

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg

Lehrstuhl II

Direktor: Professor Dr. med. A. Karschin

---

**Die Antwort von Küken-Spinalganglienneuronen  
auf Hitze wird NGF-unabhängig reguliert**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Julia Wach

aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2006

Referentin: Professor Dr. rer. nat. Marlen Petersen  
Korreferent: Professor Dr. med. Michael Gekle  
Dekan: Professor Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2007

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Familie in Liebe gewidmet



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Einleitung</b> .....	1
<b>Material und Methoden</b> .....	7
1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	7
2. Operationsverfahren .....	7
2.1. Exzision der Spinalganglien aus Segmenten der gesamten Wirbelsäule .....	7
2.2. Ligation des <i>Nervus ischiadicus</i> .....	8
2.3. Exzision der korrespondierenden Spinalganglien des <i>Nervus ischiadicus</i> .....	9
2.4. Exzision der korrespondierenden Spinalganglien des <i>Nervus ischiadicus</i> ohne vorherige Ligation .....	11
2.5. Scheinoperation .....	11
3. Isolierung und Kultivierung der Spinalganglienneurone .....	11
4. Identifizierung nozizeptiver Neurone .....	13
5. Auswertung .....	14
6. Materialien und Arbeitsprotokolle .....	15
<b>Ergebnisse</b> .....	20
1. Hitze- und Capsaicinstimulation isolierter Spinalganglienneurone der Ratte .....	20
1.1. Antwort auf Capsaicin nach Zellkultur ohne NGF .....	20
1.2. Antwort auf Hitze (44° C) nach Zellkultur ohne NGF .....	21
1.2.1. Nach Zellkultur in serumhaltigem F-12-Medium .....	22
1.2.2. Nach Zellkultur in serumfreiem TNB-100-Medium .....	23
2. Hitzestimulation isolierter Spinalganglienneurone von Küken .....	24
2.1. Antwort auf unterschiedlich hohe Hitzereize in Abhängigkeit von der Zeit in Zellkultur .....	24
2.2. Antwort auf Hitze (44° C) in Abhängigkeit von NGF im Kulturmedium .....	25

2.2.1. Nach Zellkultur in serumhaltigem F-12-Medium mit und ohne NGF .....	26
2.2.2. Nach Zellkultur in serumfreiem TNB-100-Medium mit und ohne NGF .....	27
2.3. Antwort auf Hitze (46° C) in Abhängigkeit von NGF im Kulturmedium .....	28
3. Hitzestimulation von Küken-Spinalganglienneuronen nach Nervenligation .....	29
3.1. Antwort auf Hitze (44° C) der korrespondierenden Spinalganglienneurone des <i>Nervus ischiadicus</i> nach Ligation .....	29
3.2. Antwort auf Hitze (44° C) der korrespondierenden Spinalganglienneurone des <i>Nervus ischiadicus</i> ohne vorherige Ligation .....	29
3.3. Antwort auf Hitze (44° C) der korrespondierenden Spinalganglienneurone des <i>Nervus ischiadicus</i> nach einer Scheinoperation.....	30
<b>Diskussion</b> .....	32
1. Allgemeine methodische Überlegungen .....	32
1.1. Detektierung capsaicin- und hitzesensibler Neurone .....	32
1.2. Isolierte Spinalganglienneurone als Modell für periphere Endigungen .....	33
1.3. Reduktion des NGF-Gehaltes in Spinalganglienneuronen <i>in vivo</i> .....	33
2. In Ratten sinkt der Anteil capsaicin- und hitzesensitiver Spinalganglienneurone <i>in vitro</i> unter NGF-Mangel .....	34
3. In Küken steigt der Anteil hitzesensitiver Spinalganglienneurone <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> unabhängig von NGF .....	36
4. Mögliche Bedeutung der Ergebnisse .....	37
<b>Zusammenfassung</b> .....	38
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	39



## Einleitung

Schmerz als Warnsystem des Körpers vor der Einwirkung schädigender Reize ist eine unverzichtbare Voraussetzung für unser Überleben. Menschen, die an einer kongenitalen Schmerzunempfindlichkeit leiden, fügen sich selbst Verletzungen zu, es kommt zu vielfältigen schweren Verstümmelungen und zu einer deutlich erniedrigten Lebenserwartung (Baxter und Olszewski, 1960). Andererseits kann Schmerz, besonders wenn er chronisch wird, für die Betroffenen eine extreme Belastung werden und kann das somatische, aber auch das psychische Befinden wie vermutlich kaum ein anderes Gefühlserleben beeinflussen. Aus diesem Grund ist Schmerz, seine Therapie und insbesondere die Klärung seiner Entstehung nach wie vor eine große Herausforderung der Wissenschaft.

Die „International Association for the Study of Pain“ (IASP) definiert den Schmerz als „unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“ (Übersetzte Definition, 1979). Die Ursachen für die Entstehung von Schmerz sind vielfältig. Er kann bei der Nozizeption entstehen, in deren Rahmen Nozizeptoren akut erregt werden, welche die Information über den noxischen Reiz an das zentrale Nervensystem weiterleiten. Desweiteren kann er durch eine Schädigung des peripheren oder zentralen Nervensystems oder auch durch funktionelle Störungen, wie vaskuläre Fehlregulation oder psychosomatische Vorgänge, bedingt sein. Man unterscheidet zwischen einem viszeralem und einem somatischem Schmerz. Der viszerale Schmerz geht von den inneren Organen aus und kann in andere Körperregionen übertragen werden, sogenannte Head-Zonen. Beim somatischen Schmerz wird zwischen Oberflächenschmerz, verursacht durch noxische Reize an der Haut, und Tiefenschmerz, der seinen Ursprung in Muskeln, Knochen und Gelenken hat, differenziert. Weiterhin unterscheidet man, je nach Dauer, zwischen akutem Schmerz mit einer Dauer von unter sechs Monaten und chronischem Schmerz mit einer Dauer von mehr als sechs Monaten.

Als Nozizeption bezeichnet man die Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von noxischen Reizen. Die Erregung nozizeptiver primärer Afferenzen, sogenannter



Nozizeptoren, erfolgt an freien Nervenendigungen, die zum Beispiel in der Haut, in Muskeln, Sehnen, Gelenken, aber auch in Gefäßen und Bindegewebe lokalisiert sind. Die Weiterleitung überschwelliger Reize erfolgt entweder über schnell leitende A $\delta$ -Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit von etwa 12 – 30 m/s oder über langsam leitende C-Fasern mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 1 m/s (Srinivasa et al., 1999). Die Information des noxischen Reizes wird an Neurone des Hinterhorns der grauen Substanz des Rückenmarks vermittelt, die diese über den Vorderseitenstrang zum Thalamus weiter leiten. Dort finden Umschaltvorgänge statt, wie zum Beispiel zum motorischen Cortex, wodurch eine Fluchtreaktion eingeleitet werden kann, oder zum limbischen System, wo der noxische Reiz eine affektive Beurteilung erfahren kann. Es gibt verschiedene Klassen von Nozizeptoren. Eine Klasse reagiert auf mechanische Reize, andere auf chemische oder thermische Reize. Desweiteren existieren Nozizeptoren, die auf alle drei Reizmodalitäten antworten, sogenannte polymodale Nozizeptoren, und Nozizeptoren, die unter physiologischen Bedingungen nur auf thermische und chemische Reize reagieren, nach Sensibilisierung jedoch auch auf mechanische Reize antworten. Diese werden stumme Nozizeptoren genannt (Schmidt et al., 1995; Srinivasa et al., 1999).

Die Einwirkung noxischer thermischer Reize auf hitzesensible Nozizeptoren führt zur Öffnung spezieller Ionenkanäle, was zu einer Depolarisation des Nozizeptors und zur Generierung von Aktionspotentialen führt. Diese Ionenkanäle werden Hitzerezeptoren genannt. Sie befinden sich unter anderem an den freien Nervenendigungen und in den Somamembranen der Nozizeptoren (Scott 1992; Bevan 1999). Der erste klonierte Hitzerezeptor in Säugetieren ist der „transient receptor potential V1“ (TRPV1), der zunächst „Vanilloid Receptor 1“ (VR 1) genannt wurde. Er erhielt diesen Namen, da er nicht nur auf niederschwellige noxische Hitzereize ab 43° C, sondern auch auf die Einwirkung des Vanilloids Capsaicin, des scharfen Inhaltsstoffes aus Chili-Schoten, reagiert (Caterina et al., 1997). Der TRPV1 ist ein Mitglied der TRP-Familie, einer großen Klasse von Ionenkanälen, die vor allem durch eine gemeinsame Primärstruktur und durch ihre Permeabilität für Kationen wie Natrium, Kalium und Calcium charakterisiert ist (Gunthorpe et al., 2002). Der TRPV1 ist ein integrales Membranprotein mit sechs transmembranären Domänen (siehe

Abbildung 1). Zwischen den Transmembranregionen fünf und sechs befindet sich ein kurzes hydrophobes Zwischenstück, die eigentliche Porenregion (Caterina et al., 1997; Hayes et al., 2000).

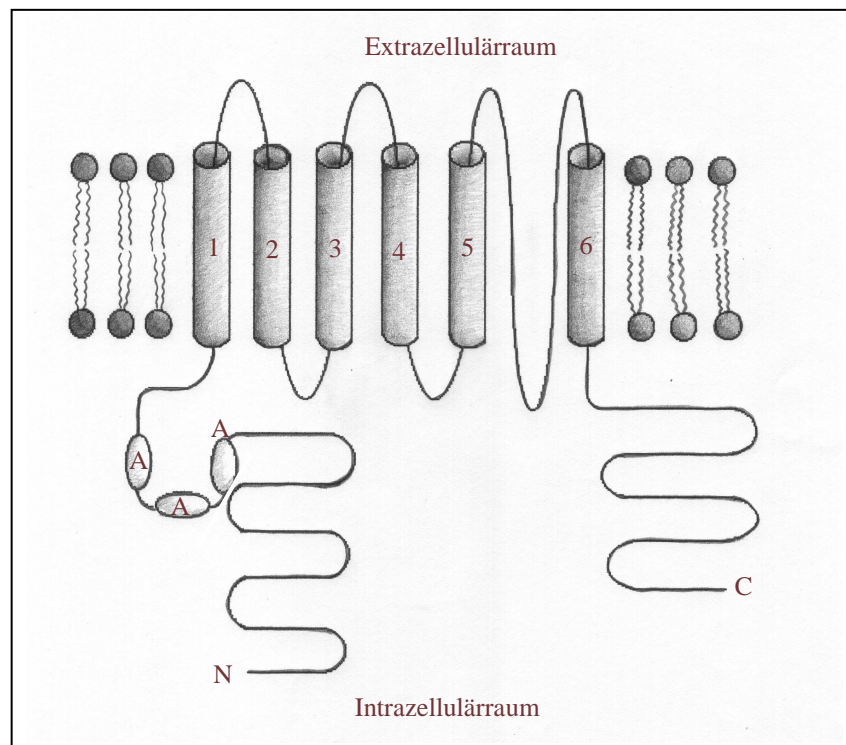


Abbildung 1: Aufbau des TRPV1 mit sechs transmembranären Domänen (1-6), kurzem hydrophoben Zwischenstück als eigentliche Porenregion, sowie C- und N-Terminus mit drei Ankyrinregionen (A).

Blockierbar ist der TRPV1 unter anderem durch Capsazepine, ein kompetitiver Antagonist (Bevan et al., 1992) (siehe Tabelle 1). Die Antwort des TRPV1 auf die Einwirkung von Capsaicin oder Hitze ist modulierbar: So führt beispielsweise eine Zunahme der Protonenkonzentration im extrazellulären Medium zu einer Sensibilisierung der durch den TRPV1 hervorgerufenen Capsaicin- und Hitzeantwort (Petersen und LaMotte, 1993; Tominaga et al., 1998). Neben dem TRPV1 sind weitere Thermorezeptoren bekannt (Clapham, 2003). Der TRPV2 oder auch „Vanilloid Receptor Like 1“ (VRL 1) reagiert auf noxische Hitze ab zirka 52° C, ist aber unempfindlich gegenüber Capsaicin (Caterina et al., 1999) (siehe Tabelle 1). Der

TRPV3 wird durch Temperaturen von 36 – 39° C (Smith et al., 2002), der TRPV 4 von Temperaturen ab 24° C stimuliert (Pedersen et al., 2005) (siehe Tabelle 1). Die weiteren Mitglieder der Familie der TRPV-Rezeptoren reagieren auf Stimuli wie beispielsweise Spannungsänderung oder Änderung der Osmolarität (Hoenderop et al., 1999; Strotmann et al., 2000; Clapham, 2003).

	TRPV1	TRPV2	TRPV3	TRPV4
Temperaturschwelle	c.a. 43° C	c.a. 52° C	c.a. 36° C	c.a. 24° C
Capsaicin - Sensibilität	+	-	-	-
Blockierbarkeit durch Capsazepine	+	-	-	-

Tabelle 1: Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Hitzerezeptoren TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4 in Säugerneuronen.

Die Expression des TRPV1 ist vor allem von der Anwesenheit des Neurotrophins „Nerve Growth Factor“ (NGF) abhängig (Michael und Priestley, 1999). Dies ist ein Protein, das im embryonalen Nervensystem unter anderem Einfluss auf das Wachstum und die Verzweigungen von Nervenfasern hat (Barde, 1989). Im adulten Nervensystem ist NGF für die Expression von Neuropeptiden wie Substanz P (Lindsay, 1996; Skoff et al., 2003) und „calcitonin gene-related peptide“ (CGRP) notwendig (Lindsay und Harmor, 1989). Die Expression anderer Neuropeptide, beispielsweise Galanin, wird hingegen von NGF unterdrückt (Verge et al., 1995; Kerekes et al., 1997). Für die Regulation der Expression des TRPV1 bindet NGF an den trkA-Rezeptor (Meakin und Shooter, 1992; Chao und Hempstead, 1995), welcher die Funktion einer Tyrosinkinase hat (Barbacid, 1994). Über mehrere Signaltransduktionsschritte kommt es zu einer gesteigerten Expression des TRPV1 (Clapham, 2003) (siehe Abbildung 2). Die Abhängigkeit der Expression des TRPV1 von NGF konnte anhand von isolierten Ratten- und Mäuse-Spinalganglienneuronen demonstriert werden. Bei Mangel an NGF im Kulturmedium kommt es hier zum Verlust der Capsaicin- und Hitzesensibilität (Winter et al., 1988; Bennett et al., 1998). Gebildet wird NGF in nichtneuronalen Zellen im Innervationsgebiet der Nozizeptoren (Leon et al., 1994; Barouch et al., 2001) und wird von dort retrograd zu den Somata der Neurone transportiert (Johnson et al., 1987).

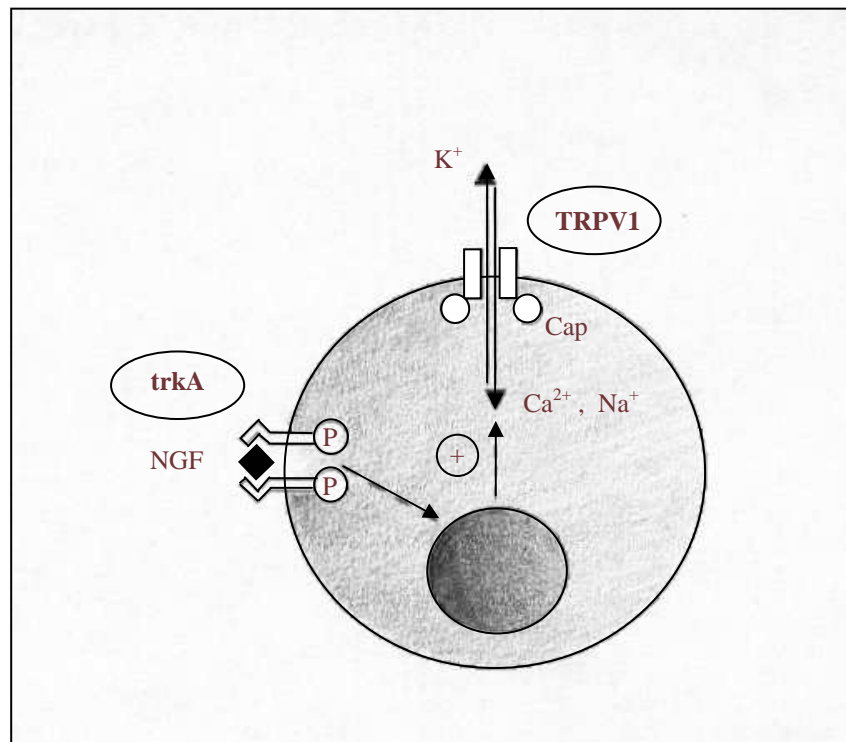


Abbildung 2: Spinalganglienneuron mit den Rezeptoren TRPV1 und trkA. Dargestellt sind die NGF-Bindungsstelle (NGF) und die Tyrosinkinase (P) des trkA, die Bindungsstellen von Capsaicin am TRPV1(Cap) sowie der Einwärtsstrom von Calcium- und Natriumionen (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>) und der Auswärtsstrom von Kaliumionen (K<sup>+</sup>).

Unter pathophysiologischen Bedingungen spielt die Regulation der Expression des TRPV1 durch NGF eine wichtige Rolle. Kommt es zu einer Entzündung in der Umgebung eines Nerven, werden nichtneuronale Zellen wie Mastzellen und Fibroblasten zu einer gesteigerten Freisetzung von NGF angeregt. Dieses wird dann vermehrt retrograd zu den Somata der primär afferenten Neurone transportiert und führt dort zu einer verstärkten Expression des TRPV1 (Lewin et al., 1994; Rueff und Mendell, 1996; Amaya et al., 2004). Es kommt zu einer Sensibilisierung der Neurone gegenüber Hitzeeinwirkung und damit zu einer erhöhten Empfindlichkeit des Organismus gegenüber der Einwirkung thermischer noxischer Reize, zur sogenannten thermischen Hyperalgesie (Chuang et al., 2001; Amaya et al., 2004).

Nicht nur im Rahmen von Entzündungsreaktionen, sondern auch nach Nervverletzung kann thermische Hyperalgesie auftreten (Bennet und Xie, 1988). Hierbei scheint der TRPV1 jedoch keine Rolle zu spielen, da die durch eine Verletzung der Axone bedingte Unterbrechung des retrograden axonalen Transportes von NGF zu

einer verminderten Expression des TRPV1 führt (Johnson et al., 1987; Michael und Priestley, 1999). Ein möglicher Mechanismus bei der Entwicklung von thermischer Hyperalgesie nach Nervenverletzung in Säugern könnte die Hochregulation eines bisher nicht identifizierten Hitzerezeptors sein, der unabhängig von NGF exprimiert wird.

Im Gegensatz zu Säugern reagieren Vögel nicht auf die Einwirkung von Capsaicin (Szolcsányi et al., 1986; Sann et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, dass Küken-Spinalganglienneurone jedoch auf niederschwellige noxische Hitze reagieren (Marìn-Burgin et al., 2000). Der hierfür zuständige Rezeptor im Küken wird ab einer Temperatur von zirka 42° C aktiviert. Er ist unempfindlich gegenüber der Einwirkung von Capsaicin, die Hitzeantwort kann jedoch durch den Capsaicinrezeptor-Antagonisten Capsazepine dosisabhängig antagonisiert werden (Marìn-Burgin et al., 2000). Dies weist auf einen vom TRPV1 in Säuger-Neuronen unterschiedlichen Hitzerezeptor hin, der jedoch gewisse Gemeinsamkeiten mit ihm haben muss, erkennbar an der Blockierbarkeit durch Capsazepine. Aus Neuronen von Küken konnte ein Capsaicin-unempfindlicher Hitzerezeptor für niederschwellige Hitze kloniert werden, der in Analogie zum TRPV1 der Säuger cTRPV1 genannt wird. Er zeigt zu 68% eine identische und zu 79% eine ähnliche Aminosäuresequenz wie der TRPV1 der Ratte (Jordt und Julius, 2002).

Die vorliegende Arbeit wendet sich der Frage zu, ob die Expression des Küken-TRPV1 von NGF abhängig ist. Die Klärung dieser Frage soll dazu beitragen, den Küken-Hitzerezeptor weiter zu charakterisieren. Darüber hinaus könnten die Ergebnisse wichtige Informationen über pathophysiologische Vorgänge, in deren Rahmen es zu einer Veränderung des NGF-Gehaltes in Spinalganglienneuronen kommt, liefern.

## **Material und Methoden**

### **1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 180-290 g (Charles River, Sulzfeld) und Hühnerküken mit einem Gewicht von 45-560 g (Lehr- und Versuchsstation für Kleintierzucht, Kitzingen). Die Ratten wurden maximal zu viert in Plexiglaskäfigen (42 cm x 26 cm x 18 cm), die Küken wurden maximal zu zehnt in einem Gehege (150 cm x 150 cm), das mit einer Rotlichtlampe versehen war, gehalten. Insgesamt wurden 21 Ratten und 64 Küken verwendet. Die Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche wurde durch die Regierung von Unterfranken erteilt.

### **2. Operationsverfahren**

Bei einem Teil der Küken (n = 41) und bei allen Ratten (n = 21) wurden möglichst viele Spinalganglien aus allen Segmenten der Wirbelsäule entnommen. Beim anderen Teil der Küken (n = 19) erfolgte eine Ligation des *Nervus ischiadicus* und anschließend die Exzision der korrespondierenden Spinalganglien. Bei drei Küken erfolgte eine Exzision der korrespondierenden Spinalganglien des *Nervus ischiadicus* ohne vorherige Ligation, bei einem Küken erfolgte eine Scheinoperation des *Nervus ischiadicus* mit anschließender Gewinnung der korrespondierenden Spinalganglien.

#### **2.1. Exzision der Spinalganglien aus Segmenten der gesamten Wirbelsäule**

Zunächst wurden die Tiere durch eine intraperitoneal applizierte Überdosis von Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, bei Küken 9-15 mg pro kg Körpergewicht, bei Ratten 75-150 mg pro kg Körpergewicht; Materialien siehe Tabelle 2) getötet, anschließend wurde der Rücken der Tiere großflächig rasiert und die Haut über der Wirbelsäule entfernt. Dann wurde die Wirbelsäule rasch exzidiert. Um an die Spinalganglien zu gelangen, ohne sie dabei zu verletzen, wurde die Wirbelsäule vorsichtig in der Sagittalebene gespalten. Die vom nun eröffneten *Canalis vertebralis*

aus gut zugänglichen Ganglien wurden anschließend mit Hilfe einer Federschere aus den *Foramina intervertebralia* heraus gelöst. Dies geschah unter mikroskopischer Kontrolle und unter Vermeidung von Zug oder Druck. Die Ganglien wurden unverzüglich in eine Nährlösung, bestehend aus „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“ (D-MEM) und Gentamycin (0,025 mg/ml) gegeben. Pro Tier wurden zirka 30 bis 40 Ganglien entnommen.

## 2.2. Ligation des *Nervus ischiadicus*

Es erfolgte eine Ligation des rechten *Nervus ischiadicus* des Kükens zirka einen Zentimeter proximal der Bifurkation in den *Nervus tibialis* und den *Nervus fibularis*.

Hierfür wurden die Küken durch intraperitoneale Injektion von Narcoren® (zirka 7 mg pro kg Körpergewicht; Materialien siehe Tabelle 3) narkotisiert. Die Tiefe der Narkose wurde durch starkes Kneifen mit der Pinzette überprüft. Erst wenn die Tiere darauf keine Reaktion mehr zeigten, wurde mit dem Eingriff begonnen. Die Narkose wurde mittels Äther über die Dauer des Eingriffs aufrechterhalten. Dazu wurde ein mit Äther getränkter Wattebausch auf den Schnabel gelegt und zeitweise entfernt, um eine Überdosierung zu vermeiden. Nun wurde ein Hautschnitt von zirka zwei Zentimetern Länge unterhalb des getasteten *Os femoris* gesetzt und die Haut wurde von der Muskulatur abgelöst. Dann wurde die *Pars postacetabularis* des *Musculus iliotibialis lateralis* aufgesucht. Dieser Muskel und der darunter liegende *Musculus iliofibularis* wurde vorsichtig angehoben, bis der *Musculus puboischiofemoralis* sichtbar wurde. Dieser wurde in die Tiefe bis zum Erreichen des *Nervus ischiadicus* stumpf frei präpariert. Nun wurden vorsichtig drei nichtresorbierbare chirurgische Fäden unter dem Nerv durchgezogen und jeweils fest mittels dreier chirurgischer Knoten zugezogen. Der Abstand zwischen den einzelnen Ligationen betrug einen bis zwei Millimeter (siehe Abbildung 3).

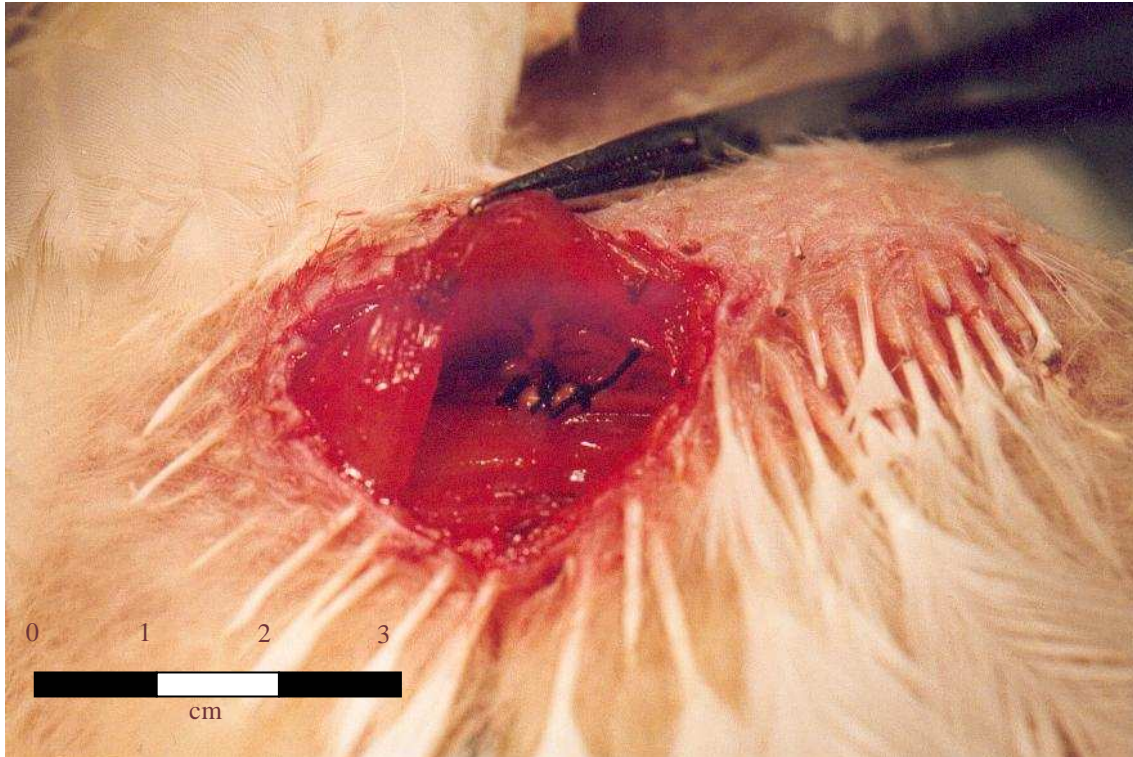


Abbildung 3: Operationssitus nach Ligation des *Nervus ischiadicus*. Die Muskeln wurden mit einer Arterienklemme nach oben gehalten.

Anschließend wurden die Muskeln wieder über die Ligationsstelle gedeckt und der Hautschnitt mit Einzelknopfnähten verschlossen. Abschließend wurde die Naht mit Ethanol 70% desinfiziert. Die Tiere wurden bis zum Erwachen beobachtet. Die Ligation blieb je nach Experiment für zwei bis maximal sechs Tage bestehen. Während dieser Zeit befanden sich die Tiere in gutem Allgemeinzustand, in keinem Fall wurde eine Infektion der Wunde oder selbstmutilierendes Verhalten wie Autotomie (Wall et al., 1979) beobachtet.

### **2.3. Exzision der korrespondierenden Spinalganglien des *Nervus ischiadicus***

Zwei bis sechs Tage nach Ligation des *Nervus ischiadicus* wurden die korrespondierenden Spinalganglien exzidiert. Bei Küken sind dies die Spinalganglien der Rückenmarkssegmente S4 bis S9 (King und McLelland, 1985). S9 wurde wegen schwierigen Präparationsverhältnissen belassen.



Die Tiere wurden zunächst durch eine intraperitoneale Injektion einer Überdosis Narcoren® (9-15 mg pro kg Körpergewicht; Materialien siehe Tabelle 4) getötet. Anschließend wurde der Oberschenkel auf der Seite der Ligation rasiert, Haut und Muskulatur wurden entfernt und der *Nervus ischiadicus* wurde frei präpariert. Alle anatomischen Strukturen entlang des Verlaufs des Nerven bis zu dessen Aufzweigung in die einzelnen spinalen Äste und deren Eintritt in die Wirbelsäule wurden entfernt (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4: Operationssitus mit freigelegtem *Nervus ischiadicus*. Dargestellt ist der Verlauf des Nerven, seine Aufzweigung in die spinalen Äste und die zugehörigen Spinalganglien, die direkt vor den *Foramina intervertebralia* gelegen sind.

Unter mikroskopischer Sicht wurden die in den *Foramina intervertebralia* lokalisierten Spinalganglien durch vorsichtiges Aufbrechen der Wirbelbögen und Pedikel mit Hilfe einer feinen Luer-Zange freigelegt. Die Ganglien wurden unter mikroskopischer Kontrolle mittels Federschere exzidiert und in D-MEM mit Gentamycin gegeben. Um eine Schädigung der Spinalganglien durch das Sistieren der

Blutzirkulation während der Präparation zu verhindern, wurde der Eingriff möglichst schnell und unter wiederholtem Befeuchten des Situs mit Ringer-Lösung durchgeführt.

#### **2.4. Exzision der korrespondierenden Spinalganglien des *Nervus ischiadicus* ohne vorherige Ligation**

Um auszuschließen, dass die im Rahmen der Ligation beobachteten Veränderungen der Hitzeantwort der Küken-Spinalganglienneurone nicht auf besondere Eigenschaften speziell der korrespondierenden Spinalganglien des *Nervus ischiadicus* zurückzuführen sind, wurden aus drei Küken die Ganglien des zuvor nicht ligierten *Nervus ischiadicus* nach dem oben beschriebenen Vorgehen exzidiert.

#### **2.5. Scheinoperation**

Um spezifische Auswirkungen der Nervenligation auf die Hitzeantwort der Küken-Spinalganglienneurone von unspezifischen Effekten durch den operativen Eingriff abgrenzen zu können, wurde bei einem Küken eine Scheinoperation durchgeführt. Hierbei wurde der rechte *Nervus ischiadicus* wie für die Ligation freipräpariert und drei chirurgische Fäden wurden unter dem Nerv durchgezogen, jedoch nicht verknotet. Nach sechs Tagen postoperativ wurden die korrespondierenden Spinalganglien nach dem oben beschriebenen Vorgehen gewonnen. Anschließend wurden die Neurone für einen Tag in F-12-Medium ohne NGF kultiviert.

### **3. Isolierung und Kultivierung der Spinalganglienneurone**

Die Isolierung der Spinalganglienneurone erfolgte enzymatisch und mechanisch (Petersen et al., 1996). Hierfür wurden die Ganglien unter dem Mikroskop weitgehend von Bindegewebe, Blutgefäßen und Axonen befreit. Das verbliebene Bindegewebe wurde durch in D-MEM gelöste Collagenase (243 U/ml; Materialien siehe Tabelle 5) zersetzt. Dazu wurden die Ganglien in mit der Collagenase-Lösung gefüllte Petrischalen gegeben und bei 37° C und 3,5 % CO<sub>2</sub>-Begasung für insgesamt 120 Minuten inkubiert. Zum Erhalt der Aktivität des Enzyms wurde alle 40 Minuten die Hälfte der Collagenase erneuert und alle zehn Minuten wurden die Petrischalen von Hand leicht geschwenkt.

Die nun folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank, um eine Kontamination der Kultur zu vermeiden. Die Ganglien wurden mit einer Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen umgesetzt. Um hierbei ein Anhaften der Ganglien an der Innenwand der Pipette zu vermeiden, war diese zuvor mit Sigmacote® beschichtet worden. Danach wurden die Ganglien mit „Dulbecco's Phosphate Buffered Saline“ (D-PBS) gewaschen. Nun wurde vorgewärmtes D-MEM mit Trypsin (1mg/ml) zugegeben und die Ganglien wurden erneut für 11 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift in D-MEM wurden die Zellen durch Trituieren aus ihrem Verband gelöst. Hierzu wurde eine mit Sigmacote® vorbehandelte Pasteurpipette benutzt, deren Spitze zuvor kurz durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen worden war, um die scharfen Kanten abzurunden. Durch wiederholtes vorsichtiges Einsaugen und Auspressen von zirka 2 ml der in D-MEM gelösten Ganglien entstand eine Zellsuspension. Diese wurde vorsichtig auf Percoll gegeben, welches zuvor mit D-PBS und aqua a. i. auf eine Enddichte von 1,13 g/ml gebracht worden war. Durch die im Vergleich zur Zellsuspension höhere Viskosität des Percolls wurden noch verbliebene Gewebestandteile zurückgehalten, während die Neurone passieren konnten und sich nach Zentrifugation bei 2500 U/min als Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens niederschlugen. Nach drei weiteren Waschschriften in D-MEM und jeweils folgender Zentrifugation bei 1000 U/min wurde das jeweilige Nährmedium zugegeben. Als Nährmedien dienten serumfreies TNB-100-Medium oder serumhaltiges F-12-Medium, jeweils mit Zusätzen versehen (siehe Tabelle 6). Diesen wurde je nach Versuchsprotokoll NGF 7S (isoliert aus submaxillären Speicheldrüsen der Maus, 100 ng/ml) zugegeben. Es folgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei 1200 U/min. Die in dem Medium suspendierten Zellen wurden nun auf mit Poly-L-Lysin (MW 150.000) beschichtete runde Deckgläschen gegeben (siehe Arbeitsprotokoll 1). Nach zirka vier Stunden hafteten die Zellen an den Deckgläschen fest und wurden dann je nach Experiment für ein bis drei Tage in 2 ml des entsprechenden Mediums unter 3,5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und bei auf 37° C erwärmter und mit Wasserdampf angereicherter Luft inkubiert. Täglich wurde die Hälfte des Mediums erneuert.

#### 4. Identifizierung nozizeptiver Neurone

Zur Identifizierung hitze- und capsaicinsensitiver nozizeptiver Neurone wurde die Cobalt-Uptake-Färbung angewendet (Hogan, 1983; Nagy et al., 1993; Reichling et al., 1997). Durch die Einwirkung von Capsaicin oder Hitze kommt es zur Öffnung des TRPV1 und zum Einstrom von Kationen. Bei Anwesenheit von Cobaltionen im extrazellulären Medium gelangen diese über den aktivierten Rezeptor in die Zellen und können mittels Ammoniumpolysulfid präzipitiert werden. Dies führt zu einer Braunfärbung der Neurone, welche den entsprechenden Rezeptor exprimieren. Zusätzlich erfolgte eine Gegenfärbung mit Trypan-Blau, um avitale Zellen darzustellen. Im Gegensatz zu intakten Neuronen können diese den Farbstoff nicht aus den Somata heraus transportieren und es kommt zu einer Blaufärbung dieser Zellen (siehe Abbildung 5).

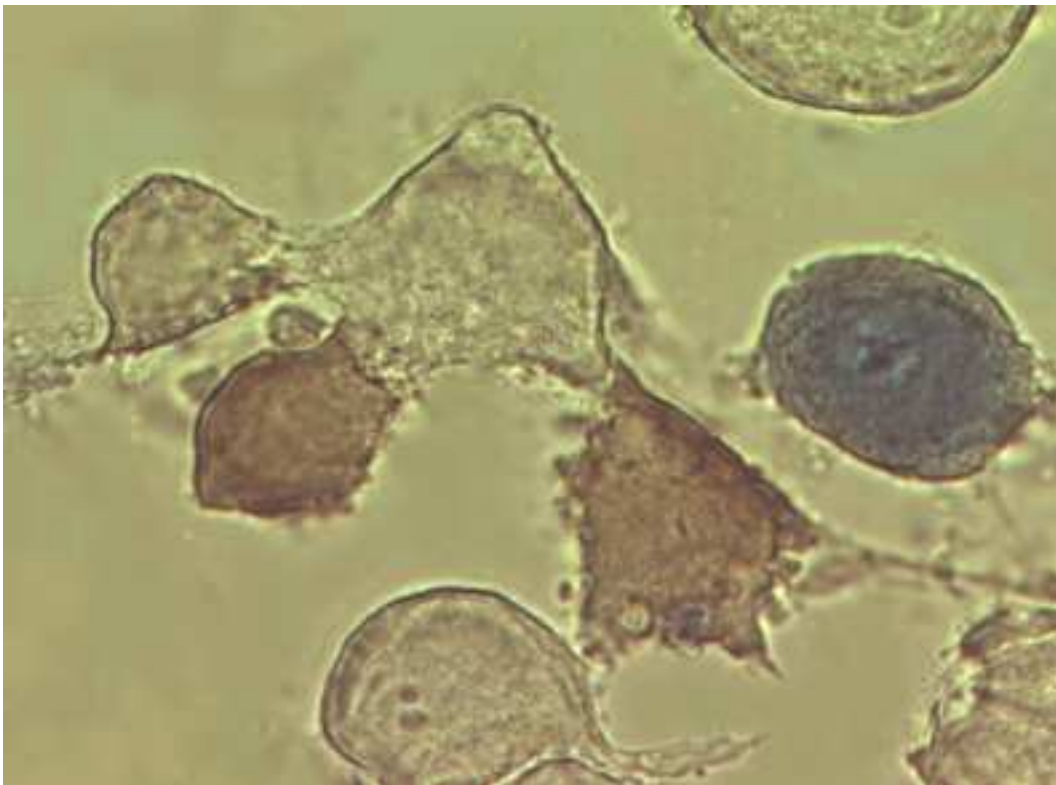


Abbildung 5: Kücken-Spinalganglienneurone nach Stimulation mit Hitze (44° C) und anschließender Cobalt-Färbung und Trypan-Blau-Färbung. Neurone, die auf den Hitzereiz reagiert haben, erscheinen braun gefärbt, Neurone, die nicht reagiert haben, erscheinen ungefärbt. Ein avitales Neuron erscheint blau gefärbt.

Für die Cobalt-Uptake-Färbung wurden die Deckgläschen mit den Spinalganglienneuronen nach der Zellkultur in Petrischälchen mit Assay-Puffer und Cobaltchlorid (5 mM; Materialien siehe Tabelle 7) gegeben (siehe Arbeitsprotokoll 2). Für die Stimulation mit Capsaicin wurden die Zellen bei Raumtemperatur für acht Minuten in der Cobaltchloridlösung mit Capsaicin (300nM; Zusammensetzung siehe Tabelle 8) inkubiert. Für die Stimulation mit Hitze wurde die Cobaltchloridlösung auf die entsprechende Stimulationstemperatur erwärmt und die Deckgläschen wurden hinein gegeben. Sie blieben dann für acht Minuten im auf die jeweilige Untersuchungstemperatur erhitzten Wärmeschrank. Anschließend wurden die Deckgläschen in Assay-Puffer gewaschen und für zwei Minuten in eine Ammoniumpolysulfidlösung gegeben. Nun wurden die Deckgläschen für zehn Minuten mit Trypan-Blau (1,2 µg/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte eine zwanzigminütige Fixierung in 4% Paraformaldehyd. Zwischengeschaltet waren mehrere Waschschriffe in PBS. Zum Schluss wurde jeweils 1,4 µl DABCO (Diazabicyclooctan) auf Objektträger gegeben. Pro Objektträger wurde nun ein Deckgläschen mit der Zellseite nach unten darauf gelegt und dessen Rand wurde mit Klarlack versiegelt. Bis zur Auswertung, die innerhalb weniger Stunden erfolgte, wurden diese Objektträger im Kühlschrank unter Lichtschutz aufbewahrt.

## **5. Auswertung**

Zur Ermittlung des prozentualen Anteils der durch Cobalt gefärbten Neurone wurden die Deckgläschen unter ein Mikroskop mit 63-facher Vergrößerung gegeben (Materialien siehe Tabelle 9). Über eine Videokamera und mittels der Software "OPTIMAS" wurde das Bild in einen Rechner eingespeist. Die Deckgläschen wurden nun systematisch abgefahren und pro Deckgläschen wurden mindestens hundert Neurone ausgewertet. Es wurden nur Zellen einbezogen, die eindeutig gefärbt oder eindeutig ungefärbt waren, äußerlich intakt erschienen und keine Färbung durch Trypan-Blau aufwiesen. Der prozentuale Anteil der durch Cobalt gefärbten Neurone an der Gesamtheit der gezählten Zellen wurde ermittelt. Die ermittelten Prozentzahlen wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Microsoft Excel“ in Tabellen zusammengefasst. Anschließend wurden aus den Prozentzahlen von mindestens drei

Tieren für den jeweils zu untersuchenden Parameter der Mittelwert und der mittlere Fehler der Standardabweichung berechnet. Mit dem Programm „Sigma Plot Version 4.0“ wurden nun Liniendiagramme erstellt, die die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler der Standardabweichung darstellten.

## **6. Materialien und Arbeitsprotokolle**

### **Tabelle 2: Materialien für die Exzision der Spinalganglien aus Segmenten der gesamten Wirbelsäule**

- Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, 160 mg/ml, Merial, Hallbergmoos)
- Pinzette, chirurgisch, fein
- Schere, gerade, groß
- Schere, gerade, klein
- Tischmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Federschere
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, Sigma, Steinheim)
- Gentamycin (0,025 mg/ml, Life Technologies, Eggenstein)

### **Tabelle 3: Materialien für die Ligation**

- Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, 160 mg/ml, Merial, Hallbergmoos)
- Pinzette, chirurgisch, fein
- Diethyläther
- Skalpellgriff
- Skalpellklinge, Nr. 10
- Schere, gerade, klein
- Faden, nichtresorbierbar (Seide, Stärke 3/0, Braun, Melsungen)
- Ethanol 70%

### **Tabelle 4: Materialien für die Exzision der korrespondierenden Ganglien des Nervus ischiadicus nach Ligation**

- Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, 160 mg/ml, Merial, Hallbergmoos)
- Pinzette, chirurgisch, fein

- Schere, gerade, klein
- Tischmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Luer-Zange, fein
- Federschere
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, Sigma, Steinheim)
- Gentamycin (0,025 mg/ml, Life Technologies, Eggenstein)
- Ringer-Lösung

**Tabelle 5: Materialien für die Isolierung und Kultivierung der Spinalganglienneurone**

- Tischmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, Sigma, Steinheim)
- Collagenase (2,5 mg/ml, 243 U/ml, Biochrom, Berlin)
- Petrischälchen
- Inkubator (Heraeus, Hanau)
- Sterilbank (Heraeus, Hanau)
- Pasteurpipetten
- Zentrifugenröhrchen 15 ml
- Sigmacote® (Sigma, Steinheim)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS, Sigma, Steinheim)
- Trypsin (1 mg/ml, Sigma, Steinheim)
- Percoll (Dichte 1,13 g/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Life Technologies, Eggenstein)
- Aqua ad iniectabilia
- Zentrifuge (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau)
- TNB-100-Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 6)
- F-12-Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 6)
- NGF (7S von der Maus, 100 ng/ml, Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden)
- Poly-L-Lysin (MW 150.000, Sigma, Steinheim)
- Deckgläschen, rund, Durchmesser 10 mm

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Nährmedien**

- TNB 100: TNB-100-Medium (Biochrom, Berlin)  
Protein-Lipid-Komplex (Biochrom, Berlin)  
Penicillin 100 U/ml (Life Technologies, Eggenstein)  
Streptomycin 100 µg/l (Life Technologies, Eggenstein)
  
- F-12: Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma, Steinheim)  
Pferdeserum 10 % hitzeinaktiviert (Life Technologies, Eggenstein)  
MEM Amino Acids (Life Technologies, Eggenstein)  
L-Glutamine 2 mM (Seromed, Berlin)  
Penicillin 100 U/ml (Life Technologies, Eggenstein)  
Streptomycin 100 µg/l (Life Technologies, Eggenstein)

**Tabelle 7: Materialien für die Cobalt-Färbung**

- Petrischälchen
- Assay-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 8)
- Cobaltchloridlösung (5 mM,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  gelöst in Assay-Puffer)
- Capsaicin (Calbiochem, Bad Soden)
- Wärmeschrank (Heraeus, Hanau)
- Ammoniumpolysulfidlösung
- Trypan-Blau-Lösung 0,1% (Trypan-Blau 80% 1,2 µg /ml, Sigma, Steinheim, gelöst in 10 ml PBS)
- Paraformaldehyd 4%
- PBS (Phosphate Buffered Saline, Zusammensetzung siehe Tabelle 8)
- DABCO (Diazabicyclooctan 2,5 %, 4 µl, Sigma, Steinheim)
- Objektträger
- Klarlack



**Tabelle 8: Zusammensetzung der Lösungen für die Cobalt-Färbung**

- Capsaicinlösung:		
Stocklösung I:	20,7 mg Capsaicin gelöst in 12,5 ml Ethanol absolut (5,45 mM)	
Stocklösung II:	92 µl Stocklösung I gelöst in 50 ml CoCl <sub>2</sub> -Lösung (5 mM CoCl <sub>2</sub> gelöst in Assay-Puffer)	
300 nM-Lösung:	60 µl Stocklösung II gelöst in 1,94 ml CoCl <sub>2</sub> -Lösung (5 mM CoCl <sub>2</sub> gelöst in Assay-Puffer)	
- Assay-Puffer:	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,75 mM
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2 mM
	KCl	5 mM
	Glucose	12 mM
	Hepes	10 mM
	Sucrose	137 mM
	NaCl	57,1 mM
	pH-Wert mit 1N KOH auf 7,4 justiert	
	Osmolarität bei Raumtemperatur 296 mOsmol/l	
- PBS:	NaCl	35 mM
	KCl	0,68 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,38 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,03 mM
	pH-Wert mit 1N NaOH auf 7,4 justiert	
	Osmolarität bei Raumtemperatur 312 mOsmol/l	

**Tabelle 9: Materialien für die Auswertung**

- Mikroskop (Photomikroskop Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen)
- Videokamera
- Software "OPTIMAS Image Analyzing System" (Optimas Corp.)
- Software "Microsoft Excel"
- Software "Sigma Plot Version 4.0"

### **Arbeitsprotokoll 1: Vorbereitung der Deckgläschen**

1. Deckgläschen mit einem Durchmesser von 10 mm mehrfach durch die Flamme eines Bunsenbrenners ziehen
2. in Petrischälchen legen
3. mit 35 µl Poly-L-Lysin beschichten
4. über Nacht einwirken lassen
5. Deckgläschen vier mal mit PBS waschen, dazwischen und zum Schluss mit Vakuumpumpe trocken saugen
6. bis zur Verwendung in einer feuchten Kammer aufbewahren

### **Arbeitsprotokoll 2: Durchführung der Cobalt-Färbung**

1. Deckgläschen 2 min in Assay-Puffer waschen
2. Deckgläschen 8 min in Cobaltchloridlösung geben
3. Deckgläschen 2 min in Assay-Puffer waschen
4. Deckgläschen 2 min in Ammoniumpolysulfid geben
5. Deckgläschen 2 min in PBS waschen
6. Deckgläschen mit 60 µl Trypan-Blau beschichten, 10 min einwirken lassen
7. Deckgläschen kurz in PBS tauchen
8. Deckgläschen 20 min in Paraformaldehyd geben
9. Deckgläschen 2 min in PBS waschen
10. Deckgläschen 2 min in bidestilliertem Wasser waschen
11. 35 µl DABCO auf einen Objektträger platzieren
12. Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf den Objektträger mit dem DABCO legen
13. Ränder der Deckgläschen mit Klarlack versiegeln

## Ergebnisse

### 1. Hitze- und Capsaicinstimulation isolierter Spinalganglienneuronen der Ratte

Im ersten Teil der Arbeit wurde die NGF-Abhängigkeit der Expression des TRPV1-Rezeptors in Ratten-Spinalganglienneuronen untersucht. Hierfür wurden den Tieren möglichst viele Spinalganglien aller Rückenmarkssegmente entnommen, deren Neurone wurden isoliert und anschließend für ein bis drei Tage in Zellkultur in NGF-freiem Medium gehalten. Die Proportion der capsaicin- oder hitzesensiblen Neurone wurde anhand der Cobalt-Färbung ermittelt.

#### 1.1. Antwort auf Capsaicin nach Zellkultur ohne NGF

Die Spinalganglienneurone wurde für ein bis drei Tage in Zellkultur in serumfreiem TNB-100-Medium ohne Zusatz von NGF kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Capsaicin in einer Konzentration von 300 nM stimuliert und schließlich der Cobalt-Färbung unterzogen und analysiert.

Nach einem Tag Zellkultur in Abwesenheit von NGF wiesen  $61,0\% \pm 4,0$  ( $n = 7$  Tiere) der Neurone eine Färbung durch Cobalt auf. Nach zwei Tagen unter Zellkulturbedingungen reagierten  $49\% \pm 3,0$  ( $n = 4$ ) der Neurone mit einem Cobalteinstrom auf die Capsaicinstimulation, nach drei Tagen betrug dieser Anteil  $33,5\% \pm 4,5$  ( $n = 6$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Anteil capsaicinsensitiver Ratten-Spinalganglienneurone im Verlauf der Zellkultur in Medium ohne NGF abnimmt.

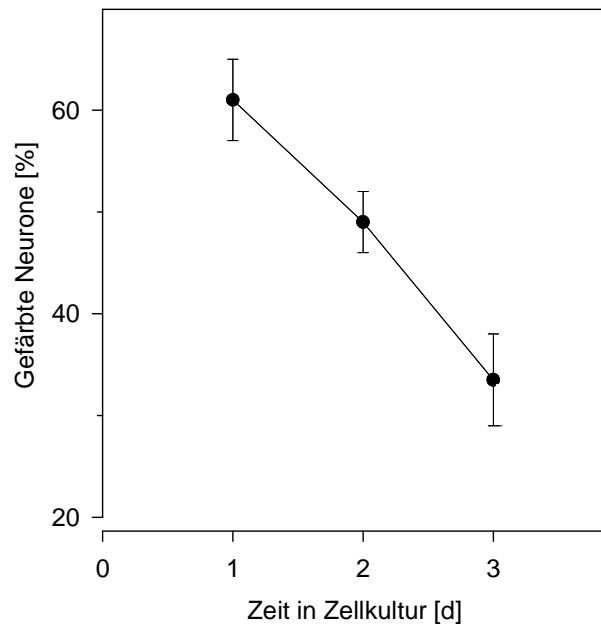


Abbildung 6: Anteil capsaicinsensitiver (300 nM) Spinalganglienneurone der Ratte nach ein, zwei und drei Tagen Zellkultur in TNB-100-Medium ohne NGF. Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  mittlerer Fehler der Standardabweichung.

## 1.2. Antwort auf Hitze (44° C) nach Zellkultur ohne NGF

In den folgenden Experimenten wurde die Änderung der Proportion der durch niederschwellige Hitze stimulierten Ratten-Spinalganglienneurone bei Abwesenheit von NGF untersucht. Dazu wurden die Spinalganglienneurone für ein bis drei Tage in Zellkultur ohne Zugabe von NGF gehalten. Danach wurden die Zellen mit einer Temperatur von 44° C stimuliert, und mit Hilfe der Cobalt-Färbung wurde der Anteil der hitzesensitiven Neurone ermittelt. Um einen möglichen Einfluss des im Kulturmedium enthaltenen Serums auf die Hitzesensibilität von Spinalganglienneuronen auszuschließen, wurden die Experimente sowohl in serumhaltigem F-12-Medium, als auch in serumfreiem TNB-100-Medium durchgeführt.

### 1.2.1. Nach Zellkultur in serumhaltigem F-12-Medium

Nach einem Tag Zellkultur in serumhaltigem F-12-Medium ohne NGF zeigten  $42,4\% \pm 5,0$  ( $n = 5$  Tiere) der Neurone eine Färbung durch Cobalt. Dieser Anteil sank auf  $27,3\% \pm 3,8$  ( $n = 3$ ) nach zwei Tagen und auf  $12,8\% \pm 1,1$  ( $n = 4$ ) nach drei Tagen Zellkultur in Abwesenheit von NGF. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Proportion der durch niederschwellige Hitze stimulierten Ratten-Spinalganglienneurone in Abwesenheit von NGF im Laufe der Zellkultur in serumhaltigem F-12-Medium abnimmt.

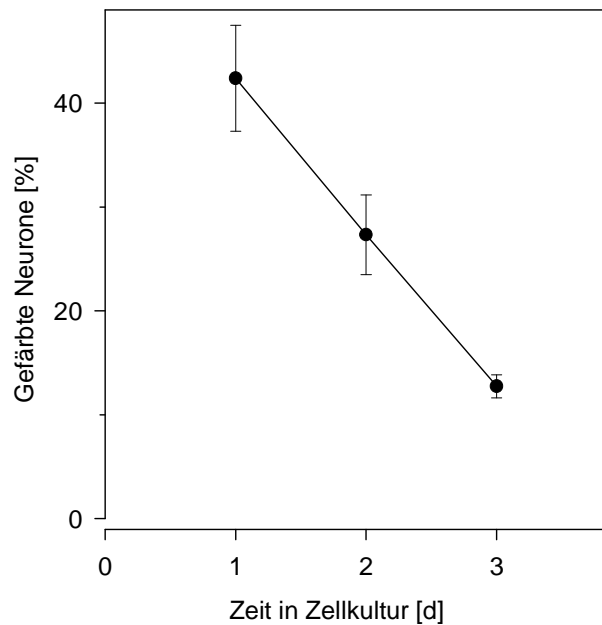


Abbildung 7: Anteil hitzesensitiver ( $44^{\circ}$  C) Spinalganglienneurone der Ratte nach ein, zwei und drei Tagen Zellkultur in serumhaltigem F-12-Medium ohne NGF. Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  mittlerer Fehler der Standardabweichung.

### 1.2.2. Nach Zellkultur in serumfreiem TNB-100-Medium

Nach einem Tag in Zellkultur in serumfreiem TNB-100-Medium ohne NGF zeigten  $26,8\% \pm 3,2$  ( $n = 4$  Tiere) der Spinalganglienneurone eine hitzeinduzierte Färbung durch Cobalt. Nach zwei Tagen Zellkultur sank dieser Anteil auf  $10,8\% \pm 2,2$  ( $n = 4$ ) und nach drei Tagen Zellkultur ohne NGF zeigten nur noch  $5\% \pm 1,1$  ( $n = 4$ ) der Neurone eine Antwort auf die Hitzestimulation. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Abnahme der Proportion der durch Hitze stimulierten Spinalganglienneurone im Verlauf der Kultur ohne NGF auch in serumfreiem Medium beobachtet werden kann.

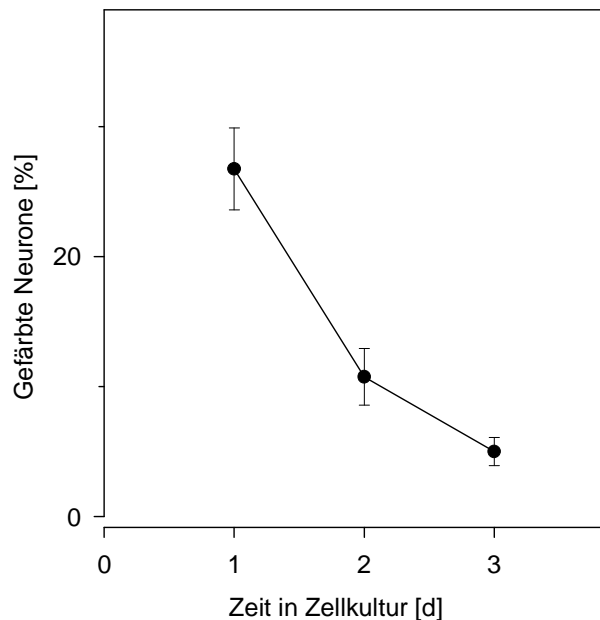


Abbildung 8: Anteil hitzesensitiver ( $44^{\circ}$  C) Spinalganglienneurone der Ratte nach ein, zwei und drei Tagen Zellkultur in serumfreiem TNB-100-Medium ohne NGF. Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  mittlerer Fehler der Standardabweichung.

## **2. Hitzestimulation isolierter Spinalganglienneurone von Küken**

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Anteil hitzesensitiver Küken-Spinalganglienneurone *in vitro* nach Zellkultur untersucht. Hierfür wurden den Tieren möglichst viele Spinalganglien aller Rückenmarkssegmente entnommen, deren Neurone wurden isoliert und anschließend für ein bis drei Tage in Zellkultur mit oder ohne NGF gehalten. Die Proportion der hitzesensitiven Neurone wurde anhand der Cobalt-Färbung ermittelt.

Zunächst wurde die Proportion hitzesensitiver Küken-Spinalganglienneurone in Abhängigkeit von unterschiedlichen Stimulationstemperaturen (42, 44, 46° C) und unterschiedlicher Dauer der Zellkultur (ein bis drei Tage) in serumfreiem TNB-100-Medium mit NGF untersucht. Anschließend wurde untersucht, ob die Antwort auf Hitze in Küken-Spinalganglienneuronen von der Anwesenheit von NGF in der Zellkultur abhängt. Hierfür wurde der Anteil hitzesensitiver Neurone sowohl nach Zellkultur in serumhaltigem F-12-Medium mit und ohne NGF, als auch nach Zellkultur in serumfreiem TNB-100-Medium mit und ohne NGF ermittelt. Zur Hitzestimulation wurden hier Temperaturen von 44° C und 46° C gewählt.

### **2.1. Antwort auf unterschiedlich hohe Hitzereize in Abhängigkeit von der Zeit in Zellkultur**

Nach einem Tag unter Zellkulturbedingungen und Stimulation mit 42° C reagierten 2,6%  $\pm$  0,8 (n = 8 Tiere) der Neurone mit einem Cobalteinstrom, bei einer Stimulation mit 44° C waren es 1,8%  $\pm$  0,3 (n = 4) der Neurone und bei 46° C 10,3%  $\pm$  2,1 (n = 4). Nach zwei Tagen unter Zellkulturbedingungen und Stimulation mit 42° C waren 9,1%  $\pm$  1,0 (n = 7) der Neurone durch Cobalt gefärbt, bei Stimulation mit 44° C zeigten 11,7%  $\pm$  2,6 (n = 3) und bei Stimulation mit 46° C bereits 19,0%  $\pm$  5,0 (n = 3) der Neurone eine hitzeinduzierte Cobalt-Färbung. Nach drei Tagen Zellkultur und Hitze einwirkung von 42° C wiesen 12,0%  $\pm$  3,6 (n = 4) der Neurone, nach Hitze einwirkung von 44° C 23,0%  $\pm$  1,6 (n = 4) der Neurone und nach Hitze einwirkung von 46° C bereits 27,0%  $\pm$  2,1 (n = 3) der Neurone eine Färbung durch Cobalt auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proportion der hitzesensitiven Kücken-Spinalganglienneurone mit ansteigenden Temperaturen steigt. Sie zeigen auch, dass der Anteil hitzesensitiver Neurone mit der Zeit in Zellkultur steigt.

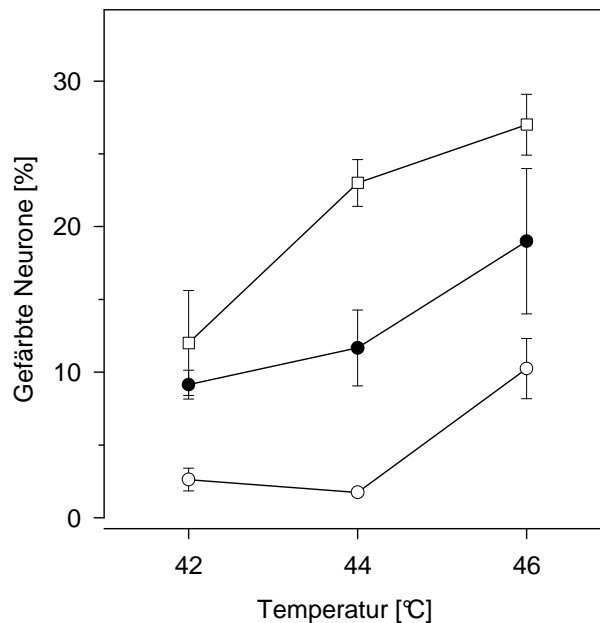


Abbildung 9: Anteil hitzesensitiver (42, 44, 46° C) Spinalganglienneurone des Kükens nach einem Tag (weiße Punkte), zwei Tagen (schwarze Punkte) und drei Tagen (weiße Kästchen) Zellkultur in TNB-100-Medium mit NGF. Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  mittlerer Fehler der Standardabweichung.

## 2.2. Antwort auf Hitze (44° C) in Abhängigkeit von NGF im Kulturmedium

In diesen Experimenten wurde die Abhängigkeit der Hitzeantwort der Kücken-Spinalganglienneurone von der Anwesenheit von NGF im Kulturmedium untersucht. Ein Teil der Neurone wurde für drei Tage in NGF-haltigem Nährmedium und ein anderer Teil der Neurone wurde für drei Tage in NGF-freiem Medium kultiviert, anschließend wurden sie mit einer Temperatur von 44° C stimuliert. Der Anteil hitzesensitiver Neurone wurde anhand der Cobalt-Färbung ermittelt. Um eventuelle Einflüsse des Serums in serumhaltigen Medien auf die Hitzeantwort auszuschließen, wurden die Neurone sowohl in serumhaltigem F-12-Medium als auch in serumfreiem TNB-100-Medium kultiviert.



### 2.2.1. Nach Zellkultur in serumhaltigem F-12-Medium mit und ohne NGF

Unter Kulturbedingungen in serumhaltigem F-12-Medium in Anwesenheit von NGF stieg der Anteil gefärbter Neurone nach Hitzeeinwirkung von 44° C von 14,3% ± 1,3 (n = 6 Tiere) nach einem Tag Zellkultur auf 24% ± 3,5 (n = 4) nach zwei Tagen unter Zellkulturbedingungen und nach drei Tagen Zellkultur auf 27,0% ± 2,5 (n = 4).

Unter Kulturbedingungen in F-12-Medium in Abwesenheit von NGF stieg der Anteil gefärbter Neurone nach Stimulation mit 44° C von 13,0% ± 1,0 (n = 7 Tiere) nach einem Tag Zellkultur auf 22% ± 2 (n = 4) nach zwei Tagen Zellkultur und nach drei Tagen unter Zellkulturbedingungen auf 28,3% ± 4,3 (n = 4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Proportion hitzesensitiver Kükenspinalganglienneurone unabhängig von der Anwesenheit von NGF mit der Dauer der Zellkultur in serumhaltigem Medium steigt.

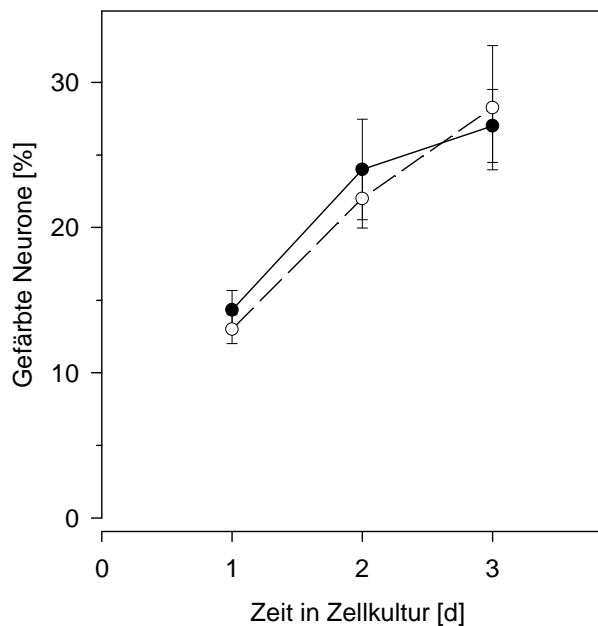


Abbildung 10: Anteil hitzesensitiver (44° C) Spinalganglienneurone des Kükens nach ein, zwei und drei Tagen Zellkultur in serumhaltigem F-12-Medium mit NGF (schwarze Punkte) und ohne NGF (weiße Punkte). Angabe der Werte als Mittelwert ± mittlerer Fehler der Standardabweichung.

### 2.2.2. Nach Zellkultur in serumfreiem TNB-100-Medium mit und ohne NGF

Nach Zellkultur in serumfreiem TNB-100-Medium mit NGF stieg der Anteil gefärbter Neurone nach Hitzestimulation mit 44° C von 1,8% ± 0,3 (n = 4 Tiere) nach einem Tag Zellkultur auf 11% ± 2 (n = 3) nach zwei Tagen unter Zellkulturbedingungen und nach drei Tagen Zellkultur auf 19,3% ± 2,6 (n = 4).

Nach Zellkultur in TNB-100-Medium ohne NGF stieg der Anteil gefärbter Neurone nach Stimulation mit 44° C von 1,6 % ± 0,5 (n = 5 Tiere) nach einem Tag Zellkultur auf 12% ± 2,6 (n = 3) nach zwei Tagen Zellkultur und auf 22,5 % ± 3,4 (n = 4) nach drei Tagen unter Zellkulturbedingungen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

Auch in serumfreiem Medium zeigen Küken-Spinalganglienneurone unabhängig von der Anwesenheit von NGF einen Anstieg des Anteils hitzesensitiver Neurone mit der Zeit der Zellkultur.

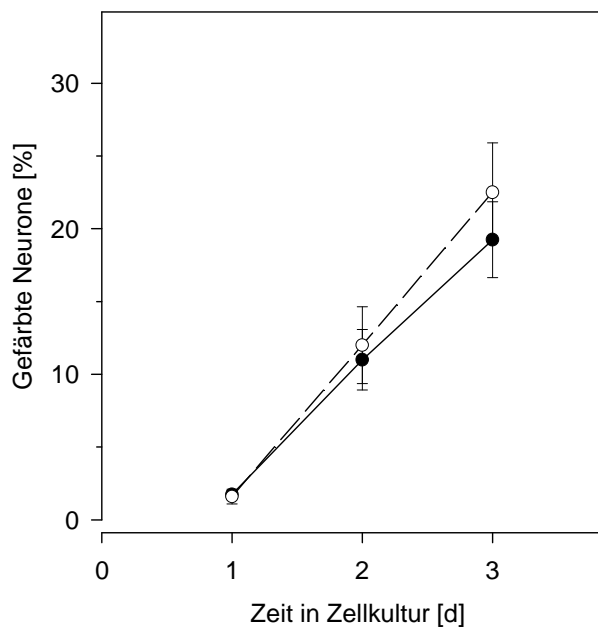


Abbildung 11: Anteil hitzesensitiver (44° C) Spinalganglienneurone des Kükens nach ein, zwei und drei Tagen Zellkultur in TNB-100-Medium mit NGF (schwarze Punkte) und ohne NGF (weiße Punkte). Angabe der Werte als Mittelwert ± mittlerer Fehler der Standardabweichung.

### 2.3. Antwort auf Hitze (46° C) in Abhängigkeit von NGF im Kulturmedium

Der Anteil der durch Hitzestimulation mit 46° C gefärbten Neurone stieg nach einem Tag unter Zellkulturbedingungen in F-12-Medium mit NGF von  $11,2\% \pm 2,1$  (n = 3 Tiere) auf  $20\% \pm 2,1$  (n = 3) nach zwei Tagen Zellkultur und nach drei Tagen unter Zellkulturbedingungen auf  $27,5\% \pm 0,5$  (n = 3).

Nach Zellkultur in F-12-Medium ohne Zugabe von NGF stieg der Anteil gefärbter Neurone nach Stimulation mit 46° C von  $8,3\% \pm 1,5$  (n = 4 Tiere) nach einem Tag unter Zellkulturbedingungen auf  $17,3\% \pm 1,2$  (n = 3) nach zwei Tagen in Zellkultur und auf  $22,5\% \pm 3,5$  (n = 3) nach drei Tagen unter Zellkulturbedingungen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch bei Stimulation mit 46° C der Anteil hitzesensitiver Küken-Spinalganglien neurone unabhängig von NGF mit der Zeit in Zellkultur steigt.

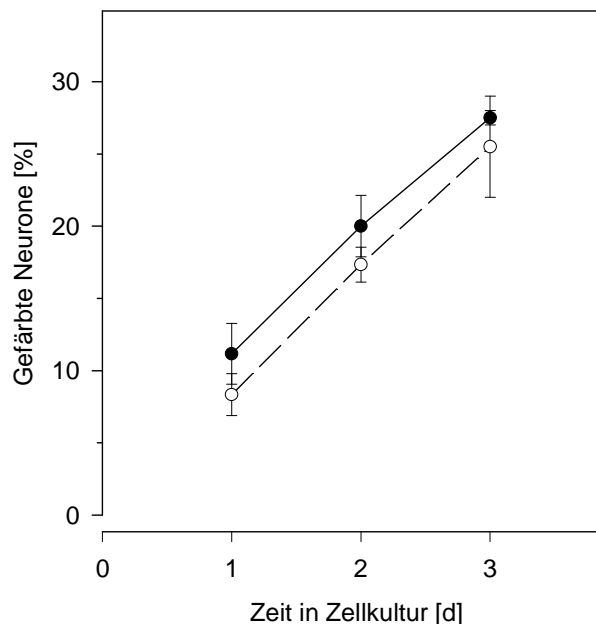


Abbildung 12: Anteil hitzesensitiver (46° C) Spinalganglien neurone des Kükens nach ein, zwei und drei Tagen Zellkultur in F-12-Medium mit NGF (schwarze Punkte) und ohne NGF (weiße Punkte). Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  mittlerer Fehler der Standardabweichung.

### **3. Hitzestimulation von Küken-Spinalganglienneuronen nach Nervenligation**

Im dritten Teil der Arbeit wurde die Proportion hitzesensitiver Küken-Spinalganglienneurone *in vivo* nach Ligation des *Nervus ischiadicus* untersucht. Durch die Ligation wird der retrograde axonale Transport von NGF von der Peripherie zu den Spinalganglienneuronen unterbrochen (Johnson et al., 1987).

#### **3.1. Antwort auf Hitze (44° C) der korrespondierenden Spinalganglienneurone des *Nervus ischiadicus* nach Ligation**

Es erfolgte eine feste Ligation des rechten *Nervus ischiadicus*, die für zwei, vier und sechs Tage bestehen blieb. Danach wurden die Neurone der korrespondierenden Spinalganglien isoliert und für einen Tag unter Kulturbedingungen in F-12-Medium ohne NGF gehalten. Anschließend wurden die Neurone mit 44° C stimuliert und der Anteil hitzesensitiver Neurone wurde mit Hilfe der Cobalt-Färbung ermittelt.

Nach Ligation des *Nervus ischiadicus* im Küken stieg der Anteil der durch Hitzeeinwirkung aktivierten Neurone der korrespondierenden Spinalganglien von 18,2% ± 3,5 (n = 5 Tiere) nach zwei Tagen Ligationsdauer auf 22,9% ± 2,1 (n = 6) nach vier Tagen und auf 28,1% ± 1,4 (n = 8) nach sechs Tagen Ligationsdauer. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch bei *in vivo* herbeigeführtem NGF-Mangel durch Ligation der Anteil hitzesensitiver Küken-Spinalganglienneurone mit der Dauer der Ligation steigt.

#### **3.2. Antwort auf Hitze (44° C) der korrespondierenden Spinalganglienneurone des *Nervus ischiadicus* ohne vorherige Ligation**

Um festzustellen, ob der Anstieg hitzesensitiver Neurone tatsächlich auf die Ligation zurück zu führen ist und nicht nur eine Besonderheit der korrespondierenden Ganglien des *Nervus ischiadicus* darstellt, wurden Kontrollversuche an Spinalganglienneuronen des rechten *Nervus ischiadicus* durchgeführt, der zuvor nicht ligiert worden war. Die Neurone wurden isoliert und anschließend für einen Tag in F-

12-Medium ohne NGF kultiviert. Nach Stimulation mit 44° C und anschließender Cobalt-Färbung konnte der Anteil der hitzesensitiven Neurone ermittelt werden.

Hierbei wiesen 10,3 %  $\pm$  1,9 (n = 3 Tiere) der Neurone eine durch Hitzestimulation induzierte Cobalt-Färbung auf. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die korrespondierenden Spinalganglien des *Nervus ischiadicus* keinen erhöhten Anteil hitzesensitiver Neurone aufweisen.

### **3.3. Antwort auf Hitze (44° C) der korrespondierenden Spinalganglienneurone des *Nervus ischiadicus* nach einer Scheinoperation**

Um spezifische Auswirkungen der Nervenligatur auf die Hitzeantwort der Küken-Spinalganglienneurone von unspezifischen Effekten durch den operativen Eingriff abgrenzen zu können, wurde an einem Küken eine Scheinoperation durchgeführt. Hierzu wurde der rechte *Nervus ischiadicus* freipräpariert und drei Fäden unter ihm durchgezogen aber nicht verknotet. Nach sechs Tagen wurden die korrespondierenden Spinalganglien exzidiert und deren Neurone für einen Tag in Zellkultur in F-12-Medium ohne NGF gehalten. Anschließend wurden sie mit 44° C stimuliert und der Cobalt-Färbung zugeführt.

Nach Scheinoperation und Stimulation mit 44° C wiesen 11% (n = 1 Tier) der korrespondierenden Spinalganglienneurone eine durch Hitzestimulation induzierte Cobalt-Färbung auf. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass es nach der Scheinoperation in Küken-Spinalganglien zu keiner Steigerung des Anteils hitzesensitiver Neurone kommt.

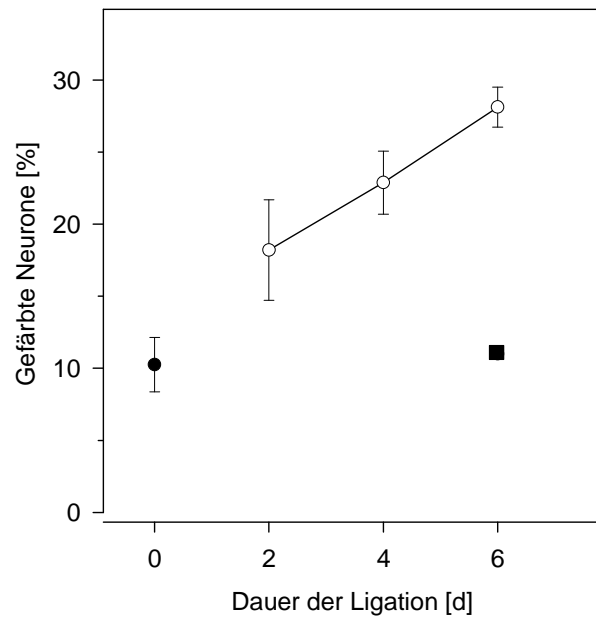


Abbildung 13: Anteil hitzesensitiver ( $44^{\circ}\text{C}$ ) Spinalganglienneurone des *Nervus ischiadicus* des Kükens nach zwei, vier und sechs Tagen Ligation (weiße Punkte), ohne vorherige Ligation (schwarzer Punkt) und sechs Tage nach Scheinoperation (schwarzes Kästchen). Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  mittlerer Fehler der Standardabweichung.

## Diskussion

### 1. Allgemeine methodische Überlegungen

#### 1.1. Detektierung capsaicin- und hitzesensibler Neurone

Die Somata primärer Afferenzen, die Spinalganglienneurone, sind eine heterogene Population vor allem hinsichtlich der Expression von Membranrezeptoren und Neuropeptiden. Der größte Anteil der nozizeptiven primären Afferenzen exprimiert den Rezeptor TRPV1. Der TRPV1 ist ein unspezifischer Kationenkanal (Bevan und Szolcsányi, 1990), der in Ratten durch Capsaicin und Hitze (Caterina et al., 1997), in Küken nur durch Hitze aktiviert wird (Szolcsányi et al., 1986; Sann et al., 1987; Marín-Burgin et al., 2000). Zur Identifizierung der TRPV1-exprimierenden nozizeptiven Neurone wurde in dieser Arbeit die Cobalt-Uptake-Methode verwendet (Hogan, 1983; Nagy et al., 1993; Reichling et al., 1997; Wendland et al., 2003). Bei dieser Methode gelangen bei Anwesenheit von Cobaltionen im extrazellulären Medium diese über den aktivierten Rezeptor in die Zellen und können dort mittels Ammoniumpolysulfid zu einem braunen Präzipitat ausgefällt werden. Die Spinalganglienneurone, in denen der Rezeptor aktiviert wurde, erscheinen unter dem Mikroskop braun gefärbt. Auf diese Weise können innerhalb der heterogenen Population der Spinalganglienneurone die Neurone detektiert werden, die funktionelle Capsaicin- und Hitzerezeptoren exprimieren. Um zu verhindern, dass avitale Neurone miterfasst werden, wurden diese in der vorliegenden Arbeit durch eine Gegenfärbung mit Trypan-Blau identifiziert. Trypan-Blau diffundiert in alle Zellen, wird jedoch nur von vitalen Zellen wieder aktiv aus den Somata heraus transportiert. Tote Neurone erscheinen daher blau gefärbt.

Eine andere Möglichkeit zum Nachweis des TRPV1 wäre die Verwendung von spezifischen Antikörpern gewesen. Bei immunzytochemischen Färbungen wird zwar das Vorhandensein des Rezeptors, jedoch nicht seine Funktionsfähigkeit nachgewiesen. Funktionsunfähige Rezeptoren werden dabei miterfasst. Im Unterschied dazu ist die hier angewandte Cobalt-Uptake-Methode ein selektiver Nachweis funktionsfähiger Rezeptoren.

Die Beurteilung der Färbung der Spinalganglienneurone erfolgte visuell. Es wurden nur vitale Zellen, die eindeutig gefärbt oder ungefärbt erschienen und eine intakte Morphologie aufwiesen, in den Datenpool aufgenommen. Die visuelle subjektive Beurteilung der Neurone wurde einer computergestützten optischen Dichtemessung (Nicholas et al., 1999) vorgezogen, da bei dieser Methode nur Graustufen erfasst werden können und keine Braun- oder Blaufärbung beurteilt werden kann.

## **1.2. Isolierte Spinalganglienneurone als Modell für periphere Endigungen**

Zur Bestimmung capsaicin- und hitzesensitiver Neurone wurden Spinalganglienneurone isoliert und für ein bis drei Tage kultiviert. Isolierte Spinalganglienneurone lassen sich als Modell für periphere Endigungen verwenden, da Rezeptoren der Endigungen auch in die Membran der Somata der Neurone eingebaut werden (Scott 1992; Bevan 1999). Der Vorteil von Experimenten an isolierten Spinalganglienneuronen ist, dass damit definierte Untersuchungsbedingungen geschaffen werden können. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezielt NGF dem Kulturmedium hinzugefügt oder weg gelassen werden. Andererseits ist es aber unabdingbar, dass bei der Exzision der Spinalganglien aus den *Foramina intervertebralia* deren Axone durchtrennt werden, was eine Verletzung bedeutet und möglicherweise Veränderungen in den Neuronen bewirkt.

NGF wird hauptsächlich aus nichtneuronalen Zellen wie beispielsweise Mastzellen und Makrophagen freigesetzt (Leon et al., 1994; Barouch et al. 2001). Diese Zellen können sich auch in der Zellkultur vermehren und zu einer Steigerung des NGF-Gehaltes im Kulturmedium führen. Um dies weitgehend zu verhindern, wurden die Neurone nach enzymatischer und mechanischer Isolation durch eine dichtegradiente Zentrifugation von nichtneuronalen Zellen und Gewebebestandteilen getrennt (Petersen et al., 1996). Weiterhin wurde täglich die Hälfte des Kulturmediums erneuert.

## **1.3. Reduktion des NGF-Gehaltes in Spinalganglienneuronen *in vivo***

Um zu prüfen, ob die unter Zellkulturbedingungen beobachtete NGF-unabhängige Zunahme des Anteils hitzesensitiver Küken-Spinalganglienneurone nicht allein durch



die Zellkultur bedingt ist, wurden *in vivo*-Experimente durchgeführt. NGF wird nicht in primären Afferenzen, sondern in nichtneuronalen Zellen im Innervationsgebietes der Neurone synthetisiert und dann retrograd in den Axonen zu den Somata der Neurone transportiert (Johnson et al., 1987). Folglich kann durch Ligation der Axone der NGF-Gehalt in den korrespondierenden Spinalganglien reduziert werden. In dieser Arbeit erfolgte eine Ligation des *Nervus ischiadicus* des Kükens. Dieser Nerv wurde gewählt, da er durch seine Größe und Lage experimentell gut zugänglich ist und seine korrespondierenden Spinalganglien gut zu identifizieren sind. Desweiteren ist ein Vergleich mit Daten von Ratten möglich, eine Spezies, bei der zur Untersuchung ähnlicher Fragestellungen ebenfalls der *Nervus ischiadicus* für Ligationsexperimente gewählt wurde (Wendland et al., 2003).

## **2. In Ratten sinkt der Anteil capsaicin- und hitzesensitiver Spinalganglienneurone *in vitro* unter NGF-Mangel**

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Anteil capsaicin- und Anteil capsaicin- und hitzesensitiver Spinalganglienneurone von Ratten durch NGF im Kulturmedium verändert wird. Es wurde gezeigt, dass der Anteil capsaicinsensitiver Neurone im Verlauf von drei Tagen Zellkultur in Nährmedium ohne NGF-Zusatz signifikant sinkt. Unter den gleichen Zellkulturbedingungen nimmt auch der Anteil hitzesensitiver Neurone ab. Die Ergebnisse bestätigten Daten anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine Verminderung der Hitze- und Capsaicinsensitivität von Säuger-Neuronen unter NGF-Mangel zeigten (Winter et al., 1988; Bennett et al., 1998; Stucky und Lewin, 1999).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich am ersten Tag nach Zellkultur ein deutlicher Unterschied zwischen dem Anteil capsaicinsensitiver und dem Anteil hitzesensitiver Spinalganglienneurone. Die Proportion capsaicinsensitiver Neurone lag bei zirka 2/3, die der hitzesensitiven Neurone bei etwa 1/3 der Gesamtheit der Spinalganglienneurone. Eine mögliche Erklärung für diesen quantitativen Unterschied ist die unterschiedliche Intensität der zwei Reizmodalitäten chemisch und physikalisch. Bei der chemischen Reizung mit Capsaicin lag die Dosis von 300 nM im Bereich der maximalen Dosis zur Aktivierung aller TRPV1-Rezeptoren (Marìn-Burgin et al., 2000; Wendland et al.,

2003), während bei der physikalischen Reizung mit 44° C diese nur gering oberhalb der Temperaturschwelle des TRPV1 liegt (Caterina et al., 1997). Dennoch wurde diese niedrige Temperatur gewählt, um eine Schädigung der Neurone durch Hitze einwirkung zu vermeiden.

In einem Teil der Experimente wurde serumhaltiges Medium, im anderen Teil der Experimente serumfreies Medium verwendet, um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch im Nährmedium enthaltene Serumbestandteile zu vermeiden. Hierbei lag der Anteil capsaicin- und hitzesensitiver Neurone nach Kultur in serumfreiem Medium unter dem der Neurone, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten Faktoren im Serum sein, die die Capsaicin- und Hitzeantwort der sensorischen Neurone beeinflussen. Ein weiterer Grund könnte sein, dass Serumbestandteile selektiv zum Überleben der TRPV1-exprimierenden Spinalganglienneurone führen. Die Abnahme des Anteils capsaicin- und hitzesensibler Neurone im Verlauf der Zellkultur in NGF-freiem Medium erfolgte jedoch sowohl bei Verwendung von serumhaltigem als auch bei Verwendung von serumfreiem Medium.

Durch die Stimulation von Ratten-Spinalganglienneuronen mit Capsaicin ist es möglich, spezifisch den TRPV1 zu aktivieren (Pedersen et al., 2005). Im Gegensatz dazu können durch die Stimulation mit Hitze weitere Hitzerezeptor-Typen aktiviert werden, die zum Anteil der hitzesensitiven Neurone in unseren Experimenten beigetragen haben könnten. Bereits bekannte weitere Hitzerezeptoren neben dem TRPV1 sind der TRPV2, der TRPV3 und der TRPV4 (Clapham, 2003). Der TRPV2 wird durch Temperaturen oberhalb von 52° C, der TRPV3 wird durch mäßige Hitze ab 33° C und der TRPV4 ab Temperaturen von 24° C aktiviert (Benham et al., 2002; Pedersen et al., 2005). Für den TRPV2 konnte gezeigt werden, dass seine Temperaturschwelle durch wiederholte Hitze einwirkung gesenkt werden kann (Caterina et al., 1999). Seine Expression wird jedoch nicht von NGF reguliert (Barnhill et al., 2004). Ob NGF einen Einfluss auf die Expression des TRPV3 und TRPV4 hat, ist bislang ungeklärt.

### 3. In Küken steigt der Anteil hitzesensitiver Spinalganglienneurone *in vitro* und *in vivo* unabhängig von NGF

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Anteil hitzesensitiver Küken-Spinalganglienneurone im Verlauf der Zellkultur und mit der Dauer der Nervenligation unabhängig von NGF steigt. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchungen an Ratten-Spinalganglienneuronen, hier sinkt die Proportion hitzesensitiver Neurone im Verlauf der Zellkultur unter NGF-Mangel.

Ähnlich wie bei den Ratten-Experimenten zeigte sich auch hier, dass der Anteil hitzesensitiver Neurone nach Zellkultur in serumhaltigem F-12-Medium höher lag als nach Kultur in serumfreiem TNB-100-Medium. Auch hier könnte die Erklärung ein Einfluss von Serumbestandteilen auf die Hitzesensitivität der Küken-Neurone oder auf das selektive Überleben der hitzesensitiven Neurone sein. Nach Kultur in serumhaltigem und serumfreiem Medium zeigte sich jedoch gleichermaßen ein Anstieg des Anteils hitzesensitiver Küken-Spinalganglienneurone unabhängig von NGF.

Nach einem Tag Zellkultur reagieren im Gegensatz zu den Rattenneuronen deutlich weniger Küken-Neurone auf die Stimulation mit 44° C. Bei Ratten liegt der Anteil hitzesensitiver Neurone nach einem Tag Zellkultur deutlich höher. Diese Diskrepanz kann durch die Unterschiede im Ratten- und Küken-TRPV1 bedingt sein. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der Küken-Rezeptor bei der Isolierung der Spinalganglienneurone durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen zunächst inaktiviert wird (Harteneck, 2003) und erst im Verlauf der Zellkultur oder der Ligation wieder aktivierbar ist. Eine weitere Erklärung wäre, dass die hier verwendeten Ratten bereits adulte Tiere waren und über eine andere Rezeptorausstattung verfügten als die erst wenige Tage alten Küken. Weiterhin könnten in den Ratten zusätzliche Hitzerezeptoren aktiviert worden sein, welche im Küken möglicherweise nicht existieren.

Zur Untersuchung des Einflusses von NGF-Mangel auf den Anteil hitzesensitiver Küken-Spinalganglienneurone unter *in vivo*-Bedingungen erfolgten Nervenligationsexperimente. Während es bei Ligation des *Nervus ischiadicus* der Ratte zu einer durch den NGF-Mangel bedingten Abnahme des Anteils capsaicinsensitiver Neurone kommt (Wendland et al., 2003), zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nach Ligation des

gleichen Nerven im Kücken eine Zunahme der Proportion hitzesensitiver Neurone. Diese Ergebnisse bestätigen die *in vitro*-Experimente, die eine NGF-unabhängige Steigerung des Anteils hitzesensitiver Spinalganglienneurone im Verlauf der Zellkultur zeigten.

Es konnte gezeigt werden, dass als Ursache für die Hochregulation des Anteils hitzesensitiver Spinalganglienneurone im Kücken unter *in vitro*- und unter *in vivo*-Bedingungen sowohl NGF als auch Serumbestandteile ausscheiden. Welche Faktoren hierfür verantwortlich sind und auf welche Weise diese zu einer Zunahme des Anteils hitzesensitiver Kückenneurone führen, muss durch weitere Experimente geklärt werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einem ersten Ansatz zeigen, dass die Menge der TRPV1-mRNA in Kückenneuronen nach Axotomie zunimmt, was auf eine gesteigerte Expression dieses Rezeptors hinweist (Wach et al., 2003).

#### **4. Mögliche Bedeutung der Ergebnisse**

NGF-Mangelbedingungen herrschen auch bei verschiedenen krankhaften Zuständen, bei denen es zu einer Unterbrechung des retrograden axonalen Transportes von NGF kommt, wie zum Beispiel nach traumatischer Verletzung eines peripheren Nerven oder im Rahmen degenerativer Veränderungen wie bei der peripheren Polyneuropathie. Die vorliegenden Ergebnisse könnten neben der weiteren Charakterisierung des Kücken-TRPV1 zur Klärung der Entstehung pathophysiologischer Phänomene, die mit einem NGF-Mangel einhergehen, beitragen.

## Zusammenfassung

Der erste klonierte Hitzerezeptor in Säugetieren ist der „transient receptor potential V1“ (TRPV1). Er wird durch noxische Hitzeereize ab 43° C und durch chemische Substanzen wie das Vanilloid Capsaicin aktiviert. Die Expression des TRPV1 wird durch das Neurotrophin „Nerve Growth Factor“ (NGF) gesteuert, welches in nichtneuronalen Zellen im Innervationsgebiet der Nozizeptoren gebildet und von dort retrograd zu den Somata der Neurone transportiert wird.

Im Gegensatz zu Säugern reagieren Vögel nicht auf Capsaicin, aber auf Hitze ab 42° C. Der hierfür zuständige Rezeptor im Küken wurde kloniert und cTRPV1 genannt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Expression des TRPV1 von Küken ebenso wie bei Säugern von NGF reguliert wird.

Hierfür wurden Spinalganglienneurone aus Ratten und Küken isoliert. Die Neurone wurden mit Capsaicin oder Hitze stimuliert und der Anteil capsaicin- bzw. hitzesensitiver Neurone wurde mit Hilfe der Cobalt-Uptake-Methode ermittelt. Diese Werte wurden für Zeiten bis zu drei Tagen in Zellkultur in Medium mit und ohne NGF bestimmt. In weiteren Experimenten wurde eine Ligation des *Nervus ischiadicus* im Küken vorgenommen, um den Einfluss von NGF-Mangel *in vivo* auf den Anteil hitzesensitiver Neurone in den korrespondierenden Spinalganglien zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass sowohl der Anteil der capsaicinsensitiven als auch der hitzesensitiven Spinalganglienneurone der Ratte bei Abwesenheit von NGF im Kulturmedium mit der Zeit in Zellkultur abnimmt. Im Unterschied dazu nimmt in Küken der Anteil hitzesensitiver Spinalganglienneurone unabhängig von der An- oder Abwesenheit von NGF im Kulturmedium mit der Zeit in Zellkultur zu. Auch unter *in vivo*-Bedingungen nach Ligation des *Nervus ischiadicus* zeigte sich beim Küken ein Anstieg der Proportion hitzesensitiver Spinalganglienneurone. Somit konnte gezeigt werden, dass der Küken-TRPV1 im Gegensatz zum TRPV1 der Ratten unabhängig von NGF reguliert wird.

Die vorliegenden Ergebnisse tragen zur weiteren Charakterisierung des Küken-TRPV1 bei. Darüber hinaus könnten die Ergebnisse zur weiteren Klärung pathologisch veränderter Hitzeempfindungen im Rahmen von Erkrankungen, die mit einer Änderung des NGF-Gehaltes im Innervationsgebiet von Nozizeptoren einhergehen, beitragen.

## Literaturverzeichnis

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: 2303-10

Barbacid M (1994) The trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25: 1386-403

Barde YA (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2: 1525-34

Barnhill JC, Stokes AJ, Koblan-Huberson M, Shimoda LH, Muraguchi A, Adra CN, Turner H (2004) RGA protein associates with a TRPV ion channel during biosynthesis and trafficking. *J Cell Biochem* 91: 808-20

Barouch R, Appel E, Kazimirsky G, Brodie C (2001) Macrophages express neurotrophins and neurotrophin receptors. Regulation of nitric oxide production by NT-3. *J Neuroimmunol* 112: 72– 77

Baxter DW, Olszewski J (1960) Congenital universal insensitivity to pain. *Brain* 83: 381-93

Benham CD, Davis JB, Randall AD (2002) Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacol* 42: 873-88

Bennett DL, Koltzenburg M, Priestley JV, Shelton DL, McMahon SB (1998) Endogenous nerve growth factor regulates the sensitivity of nociceptors in the adult rat. *Eur J Neurosci* 10: 1282-91

Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87-107

Bevan S (1999) Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. *Aus: Textbook of Pain*, 4. Auflage, Churchill Livingstone, Edinburgh, 85-103

Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, Yeats JC (1992) Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 107: 544-52

Bevan S, Szolcsanyi J (1990) Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci* 11:330-3

Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-41

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: 816-24

Chao MV, Hempstead BL (1995) p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* 18: 321-6

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. *Nature* 411: 957-62

Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426 : 517-24

Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB (2002) The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 23 : 183-91

Harteneck C (2003) Proteins modulating TRP channel function. *Cell Calcium* 33: 303-10

Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB (2000) Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 88: 205–15

Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ (1999) The epithelial calcium channel, ECaC, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 488-92

Hogan PG (1983) Expression of markers for pain sensory neurons in cell culture. PhD Dissertation, Harvard University, Cambridge, Massachusetts

International Association for the Study of Pain (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain* 6: 248-52

Johnson EM, Taniuchi M, Clark HB, Springer JE, Koh S, Tayrien MW, Loy R (1987) Demonstration of the retrograde transport of nerve growth factor receptor in the peripheral and central nervous system. *J Neurosci* 7: 923-9

Jordt SE, Julius D (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 108: 421-30

Kerekes N, Landry M, Rydh-Rinder M, Hökfelt T (1997) The effect of NGF, BDNF and bFGF on expression of galanin in cultured rat dorsal root ganglia. *Brain Res* 754: 131-41

King AS, McLelland J (1985) Form and function in birds, Vol. 3. Academic Press Inc:London

- Leon A, Buriani A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L, Levi-Montalcini R (1994) Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3739–43
- Lewin GR, Rueff A, Mendell LM (1994) Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur J Neurosci* 6: 1903-12
- Lindsay RM (1996) Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351: 365-73
- Lindsay RM, Hargraves AJ (1989) Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature* 337: 362-4
- Marín-Burgin A, Reppenhagen S, Klusch A, Wendland JR, Petersen M (2000) Low-threshold heat response antagonized by capsazepine in chick sensory neurons, which are capsaicin-insensitive. *Eur J Neurosci* 12: 3560-6
- Meakin SO, Shooter EM (1992) The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci* 15: 323-31
- Michael GJ, Priestley 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: 1844-54
- Nagy I, Pabla R, Matesz C, Dray A, Woolf CJ, Urban L (1993) Cobalt uptake enables identification of capsaicin- and bradykinin-sensitive subpopulations of rat dorsal root ganglion cells in vitro. *Neuroscience* 56: 241-6
- Nicholas RS, Winter J, Wren P, Bergmann R, Woolf CJ (1999) Peripheral inflammation increases the capsaicin sensitivity of dorsal root ganglion neurons in a nerve growth factor-dependent manner. *Neuroscience* 91: 1425-33
- Pedersen SF, Grzegorz O, Nilius B (2005) TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38: 233-52
- Petersen M, La Motte RH (1993) Effect of protons on the inward current evoked by capsaicin in isolated dorsal root ganglion cells. *Pain* 54: 37-42
- Petersen M, Lamotte RH, Klusch A, Kniffki KD (1996) Multiple capsaicin-evoked currents in isolated rat sensory neurons. *Neuroscience* 75: 495-505
- Reichling DB, Barratt L, Levine JD (1997) Heat-induced cobalt entry: An assay for heat transduction in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 77: 291-4
- Rueff A, Mendell LM (1996) Nerve growth factor NT-5 induce increased thermal sensitivity of cutaneous nociceptors in vitro. *J Neurophysiol* 76: 3593-6



Sann H, Harti G, Pierau FK, Simon E (1987) Effect of capsaicin upon afferent and efferent mechanisms of nociception and temperature regulation in birds. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 1347-54

Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 5: 333-41

Scott SA (1992) In: *Sensory neurons: Diversity, development and plasticity*. Oxford University Press, New York

Skoff AM, Resta C, Swamydas M, Adler JE (2003) Nerve growth factor (NGF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) regulate substance P release in adult spinal sensory neurons. *Neurochem Res* 28: 847-54

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: 186-90

Srinivasa NR, Meyer R, Ringkamp M, Campbell JN (1999) Peripheral neural mechanisms of nociception. *Aus: Textbook of Pain*, 4. Auflage, Churchill Livingstone, Edinburgh, 11-57

Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2: 695-2

Stucky CL, Lewin GR (1999) Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci* 19: 6497-5

Szolcsányi J, Sann H, Pierau FK (1986) Nociception in pigeons is not impaired by capsaicin. *Pain* 27: 247-60

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: 531-43

Verge VM, Richardson PM, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T (1995) Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression in vivo: a novel role in peptide suppression in adult sensory neurons. *J Neurosci* 15: 2081-96

Wach J, Marín-Burgin A, Klusch A, Forster C, Engert S, Schwab A, Petersen M (2003) Low-threshold heat receptor in chick sensory neurons is upregulated independently of nerve growth factor after nerve injury. *Neuroscience* 117: 513-9

Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7: 103-11

Wendland JR, Schmidt KH, Koltzenburg M, Petersen M (2003) No overlap of sensitivity to capsaicin and expression of galanin in rat dorsal root ganglion neurons after axotomy. *Exp Brain Res* 153: 1-6

Winter J, Forbes CA, Sternberg J, Lindsay RM (1988) Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. *Neuron* 1: 973-81

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Marlen Petersen für ihre unermüdliche Unterstützung, Motivation und Inspiration bedanken. Sie hat in mir die Faszination für wissenschaftliches Arbeiten, sei es bei Experimenten oder beim Verfassen von Texten, geweckt und mich unermüdlich und mit dauernder Beständigkeit bei meiner wissenschaftlichen und beruflichen Laufbahn begleitet. Durch die Vermittlung von Wissen und Fertigkeiten ebenso wie durch konstruktive Kritik und beständige Forderung, aber auch Förderung, war die Zusammenarbeit mit ihr, nicht nur was die wissenschaftliche Arbeit, sondern auch, was die Arbeit im Team betrifft, außerordentlich lehrreich.

Ferner möchte ich danken Frau Dr. Antonia Marìn-Burgin für die Einführung in die thematischen und methodischen Grundlagen, Frau Tanja Martini für die Assistenz bei den angewandten Methoden, Herrn Andreas Klusch für Unterstützung bei methodischen und technischen Fragestellungen, sowie Herrn Prof. Dr. Michael Gekle, Physiologisches Institut I der Universität Würzburg, für die Übernahme des Korreferats.

## **Publikationsverzeichnis**

### **Originalarbeit**

Wach J, Marìn-Burgin A, Klusch A, Forster C, Engert S, Petersen M (2003) Low threshold heat receptor in chick sensory neurons is upregulated independently of NGF after nerve injury. *Neuroscience* 117: 513-19

### **Kongressbeiträge**

Wach J, Marìn-Burgin A, Petersen M (2001) Heat response in chick sensory neurons is independent of NGF. Jahreskongress der Deutschen und Skandinavischen Physiologischen Gesellschaft, Berlin.

## Lebenslauf

Name: Julia WACH

Wohnort: Würzburg

Geburtsdatum/-ort: 19.12.1977 in Würzburg

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1985-1989: Grundschule Marktbreit  
1989-1991: Gymnasium Marktbreit  
1991-1997: Armin-Knab-Gymnasium Kitzingen

Studium: 1997-2004: Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg für das Fach Humanmedizin

Praktisches Jahr: 1. Tertial: Wahlfach Dermatologie in der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg  
2. Tertial: Fach Innere Medizin in der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg  
3. Tertial: Fach Chirurgie im Kantonsspital Uri, Schweiz

Berufliche Laufbahn: 2004: Assistenzarztstelle in der Chirurgie im Kantonsspital Uri, Schweiz  
Seit 2005: Assistenzarztstelle in der Medizinischen Klinik II (Schwerpunkt Gastroenterologie, Onkologie, Endokrinologie) des Leopoldina-Krankenhauses Schweinfurt

Würzburg, den 31.10.2006

A handwritten signature in black ink on a light green rectangular background. The signature is written in a cursive style and appears to read 'Julia Wach'.