: 39-63. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH

- Treede RD (2007): Das somatosensorische System. In: Schmidt RF, Thews G: Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. 30. Auflage, Kapitel 14: 296-323. Springer Verlag
- Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN (1995): Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol* **483**: 747-758
- Trimmer JS, Rhodes KJ (2004): Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol* **66**: 477-519
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena C, Mackie K, Walker JM (1998): Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* **83**: 393-411
- Ugawa S, Ueda T, Yamamura H, Shimada S (2005): In situ hybridization evidence for the coexistence of ASIC and TRPV1 within rat single sensory neurons. *Brain Res Mol Brain Res* **136**: 125-133
- Ullmann A, Jacob F, Monod J (1967): Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **24**: 339-343
- Valtschanoff JG, Rustioni A, Guo A, Hwang SJ (2001): Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol* **436**: 225-235
- 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
- Van der Stelt M, Di Marzo V (2004): Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* **271**: 1827-1834
- Vazquez E, Valverde MA (2006): A review of TRP channels splicing. *Semin Cell Dev Biol* **17**: 607-617
- Vlachova V, Teisinger J, Susankova K, Lyfenko A, Ettrich R, Vyklicky L (2003): Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci* **23**: 1340-1350
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A (1979): The enzyme linked immunosorbent assay ELISA: A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Laboratories, Alexandria, Virginia
- Vos MH, Neelands TR, McDonald HA, Choi W, Kroeger PE, Puttfarcken PS, Faltynek CR, Moreland RB, Han P (2006): TRPV1b overexpression negatively regulates TRPV1 responsiveness to capsaicin, heat and low pH in HEK293 cells. *J Neurochem* **99**: 1088-1102
- Vydyanathan A, Wu ZZ, Chen SR, Pan HL (2005): A-type voltagegated K⁺ currents influence firing properties of isolectin B4-positive but not -negative primary sensory neurons. *J Neurophysiol* **93**: 3401-3409
- Wang C, Hu HZ, Colton CK, Wood JD, Zhu MX (2004): An alternative splicing product of the murine *trpv1* gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *J Biol Chem* **279**: 423-430
- Wang S, Lim G, Mao J, Sung B, Yang L, Mao J (2007): Central glucocorticoid receptors regulate the upregulation of spinal cannabinoid-1 receptors after peripheral nerve injury in rats. *Pain* **131**: 96-105
- Ward SM, Bayguinov J, Won KJ, Grundy D, Berthoud HR (2003): Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* **465**: 121-135

- Watanabe T, Sakurada N, Kobata K (2001): Capsaicin-, resiniferatoxin-, and olvanil-induced adrenaline secretions in rats via the vanilloid receptor. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 2443-2447
- Weber K, Osborn M (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**: 4406-4412
- Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC (1968): Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem* **243**: 4543-4555
- Wells DE, Bibb WF (1986): A method for freezing hybridoma clones in 96-well microculture plates. *Meths Enzymol* **121**: 417-422
- Westermeier R, Gronau S, Schickle H (1989): Semidry-Blotting von Proteinen aus SDS- und IEF-Polyacrylamidgelen. Pharmacia, Freiburg, Sonderdruck SD 072
- Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM (2004): Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *J Neurosci* **24**: 6410-6415
- Wu YJ, Dworetzky SI (2005): Recent developments of KCNQ potassium channel openers. *Curr Med Chem* **12**: 453-460
- Yazulla S, Studholme KM (2004): Vanilloid receptor like 1 (VRL1) immunoreactivity in mammalian retina: Colocalization with somatostatin and purinergic P2X1 Receptors. *J Comp Neurol* **474**: 407-418
- Yiangou Y, Facer P, Dyer NH, Chan CL, Knowles C, Williams NS, Anand P (2001a): Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet* **357**: 1338-1339
- Yiangou Y, Facer P, Ford A, Brady C, Wiseman O, Fowler CJ, Anand P (2001b): Capsaicin receptor VR1 and ATP gated ion channel P2X3 in human urinary bladder. *BJU Int* **87**: 774-779
- Yoshimura N, de Groat WC (1999): Increased excitability of afferent neurons innervating rat urinary bladder after chronic bladder inflammation. *J Neurosci* **19**: 4644-4653
- Yost CS (1999): Potassium channels: basic aspects, functional roles and medical significance. *Anesthesiology* **90**: 1186-1203
- Xu L, Enyeart JA, Enyeart JJ (2001): Neuroprotective agent riluzole dramatically slows inactivation of Kv1.4 potassium channels by a voltage-dependent oxidative mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* **299**: 227-237
- Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE (2002): TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**: 181-186
- Xue Q, Yu Y, Trilk SL, Jong BE, Schumacher MA (2001): The genomic organization of the gene encoding the vanilloid receptor: evidence for multiple splice variants. *Genomics* **76**: 14-20
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999): Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 5780-5785

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang HH, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED (1999): Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**: 452-457

9. Anhang

9.1 Sequenzen

In den folgenden Sequenzen von TRPV1 und TRPV2 mit Angabe der *GenBank accession number* (Acc.No.) sind die Primer enthalten, die für die Amplifikationen verwendet wurden. Vorwärtsprimer sind durch 'F' und (→) und Rückwärtsprimer durch 'R' und (←) gekennzeichnet. Die Bezeichnung 'RT' und die **blaue Markierung** weist auf die Primer für die RT-PCR der N-terminalen Bereiche und die **braune Markierung** für die RT-PCR von Volllänge-TRPV1, die **rote Markierung** auf die degenerierten Primer für die N-Termini und die **violette Markierung** auf die degenerierten Primer von Volllänge-TRPV1 hin. Die **grüne Markierungen** entsprechen den artifiziellen Schnittstellen. Zusätzlich sind Start-ATG und Stop-Codon **fett** dargestellt.

TRPV1 mRNA (Acc.No. AF029310)

VR1-RTF4 (→) cagctccaaggcaacttgctc	VR1-RTF2 (←) gtgtgcctgcacctagctg	
1 cagctccaaggcaacttgctccatttgggggtgtgctgcacctagctggttgcaaattgggccacagagga		70
VR1-VL-F1 (→) gaatccgaaaggatggaacaacgg		
VR1-F1 (→) ggatccgaacaacgggctagctta		
71 tctggaaaggatggaacaacgggctagcttagactcagaggagtctgagtccccacccaagagaactcc		140
141 tgcttgaccctccagacagagaccctaactgcaagccacctccagtcagccccacatcttactacca		210
211 ggagtcgtaccggctttttgggaagggtgactcggaggaggcctctcccctggactgccttatgagga		280
281 agcggggtggcttctgcctatcatcactgtcagctctgttctaactatccagaggcctggggatgga		350
	VR1-R1 (←) gtctccgctggtgagaagtaggaattc	
351 cctgccagtgtcaggccgtcatcccaggactccgtctccgctggtgagaagccccagagctctatgatc		420
421 gcaggagcatcttcgatgctgtggctcagagtaactgccaggagctggagagcctgctgcccttctcgtca		490
491 gaggagcaagaagcctgactgacagcgagttcaaagaccagagacaggaaagacctgtctgctaaaa		560
561 gccatgctcaatctgcacaatgggcagaatgacaccatcgctctgctcctggacgttgcccggaagacag		630
631 acagcctgaagcagttgtcaatgccagctacacagacagctactacaagggccagacagcactgcacat		700
VR1-RTR4 (←) attgaacggcgggaacatgac		
701 tggcattgaacggcgggaacatgacgctggtgaccctcttgggtggagaatggagcagatgtccaggctgcg		770
771 gctaacggggacttcttcaagaaaacaaagggaggcctggcttctactttggtgagctgcccctgtccc		840
841 tggctgctgcaccaaccagctggcattgtgaagttcctgctgcagaactcctggcagcctgcagacat		910
911 cagcggccgggactcagtgggcaacacgggtgcttcatgccctgggtggaggtggcagataaacacagttgac		980
981 aacaccaagttcgtgacaagcatgtacaacgagatcttgatcctgggggcccactccaccccacgctga		1050
1051 agctggaagagatcaccaacaggaaggggctcacgccactggctctggctgctagcagtggggaagatcgg		1120
1121 ggtcttggcctacattctccagagggagatccatgaaccggagtgccgacacctatccaggaagttcacc		1190

1191 gaatgggcctatgggcccagtgccactcctccctttatgacctgtcctgcattgacacctgtgaaaagaact 1260
 1261 cggttctggaggtgatcgcttacagcagcagtgagaccctaaccgtcatgacatgcttctcgtggaacc 1330
 1331 cttgaaccgactcctacaggacaagtgggacagatttgtcaagcgcacatcttctacttcaacttcttcgtc 1400
 1401 tactgcttgatatgatcatcttcaccgcggtgctactatcgccctgtggaaggcttgccccctata 1470

1471 agctgaaaaaacaccgttggggactatttccgagtcaccggagagatcttgtctgtgtcaggaggagtcta 1540
 1541 cttcttctccgagggattcaatatttctcgcagaggcgaccatccctcaagagtttgtttgtggacagc 1610
 1611 tacagtgagatacttttctttgtacagtgcgtgttcatgctgggtgtctgtgggtactgtacttcagccaac 1680
 1681 gcaaggagtatgtggcttccatgggtgttctccctggccatgggctggaccaacatgctctactatacccg 1750
 1751 aggattccagcagatgggcatctatgctgtcatgattgagaagatgatcctcagagacctgtgccggttt 1820
 1821 atgttcgtctacctcgtgttcttgtttggattttccacagctgtgggtgacactgattgaggatgggaaga 1890
 1891 ataactctctgcctatggagtccacaccacacaagtgccgggggtctgcctgcaagccaggtaactctta 1960
 1961 caacagcctgtattccacatgtctggagctgttcaagttcaccatcgccatgggagacctggagttcact 2030
 2031 gagaactacgacttcaaggctgtcttcatcatcctgttactggcctatgtgattctcacctacatccttc 2100
 2101 tgcacaacatgctcattgctctcatgggtgagaccgtcaacaagattgcacaagagagcaagaacatctg 2170
 2171 gaagctgcagagagccatcaccatcctggatacagagaagagcttctgaagtgcagaggaaggccttc 2240
 2241 cgctctggcaagctgctgcaggtgggttctactcctgacggcaaggatgactaccggtgggtgtttcaggg 23100
 2311 tggacgaggtaaactggactacctggaacaccaatgtgggtatcatcaacgaggaccaggaactgtga 2380
 2381 gggcgtcaagcgcaccctgagcttctccctgaggtcaggccgagtttcagggagaaactggaagaacttt 2450
 2451 gccttggttccccttctgagggatgcaagcactcgagatagacatgccaccagcaggaagaagttcaac 2520

VR1-VL-R1 (-)
cagggga

2521 tgaagcattatacgggatcccttaagccagaggatgctgaggttttcaaggattccatggtcccagggga 2590

gaaataatggctctaga

2591 gaaataatggacactatgcagggatcaatgccccgtcttgggtggtctgcttagggaaccagcaggggtt 2660
 2661 gacgttatctgggtccactctgtgcctgcctagggcacattcctaggacttcggcgggcctgctgtgggaa 2730

VR1-RTR4 (-)
tatccaacatgatctccaa

2731 ctgggaggtgtgtgggaattgagatgtgtatccaacatgatctccaaacatttgctttcaactcttta 2800
 2801 tggactttatataaacagagtgaaatggcaaatctctacttggacacat

TRPV2 mRNA (Acc.No. AF129113)

VRL1-RTF1 (-)
gtccactgtgtgagacgaac

1 ggcgttaaaccctgctctgtccactgtgtgagacgaacaggtggaggggtggacgacgcagagaaagctcgg 70
 71 agcgggcccgcggaggttcccacagccccattactgtcagcgttgagccgccccctccgggcccacttc 140
 141 ctctctcagtccccgctgccggagagccccgctaggctcgggtgatcctagcctgcagtttgccgcccgcta 210
 211 caccttggcttcagcctgccccgtcccagccaggcctgcccctgcgggtatgagagaggaaccttaacatc 280

VRL1-F1 (-)
ggatccacttcagcctccagccc

281 tccatctctacagaggtttcagctgtaaggagcatcctcctctctcaggatgacttcagcctccagcccc 350
 351 ccagctttcaggctggagacttccgatggagatgaagagggcaatgctgaggtgaacaaggggaagcagg 420
 421 aaccgccccccatggagtcaccattccagagggaggaccggaattcctcccctcagatcaaagtgaacct 490
 491 caacttcataaagagacctcctaaaaacacttctgctcccagccagcaggagccagatcgggttgaccgt 560

VRL1-R1 (-)

cgactcttcagtggtctcccggggtgtccccgaggaactgactggactgctagaatacctgcgct

561 gaccgactcttcagtggtctcccggggtgtccccgaggaactgactggactgctagaatacctgcgct 630
 631 ggaacagcaagtacctcactgactctgcatacacagaaggctccactggaaagacgtgacctgatgaaggc 700
 701 tgtgctgaaccttcaggatgggggtcaatgctgcatcatgccgctgctgcagattgacaaggattccggc 770

VRL1-RTR4 (-)

acagtgcgctgcacatcg

771 aatcccaagcccctcgtcaatgcccagtgaccgatgagttctaccaaggccacagtgcgctgcacatcg 840

c

841 ccatagagaagaggagcctgcagtgctggaagctgctggtagagaatggagcggatgttcacctccgagc 910

911 ctgtggccgcttcttccaaaagcaccaaggaacttgtttctatthttggagagctacctctttctctggct 980
 981 gcgtgcaccaagcagtgggatgtggtgacctacctctggagaaccacaccagccggccagcctggagg 1050
 1051 ccaccgactccctgggcaacacagtctcgcacagctctggaatgattgcagataactcgctgagaacag 1120
 1121 tgccttggtgatccacatgtacgacggcttctacaaatgggggcgcctctgccccactgtgcagctt 1190
 1191 gaggaaatctccaaccaccaaggcctcacacccctgaaactagccgccaaggaaggcaaaatcgagattt 1260
 1261 tcaggcacattctgcagcgggaattctcaggaccgtaccagccctttcccgaagtttactgagtggtg 1330
 1331 ttacggctcctgtgcgggtatcgctgtacgacctgtcctctgtggacagctgggaaaagaactcgggtctg 1400
 1401 gagatcatcgcttttcattgcaagagcccgaaccggcaccgcatggtggttttagaaccactgaacaagc 1470
 1471 ttctgcaggagaaatgggatcggctcgtctcaagattcttcttcaacttcgcctgctacttgggtctacat 1540
 1541 gttcatcttcaccgctcgttgccctaccaccagccttccctggatcagccagccatcccctcatcaaaagcg 1610
 1611 acttttggggaatccatgctgctgctgggccacattctgatcctgcttgggggtatttacctcttactgg 1680
 1681 gccagctggtgacttttggcggcgccgctgtttatctggatctcatctcatggacagctactttgaaat 1750
 1751 cctctttctccttcaggctctgctcacagtgctgtcccagggtgctgcgcttcatggagactgaatggtac 1820
 1821 ctaccctctgctagtgttatccctagtgtgggctggctgaaactgctttactacacacggggctttcagc 1890
 1891 acacaggcatctacagtgctcatgatccagaaggctccttcgagacctgctccgcttctctgctggtcta 1960
 1961 cctggtcttctctttcggcttctgctgtagccctagtaagcttgagcagagaggcccgaaagtcocaaagcc 2030
 2031 cctgaagataacaactccacagtgacggaacagcccacgggtgggcccaggaggaggagccagctccatatac 2100
 2101 ggagcattctggatgcctccctagagctgttcaagttcaccattggtatgggggagctggctttccagga 2170
 2171 acagctgcgctttctgctggggtggtcctgctgttgctgttggcctacgtccttctcacctacgtcctgctg 2240
 2241 ctcaacatgctcattgctctcatgagcgaaactgtcaaccacgttgctgacaacagctggagcatctgga 2310
 2311 agttgcagaaagccatctctgtcttgagatggagaatggttactggtggtgcccggaggaagaaacatcg 2380
 2381 tgaaggaggctgctgaaagtcggcaccaggggggatggtaccctgatgagcgtggtgcttcagggtg 2450
 2451 gaggaagtaaatgggctgcttgggagaagactcttcccaccttatctgaggatccatcagggccaggca 2520
 2521 tcaactggaataaaaaagaacccaacctctaaaccggggaagaacagtgccctcagaggaagaccatctgcc 2590
 2591 ccttcaggctcctccagtccccctgatggcccagatgcagcagcaggctggcaggatggagtagggaatct 2660
 2661 tcccagccacaccagaggctactgaatthttggtagaaatataaatatthtttttgcac

9.2 Tabellen

Tab. 8: Ko-Expression von TRPV1, TRPV2, Kv1.4 und CB1 in Spinalganglienschnitten

	Anzahl der Tiere (n)	Ko-Expression (%) ¹	Ko-Expression (%) ²	Durchmesser (μm)
TRPV1 mit				
TRPV2	6	4.7 \pm 1.3	1.7 \pm 0.5	24.7 \pm 1.2
Kv1.4	4	86.8 \pm 1.8	26.3 \pm 0.5	18.9 \pm 0.8
CB1-Protein	4	85.0 \pm 3.3	24.4 \pm 2.7	20.2 \pm 0.5
CB1-mRNA	2	78.8 \pm 8.6	24.4 \pm 0.2	18.3 \pm 1.8
TRPV2 mit				
TRPV1	6	20.7 \pm 5.3	1.7 \pm 0.5	24.7 \pm 1.2
Kv1.4	3	0	0	n. verwendbar
CB1-Protein	4	6.2 \pm 3.9	0.23 \pm 0.1	24.3 \pm 3.9
CB1-mRNA	2	82.4 \pm 17.7	2.2 \pm 0.3	32.2 \pm 2.6
Kv1.4 mit				
TRPV1	4	73.9 \pm 1.5	26.3 \pm 0.5	18.9 \pm 0.8
TRPV2	3	0	0	n. verwendbar
CB1-Protein	3	93.1 \pm 0.1	33.9 \pm 0.4	18.2 \pm 1.3
CB1-mRNA	1	92	29.8	18.5
CB1-Protein mit				
TRPV1	4	69.4 \pm 6.5	24.4 \pm 2.7	20.2 \pm 0.5
TRPV2	4	0.6 \pm 0.4	0.23 \pm 0.1	24.3 \pm 3.9
Kv1.4	3	90.2 \pm 0.3	33.9 \pm 0.4	18.2 \pm 1.3
CB1-mRNA mit				
TRPV1	2	43.5 \pm 1.5	24.4 \pm 0.2	20.3 \pm 1.8
TRPV2	2	4.0 \pm 0.4	2.2 \pm 0.3	32.2 \pm 2.6
Kv1.4	1	46.7	29.8	18.5

¹ der Positiven in Bezug auf den entsprechenden Marker
² von allen Neuronen

Tab. 9: Expression von TRPV1, TRPV2, Kv1.4 und CB1 in Spinalganglienneuronen der Ratte

	Anzahl der Tiere (n)	Positive Neurone absolut (n)	relativ (%)	Durchmesser (μm)
Kv1.4	5	5,105 von 14,342	35.7 ± 0.5	18.6 ± 0.6
TRPV1	14	3,532 von 11,268	32.3 ± 1.2	20.4 ± 0.6
TRPV2	13	557 von 9,920	6.2 ± 0.7	27.8 ± 0.6
CB1 (Protein)	7	3,241 von 8,880	36.4 ± 0.5	19.5 ± 0.7
CB1 (mRNA)	2	2,217 von 3,819	57.1 ± 2.5	20.7 ± 2.1

10. Abkürzungsverzeichnis

A	A	Ampère(s)
	Abb.	Abbildung
	Acc. No.	Genbank <i>accession number</i>
	AEA	Anandamid
	Ak	Antikörper
	AM	Acetoxymethylester
	AMH	A-Faser Mechano-Hitze-Nozizeptoren
	AP	Alkalische Phosphatase
	4-AP	4-Aminopyridin
	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
	AS	Aminosäure
	ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
B	bp	Basenpaare
	BCIP	X-Phosphat: 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
	BSA	Bovines Serumalbumin
C	°C	Grad Celsius
	CaCl ₂	Kalziumchlorid
	cAMP	Adenosin-3',5'-monophosphat
	Caps	Capsaicin
	CaV _y	spannungsgesteuerter Kalziumkanal
	CB1	Cannabinoidrezeptor 1
	cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA
	cm	Zentimeter
	cm ²	Quadratzenimeter
	CMH	C-Faser Mechano-Hitze-Nozizeptoren
	CoCl ₂	Kobaltchlorid
	Cpz	Capsazepin
	C-terminal	carboxyterminal
	C-Terminus	Carboxyterminus
	Cy3	Indocarbocyanin

D	Da	<i>Dalton</i>
	dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
	DEPC	Diethylpyrocarbonat
	DIG	Digoxigenin
	DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
	dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
	DRG	<i>dorsal root ganglion</i> (Hinterwurzelganglion)
	DTT	1,4-Dithiothreitol
	dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
E	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
	EGTA	Ethylenglycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
	ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
	ENF	<i>epidermal nerve fibers</i> (epidermale Nervenfasern)
F	FA	Formamid
	FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Rinderserum)
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	g	Erdbeschleunigung [9,8m/s ²]
	g	Gramm
	G418	Geneticin
	GIRK	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
H	h	Stunde(n)
	HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
	HCl	Salzsäure
	HEK	<i>Human Embryonic Kidney cells</i>
	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure
	HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
	His	Histidin
	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
	H ₂ O	Wasser
	H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
	HT	Hypoxanthin-Thymidin

I	IB ₄	Isolectin B ₄
	Ig	Immunglobulin
	IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
K	kb	<i>kilobase(s)</i>
	KCl	Kaliumchlorid
	kDa	Kilodalton
	KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
	Kv	<i>voltage-gated</i> Kaliumkanal (spannungsgesteuerter Kaliumkanal)
	Kv1.4	Kv Subtyp 1.4 aus der Kv1-Familie
	L	l
	LB	Luria Bertani
	LiCl	Lithiumchlorid
M	M	molar [mol/l]
	mA	Milliampère(s)
	mAk	monoklonaler Antikörper
	mg	Milligramm
	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
	min	Minute(n)
	ml	Milliliter
	mm	Millimeter
	mM	millimolar [mmol/l]
	mmol	millimol
	mRNA	<i>messenger</i> RNA
	µg	Mikrogramm
	µM	mikromolar
	µmol	mikromol
	µl	Mikroliter
	N	NaCl
NaHCO ₃		Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄		Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄		Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH		Natriumhydroxid
NaVy		spannungsgesteuerter Natriumkanal
NBT		Nitrotetrazoliumblausäurechlorid

	ng	Nanogramm
	NGF	<i>nerve growth factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)
	nm	Nanometer
	nmol	nanomol
	NTA	<i>Nitrilotriacetic Acid</i>
	N-terminal	aminoterminal
	N-Terminus	Aminoterminus
O	OD	optische Dichte
	OPD	p-Phenylendiamin
P	p.a.	zur Analyse (<i>per analysis</i>)
	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
	PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
	PEG	Polyethylenglykol
	PFA	Paraformaldehyd
	pg	pikogramm
	pH	<i>potentia hydrogenii</i>
	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
	PKA	Proteinkinase A
	pmol	pikomol
	POD	Peroxidase
	PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
	RNase	Ribonuklease
	ROI	<i>region of interest</i>
	rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
	RT	Raumtemperatur
	<i>RT</i>	Reverse Transkription
	RTX	Resiniferatoxin
S	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
	sec	Sekunde(n)
	SEM	<i>standard error of mean</i> (Standardfehler)
	SSC	<i>Saline-Sodium Citrate</i>

T	Tab.	Tabelle
	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
	TBS	<i>tris-buffered saline</i>
	TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
	TG	trigeminale Ganglion
	T _m	Primer-Schmelztemperatur
	TM	transmembran
	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	TRP	transienter Rezeptor-Potenzial-Kanal
	TRPV	TRP vom Vanilloidrezeptortyp (Vanilloidrezeptor)
	TSS	<i>transformation and storage solution</i>
	Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monolaurat
U	ü.N.	über Nacht
	Ü.N.K.	über Nacht Kultur
	U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
	UV	ultraviolett
V	V	Volt
	VR1	<i>vanilloid receptor subtype 1</i>
	VRL1	<i>vanilloid receptor like protein 1</i>
	v/v	<i>volume per volume</i>
W	w/v	<i>weight per volume</i>
X	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galactopyranosid
	X-Phosphat	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Z	ZNS	zentrales Nervensystem

Veröffentlichungen

Kongressbeiträge

6. Jahrestreffen des IAK Molekulare und Zelluläre Neurobiologie (Mainz)

Binzen U, Greffrath W, Saaler-Reinhardt S, Treede RD (2006): Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons.

Annual Meeting der Society for Neuroscience (Atlanta)

Binzen U, Greffrath W, Saaler-Reinhardt S, Treede RD (2006): Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons. Program No. **441.14**. *Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2006. Online

Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (München)

Binzen U, Greffrath W, Saaler-Reinhardt S, Treede RD (2006): Co-expression of the cannabinoid receptor 1 (CB1) with the voltage-gated potassium channel Kv1.4 in nociceptive rat dorsal root ganglion neurons. *Acta Physiologica* **186** (Suppl. 1): 170

Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (Göttingen)

Binzen U, Greffrath W, Saaler-Reinhardt S, Treede RD (2005): Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Pflügers Archiv – Eur J Physiol* **449** (Suppl. 1): S118

Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (Bochum)

Greffrath W, Büsselberg D, Fischbach T, Binzen U, Nawrath H, Saaler-Reinhardt S, Treede RD (2003): Contribution of intracellular organelles to the transduction process for noxious heat stimuli. *Pflügers Archiv - Eur J Physiol* **445** (Suppl. 1): S31 (O11-1)

Annual Meeting der Society for Neuroscience (Orlando)

Greffrath W, Drathen U, Schwarz S, Mager W, Saaler-Reinhardt S, Treede RD (2002): Functional "knock-out" of capsaicin-sensitive neurons reveals a central role of vanilloid receptors for the transduction of noxious heat stimuli in vivo und in vitro. Program No. **49.6**. *Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2002. Online

Publikationen

Binzen U, Greffrath W, Hennessy S, Bausen M, Saaler-Reinhardt S, Treede RD (2006): Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **142** (2): 527-539

Greffrath W, Binzen U, Schwarz ST, Saaler-Reinhardt S, Treede RD (2003): Co-expression of heat sensitive vanilloid receptor subtypes in rat dorsal root ganglion neurons. Neuroreport **14** (17), 2251-2255

Vorträge

Binzen U (2006): Pro- und antinozizeptive Signalwege in Spinalganglienneuronen der Ratte
Institutskolloquium am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz